UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

"CLONAGEM DO RECEPTOR DE ACTH DE CÉLULAS
ADRENOCORTICAIS Y-1 DE CAMUNDONGO E EXPRESSÃO EM
FIBROBLASTOS 3T3 E CÉLULAS AR-1 PARA ELUCIDAÇÃO DE
VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL"

FÁBIO LUÍS FORTI

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: PROF. DR. HUGO AGUIRRE ARMELIN

SÃO PAULO

01/02/2001

"Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram".

Alexander Graham Bell (1847-1922)

"Algumas pessoas nunca aprendem nada porque entendem tudo muito depressa".

Alexander Pope (1688-1744)

"Investir em conhecimentos rende sempre os melhores juros".

Benjamim Franklin (1706-1790)

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano".

Isaac Newton (1642-1727)

"A ciência é a procura da verdade, não é um jogo no qual uma pessoa tenta bater seus oponentes, prejudicar outras pessoas".

Linus Pauling (1901-1994)

"Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão".

Max Planck (1858-1947)

DEDICATÓRIA

"A DEUS, POR TUDO".

"A Juliana, minha querida, que sempre me incentivou nas horas tenebrosas e calmas com força, amor, companheirismo e paciência para que eu pudesse finalizar mais esta importante etapa de minha vida. A você, que me ajuda diariamente a compreender o amor e muitas outras coisas da vida, o meu muito obrigado, sempre, de coração".

"Aos meus pais Jacob e Irma, pelo exemplo de amor, dedicação, honestidade e educação que sempre foram e serão os pilares de minha vida e do futuro de nossas famílias".

"Ao meu querido irmão Wilson, pelo exemplo de perseverança e paciência, por nosso amor, amizade, cumplicidade e por tudo o mais que fez por mim nestes árduos anos aqui em São Paulo".

"Ao professor Hugo Armelin, pelo exemplo de profissionalismo, respeito, sabedoria e diplomacia que conduziu o laboratório neste período, e que me ajudou a enxergar e aprender a pesquisa e a ciência da biologia celular e molecular e da bioquímica que, como químico, eu desconhecia".

"Ao meu querido irmão Edison, aos meus sogros Miguel, Marylene e a minha cunhada Maria Rosa pelo incentivo e carinho que sempre me dão".

AGRADECIMENTOS

Ao professor Hugo Armelin, pela oportunidade da orientação, amizade, paciência, dedicação e incentivo durante estes anos de trabalho, através de uma convivência amigável, profissional e produtiva.

Aos colegas do laboratório Érico, Paula, Kátia, Miriam, Ivan, Ana, Claudimara, Telma e Carolina pelo incentivo, ajuda com reagentes e experimentos, discussões e troca de informações necessárias para uma convivência pacífica e formadora de opiniões durante estes anos.

Ao técnico Alexandre Dermargos, amigo e padrinho, que nunca negou uma ajuda por mais simples que fosse, pelas conversas, conselhos e sugestões nas horas mais difíceis.

Aos técnicos Eduardo, Rose, Simone e D. Maria de Sá pelo serviços prestados, paciência e apoio.

A grande amiga Maria Aparecida (Cida ou Cidoca), por tudo que fez por mim e pela Jú em San Diego.

Ao Cláudio Joazeiro, ao prof. Tony Hunter e aos técnicos de seu laboratório, no Salk Institute, La Jolla CA, pela oportunidade de trabalhar uns meses no 1º mundo, pela ajuda e incentivo que me deram.

Aos amigos Fábio/Alexandra e Flávia da UCSD, pela ajuda moral, turística, social e profissional em San Diego.

Ao Sérgio Oyama, pela paciência e ajuda com modelagem molecular.

Aos professores Ângelo Gambarini, El-Dorry, Pio Colepicolo, Mari Sogayar, Ohara Augusto, Bianca Zingales, Aline da Silva, Wlândia Viviani, Sérgio Verjovski e Yoshimi (Bl 19), seus técnicos e alguns alunos, pela ajuda com reagentes e equipamentos.

Ao professor Bayardo Torres, pelo encorajamento, incentivo, sugestões e conselhos nas nossas conversas e pela oportunidade da monitoria PAE.

A todo o pessoal da biblioteca, da secretaria de pós-graduação, da secretaria da Bioquímica, dos setores de áudio-visual, informática e xerox, pela atenção e serviços prestados.

A todos os amigos de fora da USP, Patrícia Campos, Marcos Bet e Sandra Poppe pelo apoio e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos colegas professores da UNIBAN pelos quebra-galhos e incentivo.

A todos os colegas da pós-graduação do IQ pelo incentivo.

Por todos os funcionários do Instituto de Química, que de uma forma ou outra, ajudaram na realização deste trabalho.

A FAPESP pela bolsa concedida, processo nº 96/4266-8.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 - O DESENVOLVIMENTO CELULAR EUCARIÓTICO	1
I.2 – FATORES EXTRACELULARES X VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES	3
I.2.1 - RECEPTORES COM ATIVIDADE DE TIROSINA QUINASE (RPTK)	4
I.2.1.1 – VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ACIONADAS POR RPTKs.....	6
I.2.1.1.1 – VIA DAS MAPK.....	6
I.2.1.1.2 – VIA DE PI3K e AKT/PKB.....	8
I.2.1.1.3 – VIA DE PKC.....	10
I.2.2 - RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS (GPCR)	11
I.2.2.1 – VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ACIONADAS POR GPCRs.....	15
I.2.2.1.1 – VIA DE PKA.....	15
I.2.2.1.2 – VIA DE PKC.....	17
I.2.3 – COMUNICAÇÃO ENTRE AS VIAS SINALIZADORAS ATIVADAS POR GPCRs x RTKs	18
I.3 – GENES DE RESPOSTA PRIMÁRIA	19
I.3.1 – fos, jun e myc.....	20
I.3.2 – O PROMOTOR DE c-fos x PROLIFERAÇÃO CELULAR	21
I.4 – GENES DE RESPOSTA SECUNDÁRIA.....	23
I.4.1 – ciclinas, cdk's e ckis.....	24
I.5 – EFEITOS ENDÓCRINOS DO HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO x BASES MOLECULARES E VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL INTRACELULARES.....	26
I.5.1 – O HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO.....	26
I.5.2 – O RECEPTOR DE ACTH	29
I.5.3 – A LINHAGEM DE CÉLULAS Y-1	31
I.5.4 – ACTH x CÉLULAS Y-1.....	32
II. OBJETIVOS GERAIS	366
II.1 - OBJETIVOS	366
II.2 - PLANO EXPERIMENTAL.....	37
II.3 - VIABILIDADE E RELEVÂNCIA	388
III. MATERIAIS E MÉTODOS	40
III.1 - MATERIAIS	400
III.1.1 – LINHAGENS CELULARES.....	400
III.1.2 - ANTICORPOS	400
III.1.3 – HORMÔNIOS E FATORES PEPTÍDICOS DE CRESCIMENTO	41
III.1.4 - ENZIMAS.....	41
III.1.5 – INIBIDORES E ATIVADORES ENZIMÁTICOS.....	422
III.1.6 - KITS	433
III.1.7 – MEIOS DE CULTURA.....	44
III.1.8 – NUCLEOTÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS	444
III.1.9 - PLASMÍDEOS.....	455

III.1.10 – DROGAS, ANTIBIÓTICOS E REAGENTES DIVERSOS.....	455
III.1.11 - SOLVENTES	46
III.1.12 – SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	47
III.2 - MÉTODOS	50
III.2.1 – CULTURA CELULAR.....	50
III.2.2 - EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL E TRATAMENTO COM DNAase.....	51
III.2.3 – TRANSCRIÇÃO REVERSA DOS mRNA	52
III.2.4 – AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR PCR.....	52
III.2.5 – ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO do cDNA.....	53
III.2.6 – SUBCLONAGEM DO cDNA AMPLIFICADO EM VETOR BACTERIANO	54
III.2.7 – TRIAGEM DAS COLÔNIAS BACTERIANAS, MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS E VERIFICAÇÃO DA SUBCLONAGEM DO INSERTO DE cDNA.....	55
III.2.8 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE FRAGMENTOS DE DNA	566
III.2.9 – PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES.....	56
III.2.10 – MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	577
III.2.11 – CLONAGEM DO cDNA EM VETOR DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA.....	588
III.2.12 – SEQUENCIAMENTO DO cDNA NO VETOR pMOSBlueT	600
III.2.13 - CO-TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS 3T3 E AR-1	622
III.2.13.1 – MÉTODO DA LIPOFECTINA.....	622
III.2.14 – EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	644
III.2.15 – HIBRIDIZAÇÃO POR SOUTHERN BLOT.....	655
III.2.15.1 - FRACIONAMENTO DO DNA.....	655
III.2.15.2 - PREPARAÇÃO DA SONDA RADIOATIVA.....	666
III.2.15.3 - PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO	677
III.2.15.4 - LAVAGENS DA MEMBRANA E EXPOSIÇÃO.....	677
III.2.16 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENILATO CICLASE POR MEDIDA DE PRODUÇÃO DE cAMP.....	68
III.2.16.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS OU EXTRATOS CELULARES	68
III.2.16.2 - DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE cAMP PRODUZIDO	688
III.2.16.3 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO E TRATAMENTO DOS DADOS.....	700
III.2.17 – CURVAS DE CRESCIMENTO DOS CLONES CELULARES.....	711
III.2.18 – DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE DNA OU DA TRANSIÇÃO G1→S DO CICLO CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA TRITIADA.....	722
III.2.19 – DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DAS FAMÍLIAS FOS E JUN E DA PROTEÍNA c-MYC POR IMUNOCITOQUÍMICA, USANDO REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE	733
III.2.20 – EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT PARA AS PROTEÍNAS ERK1,2, AKT/PKB, JNK, CREB E p27 ^{Kip1}	77
III.2.20.1 - OBTENÇÃO DOS LISADOS CELULARES	777
III.2.20.2 - SDS-PAGE	777
III.2.20.3 - WESTERN BLOT.....	78
III.2.20.4 – REUTILIZAÇÃO DA MEMBRANA DE WESTERN BLOT ("STRIPING").....	79
III.2.21 – ENSAIO DE RAS-GTP.....	80
IV. RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	81
IV. 1 – GERAÇÃO DE CLONES TRANSFECTANTES DE CÉLULAS AR-1 E FIBROBLASTOS 3T3 EXPRESSANDO O ACTHR FUNCIONAL	81
IV. 1.1 - AMPLIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO cDNA DO ACTHR.....	81
IV.1.2 - SUBCLONAGEM DO cDNA DO ACTHR EM VETOR PLASMIDIAL BACTERIANO	82
IV.1.3 - CLONAGEM DO cDNA DO ACTHR EM VETOR DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA	83
IV.1.4 - SEQUENCIAMENTO DO cDNA DO ACTHR	84
IV.1.5 - CO-TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS 3T3 E AR-1.....	86
IV.1.6 - TESTE DA INCORPORAÇÃO DOS VETORES TRANSFECTADOS NO DNA GENÔMICO DE CLONES 3T3 E AR-1 POR SOUTHERN BLOT E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO cDNA DO ACTHR POR RT/PCR	88
IV.1.7 - ANÁLISE DA FUNCIONALIDADE DO ACTHR EXPRESSO EM CÉLULAS 3T3 E AR-1 POR DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ADENILATO CICLASE OU ENSAIO DE PRODUÇÃO DE cAMP.....	91
IV.2 – EFEITOS DE ACTH NOS CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR.....	100

IV.2.1 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-FOS POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE: ACTH INDUZ A EXPRESSÃO DE c-FOS NOS CLONES 3T3 ACTHR MAS NÃO NOS CLONES AR-1 ACTHR	100
IV.2.2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-MYC POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE: ACTH NÃO REGULA A EXPRESSÃO DESTA PROTEÍNA EM AMBOS OS CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR COMO O FAZ EM CÉLULAS Y-1	103
IV.2.3 - ACTH ATIVA FRACAMENTE ERK1,2 NOS CLONES 3T3 E AR-1 ACTHR COMO O FAZ EM CÉLULAS Y-1.....	104
IV.2.4 - ACTH E FGF2 ATIVAM JNK2 EM CÉLULAS Y-1 MAS NÃO NOS CLONES 3T3 ACTHR	108
IV.2.5 - ACTH, CORTICOTROPINA A E FGF2 ATIVAM CREM1/ATF1 EM CÉLULAS Y-1 E NOS CLONES 3T3 ACTHR.....	109
IV.2.5 - ACTH INDUZ A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-FOS NOS CLONES 3T3 ACTHR INDEPENDENTE DAS VIAS DE PKA, PKC E MAPK.....	110
IV.2.6 - CURVAS DE CRESCIMENTO CELULAR: ACTH NÃO ALTERA O CRESCIMENTO DOS CLONES 3T3 E AR-1 COMO O FAZ EM CÉLULAS Y-1	115
IV.2.7 - DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE DNA POR ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA TRITIADA: ACTH NÃO INIBE NEM INDUZ A ENTRADA NA FASE S DO CICLO CELULAR DE CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR COMO O FAZ EM CÉLULAS Y-1.....	117
IV.3 – ENVOLVIMENTO DE OUTRAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NOS EFEITOS DE ACTH EM CÉLULAS Y-1.....	121
IV.3.1 - ACTH NÃO INIBE A ATIVIDADE DE Ki-Ras SUPEREXPRESSA EM Y-1	121
IV.3.2 - Y-1 APRESENTA ALTOS NÍVEIS CONSTITUTIVOS DE AKT/PKB ATIVADA, DEPENDENTE DE PI3K E OU Src	122
IV.3.3 - ACTH REDUZ OS NÍVEIS DE AKT ATIVADA EM CÉLULAS Y-1 ATRAVÉS DA VIA DE PKA	126
IV.3.4 - A REDUÇÃO DE AKT ATIVADA POR ACTH NÃO DEPENDE DE PKC OU MAPK	129
IV.3.5 – ACTH NÃO REGULA A EXPRESSÃO OU ATIVIDADE DE AKT EM CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR.....	130
V. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	1322
V.1 – GERAÇÃO DE CLONES TRANSFECTANTES DE AR-1 E 3T3 EXPRESSANDO ACTHR FUNCIONAL	1322
V.2 – INDUÇÃO DE c-FOS POR ACTH EM TRANSFECTANTES AR-1 E 3T3 ACTHR.....	1377
V.3 – INDUÇÃO DE OUTROS GENES: FAMÍLIAS FOS E JUN E O GENE c-MYC	141
V.4 – EFEITOS DE ACTH NO CRESCIMENTO DOS TRANSFECTANTES ACTHR.....	1422
V.5 – A VIA DE PI3K/AKT EM CÉLULAS Y-1 E A RESPOSTA ANTI-MITOGÊNICA DE ACTH.	1433
VI. CONCLUSÕES.....	149
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
CURRICULUM VITAE.....	168

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A</i> : adenosine	<i>JNK</i> : c-JUN N-terminal kinase
<i>AC</i> : adenylate cyclase	<i>LDL</i> : low density lipoprotein
<i>ACTH</i> : adrenocorticotrophic hormone	<i>LZ</i> : leucine zipper
<i>ACTHR</i> : adrenocorticotrophic hormone receptor	<i>MAPK</i> : mitogenic activating protein kinase
<i>AMP</i> : adenosine-5' monophosphate	<i>MCR</i> : melanocortin receptor
<i>AP1</i> : activating protein 1	<i>mRNA</i> : messenger ribonucleic acid
<i>ATF</i> : activating transcription factor	<i>NGF</i> : nerve growth factor
<i>BSA</i> : bovine serum albumin	<i>NO</i> : nitric oxide
<i>CAK</i> : cyclin activating kinase	<i>PAGE</i> : polyacrylamide gel electrophoresis
<i>cAMP</i> : adenosine-3', 5' cyclic monophosphate	<i>PBS</i> : phosphate buffer saline
<i>CDK</i> : cyclin-dependent kinase	<i>PDE</i> : phosphodiesterase
<i>cDNA</i> : complimentary deoxyribonucleic acid	<i>PDGF</i> : platelet-derived growth factor
<i>CRE</i> : CREB responsive element	<i>PI3K</i> : phosphoinositide 3-OH kinase
<i>CRF</i> : corticotropin releasing factor	<i>PKA</i> : protein kinase A
<i>CSF</i> : colony stimulating factor	<i>PKB</i> : protein kinase B
<i>CTX</i> : cholera toxin	<i>PKC</i> : protein kinase C
<i>DAG</i> : diacyl-glycerol	<i>PLC</i> : phospholipase C
<i>DME</i> : Dulbecco's modified Eagle's	<i>PMA</i> : 4- α -phorbol 12-myristate 13-acetate
<i>DMSO</i> : dimethyl-sulfoxide	<i>PMSF</i> : phenylmethylsulfonyl fluoride
<i>DNA</i> : deoxyribonucleic acid	<i>POMC</i> : pro-opiomelanocortin
<i>EDTA</i> : ethylenediaminetetraacetic acid	<i>PTX</i> : pertussis toxin
<i>EGF</i> : epidermal growth factor	<i>RE</i> : retículo endoplasmático
<i>ERK</i> : extracellular regulatory kinase	<i>RGS</i> : regulatory G-protein signaling
<i>FGF2</i> : fibroblast growth factor 2	<i>RMN</i> : ressonância magnética nuclear
<i>FT</i> : fator de transcrição	<i>RPTK</i> : receptor of protein tyrosine kinase
<i>GDP</i> : guanosine 5'-diphosphate	<i>SAPK</i> : stress activating protein kinase
<i>GEF</i> : guanine-nucleotide exchange factor	<i>SDS</i> : sodium dodecyl-sulphate
<i>GH</i> : growth hormone	<i>SF1</i> : steroidogenic factor 1
<i>GM-CSF</i> : granulocyte macrophage – colony stimulating factor	<i>SH2</i> : Src homology 2
<i>GPCR</i> : G protein-coupled receptor	<i>SIE</i> : sis inducible element
<i>GTP</i> : guanosine 5'-triphosphate	<i>SRF</i> : serum response factor
<i>HLH</i> : helix-loop-helix	<i>StAR</i> : Steroidogenesis acute regulatory protein
<i>IBMX</i> : 3-isobutyl-1-methylxanthine	<i>T</i> : thymidine
<i>IP₃</i> : inositol 1, 4, 5-triphosphate	<i>TCF</i> : ternary complex factor
<i>JAK</i> : Janus activating kinase	<i>TPA</i> : 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
	<i>TRE</i> : TPA regulatory element

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA ILUSTRATIVO DO MECANISMO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DISPARADO POR AGENTES MITOGÊNICOS QUE SE LIGAM A RECEPTORES DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASES DE MEMBRANA E ATIVAM A VIAS DAS GTPASES DA FAMÍLIA DE RAS, QUE POR SUA VEZ REGULAM DIVERSOS PROCESSOS CELULARES IMPORTANTES. ABREVIATURAS: AP= ADAPTOR PROTEIN; GEF= GUANINE-NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR.....	5
FIGURA 2. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ATIVAÇÃO DA VIA DAS MAPKS POR AGENTES MITOGÊNICOS, MEDIADA POR RAS/RAC/CDC42, QUE FINALIZA COM A ATIVAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO NUCLEARES COMUNS OU NÃO ÀS 3 ISOFORMAS DE MAPK (ERK, JNK E P38).	7
FIGURA 3. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ATIVAÇÃO, MEDIADA POR RAS, DA VIA DE PI3K/PKB POR FATORES DE SOBREVIVÊNCIA E DOS POSSÍVEIS E CONHECIDOS SUBSTRATOS DE PKB QUE CONTROLAM O DESENVOLVIMENTO CELULAR EM DIVERSOS NÍVEIS E SITUAÇÕES.	9
FIGURA 4. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ATIVAÇÃO DA VIA DE PKC POR RECEPTORES DE PROTEÍNA TIROSINA QUINASE ESTIMULADOS POR AGENTES MITOGÊNICOS, ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO PRÉVIA DE PLC γ	11
FIGURA 5. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA TRANSDUÇÃO DE SINAL POR RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G QUANDO ATIVADOS POR DIFERENTES AGONISTAS. O ESQUEMA TAMBÉM MOSTRA A ATIVAÇÃO/INIBIÇÃO DE POSSÍVEIS E CONHECIDAS PROTEÍNAS EFETUADORAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR E QUE SÃO ATIVADAS PELAS SUBUNIDADES α E $\beta\gamma$ DAS PROTEÍNAS G DISSOCIADAS ENTRE SI E DOS RECEPTORES..	14
FIGURA 6. ESQUEMA ILUSTRATIVO MOSTRANDO A ATIVAÇÃO DA VIA DE PKA POR RECEPTORES GPCRS ATIVADOS POR DIFERENTES AGONISTAS CULMINANDO NA ATIVAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO E/OU DE PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS COM ATIVIDADE DE GEFS.	17
FIGURA 7. ESQUEMA ILUSTRATIVO MOSTRANDO QUE SINAIS EXTRACELULARES TRANSDUZIDOS INTRACELULARMENTE POR GPCRS OU RPTKS PODEM ATIVAR DIFERENTES E DESCONHECIDAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS, CULMINANDO NA ATIVAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO QUE SE LIGAM EM E ATIVAM OS 4 ELEMENTOS REGULATÓRIOS DO PROMOTOR DO PROTO-ONCOGENE C-FOS.....	23
FIGURA 8. ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS FASES DO CICLO CELULAR DE MAMÍFEROS E AS RESPECTIVAS PROTEÍNAS QUE REGULAM POSITIVA (CICLINAS/CDKS) E/OU NEGATIVAMENTE (CKIS) ESTAS FASES. NO LADO ESQUERDO DA FIGURA ESTÃO MOSTRADOS OS MECANISMO DE INIBIÇÃO DO CICLO CELULAR PELAS CKIS.	25
FIGURA 9. ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS EFEITOS ESTEROIDOGÊNICOS (TRÓPICOS) E PROLIFERATIVOS (TRÓFICOS) DESENCADEADOS PELO HORMÔNIO ACTH EM CÉLULAS CORTICADRENALIS ATRAVÉS DO ACTHR.	28
FIGURA 10. ILUSTRAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO GENÔMICA, DO MENSAGEIRO TRANSCRITO E DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DO RECEPTOR DE ACTH DE CAMUNDONGO	30
FIGURA 11. ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ACIONADAS PELO RECEPTOR DE ACTH ENVOLVIDAS NOS EFEITOS DO HORMÔNIO ACTH: PKA É A ÚNICA VIA ATUALMENTE COMPROVADAMENTE ENVOLVIDA ENQUANTO QUE PKC E MAPK SÃO VIAS SOB INVESTIGAÇÃO E MUITO PROVAVELMENTE ENVOLVIDAS.	35
FIGURA 12. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%/BROMETO DE ETÍDEO MOSTRANDO O cDNA DO RECEPTOR DE ACTH AMPLIFICADO E REAMPLIFICADO POR PCR, COM TAMANHO DE ~1000PB. A ESQUERDA DO GEL ESTÁ O MARCADOR DE DNA LAMBDA DIGERIDO COM HIND III/EcoR I.....	82
FIGURA 13. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%/BROMETO DE ETÍDEO DO PLASMÍDEO PMOSBLUE T COM O INSERTO DE cDNA DO ACTHR CLONADO, APÓS DIGESTÃO COM VÁRIOS PARES DE ENZIMAS DE RESTRIÇÃO. COMO CONTROLES SÃO MOSTRADOS O VETOR NÃO DIGERIDO E O MARCADOR DE DNA λ DIGERIDO COM ECO R I/HIND III.	83
FIGURA 14. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1%/BROMETO DE ETÍDEO MOSTRANDO O PLASMÍDEO DE EXPRESSÃO PSVK3 CONTENDO O INSERTO DE cDNA, APÓS DIGESTÃO COM ALGUMAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO, E O VETOR NÃO DIGERIDO COMO CONTROLE. O MARCADOR DE PESO MOLECULAR, DNA λ DIGERIDO COM HIND III/EcoR I, ESTÁ MOSTRADO NO LADO ESQUERDO DO GEL.	84
FIGURA 15. SEQUÊNCIA DO cDNA DO RECEPTOR DE ACTH SUBCLONADO NO VETOR PMOSBLUE T. A REGIÃO QUE COMPREENDE O OLIGONUCLEOTÍDEO DE 18PB ("UPSTREAM PRIMER") USADO INICIALMENTE PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA A PARTIR DA EXTREMIDADE 5' FOI PERDIDA DURANTE A CLONAGEM. NNN - SÍTIO DE POLICLONAGEM DO VETOR PMOSBLUE T; NNN - CÓDONS DE INICIAÇÃO/TERMINAÇÃO DELIMITANDO A REGIÃO CODIFICADORA; NNN – REGIÃO CODIFICADORA DO cDNA DO ACTHR; NNN – REGIÃO COMPLEMENTAR AO "DOWNSTREAM PRIMER"; NNN – REGIÃO DO NOVO "UPSTREAM PRIMER".	85

