Expressão de Fatores Peptídicos de Crescimento e regulação do Ciclo Celular em Células Adrenocorticais

Tese de doutoramento apresentada ao
Departamento de Bioquímica
Instituto de Química
Universidade de São Paulo - Brasil

Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

Co-orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

São Paulo - 23 de Outubro de 2003

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

Rebustini, Ivan Tadeu
R293ex Expressão de fatores peptídicos de crescimento e regulação
do ciclo celular em células adrenocorticais / Ivan Tadeu
Rebustini. -- São Paulo, 2003.
157p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Armelin, Hugo Aguirre

Co-orientador : Lotfi, Claudimara Ferini Pacicco

1. Biologia molecular 2. Biologia celular 3. Expressão
gênica I. T. II. Armelin, Hugo Aguirre, orientador. III. Lotfi,
Claudimara Ferini Pacicco, co-orientador.

574.88 CDD

"Expressão de fatores peptídicos de crescimento e regulação do ciclo celular em células adrenocorticais"

IVAN TADEU REBUSTINI

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

Aprovado por:

Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. OHARA AUGUSTO
IQ – USP

Profa. Dra. BETTINA MALNIC
IQ – USP

Profa. Dra. ANAMARIA ARANHA CAMARGO
LUDWIG

Profa. Dra. MARIA APARECIDA NAGAI
FM – USP

SÃO PAULO
23 DE OUTUBRO 2003.

Este trabalho e minha bolsa de doutoramento foram financiados pela FAPESP durante o período de outubro de 1999 a outubro de 2003 (processo FAPESP nº 99/07559-4) .

Agradecimentos

Sobre monstros e anjos...

"There is a destiny that makes us brothers. None goes alone. All that we send into the lives of others comes back into our own"

Durante meu doutoramento, um pouco antes de minha segunda viagem aos EUA, eu estava bastante apreensivo devido às pressões típicas de final de tese e a necessidade de tomar decisões rápidas em tempo hábil. Sobretudo, estava bastante relutante também porque, dentro do contexto da viagem, surgiram muitas dúvidas a respeito da guerra dos homens e da guerra dentro dos homens, principalmente no que diz respeito à minha fé pessoal.

Na noite do dia 10 de abril de 2003 embarquei no avião com destino a Washington tomado por sentimentos adversos de insegurança e de excitação, mas com expectativas um pouco diferentes das que antecederam minha primeira viagem, há alguns meses atrás, pois iria passar por um período relativamente longo fora de casa, longe dos amigos, dos familiares e do meu país, numa colaboração que abriria muitas portas futuramente. No entanto, ocorreu que, através da porta que abria caminho para um universo de grandes possibilidades, também havia sido liberada uma espécie de monstro interior, cuja natureza, difícil de se precisar com palavras, estava envolta por sentimentos de medo e de solidão.

Durante meu primeiro fim de semana nos EUA, muito bem instalado e assistido, ao caminhar pela West Cedar Lane em frente ao National Institutes of Health, em Bethesda, notei que esse monstro interior era maior do que havia imaginado, talvez o tenha alimentado ao sentir-me naturalmente desconfortável devido às barreiras culturais e lingüísticas típicas das primeiras semanas de adaptação, sobretudo dentro de um país que me parecia hostil, cujo governo humilhava o mundo com demonstrações de poder que eu repudiava. Entretanto, rapidamente pude perceber que havia pessoas comuns, como em qualquer outro lugar, que além de abrir as portas de suas casas, compartilhavam muitas de minhas opiniões. Aprendi que conviver com a diferença é muito mais fascinante, desafiador e complexo do que eu supunha, que deveria travar uma luta contra algumas de minhas limitações e não seria possível olhar para os lados, somente para dentro de mim mesmo. Senti-me muito solitário e um pouco triste nesse dia.

Injusto, sentir-se solitário e triste num contexto desses, com possibilidades e perspectivas tão favoráveis. Notei que a minha aparente independência adquirida ao longo de anos precisava ser reavaliada. Não se tratava simplesmente de passar algum tempo longe, na realidade eu jamais havia sido colocado à prova diante daquela situação. A insegurança em abraçar a causa tornava a responsabilidade mais inacessível do que de fato era. Tais pensamentos preencheram boa parte de meu tempo nesse dia.

Decidi caminhar, sem rumo aparente, para tornar claras as idéias. Segui pela West Cedar Lane até a Old Georgetown Road, em direção ao centro de Bethesda. Estava bastante frio, era começo de primavera em Maryland, mas uma tarde luminosa de sol. Embora estivesse vivendo uma situação relativamente comum dentro dos meios acadêmicos brasileiros, particularmente havia chegado aonde eu jamais imaginara antes e ainda sim, poderia tentar atingir alvos mais ambiciosos. Embora houvesse conquistado o direito de estar ali, senti-me de fato privilegiado por ser uma dessas pessoas capazes de tocar seus sonhos... Notei que havia rompido também as correntes que aprisionavam algo ainda maior dentro de mim, e uma inesperada sensação de paz começava a surgir. Naquele exato momento, operou-se uma espécie de milagre interior, havia transcendido sentimentos de medo e de solidão que me reduziam à condição de fugitivo de mim mesmo, e descobri uma coragem que não pensei existir, que me impulsionou a seguir adiante. Não me lembro de ter experimentado tanta paz como naquela tarde em Bethesda, quando descobri que a liberdade pode ser fria, mas é sempre luminosa... Aprendi a diferença entre ser só e estar só... E que meu medo de estar só talvez nada mais fosse do que meu medo de ser livre.

Sempre fui e ainda sou absolutamente bem afortunado nos quesitos família e amigos. Nasci num berço de valores humildes e simples, sobretudo entre pessoas generosas e boas. Fui presenteado ao longo da vida com amigos que considero parte do que sou, tanto os que estão ao meu lado quanto aqueles que estão afastados de meu convívio. Estas são minhas referências de vida - família e amigos. Aprendi que a solidão pode ser útil, pois a partir dela pude recorrer a essas referências de vida e buscar forças nelas, sobretudo reavaliei boa parte delas.

Durante o vôo noturno do dia 10 de abril eu observei as luzes da cidade de São Paulo e a miríade de pontos formando desenhos extraordinários no breu... Uma demonstração da grandeza dos feitos dos homens... Seria essa a visão dos anjos, se pudessem nos observar? Achei mágico poder observar a cidade como sempre imaginei que o fizessem os anjos... Se eu fixasse cada ponto isoladamente, certamente não teria essa visão de conjunto tão extraordinária como observar do alto todas as luzes ao mesmo tempo. Por isso, não acredito que exista uma única pessoa com tanta luz capaz de preencher todas as nossas expectativas e iluminar o caminho, assim como fixar somente um ou dois pontos não contribui para formar esse fascinante mosaico. Se cada um é insubstituível e ocupa um espaço único em nossas vidas, acredito que amar consista exatamente no exercício de manter todas as luzes acesas, ao mesmo tempo. Às vezes, as pessoas que amamos se vão, ou estão distantes, muitas vezes de uma maneira irreversível, mas acenderam, cada uma delas, uma centelha de luz e cabe a nós mantê-la acesa para sinalizar o caminho e seguir sempre adiante.

Por falar em milagres e anjos, devo confessar que sempre fui alguém muito preso às contingências do mundo real e um pouco avesso a valores religiosos. No entanto, do avião, eu imaginei anjos, ou qualquer outra criatura oriunda de nossa fé, observando a Terra e os homens. Lembrei de minha definição particular para anjos: seres que velam por nós, mas que não são como concebemos ser Deus... Podem até estar longe disso, ainda repletos de certas imperfeições... Ainda, acredito que eles possam estar muito mais próximos de nós do que imaginamos... E que muitos deles estão ao nosso lado! Manifestam-se através da bondade dos outros. Costumo brincar com o assunto, dizendo que Deus talvez tenha emprestado alguns de seus anjos para nos auxiliar aqui neste mundo, tamanha a bondade e a solicitude de algumas pessoas em determinadas fases de nossas vidas. Minha definição para anjo é essa, qualquer criatura, sobre-humana ou não, com mais ou menos imperfeições, mas muito bem intencionada, que nos auxilia a tornar possível nossa felicidade.

Em minha vida, há a presença constante desses "anjos" que reacenderam minha fé na humanidade, apesar de tudo, sobretudo minha fé em mim mesmo. Em última instância, minha fé em Deus, não que houvesse dúvidas a esse respeito, mas às vezes a truculência e a opressão do mundo deixam a nossa crença no divino em estado de latência. Talvez esse seja o maior milagre, reconhecer no outro, e em particular, em si mesmo, as manifestações muitas vezes sutis, mas inequívocas, da presença de Deus, e nunca se sentir solitário diante dos desafios impostos (escolhidos por nós?) pela vida.

Dedicatórias

Aos meus pais, Vera Lúcia e Ariovaldo, minhas referências primordiais de vida; ao meu irmão e amigo Fábio, e à minha cunhada e irmã de afinidade Suzana; à minha irmã e mais fiel escudeira Ilara, e à Camila, minha sobrinha (nosso pequeno-imenso presente); à minha avó Maria Luiza, meu maior exemplo de dedicação e de abnegação, e ao meu primo e amigo Vagner Tadeu.

Aos caros amigos e colegas de trabalho, pelo apoio moral e técnico e pelo excelente convívio diário ao longo de anos: Paula F. Asprino, Érico T. Costa, Carolina L. Bigarella, Gilson M. Murata, Alexandre D. Oliveira, Tatiana G. F. Matos, Kátia M. Rocha, Fábio L. Forti e Maria do Céu Q. S. Moraes (nossa amiga de além-mar).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hugo A. Armelin, pelo privilégio de ser um de seus alunos, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho em seu laboratório, e pela referência de excelência na carreira científica.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Claudimara F. P. Lotfi, pelo interesse e pela colaboração ao longo de nosso trabalho.

Aos ex-colegas de trabalho, mas para sempre amigos Míriam S. Moraes, Ana Paula Lepique e Nancy V. Bonilla (minha companheira para os cahorros-quentes durante os trabalhos de finais de semana).

À Telma T. Schwindt, pelos anos de convívio amigo, sempre juntos na alegria e na tristeza, na saúde e na doença... (não somos casados!). Em especial, ao apoio da dona Helena e do seu Francisco (pais da Telma), que sempre me acolheram dentro de um ambiente verdadeiramente amigo e familiar.

Às valiosas colaborações com a Profa. Dra. Patrícia Gama (análises de Microscopia de Fluorescência e Confocal) e com a Dra. Marcella Faria (pela amizade e pelos experientes conselhos que impulsionaram minha carreira para vãos mais distantes).

Ao apoio profissional e pessoal dos docentes do Departamento de Bioquímica: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, Profa. Dra. Ohara Augusto, Prof. Dr. Alexander H. Ulrich, Profa. Dra. Maria Júlia M. Alves e Prof.Dr. Ronaldo B. Quaggio.

Aos bons vizinhos, sempre solícitos e amigáveis: Marcelo, Cássio, Camila e Aurélio (e todos do Laboratório da Profa. Dra. Bianca Zingales); Sheila, Carlos, Irenice, Luciana e Karen (e todos do Laboratório da Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar); Marcelo, Denise, Edilaine e Berenice (e todos do Laboratório da Profa. Dra. Ohara Augusto) e à minha amiga Paromita Majunder (shanti!).

Ao pessoal das secretarias de Bioquímica e de Pós-Graduação: Simone e Viviane, Cibele e Milton.

Ao pessoal do NIDCR/NIH, que me acolheu tão bem durante minha colaboração em Washington-DC: Dra. Hynda K. Kleinman pela oportunidade profissional única e disposição de ajudar sempre, Dr. Matthew P. Hoffman, com quem trabalhei diretamente e pude trocar valiosas experiências profissionais, e também pela doação de reagentes necessários para trabalhar com RNAi em meu projeto no Brasil.

Aos amigos Wilson R. Toselli (meu amigo-irmão), Danilo Tovo (meu amigo "Danish"), Luciano A. Xavier (amigo desde antigas farras Federais!), Cristine Balliego, ex-aluna de iniciação científica (minha primeira cobaia humana!) e Jacqueline Salotti, a mais nova aluna de pós-graduação do laboratório (A última cobaia! Por enquanto...).

Índice

Resumo - página 10

Summary - página 11

Lista de Figuras - página 12

Lista de Tabelas - página 15

1. Introdução - página 16

- 1.1 Ciclo celular em eucariotos - página 17
- 1.2 Expressão gênica associada ao controle do ciclo celular - página 18
- 1.3 Fatores peptídicos de crescimento, mecanismos de ação e sua atividade biológica - página 19
- 1.4 Córtex supra-renal, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), células adrenocorticais e a linhagem celular Y-1 - página 21
- 1.5 ACTH, FGF2 e vias de sinalização associadas ao controle do ciclo celular - página 22
- 1.6 Produção de fatores peptídicos de crescimento *in vivo* e *in vitro* por células adrenocorticais - página 28
- 1.7 FGF e seu sistema de sinalização - página 29

2. Objetivos - página 31

- 2.1 Detecção e caracterização (seqüências de DNA) de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores expressos em células adrenocorticais - página 32
- 2.2 Investigar o papel funcional de FGF2, PDGF-A e PDGF-B e seus respectivos receptores em células adrenocorticais, e sua regulação sob estímulos de ACTH - página 33
- 2.3 Distribuição subcelular, compartimentalização de FGF2 e dos receptores para FGF detectados em células adrenocorticais, e sua implicação funcional - página 34

2.4 Bloqueio do sistema de sinalização promovido pelos receptores de FGF detectados em células adrenocorticais - página 35

3. Materiais e Métodos - página 38

3.1 Cultura celular - página 39

3.2 Obtenção de culturas primárias de células adrenocorticais - página 41

3.3 Carenciamento e estímulo de células em cultura - página 43

3.4 Purificação e extração de RNA total - página 44

3.5 Obtenção dos fragmentos de c-DNA - página 46

3.6 Amplificação e isolamento de plasmídeos - página 48

3.7 Subclonagem dos produtos de PCR e sua caracterização - página 50

3.8 Expressão de fatores peptídicos de crescimento em células Y-1 - página 52

3.9 Imunoprecipitação - página 56

3.10 Medidas de síntese de DNA através de incorporação de BrdU - página 57

3.11 “Northern blotting” - página 58

3.12 Transfecção celular - página 60

3.13 Digestões com enzimas de restrição - página 62

3.14 Obtenção da proteína de fusão FGF2/GFP - página 63

3.15 Interferência de RNA - página 65

4. Resultados - página 70

4.1 Detecção e caracterização (seqüências de cDNA) de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores expressos em células adrenocorticais - página 71

4.2 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e seus respectivos receptores - página 76

4.3 Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e seus receptores (PDGFR) - página 86

4.4 Regulação da expressão de FGF2 e de seus receptores em células adrenocorticais sob estímulo de ACTH - página 93

4.5 Distribuição subcelular de FGF2 em células adrenocorticais e sua implicação funcional - página 98

4.6 Bloqueio do sistema de sinalização de FGF em células adrenocorticais através de interferência de RNA (RNAi) - página 112

5. Discussão - página 120

5.1. Detecção e caracterização (seqüências de cDNA) de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores expressos em células adrenocorticais – página 121

5.2. Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF2) e seus receptores (FGFRs) – página 124

5.3. Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e seus Receptores (PDGFR) – página 130

5.4. Regulação da expressão de FGF2 e de seus receptores em células adrenocorticais sob estímulo de ACTH – página 131

5.5. Distribuição subcelular de FGF2 em células adrenocorticais e sua implicação funcional – página 133

5.6. Bloqueio do sistema de sinalização para FGF em células adrenocorticais através de interferência de RNA (RNAi) – página 136

6. Conclusões – página 139

6. Referências Bibliográficas - página 142

7. *Curriculum Vitae* - página 152

Resumo

ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) e fatores peptídicos de crescimento regulam a proliferação celular em células adrenocorticais. Resultados preliminares de ensaios biológicos, cromatografia de heparina-sefárose e “Western blotting” indicaram a produção de fatores peptídicos de crescimento das famílias de PDGF e de FGF na linhagem celular adrenocortical Y-1. No entanto a relação entre o estímulo promovido por ACTH e a expressão de fatores peptídicos de crescimento e sua contribuição para o controle do ciclo celular em células adrenocorticais ainda não estão definidas.

Os principais objetivos deste projeto consistiram em: 1. Detectar e caracterizar os fatores peptídicos de crescimento e seus correspondentes receptores expressos em células adrenocorticais; 2. Investigar a regulação da expressão de fatores peptídicos de crescimento sob o estímulo de ACTH; 3. Definir os mecanismos de ação para os fatores peptídicos de crescimento localmente expressos e sua contribuição na regulação do ciclo celular.

Os modelos experimentais utilizados foram: a linhagem Y-1 de células tumorais de adrenocorticais de camundongo e culturas primárias de células adrenocorticais de rato.

Os resultados obtidos foram: 1. Fatores peptídicos de crescimento e seus respectivos receptores, correspondentes a PDGF (A e B), FGF2 (isoformas de alto e de baixo peso molecular), IGF (1 e 2), TGF β (1, 2 e 3), VEGF-A, TGF α e EGF, foram detectados por RT-PCR e confirmados por clonagem e sequenciamento; 2. mRNAs correspondentes às formas de “splicing” alternativo para FGF2, bem como as isoformas de baixo (LMW-FGF2) e de alto (HMW-FGF2) peso molecular para a proteína FGF2 foram detectados em células Y-1. Os níveis basais de LMW-FGF2 foram aumentados sob estímulo de ACTH; 3. Com relação à distribuição subcelular em células adrenocorticais, LMW-FGF2 endógeno (produzido sob estímulo de ACTH) foi encontrado predominantemente no citoplasma, enquanto LMW-FGF2 exógeno (recombinante) foi internalizado para o núcleo de maneira dose e tempo-dependente; 4. Receptores para FGF foram detectados e caracterizados em células adrenocorticais. As isoformas detectadas, correspondentes a FGFR1b, FGFR2c e FGFR3b, foram reguladas sob tratamentos de ACTH e de FGF2. A expressão de FGFRs foi silenciada utilizando-se RNAs de interferência (RNAi), permitindo investigar a contribuição da sinalização promovida por FGF e seus receptores no ciclo celular.

Summary

ACTH and locally produced peptide growth factors regulate the proliferation in adrenocortical cells. Our previous results of biological assays, heparin-sepharose chromatography and Western blot indicated that PDGF and FGF-like factors are synthesized in Y-1 adrenocortical cell line. But the interaction among the ACTH stimulation and locally produced peptide growth factors, and their contribution for the cell cycle control, remains to be investigated.

The main objectives of these project were: 1. To characterize peptide growth factors and their respective receptors expressed in adrenocortical cells; 2. To investigate the regulation of the expression of peptide growth factors under ACTH stimulation; 3. To find the mechanism of action of the locally produced peptide growth factors and to determine their contribution in the cell cycle control. The experimental models utilized were the Y-1 mouse adrenocortical cell line and primary cultures from rat adrenocortex.

The results found were: 1. Several peptide growth factors and their respective receptors, corresponding to PDGF (A and B), FGF2 isoforms, IGF (1 and 2), TGF β (1, 2 and 3), VEGF-A, TGF α and EGF were detected by RT-PCR and confirmed by cloning and sequencing; 2. Two mRNAs splicing variants, as well the low (LMW-FGF2) and the high (HMW-FGF2) molecular weigh isoforms for FGF2 were detected in adrenocortical cells. The very low basal level of the endogenous LMW-FGF2 in untreated cells was up regulated after the ACTH stimulation; 3. In regard to the intracellular distribution of FGF2 in adrenocortical cells, the endogenous (ACTH induced) LMW-FGF2 was found predominantly in he cytoplasm, but the exogenous (recombinant) LMW-FGF2 was internalized into the nucleus in a time and dose dependent manner; 4. FGFRs corresponding to FGFR1b, FGFR2c and FGFR3b isoforms were detected and characterized in adrenocortical cells. All of them were up regulated under ACTH and FGF2 treatments. The expression of FGFRs could be silenced by RNAi approach, allowing to investigate the contribution of the FGF signaling for the cell cycle control.

Lista de Figuras

1. Introdução

Figura 1 - Linhagem celular Y-1 e resposta a ACTH (página 22)

Figura 2-a) Ativação de receptores de 7 hélices acoplados à proteína G heterotrimérica (página 25)

Figura 2-b) Vias de transdução de sinal associadas à transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ do ciclo celular (página 25)

2. Objetivos

Figura 3 - Metodologias utilizadas para interferência de RNA (página 37)

3. Materiais e Métodos

Figura 4 - Obtenção de culturas primárias de células adrenocorticais de rato (página 42)

Figura 5 - Procedimentos para transfecções transientes dos siRNAs em células Y-1 (página 61)

Figura 6 – Obtenção da proteína de fusão a GFP para LMW-FGF2 (página 63)

Figura 7 - Oligonucleotídeos específicos para obtenção de LMW-FGF2 contendo adaptadores para Xho I e Hind III (página 64)

Figura 8 - Bloqueio da expressão gênica através da degradação específica de mRNAs (página 66)

Figura 9 - Desenho dos oligonucleotídeos contendo repetições invertidas para subclonagem em pSUPER e utilização em RNAi (página 67)

Figura 10 - Duplas-fitas sintéticas de DNA para subclonagem em pSUPER (página 68)

Figura 11 - siRNAs sintéticos utilizados em ensaios de interferência de RNA (página 69)

4. Resultados

Figura 12 - Verificação através de PCR da subclonagem de fragmentos de c-DNA em pMOSBlue recombinantes (página 73)

Figura 13 - Posição dos oligonucleotídeos (em pMOSBlue) utilizados para verificar a presença dos insertos através de PCR (página 74)

Figura 14: “Northern blotting” para detectar isoformas de mRNAs para FGF2 (página 76)

Figura 15-a) Eletroforese em gel de agarose dos c-DNAs obtidos por RT-PCR correspondentes aos mRNAs “canônico” e ao produto de “splicing” alternativo para FGF2 (página 77)

Figura 15-b) Análise de similaridade de sequência de DNA para os c-DNAs (canônico e alternativo) de FGF2 detectados e em células Y-1 (página 77)

Figura 16 – Isoformas para FGF2 expressas em células Y-1 e em linhagens celulares controle (página 78)

Figura 17 – Purificação de anti-FGF2 por imunoprecipitação e demonstração da presença de isoformas de LMW- e HMW-FGF2 em células Y-1 (página 80)

Figura 18 – Detecção de diferentes FGFRs em células adrenocorticais Y-1 através de RT-PCR (página 81)

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para FGFRs, em células adrenocorticais Y-1 e em MCF-7 (página 82)

Figura 20-a) Sequências de c-DNA obtidas (RT-PCR e sequenciamento) e peptídicas (previstas) para os fragmentos de FGFR1b detectados em células adrenocorticais Y-1 (página 83)

Figura 20-b) Sequências de c-DNA obtidas (RT-PCR e sequenciamento) e peptídicas (previstas) para os fragmentos de FGFR2c detectados em células adrenocorticais Y-1 (página 84)

Figura 20-c) Sequências de c-DNA obtidas para FGFR3b em células adrenocorticais Y-1 (página 85)

Figura 21 – c-DNAs detectados por RT-PCR e caracterizados (sequenciamento) para PDGF-B (página 87)

Figura 22 - Detecção de diferentes PDGFRs em fibroblastos Balb3T3 (clone A31) através de RT-PCR (página 89)

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de RT-PCR para detecção de PDGFRs em fibroblastos Balb3T3 (clone A31) (página 90)

Figura 24-a) Sequências de c-DNA obtidas (RT-PCR e sequenciamento) e peptídica (deduzida) para as diferentes regiões de PDGFR- α , para células Balb3T3 (clone A31) (página 91)

Figura 24-b) Sequências de c-DNA obtidas (RT-PCR e sequenciamento) e peptídica (deduzida) para as diferentes regiões de PDGFR- β , para células Balb3T3 (clone A31) (página 92)

Figura 25 – “Western blotting” para FGF2 expresso em células Y-1 sob estímulo de ACTH (página 93)

Figura 26-a) Imunoperoxidase para FGFR1b em células Y-1 (página 95)

Figura 26-b) Imunoperoxidase para FGFR2c em células Y-1 (página 96)

Figura 26-c) Imunoperoxidase para FGFR3b em células Y-1 (página 97)

Figura 27 - “Western blotting” e curva de dose-resposta para FGF2 (recombinante) em células Y-1 (página 99)

Figura 28-a) Microfotografias correspondentes a experimentos de imunoperoxidase para FGF2 em células FHN (página 101)

Figura 28-b) Microfotografias correspondentes a experimentos de imunoperoxidase para FGF2 em células Y-1 (página 102)

Figura 29-a) Imunofluorescência para detecção de FGF2 em células FHN (página 104)

Figura 29-b) Controle negativo para o anticorpo secundário anti-IgG (Cy2) utilizado em imunofluorescências, em células adrenocorticais Y-1 (página 104)

Figura 29-c) Imunofluorescência para detecção de FGF2 em células adrenocorticais Y-1 carenciadas (página 104)

Figura 30 – Diferentes localizações subcelulares para LMW-FGF2 endógeno e LMW-FGF2 exógeno em células adrenocorticais Y-1 (página 106)

Figura 31-a) Análise de co-localização (“profile”) entre padrões de fluorescência para FGF2 e EtBr em células adrenocorticais Y-1 sob estímulo de ACTH (página 107)

Figura 31-b) Análise de co-localização (“profile”) entre padrões de fluorescência para FGF2 e EtBr em células adrenocorticais Y-1 sob estímulo de FGF2 (página 107)

Figura 32 – Varredura através de LSCM, em diferentes profundidades, e padrões de distribuição de FGF2 em células adrenocorticais Y-1 (página 109)

Figura 33 – Localização nuclear de FGF2 exógeno em células adrenocorticais Y-1 (página 109)

Figura 34 – Obtenção de LMW-FGF2 fusionado a GFP (“green fluorescent protein”) (página 111)

Figura 35 – Testes de transfecção transiente de siRNAs em células adrenocorticais Y-1 (página 113)

Figura 36 – Curvas de saturação obtidas por RT-PCR para FGFR1, FGFR2 e FGFR3 (página 115)

Figura 37 – Efeitos de siRNAs na indução da degradação específica de mRNAs para FGFR1 e FGFR2 (página 117)

Figura 38 – Microfotografias representativas de experimentos de bloqueio da expressão de c-Fos em células adrenocorticais Y-1 tratadas com siRNAs específicos para FGFR1 e FGFR2 (página 118)

Figura 39 – Bloqueio da expressão de c-Fos em células adrenocorticais Y-1 tratadas com siRNAs específicos para FGFR1 e FGFR2 (página 119)

4. Discussão

Figura 40 – “Splicing” alternativo para FGF2 (página 122)

Figura 41 – Mecanismo proposto para a geração de isoformas de FGF2 a partir de um único mRNA (página 124)

Figura 42 – Organização genômica e geração de diferentes isoformas para FGFRs (página 126)

Figura 43 – Vias distintas de sinalização propostas para FGF2 endógeno e FGF2 exógeno em células adrenocorticais Y-1 (página 133)

Lista de Tabelas

2. Materiais e Métodos

Tabela 1 - Linhagens celulares estabelecidas e culturas primárias (página 40)

Tabela 2 - Oligonucleotídeos para RT-PCR e reações de sequenciamento (página 47)

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados (página 49)

Tabela 4 - Inibidores de protease e de fosfatase (página 53)

Tabela 5 - Volumes de soluções de Lipofectamina utilizados em experimentos de transfecção celular (página 62)

Tabela 6 - Enzimas de restrição (página 62)

3. Resultados

Tabela 7 - Fragmentos de c-DNA detectados e caracterizados em células adrenocorticais Y-1 (página 72)

Tabela 8 - pMOSBlue recombinantes contendo fragmentos de c-DNA (RT-PCR) correspondentes a fatores peptídicos de crescimento e seus receptores (página 75)

Tabela 9 - Padrões de localização para FGF2 medidos através de imunoperoxidase em células adrenocorticais Y-1 e FHN (página 100)

4. Discussão

Tabela 10 - Principais categorias de fatores peptídicos de crescimento, expressos no córtex supra-renal e seus efeitos no tecido adulto (homeostase) e no tecido fetal (desenvolvimento) (página 121)

Tabela 11 - Efeitos de ACTH na expressão de fatores peptídicos de crescimento no córtex supra-renal (página 129)

1. Introdução

1.1.Ciclo celular em eucariotos

Os pré-requisitos necessários para iniciar a resposta proliferativa em eucariotos são a sinalização extracelular, promovida por hormônios e fatores peptídicos de crescimento, a transdução do sinal extracelular, a partir de receptores específicos e de proteínas intracelulares e a ativação da expressão de genes responsáveis pelo controle do ciclo celular ^(1 e 2).

O ciclo celular consiste numa série de eventos que levam a célula a iniciar o processo de divisão celular, cada um deles correspondendo à ativação de respostas específicas que caracterizam as diferentes fases do ciclo celular ⁽³⁾.

A fase G1 consiste nos primeiros eventos de ativação de proteínas pré-existentes cujos principais representantes são receptores específicos (transmembranares ou intra-celulares), que reconhecem o sinal extracelular (moléculas sinalizadoras, como hormônios e fatores de crescimento), e proteínas intracelulares, que ativadas amplificam a resposta ao sinal extracelular num processo conhecido como transdução de sinal. A transdução de sinal irá culminar com a fosforilação de fatores de transcrição no núcleo e a expressão de genes de resposta primária (independentes de síntese protéica), essenciais para a ativação da expressão de genes de resposta secundária, cujos principais representantes consistem em ciclinas e em suas respectivas quinases específicas (CDKs). A ação concertada entre receptores e moléculas transdutoras de sinal, e a expressão de genes de resposta primária e secundária promovem a progressão em G1 e o início da síntese de DNA.

O primeiro ponto de regulação do ciclo celular encontra-se na transição G1→S e consiste na fosforilação de Rb pelos complexos formados entre ciclinas e CDKs e a ativação do fator geral de transcrição E2F. O controle da expressão e da degradação de diferentes ciclinas e da atividade de suas correspondentes CDKs ocorre ao longo de todas as fases do ciclo celular, sendo fundamental para a manutenção correta da divisão celular. A partir da fosforilação de Rb e da liberação de E2F, há um comprometimento com a progressão do ciclo celular, concomitante com o início da síntese de DNA (ou fase S). Após a síntese de DNA a célula inicia a preparação para a mitose, correspondente à fase G2. Nessa etapa ocorre outro importante ponto de regulação, com a ativação da proteína p53 responsável por detectar erros de replicação (mutação no DNA) e material genético não duplicado (essa regulação será discutida na seção 1.2).

A mitose (ou fase M) consiste na divisão celular propriamente dita, caracterizada pela condensação e segregação dos cromossomos e pela desorganização da estrutura da membrana nuclear. Após a segregação dos cromossomos, a membrana nuclear é novamente organizada e ocorre citocinese (divisão do material citoplasmático).

Células pós-mitóticas podem deixar o ciclo celular e permanecer por dias, semanas, ou em alguns casos indefinidamente sem proliferar, num estado conhecido como quiescência (ou fase G0). O estado de quiescência corresponde a um repouso por tempo indeterminado, no entanto a célula pode manter seu potencial proliferativo (hepatócitos são um exemplo típico), ou não apresentar taxa de proliferação (células terminalmente diferenciadas, como neurônios).

O estado G0 pode ser experimentalmente induzido em linhagens celulares cultivadas. Consiste em sincronizar todas as células fora do ciclo celular, retirando do meio de cultura fatores que induzem a proliferação (hormônios e fatores peptídicos de crescimento), mantendo apenas o meio de cultura mínimo contendo precursores de biomoléculas (açúcares, aminoácidos, polissacarídeos), vitaminas e sais minerais necessários à sobrevivência celular.

Cabe ressaltar que a sinalização celular promovida por hormônios e fatores de crescimento e a expressão gênica associada à transdução de sinal nem sempre são elementos suficientes para promover a proliferação celular. Muitos outros fatores estão associados à resposta proliferativa, como inibição de proliferação celular devido ao contato célula-célula, mobilização de proteínas armazenadas na superfície e na matriz extracelular, e descontrole da proliferação celular associado à perda de adesão celular e polaridade (orientação das células dentro de um tecido), em processos de formação de tumores ⁽⁴⁾.

1.2. Expressão gênica associada ao controle do ciclo celular

A ativação específica da expressão de proto-oncogenes e de genes supressores de tumor ao longo do ciclo celular regula todos os eventos associados à proliferação. Alterações na expressão de proto-oncogenes, como mutações, deleções e amplificações tanto dos genes como de seus produtos finais (proteínas reguladoras) podem levar à transformação celular e ao desenvolvimento de neoplasias.

Os proto-oncogenes codificam para todas as classes de proteínas envolvidas no sistema de sinalização que controla o ciclo celular ⁽⁵⁾. Pode-se citar como exemplos clássicos os genes *c-sis* e *c-int-2*, cujos produtos são os fatores de crescimento PDGF-B e FGF-3 ⁽⁶⁾, respectivamente; *c-erbB* e *c-erbA*, que codificam, respectivamente, os receptores para EGF (“Epidermal Growth Factor”) e para o hormônio tireoidiano; *c-src* e *c-mos*, proto-oncogenes de proteínas citoplasmáticas com atividade quinásica (tirosina e serina/treonina quinases), cujos homólogos virais foram descobertos em sarcomas de Rous e de Moloney, respectivamente; e o oncogene *c-ras* e seus homólogos *H-ras*, *Ki-ras* e *N-ras*.

Outra importante classe de proto-oncogenes codifica fatores de transcrição essenciais para a progressão da transição G1→S e são amplamente utilizados como marcadores de início de resposta

proliferativa. São denominados genes de resposta primária e os exemplos mais conhecidos são *c-fos* e *c-jun* (que codificam fatores de transcrição do complexo AP-1) ⁽⁵⁾. Esses genes em geral possuem um pico máximo de transcrição entre em 15 a 30 minutos e de tradução entre 2 a 3 horas após o estímulo mitogênico.

Anti-oncogenes ou genes supressores de tumor antagonizam o efeito proliferativo mediado pelos proto-oncogenes. Os exemplos mais importantes são os genes *rb* (retinoblastoma) e *p53*.

A proteína codificada por *rb* tem sua atividade regulada por ciclinas e CDKs específicas ⁽⁷⁾. Durante o ciclo celular, genes de resposta secundária codificam para proteínas de alto “turn-over” conhecidas como ciclinas, que se associam a quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e promovem a progressão do ciclo celular na fase G1 através da fosforilação de Rb (reguladora da atividade do fator de transcrição E2F), e da dissociação do complexo Rb/E2F, liberando esse fator de transcrição essencial para progressão do ciclo celular.

O supressor de tumor p53 encontra-se mutado em cerca de 80% dos tumores descritos até o momento e atua em pontos específicos no ciclo celular, conhecidos como “check points” ⁽⁸⁾. Os principais exemplos consistem na regulação da expressão de genes das famílias Kip (p21, p27 e p57) e INK (p16, p15, p18 e p19), que inibem a formação dos complexos ciclina/CDK, a fosforilação de Rb e a ativação da transcrição por E2F, e também no envolvimento de p53 com vias de ativação de caspases na mitocôndria e indução de apoptose ⁽⁹⁾.