FIGURA 16 . EXPERIMENTOS DE SOUTHERN BLOT PARA CÉLULAS Y-1 E CLONES TRANSFECTANTES DE AR-1 E 3T3 VERIFICANDO A EFICIÊNCIA DA CO-TRANSFEÇÃO PELA INCORPORAÇÃO DOS VETORES NO DNA GENÔMICO DIGERIDO COM AS ENZIMAS EcoR I/HIND III (A) E EcoR I/XBA I (B).	89
FIGURA 17. EXPERIMENTOS DE RT/PCR MOSTRANDO A EXPRESSÃO DO mRNA DO ACTHR EM CÉLULAS 3T3, AR-1 E Y-1 (A) E CLONES TRANSFECTANTES AR-1 E 3T3 (B E C). EM A, PRIMERS 1, 2 E 3 REFEREM-SE A 3 DIFERENTES PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS QUE GERAM FRAGMENTOS DE TAMANHOS PRÓXIMOS.	90
FIGURA 18. ENSAIO DE PRODUÇÃO DE CAMP OU DE ATIVIDADE DE ADENILATO CICLASE DE CÉLULAS Y-1, AR-1 E CLONES AR-1 EM MEIO DME/10% FCS/50µg/ML G418 ESTIMULADOS COM ACTH ₃₉ , FORSKOLINA E TOXINA DE CÓLERA NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADOS.	92
FIGURA 19. ENSAIO DE PRODUÇÃO DE CAMP OU DE ATIVIDADE DE ADENILATO CICLASE PARA CLONES 3T3 EM MEIO DME/20% FCS/100µg/ML G418 ESTIMULADOS COM ACTH ₃₉ E FORSKOLINA NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADOS.	94
FIGURA 20. CURVAS DE DOSE-RESPOSTA PARA CÉLULAS Y-1 E CLONES AR-1 ACTHR 03 E 3T3 ACTHR 07 CRESCENDO EXPONENCIALMENTE E ESTIMULADOS COM ACTH ₃₉ NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS POR 15MIN E NA PRESENÇA DO PEPTÍDEO COMPETIDOR ACTH ₇₋₃₈ (PONTILHADO) EM DUAS CONCENTRAÇÕES, POR 15MIN.	95
FIGURA 21. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CAMP EM CÉLULAS Y-1 (A) E NO CLONE AR-1 ACTHR 03 (B) ESTIMULADOS COM ACTH ₃₉ 1nM NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SORO.	97
FIGURA 22. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CAMP NOS CLONES 3T3 ACTHR 07 (A) E ACTHR 27(B) ESTIMULADOS COM ACTH ₃₉ 1nM NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE SORO.	98
FIGURA 23. IMUNOCITOQUÍMICA PARA A PROTEÍNA C-MYC DE CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 CARENCIADOS PARA SORO E ESTIMULADOS COM ACTH ₃₉ OU SORO POR 3H NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS.	104
FIGURA 24. "WESTERN BLOT" PARA ERK1,2 FOSFORILADAS EM CÉLULAS Y-1 (A) E CLONES 3T3 (B E C) CARENCIADAS PARA SORO E ESTIMULADAS COM ACTH ₃₉ , CORTICOTROPINA A E FGF2, NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADAS. "WESTERN BLOT" PARA ERK1,2 NÃO FOSFORILADAS ESTÃO MOSTRADOS EM A (MEMBRANA NOVA), B E C (MEMBRANAS REUTILIZADAS).	105
FIGURA 25. "WESTERN BLOT" PARA ERK1,2 FOSFORILADA EM CÉLULAS AR-1 (A) E CLONES DE AR-1 (B) CARENCIADAS PARA SORO E ESTIMULADAS COM ACTH, CORTICOTROPINA A E/OU FGF2 NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADAS. EM (B) O CONTROLE ERK1,2 NÃO FOSFORILADA ESTÁ MOSTRADO PARA O CLONE SVK3 05 EM EXPERIMENTO COM MEMBRANA REUTILIZADA.	106
FIGURA 26. "WESTERN BLOT" PARA ERK1,2 FOSFORILADAS EM CÉLULAS Y-1 (A, C) E CLONES DE 3T3 (B, C) CARENCIADOS PARA SORO E ESTIMULADOS COM ACTH ₃₉ , CORTICOTROPINA A, 8Br-CAMP E/OU FGF2 NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADAS.	107
FIGURA 27. "WESTERN BLOT" PARA JNK FOSFORILADA E TOTAL (MEMBRANAS REUTILIZADAS) EM CÉLULAS Y-1 (A) E CLONES 3T3 (B) CARENCIADAS PARA SORO E ESTIMULADAS COM ACTH ₃₉ , CORTICOTROPINA A E/OU FGF2 NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADAS.	109
FIGURA 28. "WESTERN BLOT" PARA AS PROTEÍNAS CREB/ATF/CREM FOSFORILADAS E NÃO FOSFORILADAS (MEMBRANAS REUTILIZADAS) EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 CARENCIADAS PARA SORO E ESTIMULADAS COM ACTH ₃₉ , CORTICOTROPINA A E/OU FGF NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADOS.	110
FIGURA 29. IMUNOCITOQUÍMICA PARA A PROTEÍNA C-FOS EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 (A) E AR-1 (B) CARENCIADOS PARA SORO E ESTIMULADOS POR 2H COM ACTH, FORSKOLINA, DB-CAMP, SORO E FGF2 NAS CONCENTRAÇÕES INDICADAS. VALORES MÉDIOS DE 3 EXPERIMENTOS ± DESVIO PADRÃO.	111
FIGURA 30. IMUNOCITOQUÍMICA PARA A PROTEÍNA C-FOS EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 CARENCIADOS PARA SORO (A) E EM CRESCIMENTO EXPONENCIAL (B) ESTIMULADOS COM ACTH, PMA, Go6983 E SORO NAS CONCENTRAÇÕES E TEMPOS INDICADOS. AS BARRAS REPRESENTAM VALORES MÉDIOS DE 3 EXPERIMENTOS ± O DESVIO PADRÃO.	113
FIGURA 31. IMUNOCITOQUÍMICA PARA A PROTEÍNA C-FOS EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 CARENCIADOS PARA SORO (A) E ESTIMULADOS COM ACTH, PD98059 E SORO NAS CONCENTRAÇÕES E TEMPOS INDICADOS. AS BARRAS REPRESENTAM VALORES MÉDIOS DE 3 EXPERIMENTOS ± O DESVIO PADRÃO.	114
FIGURA 32. CURVAS DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 (A) E AR-1 (B) EM MEIO DME/10% FCS/100µg/ML G418 ESTIMULADAS OU NÃO COM ACTH 1nM, POR 5 DIAS CONSECUTIVOS.	116
FIGURA 33. ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE H3-TIMIDINA PARA CÉLULAS Y-1 (A) E CLONES 3T3 (B-H) PARA DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE ACTH NA SÍNTESE DE DNA OU ENTRADA NA FASE S DO CICLO CELULAR.	119
FIGURA 34. ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE H3-TIMIDINA PARA CLONES AR-1 (A-F) PARA DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DE ACTH NA SÍNTESE DE DNA OU ENTRADA NA FASE S DO CICLO CELULAR.	120
FIGURA 35. "WESTERN BLOT" PARA Ki-RAS TOTAL E GTP EM CÉLULAS Y-1 CARENCIADAS PARA SORO E ESTIMULADAS COM ACTH ₃₉ , FGF2 E WORTMANINA NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADAS.	122

FIGURA 36. "WESTERN BLOT" PARA AKT FOSFORILADA MOSTRANDO O BASAL APRESENTADO PELAS CÉLULAS Y-1, NA PRESENÇA OU NÃO DE SORO E FGF2, E A REDUÇÃO DOS NÍVEIS BASAIS POR WORTMANINA NOS TEMPOS E CONCENTRAÇÕES INDICADAS.	123
FIGURA 37. "WESTERN BLOT" PARA AKT FOSFORILADA EM CÉLULAS Y-1 CARENCIADAS E TRATADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INIBIDORES DE PI3K, WORTMANINA (A) E LY (B).	124
FIGURA 38. "WESTERN BLOT" MOSTRANDO QUE INIBIDORES DE SRC PP1 E TA47 ELIMINAM OS NÍVEIS BASAIS DE AKT FOSFORILADA, INDEPENDENTE DA PRESENÇA DE ACTH EM CÉLULAS Y-1 CARENCIADAS PARA SORO E TRATADAS COM ACTH ₃₉	125
FIGURA 39. "WESTERN BLOT" PARA AKT FOSFORILADA EM CÉLULAS Y-1 CARENCIADAS E TRATADAS COM ACTH NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TOXINA DE PERTUSSIS.	125
FIGURA 40. "WESTERN BLOT" MOSTRANDO O EFEITO INIBITÓRIO DE ACTH SOBRE AKT ATIVADA, ATRAVÉS DE SUA DESFOSFORILAÇÃO, EM CÉLULAS Y-1 INDEPENDENTE DA PRESENÇA DE SORO NO MEIO.	126
FIGURA 41. "WESTERN BLOT" DE CINÉTICA DE REDUÇÃO DO NÍVEL CONSTITUTIVO DE AKT FOSFORILADA EM CÉLULAS Y-1 CARENCIADAS, POR TRATAMENTOS COM ACTH ₃₉ NA CONCENTRAÇÃO E TEMPOS INDICADOS.	127
FIGURA 42. "WESTERN BLOT" MOSTRANDO O BLOQUEIO DO EFEITO INIBITÓRIO DE ACTH ₁₋₃₉ SOBRE AKT FOSFORILADA, PELO PEPTÍDEO COMPETIDOR ACTH ₇₋₃₈ , EM CÉLULAS Y-1 CARENCIADAS.	127
FIGURA 43. "WESTERN BLOT" MOSTRANDO ATIVADORES DA VIA DE PKA QUE MIMETIZAM OS EFEITOS INIBITÓRIOS DE ACTH SOBRE AKT ATIVADA. A) TOXINA DE CÓLERA (CTX), ATIVADOR DE PROTEÍNA G α ; B) FORSKOLINA (FK), ATIVADOR DE ADENILATO CICLASE; C) 8BR-cAMP (8Br), ATIVADOR DE PKA.	128
FIGURA 44. A) "WESTERN BLOT" MOSTRANDO A INIBIÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DE ACTH SOBRE AKT FOSFORILADA EM CÉLULAS Y-1 PELO INIBIDOR ESPECÍFICO DE PKA H89. B) "WESTERN BLOT" PARA AKT FOSFORILADA EM UM CLONE Y-1 PKA ⁻ MOSTRANDO QUE ACTH NÃO REDUZ OS NÍVEIS CONSTITUTIVOS DE AKT ATIVADA.	129
FIGURA 45. A E B) "WESTERNS BLOT" MOSTRANDO QUE INIBIDORES DE PKC NÃO BLOQUEIAM O EFEITO INIBITÓRIO DE ACTH SOBRE AKT FOSFORILADA EM Y-1. C) "WESTERN BLOT" MOSTRANDO QUE O INIBIDOR DE MEK-1 NÃO BLOQUEIA O EFEITO INIBITÓRIO DE ACTH SOBRE AKT FOSFORILADA EM CÉLULAS Y-1.	130
FIGURA 46. "WESTERN BLOT" MOSTRANDO O EFEITO DE AGENTES MITOGÊNICOS NA ATIVAÇÃO DE AKT EM CLONES DE FIBROBLASTOS 3T3 E A AUSÊNCIA DOS EFEITOS DE ACTH NA REGULAÇÃO DE AKT.	131
FIGURA 47. "WESTERN BLOT" MOSTRANDO O EFEITO DE AGENTES MITOGÊNICOS NA ATIVAÇÃO DE AKT EM CLONES DE AR-1 E AUSÊNCIA DOS EFEITOS DE ACTH NA REGULAÇÃO DE AKT.	131
FIGURA 48. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA MOLECULAR BIDIMENSIONAL DO RECEPTOR DE ACTH OBTIDA POR PROGRAMAS DE MODELAGEM MOLECULAR MOSTRANDO AS ALÇAS INTRA E EXTRACELULARES, AS REGIÕES DE α -HÉLICES TRANSMEMBRANARES E OS PROVÁVEIS SÍTIOS DE MODIFICAÇÃO PÓS-TRADUCIONAL (FORTI, OYAMA & ARMELIN, RESULTADOS NÃO PUBLICADOS).	135
FIGURA 49. ESQUEMA ILUSTRATIVO MOSTRANDO AS ATUAIS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL (PKA, PKC E MAPK) E COMUNICAÇÕES ENTRE VIAS (ERK1,2→ATF1/CREM1; JNK2→ATF1/CREM1; JNK2→TCF) ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE AÇÃO DE ACTH PARA ATIVAÇÃO DO GENE C-FOS, COMO PARTE DOS EFEITOS MITOGÊNICOS PROMOVIDOS PELO HORMÔNIO. O ESQUEMA TAMBÉM SUGERE PROVÁVEIS INTERAÇÕES DE VIAS (PKA→RAF1; AC→EPAC; RAP1→RAS/RAF1; $\beta\gamma$ →JNK2; $\beta\gamma$ →RHOA; PKC→RHOA) ENVOLVIDAS NOS EFEITOS DE ACTH EM CÉLULAS ADRENAIS Y-1.	140
FIGURA 50. ESQUEMA ILUSTRATIVO MOSTRANDO AS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL QUE CONTRIBUEM PARA O MECANISMO DE AÇÃO DE ACTH EM CÉLULAS ADRENAIS Y-1 ASSIM DESCRITO: "ACTH SE LIGA AO ACTHR QUE ATIVA GS, CUJA GS α ATIVA A ADENILATO CICLASE A PRODUZIR cAMP. cAMP ATIVA PKA QUE DEVE ESTAR ATIVANDO UMA FOSFATASE INIBIDORA DE AKT ATIVADA, POR DESFOSFORILAÇÃO. OS NÍVEIS CONSTITUTIVOS DE AKT ATIVADA, POR SUA VEZ, SÃO MANTIDOS POR RAS-GTP E OU SRC, ATRAVÉS DA ATIVAÇÃO DE PI3K. AO SER INIBIDA, AKT DEIXA DE INIBIR, POR FOSFORILAÇÃO, OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA DOS "FORKHEAD" (AFX/FKHR) (QUE SE DISSOCIAM DA PROTEÍNA ADAPTADORA 14-3-3 NO CITOPLASMA E MIGRAM PARA O NÚCLEO), LIGANDO-SE ENTÃO A ELEMENTOS PROMOTORES DE VÁRIOS GENES, DENTRE ESTES O DE P27 ^{KIP1} , CUJA TRANSCRIÇÃO É AUMENTADA (E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TAMBÉM). UMA VEZ NO CITOPLASMA, P27 ^{KIP1} INIBE A ATIVIDADE DE COMPLEXOS CICLINA/Cdk BLOQUEANDO O CICLO CELULAR. O ESQUEMA TAMBÉM SUGERE PROVÁVEIS VIAS E COMUNICAÇÕES ENTRE VIAS QUE PODEM ESTAR MEDIANDO E CONTRIBUINDO PARA OS EFEITOS ANTI-MITOGÊNICOS DE ACTH NESTAS CÉLULAS.	148

LISTA DE TABELAS

TABELA I. RENDIMENTO DE COLÔNIAS E CLONES COLETADOS A PARTIR DE 5 CO-TRANSFEÇÕES INDEPENDENTES COM OS VETORES PSV2-NEO, PSVK3 E PSVACTHR.	87
TABELA II. CLONES DE CÉLULAS 3T3 E AR-1 ISOLADOS DAS CO-TRANSFEÇÕES MOSTRADAS NA TABELA I E ANALISADOS NOS EXPERIMENTOS SUBSEQUENTES.	88
TABELA III. EFEITOS DE ACTH E SORO (2H DE TRATAMENTO) NA INDUÇÃO DA PROTEÍNA C-FOS EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 E AR-1 ACTHR.	101
TABELA IV. RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE CAMP (FIGURAS 18 E 19) E ATIVAÇÃO DE C-FOS (TABELA III) MOSTRANDO QUE NÃO HÁ CORRELAÇÃO ENTRE ESTES EFEITOS PROMOVIDOS POR ACTH (TRATAMENTOS DE 30MIN) NOS CLONES DE FIBROBLASTOS EXPRESSANDO O ACTHR.	102
TABELA V. EFEITOS DE ACTH E SORO (2H DE TRATAMENTO) NA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DAS FAMÍLIAS FOS E JUN EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 ACTHR.	103

RESUMO

O hormônio adrenocorticotrópico, ACTH, regula a função (esteroidogênese) e a proliferação das células da córtex das glândulas adrenais através de um único receptor específico, ACTHR, que pertence à superfamília GPCR (G-protein coupled receptors). Embora o ACTHR tenha sido clonado há 8 anos, os mecanismos moleculares das ações mitogênica e anti-mitogênica de ACTH permanecem obscuros, cuja elucidação é objeto de estudo deste trabalho.

A abordagem experimental consistiu na clonagem do ACTHR de células adrenocorticais Y-1 de camundongo e expressão funcional em fibroblastos 3T3 e células AR-1. Clones transfectantes, expressando estavelmente ACTHR, mostraram-se responsivos a ACTH através de: a) ativação de adenilato ciclase e b) indução de genes das famílias fos e jun. Por outro lado, medidas de síntese de DNA e proliferação celular indicam que ACTH não tem nenhum efeito mitogênico ou anti-mitogênico nos transfectantes ACTHR.

O gene c-fos foi usado como alvo para testar vias de transdução de sinal ativadas por ACTH nos transfectantes 3T3 ACTHR. Estes testes mostraram que PKA, PKC e MAPK tem pouca ou nenhuma participação na indução de c-fos por ACTH nos clones 3T3 ACTHR, sugerindo que ACTHR pode ativar vias ainda não identificadas e motivando a busca de novas vias ativadas por ACTH nas células Y-1.

Verificou-se que células Y-1 apresentam níveis constitutivamente elevados de AKT/PKB ativada (fosforilada), dependentes de PI3K e SRC, e que ACTH promove rápida desfosforilação de AKT via Gs/Adenilato Ciclase/cAMP/PKA. Ao promover a inativação de AKT, ACTH promove simultaneamente a indução da proteína p27^{Kip1}, um mecanismo que contribui para a atividade anti-mitogênica de ACTH.

ABSTRACT

The adrenocorticotrophic hormone, ACTH, regulates both function and proliferation of adrenocortical cells binding to a specific receptor, ACTHR, which belongs to superfamily of GPCR (G-protein coupled receptors). ACTHR was cloned a few years ago, but the molecular mechanisms underlying the mitogenic and anti-mitogenic actions of ACTH remain unknown, whose elucidation is aim of this project.

The experimental approach was to clone the ACTHR from mouse Y-1 adrenocortical cells and to express the functional receptor in Balb 3T3 fibroblasts and AR-1 cells. Transfectant clones stably expressing the ACTHR respond to ACTH treatments by: a) adenylate cyclase activation and b) induction of fos and jun genes. On the other hand, experiments of DNA synthesis and cellular proliferation showed that ACTH has not mitogenic or anti-mitogenic effects in ACTHR transfectants.

c-fos gene was used as a target to test signal transduction pathways activated by ACTH into 3T3 ACTHR transfectants. The results showed that PKA, PKC and MAPK have no relevant contribution on the ACTH c-fos induction in 3T3 ACTHR transfectants suggesting that ACTHR can activate signal transduction pathways still not identified. This conclusion prompted us to search for another signal transduction pathways triggered by ACTHR in Y-1 adrenocortical cells.

This search led to the detection of high constitutive levels of activated AKT/PKB in Y-1 adrenocortical cells, which are dependent on PI3K and SRC. ACTH causes a strong and rapid downregulation of activated AKT in a Gs/Adenylate Cyclase/cAMP/PKA dependent manner. Apparently, dephosphorylation of AKT promoted by ACTH releases transcription factors that induce p27^{Kip1}, a likely mechanism underlying ACTH anti-mitogenic effects in adrenocortical cells.

I. INTRODUÇÃO

I.1 - O DESENVOLVIMENTO CELULAR EUCARIÓTICO

Se uma célula deve viver ou morrer depende de ações externas tais como hormônios, fatores de crescimento solúveis, contato com outras células vizinhas, aderência à componentes da matriz extracelular e/ou de ações internas como mutações e mecanismos intrácrinos. Tais ações são responsáveis pelo desenvolvimento ou não das células, processos complexos envolvendo multicomponentes e multietapas que resultam em um dos seguintes fenômenos: proliferação; diferenciação, senescência; quiescência ou apoptose.

Para a maior parte destes processos a divisão celular é essencial e compreende a duplicação do material genético e divisão dos componentes citoplasmáticos, resultando em duas células filhas com o mesmo conteúdo genético original. Estes eventos constituem o fenômeno do ciclo celular, que é dividido em 4 fases, a saber em ordem cronológica: fase G1, intervalo de tempo variável compreendido entre a mitose propriamente dita (M) e a síntese de DNA (S), respectivamente, onde os processos de transcrição e tradução se mantêm; fase S, período de tempo igual ou inferior a G1 onde ocorre a síntese, replicação ou duplicação do DNA; fase G2, intervalo de tempo inferior a G1 e S, compreendido entre a síntese de DNA (S) e a mitose, respectivamente, onde as células apresentam cromossomos duplicados; fase M, intervalo muito curto de tempo onde ocorre a divisão celular propriamente dita ou mitose (M), levando à formação de duas células filhas (Figura 8). Estas quatro fases podem se repetir, como num ciclo, indefinidamente, constituindo o ciclo celular (Figura 8).

O funcionamento adequado do ciclo celular de organismos eucaróticos é feito regulando-se transições de fases ou fases específicas do ciclo celular (**Murray, 1994; O'Connell & Nurse, 1994**). A regulação mais importante é realizada na transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$, onde G_0 refere-se a um local (ou “subfase”) embutido na fase G_1 , por onde todas as células permanecem na ausência de estímulos mitogênicos, antes de ingressar em um novo ciclo e uma nova mitose. Após deixar G_0 , as células ainda passam pelo ponto de restrição R, que é um momento crítico do ciclo dentro de G_1 e próximo de S, que operacionalmente separa o ciclo celular num período dependente de fatores mitogênicos e outro período, autônomo e independente de mitógenos, que compreende a entrada na fase S e chegada até a divisão celular. Uma vez que a célula deixa o ponto R ela estará necessariamente comprometida com a síntese de DNA e outra volta no ciclo celular (Figura 8) Outro ponto de regulação do ciclo celular menos importante ocorre durante a fase G_2 , onde a célula dispõe de mecanismos que identificam o encerramento e a qualidade da duplicação do DNA, podendo ocorrer reparos em casos de erros. (**Pardee, 1989; Gudas et al, 1994; Lewin, 1990; Larsson et al, 1989; Reddy, 1994**).

Sinais extracelulares de agentes mitogênicos, como fatores de crescimento ou hormônios, são importantes para a progressão das células no ciclo celular através de G_0 . Estes sinais são transportados até o núcleo das células pela ativação de vias de sinalização intracelulares (**Hunter, 1997**). Como principal consequência, há a transcrição de genes de resposta primária, num processo independente de síntese protéica, cujas proteínas produzidas parecem garantir o padrão de expressão diferencial de outros genes (de resposta secundária), necessários para que a célula transite ao longo do ciclo celular (**Herschman, 1991**). Exemplos

mais conhecidos destes genes de resposta primária são os proto-oncogenes das famílias fos (**Greenberg & Ziff, 1984**) e jun (**Ryder & Nathans, 1988**) e o proto-oncogene c-myc (**Kelly et al., 1983**).

Os fatores de crescimento são fatores polipeptídicos, produzidos e secretados por determinadas células, que possuem ação autócrina e/ou parácrina na proliferação e/ou diferenciação de células vizinhas, pertencentes a tecidos iguais ou diferentes, ou de células vizinhas em diferentes zonas de diferenciação (**Armelin, 1973; Stiles, 1984**). Como exemplos mais importantes pode-se citar o FGF (fibroblast growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), IGF (insulin growth factor), EGF (epidermal growth factor), TGF (transforming growth factor), NGF (nerve growth factor) e GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) (**Sporn & Roberts, 1988; Folkman & Klagsbrun, 1987; Aaronson, 1991; Feige et al, 1998; Scweppe et al, 1997**).

Dentre os hormônios mitogênicos, que são peptídeos produzidos por glândulas endócrinas e têm efeitos no crescimento e/ou manutenção de tecidos alvo especializados, destacam-se o hormônio de crescimento ou GH (growth hormone), a insulina, a angiotensina e a adrenocorticotropina ou ACTH (adrenocorticotropic hormone) (**Vanderkuur et al, 1997; Tian et al, 1998; Lotfi et al, 1997**).

I.2 - FATORES EXTRACELULARES X VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULARES

Tanto os fatores peptídicos de crescimento como os hormônios peptídicos mitogênicos, tem como mecanismos de ação a ativação de vias sinalizadoras intracelulares através da ligação inicial a um receptor de membrana. Duas classes principais de receptores de membrana estão envolvidas na ligação destes fatores e

hormônios, bem como de outras substâncias com funções biológicas diversas: 1^a) os receptores protéicos de tirosina-quinase (RPTK), e 2^a) os receptores acoplados a proteínas G triméricas (GPCR). Estes receptores normalmente iniciam uma ou várias sequências de reações bioquímicas efetuadas por interações do tipo proteína-proteína, que chegam a transduzir o sinal até o núcleo, onde normalmente a última reação é uma interação do tipo proteína-ácido nucléico, resultando em alteração de expressão gênica e consequente alteração fenotípica celular (**Cooper et al, 1997**).

1.2.1 - RECEPTORES COM ATIVIDADE DE TIROSINA QUINASE (RPTK)

Pertencem a esta classe os receptores de insulina, IGF, EGF, FGF e PDGF, bem como outros menos destacados. Esta classe de receptores possui: 1) um ou mais domínios extracelulares do tipo imunoglobulinas ou domínios ricos em cisteína no N-terminal (**Miyazawa et al, 1998**), que possuem sítios de glicosilação, responsáveis pela ligação do fator de crescimento; 2) um domínio transmembranar hidrofóbico formado por uma única α -hélice e 3) no C-terminal citoplasmático, domínios catalíticos, com atividade intrínseca de tirosina quinase, e regulatórios, que contém múltiplos sítios de autofosforilação (**Fantl et al, 1993; Pawson, 1988**).

Na maioria dos casos, a ligação do agonista leva a dimerização de duas moléculas de receptor, as quais reconhecem e fosforilam resíduos de tirosina nos domínios citoplasmáticos do C-terminal uma da outra (**Pawson & Schlessinger, 1988**). Uma vez fosforiladas, as tirosinas são reconhecidas por domínios SH2 (Src homology 2) de proteínas adaptadoras conhecidas como GRB2, que reconhecem e ativam outras proteínas conhecidas como SOS (son of sevenless) através de seus

domínios SH3 (Src homology 3), que por sua vez ativam proteínas pertencentes e comuns a várias vias de sinalização, como Ras e outros membros de sua família, como Rap, Gal, Rac, Cdc42 e Rho (Figura 1). Ras é uma destas proteínas ativadas por RPTKs considerada das mais importantes no controle do desenvolvimento celular (McCormick, 1993; Denhardt, 1996).

Figura 1. Esquema ilustrativo do mecanismo de transdução de sinal disparado por agentes mitogênicos que se ligam a receptores de proteína tirosina quinases de membrana e ativam a vias das GTPases da família de Ras, que por sua vez regulam diversos processos celulares importantes. Abreviaturas: AP= adaptor protein; GEF= guanine-nucleotide exchange factor

Ras, também conhecida como p21^{ras}, pertence a uma grande família de pequenas proteínas (21kDa) com atividade GTPásica, pois ligam GDP no estado inativo e GTP no estado ativado. São conhecidos 3 genes codificando proteínas Ras: H-Ras (Harvey/Ha-ras), K-ras (Kirsten/Ki-ras) e N-ras. Uma vez ativadas por

fatores de crescimento ou hormônios peptídicos, as proteínas Ras podem ativar outras proteínas efetadoras e iniciar uma ou várias sequências de reações de interação proteína-proteína, as conhecidas cascatas de fosforilação ou de transdução de sinal, culminando em eventos nucleares ao nível de transcrição gênica (**Barbacid, 1987; Bos & Burgering, 1995; McMahon et al, 1997**).

I.2.1.1 - VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ACIONADAS POR RPTKs

I.2.1.1.1 - VIA DAS MAPK

A via das MAPK (mitogenic activating protein kinases) é constituída por várias proteínas, que possuem atividade de serina/treonina quinases, constituindo conjuntos de proteínas diferentes, cada um dos quais sendo considerado como uma cascata de quinases, mas que possuem funções biológicas relacionadas entre si e principalmente com a proliferação e diferenciação celular (**Hunter & Karin, 1992**). Os três conjuntos de quinases mais importantes, classificados como MAPK, são ativados por diferentes estímulos extracelulares, provocados ou não por fatores de crescimento ou hormônios que se ligam a RPTKs, e culminam na ativação por fosforilação de três proteínas que dão nome às três diferentes vias por serem as últimas quinases de cada via: 1ª) ERK 1 e 2, (extracellular signal regulated kinase); 2ª) JNK 1, 2 e 3 (JUN N-terminal kinase) ou SAPK (stress activated protein kinase); 3ª) p38 kinase ou RK (reactivating kinase).

Estas três vias podem ser ativadas, por exemplo, pela proteína Ras que se liga e ativa proteínas quinases homólogas (isoenzimas) de cada uma das vias citadas, iniciando uma sequência de reações de fosforilação através de interações proteína quinase-proteína quinase culminando na fosforilação das últimas proteínas quinases de cada via. Estas últimas, por sua vez, migram para o núcleo com a

finalidade de ativar proteínas com atividade de fatores de transcrição (FT) ou então ativam proteínas citoplasmáticas conhecidas como MAPKAPK (mitogen-activated protein kinase activated protein kinase), as quais podem promover ativação por fosforilação de outras proteínas citoplasmáticas ou nucleares com atividades metabólicas regulatórias. (Inglese et al, 1995). FT são proteínas nucleares que possuem domínios catalíticos básicos e/ou carregados positivamente para ligação ao DNA, bem como domínios regulatórios de interação com quinases. As principais proteínas fatores de transcrição ativadas pelas quinases JNK, ERK ou p38 são conhecidas também como TCFs (ternary complex factors) e incluem: SRF (serum response factor), Elk-1 (Ets-like transcription factors), SAP-1 (SRF accessory protein 1 or stress activating protein 1), ATF-2 (activating transcription factor 2), c-MYC e CREB (CRE binding protein) (Figura 2).

Figura 2. Esquema ilustrativo da ativação da via das MAPKs por agentes mitogênicos, mediada por Ras/Rac/Cdc42, que finaliza com a ativação de fatores de transcrição nucleares comuns ou não às 3 isoformas de MAPK (ERK, JNK e p38).

Muitos fatores de transcrição são produtos de genes de resposta primária, como os genes das famílias fos e jun e o gene c-myc citados anteriormente, ou seja, possuem transcrição inicial independente de síntese protéica e são necessários para a transcrição de outros genes. Através de seus domínios ligadores de DNA, as proteínas fatores de transcrição ligam-se a determinadas sequências de nucleotídeos em elementos promotores de certos genes promovendo um recrutamento do complexo basal de transcrição ou um impedimento de transcrição pelo mesmo havendo, portanto, regulação de expressão gênica.

I.2.1.1.2 - VIA DE PI3K e AKT/PKB

Esta via de transdução de sinal têm sido muito estudada ultimamente por estar envolvida com apoptose, proliferação celular, rearranjos de citoesqueleto, controle metabólico e tráfego de vesículas. É uma via de sinalização intracelular ativada por fatores de crescimento, como PDGF, e hormônios peptídicos, como insulina, que também é mediada e iniciada pela proteína Ras (**Feig, 1993**).

Ras ativa PI3K (phosphoinositide 3-kinase), uma quinase que fosforila lipídeos de membrana (fosfatidil-inositol 3-fosfato, PIP₃) que por sua vez recrutam, por exemplo, a proteína quinase B (PKB) ou AKT através da ligação ao domínio PH (pleckstrin homology) específico (Figura 3). Proteínas serina/treonina quinases conhecidas como PDKs (phosphoinositide dependent kinases) e ILKs (integrin linked kinases) reconhecem e ativam AKT por fosforilação quando ainda na membrana.

Uma vez ativada, a serina/treonina quinase AKT pode atuar, por exemplo, sobre alguns substratos principais promovendo: a) inibição da proteína Bad levando a aumentos das proteínas da família de Bcl no estado ativado, as quais possuem função anti-apoptótica; b) inibição da proteína Caspase-9, cuja atividade proteolítica

é ativada em estados de apoptose; c) ativação da sintase de NO em células endoteliais de artéria, aumentando os níveis de NO envolvidos com relaxação muscular e diminuição da pressão arterial; d) ativação da proteína $IKK\alpha$ que inibe $I\kappa B$ provocando a liberação de fatores de transcrição $NF\kappa B$, responsáveis pela indução de genes de resposta secundária envolvidos em ciclo celular, como por exemplo ciclina D1 (Joyce et al, 1999); e) ativação de glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) e, f) inibição de fatores de transcrição da família dos forkhead, como a proteína Fas-L por exemplo, devido a sua fosforilação promovendo associação com proteínas 14-3-3 e retenção no citoplasma (Brunet et al, 1999), levando a uma diminuição da expressão de proteínas envolvidas com ciclo celular, como por exemplo a proteína p27 (Medema et al, 2000), que atua como inibidora de complexos ciclina/CDK (Figura 3) (Khwaja, 1999).

Figura 3. Esquema ilustrativo da ativação, mediada por Ras, da via de PI3K/PKB por fatores de sobrevivência e dos possíveis e conhecidos substratos de PKB que controlam o desenvolvimento celular em diversos níveis e situações.

I.2.1.1.3 - VIA DE PKC

Após a ligação de fatores extracelulares e consequente auto-ativação, RPTKs podem se ligar e ativar as proteínas de membrana conhecidas como PLC γ (phospholipase C) (**Nishizuka, 1984**), através de domínios SH2 e SH3 desta última (**Pawson & Schlessinger, 1988**). PLC γ , no estado ativado, degrada fosfolipídeos de membrana (fosfatidilserina, fosfatidilcolina, ácido fosfatídico e outros), produzindo 2^{os} mensageiros intracelulares como DAG (diacilglicerol) e IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfato), o qual por sua vez se liga em receptores específicos no retículo endoplasmático (RE) promovendo a liberação de Ca⁺² destes depósitos intracelulares. Tanto DAG como Ca⁺² são mensageiros que ativam uma classe de proteínas conhecidas como PKC (protein kinase C ou proteína quinase dependente de Ca⁺²), ligando-se à domínios regulatórios específicos (**Nishizuka, 1988**). Cerca de doze isoformas de PKC tem sido descritas e podem ser ativadas diferencialmente por DAG na membrana plasmática, por Ca⁺² no citoplasma, por estes dois mensageiros simultaneamente na membrana plasmática ou por outras proteínas que apresentam domínios que mimetizam os efeitos de DAG e Ca⁺² (**Blumberg, 1988**). Uma vez ativada, PKC, que tem atividade de serina/treonina quinase, pode regular por fosforilação diversos substratos enzimáticos diferentes pertencentes a vias sinalizadoras que controlam o desenvolvimento celular (Figura 4) (**Nishizuka, 1992**).

Figura 4. Esquema ilustrativo da ativação da via de PKC por receptores de proteína tirosina quinase estimulados por agentes mitogênicos, através da ativação prévia de PLC γ .

I.2.2 - RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS (GPCR)

Esta classe de receptores, também conhecidos como de sete-hélices ou de serpentina, é formada por uma superfamília de mais de 1000 membros, dividida em subfamílias de acordo com as diferentes classes de ligantes, os quais não são todos conhecidos. Estes receptores possuem sete domínios transmembranares hidrofóbicos do tipo α -hélice conectando três alças e o N-terminal extracelulares à três alças intracelulares e o C-terminal citoplasmático. Muitos resíduos hidrofóbicos das regiões transmembranares, bem como resíduos hidrofílicos das alças extra e intracelulares são conservados em quase todos os membros da superfamília, sendo adotados como características quase que intrínsecas desta classe de receptores (Figura 5) (Kilpatrick et al, 1999).

A grande maioria dos hormônios peptídicos, moléculas odorantes, moléculas gustativas, opióides, estímulos luminosos e outras substâncias exercem seus efeitos intracelulares através da ligação a um receptor específico pertencente a classe dos GPCRs (**Gutkind, 1998**). A ligação dos agonistas pode se dar com as alças extracelulares hidrofílicas, que ainda contém sítios de glicosilação conservados, ou com as próprias regiões iniciais dos domínios transmembranares hidrofóbicos, sendo que o tipo de ligante irá determinar esta especificidade (**Coughlin, 1994**).

Até pouco tempo atrás apenas os receptores de bacteriorodopsina e da rodopsina bovina, que pertencem a esta classe, tinham estrutura bidimensional de baixa resolução determinada por difração de raios X (cristalografia), ressonância magnética nuclear (RMN) e modelagem molecular possibilitando, assim, que outros receptores pudessem ser estudados por comparação e alinhamento de estruturas (**Schertler & Hargrave, 1995**). As grandes dificuldades estruturais nestes estudos residem: na obtenção de proteínas isoladas da membrana celular para que possam ser cristalizadas; na grande mobilidade espacial das alças intra e extracelulares nos respectivos ambientes; na própria interação destas proteínas com membranas celulares, que apresentam variações na composição lipídica; na falta de “softwares” que consigam considerar todas as variáveis de um ambiente celular para serem aplicados na dinâmica molecular; etc.. Entretanto, recentemente, um modelo molecular tridimensional de alta resolução obtido a partir de dados cristalográficos para o GPCR rodopsina bovina foi publicado (**Palczewski et al, 2000**) e está revelando significativas mudanças nos inúmeros modelos anteriormente propostos e,

certamente, será o modelo experimental tido como padrão estrutural e como a referência futura para outros GPCRs desta superfamília.

Esta classe de receptores transduzem intracelularmente o sinal do agonista por interações da 2^a, 3^a alça intracelular e ou do C-terminal com uma classe de proteínas ligadoras de GTP, que possuem atividade GTPásica e conhecidas como proteínas G, daí o nome de receptores acoplados a proteínas G ou GPCRs (**Bourne, 1997**). Do modelo da rodospina cristalizado por Palczewski, pode-se notar, agora, que estes domínios citoplasmáticos dos GPCRs (principalmente a chamada α -hélice VIII, posicionada quase que paralela a bicamada lipídica e perpendicularmente as outras 7 α -hélices) são capazes de se associar simultaneamente com o C-terminal das subunidades α e γ da proteína G para ativá-la. Estas últimas, também conhecidas com G heterotriméricas, são formadas por três subunidades: α ($G\alpha$), de 45-47kDa, que possui uma miristoilação para inserção na membrana, é a responsável pela ligação de GTP no estado ativado com consequente dissociação das outras duas subunidades e, ao hidrolizá-lo a GDP retorna ao estado inativado; β ($G\beta$), de ~35kDa, está constantemente ligada a $G\gamma$ por interações salinas e hidrofóbicas e pode deslocar o complexo ao longo da membrana e até mesmo para o citoplasma, a fim de ativar proteínas efetoras da sinalização; e γ ($G\gamma$), de 7-9kDa, que possui uma palmitoilação para inserção na membrana e para manter $G\beta$ junto da mesma a fim de restaurar o estado trimérico inativo (Figura 5) (**Neer, 1995**).

As proteínas G no estado dissociado, permitem que a subunidade $G\alpha$ -GTP se ligue e ative proteínas efetoras, dentre as quais a adenilato ciclase (AC), que constitui a classe mais importante. A família de AC é composta por nove membros com alta homologia, porém de expressão tecidual diferencial, que atuam como

efetores específicos de determinados GPCRs na conversão específica e com alta afinidade de ATP em AMP cíclico (AMPc ou cAMP), o primeiro 2º mensageiro a ser descoberto (**Sutherland & Rall, 1957 & 1958**). cAMP é de extrema importância em muitos processos de sinalização específicos ou mesmo do metabolismo energético intermediário. As AC possuem domínios regulatórios e catalíticos para ligação de Mg^{+2} ; ATP e a subunidade $G\alpha$ -GTP e também onze domínios de α -hélice transmembranares garantindo sua inserção junto à membrana (**Hurley, 1999**). Os níveis de cAMP intracelulares são garantidos por outra proteína responsável pela degradação de cAMP em AMP por hidrólise, as fosfodiesterases de cAMP ou PDE (Figura 5).

Figura 5. Esquema ilustrativo da transdução de sinal por receptores acoplados a proteínas G quando ativados por diferentes agonistas. O esquema também mostra a ativação/inibição de possíveis e conhecidas proteínas efetoras de sinalização intracelular e que são ativadas pelas subunidades α e $\beta\gamma$ das proteínas G dissociadas entre si e dos receptores.

Atualmente as proteínas G são classificadas principalmente como: Gs, que estimulam a adenilato ciclase; Gi, que inibem a adenilato ciclase; Gq, que estimula outra proteína efetadora de membrana, as fosfolipases (PLC β), que hidrolisam fosfolipídeos de membrana gerando outros tipos de 2º mensageiros; Go/Gi, que regulam abertura/fechamento de canais de K⁺, Ca⁺² e Na⁺ e ativam a tirosina quinase não receptora Src; G11/G12, cujas proteínas efetadoras ainda não são totalmente conhecidas; Golf, ativadas por moléculas odorantes e ativam adenilato ciclase; Gt, ativadas pela luz e cujos efetores são fosfodiesterases de cGMP. Todas estas classes de proteínas G são reguladas por proteínas RGS (regulators of G protein signaling) e possuem estímulos ativadores, proteínas efetadoras, localização tecidual e efeitos muito diversos, que tem aumentado assustadoramente, uma vez que um número crescente de novos GPCRs tem sido descobertos (Figura 5). Entretanto, comparando-se com o número de GPCRs descritos, as proteínas G estão em número muito inferior, atribuindo-se assim, uma promiscuidade de interação destas últimas com os primeiros (**Berman & Gilman, 1998**).

I.2.2.1 - VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL ACIONADAS POR GPCRs

I.2.2.1.1 - VIA DE PKA

A ligação de hormônios a seus respectivos receptores (GPCRs) leva a ativação de G α e consequente dissociação do complexo receptor-hormônio e das subunidades G $\beta\gamma$ nas proteínas G (**Spaulding, 1993**). A subunidade G α , por sua vez ativa proteínas efetoras como adenilato ciclase promovendo aumentos de cAMP intracelular. Quando moléculas de cAMP ligam-se à proteína PKA (protein kinase A or cAMP dependent protein kinase) esta torna-se ativada (**Francis and Corbin,**

1994). PKA é formada por duas subunidades catalítica ($C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$), de 38kDa, ligadas às duas subunidades regulatórias (R, RI, RII), de 45-49kDa, formando o complexo tetramérico R_2C_2 no estado inativo (**Uhler & McKnight, 1987**). A ligação de duas moléculas de cAMP em cada uma das subunidades R promove sua dissociação das subunidades C, que por sua vez tem atividade de serina/treonina quinase. Os dois monômeros C ativos fosforilam sequências consenso ou motivos específicos de proteínas nucleares e/ou citoplasmáticas (Figura 6) (**Gonzalez & Montminy, 1989**). A maior parte das subunidades C ativadas se dirige para o núcleo onde fosforilam resíduos de serina das proteínas CREB (CRE binding protein), CREM (CRE modulator protein) e/ou ATF (activating transcription factors), fatores de transcrição que se dimerizam para reconhecer e se ligar a elementos CRE (cAMP responsive element), em promotores de vários genes, como os de resposta primária das famílias fos e jun ou o de resposta secundária de ciclina D1 (**Hagiwara et al, 1993; Muller & Sewing, 1994**). Recentemente foram descritas outras proteínas que ligam o cAMP intracelular produzido além de PKA. As proteínas cAMP-GEF (guanine nucleotide exchange factors) ou Epac são ativadoras das proteínas Rap1, que são GTPases da família de Ras e que tem funções biológicas importantes no controle da proliferação e diferenciação celular, também tem domínios de ligação de cAMP e tem atividade regulada por este nucleotídeo cíclico (Figura 6) (**de Rooij et al, 1998**).

Figura 6. Esquema ilustrativo mostrando a ativação da via de PKA por receptores GPCRs ativadas por diferentes agonistas culminando na ativação de fatores de transcrição e/ou de proteínas citoplasmáticas com atividade de GEFs.

I.2.2.1.2 - VIA DE PKC

Quando estimulados, RPTKs podem ativar PKCs através de PLC γ e, do mesmo modo, GPCRs também podem ativar PKCs, porém através das isoformas PLC α e PLC β (Koch et al, 1994). As subunidades G α -GTP dissociadas podem se ligar e ativar PLC β enquanto que as subunidades G $\beta\gamma$ dissociadas são capazes de ligar e ativar PLC α . PLC α e β , no estado ativado, também promovem a degradação de fosfolípidos de membrana produzindo os 2^{os} mensageiros DAG, IP₃ e, consequentemente, Ca⁺², os quais ativam diferentes isoformas de PKC, que produzem efeitos regulatórios peculiares (Figura 5) (Clemens et al, 1992).

I.2.3 - COMUNICAÇÃO ENTRE AS VIAS SINALIZADORAS ATIVADAS POR GPCRs x RTKs

As principais vias de transdução de sinal acionadas por alguns hormônios peptídicos que se ligam a GPCRs em tecidos especializados, para exercer seus efeitos fisiológicos, podem interagir dinamicamente com outras e convergir para regulação de transcrição gênica (**Daub et al, 1996**). Recentemente descritos possuírem ação mitogênica e de sinalização intracelular pouco conhecida, os hormônios gastrina, colecistoquinina, prostaciclina, endotelina, bombesina e vasopressina atuam se ligando a GPCRs específicos. Uma vez ativado, estes GPCRs podem promover a interação de vias de transdução de sinal acionadas por fatores de crescimento, os quais se ligam à classe dos receptores de tirosina quinase (RPTK) (**Luttrell et al, 1999; Gutkind, 1998**). Os efeitos mitogênicos ou antimitogênicos destes hormônios peptídicos tem sido relacionados ao envolvimento das cascatas de fosforilação de MAPK (ERK 1/2, JNK e p38), que podem ser ativadas diretamente por proteínas componentes comuns, como Ras por exemplo, ou transativadas pela fosforilação inicial e independente de agonistas dos RTKs, por proteínas adaptadoras como Shc, Src e outras (**Rozengurt, 1998; Della Rocca et al, 1999**).

Diferentes vias de transdução de sinal podem convergir para uma regulação da transcrição de um ou mais genes de maneira sinérgica, ou uma via pode modular negativamente a ação de outra, de maneira antagônica.

I.3 - GENES DE RESPOSTA PRIMÁRIA

Células eucaróticas em crescimento na presença de fatores de crescimento, hormônios ou qualquer agente mitogênico estão transitando continuamente pelas quatro fases do ciclo celular. Por outro lado, quando estas células são transferidas para condições totalmente destituídas de mitógenos elas tendem a se concentrar em G0, tornando-se quiescentes, com níveis de transcrição e tradução basais muito baixos. Uma vez apropriadamente estimuladas, ocorre a indução de genes de resposta primária que constituem a primeira onda de transcrição gênica, independente de síntese protéica. Grande parte dos genes em questão têm como produtos fatores de transcrição protéicos, que por sua vez provocam novas ondas de transcrição, agora de genes chamados de resposta secundária e genes tardios, que atuam em fases subsequentes do ciclo celular (**Reddy, 1994; Sherr, 1995**).

Alguns dos genes de resposta primária são classificados como proto-oncogenes, pois alterações quaisquer promovendo sua super-expressão levam a um descontrole das fases do ciclo celular, causando uma proliferação quase que “desenfreada”, que resulta em transformação, neoplasia ou tumorigênese celular. Por outro lado, a indução destes genes é obrigatória para uma transição normal de G0 para as fases seguintes do ciclo celular. Proto-oncogenes são genes celulares homólogos a genes virais oncogênicos (oncogenes), os quais causam tumores ao serem transfectados em células normais. A ação contrária dos proto-oncogenes no ciclo celular é, normalmente, contrabalançada por genes supressores de tumor ou anti-oncogenes, cuja perda de função leva a descontroles no ciclo celular, causando proliferação descontrolada e eventualmente tumor (**Marx, 1993; Jiang et al, 1993**).

I.3.1 - fos, jun e myc

São proto-oncogenes de resposta primária induzidos por estímulos extracelulares como fatores de crescimento, hormônios e outros mitógenos que, quando expressos, codificam para proteínas nucleares com atividade de fatores de transcrição. Todos estes genes não são expressos em células “normais” de fibroblastos NIH3T3 de camundongo mantidas no estado de quiescência (**Bravo et al, 1986; Ryseck, et al, 1988**). A transcrição aproximadamente nula destes genes nesta situação é rápida e fortemente revertida para altos níveis de expressão quando agentes mitogênicos são utilizados para estimular as células. Por outro lado, a microinjeção de anticorpos ou oligonucleotídeos antisense contra proteínas e mRNAs dos genes fos, jun e myc, respectivamente, bloqueiam a progressão no ciclo celular de células estimuladas com diferentes mitógenos (**Holt et al, 1986; Heikkila et al, 1987; Kovary & Bravo, 1991; Cosenza et al, 1994; Robinson-Benion et al, 1991**).

A família fos é formada pelos genes c-fos, fra-1, fra2 e fosB, enquanto que a família jun é formada pelos genes c-jun, junB e junD. As respectivas proteínas das famílias FOS e JUN possuem domínios do tipo zíper de leucina ou LZ (leucine zipper), domínios de ligação ao DNA, domínios de transativação e domínios de ligação a proteínas do complexo de transcrição basal (**Sassone-Corsi, et al, 1988**). Uma vez que são fatores de transcrição e possuem domínios de zíper de leucina, estas proteínas formam homodímeros Jun/Jun e heterodímeros do tipo Fos/Jun, onde qualquer proteína das respectivas famílias podem estar envolvidas. Estes dímeros compõe o fator de transcrição conhecido como AP1 (activator protein 1), capaz de reconhecer e se ligar em elementos específicos da região promotora de muitos

genes (principalmente de resposta secundária ou tardia) promovendo sua transcrição (**Chiu et al, 1988**). Dentre estes elementos estão as sequências FAP (fos AP-1 binding site) ou TRE (TPA responsive element, onde TPA é o agente mitógeno 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ativador de PKC), encontradas nos promotores dos genes das famílias fos, jun e outros (**Curran & Franza, 1988**).

O gene c-myc, homólogo do gene viral v-myc, produz a proteína c-Myc que pertence a uma pequena família incluindo L-Myc e N-Myc que, juntamente com a proteína Max e a família Mad (Mad1, Mad3, Mad4 e Mxi, em camundongo), compõe a rede Myc/Mad/Max de fatores de transcrição. As proteínas Myc e Mad competem para dimerizar com Max, formando dímeros Myc/Max ou Mad/Max. A dimerização destas proteínas se dá graças a interação dos domínios HLH (helix-loop-helix) e LZ que elas apresentam; também possuem domínios de ligação ao DNA e de transativação (**Kerkhoff et al, 1991; Blackwood & Eisenman, 1991; Blackwood et al, 1992**). Os dímeros Myc/Max formados reconhecem sequências específicas na região promotora de diversos genes importantes para progressão das células na transição G0→G1→S do ciclo celular, como o de ciclina D1 (**Daksis et al, 1994**).

1.3.2 - O PROMOTOR DE c-fos x PROLIFERAÇÃO CELULAR

Dentre os proto-oncogenes da família fos, o gene c-fos tem sido muito utilizado como marcador de proliferação celular e respostas a potenciais agentes mitogênicos, pois sua expressão ao nível de mRNA e proteína é rápida (30 e 110min, respectivamente), alta e ocorre em quase todos os tecidos até então investigados. O gene c-fos possui 7,5kb, compreende 4 exons e 3 íntrons e codifica para uma proteína nuclear de 63kDa, ativada por fosforilação e cujos níveis de fosforilação levam a diferentes mobilidades eletroforéticas em SDS-PAGE. A

utilização de c-fos como marcador de resposta proliferativa é favorecida pelos elementos “enhancer” que fazem parte de sua região promotora, os quais podem ser ativados por fatores de transcrição específicos ou comuns que encerram diferentes vias de transdução de sinal intracelulares acionadas por um único estímulo extracelular (Figura 7).

O promotor de c-fos situa-se dentro dos 600pb que precedem o início (+1) da transcrição do gene (-600) e compreende 4 elementos regulatórios principais (Figura 7) **(Robertson et al, 1995)**:

- SIE (STAT inducible element), que liga fatores de transcrição da família STAT (signal transducers and activators of transcription), ativados por JAK (Janus kinase);
- SRE (serum response element), que liga fatores de transcrição das famílias do TCF e SRF, ativados principalmente pela via das MAPK e RhoA, respectivamente;
- TRE ou FAP, que liga os fatores de transcrição do tipo AP-1, ativados pelas vias de cAMP/PKA, PKC e MAPK;
- Ca/CRE (Ca^{+2} e cAMP responsive element), liga os fatores de transcrição CREB, ativado pela via de PKA, PKC e ERK1,2.

Como descrito acima, as vias de transdução de sinal mais clássicas como PKA, PKC e MAPK são ativadoras de c-fos e podem ser ativadas por muitos estímulos extracelulares diferentes, mitogênicos ou não. Entretanto outras vias de transdução de sinal além das citadas podem ativar fatores de transcrição que ligam no promotor e ativam c-fos, como por exemplo a ativação de fatores de transcrição SRF pela via de RhoA/ROK/FAK/paxilina/p130^{CAS}, envolvida em rearranjos de citoesqueleto **(Hill et al, 1995; Rozengurt, 1998, Alberts et al, 1998; Sun et al, 1999)**.

Figura 7. Esquema ilustrativo mostrando que sinais extracelulares transduzidos intracelularmente por GPCRs ou RPTKs podem ativar diferentes e desconhecidas vias de transdução de sinais, culminando na ativação de fatores de transcrição que se ligam em e ativam os 4 elementos regulatórios do promotor do proto-oncogene *c-fos*.

I.4 - GENES DE RESPOSTA SECUNDÁRIA

São genes cuja expressão é induzida pelos genes de resposta primária, cujas proteínas correspondentes são de alto “turnover” e meia vida regulada, e que são imprescindíveis para progressão das células no ciclo celular, especialmente na fase tardia de G1 ou na interface G1/S, e nas fases subsequentes S, G2 e M. Participam deste conjunto de genes aqueles totalmente envolvidos com proliferação celular, como os genes de ciclinas e inibidores de Cdks (cyclin dependent kinase) ou de complexos Ciclina/Cdk, também conhecidos como cki (cyclin kinase inhibitor), e genes envolvidos com função tecido-específica das células (Sherr, 1993).

I.4.1 - ciclinas, cdks e ckis

Ciclinas são proteínas de 30-45kDa que não têm atividade intrínseca sozinhas, porém constituem-se nas subunidades regulatórias de complexos protéicos indispensáveis para a progressão no ciclo celular (**Reddy, 1994; Sherr, 1995**). Ciclinas se associam a proteínas de 35-40kDa com atividade de serina/treonina quinase, as Cdk, através de domínios de ligação específicos conhecidos como “cyclin box”. Após a ligação, o complexo sofre ativação por fosforilação em resíduos de treonina, serina e tirosina por proteínas CAK (Cdk activating kinase). Através do domínio catalítico da Cdk conhecido como “core” catalítico, complexos Ciclina/Cdk fosforilam e ativam substratos necessários para progressão em diferentes fases do ciclo celular (**Jeffrey et al, 1995**).

Ciclinas D se associam com Cdk2,4,5,6 para constituir o complexo responsável pela transição G0→G1→S, enquanto que ciclina E se associa com Cdk2 na interface G1/S e S, e ciclinas A e B se associam com Cdk2 compondo os principais complexos responsáveis pela transição S→G2→M (Figura 8).

De atividade contrária as ciclinas, que têm uma função de promover a progressão do ciclo celular, os inibidores de ciclo celular ou Ckis são proteínas em geral de baixo peso molecular que se ligam a Cdk ou a complexos Ciclina/Cdk. No primeiro caso estão os inibidores da subclasse INK, constituída por p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INKd4}, que se ligam a Cdk4/6 impedindo a formação de complexos com as Ciclinas. No segundo caso estão os inibidores da subclasse KIP, constituída por p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}, que ligam aos complexos Ciclina/Cdk já formados impedindo sua atividade quinásica (**Hall et al, 1995; Morgan, 1995**).

Diferentemente das Cdks, que possuem expressão constitutiva ao longo de todo o ciclo celular, as ciclinas e os Ckis tem expressão regulada em diferentes fases ou transição de fases do ciclo celular através de controle transcripcional e/ou traducional, associado ou não a processos de ubiquitinação proteolíticos, de regulação dose-tempo dependente. Assim, a progressão ao longo do ciclo celular eucariótico, promovida por fatores mitogênicos extracelulares, depende da expressão antagônica de Ciclinas e Ckis, que se alternam na regulação da atividade das Cdks (Figura 8).

Figura 8. Esquema ilustrativo das fases do ciclo celular de mamíferos e as respectivas proteínas que regulam positiva (Ciclinas/Cdks) e/ou negativamente (Ckis) estas fases. No lado esquerdo da figura estão mostrados os mecanismos de inibição do ciclo celular pelas Ckis.

I.5 - EFEITOS ENDÓCRINOS DO HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO x BASES MOLECULARES E VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL INTRACELULARES

I.5.1 - O HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓFICO

ACTH, hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina é um peptídeo de 39aa produzido e secretado da região anterior da hipófise a partir de estímulos hipotalâmicos representados pelo peptídeo CRF (corticotrophin releasing factor), que se liga e ativa receptores específicos na hipófise (CRFR). ACTH é produzido pelo processamento da POMC (pro-opiomelanocortin), uma glicoproteína precursora de 32kDa, na região intermediária da hipófise produzindo vários outros hormônios peptídicos com funções diversas como os MSHs (melanocytes stimulating hormone), CLIP (corticotropin like peptide), endorfinas e lipotrofinas.

ACTH é secretado na corrente sanguínea de maneira periódica, sendo que o pulso máximo de secreção ocorre pela manhã, nas últimas 2h do período de sono, e tem a finalidade de atingir o tecido alvo que são as glândulas adrenais ou suprarenais (**Griffin & Ojeda, 1996**). Estas são constituídas por 2 regiões distintas: a córtex, que representa cerca de 90% das glândulas e a medula, a parte menor e mais interna responsável pela produção e secreção de adrenalina. A região da córtex é formada por 3 zonas de diferenciação celular com morfologia e funções características: glomerulosa, fasciculada e reticulada.