1.3. Fatores peptídicos de crescimento, mecanismos de ação e sua atividade biológica

A investigação de peptídeos ativos na regulação da proliferação celular iniciou-se com a utilização de extratos de tumores, glândulas salivares (Levi-Montalcini e Hamburger, 1953), e de tecidos de sarcomas (Cohen, 1960) na indução de proliferação celular de fibroblastos em cultura. Na tentativa de isolar o fator responsável pela ativação de células neurais *in vitro*, que mais tarde seria identificado como NGF (“Neural Growth Factor”), foi isolado EGF (“Epidermal Growth Factor”) de extratos de glândulas salivares, sendo responsável por causar a erupção pré-matura de dentes incisivos em ratos (Cohen, 1962) ^(10, 11). Após a detecção e caracterização de EGF e de seu correspondente sistema de receptores, outros peptídeos ativos, análogos à insulina (um hormônio peptídico) foram detectados no plasma humano, e as seqüências de aminoácidos correspondentes a IGF-I e IGF-II (“Insulin-like Growth Factor”) foram obtidas (Rinderknecht e Humbel, 1976). A existência de FGF (“Fibroblast Growth Factor”) foi proposta por Armelin ⁽¹²⁾ e confirmada por Gospodarowicz ⁽¹³⁾, sendo posteriormente caracterizado para uma série de tecidos de origem endo e exodérmica ⁽¹⁴⁾. Outras famílias de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores

também foram descobertas e caracterizadas: PDGF (“Platelet-derived Growth Factors”) ⁽¹⁵⁾, purificado de plaquetas, mas presente em placenta humana e em linhagens de células normais e transformadas, TGF α (“Transforming Growth Factor α ”), um peptídeo com homologia a EGF, isolado de meio de cultura condicionado por linhagem melanoma (Marquardt e Todaro, 1982), a família de TGF β (“Transforming Growth Factor β ”), isolados de plaquetas e placenta humanas (Assoian e Frolik, 1983) e VEGF (“Vascular Endothelial Growth Factor”) ⁽¹⁶⁾.

Fatores peptídicos de crescimento podem regular o ciclo celular promovendo a transição G0→G1, a progressão através de G1 com a entrada em S, e a progressão através de G2, bem como inibir a resposta mitogênica e a síntese de DNA, tanto *in vivo* como *in vitro* ⁽¹⁷⁾. Exemplos disso são os efeitos mitogênicos de FGF-2 em células em cultura ^(7 e 8), como em fibroblastos Balb3T3 e em linhagens clonais de córtex adrenal (Y-1), efeito muito bem estabelecido em nosso laboratório ^(18, 19). Os efeitos anti-mitogênicos podem ser ilustrados pela ação de TGF- β na ativação de fatores de transcrição específicos (SMADs) responsáveis pela regulação de proteínas inibidoras de ciclo celular das famílias Kip (p21 e p27) e INK (p16, p15), que interferem na interação de ciclinas com CDK ⁽²⁰⁾.

Os mecanismos de ação para fatores peptídicos de crescimento são distintos dos hormônios. Os primeiros possuem ação local e restringem-se à própria célula que os produzem (sinalização autócrina) ou às células e tecidos vizinhos (sinalização parácrina), e em geral sua meia-vida limita-se ao período de minutos ou no máximo algumas horas. Hormônios têm ação endócrina, e requerem o transporte na corrente sanguínea para atuar em tecidos distantes de seu local de produção, podendo permanecer na circulação por horas ou mesmo dias, e em geral possuem ação sistêmica. Como principais exemplos de mecanismos de ação para fatores de crescimento podemos citar a existência de alças autócrinas associadas a desordens proliferativas e formação de tumores ^(21, 22), bem como em formas de regulação normal do ciclo celular como sobrevivência de neurônios *in vitro* através da expressão de NGF (“Neuronal Growth Factor”) ⁽²³⁾.

Efeitos parácrinos de fatores peptídicos de crescimento também são observados em células de tecidos normais, como angiogênese promovida por VEGF e FGF, modulação de resposta imune através de recrutamento de macrófagos induzidos pela sinalização de PDGF, e em distúrbios patológicos, como a sinalização de FGF e o recrutamento de fibroblastos em processos de fibrose cística e a ativação de enzimas proteolíticas envolvidas em adesão celular e desenvolvimento de metástases.

Uma proposta relativamente recente sugere que fatores peptídicos de crescimento podem agir de forma intrácina ⁽²⁴⁾, isto é, atuando de maneira exclusivamente intracelular. Os mecanismos dessa ação intrácina ainda são muito obscuros, embora haja relatos de interações das isoformas de FGF2 de alto peso molecular (HMW-FGF2s) com proteínas nucleares, como nucleolina, responsável pela

organização de nucléolos ⁽²⁵⁾. CKII, uma serina/treonina quinase presente no citoplasma e no núcleo de todas as células eucarióticas, é formada por duas subunidades α e duas subunidades β , e fosforila uma série de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, como p53 e nucleolina. A adição de FGF2 a núcleos isolados de fibroblastos 3T3 em G0 induz a fosforilação de nucleolina, um substrato para CKII, que atua no metabolismo do pré-RNA ribossômico e na organização de nucléolos. FGF2 promove a ativação de CKII interagindo diretamente com sua subunidade β (FGF1, insulina, NGF ou EGF não promovem essa ativação), e os complexos FGF2/CKII são encontrados exclusivamente durante a transição G1→S.

1.4. Córtex adrenal, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), células adrenocorticais e a linhagem celular Y-1

A glândula supra-renal é formada pelo córtex (85-90% de sua massa) e pela medula (responsável pela secreção de adrenalina e noradrenalina). O córtex é formado por três tipos de células com morfologias distintas: células glomerulosas (próximas à cápsula da glândula supra-renal), células fasciculadas e células reticulares (camadas mais internas, próximas à medula).

As funções do córtex adrenal consistem na síntese e na secreção de hormônios esteróides, fenômeno conhecido como esteroidogênese. Células da zona fasciculada produzem glicocorticóides (cortisol e cortisona), enquanto células glomerulosas produzem mineralocorticóides (aldosterona).

O passo limitante da esteroidogênese é a translocação do colesterol no interior da mitocôndria, onde a enzima p450_{scc} (proteína integral da membrana interna da mitocôndria) promove a clivagem da cadeia lateral do colesterol ⁽²⁶⁾, permitindo assim as próximas etapas de formação de pregnolenona, que deixa a mitocôndria (provavelmente por difusão passiva) e no retículo endoplasmático, é convertida em desoxi-corticosterona (roedores) e desoxi-cortisol (humanos, bovinos e suínos), que retornam para a mitocôndria e dão origem a corticosterona e cortisol, respectivamente, pela ação da enzima p450_{11 β} .

ACTH (hormônio adrenocorticotrópico ou corticotropina) é produzido pela hipófise e consiste num peptídeo de 39 aminoácidos ⁽²⁶⁾, gerado pela clivagem da pró-opiomelanocortina (POMC), uma glicoproteína de 241 aminoácidos precursora de diversos hormônios hipofisários. ACTH liga-se a receptores transmembranares ⁽²⁷⁾ acoplados à proteína G responsáveis pela ativação da adenilato ciclase e, conseqüentemente, promovendo o aumento dos níveis de c-AMP. O processo de mobilização do colesterol é dependente de c-AMP, que também regula a transcrição das citocromo p450 hidroxilases ⁽²⁸⁾. Dessa forma, ACTH atua diretamente na regulação da

esteroidogênese. Análogos de c-AMP (dibutilil c-AMP e 8-Br-c-AMP) mimetizam a ativação da esteroidogênese por ACTH ⁽²⁹⁾, indicando que este processo é dependente de c-AMP.

Outras proteínas reguladas por ACTH são a HMG-CoA-Redutase (envolvida na biossíntese de colesterol), o receptor de LDL (responsável pelo reconhecimento do colesterol livre no plasma), a colesterol esterase (produz colesterol livre a partir de ésteres armazenados), a SCP-2 (proteína transportadora de colesterol até a mitocôndria) e a proteína StAR (“steroidogenic acute regulatory”), um componente essencial de transferência de colesterol da membrana externa para a membrana interna da mitocôndria ⁽³⁰⁾.

Y-1 é uma linhagem clonal de células derivadas de tumor funcional de córtex adrenal de camundongos ^(31, 32), sendo o mais importante modelo experimental utilizado na investigação da regulação do ciclo celular em células adrenocorticais *in vitro*. Apresenta como principais características de transformação celular a amplificação do proto-oncogene *c-Ki-ras* e a transcrição parcialmente desregulada do proto-oncogene *c-myc* ^(33, 34). No entanto, ainda mantém resposta funcional a ACTH (esteroidogênese e alteração morfológica através de arredondamento celular, como ilustrado pela figura 1) e expressão de altos níveis do receptor para ACTH.

Figura 1 - Linhagem celular Y-1 e resposta a ACTH. 1-a) Células em crescimento exponencial (DMEM, 10%FCS). 1-b) Células sincronizadas (induzidas à fase G0 do ciclo celular) e estimuladas com ACTH (1nM, 30 minutos após estímulo).

1.5. ACTH, FGF2 e vias de sinalização associadas ao controle do ciclo celular

Uma vez atendidos aos pré-requisitos necessários para o início da resposta proliferativa, a célula inicia o ciclo celular, cujo principal controle ocorre durante a transição G0→G1→S. Fatores peptídicos de crescimento e hormônios regulam essa transição através da interação com receptores transmembranares com atividade tirosina quinase ⁽³⁵⁾ ou associados à proteína G (respectivamente)

⁽³⁶⁾. FGF2 e ACTH são exemplos de moléculas sinalizadoras extracelulares que promovem a transdução de sinal a partir da ativação de receptores transmembranares associados respectivamente a estas duas vias de sinalização. Na figura 2, estão representadas as vias clássicas de transdução de sinal a partir desses receptores e as interações entre os sinais iniciados nos mesmos.

A ativação, tanto do receptor quanto das proteínas que compõem a cascata de sinalização, ocorre através da fosforilação de resíduos específicos de aminoácidos para promover a atividade quinásica intrínseca dessas proteínas, que podem ser do tipo tirosina-quinase e serina/treonina quinase, de acordo com os aminoácidos fosforilados para sua ativação.

A regulação do crescimento pode ser mediada por diferentes receptores, para diferentes famílias de moléculas. Alguns deles são receptores associados à proteína G, a fatores de crescimento, a citocinas ou a moléculas de adesão celular e antígenos, e podem ativar diferentes vias de transdução de sinal responsáveis pela expressão gênica. A seguir, serão descritas algumas das vias de transdução de sinal atualmente bem estabelecidas para hormônios e para fatores de crescimento.

Via de transdução de sinal iniciadas através da ativação de receptores tirosina-quinase

Fatores de crescimento ativam seus respectivos receptores através de sua dimerização e a subsequente fosforilação cruzada dos mesmos em domínios ricos em tirosina. A atividade quinásica dos receptores resulta em sua fosforilação, responsável pela ativação da via de transdução de sinal da proteína Ras (“Rat sarcoma virus”) ⁽³⁵⁾.

Células de mamíferos podem conter 3 genes homólogos para Ras: *H-ras* (“Harvey sarcoma vírus”), *N-ras* (“NIH3T3-cell transforming oncogene”) e *Ki-ras* (“Kirsten sarcoma vírus”), este último com 2 formas de “splicing” alternativo variantes na sequência amino-terminal. Os genes para Ras são parte de uma superfamília de genes que codificam pequenas proteínas que se ligam a nucleotídeos de Guanina (proteínas G). Em sua forma inativa, Ras encontra-se ligada a GDP, ancorada à membrana. A ativação de Ras requer proteínas adaptadoras GRB2, que se ligam através de domínios específicos tipo SH2 (“Src-Homology”). Os domínios SH3 de GRB2, por sua vez, são reconhecidos por proteínas dos tipos GEF (“Guanine-nucleotide exchange factor”), e Sos (“soon of sevenless”, descrito inicialmente em *Drosophila*), que promovem a troca de GDP por GTP em Ras, ativando-a. Ras é desativada pela interação com proteínas tipo GAP (“GTPase activating proteins”), como p¹²⁰Ras GAP e NF-1 (neurofibrina) ⁽³⁵⁾, que induzem a atividade GTPásica de Ras (hidrólise de GTP).

Ras ativada liga-se ao domínio aminoterminal de Raf (Serina/Treonina quinase) que promove a fosforilação de um conjunto de serina/treonina quinases conhecidas como MEK (“Map-Erk kinase”), responsável pela fosforilação de outras proteínas tipo MAP quinase (“Mitogenic Activating

Protein”) ⁽³⁵⁾, como ERK 1 e 2 (“extra-cellular signal regulated kinase”), JNK (“Jun-activated kinase”) e SAPK (“stress-activated protein kinase), que fosforilam fatores de transcrição no núcleo e ativam a transcrição da família de genes de resposta primária *fos* e *jun* ⁽³⁷⁾.

MAPKs fosforiladas migram para o núcleo e ativam fatores que se ligam a seqüências de DNA específicas, promovendo o início da transcrição gênica. Os fatores de transcrição mais conhecidos são a proteína CREB (“CRE binding”), ativada pela subunidade catalítica de PKA (proteína quinase A), e que se liga a seqüências de DNA conhecidas como CRE (“c-AMP response element”), TCF (“ternary complex factor) e SRF (“serum-response factor”), fatores de transcrição que interagem com seqüências regulatórias de DNA conhecidas como SER (“serum-response element”), formando um complexo ternário responsável pela transcrição de genes de resposta primária. Outras classes de fatores de transcrição ativados por MAPKs compõem a família dos TCF (“ternary-complex factors”) Elk-1 (Ets-like transcription factor) e SAP-1 (“SRF accessory protein ou stress-activating protein”).

Via de transdução de sinal associadas a receptores acoplados à proteína G

Receptores acoplados à proteína G promovem a cascata de fosforilação responsável, entre outros fenômenos, pelo aumento dos níveis de c-AMP intra-celulares (figura 2b) ⁽³⁶⁾. O receptor para ACTH é um exemplo típico ⁽²⁷⁾, e consiste numa proteína de 297 aminoácidos que possui 7 segmentos hidrofóbicos, em α -hélice, transmembranares, e 2 sítios de glicosilação no domínio amino-terminal, além de seqüências de fosforilação para PKA e PKC.

Proteínas G heterotriméricas consistem de três subunidades: β e γ (de 35 e de 7 Kda, respectivamente) e a subunidade α (45 KDa), com atividade GTPásica (analogamente a Ras) (figura 2a). A ativação do receptor provoca uma mudança conformacional que promove o estímulo da troca de GDP por GTP pela subunidade α . A subunidade α , ligada a GTP, dissocia-se das demais subunidades (β e γ), ativando a enzima adenilato ciclase, e promovendo conversão de ATP em c-AMP, aumentando seus níveis intracelulares (figura 2b).

Figura 2-a

Figura 2-b

Figura 2-a) Ativação de receptores de 7 hélices acoplados à proteína G heterotrimérica. As subunidades α e $\beta\gamma$ permanecem ancoradas à membrana citoplasmática.

Figura 2-b) Vias de transdução de sinal associadas à transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ do ciclo celular. A relação temporal entre as ondas de transcrição/tradução gênicas que ocorrem ao longo da transição $G_1 \rightarrow S$, para a linhagem celular Y-1, está indicada.

A Via de PKA

Os efeitos de c-AMP são mediados por PKA (“protein Kinase A” ou proteínas quinases dependentes de c-AMP), um tetrâmero com duas subunidades regulatórias (R) de 49 KDa e duas subunidades catalíticas (C), de 38 KDa. Nessa forma, PKA é inativa. A constante de afinidade entre as subunidades regulatória e catalítica é da ordem de 0,2 nM, e com a ligação de c-AMP às subunidades catalíticas, ocorre a diminuição da constante de afinidade da ordem de 10^4 vezes, ocasionando a dissociação do tetrâmero e a liberação das subunidades catalíticas, que estão agora com seus domínios de atividade expostos. As subunidades catalíticas migram para o núcleo e podem ativar fatores de transcrição como CREB (figura 2b).

Via de PKC

A via de PKC pode ser ativada a partir de receptores de tirosina-quinase ou de sete hélices transmembranares. Envolve a ativação de PKC (Proteína quinase dependente de Ca^{2+}) por DAG (Diacil glicerol) ou agentes que mimetizam seus efeitos, como o éster de forbol PMA (“Phorbol-12 myristate-13 acetate”), que tem sido utilizado para investigar o envolvimento de PKC em proliferação celular⁽³⁸⁾.

Proteínas G- α ligadas a GTP promovem a ativação de fosfolipases de membrana (PLC), responsável pela hidrólise do fosfolípido de membrana fosfatidil-inositol 4, 5 bifosfato (PIP_2), gerando DAG (diacilglicerol) e IP_3 (inositol 1,4,5 trifosfato). IP_3 promove a abertura de canais de Ca^{2+} do retículo endoplasmático. Ambos os efeitos, presença de DAG e aumento de Ca^{2+} intracelular promovem a ativação de PKC. DAG interage com o sítio regulatório de PKC, promovendo sua ativação. Dessa forma, PKC pode controlar a atividade de outras quinases envolvidas na regulação da transcrição gênica (figura 2b).

Transdução de sinal associada a ACTH

Animais hipofisectomizados têm como principal característica de anomalia a atrofia no córtex supra-renal e a diminuição da esteroidogênese, situação que pode ser revertida pela administração de ACTH exógeno. No entanto, há indícios de que ACTH pode não ser suficiente para reverter a atrofia do córtex supra-renal, induzida experimentalmente em animais hipofisectomizados, demonstrando que o mesmo não é essencialmente mitogênico *in vivo* como se supunha. O processamento do fragmento N-terminal de POMC denominado γ -pró-melanotropina parece ocorrer também no córtex supra-renal (através da ação de serina-proteases que ainda não

foram completamente caracterizadas), liberando estequiometricamente ACTH e um peptídeo N-terminal que possui atividade mitogênica local ⁽³⁹⁾. Em linhagens celulares (especificamente Y-1) e culturas primárias adrenocorticais, ACTH promove a alteração do citoesqueleto, esteroidogênese, indução dos proto-oncogenes *c-fos* e *c-jun* (entre G0 e G1) e inibição do proto-oncogene *c-myc*. No entanto, ocorre um bloqueio na transição G1→S do ciclo celular.

Esse fenômeno tem sido extensivamente investigado em nosso grupo. Recentemente, esses estudos foram revisados por Rocha e colaboradores ⁽⁴⁰⁾, sendo proposto que a ação de ACTH dispara um efeito mitogênico parcial caracterizado pela ativação de ERK1/2 e de MAPKs ⁽⁴¹⁾, indução da transcrição dos genes *c-fos*, *fos-B*, *fra-1*, *fra-2*, *c-jun* e *jun-B* ⁽²⁹⁾ e uma fraca estimulação de síntese de DNA. Essa resposta mitogênica é antagonizada pelo forte efeito anti-proliferativo caracterizado pela ativação da via de cAMP/PKA, levando à inativação de AKT/PKB ⁽⁴¹⁾, ao aumento dos níveis de p27 ⁽⁴²⁾ e a degradação de c-Myc ⁽⁴³⁾. Mutantes de Y-1 defectivos na via de PKA não mostram esses efeitos anti-mitogênicos, muito embora ainda mantenham baixa atividade mitogênica em presença de ACTH (Eichler e Armelin, dados não publicados).

Novas perspectivas para o estudo de sinalização celular

Com os avanços da genômica no sequenciamento de genomas de diferentes organismos, houve um acúmulo crescente de informações a respeito dos componentes de vias de transdução de sinal associadas à proliferação celular. Vias de sinalização com dezenas de componentes que constituem verdadeiros “blocos de sinalização” intracelular têm sido propostos, sendo impossível em muitos casos dissociá-los e investigar cada um deles separadamente.

A proposta para compreender sinalização celular estende-se atualmente para sistemas constituídos de complexos multi-proteicos denominados “máquinas moleculares”. O conceito de máquinas moleculares não é recente, e tem sido revisado por Alberts ⁽⁴⁴⁾, que cita como principais exemplos o proteossomo, o spliceossomo e o complexo que forma a estrutura do poro nuclear. Esse conceito tem sido aplicado à transdução de sinal, uma vez que muitos de seus componentes funcionam como complexos multi-proteicos. Um exemplo disso consiste no complexo de sinalização formado a partir de receptores de tirosina quinase (RTK), através do recrutamento da proteína regulatória KSR-1 ⁽⁴⁵⁾, que se encontra ligada à proteína Ras e seus efetores (Raf, MEK e MAPK), criando uma interdependência entre as mesmas para que ocorra a ativação da transdução de sinal associada a elas.

O desenvolvimento de técnicas físico-químicas para caracterização de complexos multi-proteicos, em especial no campo da espectrometria de massas ^(46, 47) tem suportado a hipótese de blocos de sinalização intracelulares. Essa nova abordagem tem aberto novas fronteiras no campo da

Proteômica ⁽⁴⁷⁾, com a caracterização de proteínas envolvidas na formação desses complexos, atribuindo papel funcional à crescente informação genômica fornecida pelos sequenciamentos de DNA. Além disso, o conceito de redes de sinalização ⁽⁴⁸⁾ tem sido desenvolvido e permitiu não somente associar muitas vias ativadas ao mesmo tempo, como também simular e prever a função de proteínas ainda não totalmente caracterizadas.

Um outro aspecto relevante corresponde ao tráfico intracelular dos complexos formados entre receptores transmembrânicos e ligantes extracelulares. Esse fenômeno ocorre após a ativação da transdução de sinal e tem sido associado não somente à degradação (ubiquitinação) ⁽⁴⁹⁾ ou à reciclagem dos receptores transmembrânicos, mas também a eventos relacionados à modificação de citoesqueleto, diferenciação ⁽⁵⁰⁾ e à proliferação celular. Um exemplo disso é a ativação de expressão gênica para a entrada em S relacionada à internalização de FGF1, independente da ativação de Ras ou de efetores associados a receptores de tirosina-quinase (FGFRs) ⁽⁵¹⁾. A internalização de moléculas sinalizadoras consiste num dos objetivos investigados neste trabalho, e será discutida na seção 4.3.

1.6. Produção de Fatores Peptídicos de Crescimento *in vivo* e *in vitro* por Células Adrenocorticais

Há indícios de relações bastante complexas entre a ação de ACTH e de outros fatores reguladores de crescimento no córtex supra-renal ⁽⁵²⁾. Entre eles, fatores peptídicos de crescimento são os mais importantes, e têm sido associados à regulação do ciclo celular em células adrenais, podendo regular tanto desenvolvimento fetal ⁽⁵³⁾ quanto o crescimento em adultos de maneira autócrina e parácrina, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Os fatores peptídicos de crescimento envolvidos na regulação da proliferação, desenvolvimento e na homeostase do córtex supra-renal incluem FGF2, IGF1/2 e TGF- β ⁽⁵⁴⁾, que têm sido investigados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os efeitos proliferativos de IGF-2 produzidos nos adrenócitos durante o desenvolvimento da glândula adrenal ⁽⁵⁵⁾, e de IGF-1 na manutenção do fenótipo diferenciado do tecido adulto têm sido investigados, bem como a existência de alças autócrinas para IGF-2, superexpresso em tumores adrenocorticais. Células adrenais fetais humanas são estimuladas para proliferação por EGF (Epidermal Growth Factor) e inibidas por TGF- β ⁽⁵²⁾, enquanto o tecido adulto é fortemente estimulado por FGF-2, mas insensível a EGF ou TGF- β . VEGF também tem sido descrito como um importante fator na formação dos vasos sanguíneos no córtex supra-renal (angiogênese) ⁽⁵²⁾.

1.7. FGF e seu sistema de sinalização

FGF consiste numa vasta classe de peptídeos estruturalmente correlacionados cuja expressão e função biológica estendem-se a uma série de células e tecidos de origem meso e ectodérmica ⁽⁵⁶⁾, incluindo o córtex supra-renal. Seus efeitos mitogênicos em células estabelecidas foram inicialmente observados em fibroblastos 3T3 (Armelin, 1973) ⁽¹²⁾, e posteriormente caracterizados também em culturas primárias de adrenocórtex bovina (Gospodarowicz, 1975) ⁽¹³⁾. Atualmente, há pelo menos 23 peptídeos integrantes da família dos FGFs ⁽⁵⁶⁾, sendo essenciais para processos de diferenciação terminal, morfogênese de órgãos e angiogênese. Desordens proliferativas associadas à super expressão dos mesmos têm sido descritas em processos que levam à formação de tumor e fibrose cística, e ainda, mutações nos receptores para FGF ou a ausência da expressão dos mesmos promove desde bloqueios na morfogênese de órgãos ⁽⁵⁷⁾ até mesmo o surgimento de doenças congênitas relacionadas à má-formação craniofacial ⁽⁵⁸⁾.

Receptores para FGF correspondem a uma família de 5 genes descobertos até o momento, sendo que os mais importantes para a sinalização intracelular consistem em *flg* (FGFR1), *bek* (FGFR2), *flg-2* (FGFR3) e FGFR4 ⁽⁵⁸⁾. Cada um deles possui uma organização genômica bastante complexa, mas similar entre si em relação ao introns e exons que as compõem, com pelo menos 3 sítios de poliadenilação e um de “splicing” alternativo contido no exon 3. Os sítios de poliadenilação geram isoformas solúveis para os receptores ⁽⁵⁹⁾ (que não possuem os exons correspondentes aos domínios transmembrânico e de tirosina-quinase), que ligam aos diferentes FGFs e possuem duas funções atribuídas até o momento: intracelularmente, modulam a secreção dos FGFs e extracelularmente bloqueiam seus efeitos sinalizadores.

Há três domínios extracelulares similares à imunoglobulina (IgG) presentes na região N-terminal dos receptores para FGF, sendo que os dois mais internos (IgG2 e 3) contém os sítios de ligação a FGF. O processo de “splicing” alternativo nos exons correspondentes ao domínio IgG-3 ⁽⁵⁸⁾ gera isoformas denominadas III-b ou III-c para cada um dos FGFRs (R1, R2 e R3) ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾. As afinidades dos diferentes FGFs às diferentes isoformas III-b ou III-c para FGFR1, FGFR2 e FGFR3 são bastante variáveis, de acordo com ensaios de atividade biológica, conferindo especificidade para cada um dos componentes dessa família de fatores de crescimento.

A afinidade de FGF a seu respectivo receptor é aumentada quando há interações não-covalentes com heparan-sulfato (ou heparina) presentes no meio extracelular (associados a proteoglicanos de superfície e de matriz extracelular). A resolução da estrutura cristalográfica para o complexo FGF/FGFRs revelou a presença de dois receptores e dois ligantes associados a heparan-sulfato (com no mínimo 6 subunidades monoméricas) para efetivar a ação biológica (dimerização) dos receptores de FGF ⁽⁶¹⁾.

Além de proteoglicanos, outros receptores e proteínas transmembranares têm sido associados à ativação de FGFRs, não somente em processos de sinalização intracelular, como em eventos de regulação de elementos de adesão ou de matriz extra-celular. Um exemplo disso consiste na família de proteínas N-CAM e caderinas específicas de sistema nervoso, que formam um trímero com um receptor para FGF e regulam o contato célula a célula e a expressão gênica associada a processos de adesão celular ⁽⁶²⁾.

2. Objetivos

2.1 Detecção e caracterização (sequências de cDNA) de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores expressos em células adrenocorticais

Premissas e Relevância

Fatores peptídicos de crescimento atuam no desenvolvimento e na manutenção da homeostase do córtex supra-renal (seção 1.6), tendo diferentes funções além de promover a proliferação celular. O conjunto de famílias que compõem essa classe de moléculas sinalizadoras é muito amplo e difícil de ser investigado, o que nos levou a estabelecer os seguintes critérios para a escolha daquelas que pudessem ser candidatas a regular o ciclo celular em células adrenocorticais:

1. Fatores de peptídicos de crescimento diretamente envolvidos no controle da proliferação celular (mitogênicos ou inibitórios) ⁽⁵²⁾;
2. Fatores de peptídicos de crescimento cuja expressão fosse regulada por ACTH;
3. Presença dos respectivos receptores que pudessem contribuir para sua sinalização autócrina ou parácrina.

A linhagem celular Y-1, proveniente de tumor funcional do córtex supra-renal de camundongos, consiste num modelo experimental amplamente utilizado em nosso laboratório. Apresenta respostas funcionais a ACTH (esteroidogênese) e a FGF-2 (indução de entrada em S), oferecendo ainda vantagens metodológicas para estudos com abordagens bioquímicas e de genética molecular (são células clonáveis e transfectáveis).

Culturas primárias constituem modelos experimentais mais próximos da situação descrita *in vivo*, e têm sido utilizadas para investigar o papel de ACTH na expressão de fatores peptídicos de crescimento, bem como as vias de sinalização envolvidas no controle do ciclo celular (Lotfi e colaboradores, resultados não publicados).

Comparar estes dois modelos experimentais, em relação à expressão de fatores peptídicos de crescimento constituiu uma meta importante a ser cumprida, uma vez que não se sabe se a transformação celular de Y-1 manteve a expressão e a função dos mesmos, observadas *in vivo*, ou se correspondem a desvios que surgem durante o estabelecimento de linhagens celulares.

Objetivos e Metodologia

Detectar a expressão de fatores peptídicos de crescimento e de seus receptores, investigando a presença dos correspondentes mRNAs por RT-PCR, e caracterizar os c-DNAs obtidos através subclonagem em vetores plasmídeos e sequenciamento de DNA, utilizando como modelos

experimentais a linhagem celular Y-1 de camundongo (Materiais e Métodos, seção 3.1) e culturas primárias do córtex supra-renal de ratos (Materiais e Métodos, seção 3.2).

2.2. Investigar o papel funcional de FGF2, PDGF-A e PDGF-B e seus respectivos receptores em células adrenocorticais, e sua regulação sob estímulo de ACTH

Premissas e relevância

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório mostraram que a linhagem celular Y-1 produz e libera fatores de crescimento que estimulam fibroblastos em cultura: 1) Fatores peptídicos de crescimento similares a PDGF foram detectados em meio de cultura, condicionado por células Y-1, sendo abundantemente secretados. No entanto, células Y-1 não apresentam resposta mitogênica a PDGF, de acordo com ensaios de atividade biológica (indução de entrada em S) feitos em nosso laboratório, o que sugere a ausência de receptores para PDGF (Lee Ho, Kimura, Rebutini e Armelin, resultados não publicados); 2) FGF2 foi detectado em lisados de células Y-1, mas não no meio de cultura, sugerindo que Y-1 produz, mas não secreta FGF2, embora responda prontamente a FGF2 recombinante, o que implica na presença de receptores para FGF ainda não caracterizados nessas células.

Além disso, ACTH pode ser um regulador indireto do ciclo celular, modulando a expressão de fatores locais (PDGF, FGF2, entre outros) que promovem o controle do ciclo celular de maneira autócrina, parácrina ou mesmo intrácrina (seção 1.3).

Dessa maneira, é de grande interesse analisar a expressão de PDGFs, FGF2 e seus respectivos receptores em células adrenocorticais, em especial na linhagem celular Y-1.

Objetivos e Metodologia

- Detectar a presença de mRNAs correspondentes às isoformas de alto e de baixo peso molecular para FGF2 e de PDGF (cadeias A e B), bem como os seus respectivos receptores específicos, utilizando de RT-PCR e caracterizar os c-DNAs obtidos através de subclonagem em plasmídeos e sequenciamento de DNA;
- Investigar a regulação dos níveis de mRNA para as isoformas de FGF2 e de PDGF, sob estímulo de ACTH, utilizando “Northern blotting”, bem como detectar variantes de “splicing” alternativo ou poliadenilação para os mesmos;

- Detectar as isoformas de alto e de baixo peso molecular para FGF2 e PDGF (cadeias A e B) através de “Western blotting”, bem como a regulação de sua expressão sob estímulo sustentado de ACTH;
- Verificar a regulação, sob estímulo de ACTH, da expressão dos receptores para FGF e PDGF através de “Western blotting” e imunocitoquímicas (peroxidase e fluorescência).

2.3 Distribuição subcelular, compartimentalização de FGF2 e dos Receptores para FGF detectados em células adrenocorticais, e sua implicação funcional

Premissas e relevância

Há dois fenômenos distintos envolvendo sinalização celular promovida por fatores peptídicos de crescimento. O primeiro deles, correspondente à transdução de sinal iniciada pela ativação de receptores específicos na membrana citoplasmática, tem sido amplamente investigado, inclusive em nosso laboratório, e constitui um fenômeno imediato (2-3 minutos após estímulo) envolvendo a mobilização de substratos intracelulares.

O segundo fenômeno, que consiste na internalização do complexo formado entre fatores de crescimento e seus receptores após a ativação da transdução de sinal, está totalmente indefinido em nosso modelo experimental. Há evidências na literatura indicando que o complexo formado entre fatores de crescimento e seus respectivos receptores são internalizados ^(63, 64), podendo ocorrer a degradação do complexo (ubiquitinação e recrutamento de proteossomo) ⁽⁴⁹⁾, a reciclagem dos respectivos receptores para a membrana citoplasmática (“turn over”), ou ainda, a internalização para o núcleo ⁽⁶⁵⁾, com efeitos de sinalização nuclear muito pouco investigados. Também é possível correlacionar a compartimentalização (citoplasma, núcleo) dos fatores peptídicos de crescimento, expressos em diferentes células, com seus principais alvos e vias de ação intracelulares.

Dentro desse contexto, identificar a localização subcelular tanto das isoformas de FGF2 intracelulares induzidas ou não sob tratamentos de ACTH, como o destino do FGF2 exógeno recombinante (e sua internalização), tornou-se alvo de interesse dentro da proposta de elucidar seus mecanismos de ação.

Objetivos e Metodologias

- Identificar a localização subcelular tanto das isoformas de FGF2 intracelulares induzidas ou não induzidas sob tratamentos de ACTH, como a internalização e o destino de FGF2

exógeno, através de imunocitoquímica utilizando anticorpos acoplados à peroxidase (HRP);

- Medir a localização subcelular de FGF2 utilizando anticorpos acoplados a compostos fluorescentes (Cy2, Rodamina) e Microscopia Confocal de Varredura a Laser (LSCM , “Laser Scanning Confocal Microscopy”).

2.4. Bloqueio do sistema de sinalização promovido pelos Receptores de FGF detectados em células adrenocorticais

Premissas e Relevância

A caracterização das diferentes isoformas para FGF2 e de seus receptores em células Y-1, a regulação de sua expressão, bem como sua distribuição subcelular, constituem fortes evidências da importância do sistema FGF/FGFR dentro do contexto de proliferação celular, em particular no modelo de células adrenocorticais Y-1. No entanto, é possível interferir diretamente na expressão dos componentes desse sistema para avaliar sua contribuição nos mecanismos de controle de ciclo celular e seu papel funcional. Para tanto, diferentes abordagens estão descritas na literatura: 1) Utilização de oligonucleotídeos “antisense” ⁽⁶⁶⁾, interferindo diretamente no mecanismo de tradução de proteínas; 2) Utilização de células de animais “knockout” para diferentes membros da família dos FGF ⁽⁵¹⁾, o que permite investigar o papel funcional dos mesmos durante o desenvolvimento embrionário; 3) Utilização de duplas-fitas de RNA que disparam uma resposta intracelular conhecida como Interferência de RNA (RNAi) ^(67, 68, 69 e 70).

O fenômeno de interferência de RNA (RNAi), recentemente descoberto ⁽⁷¹⁾, foi transformado num eficiente método de gerar nocautes funcionais específicos, e pode ser uma abordagem conclusiva para explorar a via de sinalização de FGF2 e de seus receptores em células Y-1.

Com o bloqueio da expressão de fatores peptídicos de crescimento que possam estar envolvidos na resposta proliferativa, é possível investigar sua contribuição na ativação do ciclo celular ao estimular as células com agentes que induzem sua expressão (como ACTH). Nesse contexto, FGF2 e suas isoformas, cuja expressão tem sido descrita como regulada por ACTH em culturas primárias de células adrenocorticais, também constituem alvos de interesse para aplicar a metodologia de interferência de RNA.

Objetivos e Metodologia

Bloquear a expressão de FGF2 e de seus correspondentes receptores na linhagem celular Y-1 e verificar sua contribuição na regulação do ciclo celular.