A principal função fisiológica do ACTH na córtex das glândulas é regular a síntese e secreção de hormônios esteróides, no processo conhecido como esteroidogênese (**Garren et al, 1971; Rae et al, 1979**). Esta última envolve a produção de glicocorticóides como os hormônios cortisol e corticosterona, que

ocorre na zona fasciculada, a produção de mineralocorticóides como o hormônio aldosterona, que ocorre na zona glomerulosa, bem como a produção de hormônios esteróides sexuais como os andrógenos, que ocorre na zona reticulada da córtex adrenal, sendo esta última de menor intensidade e importância. A regulação da esteroidogênese deve-se principalmente à disponibilidade de colesterol para a primeira e mais importante enzima esteroidogênica, a enzima mitocondrial citocromo P450_{scc} (P450 side chain cleavage enzyme), que catalisa a quebra da cadeia lateral do colesterol a pregnenolona (**Simpson & Waterman, 1988**). A translocação do colesterol para o interior das mitocôndrias (através do espaço intermembranas) deve-se a ação da proteína StAR (steroidogenesis acute regulatory protein), que é uma etapa regulada do início da síntese dos esteróides (Figura 9) (**Waterman, 1995; Stocco & Clarck, 1997**).

A ação imediata do ACTH na regulação da esteroidogênese está exclusivamente envolvida com alterações morfológicas das células corticoadrenais, ou seja, rearranjos do citoesqueleto ao nível de microfilamentos e microtúbulos, promovendo uma maior mobilização do colesterol extracelular (trazido pelas lipoproteínas LDL) e intracelular (armazenado na forma de éster em vesículas e/ou no retículo endoplasmático) em direção às mitocôndrias (**Côte et al, 1997**). Já a ação tardia de ACTH na regulação da esteroidogênese deve-se a capacidade deste hormônio em regular a expressão gênica das enzimas esteroidogênicas (Figura 9) (**Moore & Miller, 1991; Viard et al, 1992**). O processo de esteroidogênese realizado pela córtex das glândulas adrenais é crítico para adaptações corporais em situações de estresse e na regulação e manutenção do balanço hídrico e eletrolítico realizado pelos mineralocorticóides produzidos. Todo este circuito hormonal envolvendo a

produção e secreção do ACTH composto pelo hipotálamo, hipófise e adrenais é regulado negativamente por retroalimentação pelo próprio ACTH e principalmente pelo esteróide cortisol produzido (Dallman et al, 1987).

Outro efeito importante, porém menos estudado, que ACTH desempenha nas glândulas adrenais está relacionado com o crescimento e manutenção da região da córtex. ACTH tem um efeito proliferativo das células corticais uma vez que a retirada parcial ou total de uma das glândulas é compensada por uma proliferação celular e crescimento exagerado da glândula remanescente (hipertrofia); outro fator marcante do efeito proliferativo de ACTH é que animais hipofisectomizados apresentam glândulas adrenais totalmente atrofiadas e a administração intravenosa de ACTH, estimula a proliferação celular e o crescimento do tecido corticoadrenal tornando as glândulas quase que completamente reestabelecidas (Figura 9) (Hornsby, 1985; New, 1998; New & Wilson, 1999; Carlson et al, 1999; Westphal et al, 1999).

Figura 9. Esquema ilustrativo dos efeitos esteroidogênicos (trópicos) e proliferativos (tróficos) desencadeados pelo hormônio ACTH em células corticoadrenais através do ACTHR.

1.5.2 - O RECEPTOR DE ACTH

ACTH se liga especificamente e com alta afinidade a um receptor membranar da superfamília dos receptores acoplados à proteínas G (GPCRs), o receptor de ACTH (ACTHR) ou receptor de melanocortina 2 (MC2-R). ACTHR (Figuras 9 e 48) pertence à subfamília dos receptores de melanocortina (MCRs), composta por 5 membros, e é expresso em altos níveis na região da córtex adrenal e em baixos níveis em alguns outros tecidos como cerebral e adiposo (**Boston & Cone, 1996**). Os transcritos de ACTHR são regulados positivamente por ACTH, seja aumentando a expressão gênica ou aumentando a meia vida do mRNA (**Penhoat et al, 1989; Mountjoy & Cone, 1994**). O gene humano dos MCRs foram descritos pela primeira vez em 1992 por Mountjoy e colaboradores, e seu promotor começou a ser explorado em 1994 (**Mountjoy et al, 1992; Naville et al, 1994**). O gene bovino do ACTHR foi clonado inicialmente em 1994 (**Raikhinstein et al, 1994**).

O gene do ACTHR de camundongo, sequenciado inicialmente em 1995 (**Cammas et al, 1995; Kubo et al, 1995; Ishizuka, 1995**), é composto de 3 ou 4 exons, dependendo do “splicing” alternativo do exon 2, e apenas o 3º ou 4º exon carrega a sequência codificante inteira do ACTHR. O cDNA inteiro do ACTHR possui cerca de 1,7Kb, enquanto que o exon codificante possui cerca de 1,1Kb (Figura 10) (**Shimizu et al, 1997**). A natureza funcional dos primeiros exons deste gene não é conhecida e, embora possua alguns elementos regulatórios conhecidos em seu promotor, nenhuma funcionalidade foi encontrada, com exceção do elemento fator esteroideogênico 1 (SF1), um receptor nuclear órfão responsável pela especificidade da expressão de alguns genes esteroideogênicos (incluindo *acthr*) em algumas poucas células como de glândulas adrenais e sexuais (Figura 10) (**Cammas et al,**

1997). Este gene possui homologia na sequência de nucleotídeos de 85 e 80% com os genes do ACTHR humano e bovino, respectivamente. A proteína ACTHR é formada por 296aa, um a menos que seus homólogos humano e bovino, e possui cerca de 90 e 80% de homologia com os receptores humano e bovino, respectivamente (Raikhinstein et al, 1994; Kubo et al, 1995; Cammas et al, 1995).

Figura 10. Ilustração da organização genômica, do mensageiro transcrito e da região promotora do gene do receptor de ACTH de camundongo

O receptor de ACTH acopla-se exclusivamente à uma classe de proteínas G heterotriméricas, as proteínas Gs, que estimulam a enzima adenilato ciclase (AC) a aumentar os níveis intracelulares de cAMP através de $G_{s\alpha}$ (de Foresta et al, 1987). Sendo assim, todos os efeitos disparados por ACTH em células adrenais estariam sendo mediados pela proteína efetuidora AC e seriam causados pelo aumento de cAMP, potente e específico ativador de PKA, principalmente (Lefkovitz et al, 1970;

Finn et al, 1972 & 1976; Friedman, 1976; Buckley and Ramachandran, 1981; Hofmman et al, 1988). Entretanto, evidências experimentais acumuladas ao longo de anos, por vários e distintos grupos de pesquisa, convergem para outras proteínas efetadoras dos efeitos de ACTH. Diferentemente de outros sistemas hormônio peptídico/GPCR, não se conhece precisamente os substratos das subunidades $\beta\gamma$ da proteína Gs acoplada ao ACTHR após ligação do hormônio e dissociação de Gs em $G\alpha$ e $G\beta\gamma$, podendo esta última estar ativando várias e possíveis proteínas efetadoras que contribuem para o mecanismo de ação de ACTH (**Qiu et al, 1998**). Também não se sabe ainda se outras classes de proteínas G seriam ativadas por ACTHR e estariam envolvidas com os efeitos intracelulares do ACTH.

1.5.3 - A LINHAGEM DE CÉLULAS Y-1

Y-1 é uma linhagem clonal de células imortalizadas estabelecidas em cultura e isoladas de um tumor da córtex adrenal de camundongo (**Yasumura, 1966**). Estas células apresentam funcionalidade e respostas semelhantes à de células primárias tanto a ação do ACTH como à síntese e secreção de hormônios esteróides.

A linhagem Y-1 tem sido um modelo celular experimental bastante útil no estudo de ACTH e seus efeitos (esteroidogênicos e proliferativos) nas glândulas adrenais, uma vez que respondem adequadamente a estímulos de fatores de crescimento, soro e outros mitógenos, além de tornarem-se quiescentes e estáveis na ausência de soro no meio de cultura, características semelhantes as de fibroblastos NIH 3T3 normais de camundongo (**Armelin et al, 1977**). Estas células também podem ser utilizadas para geração de linhagens subclonais, através dos diversos métodos de transferência de DNA usados, pois apresentam um cariótipo estável (**Schimmer & Parker, 1992**).

As células Y-1 apresentam características tumorigênicas como amplificação do proto-oncogene c-Ki-ras (50-80 cópias por célula), causando altos níveis de expressão do mRNA e da proteína c-Ki-Ras, cerca de 10-20 vezes maior que um fibroblasto normal (**Schwab et al, 1983**). Cerca de 16% da proteína c-Ki-Ras total destas células encontram-se no estado ativado, ou seja, ligada a GTP. Além desta, outra característica anormal destas células é a expressão constitutiva do proto-oncogene c-myc que leva a altos níveis basais da proteína c-Myc, independente da fase do ciclo celular em que a célula se encontra (**Armelin et al, 1996; Lepique et al, 2000 in Press**).

I.5.4 - ACTH x CÉLULAS Y-1

Embora resultados experimentais realizados *in vivo* tenham comprovado os efeitos proliferativos e mitogênicos de ACTH na córtex adrenal, os mesmos não são unanimemente confirmados *in vitro* utilizando células em cultura, sejam de origem primárias ou de linhagens estabelecidas de adrenal, como as células Y-1. Isto porque está bem documentado que ACTH tem um efeito marcadamente anti-mitogênico *in vitro*, em qualquer linhagem adrenocortical e proveniente de qualquer espécie (**Ramachandran & Suyama, 1975**). Há anos nosso laboratório tem se dedicado ao estudo dos mecanismos de ação de ACTH em células adrenocorticais Y-1 a fim de esclarecer, principalmente, os efeitos deste hormônio no ciclo celular de células adrenais (**Armelin et al, 1977**). Os principais efeitos de ACTH em células Y-1 detectados e acumulados até o momento, provenientes de diversos grupos de pesquisa, são:

-estimulação da esteroidogênese (**Garren et al, 1971; Rae et al, 1979**);

- alteração morfológica de citoesqueleto levando a um arredondamento celular **(Garren et al, 1971; Rae et al, 1979; Côte et al, 1997);**
- indução da expressão de genes de resposta primária das famílias fos e jun, responsáveis pela transição G0→G1→S do ciclo celular **(Kimura & Armelin, 1988; Kimura et al, 1993 & 1993);**
- indução de síntese de DNA até 2h de tratamento **(Lotfi et al, 1997; Lotfi & Armelin, 1999);**
- inibição da síntese de DNA em tratamentos superiores a 4h **(Armelin et al, 1977; Kimura & Armelin, 1993; Lotfi et al, 1997);**
- redução dos níveis constitutivos da proteína c-MYC **(Kimura et al, 1993; Lepique et al, 2000 in Press);**

O desencadear destes efeitos nas células Y-1 e outras linhagens adrenais em resposta ao hormônio ACTH inicia-se logo após a ligação do peptídeo ao seu receptor, que deve acionar vias de transdução de sinal intracelulares. Estes circuitos regulatórios constituem rotas ligando estímulos extracelulares a eventos nucleares que levam a ativação de transcrição e consequentes alterações fenotípicas da célula. As principais vias regulatórias consideradas envolvidas nos efeitos disparados por ACTH estão citadas abaixo e mostradas na Figura 11, onde destacam-se apenas as proteínas mais conhecidas e seus respectivos alvos nucleares que são fatores de transcrição:

- via da proteína quinase A ou proteína quinase dependente de AMP cíclico, PKA **(Olson et al, 1993);**
- via da proteína quinase C ou proteína quinase dependente de Ca^{+2} e diacilglicerol, PKC **(Kimura & Armelin, 1990);**

-via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK): isoformas das quinases reguladas extracelularmente (ERK1,2) (**Lotfi et al, 1997**) e das quinases ativadas por stress (JNK/SAPK) (**Watanabe et al, 1997**);

Os efeitos esteroideogênicos e de arredondamento celular provocados por ACTH são comprovadamente mediados pela via de cAMP/PKA e, talvez em menor extensão, pela via de PKC (**Kimura & Armelin, 1990**).

Os efeitos mitogênicos de ACTH na estimulação dos proto-oncogenes fos e jun e na indução de síntese de DNA têm sido relacionados a ativação da via de cAMP/PKA (**Kimura et al, 1993b**) e talvez, PKC (**Frigeri & Armelin, 1996; Faria & Armelin, 1996**) e MAPK (**Lotfi, et al, 1997**). Já os efeitos anti-mitogênicos de ACTH na inibição da síntese de DNA (**Lotfi et al, 1997**) e da proteína c-Myc parecem ser mediados via cAMP/PKA (**Kimura et al, 1993a; Lepique et al, 2000 in Press**). Entretanto, certamente acredita-se que outras vias sinalizadoras, além das citadas acima, ou ainda uma comunicação cruzada entre elas, estão envolvidas nos mecanismos de ação de ACTH para a regulação complexa de seus efeitos mitogênicos e anti-mitogênicos (Figura 11).

Figura 11. Esquema ilustrativo das vias de transdução de sinal acionadas pelo receptor de ACTH envolvidas nos efeitos do hormônio ACTH: PKA é a única via atualmente comprovadamente envolvida enquanto que PKC e MAPK são vias sob investigação e muito provavelmente envolvidas.

II. OBJETIVOS GERAIS

II.1 - OBJETIVOS

Muito se conhece atualmente sobre vias de transdução de sinal envolvidas nos efeitos proliferativos promovidos por fatores e hormônios peptídicos de crescimento, como mostram os dados anteriores. No caso do hormônio ACTH existe ainda hoje uma fenomenologia, envolvendo seus efeitos mitogênicos *in vivo* e *in vitro* e anti-mitogênicos *in vitro*, pouco explorada no que se refere aos mecanismos moleculares que estariam por trás de seus efeitos proliferativos. Sabe-se muito bem que a partir do receptor de ACTH sinais intracelulares se propagam através de vias de transdução de sinal, das quais PKA é a única comprovadamente aceita, enquanto que PKC e MAPK tem sido evidenciadas indiretamente em alguns poucos trabalhos individuais. Além do mais existem implicações sugerindo que outras vias poderiam ser acionadas pelo receptor de ACTH, além destas três citadas.

Células adrenais, como a linhagem adrenocortical Y-1, são alvos específicos de ACTH e desenvolvem respostas especializadas frente a ligação do hormônio ao seu receptor. A proposta deste trabalho é saber se o receptor de ACTH consegue iniciar sinais intracelulares em linhagens celulares homólogas que não expressam este receptor e nenhum outro de sua família. Esta abordagem de expressão ectópica de receptores tem sido usada em diversos casos a fim de se desvendar os mecanismos moleculares de ação de um ligante, que geralmente é um hormônio ou fator peptídico de crescimento ou neurotransmissor. Para a realização desta proposta, utilizamos 2 linhagens homólogas para expressar ACTHR ectopicamente, a saber: 1ª) fibroblastos 3T3 de camundongo, que possuem um “background”

metabólico diferente de células adrenais (**Aaronson & Todaro, 1968**), e 2ª) células AR-1 (ACTH resistant), que são derivadas clonais da linhagem Y-1 não responsivas ao ACTH que provavelmente possuem um “background” metabólico semelhante ao da linhagem parental (**Armelin & Armelin, 1977**).

Nestas linhagens expressando o ACTHR pretende-se explorar inicialmente a via clássica de adenilato ciclase/cAMP/PKA/CREB para saber se o receptor está iniciando um sinal ao nível da membrana e se este sinal está se propagando pelo citoplasma para chegar ao núcleo, onde deve haver a ativação da proteína CREB e alteração de expressão gênica. A seguir pretende-se explorar um alvo nuclear de sinais mitogênicos provavelmente comuns a todas as células: o gene c-fos, amplamente usado como indicador de proliferação celular, pois tem a vantagem de ser totalmente conhecido ao nível de promotor, gene e proteína e por possuir em seu promotor elementos de transcrição conhecidos que podem ser acionados por diferentes vias sinalizadoras.

II.2 - PLANO EXPERIMENTAL

Para a execução da abordagem deste trabalho pretende-se cumprir algumas etapas sequenciais interdependentes que são:

- 1ª) Clonagem e caracterização do ACTHR: construir um vetor de expressão carregando o cDNA do ACTHR; transfectar nas linhagens de fibroblastos 3T3 e células AR-1; isolar clones transfectantes; testar a inserção da construção por Southern Blot e a expressão do ACTHR em mRNA por Northern Blot e/ou RT/PCR;
- 2ª) Teste da funcionalidade do ACTHR: testar a ativação de adenilato ciclase medindo-se a produção de cAMP após estimulação com ACTH;

3ª) Teste da transdução de sinal para o núcleo: uma vez que os resultados da 2ª etapa forem verdadeiros (e obrigatórios), deve-se verificar aqui a expressão da proteína c-FOS nos clones transfectantes estimulados com ACTH;

4ª) Exploração de vias de transdução de sinal: se resultados de ativação de c-fos (prováveis) são encontrados, deve-se investigar aqui vias de transdução de sinal provavelmente envolvidas neste efeito;

5ª) Análise da transdução de sinal para o núcleo visando outros alvos nucleares através das vias de transdução de sinal exploradas: de acordo com os resultados da 4ª etapa deve-se aqui examinar outros genes das famílias fos e jun bem como o gene c-myc, através da expressão de suas proteínas produto, nos clones transfectantes, sob estímulo com ACTH;

6ª) Teste do efeitos mitogênicos: se a 3ª, 4ª e 5ª etapas forem verdadeiras pretende-se testar aqui se ACTH é capaz de iniciar um efeito celular complexo nos clones, como o efeito mitogênico e/ou anti-mitogênico através de medidas de síntese de DNA por incorporação de timidina tritiada e curvas de crescimento celular.

II.3 - VIABILIDADE E RELEVÂNCIA

Quanto a sua viabilidade, a proposta deste trabalho se baseia nos seguintes dados: 1º) o gene do ACTHR é conhecido; 2º) a expressão ectópica do gene do ACTHR humano apresentou grandes dificuldades técnicas, porém a expressão do ACTHR de células Y-1 em células heterólogas foi realizado sem dificuldades (Cammass et al, 1995). Assim, a 1ª etapa do plano experimental é perfeitamente viável mas as etapas 2 e 3 apresentam riscos que podem comprometer a viabilidade do projeto. O sucesso da 3ª etapa é crítico para as etapas 4, 5 e 6, de resultados totalmente imprevisíveis, mas viáveis do ponto de vista experimental.

A expressão ectópica de receptores em sistemas homólogos ou heterólogos foi e ainda tem sido muito explorada para elucidar mecanismos de interação ligante-receptor, acarretando em sinais imediatos ao nível de membrana. Como exemplos clássicos estão os receptores adrenérgicos (**Jewell-Motz et al, 1997**), de angiotensina II (**Perlman et al, 1997**), de adrenomedulina (**Kapas et al, 1995**), de prostaglandinas (**Gusovsky, 1991**) e mesmo o de ACTH de camundongo (**Kapas et al, 1996**), quando foi expresso pela 1ª vez em células HeLa para fins de estudos de interação ou “binding”. Estas abordagens tem sido fundamentais para o desenvolvimento de novas drogas.

Por outro lado a expressão ectópica de receptores de hormônios peptídicos mitogênicos com a finalidade de se estudar vias de transdução de sinal é uma abordagem menos comum por ser menos previsível e mais sujeita a riscos. Provavelmente um dos primeiros sucessos usando esta abordagem foi com o receptor de CSF-1 (colony stimulating factor 1) (**Roussel et al, 1991**): o gene do receptor de CSF-1 (um receptor de tirosina-quinase) foi transfectado em células 3T3 para estudar a indução dos proto-oncogenes fos, jun, myc e da síntese de DNA por CSF-1. Mais recentemente, pode-se citar a expressão do receptor de somatostatina (sst₄) humano em células CHO (chinese hamster ovary) para estudar os efeitos proliferativos de sst₄ (**Sellers, 1999**), o de melatonina (**Godson & Reppert, 1997**), o do peptídeo liberador de gastrina (**Benya et al, 1994**), o de gastrina e colecistocinina B (**Nagata et al, 1996**), e outros. Portanto, trata-se de uma abordagem promissora em expansão e muito apropriada para casos de agonistas que promovem efeitos complexos e mecanismos moleculares obscuros, como o próprio ACTH.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 - MATERIAIS

III.1.1 - LINHAGENS CELULARES

Y-1 (Yasumura et al, 1966)

AR-1 (Kimura et al, 1983; Armelin & Armelin, 1977)

3T3 (Todaro & Green, 1963)

Clones transfectantes 3T3 ACTHR (Forti & Armelin, 1998) e AR-1 ACTHR

Clones transfectantes Y-1 PKA-R1, deficientes em PKA ou PKA⁻ (Eichler & Armelin, resultados não publicados)

III.1.2 - ANTICORPOS

Primário policlonal de coelho anti c-MYC - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti AKT/PKB fosforilada em Ser 473 - Biolabs

Primário policlonal de coelho anti AKT/PKB Total - Biolabs

Primário policlonal de coelho anti c-FOS - Santa Cruz

Primário monoclonal de camundongo anti FOS B - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti FRA 1 - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti FRA 2 - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti c-JUN - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti JUN B - Santa Cruz

Primário monoclonal de camundongo anti JUN D - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti p27^{Kip1} - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti p44/42 MAPK fosforiladas em Thr 202 e Tyr 204 - Biolabs

Primário policlonal de coelho anti p44/42 MAPK Total - Biolabs

Primário monoclonal de camundongo anti JNK1,2,3 fosforiladas em Thr 183 e Tyr 185 - Santa Cruz

Primário policlonal de coelho anti JNK1,2,3 Total - Santa Cruz

Primário policlonal de cabra anti CREB1/CREM1/ATF1 fosforilados em Ser 133 - Biolabs

Primário policlonal de coelho anti CREB/CREM/ATF1 Total - Santa Cruz

Secundário de burro anti-rabbit Ig conjugado com horseradish peroxidase - Amersham

Secundário de burro anti-camundongo Ig conjugado com horseradish peroxidase - Amersham

Secundário de burro anti-cabra Ig conjugado com horseradish peroxidase - Santa Cruz

III.1.3 - HORMÔNIOS E FATORES PEPTÍDICOS DE CRESCIMENTO

Corticotropina A: Extrato bruto de hipófise suína contendo 50% de ACTH₁₋₃₉ – Sigma

ACTH₁₋₃₉ – Sigma

ACTH₇₋₃₈ – Sigma

Fator de crescimento de fibroblastos 2 = FGF2, bovino recombinante, fornecido pelo laboratório do Prof. Dr. Angelo Gambarini, IQ-USP

Insulina - Sigma

III.1.4 - ENZIMAS

AmpliTaQ DNA polimerase 5U/μl - Gibco

EcoR I, Hind III, Kpn I, PST I e Xba I – New England

DNase I livre de RNase 1U/1 μ l - Gibco

Fosfatase alcalina de camarão 1U/ μ l – USB

Fragmento klenow de DNA polimerase I de E. coli 3U/ μ l - Gibco

Proteinase K 100mg/ml - Sigma

RNase livre de DNase 5 μ g/ μ l - Gibco

Superscript RT RNase H⁻ 200U/ μ l transcriptase reversa - Gibco

T4 polinucleotídeo quinase (T4PNK) 10U/ μ l – New England

III.1.5 - INIBIDORES E ATIVADORES ENZIMÁTICOS

IBMX (isobutil-metil-xantina) - Calbiochem

Phorbol-12 miristato-13 acetato (PMA) – Sigma

PMSF - Sigma

Toxina de cólera (CTX) - Calbiochem

Toxina de Pertussis (PTX) - Calbiochem

NaF 300mM, MgCl₂ 100mM, EGTA 100mM - Merck

Leupeptina 1mg/ml, aprotinina 1mg/ml, pepstatina 1mg/ml, ortovanadato de sódio 100mM – Sigma e Merck

PD 98059 – Biolabs

H-89 – Calbiochem

Go 6983 – Calbiochem

GF 109203X – Calbiochem

Tyrphostin A47 – Sigma

PP1 – Calbiochem

III.1.6 - KITS

Kit Biotrak de imunoensaio para cAMP com os seguintes componentes: Microplaca de 96 poços (8x12) de fundo recoberto com o anticorpo secundário anti-coelho; Conjugado cAMP-peroxidase; cAMP padrão 32pmol/ml; Antisero anti-cAMP de coelho; Substrato para peroxidase PH/TMB (peróxido de hidrogênio/tetrametil benzidina) em dimetilformamida; Tampão de ensaio de cAMP (acetato de sódio 0,05M pH 5,8, 0,02% BSA e 0,01% de preservativo); Tampão de lavagem de cAMP (tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,5, Tween 20 0,05%); Reagente de lise 1 (Brometo de dodecil-trimetil-amônio); Reagente de lise 2 – Amersham/Pharmacia.

Kit ECL Western blotting - Enhanced Chemiluminescence – Amersham/Pharmacia

Kit Elite Vecstain usando reação de imunoperoxidase: Anticorpo secundário anti-rabbit biotinilado; DAB (tetracloro de diaminobenzidina); Peróxido de amônio; Reagentes A (avidina) e B (biotina); Soro normalizador de coelho - Vectors.

Kit pMOSBlue T vector contendo: vetor plasmidial pMOSBlue T 50ng/μl; inserto controle 15ng/μl; bactérias competentes MOSBlue ; meio de cultura SOC; plasmídeo teste para transformação 0,2ng/μl; enzima T4 DNA ligase 4U/μl; tampão de ligase 10x, DTT 100mM, ATP 10mM; água livre de nuclease - Amersham/Pharmacia.

Kit Random Primers DNA Labeling System contendo: Tampão de interrupção (EDTA 0,2M pH 7,5); Tampão de reação de marcação de sonda (HEPES 0,67M, Tris-HCl 0,17M, MgCl₂ 17mM, 2-mercaptoetanol 33mM, BSA 1,33mg/ml, primers hexâmeros de oligodeoxiribonucleotídeos 18 OD₂₆₀ unidades/ml, pH 6,8); dNTPs = dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0,5mM em Tris-HCl 3mM pH 7,0 e EDTA 0,2mM -Gibco.

Kit Sephaglas BandPrep contendo: resina de sílica sephaglas BP 20% (w/v) em 6M NaI, Tris-HCl 50mM pH 8,0, Na₂SO₃ 0,05%, CDTA 10mM; Solubilizador de gel - Pharmacia Biotech.

Kit Sequenase Versão 2.0 de Sequenciamento de DNA contendo: Plasmídeo controle M13mp18; Solução DTT 0,1M; Solução EDTA 2mM; Mistura de marcação 5x (dGTP, dCTP, dTTP 7,5μM); Mistura de terminação ddN (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 80μM, NaCl 50mM e ddNTP 8μM, onde N=A, T, C, ou G); Primer -40 0,5pmol/μl (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'); Sequenase versão 2.0 T7 DNA polimerase 13U/μl (em K₃PO₄ 20mM pH 7,4, DTT 1mM, EDTA 0,1mM, glicerol 50%); Solução de interrupção (Formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05%, xileno cianol 0,05%); Tampão de diluição da enzima sequenase (Tris-HCl 10mM pH 7,5, DTT 5mM, BSA 0,5mg/ml); Tampão de sequenciamento 5x (Tris-HCl 200mM pH 7,5, MgCl₂ 100mM, NaCl 250 mM) - USB.