Duas abordagens metodológicas foram planejadas e utilizadas (figura 3, diagrama esquemático)

- Transfecção transiente de siRNAs sintéticos (desenhados em laboratório e sintetizados comercialmente). Os detalhes quanto ao desenho dos mesmos e do sistema de transfecção utilizado estão descritos na seção 3.15 (Materiais e Métodos).
- Transfecção transiente ou estável de vetores plasmideais contendo repetições invertidas, cujos transcritos geram duplas-fitas de RNAs. Foram desenhados oligonucleotídeos correspondentes às fitas “sense” e “antisense” de DNA contendo as repetições invertidas, que foram adquiridos comercialmente. As duplas fitas obtidas por anelamento foram utilizadas para subclonagem em vetores pSUPER ⁽⁷²⁾. Uma breve introdução teórica, bem como os critérios para o desenho dessas repetições invertidas e detalhes quanto ao sistema pSUPER estão descritos na seção 3.15 (Materiais e Métodos).

Legenda

Figura 3 - Metodologias utilizadas para interferência de RNA (RNAi). Os siRNAs foram gerados endogenamente através de transfecções com plasmídeos pSUPER contendo "inverted repeats" para FGF2, FGFR1, FGFR2 e FGFR3. Alternativamente, foram utilizados siRNAs sintéticos específicos para degradar os respectivos mRNAs correspondentes a FGFR1 e FGFR2. Em pSUPER, o promotor de expressão constitutiva para RNA Pol III está indicado (H1 RNA pol III).

3. Materiais e Métodos

3.1 Cultura Celular

Estoques congelados de células, mantidos em N₂ líquido, foram descongelados (37°C) e as células foram cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura celular (25, 75 e 150 mL, Corning) contendo meio de cultura DMEM ou RPMI (GIBCO, adicionado de L-glutamina 0,3 g/L, NaHCO₃ 2,0 g/L, estreptomicina 100 mg/L e ampicilina 25 mg/mL) e FCS (Soro Fetal Bovino - CultiLab, 10-20%). As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera de CO₂ (5%), em estufas para cultura de células (Forma Scientific), até que atingissem confluência de 70-80% (que corresponde à área ocupada pelas células).

Todas as culturas de células utilizadas crescem em monocamadas. Para expandi-las, o meio de crescimento foi removido e as monocamadas foram lavadas com PBS-A (KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM e MgCl₂ 6H₂O 0,50 mM, em pH 7,2) e tratadas com tripsina (0,5-1,0 mL de solução 1mg/mL, GIBCO) durante 5 minutos, a 37°C. As células foram ressuspensas em um tubo cônico Falcon (15 mL) contendo meio de crescimento (DMEM ou RPMI 10-20% FCS) e contadas em uma câmara de Neubauer, utilizando um microscópio de luz invertida (Nikon). Aliquotas dessa suspensão foram diluídas em meio de crescimento e semeadas em placas de cultura celular (diâmetros de 60-100mm, Corning) ou em laminulas circulares (nº 1, diâmetro de 1cm, Corning). O número de células semeadas foi de aproximadamente 15 mil células/laminula, 100.000 células/placa (60mm) ou 200.000 células/placa (100mm).

Para garantir a manutenção dos estoques de linhagens celulares, após a expansão das culturas, novas aliquotas foram congeladas. As monocamadas de células foram lavadas com PBS-A e tratadas com tripsina (como descrito anteriormente), as suspensões celulares foram feitas em meio para congelamento (DMEM ou RPMI contendo DMSO 10% e FCS 20%) e distribuídas em tubos criogênicos (Corning, 2mL). Os tubos foram resfriados gradativamente a 4°C (30 minutos), congelados a -20°C (2 horas), a -80°C (12 horas) e finalmente armazenados em tanques contendo N₂ líquido (-170°C).

Cada uma das linhagens celulares utilizadas e suas respectivas características e meios de cultura apropriados estão listados na tabela 1.

Tabela 1- linhagens celulares estabelecidas e culturas primárias

Célula	Origem	Descrição	Meio de Cultura
Y-1	Camundongo	Linhagem clonal derivada de tumor adrenocortical funcional (73)	DMEM
Balb3T3 (clone A31)	Camundongo	Fibroblastos de embrião estabelecidos em cultura (74)	DMEM
EJA	Camundongo	Células clonais geradas a partir fibroblastos Balb3T3 transfectados com o gene <i>h-ras</i> mutado (75)	DMEM
FHN	Humano	Células não-estabelecidas mantidas em cultura (*)	DMEM
COS-7	Macaco	Células de tumor de rim estabelecidas em cultura (76)	DMEM
MCF-7	Humano	Células de tumor de mama estabelecidas em cultura (77)	RPMI
HeLa	Humano	Células tumorais de ovário estabelecidas em cultura (78)	DMEM
Glomerulosas	Rato	Células de tecido adrenocortical, não-estabelecidas, mantidas em cultura (seção 3.2)	DMEM
Fasciculadas e Reticulares	Rato	Células de tecido adrenocortical, não-estabelecidas, mantidas em cultura (seção 3.2)	DMEM

(*) Culturas primárias mantidas em nosso laboratório (desde 1981). Fonte: doação (Instituto Butantan)

3.2 Obtenção de culturas primárias de células adrenocorticais de rato

A obtenção de culturas primárias de glândulas adrenais de ratos corresponde ao trabalho feito em colaboração com a Dra. Claudimara F. P. Lotfi, que tem desenvolvido e aplicado essa metodologia no Laboratório de Estrutura e Função Celular, do Departamento de Anatomia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. A metodologia consistiu na dissecação das glândulas e remoção da cápsula, separação mecânica do tecido adrenocortical e de seus componentes (células glomerulosas, fasciculadas e reticulares) e digestões enzimáticas (colagenase) para a dissociação dos tecidos e remoção de fibroblastos. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar devido às facilidades de experimentação (tamanho das glândulas e manipulação dos animais). Pelo menos 7 animais foram utilizados para cada preparação de culturas primárias.

Obtenção das glândulas adrenais: os ratos foram sacrificados (guilhotinados) e rapidamente abertos. As glândulas adrenais foram retiradas com uma pinça curva (juntamente com a camada de gordura que as envolve), colocadas numa placa de cultura celular de 100mm (Corning) contendo meio de cultura (DMEM), mantidas até a dissecação.

Dissecação das glândulas: as glândulas foram apoiadas em uma placa de Petri de vidro (estéril) e limpas com um bisturi cirúrgico (remoção da gordura). A cápsula fibrosa da glândula (contendo células glomerulosas do tecido adrenocortical), e a região correspondente às células fasciculadas e reticulares (juntamente com as células da medula) foram separadas mecanicamente com o auxílio de uma pinça, e distribuídas em duas placas de Petri contendo meio de cultura (DMEM).

Digestões e filtração: os fragmentos de tecido obtidos foram transferidos para tubos cônicos Falcon (Corning), contendo meio de cultura (DMEM, 10% FCS, 7mL) e digeridos com colagenase (GIBCO, 2-4mg/mL) e DNase (SIGMA, 2μL, 2U), em tempos de digestão distintos (células glomerulosas: 20 minutos; células fasciculadas e reticulares: 40 minutos), a 37°C. Após digestões, as suspensões foram lentamente homogeneizadas com uma pipeta volumétrica (cerca de 30 vezes), filtradas (filtros de nylon Milipore de 100μm) e coletadas separadamente em tubos cônicos (50 mL).

Centrifugação: o volume de cada uma das suspensões foi completado até 50mL (DMEM, 10%FCS). As suspensões foram centrifugadas (centrífuga Eppendorf, 12minutos, 700 rpm). A solução sobrenadante foi descartada e as células foram ressuspensas em meio de cultura (DMEM, 10%FCS), contadas (câmara de Neubauer) e distribuídas em placas de cultura (Corning, 60mm de diâmetro) ou lamínulas circulares (de 1cm de diâmetro). O número de células semeadas correspondeu a aproximadamente 15 mil células/lamínula, 100.000 células/placa (60mm) ou 200.000 células/placa (100mm).

Figura 4 - Obtenção de culturas primárias de células adrenocorticais de rato.

3.3 Carenciamento e estímulo de células em cultura

Carenciamento é uma aproximação experimental utilizada para induzir células em cultura a uma condição artificial de quiescência (Introdução, seção 1.1). Consiste em sincronizar todas as células fora do ciclo celular (G0) retirando-se do meio de cultura agentes que induzem proliferação (soro, hormônios e fatores peptídicos de crescimento). Isso é feito com a troca do meio de crescimento (DMEM, 10%FCS) pelo meio de carenciamento (DMEM sem a adição de soro).

Dependendo da linhagem celular utilizada, é necessário manter um mínimo de soro para a sobrevivência celular e manter a capacidade de resposta celular a diferentes estímulos. Como exemplo, no caso de fibroblastos Balb3T3 e de culturas primárias, deve-se manter 0,5% de FCS no meio de carenciamento. Em geral, células derivadas de tumores, estabelecidas em cultura, mesmo em condições severas de carenciamento (ausência total de soro), ainda mantêm um nível basal de células em proliferação, como a linhagem Y-1.

O procedimento utilizado consistiu em descartar o meio de crescimento (DMEM a 10% de FCS), lavar a monocamada de células com tampão PBS (KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM, CaCl₂ H₂O 0,7 mM e MgCl₂ 6H₂O 0,5 mM, em pH 7,2) e com meio de carenciamento (DMEM sem FCS). Após a adição do meio de carenciamento final, o tempo de carenciamento variou de acordo com a linhagem celular utilizada. Células Y-1 foram mantidas sob carenciamento por 48 horas. No entanto, fibroblastos Balb3T3 ou culturas primárias foram carenciadas por 24 horas.

Após carenciamento, as células foram estimuladas com FGF-2 recombinante (bovino, 5 ng/mL, NaCl 2M), soro fetal bovino (FCS 10%) e ACTH sintético (1 nM, PBS). Os estímulos foram sustentados (mantidos ao longo do tempo de tratamento), e os tempos de tratamento foram otimizados de acordo com cada experimento (serão descritos a seguir).

FGF-2 recombinante, bovino, corresponde à fração salina (NaCl 2M), purificada de cromatografia de heparina-sefárose e concentrada em FPLC ("Flow Protein Liquid Chromatography"), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ângelo Gambarini (IQ-USP). ACTH (Hormônio Adrenocorticotrópico) consiste no peptídeo sintético completo, comercial (SIGMA), a uma concentração-estoque de 10 µM, diluído em PBS (concentração final de 1,0 nM).

3.4 Extração e purificação de RNA total

Frações de RNA total foram obtidas através de 3 métodos: a) Extração ácida com fenol/clorofórmio (procedimento descrito por Chomczynski e Nicoletta) ⁽⁷⁹⁾; b) Ultracentrifugação através de gradiente de concentração de CsCl ⁽⁸⁰⁾; c) Reagente de Tryzol (GIBCO), de acordo com especificações do fabricante.

a) Este procedimento baseia-se no isolamento de RNA através da lise celular com um agente caotrópico (isotiocianato de guanidina) e no fracionamento dos componentes celulares com uma mistura de fenol/clorofórmio. As células (crescidas em garrafas de 75 cm² ou placas de cultura de 100 ou 150 mm de diâmetro) foram lavadas com PBS gelado (5,0 mL) e rompidas com tampão de lise (3,0 mL, isotiocianato de guanidina 4M, sarcosil 8%, β-mercaptoetanol 7%, citrato de sódio 40mM, em pH 7,0). A solução de lise foi transferida para tubos de vidro Corning (25mL) e acidificada com solução de NaCH₃COO (0,3 mL, 2M). Foram adicionados fenol saturado em água (0,4mL) e em seguida uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (0,6mL, na proporção 49:1). A solução foi homogeneizada, resfriada (gelo, 15 minutos) e centrifugada numa centrífuga Sorval (700rpm, 4°C, 20 minutos). O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos limpos. O RNA total foi precipitado com a adição de 3,3mL de isopropanol (-20°C, 30 minutos), coletado por centrifugação (8000rpm, 4°C, 20 minutos), lavado com etanol gelado (70% em água, 2mL), coletado novamente (centrifugação), seco (à temperatura ambiente, 1 hora) e ressuspensionado em água pré-aquecida (65°C, 2,2mL)

b) O procedimento descrito a seguir consiste em fracionar os lisados celulares num gradiente de concentração de CsCl obtido através de ultra-centrifugação (37000 a 40000 rpm). Os componentes celulares distribuem-se ao longo do gradiente de acordo com suas respectivas densidades relativas, e o RNA pode ser isolado devido à sua alta densidade (precipita-se no fundo dos tubos). Os lisados celulares (2,0mL) foram obtidos com a solução de lise descrita anteriormente e transferidos para tubos de ultra-centrifugação contendo CsCl estéril (2mL, 5,7 M em pH 5,0), e centrifugados numa ultracentrífuga Sorval (a 37000 rpm, 20°C, 17-20 horas). Após centrifugação, a solução sobrenadante foi descartada cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o RNA precipitado foi lavado com etanol (solução gelada a 70% em água) e os tubos foram secos (à temperatura ambiente). O RNA total foi ressuspensionado em H₂O estéril (150μL).

c) Alternativamente, RNA total foi extraído utilizando-se reagente Tryzol (GIBCO). Os volumes dos reagentes foram otimizados em nosso laboratório. As células foram rompidas com Tryzol (1,7 mL, para cada placa p100), os lisados foram homogenizados (ressuspensão) e transferidos para tubos eppendorfs estéreis (2,0 mL). Após a adição de clorofórmio (0,2 mL para cada tubo), a suspensão foi homogenizada e incubada (15 minutos, à temperatura ambiente). Os

tubos foram centrifugados (10000 rpm, 10 minutos, 4°C) e o sobrenadante (fase aquosa) foi removido. O RNA total foi precipitado da fase aquosa com isopropanol (1,7 mL) e coletado através de centrifugação (10000 rpm, 15 minutos, 4°C). Em seguida, o RNA foi lavado com solução gelada de etanol (0,5 mL, solução a 70% em água), coletado por centrifugação (14000 rpm, 15 minutos, 4°C), seco à temperatura ambiente, ressuspendido em H₂O (60 µL) e armazenado (-20°C).

Todas as frações de RNA total foram quantificadas por espectrofotometria (Espectrofotômetro U3000 Hitachi). Para quantificação, alíquotas das soluções de RNA foram diluídas em tampão TE (Tris-Cl 1mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,5) e as medidas foram feitas em comprimentos de onda de 280nm e 260nm. A qualidade das frações de RNA total foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante (agarose 1%, formaldeído 7% e brometo de etídio 1,0µg/mL) feito em tampão MOPS (MOPS a 40mM, NaCH₃COO a 10mM, EDTA a 1mM, em pH 7,0), utilizando-se cubas para eletroforese horizontal Horizon (GIBCO).

Alíquotas de RNA total (1-5µg) foram pré-aquecidas (65°C, 5 minutos), resfriadas (0°C) e incubadas com DNAase I (GIBCO, 1,0 U/µg RNA) em tampão de reação para DNase (TrisHCl a 40 mM, MgCl₂ a 6mM, EDTA a 25 mM, em pH7,5), por 10 minutos, à temperatura ambiente. A enzima foi inativada (65°C, 15 minutos) e o RNA total foi diretamente utilizado em RT-PCR.

3.5 Obtenção dos fragmentos de c-DNA

A abordagem para detectar a expressão de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores em células adrenocorticais consistiu em amplificar através de PCR c-DNAs obtidos em reações de Transcrição Reversa (RT). Para tanto, oligonucleotídeos de Timidina (12 a 18 bases) foram utilizados para a obtenção de c-DNAs correspondentes a todos os mRNAs expressos na célula. Frações de RNA total, quantificadas e tratadas com DNase, foram divididas em alíquotas (contendo 2,0-5,0 µg de RNA total). Foram adicionados oligonucleotídeos de Timidina contendo 12-18 bases (1µL, solução-estoque a 500µg/mL), solução de dNTPs (1µL, desoxinucleotídeos trifosfato, dATP, dCTP, dTTP e dGTP, todos a 10 mM cada) e água MiliQ estéril (completando um volume de 12µL). As frações de RNA foram aquecidas em banho-maria (65°C, 5 minutos) para desnaturação e imediatamente resfriadas (gelo). Foram adicionados tampão para reação de Transcrição Reversa (5µL, a 250 mM de Tris-HCl, a 375 mM KCl, a 15 mM MgCl₂, em pH 8,3 - GIBCO) e DTT (Ditiotreitol, 2µL, 0,1M). Para garantir o anelamento dos oligonucleotídeos dT com a cauda poliA dos mRNAs, as reações foram incubadas (42 °C, 2 a 3 minutos), em seguida foi adicionada Transcriptase Reversa (1µL, MMLV-RT, 19 U/µL ou SuperScript 200 U/µL). As reações foram incubadas (42°C, 50 minutos). A enzima foi inativada por aquecimento (65°C, 15 minutos) e as soluções foram utilizadas diretamente em reações de PCR. As reações de PCR foram feitas utilizando-se oligonucleotídeos específicos para as regiões codificadoras dos respectivos mRNAs para fatores peptídicos de crescimento e de seus receptores. Os oligonucleotídeos foram desenhados em nosso laboratório de acordo com sequências-consenso para camundongo descritas na literatura. Para delimitar os oligonucleotídeos na sequência de mRNA e garantir sua especificidade, foi utilizado o programa computacional BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) para medir sua similaridade com demais c-DNAs conhecidos. Os parâmetros físico-químicos dos oligonucleotídeos para as reações de PCR, como temperatura de anelamento e porcentagem de composição de bases G e C, bem como a previsão de estruturas secundárias formadas pelos mesmos, foram testados no programa GeneRunner (Hastings Softwares Inc). Os oligonucleotídeos obtidos estão listados na tabela 2. Para cada reação de PCR, adicionou-se tampão para PCR (5µL, 75mM Tris-HCl, 2mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄ e 0,001% BSA, em pH 9,0), solução de dNTPs (desoxinucleotídeos trifosfato, 1 µL, a 10 mM cada), alíquotas das reações de Transcrição Reversa (2µL), soluções de oligonucleotídeos “forward” e “reverse” (2µL de cada solução, a 12,5 µM) e a enzima Taq DNA Polimerase (0,5µL, 5 U/µL), num volume final de 50µL (completado com água MiliQ bidestilada). As amplificações através de PCR foram realizadas em ciclos de reações de desnaturação (94°C, 1 minuto), de anelamento (50-60°C 1,5 minuto) e de polimerização (72°C, 1 minuto), num termociclador Progene Techne (Uniscience do Brasil). Os controles positivos

utilizados consistiram em amplificar o gene de expressão constitutiva GAPDH (Gliceraldeído-Fosfato Desidrogenase) utilizando-se oligonucleotídeos localizados em dois exons que delimitam uma região intrônica pequena (300 pb), e RNA total, tratado com DNase (etapa anterior à reação de transcrição reversa). Fabricantes dos oligonucleotídeos: Invitrogen e BioSynthesis.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos para RT-PCR e reações de sequenciamento.

Gene	“Forward Primer”	“Reverse Primer”	c-DNA (pb)	Referência
FGF2	CTCTACTGCAAGAACGG	ACAGTATGGCCTTCTGA	350	Hebert <i>et al</i> (1990) (104)
alt.spFGF2	AGAAAAGACTCAGGCACCTGTG	TCAGCTCCTAGCAGACATTGG	526	Hebert <i>et al</i> (1990) (104)
LMW-FGF2	ATGGCAGCCGGGAGC	AGCTCTTAGCAGACATTGGAAGA	465	Hebert <i>et al</i> (1990) (104)
HMW-FGF2	ACGCGAACCCGGGAGGATG	GCTCTTAGCAGATTGGAAGAAAAAGT	582	Hebert <i>et al</i> (1990) (104)
FGFR1 (1)	TGTCGGCCTCGCGATGATGTG	GCAAGCGTAGAGGCCAGACTG	141	Beer <i>et al</i> (2000) (105)
FGFR2 (1)	TGCATGTTGAAAGATGCCGCC	ACAAGCATAGAGGCCGGAGTC	138	Mansukhani <i>et al</i> (1992) (106)
FGFR3 (1)	TGCCATCCTCCTGGAGGTGCC	GCAGCTGTAGACCCCTGCATC	147	Avivi <i>et al</i> (1991) (87)
FGFR4 (1)	TGCTGTGGGCGCACCGAGCGT	CATGGAGCCACGGGCCAGGCA	156	Stark <i>et al</i> (1991) (107)
FGFR1 (2)	TCACCGCTCTACCTGGAGATC	GGACTTCAACATCTTCACGGC	444	Beer <i>et al</i> (2000) (105)
FGFR2 (2)	ATAGCTATTTACTGCATAGGG	TCATCTTTCAACATCTTCCACT	432	Mansukhani <i>et al</i> (1992) (106)
FGFR3 (2)	ATTGGGTTTTCCCATCACTCT	AGATACCAGGTCGACAGGTC	540	Avivi <i>et al</i> (1991) (87)
FGFR4 (2)	ATCATCTGTATCAGGC	ATTGTCTTTCAGCATCTTCAC	444	Stark <i>et al</i> (1991) (107)
FGFR1 (3)	TCAACCACACCTACCAGCT	AGAACGGTCAACCATGCA	361	Beer <i>et al</i> (2000) (105)
FGFR2 (3)	ATGTCGTTGAACGTTCCACC	GAAGCCGTGATCTCCTTCT	376	Mansukhani <i>et al</i> (1992) (106)
FGFR3 (3)	TGTGCCACTTCAGGTGC	GTTTCCTACAGTCTCTCC	733	Avivi <i>et al</i> (1991) (87)
FGFR4 (3)	TACACAATCCTTACGTTGCTT	ACGTGAGGTTCTTCTGTG	444	Stark <i>et al</i> (1991) (107)
PDGF-A	TTCACGGGTCACACCGCAGTGTC	CGGCGGCTCTATCTCACCTCA	179	Mercola <i>et al</i> (1990) (108)
PDGF-B(1)	GAGCTGGACTTGAACATGACCCGA	GCAGCCGGAGCAGCGGTCCAC	231	Bonthron <i>et al</i> (1991) (109)
PDGF-B(2)	TCCCTGGCAGCAGCAGAGCCT	CTTGACGGCAGGTGGTCTCTC	546	Bonthron <i>et al</i> (1991) (109)
PDGFR α (1)	CAGCTCTTATTACCCTCTATC	GCAAGTGATACCATCCGGTGTG	231	Do <i>et al</i> (1992) (98)
PDGFR α (2)	GAAGTCACAGTGGCGGCCGCA	CAGGTCTTCTTCGGCTTCTC	546	Do <i>et al</i> (1992) (98)
PDGFR β (1)	GTTGGAGTGTGCGCTGCAAGA	CCACATTCTTGGCCCTTCAAA	231	Yarden <i>et al</i> (1986) (99)
PDGFR β (2)	CTGGGACCGCAGACCTCCCGG	GACACAAAAGTATTCCCAGT	546	Yarden <i>et al</i> (1986) (99)
IGF-1	ATGTCGTCTTCACACCTCTTC	TGCTTTTGTAGGCTTCAGTG	273	Bell <i>et al</i> (1986) (110)
IGF-2	TTGGTGCTTCTTATCTCTTTG	GAAGTCGTCCGGAAGTAC	288	Stempien <i>et al</i> (1986) (111)
IGF-R1	CGACGAGTGAGAAAATCT	TTAATAAGCAGATTGCC	1012	Wada <i>et al</i> (1993) (112)
IGF-R2	CCACCATCTTCTTTCCACT	AACCTTTCACCTCTGGGAT	536	MacDonald <i>et al</i> (1988) (113)
EGF	ATGCTCAGAAGGCTACGA	TGATAGCAGCTTCCGAGT	496	Scot <i>et al</i> (1983) (114)
TGF- α	GGAGAACAGCAGCTCCCCC	GGCAGCAGGAGTCTCTCTCT	391	Blasband <i>et al</i> (1990) (115)
EGF-R	AGTGGTCTTTGGAACTTGG	GTTGACATCCATCTGATAGG	664	Ulrich <i>et al</i> (1984) (116)
TGF- β 1	GACATGGAGCTGGTGAAA	TTCTTCTCTGTGGAGCTGA	795	Qian <i>et al</i> (1990) (117)
TGF- β 2	TACTGCAGGAGAAGGCAA	TCTGATCACCCTGGCATA	564	Miller ¹ <i>et al</i> (1989) (118)
TGF- β 3	ATTAGGGGACAGATCTTGA	ACATGGACAGTGGATGCT	561	Miller ² <i>et al</i> (1989) (119)
TGF- β R1	ACATCATGCAATGGGCT	TTACTTTTGTATGCCTTCCT	314	Tomoda <i>et al</i> (1984) (120)
TGF- β R2	CTCTGTCTGTGGATGACCT	CTTCTGGAATCTTCTCTCTG	459	Lawler <i>et al</i> (1994) (121)
VEGF	CGAAGTGGTGAAGTTCATGGAC	TCACCGCCTTGGCTTGTCTC	332/430	Sujihara <i>et al</i> (1994) (122)
PMOSBlue T7	CTCTAATACGACTCACTATAGGG	-	-	-
pGEM-Teasy	GTGAATTGTAATACGACTCACTA	GGAAACAGCTATGACCATG	-	-
Primer-40	-	GTTTTCACAGTCACGAC	-	-
pEGFP-N1	GAGGTCTATATAAGCAGAGCT	TTTCCGTATGTTGCATCA	-	-

Os produtos das reações de PCR foram fracionados e analisados através de eletroforese em gel de agarose. Aliquotas das reações de PCR foram diluídas em tampão de amostra para DNA (tampão TE contendo azul de bromofenol e xilenocianol a 0,1%, e glicerol a 30-50%) e os c-DNAs foram fracionados em eletroforese em gel de agarose (1-2%), feito em tampão TBE (Tris 9 mM, ácido bórico 9 mM e EDTA 0,2 mM, pH 8,0, contendo brometo de etídio 1µg/mL), utilizando-se cubas para eletroforese horizontal Horizon (GIBCO). Para determinar o peso molecular aproximado dos c-DNAs amplificados, foram utilizados “leaders” ou marcadores para DNA (de 100 pares de bases e 1,0 kilopares de bases, MBI-Fermentas).

As regiões do gel de agarose correspondentes aos fragmentos de c-DNA amplificados foram separadas, e os c-DNAs foram purificados utilizando-se o kit GFX (Amersham-Pharmacia Biotech). Fragmentos do gel foram tratados com solução de extração (1µL para cada µg de gel, 65°C, 15 minutos). Após a dissolução da agarose, as frações foram aplicadas em micro-colunas de separação e centrifugadas em micro-centrífuga Eppendorf (10000 rpm, 30-60 segundos). As colunas foram lavadas com solução de lavagem contendo etanol (70%, 500µL), e centrifugadas novamente (5000-10000 rpm, 30-60 segundos), secas sob centrifugação adicional (2 minutos, na mesma velocidade utilizada anteriormente) e os c-DNAs purificados foram coletados das colunas em tubos eppendorf limpos com água pré-aquecida em banho-maria (a 65°C, 30-50 µL).

3.6 Amplificação e isolamento de plasmídeos

Diversos plasmídeos comerciais foram utilizados nas diferentes abordagens metodológicas envolvidas neste trabalho. Um sumário da utilização dos mesmos está descrito na tabela 5, e será discutida com detalhes nas próximas seções.

A amplificação dos plasmídeos foi feita em bactérias das cepas DH5-α e HB101, oriundas de nossos bancos de bactérias, e foram tornadas quimicamente competentes para transformação celular de acordo com procedimento descrito por Hanahan (1983)⁽⁸⁰⁾, adaptado em nosso laboratório. As bactérias foram crescidas a 37°C em meio de cultura LB (Luria-Bertani, 50mL, triptona 10 g/L, extrato de levedura 5,0 g/L e NaCl 10,0 g/L). O crescimento foi acompanhado através de medidas de espectrofotometria até a suspensão atingir um valor de OD (densidade óptica) entre 0,6 e 0,8 (medido a um comprimento de onda de 600 nm). Após distribuir as suspensões em alíquotas (20mL) em tubos estéreis para centrífuga (com tampa), as suspensões foram resfriadas em gelo (5 minutos) e as bactérias foram sedimentadas por centrifugação branda numa centrífuga refrigerada Sorval (5000 rpm, 5 minutos), e ressuspensas em CaCl₂ (solução 0,1M, 5mL). O procedimento foi repetido mais uma vez, e as suspensões obtidas foram utilizadas diretamente para transformação celular ou imediatamente estocadas em glicerol 30% (-80°C).

A transformação celular foi feita através de choque térmico utilizando-se plasmídeos (provenientes de reações de ligação ou de estoques de nossos bancos de plasmídeos) e bactérias quimicamente competentes. Adicionou-se uma alíquota de solução contendo plasmídeos (5µL, 20-500 ng plasmídeos) numa suspensão de bactérias competentes (20µL). As suspensões foram resfriadas (3-5 minutos, 0°C), em seguida aquecidas em banho-maria (42°C, 40 segundos) e imediatamente resfriadas (30 minutos, 0°C), seguindo-se a adição de meio LB (1,0 mL). As suspensões foram incubadas (37°C, 1 hora) sem agitação. Alíquotas (50-100µL) foram aplicadas em placas contendo meio LB sólido (a 1% em agarose) e antibióticos adequados para seleção de bactérias contendo plasmídeos (os antibióticos e suas respectivas concentrações estão indicados na tabela 3).

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados

Plasmídeo	Utilização	Região promotora	Sítio de clonagem	Antibióticos para seleção
pMOSBlue	Subclonagem de produtos de PCR Sequenciamento de DNA	T7	EcoRV	Ampicilina (100µg/mL)
pGEMT-easy	Subclonagem de produtos de PCR Sequenciamento de DNA	T7	EcoRV	Ampicilina (100µg/mL)
pEGFP-N1	Controle de eficiência de transfecção Obtenção de Proteínas de fusão a FGF2	pCMV	Xho I Hind III	Kanamicina ou Neomicina (50µg/mL)
pSUPER	Subclonagem de “inverted repeats” para interferência de RNA (RNAi)	H1-RNAPol III	Bgl II Hind III	Ampicilina (100µg/mL)
pSUPER (IR-p53)	Controle positivo para RNAi (contém “inverted repeat” para p53, figura 7)	H1-RNAPol III	Bgl II Hind III	Ampicilina (100µg/mL)

Após o crescimento das bactérias nas placas de LB/agarose (37°C, 12 horas) as colônias contendo os plasmídeos recombinantes foram separadas e inoculadas em meio LB líquido (15mL) contendo o antibiótico específico para a seleção. As bactérias foram incubadas sob agitação utilizando-se um agitador “Shaker” Uniscence (37°C, 12 horas) e coletadas por centrifugação numa centrífuga Sorval (5000 rpm, 5 minutos, 0°C).

As extrações de plasmídeos recombinantes (“mini e midi-preps”) foram feitas utilizando-se o procedimento descrito por Sambrook (1989) ⁽⁸⁰⁾, adaptado em nosso laboratório, e os kits : "Plasmid Mid-Prep kit Hybaid Recovery" (Hybaid) e "QIAprep Miniprep kit" (QIAGEN). As suspensões contendo as bactérias foram centrifugadas (5000 rpm, 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. As bactérias foram ressuspensas em solução I (100µL, glicose 50 mM, TrisCl 25mM e EDTA 10mM, pH 8), seguindo-se a adição da solução II (200µL, NaOH 0,2M e SDS a 1%). Após agitar os tubos por inversão, foi adicionada solução III (150µL, KCH₃COO 5M) agitando-se cuidadosamente. Após centrifugação (12000 rpm, 5 minutos) o sobrenadante foi transferido para eppendorfs e foi adicionada solução de fenol e clorofórmio (1 volume, 1:1). A mistura foi agitada e centrifugada (10000 rpm, 5 minutos). A fase aquosa foi lavada com clorofórmio (200µL, 2 vezes) e os plasmídeos foram precipitados em etanol gelado (75%) e NaCH₃COO (concentração final 0,3M), por 1 hora (-20°C). Após centrifugação (14000rpm, 15 minutos, 4°C), o sobrenadante foi descartado e os plasmídeos foram lavados com solução de etanol (200µL, 70%), secos à temperatura ambiente, ressuspensos em água e armazenados (-20°C).

Alternativamente, foram utilizados os kits para preparações de plasmídeos “QIGEN Spin mini-preps” e “Eppendorf Perfect prep plasmids” (mini e midi-preps).

3.7 Subclonagem dos produtos de PCR e sua caracterização

Para caracterizar as sequências de c-DNA correspondentes aos fatores peptídicos de crescimento e seus receptores (seção 3.5), cada um dos produtos de PCR foi subclonado em vetores de clonagem pMOSBlue (Amersham-Biotech) e pGEMT-easy (PROMEGA). Ambos os plasmídeos contêm um fragmento da sequência do promotor viral T7 (tabela 3) utilizado em reações de sequenciamento de DNA. Foram desenhados oligonucleotídeos (tabela 2) correspondentes ao promotor viral T7 para PMOSBlue e pGEMT-easy, de acordo com o mesmo critério aplicado no desenho dos oligonucleotídeos para RT-PCR (seção 3.5).

500 ng de c-DNAs obtidos em RT-PCR foram ligados em pMOSBlue ou pGEMT-easy (1µL, 50 ng/µL) já linearizados e desfosforilados, utilizando-se tampão de reação para ligase (1µL, 250 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 5mM ATP, 5 mM DTT e polietilenoglicol 25%, em pH 7,6), DTT (0,5µL, 100mM) e a enzima T4 DNA ligase (0,5µL, 2 a 3 unidades), num volume final de 10µL, durante 12-24 horas, a 16°C. Aliquotas reações de ligação (5-10µL) foram utilizadas para transformar bactérias competentes (segundo descrito em 3.6).

Bactérias transformadas contendo plasmídeos recombinantes cujo sítio de restrição (sítio de clonagem) está inserido dentro do gene para β-galactosidase (pMOSBlue e pGEMT-easy), foram selecionadas das placas de agarose utilizando-se X-Gal (35µL, 50 mg/mL) e IPTG (20µL, 100 mM).

A coloração azul, proveniente da degradação do substrato cromogênico (X-Gal), indicou a presença de plasmídeos não-recombinantes contendo o gene para β -galactosidase intacto, enquanto colônias de bactérias sem a coloração azul indicaram a presença de plasmídeos recombinantes contendo fragmentos de c-DNA ligados no sítio de clonagem, e por isso interferindo na expressão correta da enzima (não há degradação de X-Gal e surgimento da coloração azul proveniente do substrato degradado).

Após a amplificação e purificação dos plasmídeos recombinantes (seção 3.6), a presença dos fragmentos de c-DNA clonados foi detectada através de varredura por PCR utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos correspondentes a cada um dos fragmentos de c-DNA clonados. Os plasmídeos recombinantes foram tratados com RNAase I-A bovina (Pharmacia, 1mg/mL, 1 μ g/ μ g de plasmídeo), precipitados com etanol (75%, -20°C, 1hora), coletados por centrifugação, secos (à temperatura ambiente), ressuspensos (em água) e quantificados (por espectrofotometria). Uma alíquota (200-500 ng) foi utilizada nas varreduras por PCR, e os produtos foram separados em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídeo (10 μ g/mL).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se pelo menos dois clones independentes para cada fragmento de c-DNA clonado, na direção de sequenciamento correspondente ao oligonucleotídeo T7. O sequenciamento automático foi feito utilizando-se os reagentes e especificações do kit “BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction” (Perkin-Elmer), ou o kit “Dynamic ET Terminator Cycle Sequencing” (Amersham-Pharmacia).

Plasmídeos (200 a 500 ng, 3 μ L), oligonucleotídeo T7 (3 pmol), “Enzyme Mix” (3 μ L, solução contendo os desoxinucleotídeos fluorescentes e a enzima) e tampão para reação (3 μ L, 200mM Tris-Cl e 5mM MgCl₂, pH 7,5) foram aliqüotados em eppendorfs. O volume final foi ajustado para 10 μ L (água MiliQ estéril) e a reação foi realizada em 40 ciclos no termociclador: 96°C (10 segundos); 50-55°C (30 segundos) e 60°C (4 minutos). Após os ciclos de reação de PCR adicionou-se isopropanol (80 μ L, 75%) e incubou-se (15 minutos, temperatura ambiente). Os tubos foram centrifugados numa micro-centrífuga Eppendorf (14000 rpm, 20 minutos) e o sobrenadante descartado por sucção. Após uma segunda lavagem com isopropanol (250 μ L, 75%) os tubos foram centrifugados (14000 rpm, 5 minutos) e o sobrenadante foi aspirado. As amostras foram secas (temperatura ambiente, protegidas da luz, 12 horas) e armazenadas (1 a 2 dias, -20°C).