III.1.7 - MEIOS DE CULTURA

Meio de cultura LB (10g de NaCl, 5g de extrato de levedura, 10g de peptona para 1l de água) - Sigma

Meio DME (Dulbecco's modified egle's medium) – Sigma

FCS (fetal calf serum) – Cultilab

III.1.8 - NUCLEOTÍDEOS E OLIGONUCLEOTÍDEOS

oligonucleotídeo poli (dT)₁₂₋₁₈ 500μg/ml - Gibco

DNA de espermatozoides de salmão 5,5mg/ml - Sigma

DNA ladder 250, 500 e 100pb 0,1μg/μl - Gibco

DNA lambda - Gibco

“downstream primer” do ACTHR = 5'-TCGTGATTTCTGTAAGTC-3' 50 μ M – Gibco (**Cammas et al, 1995**)

dNTPs = dATP, dCTP, dGTP, dTTP 10mM em Tris-HCl 3mM pH 7,0 e EDTA 0,2mM – Gibco

Timidina - Sigma

³H-metil-timidina – NEN

“upstream primer” do ACTHR = 5'-TTTACAACACTCAAAGCA-3' 50 μ M – Gibco (**Cammas et al, 1995**)

α ³³P-dCTP 3000Ci/mmol - NEN

α ³⁵S-dATP 1250Ci/mmol - NEN

III.1.9 - PLASMÍDEOS

pSVK3 - Pharmacia

pSVACTHR

pSV2-neo

pMOSBlue T – Amersham/Pharmacia

pMOSBlue T/ACTHR

III.1.10 - DROGAS, ANTIBIÓTICOS E REAGENTES DIVERSOS

8-bromo-cAMP (8Br-cAMP) - Sigma

dibutiril-cAMP (db-cAMP) - Sigma

Forskolina - Calbiochem

Tetraciclina - Sigma

Ampicilina - Gibco

Geneticina ou G418 – Gibco

Lipofectina – Gibco

Streptomicina - Gibco

Triton X-100 - Sigma

NP 40 - Sigma

Óleo mineral

Glicerol - Merck

Agarose – Gibco

Ágar bacteriológico - Sigma

Formamida - Sigma

β -mercaptoetanol - Sigma

TEMED - Gibco

Uréia - Sigma

III.1.11 - SOLVENTES

Acetona - Merck

Ácido acético - Merck

Álcool etílico - Merck

Álcool isoamílico - Merck

Álcool isopropílico - Merck

Clorofórmio - Merck

DMSO (dimetil sulfóxido) - Sigma

Fenol - USB

Fenol saturado com tris pH 7,8 - USB

Formaldeído - Sigma

n-butanol – Sigma

III.1.12 - SOLUÇÕES E TAMPÕES

Solução 1 (S1) (19ml de tampão de extração, 0,6ml de SDS 20%, 0,2ml de β -mercaptoetanol).

Miniprep 1 (glucose 50mM, Tris 25mM-HCl pH 8,0, EDTA 10mM, lisozima 2mg/ml)

Miniprep 2 (NaOH 0,2N, SDS 1%)

Miniprep 3 (acetato de potássio 3M pH 4,8 - ácido acético)

Acetato de sódio 3M pH 5,2 - Merck

Acetato de sódio 2M pH 4,0 - Merck

Ácido tricloroacético 5 e 10% - Sigma

Ácido Sulfúrico 1M - Merck

Acrilamida 30% e bis-acrilamida 1% - Gibco

Brometo de etídeo 10mg/ml - Sigma

BSA 10mg/ml - Sigma

CaCl₂ 2,5M - Merck

Corante Ponceau - 0,1% Ponceau, 10% ácido acético glacial - Sigma

Denhart (Polivinilpirrolidona, Ficoll, BSA) - Sigma

Southern Blot 1 (NaOH 0,2M, NaCl 0,6M) - Merck

EDTA 0,5M pH 8,0 - Merck

IPTG 100mM - Calbiochem

Líquido de cintilação {PPO (2,5-difenil-oxazol) 4g, POPOP [1,4-bis-2-(5-fenil oxazolil)-benzeno] 0,1g para 1l tolueno}

MgSO₄ 2M - Merck

NaOH 0,5 e 2M - Merck

Southern Blot 2 (Tris-HCl 1M, NaCl 0,6M, HCl pH 7,4) – Gibco e Merck

Persulfato de amônio 10% - Sigma

SDS 10 e 20% - Gibco

“Stripping” (100mM β -mercaptoetanol, 2% de SDS em tampão TBS 1x)

Tiocianato de guanidina 4M - Merck

Tripsina (tripsina 0,1%, EDTA 1mM) - Sigma

X-gal 50mg/ml - Gibco

Tampão de amostra SDS (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; dTT 50mM; bromofenolblue 0,1%)

Tampão de amostra SDS-PAGE 2x (Tris.Cl 100mM, ditiotreitól 200mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%)

Tampão de corrida para DNA 5x (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30% em água)

Tampão de corrida para SDS-PAGE 10x (25 mM Tris-base, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3)

Tampão de extração (Tris-HCl 20mM pH 7,8, EDTA 10mM pH 8,0 e NaCl 10mM).

Tampão de lise NP-40 (1% Nonidet P-40, 10% glicerol, 135 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl pH 8,0)

Tampão de lise RIPA (50mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS)

Tampão de reação de DNase I 10x (200mM Tris-HCl pH 8,4, 20mM $MgCl_2$, 500mM KCl)

Tampão de Transferência de Proteínas (glicina 39mM, Tris base 48mM, SDS 0,037%, metanol 20%)

Tampão HEPES salino (16,4g NaCl, 11,9g de HEPES, 0,21g Na_2HPO_4 p/ 0,8l de água; pH 7,05)

Tampão para diluição da fosfatase alcalina (Tris-HCl 50mM pH 8,0)

Tampão para fosfatase alcalina 10x (Tris-HCl 200mM pH 8,0, MgCl_2 100mM)

Tampão para PCR 10x (100mM Tris-HCl pH 8,4, 0,5M KCl, 15mM MgCl_2 , 0,01% gelatina)

Tampão para T4PNK 10x (Tris-HCl 70mM pH 7,6, MgCl_2 10mM, DTT 5mM)

Tampão PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 1,5mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,68mM, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,49mM pH 7,2)

Tampão PBSA (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 1,5mM pH 7,2)

Tampão SSC 20x (NaCl 3M, Citrato de sódio 0,3M) - Merck

Tampão TBE 10x (108g de Trizma, 55g de ácido bórico, 3,7g de EDTA p/ 1l água)

Tampão TBST (150 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl, 0,1% Tween-20, pH 7,5)

Tampão TE (Tris 1M pH 7,5; EDTA 0,5M pH 8,0) - Gibco

Tampão TR 5x (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl_2 e 0,1M DTT)

Tampão Tris-HCl 1,0M pH 6,8 e 1,5M pH 8,8 - Gibco

Tampão universal ("one for all") para enzimas de restrição 10x (100mM Tris-acetato pH 7,5, 100mM acetato de magnésio e 500mM acetato de potássio).

III.2 - MÉTODOS

III.2.1 - CULTURA CELULAR

Células parentais Y-1, AR-1 e 3T3 e linhagens clonais destas são mantidas sob congelamento em tanques de nitrogênio líquido. Após o descongelamento de alíquotas, estas células são mantidas em frascos de cultura de poliestireno contendo meio de cultura DME (Dulbbeco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 1,2g/l de Na_2HCO_3 , 25mg/l de ampicilina e 100mg/l de sulfato de estreptomicina. É adicionado à este meio um volume de soro fetal bovino (FCS) para se ter 10 ou 20% (v/v) de FCS e ainda, para os clones transfectantes, o antibiótico G418 50 ou 100 $\mu\text{g/ml}$. As células são incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e temperatura de 37°C até atingirem confluência desejável para posterior utilização. O meio de cultura é trocado em média a cada 2 ou 3 dias por meio fresco, para células parentais e clones, respectivamente. Ao atingirem a confluência, preenchendo o fundo das garrafas de cultura, as células são lavadas com tampão PBSA, desprendidas do substrato por tripsinização, ressuspendidas em meio de cultura fresco e transferidas em alíquotas para outros frascos ou placas.

Para experimentos com células carenciadas ou quiescentes, o carenciamento para soro das células em subconfluência é feito lavando-as 2x com tampão PBS, 1x com meio DME e finalmente as células são mantidas em DME sem soro por 48h (células Y-1 e clones) ou em meio DME/0,5% FCS/G418 50-100 $\mu\text{g/ml}$ por 24h (células AR-1, 3T3 e clones destas).

III.2.2 - EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO DE RNA TOTAL E TRATAMENTO COM DNase

Este protocolo descreve a obtenção de RNA total de células Y-1 pelo método convencional empregando o agente desnaturante tiocianato de guanidina, seguido de extrações de impurezas apolares com fenol e a mistura clorofórmio/álcool isoamílico e precipitação em meio salino com álcool isopropílico (**Chomczynski & Sacchi, 1987**). Finalmente o RNA obtido deve ser tratado com DNase para remoção de qualquer contaminante de DNA genômico. O procedimento consiste em: lavar as placas de 100mm de diâmetro contendo células Y-1 em subconfluência sob crescimento exponencial por 2x com tampão PBS gelado; lisar as células com 0,5ml de solução 4M de tiocianato de guanidina contendo 0,7% de β -mercaptoetanol; coletar os lisados em tubos Eppendorf e adicionar solução de acetato de sódio 2M pH 4,0 (na concentração final de 0,2M) e de um igual volume da mistura fenol (saturado com água) /clorofórmio (49 partes de clorofórmio para 1 de álcool isoamílico) (1:1); agitar os tubos em vortex por 10s, resfriar em gelo por 15min e centrifugar a 10000rpm por 20min a 4°C; coletar a fase aquosa e transferir para um tubo limpo contendo 0,5 ml de isopropanol; misturar bem, deixar a -20°C por 45min e centrifugar a 10000rpm por 15 min; descartar o isopropanol e deixar o sedimento secar por uns minutos; dissolver o sedimento em 0,1ml solução de lise e precipitar com isopropanol como anteriormente; lavar o sedimento (RNA) com etanol 75% gelado, secar e ressuspender em 100 μ l água bidestilada estéril; incubar em um volume final de 20 μ l 10 μ g de RNA com 10U de DNase I em tampão de reação de DNase I por 15min a 25°C; repetir a extração com fenol/clorofórmio e precipitar com isopropanol como descrito; lavar o precipitado com etanol 70%, deixar secar ao ar e

ressuspender em água bidestilada; quantificar o RNA por medida de absorbância a 260nm em espectrofotômetro (Abs = 1 corresponde a 40µg/ml de DNA)e verificar sua integridade em gel de agarose 1%/formaldeído 7%. RNAs de diferentes placas de células Y-1 foram extraídos várias vezes.

III.2.3 - TRANSCRIÇÃO REVERSA DOS mRNA

Este protocolo descreve a obtenção de híbridos de fita dupla DNA/RNA ou cDNAs para todos os mRNAs expressos por Y-1 no momento da lise celular, através do anelamento de oligonucleotídeos poli(dT)₁₂₋₁₈ com as extremidades 3' dos mRNAs contendo sequências de poli A, seguido de reação de transcrição reversa. O protocolo consiste em: misturar 3µl de água, 5µl de RNA total (~2µg) e 1µl (500ng) de oligo (dT)₁₂₋₁₈; aquecer esta mistura por 10min a 70°C, resfriar rapidamente em gelo, centrifugar e adicionar 4µl de tampão TR, 4µl de 100µM dNTPs e 2µl de DTT 0,1M; incubar esta mistura a 37°C por 2min, adicionar 1µl de transcriptase reversa Superscript RT RNase H⁻ e deixar a reação prosseguir na mesma temperatura por 1h; interromper a reação com a adição de 4µl de EDTA 0,5M pH 8,0.

III.2.4 - AMPLIFICAÇÃO DO cDNA POR PCR

Este protocolo descreve a amplificação específica do cDNA do ACTHR obtido da reação de transcrição reversa através da técnica de PCR (polimerase chain reaction) com um “downstream primer” de sequência 5'-TCGTGATTTCTGTAAGTC-3' e um “upstream primer” de sequência 5'-TTTACAACACTCAAAGCA-3' complementares ao cDNA do ACTHR (**Cammas et al, 1995**). O procedimento consiste em: montar uma reação num volume de 50µl em tubo Eppendorf de 0,5ml com 20,5µl de água, 5 µl de tampão para PCR, 8µl de 100µM dNTPs, 2µl de 50µM

de “upstream primer”, 2µl de 50µM de “downstream primer”, 10µl de produtos de transcrição reversa e 0,5µl de AmpliTaq DNA polimerase; incubar a reação em “thermocycler” durante 30 ciclos de amplificação nas condições 94°C por 1min, 49°C por 1,5min e 72°C por 1min, com posterior extensão de cadeia a 72°C por mais 10min; terminar a reação com resfriamento a 5°C e depois a -20°C. Estas amplificações foram repetidas mais uma vez com a mesma reação de transcrição reversa e também com outras. Além disso, reamplificações dos cDNAs amplificados foram utilizadas como controle.

III.2.5 - ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO do cDNA

Este protocolo descreve como se obtém cDNAs de alto grau de pureza, após uma reação de PCR, a fim de se utilizá-los em clonagens subsequentes onde contaminantes interferem com todas as etapas do protocolo. O cDNA do ACTHR obtido do PCR foi isolado em gel de agarose como descrito em III.2.8. A banda correspondente ao cDNA (~1kb) foi cortada do gel e purificada com o kit Sephaglas BandPrep para purificação de DNA. O procedimento usando o kit consiste em: dissolver a agarose contendo o fragmento de DNA por 5-10min a 60°C com uma solução tamponada de NaI; adicionar uma resina de sílica para adsorção do DNA e agitar por 5min; centrifugar a 5000rpm, descartar o sobrenadante aquoso e lavar 3x com uma solução tamponada contendo cerca de 70% de etanol absoluto, intercalando-se com centrifugações; deixar o “pellet” de resina secar ao ar por 10min; adicionar 50µl de TE e ressuspender a resina por 5min; centrifugar e coletar o eluato contendo o cDNA dissolvido; analisar novamente o cDNA obtido em gel de agarose 1% para comprovação qualitativa de rendimento e pureza. Todo este procedimento foi repetido com cDNAs de diferentes PCRs.

III.2.6 - SUBCLONAGEM DO cDNA AMPLIFICADO EM VETOR BACTERIANO

Este protocolo descreve a utilização do kit pMOSBlue T-vector para clonagem de produtos de PCR, para se fazer a subclonagem do cDNA do ACTHR, para amplificação em massa e usos posteriores como sequenciamento, por exemplo. Este kit fornece um plasmídeo linearizado (pMOSBlue T) contendo timidinas adicionais na extremidade 3' para facilitar a reação de ligação ao inserto de cDNA amplificado por PCR, que por sua vez possui adeninas desemparelhadas na extremidade 3'. A ligação deixa de ser entre extremidades polidas e passa a ser entre extremidades coesivas, sendo necessária baixa concentração da enzima DNA ligase e curtos períodos de reação.

O procedimento completo consiste em: montar uma reação de 10 μ l, onde deve-se respeitar a relação molar de ~8 inserto:1 plasmídeo, contendo 1 μ l de tampão de ligação, 0,5 μ l de DTT 100mM, 0,5 μ l de ATP 10mM, 4 μ l de cDNA 0,0375 μ g/ μ l, 2,5 μ l de água livre de nuclease, 1 μ l de plasmídeo pMOSBlue T 50ng/ μ l e 0,5 μ l de T4 DNA ligase; homogeneizar suavemente a mistura e deixar reagir durante a noite à 16°C; armazenar a 4°C antes da transformação bacteriana.

O procedimento de transformação de bactérias consiste em: juntar 20 μ l de células MOSBlue competentes (linhagem de E. coli) e 1 μ l da mistura de ligação; agitar com cuidado e deixar em gelo 30min, 42°C 1min e gelo 2min; adicionar 80 μ l de meio SOC e deixar sob agitação a 200rpm e 37°C por 1h; separadamente, preparar placas de ágar/LB/ampicilina (50 μ g/ml)/tetraciclina (15 μ g/ml) adicionando 35 μ l de X-gal (50mg/ml em dimetilformamida) e 20 μ l de IPTG 100mM sobre as placas e espalhar bem; deixar as placas a 37°C por 1-2h. Para o plaqueamento:

espalhar bem e cuidadosamente 50 μ l da mistura de transformação nas placas, incubar a 37°C durante a noite e observar no dia seguinte o número de colônias crescidas.

Paralelamente a esta subclonagem do cDNA, foram feitas outras com um fragmento teste de 214pb fornecido no kit, para testar principalmente a reação de ligação, a transformação das bactérias e também para a triagem das colônias. Para testar a eficiência de transformação das bactérias competentes, foi utilizado um plasmídeo teste fornecido no kit associado com as outras transformações. Todos os testes seguiram os mesmos procedimentos já descritos. A subclonagem do cDNA do ACTHR de diferentes preparações foi realizada mais de uma vez e sempre produziu um grande número de colônias brancas (explicação no item III.2.7 seguinte).

III.2.7 - TRIAGEM DAS COLÔNIAS BACTERIANAS, MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS E VERIFICAÇÃO DA SUBCLONAGEM DO INSERTO DE cDNA

O plasmídeo pMOSBlue permite uma triagem das colônias de forma fácil e rápida pois, utilizando-se do princípio da α -complementação, gera colônias brancas e azuis quando plaqueado em meio com indicadores X-gal e IPTG. As colônias brancas são recombinantes que possuem o inserto, enquanto que as azuis devem-se ao plasmídeo recircularizado sem o inserto.

Algumas colônias brancas foram incubadas em meio LB líquido durante a noite a 37°C, sob agitação a 200rpm, e a seguir foi feita uma minipreparação de plasmídeos de acordo com o procedimento descrito na seção III.2.10. O DNA plasmidial foi quantificado por absorbância a 260nm (Abs = 1 corresponde a 50 μ g/ml de DNA) e em seguida digerido com os pares de enzimas de restrição Hind III/EcoR

I, Kpn I/Pst I, Hind III/Kpn I e Pst I/EcoR I, que possuem sítios de restrição em ambos os lados do sítio de inserção do fragmento de cDNA no sítio de policlonagem do plasmídeo pMOSBlue T. As reações de digestão foram montadas como se segue: 7µl de pMOSBlueT/ACTHR, 1µl de tampão universal e 1µl de cada uma das enzimas. A mistura foi incubada a 37°C por 2-3h. Para verificar qualitativamente a integridade e pureza do plasmídeo e se houve incorporação do inserto de cDNA, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% (seção III.2.8).

III.2.8 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE FRAGMENTOS DE DNA

Este protocolo descreve um dos métodos mais simples de análise qualitativa de pureza e concentração de DNA, através de sua resolução física em um gel de agarose, submetido a um campo elétrico, na presença de pH e força iônica não desnaturantes. O procedimento consiste em dissolver 1% (w/v) de agarose em volume desejado de tampão TBE 1x por aquecimento e após resfriamento parcial, adicionar solução de brometo de etídeo na concentração final de 100ng/ml. Após a gelificação, aplicar as amostras de DNA de interesse (7µl de plasmídeo, 1µl de água e 2µl de tampão de corrida para DNA) no gel e fazer uma corrida em cuba de eletroforese com tampão TBE 1x por 2-3h a 70V e 25mA. O gel deve ser analisado (visualmente) com lâmpada de UV para localizar as bandas de DNA.

III.2.9 - PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

Este protocolo descreve a obtenção de bactérias que não contém plasmídeo endógeno algum e apropriadas para serem transformadas com qualquer plasmídeo de interesse (“competentes”). Estas bactérias em suspensão com 10% de glicerol ficam estocadas em freezer a -80°C e estão prontas para uso imediato sem

necessidade de um plaqueamento prévio. O procedimento para preparação de bactérias competentes consiste em: crescer uma colônia da cepa HB101 de *E. coli* em 5ml de meio LB durante a noite a 37°C sob agitação a 200rpm; inocular 250ml de meio LB com 2,5ml da cultura crescida durante a noite e manter sob a mesmas condições até alcançar uma absorbância de 0,6-0,7 no comprimento de onda de 600nm. Essa densidade é geralmente alcançada após 3h e corresponde a fase de crescimento exponencial das células. Em seguida as células são centrifugadas a 3500rpm por 5min, a 4°C, em rotor Sorvall tipo SS 34. Todos os seguintes passos são realizados a 0°C: as células são ressuspensas em 125ml de solução 50mM de CaCl_2 , incubadas por 20min e centrifugadas como anteriormente. A seguir as células são ressuspensas em 25ml de solução 50mM CaCl_2 /20% glicerol, aliquotadas em Eppendorf estéreis e mantidas em estoque a -80°C.

III.2.10 - MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Este protocolo descreve a obtenção de vetores plasmidiais em pequena escala, de pureza considerável, através do método clássico da lise bacteriana com lisozima. É feito em meio básico, com detergente, e precipitação do DNA plasmidial de baixo peso molecular em meio levemente ácido com etanol, tomando o cuidado de não degradar o DNA genômico da bactéria, seguido de extrações com solventes apolares dos “debris” celulares e contaminantes. O procedimento consiste em retirar uma colônia de bactérias *E. coli* HB 101 contendo o plasmídeo de interesse de placas-estoque com ágar/LB/ampicilina e incubar em 5ml de meio LB líquido com ampicilina (60µg/ml) a 37°C durante a noite com agitação de 200rpm. A suspensão bacteriana é centrifugada a 8000rpm por 5min, o sobrenadante é descartado e o “pellet” de bactérias é ressuspensado em 300µl da solução Miniprep 1, à temperatura

ambiente, por 5min. Adicionar à esta mistura 150 μ l da solução Miniprep 2, misturar por inversão, deixar em gelo por 5min, adicionar 450 μ l da solução Miniprep 3 e deixar em gelo por mais 5min. A seguir, centrifugar a mistura a 8000rpm por 10min, retirar o sobrenadante, lavar 2x com igual volume da mistura fenol/clorofórmio 1:1 e fazer uma lavagem final com clorofórmio, sendo que todas estas devem ser intercaladas por centrifugações a 5000rpm por 5min. À solução aquosa final são adicionados 3 volumes iguais de etanol absoluto gelado e 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2, sendo a mistura deixada em gelo por 30min. Centrifugar a mistura etanólica por 15min a 15000rpm, fazer uma lavagem com etanol 70% e emborcar o tubo Eppendorf contendo o DNA plasmidial precipitado e aderido ao tubo num papel 3M estéril a temperatura ambiente. Após a secagem, o DNA é ressuspendido em 100 μ l de água ou tampão TE e incubado com 1 μ l de RNase a 37°C por 30min. Deve-se repetir neste ponto o procedimento anterior de extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol para se obter o DNA de interesse purificado e dissolvido em água bidestilada estéril.

III.2.11 - CLONAGEM DO cDNA EM VETOR DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA

Este protocolo descreve todas as etapas necessárias para se clonar um fragmento de DNA em vetor de expressão eucariótica, a partir de sua prévia subclonagem em vetor bacteriano, para poder ser usado posteriormente em experimentos de transfecção em linhagens celulares.

Inicialmente, o plasmídeo pMOSBlue T/ACTHR foi digerido com as enzimas de restrição EcoR I e Xba I, resultando num o fragmento de DNA contendo o cDNA inteiro com extremidades correspondentes. A reação foi montada com: 7 μ l de DNA

plasmidial, 1 μ l de tampão universal, 1 μ l de EcoR I e 1 μ l de Xba I e a mistura foi deixada reagindo por 90min a 37°C. A reação foi aplicada em gel de agarose para isolamento do fragmento de cDNA correspondente, como descrito anteriormente. Após quantificação, o DNA foi submetido a reação de fosforilação com T4 PNK a fim de garantir a fosforilação de suas extremidades 5'. A reação foi montada da seguinte forma: 10 μ l de cDNA, 0,5 μ l de solução de ATP 25 μ M, 1,25 μ l de tampão universal e 0,75 μ l de T4 PNK. Esta mistura foi deixada reagindo por 30min a 37°C e a seguir foi interrompida pela adição de 0,75 μ l de EDTA 0,5M pH 7,0.

O vetor plasmidial de expressão eucariótica pSVK3 foi obtido após transformação de bactérias *E. coli*. HB-101 seguida de uma minipreparação de plasmídeos, como descrito. Amostras de plasmídeo purificadas e quantificadas foram submetidas a digestão com as enzimas de restrição EcoR I e Xba I, como descrito anteriormente. Este plasmídeo linearizado foi isolado em gel de agarose por eletroforese, depois foi purificado e quantificado. Amostras de pSVK3 linearizado foram submetidas a reação de desfosforilação com fosfatase alcalina para evitar o seu próprio anelamento. A reação foi montada como se segue: 10 μ l de DNA plasmidial cortado com EcoR I e Xba I, 2 μ l de tampão para fosfatase e 0,5U de fosfatase alcalina diluída em 8 μ l de tampão de diluição. Esta mistura foi deixada reagindo por 45min a 37°C e na sequência foram adicionados mais 8 μ l de fosfatase diluída, 0,8 μ l de tampão de fosfatase e a mistura foi incubada por mais 45min a 37°C. Para inativação da enzima a mistura foi deixada por 20min a 65°C.

A reação de ligação do fragmento de cDNA do ACTHR ao plasmídeo, ambos com extremidades Xba I e EcoR I, foi montada (10 μ l de cDNA, 2 μ l do plasmídeo, 4 μ l de tampão de DNA ligase e 4 μ l de T4 DNA ligase) e incubada a 15°C por 24h. A

proporção molar usada de inserto/plasmídeo foi de ~8:1. Uma transformação de bactérias *E. coli*. HB 101 com o produto desta reação foi realizada da seguinte forma: misturar 90µl de bactérias competentes com 5µl de produtos da reação de ligação, deixar 30min no gelo, 2min a 37°C, 10min no gelo, adicionar 400µl de meio LB líquido e incubar a 37°C por 1h. A seguir, colocar 100µl desta mistura em placas de ágar/LB/ampicilina para cada plasmídeo usado e deixar durante a noite a 37°C.

Colônias escolhidas aleatoriamente obtidas foram incubadas em 5ml de meio LB líquido e deixadas durante a noite a 37°C sob agitação. Uma minipreparação destes plasmídeos foi realizada e a uma amostra do plasmídeo purificado e quantificado foi utilizada numa reação de digestão com as mesmas enzimas de restrição EcoR I e Xba I, para liberação do fragmento de cDNA clonado. Para verificar se houve a clonagem do cDNA do ACTHR no vetor de expressão pSVK3, cuja construção foi denominada pSVACTHR, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1%. Esta clonagem foi realizada mais 4 vezes da mesma forma, com cDNAs de ACTHR de placas diferentes de células Y-1.

III.2.12 - SEQUENCIAMENTO DO cDNA NO VETOR pMOSBlueT

O protocolo em que foi baseado o kit utilizado é o de dideoxinucleotídeos de Sanger (**Sanger et al, 1977**). Este protocolo descreve o sequenciamento do cDNA do ACTHR subclonado no vetor pMOSBlueT com o uso do primer -40 do próprio kit e do “upstream primer” usado nas amplificações por PCR.

O procedimento consiste inicialmente em fazer a desnaturação alcalina do pMOSBlue T/ACTHR da seguinte forma: juntar 8-10µg de DNA plasmidial com 2µl de primer -40 ou “upstream primer”, em 20µl solução final, e adicionar 0,1 volumes

de EDTA, 0,1 volumes de NaOH; aquecer por 3min a 65°C; adicionar 0,1 volumes de acetato de sódio mais 3-4 volumes de etanol absoluto gelado e deixar precipitar a -70°C por 30min ou -20°C durante a noite. A seguir, centrifugar por 15min a 14000rpm, descartar o sobrenadante, lavar o precipitado com 3-4 volumes de etanol 70%, centrifugar 5min a 14000rpm, descartar o sobrenadante e deixar o DNA precipitado desnaturado secar ao ar por cerca de 20min.

Na sequência, deve-se montar as 4 reações da seguinte forma: ressuspender o DNA em 8µl de água bidestilada estéril, adicionar 2µl de tampão de sequenciamento e levar ao banho-maria 37°C por 15-20min para o anelamento do “primer” e plasmídeo desnaturados. Adicionar à esta solução: 2µl de mistura de marcação (diluída em água 1:5, v/v), 1µl de DTT, 1µl de α -³⁵S dATP ou α -³³P dCTP, 2µl de sequenase (diluída com tampão de diluição 1:8, v/v), misturar, centrifugar e deixar a temperatura ambiente por 10min. Durante esta reação, em 4 tubos Eppendorfs de 0,5ml são colocados 2,5µl de cada mistura de terminação ddN e os tubos são incubados em banho-maria a 37°C por 3-5min. Terminada a reação de marcação, 3,5µl desta mistura é transferida a cada um dos 4 Eppendorfs, que são misturados, centrifugados e levados ao banho 37°C por 10min. Após este período, a reação de terminação é interrompida com a adição de 4µl da mistura de interrupção.