Para analisar os produtos obtidos, foi adicionado tampão de corrida (3 μ L, Dextran Blue a 50ng/mL e EDTA a 25 mM, 200mM Tris-Cl em pH 7,5) e formamida deionizada (1 μ L) em cada uma das reações. As amostras foram desnaturadas (95°C, 1 minuto) e aplicadas num gel de poliacrilamida (6%, contendo 7M de uréia), acoplado a um sequenciador automático ABI-PRISM DNA sequencer (Perkin-Elmer).

3.8 Expressão de fatores peptídicos de crescimento em células Y-1

A expressão de fatores peptídicos de crescimento e sua regulação sob diferentes estímulos (ACTH e FGF2) foram investigadas através de “Western blotting” e imunocitoquímica. Ambas as metodologias fornecem informações complementares no estudo da expressão de uma proteína: a primeira delas permite a quantificação de uma proteína em relação à quantidade total de proteínas celulares (de um conjunto de células), enquanto a segunda fornece informações sobre o número de células individuais de uma população total que expressam essa proteína.

Fatores peptídicos de crescimento podem ser expressos como diferentes isoformas com pesos moleculares distintos, muito embora conservem entre si o sítio de reconhecimento (antígeno) para o mesmo anticorpo. Por causa disso, “Western blotting” foi a metodologia utilizada para investigar a expressão de isoformas de FGF2 com diferentes pesos moleculares, uma vez que é possível nessa abordagem separá-las de acordo com seus diferentes pesos moleculares. Embora não seja possível obter essa informação através de imunocitoquímica, a vantagem desta é que é possível observar a expressão das proteínas de interesse *in situ*, permitindo inferir sobre sua localização intracelular (citoplasmática, nuclear). No entanto, de acordo com sua reprodutibilidade, pode-se fazer uma estimativa grosseira em experimentos de imunoperoxidase dos níveis de expressão de uma proteína de acordo com a intensidade da reação da peroxidase.

3.8.1 “Western blotting”

As células foram colocadas em cultura, e após os tratamentos (carenciamento, estímulos com ACTH e FGF2), foram lavadas 2 vezes com PBS (KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM, CaCl₂ H₂O 0,7 mM e MgCl₂ 6H₂O 0,5 mM, em pH 7,2) e rompidas com tampão RIPA (em gelo, 200-500 µL, NP-40 1%, NaCl 150 mM, Tris-Cl 50 mM, SDS 0,1% e deoxicolato de sódio 0,5%, em pH 7,5), adicionado de inibidores de protease e de fosfatase (tabela 4).

Os lisados celulares foram deixados sob agitação em câmara fria (5 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi coletado por centrifugação numa micro-centrífuga Eppendorf (14000 rpm, 10 minutos). Aliquotas (10µL) dos lisados foram utilizadas para quantificar as proteínas totais por espectrofotometria com reagente de Bradford-Biorad (diluído 4 vezes, 990µL), utilizando-se como padrão uma curva de dose com concentrações definidas de albumina bovina (0,5 a 2,5 mg/mL), a um comprimento de onda de 595nm. As leituras foram feitas em duplicatas.

Tabela 4 - inibidores de protease e de fosfatase utilizados

Inibidor	Solução-Estoque	Concentração Final
Ortovanadato de Sódio	100 mM (H ₂ O)	1,0 mM
PMSF	250 mM (isopropanol)	1,0 mM
Aprotinina	1,0 mg/mL (HEPES, 10 mM, pH 8,0)	2 µg/mL
Pepstatina A	1,0 mg/mL (etanol)	2 µg/mL

As frações quantificadas de proteínas totais foram desnaturadas (100°C, 5 minutos) em tampão de amostra para proteínas (Tris-Cl 200mM, β-mercaptoetanol 20%, dodecil sulfato de sódio 8%, azul de bromofenol 0,4% e Glicerol 40%, pH 6,8) e aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante (15% acrilamida e 0,5% bis-acrilamida, contendo SDS 0,1%), acoplado a uma cuba de eletroforese GIBCO com tampão para eletroforese (Tris-base 25 mM, glicina 250 Mm e SDS 0,1%, pH 8,3). Utilizou-se Rainbow-Amersham-Pharmacia (20µL para cada gel) como padrão para marcador de peso molecular.

A eletroforese foi feita a 40-50 V, durante 12 horas. Após, o gel de poliacrilamida contendo as proteínas totais fracionadas foi embebido em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris-base 48 mM, SDS 0,037% e metanol 20%, pH 8,0), e as proteínas foram transferidas para membranas de Nylon (Hybond C+) utilizando-se uma cuba de transferência “semi-dry” Bioered (25 V, 500 mA, 50W, 1 hora). A membrana foi corada com solução de Ponceau-S (0,1%, ácido acético 10%) para verificar a eficiência da transferência das proteínas, e bloqueada com TBST (NaCl 150 mM, Tris 50 mM e Tween-20 0,1%), contendo 1% leite em pó, lavada (3 vezes, TBST) e incubada com anticorpo primário (2µg/mL, diluído 200-1000 vezes em TBST, com ou sem leite em pó a 2,5%) por 12-24 horas, a 4°C. A seguir, a membrana foi lavada (TBST, 3 vezes, 10 minutos cada lavagem), incubada com anticorpos secundário acoplado à enzima peroxidase HRP (2µg/mL, diluído 200-1000 vezes em TBST), durante 1h, lavada novamente (com TBST), e finalmente incubada com os reagentes do kit ECL Plus (Amersham-Pharmacia) para auto-radiografia, utilizando-se filmes fotográficos ("Diagnostic Films"), revelador e fixador dentais (KODAK).

Os anticorpos primários utilizados foram Anti-FGF2 (camundongo), Anti-FGFR1 (camundongo), anti-FGFR2 (camundongo), anti-FGFR3 (camundongo), anti-p53 (humano) e anti-c-Fos (camundongo), todos de procedência Santa Cruz Biotechnology, produzidos em coelhos. O anticorpo secundário utilizado foi Anti-IgG (coelho) acoplado à Peroxidase (HRP- Amersham).

3.8.2 Imunocitoquímica

Foram utilizadas duas aproximações experimentais: imunoperoxidase (utilizando-se anticorpos secundários marcados com a enzima peroxidase) e imunofluorescência (utilizando anticorpos secundários acoplados a fluoróforos). Para cada uma delas, células semeadas em lamínulas de vidro circulares Corning (1 cm de diâmetro, 20.000 células/lamínula), foram estimuladas com ACTH ou FGF2 (de acordo com cada experimento específico)

As células foram submetidas ao seguinte pré-tratamento: fixação (formaldeído ou p-formaldeído, 4% em PBS, Triton 0,3%); permeabilização das membranas celulares (incubação com NP-40 1%, em PBS, 20 minutos, à temperatura ambiente); lavagens (PBS-A, 3 vezes); incubação com soro normalizador (5%, em PBS-A e 0,3% de Triton, 1h); lavagens (PBS-A e Triton 0,3%, 3 vezes); incubação com anticorpo primário em câmara úmida (2µg/mL, 200-1000 vezes diluído em PBS, contendo albumina bovina a 1mg/mL, 12 horas, 4°C); lavagens (PBS-A e Triton 0,3%, 3 vezes).

A incubação com soro normalizador consiste em utilizar um soro de origem animal diferente à do anticorpo primário utilizado, e tem como finalidade eliminar sítios de interações não específicas para o anticorpo primário. Uma alternativa a essa etapa consistiu em incubar as células com albumina bovina (fração V, 1mg/mL, 1 hora, à temperatura ambiente). Os anticorpos primários utilizados foram Anti-FGF2 (camundongo), Anti-FGFR1 (camundongo), anti-FGFR2 (camundongo), anti-FGFR3 (camundongo), anti-p53 (humano) e anti-c-Fos (camundongo), todos de procedência Santa Cruz Biotechnology, produzidos em coelhos.

Imunoperoxidase: nessa abordagem, o anticorpo secundário utilizado é biotinilado, capaz de ligar-se não-covalentemente a avidina, que possui 4 sítios de ligação à biotina. O complexo, formado entre o anticorpo secundário e a avidina, deixa livre 3 sítios adicionais de ligação à biotina. Como a enzima peroxidase também é biotinilada, há uma amplificação da marcação. No entanto, a intensidade de marcação pode variar com as condições experimentais, como o lote dos anticorpos e o tempo de reação com DABI (diaminobenzidina, substrato para a enzima peroxidase), o que exigiu que os experimentos fossem realizados pelo menos em duplicatas com os mesmos anticorpos e reagentes. O número total de células contadas correspondeu a 500 para cada lamínula.

Após o pré-tratamento, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-rabbit-IgG acoplado com HRP (peroxidase, diluição 1:1000 em PBS, 12 horas, câmara úmida, 4°C). Após, as lamínulas foram lavadas (PBS, 3 vezes) e incubadas com o complexo Avidina/Biotina (cada solução diluída 100 vezes em PBS, de acordo com as especificações do kit Vectastain, Vector), por 1 hora. As lamínulas foram lavadas (PBS, 3 vezes), e foram adicionados DABI (diaminobenzidina) e persulfato de amônio (em pastilhas) previamente diluídos em 15 mL de PBS. Após rápida incubação

(15-30 segundos), as lamínulas foram lavadas com água bidestilada (3 vezes), e montadas em lâminas para microscopia (coladas com Entellan, dissolvido em Xilol). Os núcleos celulares foram corados em banho de imersão (30-60 segundos) com Hematoxilina de Harrys (solução aquosa 2 mg/mL, contendo alúmen de potássio 10mg/mL, óxido de mercúrio 2,5mg/mL, CH₃COOH glacial 40mL/L e etanol 50mL/L), e diferenciados com tratamento por imersão em Li₂CO₃ (solução saturada, que confere uma coloração azulada à Hematoxilina no interior dos núcleos). As lamínulas foram lavadas (água bidestilada, 3 vezes), secas à temperatura ambiente (2 horas), cobertas cada uma delas com óleo mineral (Nujol) e uma lamínula quadrada, e finalmente analisadas em um microscópio Nikon de contraste de fase.

Cabe ressaltar aqui algumas variações metodológicas para medir os receptores de FGF. A etapa no pré-tratamento correspondente à permeabilização com NP-40 não foi realizada, para evitar a exposição excessiva da membrana das células ao detergente que poderia solubilizar os receptores das mesmas. Pelo mesmo motivo, as soluções utilizadas para as lavagens foram feitas sem o detergente Triton (0,3%). A permeabilização das células, neste caso, foi feita somente na etapa de fixação com formaldeído ou p-formaldeído (solução a 4% em PBS contendo 0,3% de Triton).

Imunofluorescência. As células, submetidas ao pré-tratamento descrito anteriormente, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG acoplado ao fluoróforo Cy2 (Amersham, 2µg/mL, diluído 50 vezes em PBS), tratadas com RNase B (GIBCO, 10µg/mL, 20 minutos, temperatura ambiente), incubadas com Brometo de Etídeo (diluído 1:1000 m/v, 20 minutos), lavadas (água) e montadas em lâminas contendo óleo protetor Vectashield (Vectastain). A etapa de tratamento com RNase B foi essencial para evitar interações do Brometo de Etídeo com RNA citoplasmático. As lâminas foram analisadas em um microscópio confocal de varredura a laser Zeiss ("Laser Scanning Confocal Microscopy" – LSCM). As análises de LSCM foram realizadas no Laboratório de Biologia de Epitélios Digestivos (Departamento de Embriologia e Desenvolvimento, ICB/USP), sob supervisão da Profa. Dra. Patrícia Gama.

3.9 Imunoprecipitação

Anti-FGF2 policlonal, cujos epitopos correspondem à região C-terminal para FGF2, foi utilizado para detectar isoformas de baixo e de alto peso molecular para FGF2. Anticorpos policlonais são mais específicos para detectar proteínas do que anticorpos monoclonais. No entanto, o antisoro policlonal comercial pode conter anticorpos contaminantes que não são específicos para a proteína de interesse. Para eliminar (ou diminuir a presença) de anticorpos não-específicos na fração comercial de anti-FGF2, utilizou-se purificação por imunoafinidade (imunoprecipitação), onde anti-FGF2 foi incubado com uma solução contendo FGF2 recombinante (bovino) e proteína-A ligada a sefarose. A proteína A liga à cadeia pesada Fc da região de imunoglobulina para anti-FGF2. Após imunoprecipitação do complexo FGF2/anti-FGF2/proteína-A sefarose, a fração sobrenadante (empobrecida de anti-FGF2 específico para FGF2) foi separada e testada, e anti-FGF2 foi recuperado por eluição do precipitado. A solução resultante da eluição (enriquecida somente de anti-FGF2 específico para FGF2), foi testada quanto à sua especificidade para as isoformas de FGF2.

Preparação da solução-estoque de proteína-A sefarose

Em um tubo cônico Falcon (15 mL, Corning), foram adicionados proteína-A sefarose (Amersham-Pharmacia) e água MiliQ, na proporção 1:5 (em volume). A solução foi agitada até a hidratação da proteína-A sefarose (15 minutos, temperatura ambiente), e centrifugada (2000 rpm, 2 minutos, temperatura ambiente). O procedimento foi repetido (3 vezes), e finalmente adicionou-se tampão Tris (50 mM, pH 7,5) na proporção 1:1 (em volume). Uma alíquota da solução (50µL) suficiente para cada experimento foi separada do estoque. A proteína-A sefarose foi coletada por centrifugação (2000 rpm, 2 minutos, temperatura ambiente) e ressuspensa no mesmo volume com tampão RIPA para “Western blotting” contendo inibidores de protease e de fosfatase (ver seção 3.8.1).

Obtenção da solução empobrecida de anti-FGF2

Anti-FGF2 (10ng) foi adicionado a uma solução contendo FGF2 recombinante (200µg), em tampão RIPA (adicionado de inibidores), num volume final de 500µL. A solução foi incubada (4°C, 4-12 horas, sob agitação). Uma alíquota (50µL) da solução de proteína-A sefarose previamente preparada em tampão RIPA foi adicionada. Após incubação (4°C, sob agitação, 1 hora), o precipitado foi coletado através de centrifugação (2000 rpm, 2 minutos, 4°C), e a fração sobrenadante (solução empobrecida de anti-FGF2) foi separada e utilizada em “Western blotting”.

Recuperação de anti-FGF2 do precipitado

Para eluir o anti-FGF2 da proteína-A sefarrose, foi utilizado o tampão ácido de eluição recomendado pelo fabricante (Amersham-Biotech): Glicina (0,1 M) em pH 3,0. Alternativamente, foi testado também tampão citrato de sódio ácido (pH 3,0). O precipitado anteriormente coletado, contendo o complexo FGF2/anti-FGF2/proteína-A sefarose, foi ressuspensionado em tampão de eluição e incubado (1 hora, 4°C, sob agitação). A suspensão foi centrifugada (2000rpm, 5 minutos, 4°C), e o sobrenadante (enriquecido de anti-FGF2) foi neutralizado com tampão Tris-HCl (1 M, pH 9,0, 50-100µL), e utilizado em experimentos de “Western blotting”.

3.10 Medidas de síntese de DNA através de incorporação de BrdU

Esta metodologia consiste na incorporação de BrdU (Bromo-desoxi-Uridina), um análogo de Timidina, no DNA que está sendo sintetizado pelas células na fase S. BrdU pode ser detectado imuniquimicamente através de sua reação com um anticorpo específico.

Células Y-1 foram semeadas em lâminulas circulares Corning (1 cm de diâmetro, 20.000 células/lâminula), e transferidas para placas de poliestireno para cultura de células “multiwell” (de 6 “wells”, cada um contendo um par de lâminulas). As células semeadas em lâminulas (em duplicatas) foram estimuladas com ACTH (1nM) ou FGF2 (5ng/mL). Foi adicionado BrdU (Br-desoxi-uridina, SIGMA 50-100µmol/mL, preparado em PBS) que foi mantido por 12 horas no meio de cultura.

Após os tratamentos, as células foram fixadas e o DNA celular desnaturado segundo o seguinte procedimento: o meio de cultura foi descartado, as lâminulas foram lavadas com PBS (1 vez), e incubadas em metanol gelado (3mL, 10 minutos). Após lavagens (PBS, 3 vezes) e reidratação das células (15 minutos, PBS), foi adicionado HCl (2,0mL, solução 1,5M, 30 minutos), para desnaturação do DNA (o procedimento resulta em limitada depurinação e degradação do DNA), seguindo-se a lavagem das lâminulas (PBS, 3 vezes).

As incubações com anticorpo anti-BrdU foram feitas numa superfície plana, coberta com Parafilme, onde foram distribuídas alíquotas de anti-corpo anti-BrdU previamente diluído (40 µL). As lâminulas foram colocadas invertidas sobre as alíquotas dos anticorpos primários e incubadas (30 minutos, temperatura ambiente). Em seguida, as lâminulas foram transferidas para placas “multiwell” contendo PBS e lavadas (3 vezes). O mesmo procedimento foi utilizado para incubar as lâminulas com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo acoplado a Alexa-Fluor (2µg/mL, diluído 1:200, 50µL). Após, as lâminulas foram coladas com Entellan em lâminas retangulares para microscopia.

Finalmente, a coloração dos núcleos celulares foi feita com DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol, 5µg/mL, 50µL, 20 minutos, ausência de luz). As lâminas foram lavadas (PBS, 3 vezes), secas

(alguns minutos, temperatura ambiente, ausência de luz), e as lamínulas foram cobertas com óleo mineral Nujol e lamínulas quadradas Corning (para microscopia). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Nikon Phluophot utilizando-se filtros de excitação UV 330-380 nm e UV 420-490nm (para visualizar núcleos marcados com BrdU/fluoresceína e DAPI, respectivamente).

Os experimentos foram feitos em duplicatas e o número total de núcleos contados foi de 500 por lamínula.

3.11 “Northern Blotting”

Eletoforese das alíquotas de RNA total

Foram preparadas soluções contendo alíquotas quantificadas contendo RNA total (25 µg), 2µL de tampão MOPS concentrado 5 vezes (MOPS 40mM, NaCH₃COO 10mM, EDTA 1mM, em pH 7,0), 3,5 µL de formaldeído e 10 µL formamida deionizada (volume final de 20,0 µL, em água). As soluções foram desnaturadas (65°C, 15 minutos) e resfriadas imediatamente (0°C), adicionando-se 3 a 5 µL de tampão de amostra para RNA (glicerol 50%, EDTA 1 mM, MOPS 8mM, pH 7,0, Bromofenol e Xilenocianol a 0,25%).

As amostras de RNA foram aplicadas em gel desnaturante (em tampão MOPS diluído 5 vezes, pH 7,0) contendo agarose (1%), formaldeído (2,2 M) e Brometo de Etídeo (10 µg/mL). A eletroforese foi realizada à voltagem contínua (80-120V, 2 a 4 horas) em tampão MOPS (diluído 5 vezes, pH 7,0). A integridade do RNA foi verificado através da análise do padrão de separação entre os RNAs ribossômicos 18S e 28S (mais abundantes), num transluminador de luz ultravioleta.

Transferência do RNA do gel desnaturante para membranas de nitrocelulose

O RNA total foi transferido por capilaridade em um aparato de transferência: papel de filtro 3MM em contato com uma solução de SSC (NaCl 3,0 M, citrato de sódio 0,3 M, pH 7,0), diluída 20 vezes, o gel contendo RNA sobre o papel de filtro 3MM, membrana de nylon (Hybaid) embebida em SSC (sem diluição) disposta sobre o gel, duas folhas de papel cromatográfico 3MM, embebidas em SSC (sem diluição), dispostas sobre a membrana, e folhas de papel toalha secos cobrindo o sistema para a drenagem. O gradiente de concentração de SSC foi mantido por 16 a 24 horas. A membrana, após a transferência dos RNAs, foi lavada (H₂O esterilizada com DEPEC) e seca em papel toalha estéril (30 minutos, temperatura ambiente), e o RNA foi fixado a alta temperatura (80°C, 2 horas).

Síntese de sondas de DNA radioativas (marcadas com α -P³²-dCTP)

As sondas para hibridização foram sintetizadas a partir da desnaturação dos c-DNAs correspondentes a FGF2 (25-100ng) numa solução contendo “Random Primers” pdN₆ (oligonucleotídeos de 6 pares de bases com sequências randômicas, Amersham-Pharmacia, concentração final de 100 μ M) a 100°C, durante 5 minutos. A solução foi resfriada (em gelo) e foram adicionados 2 μ L da enzima “Large-T DNA polimerase” (7,4U/ μ L, GIBCO), 2 μ L de cada uma das soluções de dATP, dTTP e dGTP (todos a 0,5 μ M), 1 μ L de tampão para reação (500mM TrisHCl, 100mM MgCl₂, 10mM DTT, 500 μ g/mL BSA, pH 7,5) e 5 μ L de P³²- α dCTP (50 μ Ci, Amersham ou Invitrogen). A síntese das sondas foi feita à temperatura ambiente durante 2 horas.

Após a síntese, as sondas foram purificadas por filtração através de colunas de Sephadex G-50 em tampão TE (mistura 1:1). As colunas foram empacotadas por centrifugação branda (4000rpm, 5 minutos) e as reações foram aplicadas no topo das colunas, e centrifugadas (5000 rpm, 10 minutos). O material filtrado foi coletado num tubo Eppendorf e aquecido para a desnaturação das sondas (100°C, 5 minutos), sendo imediatamente resfriados (gelo).

Hibridização das membranas com as sondas radioativas

As membranas contendo RNAs fracionados foram pré-incubadas em garrafas de vidro para hibridização num tampão aquoso contendo SSPE concentrado (5 mL, solução de NaCl 3,0 M, NaH₂PO₄ 195 mM e EDTA 20,0 mM, em pH 7,4), formamida deionizada (10 mL), solução aquosa de Denhardt (2 mL, contendo Ficoll 10,0 g/L, Polivinilpirrolidona 10,0 g/L, Soroalbumina Bovina 10,0 g/L), dodecil sulfato de sódio (200 μ L, 10%), DNA de espermatozoides de salmão (200 μ g) previamente desnaturado (100°C, 2 minutos) água bidestilada (purificada em um sistema MiliQ), num volume final até 12 mL. Essa etapa correspondeu à pré-hibridização, que foi mantida por 12 horas, a 42°C, sob agitação, num forno para hibridização Hybaid.

As sondas foram diluídas em solução de hibridização (a mesma utilizada na pré-hibridização, contendo sulfato de dextrana 5%) que foi adicionada às membranas contendo os RNAs. As membranas foram incubadas por 16-24 horas, a 42°C.

Após hibridização, as membranas foram lavadas com SSC (diluído 1 vez, contendo SDS a 0,1%), à temperatura ambiente, por 20 minutos, em seguida a 42°C, por 20 minutos, com a mesma solução, e finalmente com SSC (diluído 10 vezes, contendo SDS a 0,1%), a 50°C, por 20 minutos, colocadas entre dois filmes plásticos e expostas a um filme fotográfico KODAK (12-24 horas, -80°C) para autoradiografia.

3.12 Transfecção Celular

Plasmídeos e duplas fitas de RNA foram incorporados pelas células em cultura com a utilização de lipossomos obtidos com fosfolipídios que se ligam (interações de carga) a ácidos nucleicos em solução, formando complexos que são incorporados à célula. Foram testados os reagentes comerciais Lipofectina e Lipofectamina (ambos GIBCO). Lipofectina foi utilizada em transfecção de plasmídeos, enquanto Lipofectamina mostrou-se mais eficiente para ensaios com siRNAs e por isso foi adotada. A maior toxicidade do reagente de Lipofectamina consistiu na principal limitação de sua utilização, fazendo-se necessário testes de concentração (de acordo com a tabela 5). A toxicidade do reagente foi analisada levando-se em consideração a presença de células mortas ou não aderidas à placa de cultura.

Transfecção transiente (plasmídeos)

Células foram cultivadas em placas p60 (DMEM, 10%FCS), em subconfluência (60-70%). Em seguida, foram preparadas as seguintes soluções (estéreis, em fluxo laminar): solução A (DNA plasmideal, até 10µg, em DMEM sem FCS e sem antibióticos, volume final de 100µL); solução B (Lipofectina GIBCO, 1µg/mL, em DMEM sem FCS e sem antibióticos, volume final de 100µL). As soluções foram incubadas (45 minutos) e misturadas brandamente em seguida, incubando-se novamente (15 minutos). As monocamadas celulares foram lavadas (DMEM sem FCS e sem antibióticos, 2 vezes), a mistura A e B foi diluída (até 0,8 mL, com DMEM sem FCS e sem antibióticos) e adicionada às células. Incubou-se (tempo de transfecção 5-24 horas) e o meio de transfecção foi substituído por DMEM (10% FCS, adicionado de antibióticos).

Transfecção estável (plasmídeos)

O procedimento para transfecção transiente foi mantido, no entanto o volume para a diluição da mistura A e B foi corrigido (de 0,8 mL para 1,8 mL). Após tempo de transfecção, as células foram subcultivadas em placas p100 em confluência baixa (20%), em meio DMEM contendo FCS (10%) e agente de seleção apropriado. A seleção dos clones estáveis foi feita durante duas a três semanas após transfecção, em presença de antibióticos específicos, de acordo com a resistência conferida por cada um dos plasmídeos utilizados (tabela 3).

Transfecção transiente (siRNAs)

Células foram cultivadas em placas p60 ou laminulas de vidro e mantidas em cultura (confluência de 70-80%). Em seguida, foram preparadas as soluções contendo siRNAs (200-400nM, a partir de um estoque a 20µM), e a solução contendo Lipofectamina (4-20µg/mL), todas em

DMEM (sem soro ou antibióticos). Os siRNAs utilizados foram desenhados conforme descrito em 3.14. Ambas as soluções foram misturadas e incubadas (15-30 minutos), em seguida a suspensão foi diluída e adicionada à monocamada de células (previamente lavadas com DMEM sem FCS ou antibióticos). Os volumes utilizados estão especificados, de acordo com o tamanho das placas, na tabela 5. O tempo de transfecção variou de 2 a 24 horas. Foram utilizados protocolos de transfecção transiente em pulso de 2h ou tratamentos sustentados (figura 4). Como controles, foram utilizados siRNAs cujas sequências não promovem interferência de RNA. O primeiro deles corresponde ao siRNA ligado a Rodamina (siRNA-Rho), para medir eficiência de transfecção através de medidas de fluorescência. O segundo deles corresponde ao siRNA-Sc2 (“scrambled 2”), cuja sequência não é complementar a mRNAs intracelulares.

Figura 5 - Procedimentos para transfecção transiente dos siRNAs em células Y-1. Os experimentos foram feitos em pulso (tempo de transfecção de 2 horas) ou em tratamentos sustentados (mantendo o meio de transfecção por 24 horas). Os pontos de coleta de RNA, ou de medidas de imunocitoquímica, estão indicados (2, 6, 12 e 24 horas). As setas largas delimitam o tempo de transfecção.

Diâmetro - placa de cultura (mm)	Diluição da solução de lipídio/siRNA (μL)	Lipofectamina (μg)	Volume final de Transfecção (mL)
35	100	2-25	0,8
60	300	6-75	2,4
100	800	16-200	6,4

Tabela 5 - Volumes de soluções de Lipofectamina utilizados em experimentos de transfecção celular.

3.13 Digestões com Enzimas de Restrição

Os procedimentos descritos a seguir (3.13 e 3.14) têm como etapas de caracterização a digestão de plasmídeos com enzimas de restrição. As condições experimentais e os sítios de digestão para as respectivas enzimas estão indicados na tabela 6.

Tabela 6 - Enzimas de restrição

Enzima	Tampão de reação	Sítio de Restrição
EcoR I	50 mM Tris-HCl (ph7,5), 10mM MgCl ₂ , 1 mM Ditríteitol, 10mM NaCl	G ↓ AATTC
Bgl II	50 mM Tris-HCl (ph7,5), 10mM MgCl ₂ , 1 mM Ditríteitol, 10mM NaCl	A ↓ GATCT
Hind III	10 mM Tris-HCl (ph7,5), 10mM MgCl ₂ , 1 mM Ditríteitol 50mM NaCl	A ↓ AGCTT
Xho I	50 mM Tris-HCl (ph7,5), 10mM MgCl ₂ , 1 mM Ditríteitol, 10mM NaCl	C ↓ TCGAG

Fontes: New England Biolabs, Amersham-Pharmacia e Promega

3.14 Obtenção da proteína de fusão FGF2/GFP

Choi e colaboradores ⁽⁸¹⁾ têm obtido e utilizado proteínas de fusão de FGF2 a GFP (“Green Fluorescent Protein”) para detectar a expressão e o tráfico intracelular de FGF2. Dentro do objetivo 2.3 proposto anteriormente, utilizamos a sequência codificadora completa para LMW-FGF2 (obtido através de RT-PCR), para subclonar em pEGFP-N1 (plasmídeo contendo GFP, oriundo de nosso banco de plasmídeos) e testar em transfecções transientes em células Y-1.

Plasmídeos pEGFP-N1 (provenientes de nosso banco de plasmídeos) foram digeridos com Enzimas de Restrição Xho I ou Hind III, em tampão de reação (de acordo com a tabela 6), a 37°C, durante 15 minutos. Em seguida, as enzimas foram inativadas a 65°C por 10 minutos, e os plasmídeos linearizados foram desfosforilados com fosfatase alcalina de camarão (USB, 1U/μg DNA), a 37°C, durante 1 hora, em tampão de reação (10mM MgCl₂, 20mM Tris-HCl, pH 8), seguindo-se a inativação da enzima (65°C, por 10 minutos).

Figura 6 – Obtenção da proteína de fusão a GFP para LMW-FGF2.

Figura 6-a) Sequência do cDNA clonado, gerado a partir de um único mRNA para LMW-FGF2, através de RT-PCR (oligonucleotídeos específicos indicados pelas letras maiúsculas). Em azul: códon de início de tradução (ATG) para LMW-FGF2. Figura 6-b) Proteínas de fusão a GFP previstas para LMW-FGF2. A ligação a GFP ocorre na porção C-terminal de LMW-FGF2.

Fragmentos correspondentes a LMW-FGF2 (região codificadora completa, figura 6-a) foram obtidos por RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos contendo adaptadores para XhoI e HindIII (figura 7). Após sua purificação, os c-DNAs foram ligados em pGEMT-easy utilizando o kit

PROMEGA (seção 3.7). Aliquotas das reações de ligação (5µL) foram utilizadas para transformar bactérias quimicamente competentes DH5-α e amplificar os plasmídeos recombinantes (seção 3.6).

Após purificação (“mini-preps”, seção 3.6), os plasmídeos recombinantes foram digeridos com as enzimas de restrição Xho I e Hind III (tabela 6), os fragmentos para LMW-FGF2 contendo os adaptadores foram purificados em colunas GFX-Amersham (seção 3.5) e fosforilados com T4PNK (USB, 10U), em tampão para reação (70mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, pH 7,5) suplementado de ATP (100mM).

Os fragmentos fosforilados correspondentes a LMW-FGF2 foram ligados nos plasmídeos pEGFP-N1 linearizados e desfosforilados, de acordo com o procedimento descrito em 3.7. Aliquotas das ligações foram novamente utilizadas para transformação de bactérias quimicamente competentes (seção 3.6) e amplificação dos plasmídeos recombinantes. pEGFP-N1 recombinantes foram verificados quanto à presença dos insertos através de digestão com enzimas de restrição (Xho I e Hind III, tabela 6).

```

5' CTCGAG ATG GCA GCC GGG AGC atc acc acg ctg ccc gcc ttg ccc gag
gat ggc ggc agc ggc gcc ttc ccg ccc ggc cac ttc aag gac ccc aag cgg ctg tac
tgc aaa aac ggg ggc ttc ttc ctg cgc atc cac ccc gac ggc cga gtt gac ggg gtc
cgg gag aag agc gac cct cac atc aag cta caa ctt caa gca gaa gag aga gga gtt
gtg tct atc aaa gga gtg tgt gct aac cgt tac ctg gct atg aag gaa gat gga aga
tta ctg gct tct aaa tgt gtt acg gat gag tgt ttc ttt ttt gaa cga ttg gaa tct
aat aac tac aat act tac cgg tca agg aaa tac acc agt tgg tat gtg gca ctg aaa
cga act ggg cag tat aaa ctt gga tcc aaa aca gga cct ggg cag aaa gct ata ctt
ttt ctt cca atg tct gct aag agc 3'
3' A GAA GGT TAC AGA CGA TTC TCG CTCGAA 5'

```

Figura 7 - Oligonucleotídeos específicos para obtenção de LMW-FGF2 contendo adaptadores para XhoI e HindIII. A posição dos oligonucleotídeos na sequência-consenso correspondente (em negrito), as seqüências adaptadoras para Xho I e Hind III (em vermelho), e o início de tradução (sublinhado) estão indicados.

3.15 Interferência de RNA

O fenômeno de interferência de RNA foi inicialmente descrito por Fire e colaboradores ⁽⁷¹⁾ em *C.elegans* (1998) como uma resposta de defesa celular a infecções por retrovírus. O princípio deste fenômeno está baseado no recrutamento de complexos multi-enzimáticos intracelulares (DICER e RISC) que reconhecem duplas-fitas de RNA (ds-RNA) e promovem sua degradação.

A enzima DICER, da família das RNases III ⁽⁸²⁾, é responsável pelo reconhecimento e pela clivagem dos ds-RNA em fragmentos menores denominados siRNAs (“small interfering RNAs”) de 18 a 24 pares de bases contendo 2 oligonucleotídeos “overhangs” (não-pareados) em sua porção 3’. Essa estrutura confere especificidade à ds-RNA e permite o recrutamento de RISC (“RNA Interfering Silence Complex”), um complexo multi-enzimático que possui atividade helicase. Os fragmentos de ds-RNA são convertidos em fitas simples (ss-RNAs), e permanecem ligados a RISC, sendo direcionados a sequências-alvo nos seus correspondentes mRNAs complementares. Finalmente, RISC perde afinidade pela dupla fita de RNA formada entre o fragmento de siRNA e seu mRNA complementar. DICER reconhece novamente a dupla-fita formada (mRNA + siRNA), promovendo a clivagem do mRNA e tornando-o suscetível à degradação (RNases). A figura 8 ilustra o mecanismo de interferência de RNA revisado por Hutvagner e colaboradores ⁽⁷⁰⁾.

Obtenção de repetições invertidas para subclonagem em pSUPER

Foram desenhados em nosso laboratório oligonucleotídeos (fitas sense e antisense) contendo uma sequência-consenso pequena (24nt) complementar ao mRNA-alvo, uma sequência “linker” GGGCCC e uma sequência invertida (complementar) correspondente à sequência de 24 nucleotídeos, flanqueados por sítios adaptadores para Enzimas de Restrição (Bgl II e Hind III, de acordo com a figura 9). O desenho dos oligonucleotídeos foi feito utilizando-se como ferramenta computacional o programa OligoEngine para otimização dos mesmos, de acordo com a metodologia descrita por Sui e colaboradores ⁽⁶⁸⁾.

Aliquotas de solução dos oligonucleotídeos (20µL de cada, fitas sense e antisense, soluções a 100nM) foram incubadas num volume final de 100µL tampão de anelamento (100mM NaCH₃COO, 2mM MgCH₃COO e 30mM HEPES-KOH, em pH 7,4) a 95°C por 4 minutos, seguindo-se a incubação a 70°C por 10 minutos, e finalmente com resfriamento gradual até 10°C (ou à temperatura ambiente). As duplas-fitas de DNA foram fosforiladas com 10U de T4 PNK (em tampão 70mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 5mM DTT, pH 7,5) suplementado de ATP (1mM), durante 30 minutos, a 37°C, e a enzima foi inativada (65°C, 10 minutos). As duplas fitas formadas estão mostradas na figura 10.