Em um gel de sequenciamento desnaturante (8% de poliacrilamida e 8M de uréia) de 0,4mm de espessura x 15cm de largura x 50cm de comprimento, montado numa cuba vertical com tampão TBE 1x, são aplicadas alíquotas de 3-5µl das 4 amostras do DNA plasmidial terminadas com A, C, G, ou T em canaletas diferentes, pré-aquecidas a 75°C por 5-10min para total desnaturação das fitas simples de DNA

de tamanhos variados. A eletroforese é mantida a 40-45°C, 2000V e 40-50W por períodos de 2-10h. Após a corrida, a cuba é desmontada e o gel é seco em transferidora a vácuo da Bio-Rad sobre papel 3M. O gel aderido ao papel é colocado em cassete com chapas de Raio X para sensibilização em freezer a -80°C por 24-48h. A seguir as chapas de RX são reveladas e a sequência de bases do DNA lidas em trans-iluminador.

Todo o sequenciamento foi realizado de forma manual e repetido várias vezes com plasmídeos obtidos de diferentes preparações de RNA total e cDNA.

III.2.13 - CO-TRANSFEÇÃO EM CÉLULAS 3T3 E AR-1

Este protocolo descreve a geração de clones celulares, expressando ou não o ACTHR, através da incorporação de um vetor plasmidial de expressão eucariótica no DNA genômico destas células, usando o método de lipossomos catiônicos carregando o DNA ligado. A co-transfecção de células 3T3 e AR-1 com os vetores pSVACTHR e pSVK3 foi realizada com o vetor pSV2-neo, que carrega um gene de resistência ao antibiótico neomicina e possui um promotor forte de expressão constitutiva (SV40). A seleção de células transfectadas com este plasmídeo foi feita com um antibiótico da família da neomicina, o G418. O procedimento completo está descrito a seguir.

III.2.13.1 - MÉTODO DA LIPOFECTINA

1. Plaquear $2-3 \times 10^5$ células 3T3 e AR-1 em placas de 60mm de diâmetro (confluência de ~50%) em meio DME/10% soro e incubar em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24h.
2. Preparar as seguintes soluções no dia da transfecção: A) em Eppendorfs de 1,5ml colocar 10µg de DNA plasmidial pSVK3 ou pSVACTHR em 500µl de DME sem

antibiótico e sem soro. Por se tratar de uma co-transfecção, incluir aqui o plasmídeo de resistência pSV2-neo (1µg) numa proporção de 1/10 em relação ao outro DNA. Deixar esta mistura à temperatura ambiente. B) em Eppendorfs de 0,5ml colocar 100µl de DME sem soro e sem antibiótico juntamente com 10µl de lipofectina. Deixar a temperatura ambiente por 30-45min.

3. Misturar o conteúdo dos Eppendorfs B (lipofectina) e A (DNA) e deixar a temperatura ambiente por 10-15min.

4. Durante às etapas anteriores lavar as placas de células com DME sem soro e sem antibiótico por 2x e adicionar 1ml deste meio.

5. Adicionar 0,4ml de DME ao tubo contendo a mistura na proporção de 1/10 até um volume final de 1ml, homogenizar bem e espalhar gotejando lentamente sobre as células das placas, girando-as.

6. Deixar em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 8h para transfecção das células AR-1 e por 14h para células 3T3.

7. Após os respectivos períodos, substituir o meio de transfecção por DME/soro 10% e deixar por cerca de 60h (48h no mínimo).

8. Após recuperação, subcultivar as células em diluições de 1:5 em meio DME/soro 10% e deixar incubando por 24h antes de se iniciar a seleção.

9. Adicionar meio de seleção (DME/soro 10%/G 418) às placas. A concentração de G418 usada é de 200µg/ml de meio para células AR-1 e 500µg/ml de meio para células 3T3.

10. Ao aparecimento de colônias (cerca de 15 dias), escolher as maiores, tripsinizar e transferir para microplacas de 24 poços com meio de manutenção DME/10%FCS/100µg/ml G418. Após completarem a monocamada nos poços, as

células são transferidas e expandidas em garrafas de 10cm² em meio de manutenção (DME/soro 10%/50 ou 100µg/ml G418).

Para estes experimentos, foram utilizados como controles: 1º) para transfecção, o mesmo protocolo anterior com a adição apenas do plasmídeo de resistência pSV2-neo e, 2º) para seleção, apenas as células parentais sem serem transfectadas. Todo este protocolo foi realizado em capela de fluxo laminar e com soluções e materiais estéreis.

III.2.14 - EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Este protocolo mostra a extração, purificação e quantificação de DNA genômico dos clones celulares, bem como sua digestão com enzimas de restrição, a fim de serem utilizados na técnica seguinte de Southern Blot. O procedimento, que se baseia na lise celular, digestão de proteínas e RNA contaminantes com enzimas específicas, extração de “debris” celulares com uma mistura de solventes orgânicos e uma precipitação em meio salino e pH ácido, consiste detalhadamente em:

1) Plaquear as células transfectadas em placas de 100mm de diâmetro em meio de manutenção (DME/20% FCS/G418 100µg/ml) até confluência total. Lavar 1x com PBSA e adicionar, gotejando e de forma bem espalhada, 0,5ml de solução S1. Girar a placa várias vezes até homogeneização, raspar com policial e transferir para tubos Eppendorf de 2ml. Adicionar à estas misturas RNase numa concentração final de 100µg/ml, por um período de 3-12h, em banho-maria a 37°C. Adicionar depois proteinase K nas mesmas condições.

2) Transferir esta mistura para tubos de ensaio pyrex de 15ml e elevar o volume até 5ml com água. Extrair esta solução com uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v) por duas vezes, com centrifugações intercaladas de 5min a

5000rpm. Recuperar o sobrenadante aquoso, fazer uma extração com clorofórmio apenas, e centrifugar em seguida por 10min a 10000rpm. Recuperar o sobrenadante aquoso e adicionar 3 volumes iguais de etanol absoluto gelado e acetato de sódio pH 5,2 até concentração final de 0,3M.

O DNA genômico precipita em longas fibras próximo a interface e é retirado usando uma pipeta pasteur pela ponta, em giros. Quebrar a ponta da pipeta com o DNA em um tubo Eppendorf de 2ml e deixar secar o etanol ao ambiente por 12-24h. Adicionar 1ml de tampão TE e deixar em banho-maria a 37°C por 24h para dissolução. A seguir o DNA genômico é digerido por enzimas de restrição EcoR I e Hind III (3µl de cada) num período de 12h para cada enzima. Retirar então as pontas de vidro das pipetas pasteur dos eppendorfs contendo DNA digerido e concentrar esta mistura em “speed-vac” até um volume de 100µl e quantificar em espectrofotômetro, por medida de absorbância a 260nm. Repetir este procedimento para obtenção de diferentes preparações de DNA genômico, de diferentes clones celulares, isolados de placas diferentes.

III.2.15 - HIBRIDIZAÇÃO POR SOUTHERN BLOT

Este protocolo foi usado para se testar a incorporação do DNA plasmidial contendo ou não o cDNA do ACTHR no DNA genômico dos clones celulares isolados. Isto foi realizado com diferentes preparações de DNA genômico e para cada novo experimento, as etapas seguintes foram refeitas.

III.2.15.1 - FRACIONAMENTO DO DNA

Preparar um gel de agarose 0,7% não desnaturante, aplicar cerca de 15µg de DNA genômico dos clones e deixar resolver esta eletroforese por cerca de 3h a 70-

80V. Fotografar o gel com os DNA digeridos com uma máquina polaroid e lavar o gel por 2x com as seguintes soluções e ordem: 1º) solução 1 Southern blot 20min; 2º) solução 2 Southern blot 20min e, 3º) SSC 2x 5min. A seguir montar uma transferência para membrana de nitrocelulose (Hybond N⁺, polímero derivado de nylon com cargas positivas) por capilaridade, usando como solução de transferência SSC 10x durante 20h. Desmontar a transferência e verificar sua eficiência em luz UV. Lavar a membrana com SSC 5x e levar em estufa para secagem a 80°C por 2h entre dois pedaços de papel 3MM e duas placas de vidro para fixação do DNA.

III.2.15.2 - PREPARAÇÃO DA SONDA RADIOATIVA

Retirar o fragmento correspondente ao cDNA do ACTHR do plasmídeo pSVACTHR por digestão simultânea com as enzimas de restrição EcoR I/Xba I durante 2-3h a 37°C. Separar em gel de agarose, cortar a banda correspondente ao fragmento, extrair com uma mistura de fenol/clorofórmio (1:1), precipitar com etanol e ressuspender em água como descrito anteriormente.

Este fragmento é utilizado como sonda na posterior reação de hibridização e, para isso, é marcado com um oligonucleotídeo radioativo usando o “kit Random Primers DNA Labeling System” da seguinte maneira:

- 1) cerca de 200ng de DNA dissolvido em água são desnaturadas por aquecimento em água em ebulição por 5min e, imediatamente, resfriadas em gelo.
- 2) adicionar ao DNA desnaturado: 2µl de solução de dATP, dGTP e dTTP, 15µl de tampão de reação de marcação de sonda, 5µl de α -³³P-dCTP 3000Ci/mmol (10µCi/µl), água destilada até um volume de 49µl e misturar.
- 3) adicionar 1µl da enzima Klenow, misturar em vórtex e centrifugar brevemente.
- 4) incubar a 37°C por 12h.

- 5) adicionar 5 μ l de tampão de interrupção.
- 6) adicionar 150 μ l de etanol absoluto e 20 μ l de acetato de sódio 3M pH 5,2
- 7) deixar por 1h a -20°C e centrifugar a 15000rpm por 15min.
- 8) descartar o sobrenadante e lavar o “pellet” com etanol 70% gelado.
- 9) deixar secar a temperatura ambiente e dissolver em 50 μ l de TE.

III.2.15.3 - PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO E HIBRIDIZAÇÃO

A membrana de nitrocelulose com os DNAs fixados é submetida a pré-hibridização por 3h a 68°C em solução de: Denhart 5x, SSC 5x, SDS 1% e 100 μ g de DNA de espermatozoides de salmão desnaturado (por 10min a 100°C). A hibridização é realizada a 68°C por 24h na mesma solução de pré-hibridização, agora contendo 50ng da sonda radioativa previamente desnaturada (a 100°C por 10min).

III.2.15.4 - LAVAGENS DA MEMBRANA E EXPOSIÇÃO

Após hibridização, a membrana é lavada com agitação constante no mesmo tubo de hibridização e forno da seguinte forma e ordem: 1) SSC 2x por 2x de 5min cada a temperatura ambiente; 2) SSC 2x/SDS 0,1% por 2x de 10min cada a temperatura ambiente; 3) SSC 0,2x/SDS 0,1% por 2x de 5min cada a temperatura ambiente; 4) SSC 0,2%/SDS 0,1% por 2x de 15min cada a 68°C, e 5) SSC 2x por 2x de 2min cada a temperatura ambiente. Retirar o excesso de SSC da membrana com papel 3MM; a seguir a membrana é envolvida com filme de PVC transparente e exposta a filmes de Raio-X entre telas intensificadoras por 7-10 dias a -80°C.

III.2.16 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENILATO CICLASE POR MEDIDA DE PRODUÇÃO DE cAMP

III.2.16.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS OU EXTRATOS CELULARES

Células foram plaqueadas em placas de 35mm de diâmetro contendo meio de manutenção em confluência de ~60-80% (3 placas para cada linhagem clonal). No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram estimuladas com agonistas de interesse em tempos e concentrações adequadas. Para a obtenção dos lisados celulares, o procedimento seguinte consistiu em: remover o meio, fazer uma lavagem com PBS, adicionar 0,5ml de reagente de lise 1B, incubar por 5min em estufa a 37°C e a seguir agitar a placa horizontalmente em círculos por 10min. Transferir o lisado celular para um tubo Eppendorf de 1,5ml e manter em freezer a -20°C até o ensaio. Antes da utilização, deve-se centrifugar os tubos a 10000rpm por 5min, para baixar os “debris” celulares; utilizar 100µl de extrato obtido de cada placa para determinação de cAMP com o kit.

III.2.16.2 - DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE cAMP PRODUZIDO

O “kit Biotrak cAMP enzymeimmunoassay (EIA) system” combina o uso de um conjugado de cAMP marcado com peroxidase, um antisoro anti-cAMP de coelho, um anticorpo anti-coelho fixado em um substrato (microplaca de 96 poços) e um substrato para a peroxidase. O ensaio é baseado na competição entre o cAMP celular e uma quantidade fixa de cAMP marcado com peroxidase para um determinado número de sítios de ligação no anti-cAMP específico. Assim a quantidade de cAMP marcado ligado ao anticorpo anti-cAMP será oposta a concentração de cAMP não-marcado. O complexo anticorpo primário/cAMP-peroxidase se liga ao anticorpo secundário imobilizado nos poços e o cAMP-

peroxidase livre é removidos por lavagens. A quantidade de cAMP marcado com peroxidase ligada ao anticorpo é determinada pela adição do substrato peróxido de hidrogênio/tetrametilbenzidina (PH/TMB), resultando numa reação cujo produto colorido é quantificado em espectrofotômetro para microplaca (leitora de ELISA). Níveis de cAMP podem ser detectados na faixa de 12,5-3200fmol/poço. O procedimento completo e sequencial consiste em:

1. Equilibrar todos os reagentes à temperatura ambiente, incluindo a microplaca com anticorpo imobilizado.
2. Preparar 500µl das soluções de cAMP padrão nas concentrações de 12,5, 50, 200, 800 e 3200fmol em reagente de lise 1B.
3. Montar a microplaca com poços suficientes para todos os padrões, amostras e controles, todos em duplicata e em ordem sequencial, inicialmente adicionando 200µl de reagente de lise 1B nos poços de ligação não-específica (NSB) e 100µl nos poços do branco.
4. Pipetar 100µl de padrão e das amostras no respectivos poços. Se necessário, diluir as amostras com reagente de lise 1B.
5. Pipetar 100µl de antisoro anti-cAMP em todos os poços, com exceção do branco e NSB.
6. Cobrir a placa, misturar suavemente e incubar a 3-5°C por 2h.
7. Pipetar 50µl do conjugado cAMP-peroxidase em todos os poços, exceto no branco.
8. Cobrir a placa, misturar suavemente e incubar a 3-5°C por 1h.
9. Aspirar o mistura e lavar todos os poços com tampão de lavagem por 4x. Inverter a placa sobre um papel para enxugar qualquer solução residual.

10. Adicionar rapidamente 150µl de substrato para peroxidase PH/TMB em todos os poços e deixar agitando lentamente em agitador planar circular à temperatura ambiente (15-30°C) por 1h. Uma cor azul surge e pode ser lida a 630nm. Todavia, recomenda-se interromper a reação antes do ponto final (cerca de 30min) adicionando 100µl de ácido sulfúrico 1M em cada poço. Agita-se a temperatura ambiente durante 5-10min e faz-se a leitura em 450nm dentro de no máximo 30min.

III.2.16.3 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO E TRATAMENTO DOS DADOS

Para se determinar os valores de cAMP produzido por cada amostra, deve-se fazer uma curva de calibração. Para isso utiliza-se os valores de absorbância obtidos para os padrões de cAMP de concentrações conhecidas na fórmula:

$$\% B/Bo = \frac{(Abs. \text{ padrão ou amostra} - Abs. NSB)}{(Abs. Branco - Abs. NSB)} \times 100$$

onde, % B/Bo = percentagem de cAMP ligado/cAMP livre. Deve-se fazer então um gráfico de %B/Bo versus concentração de cAMP em papel semi-log a fim de se ler os valores de cAMP das amostras diretamente da curva.

A normalização dos dados para as amostras desconhecidas foi feita através da quantificação das proteínas totais solúveis. Para isso placas de células nas mesmas condições do ensaio de cAMP foram lisadas com solução 1B e os lisados guardados em freezer. O método para quantificação utiliza o reagente de Bradford, que resulta num produto colorido lido em 595nm, e consiste em: preparar soluções de albumina de concentrações conhecidas, fazer a leitura em espectrofotômetro e plotar Abs versus concentração de albumina; isto resulta numa reta de 1º grau, cuja equação da regressão linear é utilizada para a obtenção das proteínas totais.

Experimentos de medida e produção de cAMP foram repetidos 3-5 vezes para cada célula, sendo que as curvas de dose-resposta e as cinéticas de tratamentos com ACTH foram feitas 2 vezes para cada célula e os valores finais apresentados representam a média destes experimentos mais ou menos o desvio padrão.

III.2.17 - CURVAS DE CRESCIMENTO DOS CLONES CELULARES

Este protocolo determina curvas de crescimento de clones celulares transfectantes, durante 5 dias, em meio de manutenção DME/ 10% FCS/ 50 ou 100µg/ml G418, contendo ou não ACTH.

Células foram plaqueadas em placas de 35mm de diâmetro contendo meio DME/10% FCS em duplicatas e, após 24h do plaqueamento, estando as células bem aderidas e em crescimento exponencial, adicionou-se ACTH 1nM em metade das placas. A cada 24h da adição do hormônio foi retirado um par de placas de cada célula, até um total de 120h ou 5dias. Completados 3 dias de plaqueamento ou metade do período do experimento, o meio foi trocado e ACTH foi adicionado novamente à cultura, na mesma concentração. As placas retiradas diariamente eram submetidas a uma preparação onde as células se encontravam em uma suspensão final, pronta para contagem em contador automático da Celm. Este procedimento consistiu em:

- 1) Retirar o meio das placas.
- 2) Lavar com PBSA 1x.
- 3) Adicionar 200µl de tripsina e levar as placas para a estufa a 37°C por 2min.

- 4) Após as células se soltarem totalmente das placas, adicionar 800µl de meio com 10% de soro (v/v), ressuspender delicadamente e colocar em tubo cônico. Lavar as placas com mais 1ml deste meio e juntar ao tubo (volume final de 2ml).
- 5) Centrifugar por 10min a 2000rpm.
- 6) Retirar o meio deixando uma pequena quantidade no fundo do tubo para soltar o “pellet”.
- 7) Adicionar e ressuspender o “pellet” em 1ml de fixador recém-preparado (3:1 etanol:ácido acético) e deixar por 5-10min a temperatura ambiente.
- 8) Centrifugar por 10min a 2000rpm.
- 9) Retirar o fixador, ressuspender em 1ml de PBS e deixar na geladeira até a contagem, quando então deve-se diluir apropriadamente (20-100x).

Estes experimentos foram realizados em 3 placas isoladas para cada célula e os resultados apresentados correspondem a médias $\pm$ desvio padrão.

III.2.18 - DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE DNA OU DA TRANSIÇÃO G1→S DO CICLO CELULAR POR INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA TRITIADA

Este protocolo descreve uma forma de se identificar (e quantificar) se um agente qualquer é capaz de promover ou inibir a síntese de DNA de células em cultura através da incorporação do nucleosídeo timidina marcado radioativamente com trítio (^3H -metil-timidina). A seguir as células são lisadas e a radioatividade incorporada é medida em cintilador. O procedimento consiste em:

- 1) Plaquear as células em placas com 24 poços (~80.000 células/poço) em meio de manutenção DME/10% FCS e deixar em crescimento exponencial até atingirem subconfluência.

- 2) Retirar o meio, lavar 2x com PBS, 1x com DME e adicionar 1ml de DME/soro 0,5%, deixando por 24h.
- 3) Após este período adicionar 0,5 μ Ci de timidina tritiada para 10⁻⁷M de timidina fria (concentração final) e estimular as células com FGF, ACTH e a combinação destes por um período máximo de 24h, sendo que deve-se coletar as amostras em duplicatas nos tempos 0, 6, 12 e 24h.
- 4) Lavar as amostras coletadas 1x com PBS, fixar por 20min com 1ml de TCA 10% gelado, neutralizar (solubilizar) com 0,25ml de NaOH 0,5M e coletar os lisados em um retângulo de ~1,5x2cm de papel Whatmann por capilaridade.
- 5) Lavar os papéis contendo os extratos celulares com TCA 5%, etanol 70% e acetona 1x cada, e então secar em estufa a 60°C por no mínimo 2h.
- 6) Colocar os papéis de cada amostra em frascos de cintilação contendo 5-10ml de líquido de cintilação e levar para um cintilador Packard para contagem das emissões.

Estes experimentos foram realizados em duplicatas de placas e os valores mostrados são médias mais ou menos o desvio padrão.

III.2.19 - DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DAS FAMÍLIAS FOS E JUN E DA PROTEÍNA c-MYC POR IMUNOCITOQUÍMICA, USANDO REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE

Este protocolo descreve a marcação de células, estimuladas com diversos agentes, através do uso combinado de um anticorpo primário que reconhece a proteína nuclear de interesse, um anticorpo secundário biotinilado e uma peroxidase associada a avidina, resultando numa reação de imunoperoxidação altamente específica e que pode ser quantificada contando-se as células com os núcleos

marcados pelo acúmulo localizado do produto da reação de peroxidação. Este protocolo foi realizado com células parentais e clones transfectantes mantidos em cultura em meio DME/soro 10%, com ou sem G418, na ordem que se segue abaixo:

1. Após tripsinização e suspensão das células cultivadas, plaquear 40 μ l em lamínulas de vidro circulares com cerca de 1,5cm de diâmetro. Deixar na estufa por 30min em meio DME/soro 10% para aderência das células, em placas de 6 poços (35mm diâmetro), contendo duplicatas de lamínulas em cada poço. A seguir adicionar 2 ml deste meio e deixar ao menos 24h em cultura, atingindo assim confluências variáveis para cada tipo celular e necessidade experimental.
2. Retirar o meio, lavar 2x com PBS, 2x com DME, adicionar meio DME/soro 0,5% e deixar em estufa por 24h para carenciamento.
3. Estimular as células carenciadas com as drogas ou substâncias de interesse por adição ao meio de cultura das placas.
4. Retirar o meio das placas com as lamínulas e lavar 1x com PBS.
5. Acrescentar 2 ml de formaldeído 3,7% em PBS fresco por 20 min.
6. Retirar o fixador, lavar 3x com PBS e deixar as lamínulas em PBS na geladeira até o dia da imunoperoxidação (não excedendo 3 dias).
7. Retirar da geladeira e deixar as lamínulas atingirem a temperatura ambiente. Enquanto isso preparar uma tampa de placa com 24 poços, marcando as condições de tratamento e colocando um parafilme bem esticado. Esse parafilme deverá ser mudado cada vez que for necessário. Sobre o parafilme colocar, em cada local referente a um poço, 40 μ l de NP40 1% em PBS e, com uma pinça, pegar cada lamínula e colocar sobre a gota com as células voltadas para baixo; incubar por 20min nas condições ambiente.

8. Voltar as lamínulas para as placas devidamente marcadas contendo PBSA e lavar com PBSA por 3x (as lavagens são sempre com o material das lamínulas voltado para cima). No parafilme colocar 40µl do soro normalizador 5% em PBSA contendo Triton 0,3% por 1h a temperatura ambiente (um soro de animal onde foram feitos os anticorpos secundários que vem no kit usado).
9. Voltar as lamínulas para as placas e lavar com PBSA 3x por 10min cada. Colocar sobre o parafilme 40µl do anticorpo primário desejado, na concentração previamente titulada, diluída em PBSA + 0,3% de Triton e BSA 1mg/ml. Deixar durante a noite na geladeira, em caixa plástica com tampa cujo fundo contenha uma espuma de borracha embebida com água. É importante homogeneizar em Vortex o frasco do anticorpo antes e depois de diluído.
10. Voltar as lamínulas para as placas e lavar com PBSA 3x por 10min cada.
11. Colocar sobre o parafilme 40µl de anticorpo secundário biotilado diluído em PBSA + 0,3% Triton e incubar por 1h nas condições ambiente. Este anticorpo secundário é diluído 1:800 (v/v) em PBSA + 0,3% Triton com 15µl do soro normal (1,5%) e 5µl (0,5%) de anticorpo secundário. Nesta fase já preparar o complexo ABC (980 µl do PBSA + 0,3% de Triton com 10µl do reagente A e 10µl do reagente B), pois é necessário deixá-lo descansando por no mínimo 30min antes do uso.
12. Voltar as lamínulas para as placas e lavar 3x com PBSA por 10 min cada.
13. Colocar sobre o parafilme 40µl do complexo ABC e incubar por 1h. Retirar as pastilhas de DAB e de peróxido de amônia do freezer.
14. Voltar as lamínulas para as placas e lavar 3x com PBSA por 10min. Preparar o DAB, dissolvendo uma pastilha de cada em 15ml de água deionizada.

15. Retirar, com pipeta Pasteur, o PBSA das placas contendo as lamínulas e adicionar o DAB por ~1min (trabalhar em capela de fluxo e com luvas porque o DAB é suspeito de ser carcinogênico). Retirar o DAB e lavar as lamínulas 2x com água.
16. Deixar em água até montar a lâmina. A lâmina deve ser previamente lavada, limpa e marcada com as indicações dos diferentes tratamentos. O lado sem células da lamínula é seco com papel e então ela é colada com “entellan” com as células voltadas para cima e deixada secar por alguns minutos. Em nenhuma outra ocasião dos procedimentos anteriores este material (células) pode ficar seco.
17. Contracorar as células da seguinte forma: a) mergulhar a lâmina em solução etanólica de hematoxilina por 1min; b) lavar bem em água corrente e por último lavar uma vez em água destilada; c) mergulhar a lâmina em solução saturada de LiCO_3 ; d) lavar bem em água corrente e a última vez com água destilada e e) deixar secar por várias horas ou durante a noite, à temperatura ambiente.
18. Montar, depois de seca, com uma gota de óleo mineral sobre uma lamínula de 18x18mm. Nas extremidades da lamínula quadrada colocar pequenas gotas de esmalte para não deixar a lamínula se deslocar.
19. Analisar em microscópio de luz, contando um total de ~500 células de cada lamínula, verificando as que possuem núcleo marcado ou não comparando-as com o controle negativo (células não tratadas). Fotografar no mesmo microscópio com filtros e aumentos adequados para comprovação e registro dos resultados. Cada experimento refere-se a média das duas lamínulas e os resultados apresentados referem-se a médias de 2 ou 3 experimentos independentes $\pm$ desvio padrão.

III.2.20 - EXPERIMENTOS DE WESTERN BLOT PARA AS PROTEÍNAS ERK1,2, AKT/PKB, JNK, CREB E p27^{Kip1}

Este protocolo determina os níveis de uma proteína, ativada ou não, em lisados de células estimuladas com agentes diversos, em determinadas condições de cultivo, através do isolamento destas proteínas em gel de poliacrilamida, transferência para membranas apropriadas e reconhecimento por anticorpos específicos que se ligam a determinadas regiões (epitopos) destas proteínas. O protocolo todo consiste de várias etapas isoladas descritas a seguir.

III.2.20.1 - OBTENÇÃO DOS LISADOS CELULARES

Este procedimento consiste em: lavar as células cultivadas em placas p60 (MAPK, AKT) ou p100 (p27, JNK, CREB) por 2x vezes com PBS e adicionar 0,2ml de tampão de amostra SDS (ERK, AKT), 0,5 ml de tampão de lise NP-40 (p27) ou 1ml de tampão RIPA (JNK, CREB) por placa, sendo os 2 últimos casos acrescidos de inibidores de protease e fosfatase na hora da lise; manter as placas em gelo durante 10-20 min (com exceção da lise para ERK e AKT, que deve ser feita o mais rápido possível) até que as células comecem a se soltar; raspar as placas com um policial e centrifugar a 10000rpm (p27) ou 14000rpm (ERK, AKT, JNK, CREB) por 10 min; aliquotar o sobrenadante em Eppendorfs e guardar em freezer -80°C. Reservar uma alíquota (p27, JNK, CREB) para dosagem de proteínas totais, utilizando o método de Bradford descrito anteriormente.

III.2.20.2 - SDS-PAGE

Este procedimento consiste em: pipetar um volume de lisado contendo 100µg (p27, JNK, CREB) de proteína total, adicionar tampão de amostra para SDS-PAGE 1x, aquecer por 10min, em água em ebulição, e resfriar em gelo. Para lisados de

ERK e AKT: tomar uma alíquota de 60 μ l, aquecer em banho de água em ebulição por 5min e resfriar em gelo. Resolver as proteínas em gel de poliacrilamida 10 ou 12% e realizar a eletroforese durante a noite a 15mA, em tampão de corrida para proteína.

III.2.20.3 - WESTERN BLOT

Este procedimento consiste em: transferir as proteínas do gel para membrana de nitrocelulose "Hybond-C Extra" em cuba de transferência "semi dry" Bio Rad, aplicando-se 23V, 500mA e 50W por 1h; corar a membrana com solução de Ponceau para verificação da eficiência da transferência; bloquear as proteínas imobilizadas na membrana incubando-a em 20ml de TBST/5% leite em pó desnatado por 1h (p27, AKT, JNK, CREB) ou 2-3h (ERK) a temperatura ambiente; lavar a membrana 5min por 3x com TBST e incubar com o anticorpo primário diluído 1:1000 em TBST por 2h, a temperatura ambiente (p27), ou durante à noite, a 5°C, em 20ml de TBST/5% leite em pó desnatado (ERK) ou TBST/2,5% BSA (AKT, JNK, CREB); lavar 3x por 5min TBST e incubar com o anticorpo secundário HRP (Horseradish Peroxidase) diluído 1:1000 (v/v) em TBST por 1h; lavar a membrana por 3x por 5min cada com TBST e fazer a detecção com o "kit ECL". O tempo de exposição dos filmes varia de 5s a 5 min para ERK, JNK CREB e p27, de modo a resultar em uma melhor resolução das bandas com um menor "background". Entretanto, para AKT/PKB, exposições até 10min resultam em sensibilizações muito fraca dos filmes e, para se tentar contornar isso, a membrana era colocada em cassetes contendo 3 ou mais chapas de raios X por 0,5-2h. Depois disso, as chapas eram reveladas, ficando normalmente muito fracas, médias e superexpostas, sendo difícil conseguir uma exposição ideal.

Para experimentos de “western blot” com as isoformas não fosforiladas das proteínas CREB, ERK e JNK, foram feitos novos géis e membranas com o mesmo lisado celular ou então, como é mais comum, as membranas foram reutilizadas após a utilização com o anticorpo que detecta as isoformas fosforiladas. Para isso foi feito um “stripping” destas membranas (III.2.20.4).

Nos experimentos de “western” para AKT/PKB fosforilada, foi muito frequente o aparecimento de uma banda logo abaixo de AKT, que foi considerada como sendo uma interação inespecífica do anticorpo com uma proteína qualquer de expressão constitutiva. Esta banda foi considerada como sendo um controle interno do experimento, quanto a variação de expressão de AKT total, não sendo necessário realizar outro experimento para detecção das isoformas não fosforiladas. Esta interação não específica ocorreu com frequência para determinados lotes do anticorpo e também foi causada pela reutilização do mesmo anticorpo 2-3 vezes.

III.2.20.4 - REUTILIZAÇÃO DA MEMBRANA DE WESTERN BLOT ("STRIPPING")

Após a utilização da membrana em experimentos para detectar as isoformas fosforiladas de CREB, ERK e JNK, ela é lavada por 5min 3x com TBST 1x, incubada com solução de “stripping” por 20min, à temperatura ambiente, e depois lavada 4x de 10min com grande volume de TBST, sempre com agitação constante em agitador tipo gangorra. Depois disso a membrana é novamente corada com solução de Ponceau, lavada com água e submetida a novo bloqueio em TBST/leite em pó 5% por 30min.

III.2.21 - ENSAIO DE RAS-GTP

Células Y-1 foram plaqueadas em placas p100 em meio DME/10% FCS, carenciadas por 48h na ausência de soro e depois estimuladas com agonistas de interesse por 15 ou 30min. As placas foram lavadas com PBS gelado e lisadas com tampão RIPA, na presença de 1 μ g/ml de leupeptina e aprotinina. O lisado foi centrifugado a 10000rpm, por 10min a 4°C, e os sobrenadantes coletados e congelados até o dia do experimento. Proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford. Alíquotas de lisado, contendo 500 μ g de proteínas, foram incubadas com partículas de resina de “sepharose”-glutathione ligadas às proteínas de fusão RBD-GST (Raf1 binding domain – glutathione S transferase) por 1h, a 4°C. As partículas carregando a proteína Ras-GTP ligada a RBD foram recuperadas por lavagens com tampão RIPA e centrifugações intercaladas a 2000rpm, por 2min a 4°C, num total de 4. A seguir, as partículas foram aquecidas na presença de tampão de amostra por 5min até ebulição da água do banho, e analisadas em “western blot” usando anticorpos de coelho anti Ha-Ras e de camundongo anti Ki-Ras. As proteínas Ras-GTP foram comparadas com Ras total em experimentos paralelos de “western blot” com 100 μ g de proteína total.

IV. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

IV. 1 - GERAÇÃO DE CLONES TRANSFECTANTES DE CÉLULAS AR-1 E FIBROBLASTOS 3T3 EXPRESSANDO O ACTHR FUNCIONAL

IV. 1.1 - AMPLIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO cDNA DO ACTHR

O cDNA do receptor de ACTH foi obtido através de: 1º) reação de transcrição reversa dos mRNAs contidos no RNA total, usando oligonucleotídeos poli(dT)₁₂₋₁₈, e 2º) amplificação por PCR, que foi realizada com um par de primers específicos – o “downstream primer” = 5'-TCGTGATTTCTGTAAGTC-3' e o “upstream primer” = 5'-TTTACAACACTCAAAGCA-3' (Cammass et al, 1995). Após o isolamento em gel de agarose, extração e purificação do cDNA, fez-se uma reamplificação por PCR para confirmação da amplificação e pode-se ver na Figura 12, que o cDNA amplificado possui cerca de 1000pb. O gene do ACTH-R de células Y-1, obtido pela primeira vez por Cammass (1995) com os mesmos primers nas reações de RT/PCR, possui 987pb no segmento codificante e foi confirmado por nossos resultados, ao menos com base no tamanho do fragmento amplificado.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1%/brometo de etídeo mostrando o cDNA do receptor de ACTH amplificado e reamplificado por PCR, com tamanho de ~1000pb. A esquerda do gel está o marcador de DNA lambda digerido com Hind III/EcoR I.

IV.1.2 - SUBCLONAGEM DO cDNA DO ACTHR EM VETOR PLASMIDIAL BACTERIANO

O cDNA obtido por PCR foi subclonado no plasmídeo pMOSBlue T e amplificado em bactérias competentes MOSBlue, através do uso de um kit apropriado que baseia-se no princípio da α -complementação para triagem das colônias. Trabalhando com os controles fornecidos pelo kit em paralelo, obteve-se uma alta incidência de colônias brancas analisadas em minipreparações de plasmídeos. Após obtenção dos plasmídeos, realizou-se a digestão com diferentes pares de enzimas (EcoR I/Hind III, Kpn I/Pst I, Hind III/Kpn I, EcoR I/Pst I, EcoR I/Xba I, Xba I/Kpn I) em todas as colônias brancas analisadas e comprovou-se a incorporação ou clonagem do inserto de cDNA no plasmídeo pMOSBlue T, bem como a integridade do plasmídeo (Figura 13). As reações de digestão enzimática revelaram a existência de um sítio de restrição para a enzima Pst I a cerca de 350bases da extremidade 5' do cDNA do ACTHR. Assim, para a retirada do inserto

de cDNA subclonado, foi utilizado o par EcoR I/Xba I, que forneceu terminais coesivos para posterior ligação ao vetor de expressão eucariótica (Figura 13).

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1%/brometo de etídeo do plasmídeo pMOSBlue T com o inserto de cDNA do ACTHR clonado, após digestão com vários pares de enzimas de restrição. Como controles são mostrados o vetor não digerido e o marcador de DNA λ. Digerido com EcoR I/Hind III.

IV.1.3 - CLONAGEM DO cDNA DO ACTHR EM VETOR DE EXPRESSÃO EUCARIÓTICA

O fragmento de cDNA subclonado no plasmídeo pMOSBlue T (Figura 13) foi removido por digestão com as enzimas EcoRI/XbaI e ligado ao plasmídeo de expressão eucariótica pSVK3, pré-digerido com as mesmas enzimas. O produto da reação de ligação foi utilizado para transformação de bactérias e plaqueamento e, das poucas colônias crescidas, algumas apresentavam o inserto do tamanho

esperado, como foi verificado por minipreparações de plasmídeos e posterior digestão com o mesmo par de enzimas acima. O cDNA do ACTHR clonado no vetor de expressão pSVK3, gerando a construção pSVACTHR, mostrada na Figura 14.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1%/brometo de etídeo mostrando o plasmídeo de expressão pSVK3 contendo o inserto de cDNA, após digestão com algumas enzimas de restrição, e o vetor não digerido como controle. O marcador de peso molecular, DNA λ digerido com Hind III/EcoR I, está mostrado no lado esquerdo do gel.

IV.1.4 - SEQUENCIAMENTO DO cDNA DO ACTHR

O sequenciamento do cDNA do ACTHR obtido foi realizado no próprio vetor de subclonagem pMOSBlue T, que possui os sítios T7 (promotor) e F1 (origem de replicação), com a utilização do kit de sequenciamento de DNA “Sequenase Version 2.0”, que baseia-se no método de dideoxinucleotídeos (Sanger et al., 1977). Usando-se o “primer” –40 fornecido no kit, compatível com a sequência de F1, e o “downstream primer” usado nas amplificações por PCR, leu-se a sequência de bases a partir das duas extremidades do cDNA. A sequência obtida para nosso

cDNA foi fiel à previamente determinada em 1995 por 2 grupos diferentes, com excessão da perda de uma sequência de 50pb no terminal 5' correspondente a região que contém o “upstream primer”. De qualquer forma, o fragmento perdido não pertence a região codificadora da proteína e não codifica nenhum peptídeo sinal envolvido na atividade do receptor (Figura 15). Estes experimentos de sequenciamento foram realizados de forma manual e foram repetidos mais de 5 vezes com clones independentes, provenientes de diferentes preparações.

[illegible]

Figura 15. Sequência do cDNA do receptor de ACTH subclonado no vetor pMOSBlue T. A região que compreende o oligonucleotídeo de 18pb (“upstream primer”) usado inicialmente para amplificação do cDNA a partir da extremidade 5’ foi perdida durante a clonagem. NNN - Sítio de policlonagem do vetor pMOSBlue T; NNN - Códon de iniciação/terminação delimitando a região codificadora; NNN – região codificadora do cDNA do ACTHR; NNN – Região complementar ao “downstream primer”; NNN – Região do novo “upstream primer”

IV.1. 5 - CO-TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS 3T3 E AR-1

Os vários experimentos de co-transfecção foram realizados usaram lipofectina e serviram para se determinar as condições mais apropriadas de transfecção, diferentes para as duas células usadas (3T3 e AR-1). Os vetores e construções utilizadas foram: pSVK3, o vetor de expressão eucariótica vazio; pSVACTHR, a construção carregando o cDNA do ACTHR; e pSV2-neo, o vetor de resistência a neomicina ou geneticina necessário para seleção das colônias.

O número de células plaqueadas (confluência de ~50%); o tempo de transfecção (14h para 3T3 e 9h para AR-1); a quantidade e pureza dos DNAs utilizados (relação ótima de 1/10 ou 1/15µg vetor de expressão/vetor de resistência), extraídos com “kit Flexiprep” ou “Midiprep Recovery” de extração de DNA plasmidial; a concentração de lipofectina (5 ou 10µl/2ml de meio em placa p60); a concentração de antibiótico usado na seleção (150-200µg/ml para células AR-1 e 400-500µg/ml para 3T3); o tempo de recuperação ou crescimento das células em meio com soro e sem antibiótico, logo após a transfecção (mínimo de 48h para AR-1 e 24h para 3T3); e o subcultivo após o surgimento das colônias com a seleção (suspensão bem homogênea de células numa razão mínima de 5x), são os principais fatores que limitaram e influenciaram a obtenção de boas e eficientes transfecções nas linhagens celulares de trabalho.

Para se obter um rendimento apreciável de clones celulares, para a construção contendo o cDNA do receptor, foram necessárias várias transfecções enquanto que, para o vetor vazio, muitos clones celulares foram obtidos sem dificuldades na primeira transfecção (Tabela I). Clones de células 3T3 são isolados mais facilmente que de AR-1 resultando em maior número de colônias. Os clones

celulares mostrados na Tabela II foram os de fato isolados e armazenados e são provenientes de diferentes placas, de um total de 5 transfecções. Os transfectantes obtidos que carregam o cDNA do receptor apresentam todos o mesmo aspecto morfológico das células parentais. Em relação a velocidade de crescimento os clones de AR-1 se comportam de forma semelhante a parental, mas os clones de 3T3 apresentam variações, alguns crescendo mais rapidamente, outros mais lentamente (com alto índice de morte celular) e outros são semelhantes as células parentais (maioria).

TABELA I. RENDIMENTO DE COLÔNIAS E CLONES COLETADOS A PARTIR DE 5 CO-TRANSFECÇÕES INDEPENDENTES COM OS VETORES pSV2-NEO, pSVK3 E pSVACTHR.

CO-TRANSFECÇÃO	CÉLULAS	VETOR USADO COM pSV2-neo	NÚMERO DE COLÔNIAS POR PLACA	NÚMERO DE CLONES COLETADOS
1 ^a	AR-1	pSVK3	20	8
		pSVACTHR	6	5
2 ^a	AR-1	pSVACTHR	2	4
2 ^a	3T3	pSVK3	31	11
		pSVACTHR	8	18
3 ^a	3T3	pSVK3	35	5
		pSVACTHR	2	12
4 ^a	3T3	pSVACTHR	11	9

TABELA II. CLONES DE CÉLULAS 3T3 E AR-1 ISOLADOS DAS CO-TRANSFEÇÕES MOSTRADAS NA TABELA I E ANALISADOS NOS EXPERIMENTOS SUBSEQUENTES.

CLONES			
3T3		AR-1	
SVK3	ACTHR	SVK3	ACTHR
04	01	01	01
06	02	05	02
11	03		03
12	07		05
	09		
	10		
	11		
	12		
	13		
	14		
	15		
	16		
	17		
	18		
	19		
	20		
	21		
	22		
	23		
	24		
	25		
	26		
	27		
	28		
	29		
	30		
	31		
	32		
	33		

IV.1.6 - TESTE DA INCORPORAÇÃO DOS VETORES TRANSFECTADOS NO DNA GENÔMICO DE CLONES 3T3 E AR-1 POR SOUTHERN BLOT E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO cDNA DO ACTHR POR RT/PCR

O DNA genômico de alguns clones transfectados com o vetor pSVACTHR, com o vetor vazio pSVK3 ou ainda apenas com o vetor de resistência a neomicina pSV2-neo, foi extraído, digerido com enzimas de restrição, resolvido em gel de agarose e hibridizado com sondas de DNA como o vetor pSVK3 ou o inserto de

cDNA do ACTHR, marcadas radioativamente com P^{32} para o teste da incorporação do vetor no genoma celular (Figura 16). A Figura 16A mostra a incorporação diferenciada dos respectivos vetores nos clones, mas não em Y-1, ao passo que a Figura 16B mostra que houve hibridização do cDNA do ACTHR (do vetor pSVACTHR) com o respectivo gene em células Y-1 ou com o próprio vetor transfetado contendo o cDNA (pSVACTHR) em clones 3T3 e AR-1.

Figura 16 . Experimentos de Southern blot para células Y-1 e clones transfectantes de AR-1 e 3T3 verificando a eficiência da co-transfecção pela incorporação dos vetores no DNA genômico digerido com as enzimas *EcoR I/Hind III* (A) e *EcoR I/Xba I* (B).

A Figura 17 mostra experimentos de RT/PCR de RNA total obtido de células Y-1, AR-1 e 3T3 e seus respectivos clones isolados, para detecção do mRNA do ACTHR. Pode-se ver que células parentais AR-1 e 3T3 não expressam o mRNA do ACTHR, diferentemente de células Y-1 usadas como controle (Figura 17A). Clones transfectantes de AR-1 e 3T3 analisados (Figuras 17B e 17C) mostram que a expressão do mRNA de ACTHR é qualitativamente diferente entre os clones e não é proporcional a incorporação do vetor plasmidial no DNA genômico.

Figura 17. Experimentos de RT/PCR mostrando a expressão do mRNA do ACTHR em células 3T3, AR-1 e Y-1 (A) e clones transfectantes AR-1 e 3T3 (B e C). Em A, primers 1, 2 e 3 referem-se a 3 diferentes pares de oligonucleotídeos que geram fragmentos de tamanhos próximos.

IV.1.7 - ANÁLISE DA FUNCIONALIDADE DO ACTHR EXPRESSO EM CÉLULAS 3T3 E AR-1 POR DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ADENILATO CICLASE OU ENSAIO DE PRODUÇÃO DE cAMP

Experimentos de ELISA para determinação de cAMP produzido por células Y-1, AR-1, 3T3 e clones destas duas últimas foram realizados em células crescendo exponencialmente em meio 10% soro estimuladas com ACTH e outros agentes que elevam os níveis intracelulares de cAMP (Figura 18). ACTH₃₉ estimula fortemente a produção de cAMP em células Y-1, mas não em células que não expressam o receptor de ACTH (parental AR-1 e clones AR-1 SVK3 01 e 05 e ACTHR 01), ao passo que uma estimulação menos acentuada, porém significativa, da produção de cAMP foi observada principalmente nos clones AR-1 ACTHR 03 e 05 comparados a Y-1. A Figura 18 mostra que os níveis basais de cAMP são bastante estáveis em células AR-1 e inferiores aos observados em células Y-1, porém em termos da percentagem de aumento da produção de cAMP sobre o basal, a comparação com Y-1 torna-se mais compatível e relevante, devendo ser considerada para os 3 agentes utilizados. Para todas as células AR-1, forskolina e toxina de cólera, usados como controle positivo, promoveram estimulação da adenilato ciclase, porém o estímulo pode ser considerado baixo por se tratarem de fortes ativadores de proteínas G α s e adenilato ciclase, respectivamente, e ao se comparar com os resultados obtidos para fibroblastos 3T3 e mesmo células Y-1 (Figura 19).

Figura 18. Ensaio de produção de cAMP ou de atividade de adenilato ciclase de células Y-1, AR-1 e clones AR-1 em meio DME/10% FCS/50μg/ml G418 estimulados com ACTH₃₉, Forskolina e Toxina de Cólera nos tempos e concentrações indicados.

Experimentos semelhantes, realizados inicialmente nos clones 3T3 com a finalidade de triagem de clones que expressam o ACTHR funcional, geraram os resultados da Figura 19. De uma forma geral, nota-se que muitos clones isolados como sendo ACTHR não respondem ao estímulo por ACTH₃₉, semelhante aos clones controles 3T3 SVK3 (04, 06, 11, 12), embora promovam a ativação da adenilato ciclase estimulados com forskolina. Por outro lado, muitos outros clones ACTHR apresentam ativação de adenilato ciclase por ACTH de forma semelhante ou superior à observada em células Y-1. Esta resposta variável ao ACTH quanto a produção de cAMP pode ou não estar associada a uma expressão diferencial do receptor ao nível de mRNA e quanto ao número diferente de receptores expresso

pelos clones. Da Figura 19 também nota-se que os níveis basais de cAMP intracelular destes clones não são homogêneos, podendo variar muito entre os clones porém, em geral, também são inferiores ao apresentado pelas células Y-1 (Figura 18). Diferentemente de células AR-1, células 3T3 apresentam uma resposta muito alta a forskolina na ativação da adenilato ciclase, independente dos níveis de expressão do mRNA de ACTHR (Figura 19).

A

B

C

Figura 19. Ensaio de produção de cAMP ou de atividade de adenilato ciclase para clones 3T3 em meio DME/20% FCS/100µg/ml G418 estimulados com ACTH₃₉ e Forskolina nos tempos e concentrações indicados.

Curvas de dose-resposta usando ACTH₃₉ como agonista e medindo-se a produção de cAMP intracelular foram realizadas para células Y-1 e clones AR-1 ACTHR 03 e 3T3 ACTHR 07 (Figura 20), a fim de se determinar as concentrações de ACTH mais apropriadas para sua utilização. Os resultados mostram que 10^{-9} e 10^{-8} são as concentrações de ACTH que promovem uma maior produção de cAMP em Y-1 e clones, respectivamente. Para se comprovar a especificidade de ligação de ACTH ao seu receptor e a ativação de adenilato ciclase em células Y-1 e clones, experimentos de dose-resposta foram realizadas com um peptídeo considerado biologicamente inativo e homólogo ao ACTH₃₉, o ACTH₇₋₃₈, que compete com o hormônio pela ligação ao receptor de ACTH diminuindo seus efeitos intracelulares. Experimentos de competição, usando ACTH₇₋₃₈ 10^{-9} e 10^{-8} M adicionado simultaneamente a ACTH₃₉ 1nM por 15min, resultaram na diminuição da produção de cAMP em relação ao tratamento apenas com ACTH₃₉ (Figura 20).

Figura 20. Curvas de dose-resposta para células Y-1 e clones AR-1 ACTHR 03 e 3T3 ACTHR 07 crescendo exponencialmente e estimulados com ACTH₃₉ nas concentrações indicadas por 15min e na presença do peptídeo competidor ACTH₇₋₃₈ (pontilhado) em duas concentrações, por 15min.

Além destes, experimentos de cinética de produção de cAMP por ACTH₃₉ nestas mesmas células foram realizados em condições de carenciamento ou de crescimento exponencial (Figuras 21 e 22). Pode-se notar que os três clones analisados apresentam um comportamento semelhante ao de células Y-1: uma estimulação máxima muito rápida dentro de poucos minutos com tendência de recuperação e retorno aos níveis basais, que variam entre as células e com a presença de soro no meio e que refletem diretamente nas diferentes percentagens de estimulação de cada célula.

Carenciada

Exponencial

A) Células Y-1

Carenciada

Exponencial

B) Clone AR-1 ACTHR 03

Figura 21. Cinética de produção de cAMP em células Y-1 (A) e no clone AR-1 ACTHR 03 (B) estimulados com ACTH₃₉ 1nM na presença ou ausência de soro.

Carentiada

Exponencial

A) Clone 3T3 ACTHR 07

Carentiada

Exponencial

B) Clone 3T3 ACTHR 27

Figura 22. Cinética de produção de cAMP nos clones 3T3 ACTHR 07 (A) e ACTHR 27(B) estimulados com ACTH₃₉ 1nM na presença ou ausência de soro.

Da Figura 21A, pode-se dizer que: 1) o basal de cAMP de células Y-1 não varia muito com a presença de soro no meio; 2) a percentagem de estimulação sobre o basal é maior em células crescendo exponencialmente, e 3) o nível de cAMP demora mais para retornar ao basal em células crescendo exponencialmente. Já, para o clone AR-1 ACTHR 03 (Figura 21B), pode-se dizer que: 1) o basal de cAMP é superior em células carenciadas; 2) a percentagem de estimulação sobre o basal é menor em células crescendo exponencialmente, e 3) o nível de cAMP demora mais para retornar ao basal em células crescendo exponencialmente. Observações referentes aos clones 3T3 (Figura 22) são: 1) o basal de cAMP não varia muito com a presença de soro no meio para os dois clones porém é superior (~5x) no clone ACTHR 27; 2) a percentagem de estimulação sobre o basal é maior no clone ACTHR 07 e é maior para os dois clones crescendo exponencialmente; 3) o nível de cAMP demora mais para retornar próximo do basal nos dois clones crescendo exponencialmente e 4) a estimulação máxima observada para os dois clones 3T3 carenciados é mais lenta e fica em torno de 15min.

Estes resultados de cinética de produção de cAMP para células Y-1 e clones 3T3 ACTHR assemelham-se aos obtidos para cultura primária de células adrenais bovinas em meio com 15% de soro (**Hanukoglu et al, 1990**). Todos estes resultados de produção de cAMP mostram que, apesar da grande variabilidade clonal, os estímulos provocados pelo ACTH ao se ligar ao seu receptor são de forma geral bastante próximos entre os clones transfectantes de AR-1 e 3T3 expressando o ACTHR e semelhantes as células adrenais Y-1 parentais.

IV.2 - EFEITOS DE ACTH NOS CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR

IV.2.1 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-FOS POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE: ACTH INDUZ A EXPRESSÃO DE c-FOS NOS CLONES 3T3 ACTHR MAS NÃO NOS CLONES AR-1 ACTHR

Estes experimentos foram realizados para células Y-1 e clones AR-1 e 3T3 ACTHR a fim de verificar se os efeitos de ACTH vão além da ativação da adenilato ciclase e consequentemente PKA chegando a indução da expressão das proteínas das famílias FOS e JUN, produtos dos proto-oncogenes de resposta primária c-fos e c-jun envolvidos na proliferação celular, especificamente na transição G0→G1→S do ciclo celular. O efeito de ACTH na expressão destas proteínas é bem conhecido em células Y-1 e envolve a indução coordenada da expressão das proteínas FOS e JUN (Kimura et al, 1993), para que ocorra a formação dos fatores de transcrição da família AP-1 (Curran & Franza, 1988).

A Tabela III mostra os valores de estimulação dos clones 3T3 e AR-1 ACTHR com ACTH e soro. As células AR-1 e 3T3 parentais, bem como clones controles SVK3, não apresentam qualquer alteração na expressão da proteína c-FOS por ACTH, enquanto que a estimulação por soro 20% resulta em alta expressão da proteína. Todos os clones AR-1 ACTHR e alguns clones 3T3 ACTHR não mostraram qualquer efeito significativo na expressão de c-FOS, embora expressem o mRNA do ACTHR (Figura 17B e C). Por outro lado, vários clones 3T3 ACTHR apresentaram indução da expressão de c-FOS em torno de 30% quando estimulados com ACTH₃₉ (Tabela III).

TABELA III. EFEITOS DE ACTH E SORO (2H DE TRATAMENTO) NA INDUÇÃO DA PROTEÍNA C-FOS EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 E AR-1 ACTHR.

CÉLULAS CLONES	INDUÇÃO DA PROTEÍNA c-FOS (% núcleos marcados)	
	FCS (20%)	ACTH (1nM)
Y-1	90 ± 7,3	52 ± 5,8
3T3 SVK3 04	99 ± 5,6	8 ± 1,2
3T3 SVK3 06	93 ± 3,1	10 ± 0,9
3T3 SVK3 11	98 ± 9,2	0
3T3 SVK3 12	75 ± 10,6	3 ± 0,9
3T3 ACTHR 01	99 ± 8,3	26 ± 8,2
3T3 ACTHR 02	95 ± 8,3	8 ± 3,3
3T3 ACTHR 03	98 ± 4,5	22 ± 4,3
3T3 ACTHR 07	93 ± 5,5	28 ± 5,9
3T3 ACTHR 09	100	8 ± 3,1
3T3 ACTHR 10	92 ± 8,9	11 ± 2,5
3T3 ACTHR 12	85 ± 9,3	30 ± 3,9
3T3 ACTHR 14	85 ± 2,2	24 ± 4,4
3T3 ACTHR 16	95 ± 1,2	17 ± 2,4
3T3 ACTHR 26	88 ± 6,5	20 ± 3,9
3T3 ACTHR 27	90 ± 7,6	28 ± 6,3
3T3 ACTHR 28	96 ± 7,8	8 ± 2,5
3T3 ACTHR 31	93 ± 6,4	2 ± 0,2
3T3 ACTHR 33	75 ± 4,5	35 ± 3,8
AR-1 SVK3 01	93 ± 6,7	2 ± 0,9
AR-1 SVK3 05	89 ± 11,3	1 ± 0,3
AR-1 ACTHR 01	83 ± 9,1	0
AR-1 ACTHR 02	90 ± 10,1	0
AR-1 ACTHR 03	93 ± 4,9	6 ± 1,1
AR-1 ACTHR 05	86 ± 8,8	0

* Valores médios de 3 experimentos independentes ± desvio padrão.

A análise do conjunto de clones da Tabela IV mostra que não há correlação direta e obrigatória entre a ativação de adenilato ciclase e a indução de c-FOS (valores destacados na tabela). Estes resultados de imunocitoquímica para c-FOS também foram registrados na forma de fotomicrografias para alguns clones de AR-1 e 3T3 (não apresentados), onde pode-se visualizar também os diferentes níveis de expressão da proteína por célula, através de diferentes tonalidades de marcação nuclear após tratamentos com ACTH.