Plasmídeos pSUPER (alíquotas de 1-5 µg) foram linearizados (BglIII e HindIII, segundo condições especificadas na tabela 6) e desfosforilados com Fosfatase Fetal Intestinal (CIP/USB, 10U), em tampão de reação (100mM NaCl, 1mM DTT, 50mM Tris-HCl e 10 mM MgCl₂, em pH 7,9), durante 30 minutos, a 37°C. As duplas-fitas de DNA fosforiladas foram ligadas em vetores pSUPER linearizados (Bgl II e Hind III) e desfosforilados, segundo procedimento descrito na seção 3.7. Alíquotas das ligações foram utilizadas para transformar bactérias competentes, amplificar e isolar os plasmídeos recombinantes (seção 3.6). Os plasmídeos recombinantes foram verificados quanto à presença do inserto através de digestões com enzimas de restrição EcoR I e Hind III (em condições especificadas na tabela 6) e os fragmentos obtidos foram analisados em eletroforese de

Figura 8 - Bloqueio da expressão gênica através da degradação específica de mRNAs por RNAi. O mecanismo de ativação (revisto por Hutvagner e colaboradores) ⁽⁷⁰⁾, envolve DICER (enzima da família das RNases III), capaz de reconhecer duplas-fitas de RNA (dsRNA) e gerar siRNA ("small interfering" RNAs). RISC (RNA "interfering silencing complex") corresponde a um complexo de proteínas que reconhecem os siRNAs, processando-os em fitas simples e direcionando-os a seus respectivos mRNAs-alvo, que serão degradados novamente pela DICER.

Figura 10 - Duplas-fitas sintéticas de DNA para subclonagem em pSUPER. Os mRNAs-alvo correspondem a FGF2 e aos receptores de FGF (R1, R2 e R3). As sequência-consenso pequenas correspondentes às repetições invertidas (21-24 pares de bases, em itálico), complementares aos respectivos mRNAs-alvo, a sequência “linker” (delimitada por retângulos), bem como os sítios adaptadores para enzimas de restrição (Bgl II e Hind III, em vermelho) estão indicados.

Utilização de siRNAs sintéticos correspondentes a FGFR1 e FGFR2

Os siRNAs sintéticos foram desenhados em colaboração com o Dr. Matthew P. Hoffman (NIDCR-NIH), que tem aplicado a metodologia no bloqueio de morfogênese em glândulas salivares induzida por FGF (dados não publicados), e cedidos para testes em células Y-1. Os siRNAs correspondentes aos receptores FGFR1 e FGFR2 (figura 11) foram desenhados utilizando-se como ferramentas para a análise das seqüências os programas “Gene Runner” e “OligoEngine” para otimização de siRNAs.

Os siRNAs foram utilizados para transfecção transiente segundo protocolo descrito na seção 3.11.

Figura 11 - siRNAs sintéticos utilizados em ensaios de interferência de RNA.

Fonte: Qiagen-Xeragon, adquiridos com recursos do Dr. Matthew P. Hoffman (NIDCR-NIH).

4. Resultados

4.1. Detecção e caracterização (seqüências de cDNA) de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores expressos em células adrenocorticais

Para detectar a expressão de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores, foram utilizados c-DNAs produzidos em reações de transcrição reversa (RT), a partir de frações de RNA total obtidas de células Y-1 (linhagem estabelecida de camundongo) e de células glomerulosas ou fasciculadas/reticulares (culturas primárias de rato), amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos “forward” e “reverse” (tabela 2) delimitando a região codificadora do mRNA de interesse.

As tabelas 7-a e 7-b mostram os resultados de RT-PCR obtidos para células Y-1, culturas primárias de células adrenocorticais glomerulosas e fasciculadas/reticulares. O tamanho dos c-DNAs amplificados por RT-PCR está indicado em pares de bases (pb). Os fragmentos de c-DNA descritos na tabela 7-a e 7-b foram subclonados, respectivamente, em vetores plasmídeos pMOSBlue e pGEMT-easy, e caracterizados através de sequenciamento. Para cada um dos plasmídeos caracterizados, foram realizadas pelo menos duas reações de sequenciamento, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o promotor T7 (em pMOSBlue), ou oligonucleotídeos “forward” para o c-DNA subclonado (pGEMT-easy), mostrados na tabela 2.

Tabelas 7-a e 7-b (próxima página) – Fragmentos de c-DNA obtidos por RT-PCR, detectados e caracterizados em células adrenocorticais, clonados em pMOSBlue e pGEMT-easy. Alguns Fatores de Crescimento e seus Receptores foram analisados utilizando-se diferentes pares de oligonucleotídeos delimitando regiões distintas dos correspondentes mRNAs (indicados entre parêntesis). Asteriscos indicam fragmentos que não foram identificados em Y-1 ou culturas primárias, sendo necessário a utilização de outras linhagens celulares positivas para os correspondentes c-DNAs, para testar os oligonucleotídeos. ND = c-DNAs não detectados.

Tabela 7-a

pMOSBlue			
Gene	Fragmentos de PCR (pb)		
	Y-1	G	F/R
FGF2	350	350	350
FGFR1 (1)	ND	ND	ND
FGFR1 (2)	444	444	444
FGFR2 (1)	138	138	138
FGFR2 (2)	432	432	432
FGFR3 (1)	ND	ND	ND
FGFR3 (2)	540	540	540
FGFR4 (1)	ND	ND	ND
FGFR4 (2)*	ND	ND	ND
PDGF-A	179	179	179
PDGF-B(1)	225	225	225
PDGF-B(2)	285	285	285
PDGF-R α *	ND	ND	ND
PDGF-R β *	ND	ND	ND
IGF-1	273	ND	ND
IGF-2	288	288	288
IGF-R1	ND	ND	ND
IGF-R2	ND	536	536
EGF	496	ND	ND
TGF- α	391	ND	391
EGF-R	ND	ND	ND
VEGF	332 / 462	332 / 462	332 / 462

Tabela 7-b

pGEMTeasy			
Gene	Fragmentos de PCR (pb)		
	Y-1	G	F/R
LMW-FGF2	465	465	465
HMW-FGF2	582	582	582
Alt.spl. FGF2	526	526	526
FGFR1 (3)	361	361	361
FGFR2 (3)	376	376	376
FGFR3 (3)	733	733	733
FGFR4 (3)	ND	ND	ND
TGF- β 1	795	795	795
TGF- β 2	564	564	564
TGF- β 3	561	561	561
TGF- β R1	314	314	ND
TGF- β R2	459	459	ND

Uma etapa anterior à caracterização dos c-DNAs através de sequenciamento consistiu em verificar a presença dos mesmos em pMOSBlue a partir de reações de PCR, utilizando-se alíquotas de plasmídeos (1-2 μ L, 50-100ng) e oligonucleotídeos delimitando seu sítio de clonagem. A figura 12 mostra uma experimento representativo para alguns plasmídeos pMOSBlue verificados, cujos produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose. O mesmo procedimento foi utilizado para verificar plasmídeos pGEMT-easy recombinantes (não mostrado).

Figura 12 - Verificação através de PCR da subclonagem dos produtos de RT-PCR em pMOSBlue recombinantes, utilizando oligonucleotídeos específicos delimitando seu sítio de clonagem. Os oligonucleotídeos correspondem à região promotora T7 (“primer sense”) e à região -40 (oligonucleotídeo U19, “primer antisense”).

Plasmídeos negativos quanto à presença dos insertos (pMOSBlue vazios) geraram produtos de PCR de 140 pares de bases, de acordo com a sequência delimitada pelos oligonucleotídeos no plasmídeo, mostrada na figura 13.

Figura 13 - Posição dos oligonucleotídeos no plasmídeo pMOSBlue, utilizados para verificar a presença dos insertos através de PCR. Os oligonucleotídeos delimitam uma região de 140 pares de bases em plasmídeos não-recombinantes (sem insertos).

A tabela 8 mostra a análise dos resultados obtidos na eletroforese (referente à figura 12), indicando os plasmídeos recombinantes que foram utilizados em reações de sequenciamento (em negrito), com os correspondentes tamanhos indicados (em pares de bases). Plasmídeos vazios ou que originaram fragmentos com tamanhos não esperados não foram utilizados em reações de sequenciamento.

Plasmídeo (lane)	Gene subclonado	Fragmento (pb)	Plasmídeo (lane)	Gene subclonado	Fragmento (pb)
1-2	FGFR1.2 (Y-1)	580	45-46	VEGF (Y-1)	500
3	FGFR2.1 (Y-1)	300	47-48	FGF2 (G)	500
4	FGFR2.1 (Y-1)	250	49	FGF2 (G)	250
5-6	FGFR2.1 (Y-1)	350	50	FGF2 (G)	200-300
7	FGFR2.2 (Y-1)	600	51-52	PDGF-A (G)	350
8-9	FGFR3.2 (Y-1)	ND	53-54	PDGF-B.1 (G)	350
10-12	FGFR2.1 (Y-1)	250	55-56	PDGF-A (G)	350
13-14	FGFR2.2 (Y-1)	ND	57	PDGF-B.2 (G)	ND
15-16	FGFR2.1 (Y-1)	250	58-59	TGFα (G)	550
17	FGFR2.1 (Y-1)	350	60	VEGF (G)	450
18-19	FGFR3.2 (Y-1)	600	61	VEGF (G)	250
20	FGFR2.1 (Y-1)	250	62	VEGF (G)	450
21-22	FGFR2.1 (Y-1)	250	63-64	FGF2 (G)	500
23-25	FGFR2.1 (Y-1)	350	65	FGF2 (G)	ND
26-27	FGFR.2.1 (Y-1)	250	66-68	PDGF-A (F/R)	350
28	FGFR3.2 (Y-1)	ND	69-70	PDGF-B.2 (F/R)	600
29	PDGF-B.1 (Y-1)	400	71-72	PDGF-B.1 (F/R)	350
30	FGF2 (Y-1)	500	73-74	IGF2 (F/R)	500
31	FGF2 (Y-1)	300	75	IGF1 (F/R)	ND
32-34	PDGF-A (Y-1)	350	76-78	TGFα (F/R)	500
35-37	PDGFB.2 (Y-1)	600	79	VEGF (F/R)	300
38-39	PDGF-A (Y-1)	350	80	VEGF (F/R)	ND
40-41	IGF1 (Y-1)	450	81	IGF1 (Y-1)	350
42	IGF2 (Y-1)	500	82-83	EGF (Y-1)	350
43	FGF2 (Y-1)	300	84-86	IGFR2 (Y-1)	450
44	VEGF (Y-1)	350	87	Nenhum (vazio)	140

Tabela – 8 Análise dos resultados obtidos na figura 12, correspondente à varredura por PCR de pMOSBlue recombinantes contendo fragmentos de c-DNA (RT-PCR) para Fatores Peptídicos de Crescimento e seus receptores. G = células adrenocorticais glomerulosas (rato); F/R = células adrenocorticais fasciculadas/reticulares (rato); Y-1 = linhagem celular de camundongo. Somente as amostras em negrito, contendo os fragmentos com tamanho esperado, foram utilizados em reações de sequenciamento. Observação: os tamanhos dos fragmentos são aproximados e correspondem aos fragmentos de c-DNA adicionados de 140 pares de bases (número de pares de bases delimitado no vetor vazio). ND = c-DNAs não detectados.

4.2. Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF2) e seus receptores (FGFRs)

FGF2 e suas isoformas

Numa primeira aproximação, foram detectados diferentes transcritos para FGF2 em células adrenocorticais Y-1 através de “Northern blotting” (figura 14), utilizando-se sondas radioativas sintetizadas a partir de um fragmento de c-DNA obtido por RT-PCR, correspondente à região codificadora incompleta para FGF2 (350 pb). A sequência de c-DNA correspondente ao fragmento de FGF2 utilizado para sintetizar a sonda está mostrado na figura 15-b.

Foram detectados dois mRNAs correspondentes aos transcritos de 3,7 kb (“alternative spliced”) e de 7,0 kb (“canonical”) para FGF2. A figura 14 mostra o experimento de “Northern blotting” no qual foram utilizadas alíquotas de RNA total (20µg/lane) de células carenciadas (mantidas na ausência de soro), em crescimento exponencial (10% de FCS), ou tratadas com soro (10% de FCS) em diferentes tempos de tratamento. Células carenciadas apresentaram uma pequena diminuição nos níveis de ambos os mRNAs, que foram restabelecidos sob tratamentos sustentados de soro (FCS, 10%) ao longo do tempo, como indicado pela figura 14. Níveis de mRNA correspondentes a GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase), gene de transcrição constitutiva (não regulada) na célula, foram utilizados como controle interno de quantidade de RNA.

Figura 14: “Northern blotting” para detectar isoformas de mRNAs correspondentes a FGF2. Foram utilizadas células carenciadas (C), células em crescimento exponencial (E) e células estimuladas com soro (FCS, 10%) em diferentes tempos de tratamento, indicados em horas (h). O tamanho dos mRNAs está indicado em quilobases (Kb).

Dando continuidade à caracterização dos transcritos para FGF2, as seqüências codificadoras correspondentes aos mesmos foram detectadas por RT-PCR (figura 15-a). Oligonucleotídeos específicos foram desenhados para delimitar as respectivas regiões codificadoras dos mRNAs, a partir de seqüências-consenso descritas na literatura ⁽⁸³⁾. Os fragmentos de c-DNA obtidos foram subclonados em pMOSBlue e caracterizados através de seqüenciamento (figura 15-b), e as seqüências foram comparadas utilizando-se o programa Clustal (EBI-EMBL) para análise de similaridade.

15-a

Figura 15-a) Eletroforese em gel de agarose dos c-DNAs obtidos por RT-PCR correspondentes aos mRNAs “canônico” (fragmento de 350 pb) e ao produto de “splicing” alternativo (fragmento de 500 pb) para FGF2.

Figura 15-b) Análise de similaridade de seqüência (ClustalW – EBI/EMBL) para os c-DNAs de FGF2 (canônico e alternativo) detectados e em células Y-1. As regiões correspondentes aos oligonucleotídeos para RT-PCR estão indicados (em vermelho). Asteriscos indicam similaridade entre os nucleotídeos.

15-b

```

"canonical" FGF2mRNA
alternative FGF2mRNA
-----ATGGCTGCCAGCGGCATCACCTCGCTT 27
AGAAAAGACTCAGGCACGTGTGCAAGTGTCCAAGAGCATTTCAAAAGGGAAGAAGGAGCTG 60
alternative FGF2 Upstream primer * * * * *

"canonical" FGF2mRNA
alternative FGF2mRNA
CCCGCACT--GCCGGAGGACGGCGGCGCCCTTCCC---ACCAGGCCACTTCAAG--- 78
CCAGGAACAGGCTGGAGTTGGGAAGTGCTCCTCTCTTGGGTACATTGGAAACCCAAGCTT 120
* * * * *

canonical FGF2 upstream primer
-GACCCCAAGCGGCT--CTACTGCAAGAAGCGCGGCTTCTTCTCTGCGCA---TCCATCC 131
GGATCTTATGTTTCTGGCTAATCTCCTTTTGGCACTTATGACTTTAAGACATTCTAGCT 180
* * * * *

"canonical" FGF2mRNA
alternative FGF2mRNA
CGAC-GGCCGC-----GTGGATGGCGTCCGGGAGAAGAGCGACCCACA-----CGTCAA 179
TGGCTAGTGGCTTATAATGAAGGCTTTTCATGTTGGTGACCACAAGCTGAATGCCATCAA 240
* * * * *

"canonical" FGF2mRNA
alternative FGF2mRNA
ACTACAACTCCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGGAGTGTGTGCCAACC 239
ACTACAACTCCAAGCAGAAGAGAGAGGAGTTGTGTCTATCAAGGGAGTGTGTGCCAACC 300
*****

"canonical" FGF2mRNA
alternative FGF2mRNA
GTACCTTGCTATGAAGGAAGATGGACGGCTGCTGGCTTCTAAGTGTGTTACAGAAGAGTG 299
GTACCTTGCTATGAAGGAAGATGGACGGCTGCTGGCTTCTAAGTGTGTTACAGAAGAGTG 360
*****

"canonical" FGF2mRNA
alternative FGF2mRNA
TTTCTTCTTTGAACGACTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCACGGAATACTC 359
TTTCTTCTTTGAACGACTGGAATCTAATAACTACAATACTTACCGGTCACGGAATACTC 420
*****

"canonical" FGF2mRNA
alternative FGF2mRNA
CAGTTGGTATGTGGCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTCGGATCCAAAACGGGACC 419
CAGTTGGTATGTGGCACTGAAACGAACTGGGCAGTATAAACTCGGATCCAAAACGGGACC 480
*****

Canonical FGF2 Reverse Primer
TGGACAGAAGGCCATACCTGTTTCTTCCATGTCTGCTAAGAGCTGA 465
TGGACAGAAGGCCATACCTGTTTCTTCCATGTCTGCTAAGAGCTGA 526
*****

Alternative FGF2 Reverse Primer

```

Com relação à expressão de FGF2 e de suas isoformas de baixo e de alto peso molecular (respectivamente, LMW e de HMW-FGF2s), a metodologia de “Western blotting” foi escolhida para detectar o número de isoformas de proteínas e seus correspondentes tamanhos (pesos moleculares, em KDa). Como controle positivo, FGF2 recombinante (bovino) foi utilizado (4 ng), bem como diferentes linhagens de células normais (Fibroblastos humanos normais - FHN), e células transformadas, estabelecidas em cultura (tumor de rim de macaco COS-7 e tumor de útero humano HeLa), cuja expressão de isoformas de FGF2 está descrita na literatura ⁽⁸⁴⁾. Os resultados estão mostrados nas figuras 16-a e 16-b. Pelo menos duas isoformas de alto peso molecular para FGF2 foram detectadas em Y-1, correspondendo a 21 e 24 KDa, juntamente com a isoforma de baixo peso molecular (18 Kda).

Figura 16 – Isoformas para FGF2, expressas em células Y-1 e em linhagens celulares utilizadas como controle. Figura 16-a) Células Y-1 em crescimento exponencial (100µg proteínas totais) foram comparadas com FHN (fibroblastos humanos normais) carenciados (C), em crescimento exponencial (Exp) ou estimulados com soro (FCS, 10%). FGF2 recombinante (2-4 ng) foi utilizado como controle positivo. Figura 16-b) Linhagens celulares utilizadas como controles positivos para a expressão de FGF2 de alto peso molecular. Todas os lisados de proteínas totais (200µg proteínas totais) foram obtidos a partir de células em crescimento exponencial. O padrão de peso molecular (em KDa) está indicado (não mostrado) e corresponde ao reagente “Rainbow” (Pharmacia – seção 8.1, Materiais e Métodos).

Como controle adicional da especificidade para o anticorpo utilizado, foi preparada uma solução empobrecida do mesmo (solução ii) através de imunoprecipitação, utilizando-se FGF2 recombinante e proteína-A sefarose. O anticorpo para FGF2 foi recuperado da fração imunoprecipitada (complexo FGF2/anti-FGF2/proteína-A sefarose), gerando uma solução enriquecida novamente com anti-FGF2 (solução iii). As soluções ii e iii foram utilizadas para incubar membranas para “Western blotting” contendo frações de proteínas totais obtidas de lisados de células Y-1, bem como FGF2 recombinante como controle positivo. Os resultados foram comparados com incubações utilizando anti-FGF2 diluído 1:200 (em PBS, contendo BSA a 1mg/mL), a partir de um estoque (2µg/mL). A figura 17 mostra os resultados obtidos. A solução ii, empobrecida de anti-FGF2, não apresentou detecção significativa para FGF2 e suas isoformas, enquanto a solução de anti-FGF2 não imunoprecipitada (i) e a solução contendo anti-FGF2 recuperado (iii) foram positivas, indicando a especificidade de anti-FGF2 para FGF2.

Figura 17 – Purificação de anti-FGF2 por imunoprecipitação e demonstração da presença de isoformas de LMW- e HMW-FGF2 em células Y-1. Figura 17-a) Procedimento resumido de obtenção de frações empobrecidas para anti-FGF2 através de imunoprecipitações com LMW-FGF2 (recombinante). Figura 17-b) Experimentos de “Western blotting” para testar especificidade de anti-FGF2. Os lisados celulares correspondentes às frações de proteínas totais foram obtidos de células Y-1. C = células carenciadas (DMEM, 48 horas). A3h = células tratadas com ACTH (1 nM, 3 horas). FGF2 = LMW-FGF2 recombinante, bovino (18 Kda). Em i, a membrana foi incubada com anti-FGF2 (não imunoprecipitado); em ii, a membrana foi incubada com a fração empobrecida para anti-FGF2; em iii, a membrana foi incubada com anti-FGF2 recuperado por eluição do precipitado FGF2/anti-FGF2/proteína-A sefarose.

Receptores de FGF expressos em células adrenocorticais

A abordagem para detectar as isoformas de FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4 consistiu no desenho de oligonucleotídeos específicos para os mesmos a partir de seqüências-consenso depositadas na literatura ^(85, 86, 87 e 88) para rato e camundongos e a amplificação, através de RT-PCR, de c-DNAs correspondentes. Diferentes regiões codificadoras para os mRNAs de FGFRs foram delimitadas pelos oligonucleotídeos, obedecendo aos seguintes critérios: Região I: corresponde à região de IgG1 (o primeiro domínio similar a imunoglobulina para FGFRs); Região II: corresponde

aos domínios de tirosina-quinase 1 e 2 (RTK 1 e 2) intracelulares, responsáveis pela atividade de FGFR; Região III: corresponde aos domínios IgG3 e TM (transmembrânico). Essa região define as isoformas b ou c (geradas por “splicing” alternativo) para cada um dos FGFR (R1, R2, R3 e R4).

Os c-DNAs correspondentes às regiões 1, 2 e 3 para FGFR1b, FGFR2c e FGFR3b foram detectados em células adrenocorticais Y-1, e um sumário dos resultados obtidos está mostrado na figura 18. Como controle positivo para FGFR4 (ausente nas células adrenocorticais), foram utilizadas células MCF-7, que expressam todas as formas de receptores para FGF, de acordo com resultados da literatura ⁽⁸⁹⁾. Uma figura representativa de eletroforese dos produtos de RT-PCR para os FGFRs encontrados em células Y-1 e MCF-7 está mostrada na figura 19. As seqüências de c-DNA, caracterizadas através de reações de sequenciamento, para FGFR1b, FGFR2c e FGFR3b, detectadas em células Y-1, estão mostradas nas figuras 20-a, 20-b e 20-c, respectivamente.

Figura 18 – Detecção de diferentes FGFRs em células adrenocorticais Y-1 através de RT-PCR. A tabela mostra os produtos de RT-PCR obtidos utilizando-se oligonucleotídeos específicos para FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4. Abaixo da tabela, o diagrama esquemático mostra as regiões (1, 2 e 3) delimitadas pelos oligonucleotídeos para PCR (indicados pelas setas) no mRNA correspondente, onde estão indicadas as regiões correspondentes aos domínios similares a imunoglobulina IgG1, IgG2 e IgG3, transmembrana (TM) e de tirosina-quinase (TK I e II). UP = “upstream primer” (ou oligonucleotídeo “forward”). RP = “reverse primer”.

Figura 19 – Eletroforese em gel de agarose para os produtos de PCR para FGFRs, expressos em células adrenocorticais e em células MCF-7. P = padrão de tamanho (em pares de bases). Células Y-1 (Y) e células MCF-7 (M) estão indicadas. Os fragmentos amplificados estão indicados, e correspondem aos oligonucleotídeos delimitando R1.3, R2.3, R3.3 e R4.3.

Região 2 (444 pares de bases)

"Forward primer"

```
--A CCG CTC TAC CTG GAG ATC att atc tac tgc acc ggg gcc ttc ctg atc tcc tgc atg ttg
    P  L  Y  L  E  I  I  I  Y  C  T  G  A  F  L  I  S  C  M  L
ggc tct gtc atc atc tat aag atg aag agc ggc acc aag aag agc gac ttc cat agc cag atg
    G  S  V  I  I  Y  K  M  K  S  G  T  K  K  S  D  F  H  S  Q  M
gct gtg cac aag ctg gcc aag agc atc cct ctg cgc aga cag gta aca gtg tca gct gac tcc
    A  V  H  K  L  A  K  S  I  P  L  R  R  Q  V  T  V  S  A  D  S
agt gca tcc atg aac tct ggg gtt ctc ctg gtt egg ccc tca egg ctc tcc tcc agc ggg acc
    S  A  S  M  N  S  G  V  L  L  V  R  P  S  R  L  S  S  S  G  T
ccc atg ctg gct gga gtc tcc gaa tat gag ctc cct gag gat ccc cgc tgg gag ctg cca cga
    P  M  L  A  G  V  S  E  Y  E  L  P  E  D  P  R  W  E  L  P  R
gac aga ctg gtc tta ggc aaa cca ctt ggc gag ggc tgc ttc ggg cag gtg gtg ttg gct gag
    D  R  L  V  L  G  K  P  L  G  E  G  C  F  G  Q  V  V  L  A  E
gcc atc ggg ctg gat aag gac aaa ccc aac cgt gtg acc aaa gtg gcc GTG AAG ATG TTG AAG
    A  I  G  L  D  K  D  K  P  N  R  V  T  K  V  A  V  K  M  L  K
```

TCC "Reverse primer"

S

Região 3 (361 pares de bases)

"Forward primer"

```
-TC AAC CAC ACC TAC CAG CTt gac gtc gtg gaa cga tct ccg cac cga ccc cat cct tca gca
    N  H  T  Y  Q  L  D  V  V  E  R  S  P  H  R  P  H  P  S  A
aca gtg gcc ctg ggc agc aat gtg gag ggg ctg cct gcc aac aag ttc atg tgt aag gtg tat
    G  L  P  A  N  K  T  V  A  L  G  S  N  V  E  F  M  C  K  V  Y
agc gat ccg cag cct cac att cag tgg ctg aag cac atc gag gtg aac ggg agt aag atc ggg
    S  D  P  Q  P  H  I  Q  W  L  K  H  I  E  V  N  G  S  K  I  G
cca gac aac ttg ccg tat gtc cag atc ctg aag act gct gga gtt aat acc acc gac aag gaa
    P  D  N  L  P  Y  V  Q  I  L  K  T  A  G  V  N  T  T  D  K  E
atg gag gtg ctt cat cta cgg aat gtc tcc ttt gag gat gcg ggg gag tat acg tgc ttg ggc
    M  E  V  L  H  L  R  N  V  S  F  E  D  A  G  E  Y  T  C  L  A
ggt aac tct atc gga ctc tcc cat cac tct GCA TGG TTG ACC GTT CT "Reverse primer"
    G  N  S  I  G  L  S  H  H  S  A  W  L  T  V
```

Figura 20-a) Sequências de c-DNA obtidas (RT-PCR e sequenciamento) e peptídicas (previstas) para os fragmentos de FGFR1b (flag) detectados em células adrenocorticais Y-1. Os oligonucleotídeos "forward" (UP) e "reverse" (RP) estão indicados (em negrito, letras maiúsculas). As regiões de c-DNA detectadas correspondem aos domínios transmembrânico (TM) e de tirosina quinase (RTK) (região II) e aos domínios similar a imunoglobulina (IgG3) e transmembrânico (TM) para FGFR1b. Não foi detectada a presença do domínio IgG1 para FGFR1b (região I). Os tamanhos das regiões amplificadas (em pares de bases) estão indicados.

Região 1 (138 pares de bases)

"Forward primer"

TGC ATG TTG AAA GAT GCC GCC gtg atc agt tgg act aag gat ggg gtg cac ttg ggg ccc aac aat
 C M L K D A A V I S W T K D G V H L G P N N
 agg aca gtg ctt att ggg gag tat ctc cag ata aaa ggt gcc aca cct aga **GAC TCC GGC CTC TAT**
 R T V L I G E Y L Q I K G A T P R D S G L Y
GCT TGT "Reverse primer"
 A C

Região 2 (432 pares de bases)

"Forward primer"

ATA GCT ATT TAC TGC ATA GGG gtc ttc tta atc gcc tgc atg gtg gtg aca gtc atc ttt tgc cga
 I A I Y C I G V F L I A C M V V T V I F C R
 atg aag acc acg acc aag aag cca gac ttc agc agc cag cca gct gtg cac aag ctg acc aag cgc
 M K T T T K K P D F S S Q P A V H K L T K R
 atc ccc ctg cgg aga cag gta aca gtt tgc gcc gag tcc agc tcc tcc atg aac tcc aac acc ccg
 I P L R R Q V T V S A E S S S S M N S N T P
 ctg gtg agg ata aca acg cgt ctg tcc tca aca gcg gac acc ccg atg cta gca ggg gtc tcc gag
 L V R I T T R L S S T A D T P M L A G V S E
 tat gag ttg cca gag gat cca aag tgg gaa ttc ccc aga gat aag ctg acg ctg ggc aaa ccc ctg
 Y E L P E D P K W E F P R D K L T L G K P L
 ggg gaa ggt tgc ttc ggg caa gta gtc atg gct gaa gca gtg gga atc gat aaa gac aaa ccc aag
 G E G C F G Q V V M A E A V G I D K D K P K
 gag gcg gtc acc gtg gc**A GTG AAG ATG TTG AAA GAT GA** "Reverse primer"
 E A V T V A V K M L K D

Região 3 (376 pares de bases)

"Forward primer"

-AT GTC GTT GAA CGT TCA CCA cac cgt ccc atc ctc caa gct gga ctg cct gca aat gcc tcc acg
 V V E R S P H R P I L Q A G L P A N A S T
 gtg gtc gga ggg gat gtg gag ttt gtc tgc aag gtt tac agc gat gcc cag ccc cac atc cag tgg
 V V G G D V E F V C K V Y S D A Q P H I Q W
 atc aag cac gtg gaa aag aac ggc agt aaa aac ggg cct gat ggg ctg ccc tac ctc aag gtt ctg
 I K H V E K N G S K N G P D G L P Y L K V L
 aaa gct gcc ggt gtt aac acc acg gac aaa gag att gag gtt ctc tat att cgg aat gta act ttt
 K A A G V N T T D K E I E V L Y I R N V T F
 gag gat gct ggg gaa tat acg tgc ttg gcg ggt aat tct atc ggg ata tcc ttt cac tct gca tgg
 E D A G E Y T C L A G N S I G I S F H S A W
 ttg aca gtt ctg cca gcg cct gtg aga **gAG AAG GAG ATC ACG GCT TC** "Reverse primer"
 L T V L P A P V R E K E I T A

Figura 20-b) Sequências de c-DNA (obtidas através de RT-PCR e sequenciamento) e peptídicas (previstas) para os fragmentos de FGFR2c (bek) detectados em células adrenocorticais Y-1. Os oligonucleotídeos "forward" (UP) e "reverse" (RP) estão indicados (em negrito, letras maiúsculas). As regiões de c-DNA detectadas correspondem aos domínios transmembrânico (TM) e de tirosina quinase (RTK) (região II) e aos domínios similar a imunoglobulina (IgG3) e transmembrânico (TM) para FGFR1b. A presença do domínio IgG1 para FGFR2c (região I) foi detectada. Os tamanhos das regiões amplificadas (em pares de bases) estão indicados.

Região 2 (540 pares de bases)

"Forward primer"

```
-CC CAT CAC TCT GCG TGG ctg gtg gtg ctg cca gct gag gag gag ctg atg gaa act gat gag gct ggc agc
  H  H  S  A  W  L  V  V  L  P  A  E  E  E  L  M  E  T  D  E  A  G  S
gtg tac gca ggc gtc ctc agc tac ggg gtg gtc ttc ttc ctc ttc atc ctg gtg gtg gca gct gtg ata ctc
  V  Y  A  G  V  L  S  Y  G  V  V  F  F  L  F  I  L  V  V  A  A  V  I  L
tgc cgc ctg cgc agt ccc cca aag aag ggc ttg ggc tcg ccc acc gtg cac aag gtc tct cgc ttc ccg ctt
  C  R  L  R  S  P  P  K  K  G  L  G  S  P  T  V  H  K  V  S  R  F  P  L
aag cga cag gtg tcc ttg gaa tct aac tcc tct atg aac tcc aac aca ccc ctt gtc cgg att gcc cgg ctg
  K  R  Q  V  S  L  E  S  N  S  S  M  N  S  N  T  P  L  V  R  I  A  R  L
tcc tca gga gaa ggt cct gtt ctg gcc aat gtt tct gaa ctt gag ctg cct gct gac ccc aag tgg gag cta
  S  S  G  E  G  P  V  L  A  N  V  S  E  L  E  L  P  A  D  P  K  W  E  L
tcc agg acc cgg ctg aca ctt ggt aag cct ctt gga gaa ggc tgc ttt gga cag gtg gtc atg gca gaa gct
  S  R  T  R  L  T  L  G  K  P  L  G  E  G  C  F  G  Q  V  V  M  A  E  A
att ggc atc gac aag gac cgt act gcc aag cct gtc acc gtg gcc gtg aag atg ctg aaa gat gat gcg act
  I  G  I  D  K  D  R  T  A  K  P  V  T  V  A  V  K  M  L  K  D  D  A  T
gac aag GAC CTG TCG GAC CTG GTA TCT "Reverse primer"
  D  K  D  L  S  D  L  V  S
```

Região 3 (733 pares de bases)

"Forward primer"

```
-TG TGC CAC TTC AGT GTG Cgt gta aca gat gct cca tcc tca gga gat gac gaa gat ggg gag gac gtg gct gaa
  C  H  F  S  V  R  V  T  D  A  P  S  S  G  D  D  E  D  G  E  D  V  A  E
gac aca ggg gct cct tat tgg act cgc ccg gag cga atg gat aag aaa ctg ctg gct gtg cca gcc gca aac act
  D  T  G  A  P  Y  W  T  R  P  E  R  M  D  K  K  L  L  A  V  P  A  A  N  T
gtc cgc ttc cgc tgc cca gct gct ggc aac cct acc ccc tcc atc tcc tgg ctg aag aat ggc aaa gaa ttc cga
  V  R  F  R  C  P  A  A  G  N  P  T  P  S  I  S  W  L  K  N  G  K  E  F  R
ggg cag cat cgc att ggg ggc atc aag ctc cgg cac cag cag tgg agc ttg gtc atg gaa agt gtg gta ccc tcc
  G  Q  H  R  I  G  G  I  K  L  R  H  Q  Q  W  S  L  V  M  E  S  V  V  P  S
gat cgt ggc aac tat acc tgt gta gtt gag aac aag ttt ggc agc atc cgg cag aca tac aca ctg gat gtg ctg
  D  R  G  N  Y  T  C  V  V  E  N  K  F  G  S  I  R  Q  T  Y  T  L  D  V  L
gag cgc tcc cca cac cgg ccc atc ctg cag gct ggg ctg ccg gcc aac cag aca gcc att cta ggc agt gac gtg
  E  R  S  P  H  R  P  I  L  Q  A  G  L  P  A  N  Q  T  A  I  L  G  S  D  V
gag ttc cac tgc aag gtg tac agc gat gca cag cca cac atc cag tgg ctg aag cac gtg gaa gtg aac ggc agc
  E  F  H  C  K  V  Y  S  D  A  Q  P  H  I  Q  W  L  K  H  V  E  V  N  G  S
aag gtg ggc cct gac ggc acg ccc tac gac act gta ctc aag act gca ggc gct aac acc acc gac aag gag cta
  K  V  G  P  D  G  T  P  Y  D  T  V  L  K  T  A  G  A  N  T  T  D  K  E  L
gag gtt ctg tcc ttg cac aat gtc acc ttt gag gac gcg ggg gag tac acc tgc ctg gcg ggc aat tct att ggg
  E  V  L  S  L  H  N  V  T  F  E  D  A  G  E  Y  T  C  L  A  G  N  S  I  G
ttt tcc cat cac tct gcg tgg ctg gtg gtg ctg cca gct gaG GAG GAG CTG ATG GAA AC "Reverse primer"
  F  S  H  H  S  A  W  L  V  V  L  P  A  E  E  E  L  M  E
```

Figura 20-c) Sequências de c-DNA obtidas para FGFR1b (flag) em células adrenocorticais Y-1. Os oligonucleotídeos "forward" (UP) e "reverse" (RP) estão indicados (em negrito, letras maiúsculas). As regiões de c-DNA detectadas correspondem aos domínios transmembrânico (TM) e de tirosina quinase (RTK) (região II) e aos domínios similar a imunoglobulina (IgG3) e transmembrânico (TM) para FGFR1b. Não foi detectada a presença do domínio IgG1 para FGFR1b (região I). Os tamanhos das regiões amplificadas (em pares de bases) estão indicados.

4.3. Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e seus Receptores (PDGFR)

PDGF e suas isoformas

Da mesma forma que em Y-1, culturas primárias provenientes do córtex de glândulas supra-renais de ratos foram investigadas quanto à expressão de PDGF-A e PDGF-B, utilizando-se oligonucleotídeos específicos obtidos de seqüências-consenso da literatura. Foram desenhados dois pares de oligonucleotídeos para PDGF-B, delimitando regiões distintas em sua seqüência codificadora, gerando fragmentos denominados PDGF-B.1 e PDGF-B.2. Os resultados de RT-PCR estão mostrados na tabela 7-a e indicam que tanto a linhagem celular Y-1 quanto culturas primárias do córtex supra-renal de ratos (células glomerulosas e fasciculadas/reticulares) expressam ambas as formas de PDGF. A figura 21 mostra as seqüências de c-DNA obtidas PDGF-B(1) e PDGF-B(2) a partir de células adrenocorticais Y-1, complementando resultados antriormente obtidos para PDGF-A (Rebustini, não publicados).

Região 1 (225 pares de bases)

"Forward primer"

GAG CTG GAC TTG AAC ATG ACC CGA gca cac tcc gga gtc gag ttg gaa agc tca tct cga
ggg agg agg agc cta ggg tcc ctg gca gca gca gag cct gct gta atc gcc gag tgc aag
acg cgc aca gag gtg ttc cag atc tcg cgg aac ctc atc gat cgc acc aac gcc aac ttc
ctg gtg tgg ccg ccc tgt gtg gag **GTG CAG CGC TGC TCC GGC TGC**

"reverse primer"

Região 2 (285 pares de bases)

"Forward primer"

TCC CTG GCA GCA GCA GAG CCT gct gta atc gcc gag tgc aag acg cgc aca gag gtg ttc
cag atc tcg cgg aac ctc atc gat cgc acc aac gcc aac ttc ctg gtg tgg ccg ccc tgt
gtg gag gtg cag cgc tgc tcc ggc tgc tgc aat aac cgc aat gtg caa tgc cgg gcc tcg
cag gtg cag atg cgg ccg gtc cag gtg aga aag att gag att gtg cga aag aag ccc atc
ttc aag aag gcc aca gtg acc ttg **GAG GAC CAC CTC GCC TGC AAG**

"reverse primer"

Figura 21 – c-DNAs detectados por RT-PCR e caracterizados (sequenciamento) para PDGF-B. As regiões 1 e 2 correspondem a PDGF-B (1) e PDGF-B (2) delimitados por diferentes pares de oligonucleotídeos (indicados em letras maiúsculas). O tamanho das seqüências está indicado (em pares de bases).

Receptores para PDGF

Para verificar se células adrenocorticais expressam receptores para PDGF, foram desenhados oligonucleotídeos para RT-PCR para detectar c-DNAs correspondentes a PDGFR- α e PDGFR- β na linhagem celular Y-1 e em culturas primárias de células adrenocorticais (glomerulosas e fasciculadas/reticulares) de rato, utilizando-se seqüências-referência da literatura ⁽⁹⁸⁻⁹⁹⁾.

As regiões codificadoras para os mRNAs de FGFRs foram delimitadas obedecendo aos seguintes critérios: região I: correspondente ao domínio de IgG1 para PDGFR- α e PDGFR- β . Essa região delimita nos dois receptores um fragmento de 231 pares de bases; região II: corresponde ao domínio transmembrânico e ao primeiro domínio de tirosina-quinase para PDGFRs, delimitando em ambos os receptores um fragmento de 546 pares de bases.

Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 7-a, e mostram que tanto células Y-1 quanto culturas primárias (células glomerulosas e fasciculadas/reticulares) não expressam nenhuma das isoformas de PDGFR. Como controle positivo para os oligonucleotídeos foram utilizados fibroblastos Balb3T3 (clone A31), uma vez que apresentam resposta mitogênica a PDGF-A e PDGF-B, indicando a presença dos receptores para os mesmos. Os resultados para células Balb3T3, bem como um diagrama mostrando o desenho dos oligonucleotídeos, estão mostrados na figura 22. Um experimento representativo de eletroforese em gel de agarose para os produtos de RT-PCR utilizando RNAs totais de células Y-1 e de fibroblastos Balb3T3 (clone A31), e oligonucleotídeos específicos para PDGFR (cadeias α e β), pode ser visualizado na figura 23. Os resultados de sequenciamento para os c-DNAs obtidos para PDGFR (cadeias α e β) estão mostrados nas figuras 24-a e 24-b.

Figura 22-a

Figura 22-b

Figura 22 - Detecção de diferentes PDGFRs em fibroblastos Balb3T3 (clone A31) através de RT-PCR. Figura 22-a) A tabela mostra os produtos de PCR (c-DNAs) obtidos utilizando-se oligonucleotídeos específicos para PDGFR- α e PDGFR- β . Figura 22-b) Diagrama mostrando as regiões delimitadas pelos oligonucleotídeos para PCR (indicados pelas setas) no mRNA correspondente, onde estão indicadas as regiões correspondentes aos domínios similares a imunoglobulina IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, transmembrana (TM) e de tirosina-quinase (TK I e II). UP = “upstream primer” (ou oligonucleotídeo “forward”). RP = “reverse primer”.

Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose para os produtos de RT-PCR para detecção de PDGFRs em fibroblastos Balb3T3 (clone A31) e em células adrenocorticais Y-1. Os oligonucleotídeos delimitando as regiões nos c-DNAs correspondentes a PDGFR (cadeias α e β) estão indicados no esquema (esquerda). À direita, os produtos de RT-PCR foram fracionados em eletroforese em gel de agarose. PM: padrão de tamanho (peso molecular), em pares de bases. C: controle negativo (mistura de reação contendo todos os oligonucleotídeos, mas sem a alíquota de reação de RT). As regiões delimitadas pelos oligonucleotídeos para os receptores estão indicadas (1 e 2).

Região 1 (PDGFR α 1)

CAG CTC TTA TTA CCC TCT ATC ctc cca aac gag aat gag aag att gtg cag ctg aat tcg
 Q L L L P S I L P N E N E K I V Q L N S
 tcc ttt tct ctg aga tgc gtt ggg gag agt gaa gtg agc tgg cag cac ccc atg tct gaa
 S F S L R C V G E S E V S W Q H P M S E
 gaa gaa gac ccc aac gtg gaa atc aga agt gag gag aac aac agt ggc ctc ttt gtc aca
 E E D P N V E I R S E E N N S G L F V T
 gtg ctg gaa gtg gtt aac gcc tcc gca gcc **CAC ACC GGA TGG TAC ACT TGC**
 V L E V V N A S A A H T G W Y T C

... [1320 nucleotídeos]...

Região 2 (PDGFR α 2)

GAA CTC ACA GTG GCG GCC GCA gtg ttg gtg ctg ttg gtg att gtc att gtc tct ctc atc
 E L T V A A A V L V L L V I V I V S L I
gtc ctg gtg gtc att tgg aag cag aaa cca cgg tat gaa att cgc tgg agg gtt atc gag
 V L V V I W K Q K P R Y E I R W R V I E
 tca atc agc ccc gat gga cat gag tat atc tat gtg gac ccc atg cag ttg cct tac gac
 S I S P D G H E Y I Y V D P M Q L P Y D
 tcc aga tgg gaa ttc ccg aga gat ggc ctc gtg ctt ggt cgg att [ttg gga tcc ggt gca
 S R W E F P R D G L V L G R I L G S G A
 ttt ggg aaa gtg gtc gaa ggt aca gct tat gga tta agc cgg tcc caa cct gta atg aag
 F G K V V E G T A Y G L S R S Q P V M K
 gtg gct gtg aag atg ctc aaa ccc aca gcc agg tct agt gaa aag cag gct ctc atg tct
 V A V K M L K P T A R S S E K Q A L M S
 gag ctg aag ata atg act cac ctg ggg cca cat ttg aac att gtg aac ttg ctg gga gcc
 E L K I M T H L G P H L N I V N L L G A
 tgc acc aag tca ggt ccc att tac atc atc aca gaa tac tgc ttc tat ggg gat ttg gtc
 C T K S G P I Y I I T E Y C F Y G D L V
 aac tac ttg cat aag aac aga gat] agc ttc atg agc caa cac cca **GAG AAG CCG AAG AAA**
 N Y L H K N R D S F M S Q H P E K P K K
GAC CTG
 D L

... [1173 nucleotídeos]

Figura 24-a) Sequências de c-DNA (obtidas por RT-PCR e sequenciamento) e peptídica (deduzida) para as diferentes regiões amplificadas de PDGFR- α , para células Balb3T3 (clone A31) mostrando:

Região 1 - parte do peptídeo-sinal (em *itálico*), o primeiro “loop” IgG extra-celular delimitado por duas cisteínas (indicadas em quadrados);

Região 2 - domínio transmembrânico (sublinhado) e o primeiro domínio intracelular de tirosina-quinase (entre colchetes).

Os oligonucleotídeos para RT-PCR estão indicados (**negrito**). A sequência codificadora completa para o mRNA corresponde a 3270 nucleotídeos (1090 aminoácidos, não mostrado), e os espaçamentos entre as duas regiões amplificadas estão indicados.

Região 1 (PDGFRβ1)

CTG GGA CCG CAG ACC TCC CGG ggc cta gtc atc acg ccc cct ggg cca gag ttt gtt ctc
 L G P Q T S R G L V I T P P G P E F V L
 aac atc tcc agc acc ttt gtt ctg acc tgc tcg ggc tca gct ccg gtg atg tgg gaa cag
 N I S S T F V L T C S G S A P V M W E Q
 atg tcc cag gtg ccc tgg caa gaa gcg gcc atg aat cag gac ggc acc ttc tcc agt gtg
 M S Q V P W Q E A A M N Q D G T F S S V
 ctg aca ctg acc aat gtc act ggg gga gac **ACT GGG GAA TAC TTT TGT GTC**
 L T L T N V T G G D T G E Y F C V

...[1365 nucleotídeos]

Região 2 (PDGFRβ2)

CCA CAT TCC TTG CCC TTC AAA gtg gtg gtg atc tca gcc atc ctg gcc tta gtg gtc ctt
 P H S L P F K V V V I S A I L A L V V L
acc gtc atc tct ctc atc atc ctc atc atg ctg tgg cag aag aag cca cgc tat gag atc
 T V I S L I I L I M L W Q K K P R Y E I
 cga tgg aag gtc att gag tct gtg agc tct gac ggt cat gag tac atc tac gtg gac cct
 R W K V I E S V S S D G H E Y I Y V D P
 gtg cag ttg cct tac gac tcc acc tgg gag ctg cca cgg gac cag ctt gtt ctg gga cgc
 V Q L P Y D S T W E L P R D Q L V L G R
 act [ctt ggc tct ggg gct ttc gga cag gtg gtg gag gcc aca gct cac ggt ctg agc cat
 T L G S G A F G Q V V E A T A H G L S H
 tcg cag gcc acc atg aaa gtg gct gtc aag atg ctg aaa tcg aca gcc aga agt agc gag
 S Q A T M K V A V K M L K S T A R S S E
 aag caa gcc tta atg tcc gag ctg aag att atg agt cat ctt gga ccc cac ctg aac gtg
 K Q A L M S E L K I M S H L G P H L N V
 gtc aac ctg ctg ggg gcc tgc acc aaa gga ggg ccc atc tac atc atc acg gaa tac tgc
 V N L L G A C T K G G P I Y I I T E Y C
 cga tac ggt gat ctg gtg gac tac ctg cac cgg aac aaa cac] acc **TTC TTG CAG CGA CAC**
 R Y G D L V D Y L H R N K H T F L Q R H
TCC AAC
 S N ...[1293 nucleotídeos]

Figura 24-b) Sequências de c-DNA (obtidas por RT-PCR e sequenciamento) e peptídica (deduzida) para as diferentes regiões amplificadas de PDGFR-β, para células Balb3T3 (clone A31), mostrando: Região 1 - parte do peptídeo-sinal (em itálico), o primeiro “loop” IgG extra-celular delimitado por duas cisteínas (indicadas em quadrados);

Região 2 - domínio transmembrânico (sublinhado) e o primeiro domínio intracelular de tirosina-quinase (entre colchetes).

Os oligonucleotídeos para RT-PCR estão indicados (negrito). A sequência codificadora completa para o mRNA corresponde a 3292 nucleotídeos (1094 aminoácidos, não mostrado), e os espaçamentos entre as duas regiões amplificadas estão indicados.

4.4. Regulação da expressão de FGF2 e de seus Receptores em células adrenocorticais sob estímulo de ACTH

Para verificar os efeitos de ACTH na expressão de LMW-FGF2 e de suas isoformas (HMW-FGF2), células Y-1 mantidas sob carenciamento (ausência de soro), foram estimuladas com tratamentos sustentados de ACTH (1nM) em diferentes tempos. Os níveis para FGF2 foram medidos por “Western blotting”, e os resultados estão mostrados na figura 25.

Figura 25 – “Western blotting” para FGF2 expresso em células Y-1, sob estímulo de ACTH. Foram utilizados lisados de proteínas totais obtidos de células Y-1 (100µg/lane). FGF2 recombinante (4 ng) foi utilizado como controle positivo. Exp = células em crescimento exponencial (FCS, 10%); C = células carenciadas (ausência de soro). A3, A5 e A8 = tratamentos com ACTH (1nM), em 3, 5 e 8 horas (respectivamente).

Os resultados obtidos mostram que ACTH regula a expressão de LMW-FGF2 em células adrenocorticais Y-1. Não houve mudanças mensuráveis nos níveis para HMW-FGF2.

A regulação da expressão de todos os receptores para FGF (detectados anteriormente) foi investigada através de imunocitoquímica utilizando-se anticorpos anti-FGFR1, anti-FGFR2 e anti-FGFR3, e anticorpos secundários acoplados à peroxidase (HRP). Células Y-1 foram sincronizadas (carenciamento, 48 horas) e estimuladas com ACTH (1nM) ou FGF2 (5ng/mL), em diferentes tempos de tratamento (1, 5 e 8 horas). Como controles negativos, foram utilizadas reações sem o anticorpo primário para verificar o nível basal de marcações inespecíficas para o anticorpo secundário, ou reações de imunoperoxidase na ausência de qualquer um dos anticorpos, para medir a atividade basal de peroxidases intracelulares (remanescentes após a fixação e os tratamentos das células). Células sob carenciamento (ausência de soro) e em crescimento exponencial (FCS, 10%) foram utilizadas como controles.

Os resultados estão mostrados nas figuras 26-a, 26-b e 26-c, e correspondem, respectivamente, às análises feitas para FGFR1b, FGFR2c e FGFR3b. Os níveis de expressão para todos os FGFRs aumentaram sob estímulo de FGF2 (5ng/mL) ou de ACTH (1nM). Sob estímulos de FGF2, os níveis para todos os receptores detectados diminuíram ao longo do tempo de tratamento (entre 5 e 12 horas após o estímulo). No entanto, tratamentos sustentados de ACTH mantiveram os níveis máximos de expressão dos receptores para FGF.

Em ambos os tratamentos, houve um aumento da marcação nuclear para imunoperoxidase com o tempo de tratamento, o que indica uma mudança no padrão de localização para os FGFRs ao longo do tempo.

FGFR1b em células adrenocorticais Y-1 Imunocitoquímica através de reação de imunoperoxidase

Figura 26-a) Imunoperoxidase para FGFR1b em células Y-1. A porcentagem de células marcadas (positivas para a reação de imunoperoxidase) foi medida em comparação com a porcentagem total de células (núcleos marcados com Hematoxilina). Os experimentos foram realizados em duplicatas, onde foram contadas 500 células lamínula.

FGFR2 em células adrenocorticais Y-1
Imunocitoquímica através de reação de peroxidase

Figura 26-b) Imunoperoxidase para FGFR2c em células Y-1. A porcentagem de células marcadas (positivas para a reação de imunoperoxidase) foi medida em comparação com a porcentagem total de células (núcleos marcados com Hematoxilina). Os experimentos foram realizados em duplicatas, onde foram contadas 500 células lamínula.

**FGFR3b em células adrenocorticais Y-1 Imunocitoquímica
através de reação de peroxidase**

Figura 26-c) Imunoperoxidase para FGFR3b em células Y-1. A porcentagem de células marcadas (positivas para a reação de imunoperoxidase) foi medida em comparação com a porcentagem total de células (núcleos marcados com Hematoxilina). Os experimentos foram realizados em duplicatas, onde foram contadas 500 células por lamínula.

4.5 Distribuição subcelular de FGF2 em células adrenocorticais e sua implicação funcional

Numa primeira aproximação experimental, utilizou-se “Western blotting” para verificar se a internalização de FGF2 exógeno (recombinante) adicionado às células Y-1 consistia num fenômeno dose-dependente em células Y-1. A figura 27-a mostra os resultados para células carenciadas, estimuladas com concentrações crescentes de FGF2 recombinante. As monocamadas de células foram lavadas com solução de Heparina (10 µg/mL) para evitar a interferência de FGF2 ligado à matriz extra-celular, e os lisados contendo proteínas totais foram obtidos após 5 horas de estímulo e analisados por “Western blotting”. A membrana contendo as proteínas totais fracionadas em eletroforese foi incubada com anticorpos anti-FGF2 e anti-CDK4 (gene de expressão constitutiva em células Y-1). Os filmes auto-radiografados foram obtidos, quantificados (ImageMaster – Pharmacia), e analisados. Os resultados indicam que a internalização de FGF2 é dose-dependente e aumenta com a concentração de FGF2 recombinante (exógeno) adicionado às células.

Figura 27-a

Figura 27-b

Internalização de FGF2 exógeno em células Y-1

Figura 27 - “Western blotting” e curva de dose-resposta para FGF2 em células Y-1.

Figura 27-a) “Western blotting”. Como controle positivo para a reação do anticorpo, foi utilizado FGF2 recombinante bovino (4ng, não mostrado). Como controle de quantidade de proteínas totais, foi utilizado anticorpo anti-CDK-4. O tamanho das proteínas detectadas está indicado (em kDa), e foi obtido comparando-se com um padrão de pesos moleculares comercial (Rainbow).

Figura 27-b) Quantificação dos resultados de “Western blotting”. A intensidade das bandas foi medida em unidades arbitrárias (pixels/lane). A numeração das lanes corresponde aos tratamentos com diferentes concentrações de FGF2: 1 = C (células carenciadas); 2 = FGF2 (5,0 ng/mL); 3 = FGF2 (10,0 ng/mL); 4 = FGF2 (30,0 ng/mL) e 5 = FGF2 (100 ng/mL).

A metodologia inicial para medir a distribuição subcelular de FGF2 em células Y-1 consistiu em utilizar imunocitoquímica através de anticorpos específicos anti-FGF2, e sua detecção foi feita utilizando-se anticorpos secundário ligados à peroxidase. Os resultados estão mostrados (figuras 28-a e 28-b) e resumidos na tabela 9. Células FHN (Fibroblastos Humanos Normais) foram utilizadas para comparação dos padrões de marcação para FGF2.

Linhagem Celular	Estímulo	Tempo (horas)	Marcação para FGF2
Fibroblastos humanos normais FHN	FCS (10%)	3	Núcleo
	FCS (10%)	8	Núcleo e citoplasma
	FGF2 (5 ng/mL)	3	Núcleo
	FGF2 (5 ng/mL)	8	Núcleo e citoplasma
Células adrenocorticais Y-1	FGF2 (5 ng/mL)	3	Citoplasma
	FGF2 (5 ng/mL)	8	Citoplasma
	ACTH (1nM)	3	Citoplasma
	ACTH (1nM)	8	Citoplasma

Tabela 9 - Padrões de localização (marcação) para FGF2 medidos através de imunoperoxidase, em células FHN e Y-1. O padrão de localização observado para FGF2 em Y-1 foi essencialmente citoplasmático, enquanto FHN apresentou um padrão de marcação nuclear, que se distribuiu no citoplasma ao longo do tempo de tratamento (figuras 28-a e 28-b).

Figura 28-a) Microfotografias utilizando microscópio de luz invertida, para experimentos de imunocitoquímica para FGF2 em células FHN carenciadas (C), em crescimento exponencial (Exp), tratadas com FGF2 recombinante (5,0 ng/mL) ou Soro Fetal Bovino (FCS, 10%). O tempo de tratamento está indicado (em horas). Células marcadas (coloração marrom), e núcleos não marcados (azul, Hematoxilina), podem ser visualizados.

Figura 28-b) Microfotografias utilizando microscópio de luz invertida, para experimentos de imunocitoquímica para FGF2 em células Y-1 carenciadas (C), em crescimento exponencial (Exp), tratadas com FGF2 recombinante (5,0 ng/mL) ou ACTH (1 nM). Os tempos de tratamento estão indicados (em horas). Células marcadas (coloração marrom), e núcleos não marcados (azul, Hematoxilina), podem ser visualizados.

Os resultados de imunocitoquímica mostraram localizações subcelulares distintas para FGF2 de acordo com a linhagem celular utilizada. A localização subcelular de FGF2 em FHN, embora seja predominantemente nuclear, foi detectada no citoplasma em tratamentos prolongados com soro (10% de FCS) ou FGF2 (5,0 ng/mL). No entanto, células Y-1 mostraram um padrão de distribuição para FGF2 essencialmente citoplasmático.

Para confirmar os resultados obtidos através de imunoperoxidase, utilizou-se imunofluorescência e medidas de co-localização através de Microscopia Confocal de Varredura a Laser (LSCM). Com essa metodologia, foi possível fazer medidas de marcações duplas com dois fluoróforos distintos (Cy2, para FGF2, e Brometo de Etídeo, para DNA nuclear), e co-localizar os padrões de fluorescência correspondentes a FGF2 (Cy2, verde) e ao DNA nuclear (Brometo de Etídeo, vermelho).

Inicialmente, foram feitos testes para verificar a co-localização dos padrões de fluorescência utilizando anticorpos secundários anti-IgG (coelho) ligados a Cy-2 (para anti-FGF2), mostrados em verde, e brometo de etídeo (que confere fluorescência vermelha ao DNA nuclear). Células FHN foram utilizadas como controle (figura 29-a). Para avaliar a especificidade do anticorpo secundário e medir o “background” de sua marcação, células FHN e Y-1 foram utilizadas sem tratamento com anti-FGF2 primário (figura 29-b). Finalmente, para células Y-1 carenciadas, foram testados os anticorpos específicos (primário e secundário) para FGF2 (em verde) e brometo de etídeo para marcação de DNA nuclear (em vermelho). Os resultados estão mostrados na figura 29-c, e mostram uma fluorescência muito fraca para FGF2 em células sem nenhum tratamento (células carenciadas).

Figura 29-a) Imunofluorescência para detecção de FGF2 em células FHN (em crescimento exponencial). Marcação nuclear (em vermelho, correspondente a brometo de etídeo - EtBr), e de FGF2 (em verde, correspondente ao anticorpo secundário marcado com Cy2) estão indicadas. A sobreposição das fluorescências mostra co-localização de FGF2 no núcleo.

Figura 29-b) Controle negativo para o anticorpo secundário anti-IgG(Cy2) utilizado na detecção de FGF2 em células adrenocorticais Y-1. Marcação nuclear (correspondente a EtBr), Cy2 (controle negativo) e a sobreposição das mesmas estão indicadas.

Figura 29-c) Imunofluorescência para a detecção de FGF2 em células adrenocorticais Y-1 carenciadas (DMEM, 48 horas), tratadas com brometo de etídeo (vermelho, marcação de DNA nuclear) e com anti-IgG (Cy2) para FGF2 (em verde).

Células adrenocorticais Y-1 carenciadas apresentaram padrão de marcação para FGF2 essencialmente citoplasmático (figura 29-c). A fluorescência para FGF2 foi intensificada sob estímulos de ACTH (1nM), como mostrado na figura 30-a. No entanto, a fluorescência para FGF2 foi observada somente no citoplasma. Estímulos com FGF2 exógeno (recombinante) promoveram efeitos que não haviam sido observados anteriormente através de imnuoperoxidase:

- i) Padrão de marcação para FGF2 diferenciado (vesicular)
- ii) Marcação nuclear para FGF2 (de acordo com a figura 30-b), que foi intensificada ao longo do tempo de tratamento.

As figuras 31-a e 31-b mostram a análise feita em LSCM (“Profile analysis”) correlacionando o número de “pixels” (intensidade de fluorescência) e a distância (indicada pelas setas amarelas), para células Y-1 sob estímulos sustentados de ACTH (1 nM, 5 horas, figura 31-a) e de FGF2 (recombinante, 5 ng/mL, 5 horas, figura 31-b). Não há co-localização entre os picos de fluorescência para FGF2 e para DNA nuclear em células sob tratamentos sustentados com ACTH. No entanto, a fluorescência para FGF2 foi observada no núcleo, de acordo com o resultado da análise de “profile” mostradas na figura 31-b (os picos de fluorescência para FGF2 e DNA nuclear se sobrepõem), mostrando co-localização no núcleo.

Figura 30-a

5 min

3h

Figura 30-b

5 min

3h

Figura 30 – Diferentes localizações subcelulares para LMW-FGF2 endógeno e LMW-FGF2 exógeno em células adrenocorticais Y-1.

Figura 30-a) Células Y-1 tratadas com ACTH 1nM (3 horas), marcadas com Cy2 (FGF2) e EtBr (DNA nuclear). Nota-se um aumento da marcação com o tempo de tratamento (5 minutos a 3 horas), porém os núcleos permanecem sem marcação.

Figura 30-b) Células Y-1 tratadas com FGF2, 5 ng/mL (8 horas), marcadas com Cy2 (FGF2) e EtBr (DNA nuclear). Nota-se um aumento da intensidade de marcação para FGF2 também nuclear (5 minutos a 3 horas).

Figura 31-a) Análise de co-localização (“profile”) entre padrões de fluorescência para FGF2 e para EtBr em células Y-1 sob estímulo de ACTH. Estímulo de ACTH (1 nM, 5 horas). Marcação para FGF2 em verde (anti-IgG-Cy2). Marcação para DNA nuclear em vermelho (EtBr). A seta amarela foi traçada selecionando dois núcleos celulares, para verificar co-localização de FGF2 no núcleo.

Figura 31-b) Análise de co-localização (“profile”) entre padrões de fluorescência para FGF2 e para EtBr em células Y-1 sob estímulo de FGF2. Estímulo de FGF2 (5,0 ng/mL, 5 horas). Marcação para FGF2 Células Y-1. Estímulo: FGF2 5ng/mL (5 horas). Marcação de FGF2 em verde (anti-IgG-Cy2). Marcação para DNA nuclear em vermelho (EtBr). A seta amarela foi traçada selecionando dois núcleos celulares, para verificar co-localização de FGF2 no núcleo.

Para tratamentos sustentados de FGF2 exógeno (5 ng/mL, 8 horas), realizou-se uma varredura para verificar a distribuição da fluorescência de FGF2 em diferentes profundidades, em intervalos de 0,45µm, para identificar a distribuição intracelular de FGF2 exógeno (figura 32). Essa distribuição foi detectada na região perinuclear e dentro do núcleo, após 8 horas de tratamento sustentado com FGF2 recombinante (5ng/mL).

Isolando-se uma única célula, foi possível reconstruir o núcleo celular, a partir de padrões de fluorescência para brometo de etídeo (em vermelho), e localizar a distribuição da fluorescência para FGF2 (verde). Foi utilizado o programa Bit-Plane (Zeiss), e as imagens foram adquiridas numa estação de trabalho Silicon-Graphics acoplada ao LSCM (Zeiss). A figura 33 mostra a reconstrução do núcleo celular para Y-1 e a internalização de FGF2 (mostrada em verde) dentro do núcleo celular (mostrado em vermelho), além da marcação perinuclear (ao redor do núcleo) para FGF2.

Figura 32 - Varredura através de LSCM, em diferentes profundidades, e padrões de distribuição de FGF2 em células adrenocorticais Y-1. Tratamento: FGF2 recombinante (5ng/mL, 5 horas). Cada imagem corresponde à varredura realizada a cada 0,45 μ m. Observou-se a distribuição de vesículas em diferentes seções (profundidades).

Figura 33 – Localização nuclear de FGF2 exógeno em células adrenocorticais Y-1. Reconstrução do núcleo celular para células Y-1 tratadas com FGF2 recombinante (5ng/mL, 5 horas), a partir de padrões de fluorescência encontrados para FGF2 (verde) e EtBr (em vermelho), utilizando o programa BitPlane (Silicon-Graphics/Zeiss).

Para verificar a internalização de LMW-FGF2 expresso em células Y-1, foi proposta a utilização de proteínas de fusão obtidas para FGF2 e GFP (“Green fluorescent Protein”), utilizando plasmídeos de expressão constitutiva e transfecções transientes (segundo procedimento descrito em Materiais e Métodos). Os principais objetivos consistiram em determinar a localização subcelular de FGF2 e seu tráfego intracelular ao longo do tempo de transfecção, bem como investigar se ocorre sua secreção e seu armazenamento na superfície celular.

A sequência codificadora completa para LMW-FGF2, contendo adaptadores para as enzimas de restrição Xho I e Hind III (Materiais e Métodos, seção 3.14, e tabela 6) foi obtida por RT-PCR. Os fragmentos de c-DNA foram purificados e subclonados em pGEMT-easy (seções 3.7 e 3.6, Materiais e Métodos), e os plasmídeos recombinantes foram digeridos com Xho I e Hind III (tabela 6). Fragmentos de c-DNA para LMW-FGF2 correspondente à região codificadora completa foram fosforilados e ligados em pEGFP-N1 anteriormente digeridos com XhoI e Hind III (figura 34-a), e desfosforilados. Os plasmídeos recombinantes obtidos foram caracterizados através de digestões com Hind III e Xho I, como mostrado na figura 34-b.

Figura 34 – Obtenção de LMW-FGF2 fusionado a GFP (“green fluorescent protein”). Figura 34-a) Digestões de pEGFP-N1 (5µg) com enzimas de restrição. 1 = pEGFP-N1 não digerido; 2 e 4 = pEGFP-N1 digerido com Xho I e Hind III; 3 e 5 = pEGFP-N1 digerido com Hind III e Not I (liberando o fragmento correspondente a GFP, de 700 pb). Figura 34-b) pEGFP-N1 recombinantes para LMW-FGF2, digeridos com XhoI e Hind III. Os fragmentos de LMW-FGF2 foram obtidos e estão indicados. 1-7 = pEGFP-N1 recombinantes (contendo LMW-FGF2). 8 = controle (pEGFP-N1 vazio).

4.6. Bloqueio do sistema de sinalização para FGF em células adrenocorticais através de interferência de RNA (RNAi)

Inicialmente, foram testados siRNAs sintéticos específicos para bloquear a expressão dos receptores 1 e 2 para FGF. Os siRNAs foram desenhados em colaboração com o Dr. Matthew P. Hoffman (NIDCR/NIH) e cedidos para testes em células adrenocorticais Y-1. Os detalhes quanto ao desenho dos siRNAs estão descritos na seção 3.15 (Materiais e Métodos).

Como etapa preliminar, foram testadas diferentes condições de transfecção transiente para os siRNAs. Para tanto, siRNAs não interferentes, ligados a rodamina (siRNA-Rho) foram utilizados para medir a eficiência de transfecção (“uptake”) em células adrenocorticais Y-1. A concentração dos siRNAs testada foi de 200nM. Os siRNAs foram transfectados com o reagente Lipofectamina (GIBCO) em 4 concentrações diferentes: 5, 20, 50 e 100µg/mL (diluição em DMEM sem soro ou antibióticos, de acordo com o procedimento descrito em 3.13). Tratamentos sustentados (até 24 horas), ou pulsos de transfecção de 2 horas foram testados (figura 5, seção 3.12).

Os melhores resultados corresponderam à utilização do reagente de transfecção Lipofectamina a uma concentração de 20µg/mL, em experimentos sustentados de transfecção celular, e estão mostrados na figura 35.

Figura 35 – Testes de transfecção transiente de siRNA-Rho em células adrenocorticais Y-1. As setas largas indicam tratamentos sustentados (mantidos ao longo do tempo), e os pontos de coleta (fixação das células) estão indicados (em horas). As microfotografias de fluorescência foram adquiridas utilizando-se filtros para rodamina (Rho, em vermelho) e para DAPI (núcleos celulares, em azul). A sequência de microfotografias em maior magnitude mostra imagens de células Y-1 transfectadas com siRNA-Rho por 24 horas, indicando a eficiência de transfecção para os siRNAs.

Para testar os siRNAs específicos para FGFR1 e FGFR2, foram utilizados: concentração de lipofectamina de 20µg/mL, concentração de siRNAs de 200nM e tempo de transfecção de 2 horas. Essas condições foram mantidas em todos os demais experimentos com siRNAs. Os siRNAs testados foram R1A e R1B, cujas seqüências foram escolhidas para bloquear os mRNAs para os receptores de FGFR1 (isoformas b e c), e R2A e R2B, específicas para bloquear receptores FGFR2 (isoformas b e c). siRNA correspondente à seqüência R2A “scrambled” (não interferente) foi utilizada como controle, bem como células tratadas somente com Lipofectamina.

A ação dos siRNAs específicos na degradação dos correspondentes mRNAs foi avaliada em experimentos de RT-PCR semi-quantitativos. Uma etapa preliminar foi a otimização do número de ciclos para PCR utilizado na abordagem semi-quantitativa. Os princípios envolvidos na aproximação semi-quantitativa foram: 1) Escolha do número de ciclos de PCR onde não há saturação da quantidade de c-DNA sintetizada; 2) Utilização de um controle interno (GAPDH) que não varia com

os tratamentos realizados (transfecções com siRNAs). GAPDH é um gene de transcrição constitutiva (para as condições experimentais utilizadas), não sendo interferido por nenhum dos siRNAs utilizados. A figura 36 mostra experimentos de RT-PCR onde foram feitas reações de PCR utilizando diferentes números de ciclos para FGFR1, FGFR2 e FGFR3. Após eletroforese dos produtos de PCR, os mesmos foram quantificados (densitometria, Image-Master). Foram obtidas curvas de saturação para todos os FGFRs amplificados, e foram utilizados números de ciclos correspondentes à região linear dos gráficos obtidos para FGFR1, FGFR2 e FGFR3 (15 ciclos).

Figura 36 – Curvas de saturação obtidas por RT-PCR para FGFR1, FGFR2 e FGFR3. Foram utilizados oligonucleotídeos correspondentes a cada um dos receptores detectados. O número de ciclos foi variado (até 35 ciclos) e as bandas foram quantificadas (em unidades arbitrárias OD – densidade óptica). Os experimentos correspondem a duplicatas.

Inicialmente, foi testada a ação dos siRNAs na degradação específica dos mRNAs correspondentes a FGFR1 e FGFR2. Para medir os efeitos de siRNAs na expressão de FGFR1 e FGFR2, células Y-1 foram transfectadas com cada um dos siRNAs. Frações de RNA total para cada tratamento foram extraídas após 2 horas de transfecção. c-DNAs (correspondentes aos mRNAs) foram detectados através de RT-PCR, utilizando uma aproximação semi-quantitativa. Os resultados estão mostrados na figura 37. O interferente de RNA correspondente a R1A foi eficiente na degradação do mRNA correspondente a FGFR1, no entanto R1B não mostrou o efeito esperado (presença do c-DNA correspondente a FGFR1). R2A e R2B foram eficientes na degradação de FGFR2. FGFR3 foi utilizado como controle e não foi alterado em nenhum dos tratamentos com os interferentes de RNA. SiRNA-Sc2 (correspondente ao “scrambled” para R2A), bem como somente lipofectamina (sem os siRNAs) não apresentaram efeitos de degradação para FGFR1, FGFR2 ou FGFR3.

Figura 37 – Níveis de mRNA para FGFR1, FGFR2 and FGFR3 após transfecção de siRNAs sintéticos em células adrenocorticais Y-1. Células carenciadas (DMEM, 48 horas) foram transfectadas com siRNAs (200nM) específicos para FGFR1 (R1A, R1B), FGFR2 (R2A, R2B) e um siRNA não interferente (Sc2). Após transfecção (2 horas), RNA total foi obtido de cada tratamento, e os níveis de mRNA correspondentes foram medidos através de RT-PCR semi-quantitativo, utilizando oligonucleotídeos específicos para FGFR1 e FGFR2. O controle positivo (FGFR3) e o controle interno (GAPDH) estão mostrados. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose.

Após verificar a eficiência dos siRNAs na degradação específica dos mRNAs para FGFR1 e FGFR2 (figura 37), foi planejado um ensaio funcional para medir o efeito do bloqueio desses receptores para FGF na resposta proliferativa em células adrenocorticais Y-1. Foram medidos os efeitos de bloqueio da expressão de FGFR1 e FGFR2 na indução do gene de resposta primária *c-fos*, tratadas com FGF2 recombinante (5ng/mL) e ACTH (1nM). Os resultados correspondem às microfotografias representativas mostradas na figura 38, e os níveis de expressão para *c-fos* foram quantificados (figura 39). Células tratadas com siRNA R1A, R2A e R2B, sob tratamento de FGF2, mostraram inibição do estímulo de c-Fos, efeito não observado em células transfectadas com os mesmos interferentes, tratadas com ACTH. siRNA R1B não foi eficiente na diminuição da ativação de c-Fos por FGF2, coerentemente com sua ineficiência em promover a degradação do mRNA correspondente (figura 37). Os controles corresponderam a células não interferidas, tratadas com Lipofectamina (C2) ou sem transfecção (apenas estimuladas com FGF2 ou ACTH).

Figura 37 – Microfotografias representativas de experimentos de bloqueio da expressão de c-Fos em células adrenocorticais Y-1 tratadas com siRNAs específicos para FGFR1 e FGFR2. As marcações para imunoperoxidase (marrom) e para Hematoxilina de Harrys (em azul) estão indicadas. Tratamentos de FGF2 (5ng/mL) e de ACTH (1nM) estão indicados. Os siRNAs (R1A, R1B, R2A e R2B) estão indicados, bem como células somente com lipofectamina (20ug/mL) e células não transfectadas (controles).

Obs: siRNA = 200nM
Lipofectamine = 20ug/mL

Figura 39 – Bloqueio da expressão de FGFR1 e FGFR2 utilizando siRNAs sintéticos e seu efeito na expressão de *c-fos* em células adrenocorticais Y-1. Células Y-1 carenciadas (DMEM, 48 horas), foram transfectadas com siRNAs (200nM) para FGFR1 (R1A e R1B) e FGFR2 (FGFR2A e FGFR2B). Após a transfecção dos siRNA (2 horas), células Y-1 foram estimuladas com FGF2 (5 ng/mL) ou ACTH (1 nM). A expressão de *c-fos* foi medida 2 horas de estímulo de FGF2 ou ACTH através de imunocitoquímica (reação de peroxidase) utilizando anticorpo específico anti-c-Fos, e os resultados estão mostrados em porcentagem de núcleos marcados. Os controles C1 e C2 correspondem, respectivamente, a células não transfectadas e células tratadas somente com Lipofectamina (20µg/mL). Os experimentos foram feitos em duplicatas e corresponde, cada um deles, a um total de 500 células contadas por lamínula.

5. Discussão

5.1. Detecção e caracterização (seqüências de cDNA) de fatores peptídicos de crescimento e de seus respectivos receptores expressos em células adrenocorticais

A utilização de RT-PCR para amplificar os fragmentos de c-DNA de interesse apresentou algumas implicações metodológicas que devem ser justificadas:

1. A síntese dos c-DNAs foi feita utilizando-se oligonucleotídeos de timidina de 12 a 18 bases (oligo dT₁₂₋₁₈). Esses oligonucleotídeos são complementares com as seqüências poliA presentes na porção 3' dos mRNAs, que correspondem aos transcritos expressos pela célula. Dessa maneira os c-DNAs obtidos corresponderam à população total de mRNAs transcritos. No entanto, em todos os casos, foram delimitadas pelos oligonucleotídeos para PCR fragmentos das regiões codificadoras que muitas vezes localizam-se distantes da cauda poli-A dos mRNAs. Por exemplo, para FGF2, o mRNA “canônico” (que gera as isoformas para FGF2) a região não traduzida 3' (3'UTR) corresponde a 5,7 kb, a partir da cauda poli-A ⁽⁵⁶⁾. O que garantiu a síntese do c-DNA completo incluindo a região codificadora é a eficiência da enzima SuperScript II, que segundo especificações do fabricante (INVITROGEN) sintetiza eficientemente c-DNAs de até 13,5 kb.

2. Os oligonucleotídeos para PCR foram desenhados a partir da análise das regiões codificadoras correspondentes a mRNAs (seqüências-referência) para Fatores Peptídicos de Crescimento e seus Receptores descritos na literatura para camundongo e rato (as referências estão contidas na tabela 2). O tamanho dos oligonucleotídeos variou de 18 a 25 bases, e foram escolhidos em regiões conservadas entre as seqüências-consenso de camundongo e de rato, para que pudessem ser utilizados para amplificar tanto c-DNAs provenientes de células Y-1 quanto das culturas primárias utilizadas. Os critérios mais importantes para a escolha dos Fatores Peptídicos de Crescimento a serem investigados foram definidos de acordo com resultados prévios obtidos em nosso laboratório (mostrados na seção 2.1).

3. A verificação da presença dos fragmentos de c-DNA nos plasmídeos através de PCR (figura 12) mostrou algumas desvantagens. A reação de PCR foi realizada em ciclos conforme descrito na seção 3.5 (Materiais e Métodos), no entanto a utilização de plasmídeos pode gerar um número muito grande de amplificações não específicas, e em alguns casos os fragmentos de c-DNA obtidos não corresponderam ao tamanho previsto. Plasmídeos que geraram fragmentos não esperados ou com um número muito grande de amplificações não específicas foram descartados.

A tabela 10 resume um conjunto de resultados acumulados na literatura ^(52, 53, 54 e 55) mostrando a importância de diversas categorias de Fatores Peptídicos de Crescimento e sua ampla ação biológica em células adrenocorticais adultas e fetais. Alguns resultados obtidos por RT-PCR, mostrados nas tabelas 7-a e 7-b não estão em concordância com os resultados da literatura mostrados na tabela 10.

Por exemplo, foi detectada a presença do mRNA para IGF1 (“Insuline-like Peptide Growth Factor”) somente na linhagem celular Y-1 e não em culturas primárias de ratos adultos (células glomerulosas e fasciculadas/reticulares), embora a expressão do mesmo esteja descrita na literatura para células adrenocorticais adultas bovinas ⁽¹⁰⁰⁾. IGF2, por outro lado, está descrito como restrito ao desenvolvimento do córtex adrenal fetal ⁽⁵⁵⁾, sendo expresso em tecido adulto somente em tumores adrenocorticais, fato consistente com a detecção de seu correspondente mRNA em células tumorais Y-1, embora também tenha sido detectado em culturas primárias de rato (tabelas 7-a e 7-b). Somente a presença do mRNA para IGF2, no entanto, não justificaria sua importância no contexto de sinalização celular para as culturas primárias de rato, sendo necessário avaliar também a expressão da proteína para IGF2, contudo a presença do mRNA para IGFR2 em culturas primárias de rato, mas não em células Y-1, é uma indicação (não conclusiva) de que o sistema de IGF2 e de seu receptor possam estar ativos nas culturas primárias, muito embora IGFR2 não possua domínios de ativação intracelulares (tirosina ou serina/treonina quinase) e sua função ainda não esteja totalmente elucidada.

Em relação a EGF (“Epidermal Growth Factor”) e seu homólogo TGF α (“Transforming Growth Factor α ”), embora sua expressão seja restrita aos tecidos adrenocorticais ⁽¹⁰¹⁾, os mesmos foram detectados em células Y-1, e TGF α também foi encontrado em células adrenocorticais fasciculadas/reticulares de rato. A presença de ambos na linhagem Y-1 pode constituir em parte das características transformadas desta célula, enquanto a presença de TGF α pode ser específica para a camada fasciculada/reticular do córtex adrenal de ratos *in vivo*. Tanto células Y-1 como as culturas primárias de rato não mostraram a presença do mRNA para EGFR, o que exclui sua função autócrina nos dois modelos experimentais investigados.

TGF β e seus receptores (TGF β R1 e TGF β R2) promovem a inibição da esteroidogênese e da proliferação celular, sendo igualmente importante tanto durante o desenvolvimento quanto em células adrenocorticais adultas ⁽¹⁰²⁾. Com relação a TGF β 1, 2 e 3, os principais componentes dessa via de sinalização, todos estão presentes nos dois modelos experimentais investigados, no entanto a presença dos respectivos mRNAs para TGF β R1 e R2 parece estar restrita a células Y-1 e glomerulosas, não sendo detectada em células fasciculadas/reticulares. Assim como TGF- α , TGF β R1 e R2 podem estar

sendo diferencialmente expressos em diferentes camadas do córtex adrenal *in vivo*, o que os tornaria marcadores genéticos para caracterizar cada uma das camadas das células adrenocorticais.

VEGF1 (“Vascular Endothelial Growth Factor”) foi detectado tanto na linhagem celular Y-1, como em células glomerulosas e fasciculadas/reticulares. Os oligonucleotídeos desenhados para amplificar os c-DNAs delimitaram uma região de “splicing” alternativo para VEGF1 (também conhecido como VEGFA), permitindo a detecção das duas formas de “splicing” para o mRNA. Uma vez que VEGF consiste no principal componente da sinalização para angiogênese ⁽¹⁰³⁾, sua presença justifica-se nas culturas primárias ou mesmo na linhagem celular Y-1, e seu papel na vascularização do córtex adrenal tem sido amplamente descrito na literatura.

	Tecido adulto	Tecido fetal
FGF2	Entrada em S	Angiogênese
	Angiogênese	Inervação (neurotrófico)
	Inervação (neurotrófico)	
IGF1	Entrada em S	Sem efeito
	Esteroidogênese	
IGF2	Superexpressão em tumores	Entrada em S
	adrenocorticais	Esteroidogênese
	Esteroidogênese	Desconhecido
PDGF (A ou B)	Angiogênese	
	Angiogênese	Desconhecido
VEGF	(tecido normal e tumores)	
EGF ou TGFα	Sem efeito	Entrada em S
	Inibe proliferação	Inibe proliferação
	Inibe esteroidogênese	Inibe esteroidogênese
TGFβ	(expressão de ACTH-R)	(expressão de ACTH-R)
	Induz modificação de matriz	Induz modificação de matriz
	extra-celular	extra-celular

Tabela 10: Principais Fatores Peptídicos de Crescimento, expressos no córtex supra-renal e seus efeitos no tecido adulto (homeostase) e no tecido fetal (desenvolvimento).

Os resultados para a detecção e a caracterização de seqüências obtidas para FGF2, PDGFs e seus respectivos receptores serão discutidos nos próximos tópicos (Seções 5.2 e 5.3).

5.2. Fatores de crescimento de fibroblastos (FGF2) e seus receptores (FGFRs)

FGF2 e suas isoformas

A família de FGF consiste em proteínas pequenas (24-30 kDa) cujas seqüências nucleotídicas e peptídicas mostram relativamente pouca similaridade entre si. A principal característica conservada entre os diferentes FGFs é a estrutura em barril beta prevista para todos os peptídeos biologicamente ativos ^(14, 56). Cada um dos FGFs é expresso a partir de genes independentes, e isoformas geradas a partir de “splicing” alternativo têm sido descritas e caracterizadas para FGF5 e FGF8.

FGF2 constitui o primeiro dos FGFs detectados e caracterizados, e possui papel importante em células adrenocorticais, indicado na tabela 10, e também em resultados obtidos em nosso laboratório. Inicialmente, o gene para FGF2, assim como todos os componentes da família de FGF, foi descrito como sendo composto por 3 exons, separados por introns bastante extensos (16 e 17,5 kpb) ⁽⁵⁶⁾. Recentemente ⁽⁸³⁾, foi demonstrado para FGF2 que o exon 1 também pode sofrer “splicing” alternativo, gerando isoformas de mRNAs descritas como “canonical” e “alternative spliced” FGF2 (figura 40).

Figura 40 – “Splicing” alternativo para FGF2 ⁽⁸³⁾. O espaçamento entre os introns que compõem o DNA genômico está indicado (em kpb). Os exons (em vermelho) e os sítios de poliadenilação (barras azuis) estão indicados.

Produtos de “splicing” alternativo para FGF2 foram detectados em células adrenocorticais Y-1 através de “Northern blotting” (figura 14). Fragmentos de c-DNA correspondentes aos mRNAs (regiões codificadoras) para os transcritos de FGF2 foram detectados por RT-PCR (figura 15-a) e caracterizados através de sequenciamento de DNA (figura 15-b).

Muito embora produtos de “splicing” alternativo sejam encontrados não somente em células Y-1 como também em outras linhagens que expressam FGF2, a presença de diferentes isoformas para FGF2 não pode ser justificada por “splicing” alternativo. A comparação das regiões codificadoras para os transcritos de 3,7 kb e 7 kb encontrados não mostra similaridade na região próxima a 3’UTR correspondente ao domínio N-terminal para FGF2. Não está totalmente elucidada a função dos transcritos de 3,7 kb, ou se os mesmos expressam proteínas com algum papel intracelular.

No entanto, resultados acumulados na literatura ⁽²⁴⁾ demonstram que a principal característica das isoformas para FGF2 é a conservação da região correspondente a LMW-FGF2 (FGF2 de baixo peso molecular). As isoformas maiores apresentam uma região adicional na porção N-terminal, que contém seqüências-consenso de localização nuclear (NLS) para esses peptídeos ⁽²⁴⁾. O tamanho dessas isoformas varia de 18 KDa (LMW-FGF2), e de 21,5 a 34,0 KDa (HMW-FDGF2s). LMW-FGF2 é a isoforma secretada pelas células, com papel sinalizador, enquanto HMW-FGF2s não são secretadas e atuam de maneira intrácrina (essa sinalização está descrita na seção 1.3). O mecanismo através do qual essas isoformas são geradas envolve sítios internos de entrada de ribossomos (IRES) “upstream” aos códons alternativos de início de tradução (CUG) presentes num único mRNA (“canonical” mRNA, de 7,0 kb) (figura 41). A regulação da tradução destas isoformas ainda não foi totalmente elucidada, mas há evidências da ação da porção 3’UTR do mRNA, muito longa (5,7 kb), atuando como “enhancer” na geração dessas isoformas ⁽⁹⁰⁾.

Figura 41 - Mecanismo proposto para a geração de isoformas de FGF2 a partir de um único mRNA. NLS: sequência de localização nuclear. Os códons alternativos para início de tradução (CUG) na região 5'UTR do mRNA, estão indicados. Os produtos finais correspondentes às isoformas de FGF2 de baixo peso molecular (LMW-FGF2) e de alto peso molecular (HMW-FGF2) estão indicados (em kDa).

A presença das isoformas não secretadas para FGF2 (HMW-FGF2s) têm sido descritas em transformação maligna e formação de tumores⁽⁹¹⁾. Isoformas de alto peso molecular foram encontradas na linhagem celular tumoral Y-1, cuja principal característica de transformação é a amplificação de *ki-ras*. Não se sabe se há uma relação direta entre transformação celular induzida por proteínas Ras e alteração nos níveis de expressão de FGF2 e de suas isoformas. No entanto, nos experimentos de “Western blotting” para detecção de isoformas de FGF2 em células Y-1, foi utilizado para comparação o clone EJA, proveniente de células Balb3T3 transformadas com o gene *h-ras* mutado (constitutivamente ativado) (Kovary e colaboradores)⁽⁷⁵⁾. Nesses clones a expressão de LMW-FGF2 e de pelo menos 2 isoformas para HMW-FGF2s pôde ser detectada, em comparação com a expressão de FGF2 na linhagem celular que deu origem aos clones EJA (células Balb3T3), sugerindo que a transformação por Ras pode estar relacionada com o aumento do níveis de FGF2 intracelulares e à expressão de isoformas de alto peso molecular.

Com relação aos testes de especificidade para anti-FGF2 utilizando-se diferentes frações imunoprecipitadas, o racional dessa abordagem baseia-se no fato do anticorpo anti-FGF2 reconhecer epítopos comuns para LMW-FGF2 e HMW-FGF2, correspondentes aos 15 últimos aminoácidos no domínio C-terminal da proteína (de acordo com as especificações do fabricante). Dessa forma, foi possível utilizar o mesmo anti-FGF2 para detectar LMW e HMW-FGF2s. A ausência de atividade da fração empobrecida para anti-FGF2 indicou que não havia contaminação da solução de anti-FGF2 com qualquer outra imunoglobulina que pudesse interagir com outras proteínas além de FGF2.

Receptores de FGF expressos em células adrenocorticais Y-1

Muito embora todos os receptores para FGF pertençam a genes independentes, eles possuem uma organização genômica conservada e bastante complexa, que consiste em 20 exons distribuídos ao longo de 20kb ⁽⁵⁸⁾. Na figura 42, estão representados os exons que codificam para o peptídeo-sinal (L) que é clivado durante o processamento final dos FGFRs, os domínios extracelulares similares a imunoglobulina (IgG ou “immunoglobuline-like”), o domínio transmembrânico (TM) e os domínios com atividade tirosina-quinase (TK1 e TK2) presentes na porção intracelular dos FGFRs. Os mecanismos pelos quais diferentes isoformas de FGFRs são geradas consistem na utilização de sítios alternativos de poliadenilação posicionados entre os exons 3 e 4 e 7 e 8, respectivamente, e no “splicing” alternativo dos exons que compõem a região IgG3.

Figura 42 – Organização genômica e geração de diferentes isoformas para FGFRs. Os exons que codificam para os diferentes domínios dos FGFRs estão indicados. Os domínios para FGFR estão representados: L ou “leader” (peptídeo-sinal para secreção); IgG (domínio similar a imunoglobulina); TM (domínio transmembrânico); TK1 e 2 (domínios de tirosina-quinase 1 e 2). Sítios alternativos de poliadenilação (pA), isoformas de “splicing para o domínio IgG3 (b ou c) e as regiões não-traduzíveis do mRNA (3’UTR e 5’UTR) estão indicadas.

As isoformas solúveis para FGFRs, geradas pelos produtos de poli-adenilação para os transcritos primários dos FGFRs não são importantes para disparar transdução de sinal a partir de FGF exógeno (não possuem os domínios transmembrânico e de tirosina-quinase). No entanto, essas isoformas têm sido descritas como reguladoras da atividade de FGFs ⁽⁵⁹⁾. Acredita-se que essa regulação ocorra em dois níveis: captura de FGFs produzidos pelas células, impedindo sua secreção e sua ação autócrina ou parácrina, ou quando secretados, impedem a sinalização de FGFs presentes no meio extra-celular. Resultados recentes utilizando FGFRs solúveis demonstraram a inibição da

sinalização promovida por FGF associada com a morfogênese de glândulas submandibulares de camundongo ⁽⁵⁷⁾.

Em relação às isoformas para FGFRs contendo os domínios transmembrânico e de tirosina-quinase intracelulares, os c-DNAs consenso correspondentes aos respectivos mRNAs para FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4 são bastante extensos, e possuem uma região codificadora muito ampla (variando de 2000 a 3000 bases). Para viabilizar a abordagem de RT-PCR, foram delimitadas pelos oligonucleotídeos regiões-chave nas seqüências dos mRNAs que permitiram diferenciar as isoformas b ou c e estabelecer a natureza dos FGFRs detectados.

Região I: domínio IgG1 similar a imunoglobulina. A ausência de produtos de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos delimitando essa região não significa a ausência dos receptores correspondentes, uma vez que o domínio IgG1 pode ser excisado através de poliadenilação, gerando isoformas de FGFR contendo somente os domínios IgG2 e IgG3 (suficientes para a interação com FGFs);

Região II: domínios de tirosina-quinase 1 e 2 (RTK 1 e 2) intracelulares, responsáveis pela atividade de FGFR;

Região III: domínios IgG 2, IgG3 e TM (transmembrânico). Essa região define as isoformas b ou c (geradas por “splicing” alternativo) para cada um dos FGFR (R1, R2, R3 e R4).

Cabe ressaltar que as isoformas b ou c são auto-excludentes: a presença do receptor FGFR2c, por exemplo, exclui a presença de FGFR2b. A utilização do exon correspondente a IgG3b ou IgG3c é estritamente regulada em muitos tecidos. Um exemplo disso é a isoforma FGFR2 (IIIc), predominantemente expressa em células mesenquimais. A incorporação do exon IgG3b ou IgG3c no mRNA para FGFR2 é regulada por elementos em *cis* e fatores *trans*-ativadores célula-específicos. Os elementos em *cis* presentes nos transcritos primários para FGFR2 correspondem a dois tipos: 1) seqüências ricas em bases pirimídicas; 2) repetições UG. Os primeiros elementos são reconhecidos por proteínas específicas denominadas PTB (“Polypyrimidine tract binding proteins”) diretamente envolvidas no splicing da região IgG3 (gerando a isoforma IgG3c e silenciando a isoforma IgG3b) ⁽³⁸⁾. Uma maneira de interferir na definição entre os exons IgG3b e IgG3c tem sido descrita utilizando-se RNAi para silenciar a expressão de PTB, levando a um aumento da inclusão do exon IgG3b no mRNA para FGFR2.

5.3. Fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e seus Receptores (PDGFR)

PDGF (“Platelet-derived Growth Factor”) é numa importante classe de fatores peptídicos de crescimento, responsáveis por inúmeros fenômenos biológicos, como proliferação, angiogênese e motilidade celular ⁽⁹²⁾. Resultados não publicados obtidos em nosso laboratório demonstraram a produção e a secreção de PDGF pela linhagem celular Y-1 (seção 2.2), e c-DNAs correspondentes a PDGF-A foram detectados e caracterizados em células Y-1 através de clonagem e sequenciamento em nosso laboratório (Rebustini, dados não publicados).

Receptores para PDGF são proteínas transmembranares cuja composição consiste em 4 domínios extracelulares ricos em cisteína com similaridade à imunoglobulina (“immunoglobuline-like” ou IgG), responsáveis pela ligação ao PDGF (IgG3 e IgG4), um domínio transmembrânico hidrofóbico e a região citoplasmática com dois domínios de atividade tirosina-quinase ativadas por dimerização. Podem apresentar duas formas distintas: a subunidade α e a subunidade β , contendo alta similaridade de sequência de c-DNA (60%) ⁽⁹²⁾. As subunidades α e β possuem diferentes afinidades às cadeias A e B para PDGF ^(98 e 99). A subunidade α liga às cadeias A e B de PDGF, enquanto a subunidade β liga somente à cadeia B. Como a forma ativa de PDGF corresponde a dímeros entre as cadeias A e B (PDGF-AA, PDGF-AB ou PDGF-BB), a ligação aos respectivos receptores está baseada nessas afinidades, obedecendo ao seguinte padrão: PDGF-AA interage unicamente com as subunidades $\alpha\alpha$; PDGF-AB interage tanto com $\alpha\alpha$ quanto com $\alpha\beta$ e finalmente PDGF-BB interage com as subunidades $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ e $\beta\beta$.

Células adrenocorticais não expressam nenhuma das formas (cadeia α ou β) dos receptores para PDGF. No entanto, células estabelecidas Y1 e culturas primárias glomerulosas e fasciculadas/reticulares expressam PDGF-A e PDGF-B. Ainda, PDGFs são abundantemente secretados para o meio de cultura condicionado por células Y-1 (resultados não publicados de nosso laboratório). A princípio, a transformação celular observada em células Y-1 poderia estar associada à expressão de PDGFs, que poderia não corresponder a um evento normal em células adrenocorticais. Entretanto, pelo menos em relação à detecção dos correspondentes transcritos, culturas primárias de células adrenocorticais de ratos mostraram-se positivas para PDGF-A e PDGF-B, indicando que sua expressão deve possuir papel fisiológico normal no córtex supra-renal. PDGFs têm sido descritos como angiogênicos, com efeitos parácrinos de sinalização celular ^(98 e 99) e recrutamento de fibroblastos (indução de motilidade celular). A expressão de PDGFs constitui um dos fatores peptídicos de

crescimento, juntamente com VEGF e FGF2, responsáveis pela angiogênese e vascularização do córtex supra-renal.

5.4. Regulação da expressão de FGF2 e de seus receptores em células adrenocorticais sob estímulo de ACTH

O estímulo pomovido por ACTH regula a expressão de fatores peptídicos de crescimento e seus receptores em células adrenocorticais ^(52, 53 e 54), tanto de seus transcritos, quanto de suas proteínas correspondentes, como indicado na tabela 11.

Fator de Crescimento	Tecido adrenocortical adulto	Tecido adrenocortical fetal
FGF2	↑ mRNA ↑ FGFRs (c-AMP dependente)	Desconhecido
IGF1	↑ mRNA ↑ Secreção	Desconhecido
IGF2	Desconhecido	↑ mRNA ↑ Secreção
PDGF (A/B)	Desconhecido	Desconhecido
VEGF	↑ mRNA ↑ Secreção	Desconhecido
EGF/TGFα	Desconhecido	Desconhecido
TGFβ	↑ Proteína	-

Tabela 10 – Efeitos de ACTH na expressão de fatores peptídicos de crescimento no córtex supra-renal.

ACTH não possui atividade mitogênica *in vitro* (células adrenocorticais Y-1), no entanto, poderia estar atuando como um agente mitogênico indireto, regulando a expressão de FGF2 que, secretado para o meio de cultura, estaria atuando em uma alça autócrina com efeitos locais. Embora FGF2 não seja medido no meio de cultura condicionado por Y-1, é possível que esteja sendo secretado e armazenado em proteoglicanos presentes na superfície celular. No entanto, células tratadas somente com ACTH (pulsos ou tratamentos sustentados por diferentes tempos) não apresentam síntese de DNA significativa, o que compromete a hipótese de FGF2 endógeno atuando como um agente mitogênico.

O fato mais importante a ser discutido quanto à regulação da expressão de FGF2 em células adrenocorticais Y-1 é que dois importantes pontos de regulação estão sendo acionados:

- 1 – Transcrição do gene e processamento do mRNA;
- 2 – Tradução da proteína a partir de sítios específicos de iniciação.

Tratamentos que regulam o ciclo celular e a proliferação (carenciamento e estímulo com soro) alteram somente os níveis de transcritos para o mRNA canônico, sugerindo que a isoforma gerada por “splicing” alternativo (correspondente à de 3,5 kb) não está relacionada a esse controle e deve ser regulada independentemente. Tratamentos de ACTH, que regulam tanto a função quanto a proliferação celular em células Y-1, só estimulam a isoforma de baixo peso molecular para FGF2 (LMW-FGF2), sintetizada a partir do mRNA canônico anteriormente citado. Com isso, é possível concluir que a regulação da expressão de isoformas para LMW- e HMW-FGF2 ocorre de maneira independente, apesar das mesmas serem sintetizadas a partir de um único mRNA original.

ACTH promove o aumento dos níveis de todos os receptores para FGF expressos em células Y-1. Utilizando estímulos de ACTH (1nM) há um aumento da expressão e um acúmulo de todos os FGFRs no núcleo, ao longo do tempo de tratamento, chegando a uma saturação máxima na qual todos os núcleos celulares encontram-se marcados (como mostrado nas microfotografias representativas para cada experimento, nas figuras 26-a, 26-b e 26-c). Esse aumento de expressão de FGFRs, sob estímulo de ACTH, tem sido descrito como um processo c-AMP dependente ⁽⁹³⁾, permitindo estabelecer assim uma hipótese de interação entre sinais disparados por diferentes receptores para ACTH (que aumentam os níveis de c-AMP intracelulares) e para FGFs. É possível que ACTH torne a célula mais sensível à sinalização promovida por FGFs aumentando a expressão e o número de FGFRs disponíveis.

Sob tratamentos de FGF2 (5ng/mL), ocorre um aumento (pico) de expressão para todos os FGFRs, que diminui em tempos prolongados de tratamento (12 horas), inclusive o número de núcleos marcados. Essa diminuição no padrão de marcação para FGFRs pode estar associada à dessensibilização celular à FGF2 em estímulos sustentados.

Para explicar a mudança de padrão de marcação para FGFRs (citoplasma → núcleo), a hipótese mais provável, em tratamentos de FGF2 recombinante (5ng/mL), consiste na internalização do complexo FGF2/FGFRs e sua translocação até o núcleo ou a região perinuclear (na seção seguinte será demonstrada a internalização dose e tempo-dependente para FGF2 recombinante adicionado a células Y-1, medida através de imunofluorescência e Microscopia Confocal de Varredura a Laser – LSCM). A dessensibilização da célula para FGF2 provavelmente ocorre devido à fosforilação constitutiva FGFRs.

Uma hipótese que explica a regulação da degradação de receptores de tirosina-quinase, após a transdução de sinal, está baseada no tempo de permanência dos mesmos em seu estado fosforilado. A

fosforilação de FGFRs induz a ubiquitanação e a degradação dos mesmos ⁽⁵⁰⁾. Estímulos sustentados de FGF2 devem manter os receptores em seu estado fosforilado, recrutando ubiquitina (que reconhece os resíduos de tirosina fosforilados em FGFR) e promovendo sua degradação ao longo do tempo de tratamento. Essa degradação não acontece sob estímulos de ACTH (que aumenta os níveis de FGFRs, mas não induz sua dimerização e fosforilação cruzada), permitindo que FGFRs sejam acumulados, provavelmente no núcleo ou na região perinuclear. As funções dessa translocação dos receptores para FGF na região nuclear ainda não foram esclarecidas.

5.5 Distribuição subcelular de FGF2 em células adrenocorticais e sua implicação funcional

Fatores peptídicos de crescimento ligam-se a receptores específicos e desencadeiam efeitos imediatos de transdução de sinal. Esses efeitos de sinalização têm sido amplamente investigados para FGF2 no modelo experimental de células adrenocorticais Y-1. No entanto, a internalização de fatores peptídicos de crescimento ligados a seus receptores tem sido associado a muitos outros eventos reguladores como a degradação ou reciclagem dos receptores (e sua consequente inativação), ou a sinalização intracelular com o tráfico do complexo ligante/receptor para o núcleo, e a regulação da expressão gênica (transcrição) promovida por esses complexos ⁽⁵⁰⁾. Esse fenômeno consiste num evento tardio, muito pouco investigado, e totalmente indefinido para o modelo experimental de células adrenocorticais Y-1.

Em experimentos de “Western blotting”, o estímulo promovido por FGF2 exógeno poderia estimular a expressão de FGF2 interno, e os resultados obtidos não corresponderiam à internalização de FGF2 exógeno (recombinante). No entanto, os experimentos foram feitos a partir de concentrações saturantes de FGF2 (5 ng/mL), e células tratadas por 5 horas nestas condições não mostraram aumento significativo de FGF2 em relação aos níveis basais correspondentes à célula carenciada (figura 29), uma evidência de que somente FGF2 exógeno (recombinante) não é suficiente para estimular a expressão de FGF2 endógeno. Dessa forma, FGF2 exógeno foi internalizado em células Y-1 em uma maneira dose-dependente, sem a interferência significativa de FGF2 endógeno. Para comparação, pode-se utilizar também a figura 28, que mostra o aumento dos níveis de LMW-FGF2 intracelular sob estímulos de ACTH (1nM) em 5 horas de tratamento sustentado, agente que de fato promove um aumento nos níveis de FGF2 intracelulares.

A principal vantagem de LSCM consiste na aquisição de imagens de fluorescência tridimensionais que permitem avaliar os padrões de marcação (imunofluorescência) em profundidade, e avaliar a localização subcelular das proteínas investigadas. Algumas ferramentas disponíveis no equipamento utilizado foram utilizadas para medir a distribuição dos padrões de fluorescência ao longo da distância (em μm) delimitada experimentalmente (“Profile” para os padrões de fluorescência).

Um detalhe importante a ser considerado utilizando-se brometo de etídeo como marcador de DNA nuclear foi a necessidade de tratamento prévio das células analisadas com Rnase B (seção 3.8, Materiais e Métodos), que impediu a ligação do brometo de etídeo com RNAs intracelulares presentes no citoplasma.

Sabe-se que a isoforma LMW-FGF2 é secretada, e pode ser armazenada na matriz extracelular (interagindo com heparan-sulfato). Em alguns casos, LMW-FGF2 tem sido associado a alças autócrinas descritas para células tumorais ⁽²¹⁾. Isoformas de alto peso molecular (HMW-FGF2) possuem sequência de sinalização nuclear bastante conservada ⁽²⁴⁾, que é reconhecida por importinas (heterodímero α e β), responsáveis pela internalização de HMW-FGF2s no núcleo, e esse mecanismo de ação é independente da ativação de receptores para FGF. No entanto, o papel intracelular e os alvos citoplasmáticos ou nucleares para LMW e HMW-FGF2s ainda não foram elucidados.

LMW-FGF2, normalmente secretado pelas células que o expressam, não é detectado no meio de cultura condicionado por células Y-1. Os resultados de LSCM mostraram que sua expressão aumenta sob estímulo de ACTH e distribui-se no citoplasma, não sendo encontrada no núcleo, como na linhagem controle FHN. FGF2 exógeno (recombinante), por outro lado, apresenta um padrão de marcação vesicular e foi detectado na região perinuclear e no interior do núcleo de células Y-1. A hipótese mais provável que explica esses resultados é a internalização de FGF2 exógeno para o interior das células, num mecanismo que requer possivelmente a ligação a FGFRs e à heparan-sulfato ⁽⁹⁴⁾. Resultados utilizando KGF (FGF7) mostram que a internalização de FGF7 é dependente de sua ligação a receptores para FGF ⁽⁹⁵⁾, e que a localização dos complexos FGF/FGFRs encontra-se no núcleo.

A figura 42 mostra uma proposta para explicar as diferenças no padrão de marcação para FGF2 endógeno (produzido sob estímulo de ACTH) e FGF2 exógeno (recombinante), e vias distintas de sinalização intracelular atribuídas aos mesmos.

FGF2 exógeno X FGF2 endógeno: Vias distintas de Ação ?

Figura 43 – Vias distintas de sinalização, propostas para FGF2 endógeno e FGF2 exógeno em células adrenocorticais Y-1.

Seqüências alternativas de localização nuclear (diferentes das seqüências encontradas em HMW-FGF2s) foram descritas também para LMW-FGF2, uma evidência de seu tráfego intracelular para o núcleo. Assim como HMW-FGF2s, LMW-FGF2 endógeno pode agir de maneira intrácrina, ligando a proteínas citoplasmáticas, como caseína-quinase II (CK-II) e atuando na fosforilação de proteínas nucleares (nucleolina). Esses efeitos podem estar indiretamente associados ao estímulo de ACTH, que promove um aumento de LMW-FGF2 produzido por Y-1. FGF2 exógeno (recombinante) tem ação reconhecidamente ativadora da síntese de DNA em Y-1. No entanto, fenômenos tardios (disparados após a transdução de sinal) associados à ativação de FGFRs por FGF2 consistem na internalização e na degradação (ou reciclagem) dos receptores de FGFR. Essa internalização ocorre em tratamentos prolongados e é dependente da concentração de FGF2 exógeno. Uma proposta para a ação intracelular do complexo FGF/FGFR internalizado consiste em seu tráfego até o núcleo (ou a região perinuclear). Há indícios da ativação de fosforilação de fatores de transcrição pelos complexos formados entre fatores peptídicos de crescimento e seus respectivos receptores, internalizados até o núcleo ⁽⁹¹⁾, o que justificaria a internalização e o tráfego intracelular desses complexos.

5.6. Bloqueio do sistema de sinalização para FGF em células adrenocorticais através de interferência de RNA (RNAi)

Dentro da proposta de bloquear o sistema de sinalização de FGF e seus receptores na linhagem celular adrenocortical Y-1, foram planejadas duas abordagens metodológicas: 1) Utilização de RNAs interferentes sintéticos (siRNAs), incorporados pelas células através de transfecções transientes; 2) Síntese de siRNAs endógenos através da transcrição de repetições invertidas (“inverted repeats”) correspondentes. Ambas estão descritas nas seções 2.4 e 3.15.

Transfecções transientes utilizando siRNA-Rho em células Y-1 foram feitas com diferentes concentrações de Lipofectamina (5-100µg/mL). A sequência de 21 nucleotídeos correspondente ao siRNA-Rho e não deve interferir na expressão gênica da célula (conforme especificações do fabricante). Foi possível detectar siRNA-Rho no interior das células após 2 horas de transfecção, e o nível de fluorescência aumentou com o tempo de transfecção, como mostra a figura 35. Tratamentos prolongados (24 horas) aumentaram a eficiência de transfecção de siRNAs-Rho em células Y-1.

Embora o aumento da concentração de Lipofectamina promova maior eficiência de transfecção celular, a toxicidade do reagente foi o fator limitante na dosagem. Altas concentrações (acima de 50 µg/mL) comprometeram a qualidade das culturas celulares, tornando-as inviáveis (alta quantidade de células não-aderidas ou mortas). A concentração de siRNAs utilizada (200nM) foi previamente otimizada em experimentos de dose-resposta com culturas de células estabelecidas de glândula submandibular humana e de camundongo (respectivamente, HSG – “human submandibular glands”, e células “SIMS”, resultados não publicados), etapa realizada durante uma colaboração no laboratório do Dr. Matthew P. Hoffman (NIDCR/NIH). Tratamentos sustentados com os siRNAs mostraram-se mais eficientes, e a internalização dos siRNAs foi observada a partir de 2 horas após a transfecção. Para diminuir os efeitos tóxicos do reagente de Lipofectamina, em todos os experimentos realizados as células foram mantidas em meio de transfecção por 2 horas.

A figura 37 mostra que a interferência de RNA foi eficiente utilizando os interferentes siRNA-R1A, siRNA-R2A e siRNA-R2B. Não foram detectados c-DNAs correspondentes a FGFR1 utilizando siRNA-R1A (específico para bloquear FGFR1b ou FGFR1c), no entanto a presença do produto de PCR foi detectada em células tratadas com siRNA-R1B, indicando que o mesmo não foi eficiente na degradação específica do RNA correspondente. siRNA-R2A e siRNA-R2B, específicos para bloquear FGFR2 (b ou c), também foram eficientes na degradação do mRNA correspondente. Como controle, FGFR3 foi medido para células tratadas com todos os siRNAs, e os produtos de PCR obtidos

mostraram que não houve degradação do mRNA para FGFR3, o que torna esse conjunto de experimentos um importante controle de especificidade dos siRNAs. Células Y-1 tratadas com siRNA “scrambled” (cuja sequência corresponde ao arranjo randômico das mesmas bases utilizadas em siRNA-R2A), bem como células tratadas somente com lipofectamina não mostraram efeitos de degradação para qualquer um dos FGFRs medidos, e correspondem aos controles negativos utilizados.

Células Y-1 mostraram, de fato, resposta de interferência de RNA. Essa resposta é característica de células eucarióticas diferenciadas, e tem sido relacionada a um mecanismo de defesa contra invasões retrovirais ⁽⁷¹⁾.

Resultados não publicados (Rebustini e Hoffman) obtidos em transfecções transientes utilizando os mesmos siRNAs em culturas de glândulas submandibulares de camundongo, mostram que após 24 horas de transfecção há um restabelecimento dos níveis dos respectivos mRNAs interferidos, mostrando que o efeito inibitório utilizando siRNAs sintéticos é transitório, e que os mesmos devem possuir um tempo de meia-vida nas células relativamente curto, correspondendo a 24 horas. No entanto, está descrito na literatura ⁽⁷¹⁾ que a resposta de interferência de RNA é bastante rápida, e a degradação completa da população do respectivo mRNA ocorre após 1 hora de ativação do mecanismo de interferência. Mesmo após 2 horas de transfecção, os níveis de mRNAs para FGFR1 e FGFR2 foram totalmente abolidos com a utilização de siRNA-R1A e siRNA-R2 (A ou B), respectivamente, mostrando que a resposta após o período de 2 horas ainda persiste e está relacionada com a estabilidade dos siRNA no interior da célula (não foi medida a cinética de degradação de siRNAs em células Y-1).

Células adrenocorticais Y-1 carenciadas apresentam baixo nível de expressão do gene de resposta primária *c-fos*, que consiste num importante marcador para medidas de resposta mitogênica, e também, níveis detectáveis muito baixos para FGFRs, em comparação com células crescendo exponencialmente. Mesmo assim, células Y-1 carenciadas são capazes de responder prontamente a estímulos com FGF2, indicando que os receptores presentes são suficientes para promover resposta mitogênica (entrada em S). Ainda, um fato interessante é que tanto FGF2 quanto ACTH, que promovem um aumento da expressão de c-Fos, também regulam a expressão de todos os receptores de FGF presentes em células Y-1 (resultados mostrados na seção 4.4). Para investigar a expressão do gene de resposta primária *c-fos* e sua relação com os níveis de FGFRs em células Y-1, utilizamos um ensaio funcional baseado no bloqueio promovido pelos siRNAs na expressão de FGFR1 e FGFR2, e medidas dos níveis de c-Fos expressos após 2 horas de tratamentos com ACTH e FGF2 (esse tempo corresponde ao pico de expressão para c-Fos).

Os resultados obtidos (mostrados nas figuras 37 e 38) mostraram que a expressão de c-Fos em células adrenocorticais Y-1 estimuladas com FGF2 recombinante diminuiu em células interferidas para FGFR1b e FGFR2c. Tratamentos com siRNAs inibem em até 50% a indução de c-Fos, logo a conclusão é que os FGFRs testados, cujos mRNAs foram abolidos devem também ter reduzido seus níveis de proteína (em até 50%). Uma vez que *c-fos* é um gene de resposta primária cuja expressão independe da síntese de proteínas, a diminuição de seus níveis não deve estar associada ao bloqueio da expressão de FGFR1 e FGFR2 promovido pelos siRNAs, mas sim à degradação dos mesmos, tornando a célula menos suscetível à ação de FGF2 externo. Por inferência também foi observado que FGFRs apresentam meia-vida relativamente curta, de até 2 horas, em células adrenocorticais Y-1. Dados publicados de meia-vida para FGFRs (48-72 horas) estão em desacordo com os encontrados para células Y-1. Como os níveis de FGFRs diminuem com o carenciamento, possivelmente a meia-vida da proteína muda na presença ou na ausência de tratamentos com soro, para células Y-1.

ACTH promove a ativação de c-Fos (níveis menores do que FGF2) independentemente da ativação de receptores para FGF2, assim nenhum dos tratamentos com siRNAs promoveu a diminuição de c-Fos sob estímulo de ACTH (que portanto consistiu no controle positivo para a indução de c-Fos).

Possivelmente, a utilização de siRNA R1A e R2A (ou R2B) transfectados ao mesmo tempo em células Y-1 pudessem bloquear drasticamente a indução de c-Fos. FGFR3b, embora seja expresso em células Y-1 e regulado sob tratamentos de ACTH e de FGF2, apresenta uma constante de afinidade a FGF2 muito menor do que FGFR1b ou FGFR2c, o que diminui sua contribuição na transdução de sinal promovida por FGF2.

A estabilidade dos siRNAs no interior das células e a meia-vida de seus correspondentes alvos intracelulares são fatores limitadores no bloqueio da expressão gênica. Proteínas de baixo “turn-over”, que possuem meia-vida intracelular muito longa, podem não ter seus níveis intracelulares eficientemente diminuídos sob tratamentos com siRNAs exógenos. Para contornar esse problema, sistemas de transfecção estáveis utilizando construções de DNA em plasmídeos de expressão constitutiva têm sido desenvolvidos, e permitem a geração de siRNAs constitutivamente, mantendo constante seus níveis intracelulares. Dessa maneira, os níveis de siRNAs específicos intracelulares, bem como seus efeitos na degradação dos respectivos mRNAs, são mantidos por tempo indeterminado. O exemplo mais importante tem sido o desenvolvimento de plasmídeos pSUPER contendo um promotor forte de RNAPolIII que gera eficientemente duplas fitas duplas fitas de RNA ou fitas simples contendo repetições invertidas do gene de interesse (cujo transcrito gera um “hairpin” intracelular com estrutura similar à dos siRNAs) ⁽⁷²⁾.

6. Conclusões

1. Células adrenocorticais expressam Fatores Peptídicos de Crescimento envolvidos no controle do ciclo celular. A detecção através de RT-PCR e a caracterização através de sequenciamento dos c-DNAs correspondentes aos mRNAs para FGF2, PDGFA e B, IGF1 e 2, TGF β , EGF, TGF α e VEGF, utilizando a linhagem estabelecida de células Y-1 de camundongo e culturas primárias de células Glomerulosas e Fasciculadas/Reticulares de córtex supra renal de ratos permitiu estabelecer uma comparação entre os dois modelos experimentais. De acordo com essa comparação, foi possível concluir que há uma correlação muito grande quanto à presença dos mRNAs para a maioria dos Fatores Peptídicos de Crescimento e de seus respectivos Receptores investigados, com exceção de:

- 1.1. EGF e IGF1 (presentes somente em células Y-1);
- 1.2. IGFR2 (presente somente em culturas primárias de rato);
- 1.3. TGF α , TGF β 1 e TGF β 2 (presentes somente em culturas primárias de células Glomerulosas de rato).

2. Células adrenocorticais (linhagem celular Y-1 e culturas primárias de ratos) expressam PDGFA e PDGFB, mas não possuem Receptores para PDGF (PDGFR α e PDGFR β), o que exclui essa classe de Fatores Peptídicos de Crescimento como candidatos a reguladores autócrinos do ciclo celular em células adrenocorticais. Um possível papel biológico dos mesmos poderia estar relacionado, assim como VEGFA, detectado em ambos os modelos experimentais investigados, à regulação de angiogênese e vascularização do tecido adrenocortical.

3. Com relação FGF2, um importante Fator Peptídico de Crescimento expresso em células Y-1 e também em culturas primárias de rato, pôde-se concluir que:

- 1.1. Há dois transcritos para FGF2, detectados (RT-PCR) e caracterizados através de sequenciamento de DNA, correspondentes ao mRNA canônico de 7,0 kb e ao seu produto de “splicing” alternativo de 3,7 kb;
- 1.2. Tratamentos com Soro (FCS, 10%) promoveram o aumento nos níveis de mRNA para o transcrito canônico de 7,0 kb.

4. ACTH (Hormônio Adrenocorticotrópico) é responsável pela regulação dos níveis de Fatores Peptídicos de Crescimento e de seus Receptores em células adrenocorticais.

- 4.1. Células Y-1 expressam duas isoformas de isoformas de alto peso (HMW-) e de baixo peso molecular (LMW-) para FGF2. As isoformas HMW-FGF2 (21,5 e 24 KDa) não são reguladas (em níveis detectáveis por Western blot) sob tratamento de ACTH, que promove o aumento nos

níveis de proteínas para LMW-FGF2 (18 KDa), medidos por Western blot e Imunoperoxidase. Isso implica em mecanismos distintos de regulação da expressão de LMW- e de HMW-FGF2s.

4.2. ACTH promove aumento nos níveis de Receptores para FGF em células Y-1. Todas as isoformas de FGFR detectadas por RT-PCR e caracterizadas através de seqüenciamento, correspondentes a FGFR1b, FGFR2c e FGFR3b, foram reguladas sob tratamentos de ACTH e de FGF2 recombinante, no entanto ACTH manteve os níveis de proteínas elevados, enquanto estímulos de FGF2 foram transientes, implicando em mecanismos de regulação da expressão de FGFRs distintos dependendo do tratamento (ACTH ou FGF2).

5. Há diferentes padrões de localização subcelular para LMW-FGF2 recombinante (adicionado externamente às células) ou LMW-FGF2 expressos sob estímulo de ACTH (endógenos). LMW-FGF2 endógeno é predominantemente citoplasmático, enquanto LMW-FGF2 recombinante foi internalizado dentro da célula de uma maneira dose e tempo dependente, sendo encontrado no núcleo em tempos prolongados de tratamento (5-8 horas). A localização subcelular diferenciada permitiu inferir mecanismos de ação distintos para ambos os LMW-FGF2 investigados.

6 . A expressão de Receptores para FGF (FGFR1b e FGFR2c) foi eficientemente abolida em células adrenocorticais Y-1 utilizando a metodologia de interferência de RNA (RNAi). A degradação dos respectivos mRNAs-alvo para FGFR1b e FGFR2c ocorreu eficientemente, comprovando que o fenômeno de interferência de RNA está ativo em células Y-1, gerando implicações funcionais para a célula, como o bloqueio da expressão do gene de resposta primária *c-fos* (sob estímulo de FGF2). Também, foi possível inferir que FGFR1b e FGFR2c possuem meia-vida relativamente curta (2 horas), em células Y-1 mantidas na ausência de soro.

7. Referências Bibliográficas

1. Pardee, A.B. (1989) "G1 events and regulation of cell proliferation", *Science*, 246, 603-8
2. Donward, J. (2001) "The ins and outs of signaling" *Nature*, 411
3. Darnell, J.; Matsudaira, P.; Zipursky, S.L.; Baltimore, D. and Lodish, H. (1997) "Molecular Cell Biology", Scientific American Books, New York.
4. Yamada, K.M. e Clarck, K. (2002) "Cell Biology: survival in three dimensions" *Nature*, 419 (6909): 790-791
5. Bishop, J.M. (1983) "Cellular oncogenes and retroviruses" *Annual Review of Biochemistry*, 52: 301-354.
6. Leutz, A. and Graf, T. (1990) "Relationships between oncogenes and growth factors", In "Peptide Growth Factors and their receptors" (vol.I and II), Editors: Sporn, M.B.and Roberts, A. B. Springer-Verlag, New York.
7. Sherr, C.J; (1993) "Mammalian G1 Cyclins" *Cell*, 73: 1059-1065.
8. Mercer, W.E. (1998) "Checking on the cell cycle" *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*, 30/31: 50-54.
9. Blagosklonny M.V. (2001) "Paradox of Bcl-2 (and p53): why may apoptosis-regulating proteins be irrelevant to cell death?" *Bioessays*, 23(10):947-953
10. Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1988) "Peptide Growth Factors are multifunctional" *Nature*, 332: 217-9
11. Sporn, M.B. and Roberts, A.B. (1991) "The multifunctional nature of peptide growth factors", In "Peptide Growth Factors and their receptors (I)", Editors: Sporn, M.B.and Roberts, A. B. Springer-Verlag, New York, 3-15

12. Armelin, H.A. (1973) "Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth" *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 70, (9): 2702-2706
13. Gospodarowicz, D. (1975) "Purification of FGF from bovine pituitary" *Journal of Biological Chemistry*, 250 (7): 2515-20
14. Baird, A.; Klagsbrun, M. (1991) "The fibroblast growth factor family" *Cancer Cells*, 3: 239-243
15. Favera, R.D. and Gallo, R.C. (1982) "Chromosomal localization of the human homolog c-sis of the SSV onc gene" *Science*, 218: 686-688.
16. Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987) "Angiogenic Factors" *Science*, 235: 442-447.
17. Jones, S. M. et al (2001) "Growth-Factor dependent signaling and cell cycle progression (review)" *FEBS Letters*, 490:110-116
18. Armelin, H.A., Lotfi, C.F.P. and Lepique, A. P. (1996) "Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical cells" *Endocrine Research*, 22: 373-383.
19. Lotfi, C.F.P.; Todorovic, Z.; Armelin, H.A. and Shimmer, B.P. (1997) "Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y-1 mouse adrenocortical tumor cells", *Journal of Biological Chemistry*, 272, (47): 29886-29891.
20. Moustakas A., Pardali K., Gaal A., Heldin C.H. (2002) "Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation" *Immunological Letters*, 82 (1-2): 85-91
21. Lázár-Molnar, E. et al (2000) "Autocrine and Paracrine regulation by Cytokines and Growth Factors in melanoma" *Cytokine*, 12 (6): 547-54
22. Sporn, M.B and Roberts, A. B (1985) "Autocrine Growth Factors and Cancer" *Nature*, 313:745-747.
23. Heymach, J.V. e Barres, B. A. (1995) "Neuronal Self Reliance" *Nature*, 374:405-406

24. Delrieu, I. (2000) "The high molecular weight isoforms of bFGF: an insight into an intracrine mechanism" FEBS Letters, 468:6-10
25. Bonnet, H., Filhol O., Truchet I., Brethenou P., Cochet C., Almaric F. and Bouche G. (1996) "Fibroblast Growth Factor-2 binds to the regulatory β -subunit of CK-II and directly stimulates CK-II activity toward nucleolin" Journal of Biological Chemistry, 271 (40): 24781-24787
26. Vinson, G.P. (2003) "Adrenocortical zonation and ACTH" Microscopy Research and Technique, 61: 227-239
27. Clark, A. J., Cammas, F.M and Kapas, S. (1996) "Expression of the mouse ACTH receptor gene and characterization of its promoter.", Endocrine Research, 22 (4) : 333-335.
28. Simpson, E.R. and Waterman, M.R. (1998) "Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH" Annual Review of Physiology, 50: 427-440.
29. Kimura, E.; Frigeri, C.K. and Armelin, H.A. (1993) "Relevance of *c-fos* proto-oncogene induction for the steroidogenic response to ACTH, dc-AMP and phorbol ester in adrenocortical cells" Molecular and Cellular Biochemistry, 124: 23-32.
30. Stocco, D.M., Clarck, B.J. (1997) "The role of steroidogenic acuter regulatory protein in steroidogenesis Steroids 62 (1): 29-36.
31. Yasumura, Y. Buonassissi, V. and Sato, G. (1966) "Clonal analysis of differentiated function in animal cells culture. Possible correleted maintenance of differentiated function and the diploid karyotype", Cancer Research, 26: 529-535.
32. Schimmer BP. (1979) "Adrenocortical Y1 cells" Methods in Enzymology, 58:570-574.
33. Armelin, H.A., Lotfi, C.F.P. and Lepique, A. P. (1996) "Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical cells" Endocrine Research, 22: 373-83
34. Lotfi, C.F.P.; Todorovic, Z.; Armelin, H.A. and Shimmer, B.P. (1997) "Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y-1 mouse adrenocortical tumor cells", Journal of Biological Chemistry, 272, (47): 29886-29891

35. Denhardt, D.T. (1996) "Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potencial for multiplex signalling" *Biochemical Journal*, 318: 729-47
36. Gutkind, J.S. (1998) "Cell Growth control by Gprotein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration" *Oncogene*, 17: 1331-42
37. Karin, M. (1995) "The regulation of AP-1 activity by Mitogen-Activated Protein Kinases", *The Journal of Biological Chemistry*, 270, (28): 16483-16486.
38. Faria M, Armelin HA. (1996) "Antagonistic actions of phorbol ester in mammalian G0→G1→S cell cycle transition" *Cell Growth Differ.* Jan;7(1):75-81
39. Bicknell, AB, Lomthaisong, K, Woods, R, Hutchinson, EG, Bennet, HPJ, Gladwell, RT e Lowry PJ (2001) "Characterization of a Serine Protease that cleaves pro-melanotropin at the adrenal to stimulate growth" *Cell*, 105: 903-912
40. Rocha, KM, Forti, FL, Lepique, A.P., Armelin HA (2003) "Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: roles of ACTH" *Microscopy Research and Technique*, 61: 268-274
41. Forti, FL and Armelin, HA (2000) "ACTH inhibits Ras-dependent antiapoptotic and mitogenic pathway in mouse Y-1 adrenocortical cells" *Endocrine Research*, 26: 911-914
42. Schwindt, TT, Forti, FL, Moraes, MS, Eichler, CB and Armelin, HA (2002) "ACTH promotes the p27^{kip1} induction in mouse Y-1 adrenocortical tumor cells dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation" *Biochemistry*, 41:10133:10140
43. Lepique, AP, Forti, FL, Moraes, MS and Armelin, HA (2000) " Signal Transduction in G0/G1-arrested mouse Y-1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2" *Endocrine Research*, 26:825-832
44. Alberts, B (1998) "The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists" *Cell*, 92: 291-294

45. Nguyen A, Burack WR, Stock JL, Kortum R, Chaika OV, Afkarian M, Muller WJ, Murphy KM, Morrison DK, Lewis RE, McNeish J, Shaw AS. (2002) "Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo" *Molecular and Cellular Biology* (9):3035-45.
46. Gavin, AC et al (2002) "Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes" *Nature*, 415: 141-147
47. Sali, A., Glaese, R., Earnest, T. and Baumeister, W. (2003) "From words to literature in structural proteomics" *Nature*, 422: 216-225
48. Tucker, C.L., Gera, J.F. and Uetz, P. (2001) "Towards to understanding of complex protein networks" *Trends in Cell Biology*, 11 (3): 102-106
49. Hicke, L. (1999) "Getting' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels" *Trends in Cell Biology*, 9: 107-112
50. Sorkin, A. and Zastrow, M. (2002) "Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds" *Nature*, 3:600-614
51. Komi, A., Ishisaki, A., Suzuki,M., and Imamura, T (2003) "A permeable FGF1 nuclear localization sequence peptide induces DNA synthesis independently of Ras activation" *Experimental Cell Research*, 283: 91-100
52. Feige, J.J.; Vilgrain, I.; Brand, C.; Baillys, S. and Souchelnitskiy, S. (1998) "Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors" *Journal of Endocrinology*, 158: 7-19
53. Viard, I.; Jaillard, C. and Saez, J.M. (1993) "Regulation by growth factors (IGF-I, b-FGF and TGF- β) of proto-oncogene mRNA, growth and differentiation of bovine adrenocortical fasciculata cells" *FEBS*, 328, (1,2): 94-98.
54. Ho, M. M. and Vinson, G.P. (1995) "Endocrine control of the distribution os b-FGF, IGF-1 and TGF- β 1 mRNAs in adult rat adrenal glands using non radioactive *in situ* hybridization" *Journal of Endocrinology*, 144: 379-87

55. Ilvesmaki, V. et al (1993) "IGF-II in human fetal adrenals: regulation by ACTH, PKC and Growth Factors" *Journal of Endocrinology*, 137: 533-42
56. Ornitz, D. M. and Itoh, N. (2001) "Fibroblast Growth Factors" *Genome Biology*, 2 (3): 1-12
57. Hoffman, MP, Kidder, BL, Steinberg, Z., Lakhani, S., Ho, S, Kleinman, HK and Larsen, M (2002) "Gene expression profile of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP- and FGF- dependent mechanism" *Development*, 129: 5767-5778
58. Powers, C.J. ,McLeskey, SW and Wellstein, A (2000) "Fibroblast Growth Factors, their receptors and signaling" *Endocrine-Related Cancer* 7: 165-197
59. Celli, G, LaRochelle, W, Mackem S, Sharp, R and Merlino G (1998) "Soluble dominant-negative receptor uncovers essential roles for FGFs in multi-organ induction and patterning" *The EMBO Journal*, 17 (6): 1642-1655
60. Carstens, R.P. et al (2000) "An intronic splicing silencer causes a skipping of the IIIb exon of FGFR2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein" *Mol.Cell Biol*, 20: 7388-7400
61. Pellegrini L, Burke DF, von Delft F, Mulloy B, Blundell TL. (2000) "Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin" *Nature* 407 (6807): 029-1034.
62. Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M e Christofori G (2001) "N-CAM modulates tumor-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signaling" *Nature Cell Biology*, 3: 650-656
63. Marchese C, Mancini P., Belleudi F, Felici A, Gradini R, Sansolini T, Frati L and Torrisi MR (1998) "Receptor-mediated endocytosis of keratinocyte growth factor" *Journal of Cell Science*, 111: 3517-3527
64. Roghani M and Moscatelli D (1992) "FGFb is internalized through both receptor and heparan-sulphate mediated mechanism" *The Journal of Biological Chemistry*, 267 (31): 22156-22162

65. Keresztes M and Boonstra J (1999) "Import(ance) of Growth Factors in(to) the nucleus" *The Journal of Cell Biology*, 145: 421-424
66. Brantl, S (2002) Review "Antisense RNA regulation and RNA interference" *Biochimica et Biophysica Acta*, 1575: 15-25
67. Billy, E et al (2001) "Specific interference with gene expression induced by long, ds-RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines" *PNAS*, 98: 14428-14433
68. Sui et al (2002) "A DNA vector-based technology to suppress gene expression in mammalian cells" *PNAS*, 99 (8): 5515-5520
69. Hannon, G (2002) "RNA interference", *Nature*, 418: 244-251
70. Hutvagner, G. e Zamore, D. (2002) "RNAi: nature abhors a double strand" *Current Opinion in Genetics and Development*, 12:225-232
71. Fire, A. et al (1998) "Potent and specific genetic interference by ds-RNAi in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 391: 806-811
72. Brummelkamp, T. et al (2002) "A System for stable expression of short interfering RNAs in Mammalian cells" *Science*, 296:550-553
73. Yasumura Y., et al. (1966) Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res.* 26: 529-535,
74. Aaronson SA, Todaro GJ . (1968) "Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40" *J. Cell. Physiol.* 72: 141-148
75. Kovary, K, Armelin, H. A., Armelin, M.C. (1989) "Glucocorticoid dexamethasone reversibly complements EJ-RAS oncogene to transform mouse embryo Balb3T3 cells" *Journal of Cellular Biochemistry*, 41 (4): 171-177

75. Gluzman Y . (1981) "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" *Cell* 23: 175-182
76. Sugarman BJ , et al. (1985) "Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro" *Science* 230: 943-945, 1985
77. Gey G.O., et al. "Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium". *Cancer Res.* 12: 264-265, 195273.
78. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction"; *Analitical Biochemistry*, 162: 156-159.
80. Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T (1989) "Molecular Cloning – A laboratory manual", Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
81. Choi J, Ko MK and Kai EP (2000) "Subcellular localization of the expressed 18 Kda FGF-2 isoform in corneal endothelial cells" *Molecular Vision*, 6:222-231
82. Bernstein, E. et al (2001) "Role of a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference" *Nature*, 409: 363-366
83. Dirks RPH, Potter SJ and Griep A (2001) "Novel Fibroblast Growth Factor 2 transcripts are expressed in mouse embryos" *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287: 900-909
84. Arnaud E, Touriol C, Boutonnet C, Gensac MC, Vagner S, Prats H and Prats AC (1999) "A new 34-KDa isoform of human FGF2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor" *Molecular and Cellular Biology*, 19 (1) 505-514
85. Safran, A et al (1990) "The murine flg gene encodes a receptor for fibroblast growth factor" *Oncogene*, 5: 635-643
86. Raz, V et al (1991) "PCR-based identification of new receptors: molecular cloning of a receptor for fibroblast growth factors" *Oncogene* 6: 753-760

87. Avivi et al (1991) "PCR-based identification of new receptors: molecular cloning of a receptor for fibroblast growth factors" *Oncogene*, 6: 1089-1092
88. Avivi et al (1991) "PCR-based identification of new receptors: molecular cloning of a receptor for fibroblast growth factors" *Oncogene*, 6: 1089-1092
89. Johnston CL, Cox HC, Gomm JJ and Coombes RC (1995) "FGFRs localize in different cellular compartments (A splice variant of FGFR3 localizes to the nucleus)" *Journal of Biological Chemistry*, 270 (51): 30643-30650
90. Touriol C, Roussigne M, Gensac MC, Prats H, Prats AC. (2000) "Alternative translation initiation of human fibroblast growth factor 2 mRNA controlled by its 3'-untranslated region involves a Poly(A) switch and a translational enhancer" *Journal of Biological Chemistry*, 275(25):19361-7.
91. Arese M, Chen Y, Florkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B and Rifkin DB (1999) "Nuclear activities of FGF2: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals" *Molecular Biology of the Cell*, 10: 142-144
92. Betsholtz C, Karlsson L and Lindahl P (2001) "Developmental roles of PDGFs", *Bioassays*, 23: 494-507
93. Asakai R, Akita Y, Tamura K, Kenmotsu N, Aoyama Y. (1995) "Protein kinase C-dependent down-regulation of basic fibroblast growth factor (FGF-2) receptor by phorbol ester and epidermal growth factor in porcine granulosa cells" *Endocrinology*, 136(8):3470-9
94. Sperinde, GV, and Nugent M A (2000) "Mechanisms of FGF2 intracellular processing: a kinetic analysis of the role of heparan-sulphate proteoglycans" *Biochemistry*, 39: 3788-3796
95. Marchese C, Mancini P, Belleudi F, Felici A, Torrisi R (1998) "Receptor-mediated endocytosis of KGF" *Journal of Cell Sciences*, 111: 3517-3527
96. Bugler B, Amalric C and Pratis H (1991) "Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor" *Molecular Cell Biology*, 11: 573-577

97. Quarto N, Finger FP and Rifkin DB (1991) "The NH₂-terminal extension of high molecular weight bFGF is a nuclear targeting signal" *Journal of Cell Physiology*, 147: 311-318
98. Do, M.S., Fitzer-Attas, C., Gubbay, J., Greenfeld, L., Feldman, M. and Eisenbach, L. (1992) "Mouse platelet-derived growth factor alpha receptor: sequence, tissue-specific expression and correlation with metastatic phenotype" *Oncogene* 7 (8), 1567-1575
99. Yarden, Y., Escobedo, J.A., Kuang, W.J., Yang-Feng, T.L., Daniel, T.O., Tremble, P.M., Chen, E.Y., Ando, M.E., Harkins, R.N., Francke, U. (1986) "Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors" *Nature* 323 (6085), 226-232
100. Han VK, Lund PK, Lee DC and D'Ercole AJ (1988) "Expression of somatomedin/insulin-like growth factors mRNAs in the human fetus: identification, characterization and tissue distribution" *J. Clin. End. Metabolism*, 66: 422-429
101. Smikle C B, Kim H S, Mesiano S and Jaffe R B (1996) "Identification of the ligands for the EGF-R in human fetal and adult adrenal glands" 10th International Congress of Endocrinology, San Francisco, Abstract OR6-3
102. Riopel L, Branchaud CL, Goodyer C G, Adkar V and Lefebvre Y (1989) "Growth inhibitory effect of TGF- β on human fetal adrenal cells in primary monolayer culture" *J. Cell. Physiology*, 140: 233-238
103. Gaillard I, Keramidas M, Liakos P, Vilgrain I, Feige JJ, Vittet D. (2000) "ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: a possible role in the maintenance of the microvasculature." *J. Cell Physiol.* 185 (2):226-34
104. Hebert, J.M., Basilico, C., Goldfarb, M., Haub, O. and Martin, G.R. (1990) "Isolation of c-DNAs encoding four mouse FGF family members and characterization of their expression patterns during embryogenesis" *Dev. Biol.* 138 (2), 454-463
105. Beer, H.D., Vindevoghel, L., Gait, M.J., Revest, J.M., Duan, D.R., Mason, I., Dickson, C. and Werner, S. (2000) "Fibroblast growth factor (FGF) receptor 1-IIIb is a naturally occurring

functional receptor for FGFs that is preferentially expressed in the skin and the brain" *J. Biol. Chem.* 275 (21), 16091-16097

106. Mansukhani, A., Dell'Era, P., Moscatelli, D., Kornbluth, S., Hanafusa, H. and Basilico, C. (1992) "Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF)receptor: activation by three members of the FGF family and requirement for heparin" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (8), 3305-3309

107. Stark, K.L., McMahon, J.A. and McMahon, A.P. (1991) "FGFR-4, a new member of the fibroblast growth factor receptor family, expressed in the definitive endoderm and skeletal muscle lineages of the mouse" *Development* 113 (2), 641-651

108. Mercola, M., Wang, C.Y., Kelly, J., Brownlee, C., Jackson-Grusby, L., Stiles, C. and Bowen-Pope, D. (1990) "Selective expression of PDGF A and its receptor during early mouse embryogenesis" *Dev. Biol.* 138 (1), 114-122

109. Bonthron, D.T., Sultan, P. and Collins, T.C. (1991) "Structure of the murine c-sis proto-oncogene (sis, PDGFB), encoding the B chain of platelet-derived growth factor" *Genomics* 10 (1), 287-292

110. Bell, G.I., Stempien, M.M., Fong, N.M. and Rall, L.B. (1986) "Sequences of liver c-DNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors" *Nucleic Acids Res.* 14 (20), 7873-7882

111. Stempien, M.M., Fong, N.M., Rall, L.B. and Bell, G.I. (1986) "Sequence of a placental c-DNA encoding the mouse insulin-like growth factor II precursor" *DNA* 5, 357-361

112. Wada, J., Liu, Z.Z., Alvares, K., Kumar, A., and Kanwar, Y.S. (1993) "Cloning of c-DNA for the alpha subunit of mouse insulin-like growth factor I receptor and the role of the receptor in metanephric development" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (21), 10360-10364

113. MacDonald, R.G., Pfeffer, S.R., Coussens, L., Tepper, M.A., Brocklebank, C.M., Mole, J.E., Anderson, J.K., Chen, E., Czech, M.P. and Ullrich, A. (1988) "A single receptor binds both insulin-like growth factor II and mannose-6-phosphate" *Science* 239 (4844), 1134-1137

114. Scott, J., Urdea, M., Quiroga, M., Sanchez-Pescador, R., Fong, N., Selby, M., Rutter, W.J. and Bell, G.I. (1983) "Structure of a mouse submaxillary messenger rna encoding epidermal growth factor and seven related proteins" *Science* 221, 236-240
115. Blasband AJ, Rogers KT, Chen XR, Azizkhan JC, Lee DC. (1990) "Characterization of the rat transforming growth factor alpha gene and identification of promoter sequences." *Mol Cell Biol.* 10(5):2111-21.
116. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J." Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." (1984) *Nature* 309(5967):418-25.
117. Qian,S.W., Kondaiah,P., Roberts,A.B. and Sporn,M.B. "cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor beta-1" *Nucleic Acids Res.* 18 (10), 3059 (1990)
118. Miller ¹, D.A., Lee, A., Pelton, R.W., Chen, E.Y., Moses, H.L. and Derynck, R. (1989) "Murine transforming growth factor-beta 2 c-DNA sequence and expression in adult tissues and embryos" *Mol. Endocrinol.* 3 (7), 1108-1114
119. Miller ², D.A., Lee, A., Matsui, Y., Chen, E.Y., Moses, H.L. and Derynck, R. (1989) "Complementary DNA cloning of the murine transforming growth factor- beta-3 (TGF-beta-3) precursor and the comparative expression of TGF-beta-3 and TGF-beta-1 messenger RNA in murine embryos and adult tissues" *Mol. Endocrinol.* 3, 1926-1934
120. Tomoda, T., Kudoh, T., Noma, T., Nakazawa, A., Muramatsu, M. and Arai, K. (1994) "Molecular cloning of a mouse counterpart for human TGF-beta type I receptor" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198 (3), 1054-1062
121. Lawler, S., Candia, A.F., Ebner, R., Shum, L., Lopez, A.R., Moses, H.L., Wright, C.V. and Derynck, R. (1994) "The murine type II TGF-beta receptor has a coincident embryonic expression and binding preference for TGF-beta 1" *Development* 120 (1), 165-175
122. Sugihara T, Kaul SC, Mitsui Y, Wadhwa R." Enhanced expression of multiple forms of VEGF is associated with spontaneous immortalization of murine fibroblasts." (1994) *Biochim Biophys Acta.*1224(3):365-70.