TABELA IV. RESULTADOS DE PRODUÇÃO DE cAMP (FIGURAS 18 E 19) E ATIVAÇÃO DE c-FOS (TABELA III) MOSTRANDO QUE NÃO HÁ CORRELAÇÃO ENTRE ESTES EFEITOS PROMOVIDOS POR ACTH (TRATAMENTOS DE 30MIN) NOS CLONES DE FIBROBLASTOS EXPRESSANDO O ACTHR.

CÉLULAS CLONES	PRODUÇÃO DE cAMP POR ACTH 100nM (% estimulação sobre o basal)	INDUÇÃO DA PROTEÍNA c-FOS POR ACTH 1nM (% núcleos marcados)
Y-1	134,8	52 ± 5,8
3T3 SVK3 04	3,8	8 ± 1,2
3T3 SVK3 06	7,1	10 ± 0,9
3T3 SVK3 11	13,1	0
3T3 SVK3 12	0	3 ± 0,9
3T3 ACTHR 01	93,1	26 ± 8,2
3T3 ACTHR 02	133,3	8 ± 3,3
3T3 ACTHR 03	95,8	22 ± 4,3
3T3 ACTHR 07	221,4	28 ± 5,9
3T3 ACTHR 09	63,7	8 ± 3,1
3T3 ACTHR 10	13	11 ± 2,5
3T3 ACTHR 12	94	30 ± 3,9
3T3 ACTHR 14	161	24 ± 4,4
3T3 ACTHR 16	28,6	17 ± 2,4
3T3 ACTHR 26	1432	20 ± 3,9
3T3 ACTHR 27	619,5	28 ± 6,3
3T3 ACTHR 28	589,8	8 ± 2,5
3T3 ACTHR 31	90,2	2 ± 0,2
3T3 ACTHR 33	234,6	35 ± 3,8
AR-1 SVK3 01	3,8	2 ± 0,9
AR-1 SVK3 05	8,8	1 ± 0,3
AR-1 ACTHR 01	11,1	0
AR-1 ACTHR 02	18,6	0
AR-1 ACTHR 03	92,3	6 ± 1,1
AR-1 ACTHR 05	56,5	0

Além dos resultados da tabela III, experimentos de imunoperoxidase foram realizados para outras proteínas das famílias FOS e JUN em alguns clones de fibroblastos 3T3 ACTHR carenciados para soro e estimulados com ACTH (Tabela V). Pode-se notar que outras proteínas da família FOS, além de c-FOS, exceto FOS B, e algumas da família JUN, com exceção de JUN D, tem expressão estimulada por ACTH em alguns clones. Entretanto é importante destacar que a indução, qualitativa e quantitativamente, de todo o conjunto de proteínas FOS e JUN não reproduz os dados conhecidos para a linhagem Y-1.

TABELA V. EFEITOS DE ACTH E SORO (2H DE TRATAMENTO) NA INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DAS FAMÍLIAS FOS E JUN EM CÉLULAS Y-1 E CLONES 3T3 ACTHR.

CÉLULAS / CLONES	FRA 1 (% núcleos marcados)*		FRA 2 (% núcleos marcados)*		c-JUN (% núcleos marcados)*		JUN B (% núcleos marcados)*	
	ACTH 0,1U/ml	Soro 20%	ACTH 0,1U/ml	Soro 20%	ACTH 0,1U/ml	Soro 20%	ACTH 0,1U/ml	Soro 20%
Y-1	50	90	60	90	45	80	45	80
3T3 SVK3 04	15	100	0	66	0	80	0	83
3T3 ACTHR 01	40	100	24	65	0	85	25	90
3T3 ACTHR 03	10	100	25	68	0	70	0	75
3T3 ACTHR 07	45	100	0	65	26	90	0	85

* Valores médios de 2 experimentos independentes.

IV.2.2 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-MYC POR REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE: ACTH NÃO REGULA A EXPRESSÃO DESTA PROTEÍNA EM AMBOS OS CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR COMO O FAZ EM CÉLULAS Y-1

O efeito de ACTH em células Y-1 é diminuir os altos níveis basais desta proteína, mesmo na presença de FGF2, um forte ativador da expressão de c-MYC. Nos clones 3T3 ACTHR analisados por imunocitoquímica, após carenciamento e estimulação com ACTH, não se observa qualquer efeito estimulatório de ACTH, diferentemente de agentes mitogênicos como FGF2 e soro que promovem alta estimulação de c-MYC, uma vez que esta proteína também é produto de um proto-oncogene de resposta primária (c-myc) envolvido em diferenciação e proliferação celular, principalmente na transição G1→S do ciclo celular (Figura 23). Além disso, clones 3T3 ACTHR pré-tratados com FGF2 ou soro e posteriormente estimulados ACTH não apresentam inibição da expressão de c-MYC, mostrando ser este um efeito tecido-específico de ACTH em células adrenais (Figura 23).

Figura 23. *Imunocitoquímica para a proteína c-MYC de células Y-1 e clones 3T3 carenciados para soro e estimulados com ACTH₃₉ ou soro por 3h nas concentrações indicadas.*

IV.2.3 - ACTH ATIVA FRACAMENTE ERK1,2 NOS CLONES 3T3 E AR-1 ACTHR COMO O FAZ EM CÉLULAS Y-1

Experimentos de “western blot” para as proteínas ERK1,2, da via das MAPK, foram realizados medindo-se sua ativação por fosforilação em células Y-1 e clones AR-1 e 3T3 carenciadas para soro e estimuladas por ACTH. Como já documentado (Lotfi et al, 1997), ACTH₃₉ induz fracamente a ativação destas proteínas em Y-1 (Figura 24A), porém não apresenta indução significativa de fosforilação nos clones 3T3 ACTHR examinados (Figuras 24B e C) com exceção do clone 12 (Figura 24C), diferentemente de FGF2 que promove alta ativação de ERK1,2 em todas estas células (Figura 24). Na Figura 24 pode-se ver também a utilização de anticorpos contra as isoformas não fosforiladas, que detecta proteína totais, como controle; para isso as membranas foram reutilizadas (“stripping”) após a incubação com o anticorpo para proteínas fosforiladas, exceto células Y-1, para a qual se fez uma membrana nova.

Figura 24. “Western blot” para ERK1,2 fosforiladas em células Y-1 (A) e clones 3T3 (B e C) carenciadas para soro e estimuladas com ACTH₃₉, Corticotropina A e FGF2, nos tempos e concentrações indicadas. “Western blot” para ERK1,2 não fosforiladas estão mostrados em A (membrana nova), B e C (membranas reutilizadas).

Por se tratar de uma linhagem derivada de Y-1, a linhagem parental AR-1 foi estimulada com ACTH₃₉ e não se mostrou responsiva ao hormônio, como esperado, por não expressar o ACTHR (Figura 25A). Assim como os clones 3T3, os clones de AR-1 ACTHR estimulados com ACTH₃₉ não apresentam ativação significativa de ERK1,2, com exceção do clone AR-1 ACTHR 05, ativado fracamente por ACTH₃₉. Corticotropina A, um extrato bruto de hipófise bovina comercial contendo ~50% de ACTH₃₉, induz ativação de ERK1,2 nas células AR-1, independente da expressão do receptor de ACTH, pois apresenta alguns peptídeos contaminantes que provavelmente se ligam a receptores específicos e funcionais nestas células (Figura 25) (Lotfi et al, 2000).

Figura 25. “Western blot” para ERK1,2 fosforilada em células AR-1 (A) e clones de AR-1 (B) carenciadas para soro e estimuladas com ACTH, Corticotropina A e/ou FGF2 nos tempos e concentrações indicadas. Em (B) o controle ERK1,2 não fosforilada está mostrado para o clone SVK3 05 em experimento com membrana reutilizada.

Quando testadas quanto a inibição da desfosforilação de ERK1,2 por ACTH₃₉, as células Y-1 (Figura 26A e B) e nenhum dos clones de AR-1 (Figura 25B) e 3T3 ACTHR (Figura 26C) mostraram apresentar qualquer efeito inibitório de ACTH sobre a ativação de ERK1,2 por FGF2. Assim como ACTH₃₉, 8Br-cAMP não é capaz de inibir a ativação de ERK1,2 em células Y-1 e clones 3T3 após estimulação com FGF2 (Figura 26C).

Figura 26. “Western blot” para ERK1,2 fosforiladas em células Y-1 (A, C) e clones de 3T3 (B, C) carenciados para soro e estimulados com ACTH₃₉, Corticotropina A, 8Br-cAMP e/ou FGF2 nos tempos e concentrações indicadas.

IV.2.4 - ACTH E FGF2 ATIVAM JNK2 EM CÉLULAS Y-1 MAS NÃO NOS CLONES 3T3 ACTHR

Experimentos de “western blot” para as proteínas JNK/SAPK foram realizados medindo sua ativação por fosforilação em células Y-1 e clones 3T3, carenciados para soro, estimuladas por ACTH, FGF2 e combinação destes. Corticotropina A induz a ativação de JNK em culturas primárias de adrenais de ratos (**Watanabe et al, 1997**), porém não tínhamos estes dados para nossas culturas de Y-1 tratadas com ACTH₃₉ e FGF2. Da Figura 27A vê-se que ACTH₃₉ e FGF2 estimulam a ativação por fosforilação de p46 JNK2 ou SAPK α sem alterar a expressão da proteína total, porém não ativam p56 JNK1,3. Ainda em relação a células Y-1, tratamentos associados de ACTH e FGF2 promovem apenas uma fraca ativação de JNK2, comparada aos tratamentos isolados. Nos clones 3T3 testados nenhuma ativação de JNK2 pelos mitógenos usados foi detectada e também não há variação de expressão da proteína total (Figura 27B).

Figura 27. “Western blot” para JNK fosforilada e total (membranas reutilizadas) em células Y-1 (A) e clones 3T3 (B) carenciadas para soro e estimuladas com ACTH₃₉, Corticotropina A e/ou FGF2 nos tempos e concentrações indicadas.

IV.2.5 - ACTH, CORTICOTROPINA A E FGF2 ATIVAM CREM1/ATF1 EM CÉLULAS Y-1 E NOS CLONES 3T3 ACTHR

Experimentos de western blot para proteínas da família CREB/ATF/CREM foram realizados medindo-se a ativação por fosforilação em células Y-1 e clones 3T3 carenciadas para soro e estimuladas com ACTH, Corticotropina A e FGF2. Embora se saiba por longo tempo que ACTH é capaz de induzir a transcrição de proto-oncogenes da família fos (Kimura et al, 1993), não se tem documentos da ativação direta de fatores de transcrição por ACTH. A Figura 28 mostra que ACTH, Corticotropina e FGF2 induzem fortemente a ativação por fosforilação de p35 ATF1 ou p37 CREM1, que apresentam pesos moleculares próximos e não estão sendo separadas neste “western”, enquanto que p43 CREB1 não se mostrou regulada por

estes mitógenos em células Y-1. Nos clones 3T3 testados tratamentos com estes mitógenos também promoveram uma fraca ativação de ATF1/CREM1 (Figura 28). Tanto em células Y-1 como no clone ACTHR 27 testado não há regulação da expressão de ATF1/CREM1 total (Figura 28) e o clone controle 3T3 SVK3 12 não apresenta qualquer ativação de CREM/ATF por FGF2, ACTH₃₉ e Corticotropina A.

Figura 28. "Western blot" para as proteínas CREB/ATF/CREM fosforiladas e não fosforiladas (membranas reutilizadas) em células Y-1 e clones 3T3 carenciadas para soro e estimuladas com ACTH₃₉, Corticotropina A e/ou FGF nos tempos e concentrações indicados.

IV.2.5 - ACTH INDUZ A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA c-FOS NOS CLONES 3T3 ACTHR INDEPENDENTE DAS VIAS DE PKA, PKC E MAPK

ACTH e agentes que elevam os níveis intracelulares de cAMP causam uma forte indução da proteína c-FOS em células adrenais Y-1 carenciadas para soro (Kimura et al, 1993). Como mostrado na tabela III, clones 3T3 ACTHR também apresentam indução de c-FOS por ACTH, porém, quando estimulados com derivados de cAMP, estes clones não apresentam qualquer resposta na indução de c-FOS (Figura 29A). FGF2 ativa fortemente a expressão de c-FOS nas células

analisadas e derivados de cAMP não interferem neste efeito, bem como ACTH. Resultados semelhantes foram obtidos com os clones AR-1 carenciados para soro, onde mesmo ACTH não é capaz de induzir a expressão de c-FOS (Figura 29B).

Figura 29. Imunocitoquímica para a proteína c-FOS em células Y-1 e clones 3T3 (A) e AR-1 (B) carenciados para soro e estimulados por 2h com ACTH, Forskolina, db-cAMP, soro e FGF2 nas concentrações indicadas. Valores médios de 3 experimentos $\pm$ desvio padrão.

Do mesmo modo, PMA, um agente mitogênico ativador direto das diferentes isoformas de PKC, ativa fortemente a expressão de c-FOS em células Y-1 quiescentes e possui efeito sinérgico ao de ACTH nestas células em crescimento exponencial (**Kimura et al, 1993**). A inibição de PKC por inibidores específicos como GF109203X e Go6983 resulta na redução da indução de c-FOS por ACTH em cerca de 50%. A participação de PKC na indução de c-FOS nos clones 3T3 ACTHR, carenciados para soro ou não, foi investigada e o que se observa é que não há envolvimento da via de PKC na indução de c-FOS por ACTH nestes clones, que se mantém em torno de 25-30% (Figura 30A). Também não foram observados efeitos sinérgicos dos tratamentos associados de PMA com ACTH na indução de c-FOS nos clones 3T3 testados (Figura 30B). Nesta figura pode-se ver apenas um discreto aumento na indução de c-FOS que não ultrapassa 10% de células marcadas, quando ACTH é adicionado sobre PMA nos clones 3T3 ACTHR 03 e 07 (barras vermelhas).

A

B

Figura 30. Imunocitoquímica para a proteína c-FOS em células Y-1 e clones 3T3 carenciados para soro (A) e em crescimento exponencial (B) estimulados com ACTH, PMA, Go6983 e soro nas concentrações e tempos indicados. As barras representam valores médios de 3 experimentos $\pm$ o desvio padrão.

Embora tratamentos com ACTH apenas ativem fracamente ERK1,2, como mostrado nos experimentos de “western blot” anteriores, esta via parece ser importante para o efeito mitogênico de ACTH na indução de c-FOS em células Y-1 carenciadas, pois o uso do inibidor específico PD98059 das proteínas MEK chega a reduzir em quase 50% a indução de c-FOS por ACTH nestas células. Assim, clones 3T3 carenciados para soro responsivos a ACTH na ativação de c-FOS, foram estimulados com o hormônio na presença deste inibidor de MEK e os resultados obtidos mostram que a via de MAPK não está envolvida na indução de c-FOS nestes clones tratados com ACTH (Figura 31).

Figura 31. *Imunocitoquímica para a proteína c-FOS em células Y-1 e clones 3T3 carenciados para soro (A) e estimulados com ACTH, PD98059 e soro nas concentrações e tempos indicados. As barras representam valores médios de 3 experimentos $\pm$ o desvio padrão.*

IV.2.6 - CURVAS DE CRESCIMENTO CELULAR: ACTH NÃO ALTERA O CRESCIMENTO DOS CLONES 3T3 E AR-1 COMO O FAZ EM CÉLULAS Y-1

Após a obtenção dos transfectantes e durante sua manutenção em cultura notou-se que alguns clones 3T3 ACTHR são muito sensíveis a concentração de soro no meio e que tinham baixa proliferação celular em meio 10% de soro, sendo necessária uma troca mais frequente do meio ou a presença de 20% de soro para apresentarem viabilidade confiável.

Clones celulares de AR-1 e 3T3 foram utilizados em experimentos de crescimento celular durante 5 dias em meio de cultura contendo 10% de soro e 100µg/ml de G418 na presença ou não de ACTH. Como controle usou-se células Y-1, que apresentam inibição da proliferação quando tratadas com ACTH em tempos superiores a 2h (Figura 32). Os clones controles 3T3 SVK3 06 e AR-1 SVK3 01 apresentam crescimento semelhante e independente do tratamento com ACTH. Os clones 3T3 ACTHR 07 e AR-1 ACTHR 02 cultivados na presença de ACTH apresentam uma discreta indução do crescimento celular após 36h em relação as células crescendo na ausência de ACTH. Este comportamento, não observado em Y-1, surge após a troca do meio no segundo dia do experimento, dando a impressão que as células necessitam de um tempo de adaptação para responderem ao ACTH, enquanto que, na ausência deste, sua taxa de crescimento se mantém a mesma após a troca do meio. Além disso, para os clones ACTHR, no quinto dia do experimento nota-se uma estabilização na população de células tratadas com ACTH frente a uma morte celular mais acentuada para as mesmas células cultivadas na ausência do hormônio.

A. Clones 3T3

B. Clones AR-1

Figura 32. Curvas de crescimento de células Y-1 e clones 3T3 (A) e AR-1 (B) em meio DME/10% FCS/100 μ g/ml G418 estimuladas ou não com ACTH 1nM, por 5 dias consecutivos.

***IV.2.7 - DETERMINAÇÃO DA SÍNTESE DE DNA POR
ENSAIO DE INCORPORAÇÃO DE TIMIDINA TRITIADA: ACTH
NÃO INIBE NEM INDUZ A ENTRADA NA FASE S DO CICLO
CELULAR DE CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR COMO O FAZ EM
CÉLULAS Y-1***

Clones AR-1 e 3T3 ACTHR carenciados para soro por 24h em meio de cultura DME/0,5% FCS/100µg/ml G418 foram estimulados com ACTH, combinado ou não a FGF2, na presença timidina tritiada e experimentos medindo-se a incorporação deste nucleosídeo foram realizados para se quantificar a síntese de DNA ou a transição G1→S do ciclo celular induzida por estes agentes; que é uma medida direta da indução ou inibição da proliferação celular (Figuras 33 e 34). O comportamento de células Y-1 para este ensaio está mostrado na figura 33A, onde ACTH inibe a entrada das células na fase S num comportamento semelhante ao das células não tratadas. Quando se estimula com FGF2, há alta indução de síntese de DNA em relação ao basal e, quando se associa ACTH e FGF2, o efeito de ACTH prevalece e ocorre inibição da síntese de DNA.

Os clones de 3T3 ACTHR 01, 02, 07, 09 e 10 e os clones de AR-1 ACTHR 01, 02 03 e 05 mostram perfis de síntese de DNA muito semelhantes entre si e aos dos clones controles (3T3 e AR-1 SVK3): não há efeito na indução ou inibição de síntese de DNA por ACTH, associado ou não a FGF2, que classicamente promove uma forte indução na síntese de DNA nestas linhagens (Figuras 33 e 34). Estes resultados sugerem que, aparentemente, ACTH não está tendo nenhum efeito sobre a síntese de DNA dos clones expressando o ACTHR, ou então, os efeitos de ACTH são tão discretos que o método é incapaz de detectá-los.

A

B

C

D

E

F

Figura 33. Ensaio de Incorporação de H3-Timidina para células Y-1 (A) e clones 3T3 (B-H) para determinação dos efeitos de ACTH na síntese de DNA ou entrada na fase S do ciclo celular.

Figura 34. Ensaio de Incorporação de H3-Timidina para clones AR-1 (A-F) para determinação dos efeitos de ACTH na síntese de DNA ou entrada na fase S do ciclo celular.

IV.3 - ENVOLVIMENTO DE OUTRAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL NOS EFEITOS DE ACTH EM CÉLULAS Y-1

IV.3.1 - ACTH NÃO INIBE A ATIVIDADE DE Ki-Ras SUPEREXPRESSA EM Y-1

ACTH inibe o crescimento de células adrenais *in vitro* e induz a proliferação *in vivo*. Na linhagem tumoral Y-1 de células adrenocorticais de camundongo, ACTH também apresenta este efeito inibitório em tratamentos superiores a 4h (**Armelin et al, 1977; Lotfi et al, 1997**). Células Y-1 apresentam uma amplificação do gene Ki-ras e níveis constitutivos da proteína Ras no estado ativado (Ras-GTP) que conferem o fenótipo tumoral destas células. Além disso, uma vez carenciadas para soro, estas células apresentam níveis constitutivos (cerca de 50%) de proteínas c-MYC, cuja regulação da expressão gênica deve estar relaxada e que provavelmente deve-se à amplificação do gene ras (**Kimura et al, 1988; Lepique et al, 2000**). Sabe-se que um dos efeitos de ACTH nestas células é a redução dos níveis da proteína c-MYC, por aumento de sua degradação, considerada a principal causa do efeito anti-mitogênico de ACTH (**Lepique & Armelin, resultados não publicados**).

Células Y-1 quiescentes não apresentam níveis basais detectáveis das proteínas ERK1,2 fosforiladas e, quando estimuladas por fatores de crescimento como soro ou FGF2, estas células apresentam uma rápida e máxima ativação de ERK1,2. Uma vez que Ras media a ativação destas proteínas, os níveis de Ras-GTP apresentados por Y-1 não influenciam sua resposta proliferativa frente à ação destes mitógenos. Nestas células ACTH estimula apenas fracamente a fosforilação de ERK1,2 e é incapaz de inibir a ativação destas por FGF2 (Figura 26A).

Quando testadas quanto aos efeitos de ACTH na ativação de Ki-Ras, células Y-1 quiescentes não apresentam qualquer regulação da atividade destas proteínas. Mesmo estimuladas com mitógenos fortes como FGF2, associado ou não a ACTH, e o inibidor de PI3K wortmanina, o que se observa é que os níveis de Ki-Ras-GTP não são alterados em tratamentos de 15min até 1h (Figura 35).

Figura 35. “Western blot” para Ki-Ras total e GTP em células Y-1 carenciadas para soro e estimuladas com ACTH₃₉, FGF2 e wortmanina nos tempos e concentrações indicadas.

IV.3.2 - Y-1 APRESENTA ALTOS NÍVEIS CONSTITUTIVOS DE AKT/PKB ATIVADA, DEPENDENTE DE PI3K E OU Src

A via da proteína quinase B (PKB) ou AKT é uma via de transdução de sinal envolvida com proliferação, diferenciação celular e apoptose acionada por diversos hormônios peptídicos e fatores de crescimento, ainda desconhecida em células adrenais. Em alguns sistemas celulares, a sinalização por esta via é necessária ou alternativamente mediada por Ras, através de PI3K. Baseando-se nestes dados, verificou-se como seria a expressão de AKT em células Y-1 (Figura 36), carenciadas ou não para soro, através de “western blot” com anticorpos específicos para AKT total ou ativada por fosforilação na posição Ser-473.

Figura 36. “Western blot” para AKT fosforilada mostrando o basal apresentado pelas células Y-1, na presença ou não de soro e FGF2, e a redução dos níveis basais por wortmanina nos tempos e concentrações indicadas.

A figura acima mostra que os níveis basais de AKT fosforilada são altos e independentes da presença de soro ou FGF no meio e podem ser considerados constitutivos em células Y-1, onde apenas inibindo-se PI3K consegue-se abolir totalmente a fosforilação de AKT. Como controle, nota-se que wortmanina não altera a expressão de AKT total nestas células. Curvas de dose-resposta para inibidores de PI3K, wortmanina e LY, foram realizadas através de “western blot” medindo-se diminuição dos níveis constitutivos de AKT fosforilada e comprovam o envolvimento de PI3K no basal de AKT (Figura 37A e B, respectivamente). Os níveis constitutivos de AKT fosforilada provavelmente devem-se aos níveis constitutivos de Ras-GTP, que estariam promovendo ativação de PI3K e, consequentemente, de AKT nestas células.

Figura 37. “Western blot” para AKT fosforilada em células Y-1 carenciadas e tratadas com diferentes concentrações de inibidores de PI3K, wortmanina (A) e LY (B).

Outra proteína mediadora de transdução de sinal por vias relacionadas com proliferação, diferenciação e transformação de várias linhagens celulares, brevemente investigada nas células Y-1, foi Src. Como esta proteína não receptora de membrana possui atividade de tirosina quinase, que leva a ativação de Ras em muitos sistemas celulares estudados, realizou-se alguns experimentos de “western blot” para AKT fosforilada usando-se inibidores de Src (**Yoshizumi et al, 2000**). O inibidor PP1 usado é específico para toda família Src e o outro inibidor usado, Tyrphostin A47 (TA47), também inibe Src em altas concentrações (> 50μM) mas, em baixas concentrações (~5μM), inibe a atividade de tirosina quinase de receptores de EGF. Células Y-1 carenciadas para soro e tratadas com diferentes concentrações dos dois inibidores acima foram estimuladas com ACTH (Figura 38) e o que se observa é: 1º) apenas o inibidor PP1 reduz totalmente os altos níveis basais de AKT fosforilada de células Y-1, sendo este efeito inibitório também observado com o inibidor TA47 na concentração de 100μM, 2º) o inibidor TA47 em concentrações inibitórias para EGFR apenas (≤10μM) não reduz os níveis basais de AKT fosforilada e também não bloqueia o efeito inibitório de ACTH sobre AKT (ver item IV.3.3 a

seguir), e 3^o) não se observa efeito ativador ou inibitório de ACTH sobre AKT ativado, uma vez que os níveis constitutivos de AKT fosforilada são reduzidos pelos inibidores. Destes experimentos, pode-se inferir que Src deve ser um participante da constante ativação de AKT através de PI3K via Ras ou via proteínas Shp-2/Cbl (Hakak et al, 2000).

Figura 38. “Western blot” mostrando que inibidores de Src PP1 e TA47 eliminam os níveis basais de AKT fosforilada, independente da presença de ACTH em células Y-1 carenciadas para soro e tratadas com ACTH₃₉.

Alguns fatores de crescimento e hormônios peptídicos, cujos receptores são do tipo GPCRs, promovem seus efeitos característicos em determinadas linhagens celulares através da proteína Src. A regulação na atividade de Src pode ser mediada pelas subunidades $\beta\gamma$ de proteínas Gi/o, às quais estão acoplados os GPCRs, que iniciam uma cascata de sinais intracelulares (Sellers, 1999). Usando o clássico inibidor de Gi/o, toxina de pertussis (CTX), foram realizados experimentos de “western blot” para testar se os efeitos de ACTH na redução de AKT fosforilada constitutiva poderiam ser mediados por esta classe de proteínas G (Figura 39).

Figura 39. “Western blot” para AKT fosforilada em células Y-1 carenciadas e tratadas com ACTH na presença de diferentes concentrações de toxina de pertussis.

Na Figura 39 pode-se notar que ACTH é capaz de reduzir os níveis constitutivos de AKT fosforilada em células Y-1, mesmo na presença de altas concentrações de toxina de pertussis, comprovando que o ACTHR não deve se acoplar à proteínas Gi/o para desencadear seus efeitos, ao menos sobre AKT.

IV.3.3 - ACTH REDUZ OS NÍVEIS DE AKT ATIVADA EM CÉLULAS Y-1 ATRAVÉS DA VIA DE PKA

A estimulação de células Y-1 com diferentes tempos e concentrações de ACTH mostram que há uma rápida e intensa redução dos níveis constitutivos de AKT fosforilada, que independe da presença de soro no meio de cultura (Figura 40). Como controle, reutilizou-se as mesmas membranas em outros “westerns blot” com anticorpos contra AKT total e verificou-se que ACTH não promove alterações nos níveis destas proteínas, mas apenas desfosforilação.

Figura 40. “Western blot” mostrando o efeito inibitório de ACTH sobre AKT ativada, através de sua desfosforilação, em células Y-1 independente da presença de soro no meio.

Além dos tratamentos mostrados na figura anterior, uma cinética da desfosforilação de AKT por ACTH 1nM foi realizada na faixa de 2-240min de estimulação (Figura 41) e nota-se que em tempos superiores a 240min de tratamento com ACTH os níveis de AKT fosforilada tendem a se reestabelecer.

Figura 41. “Western blot” de cinética de redução do nível constitutivo de AKT fosforilada em células Y-1 carenciadas, por tratamentos com ACTH₃₉ na concentração e tempos indicados.

Para se comprovar os resultados do efeito inibitório de ACTH sobre AKT ativada, utilizou-se inicialmente o peptídeo análogo ao ACTH₃₉, o ACTH₇₋₃₈, que compete com o hormônio pela ligação ao receptor de ACTH (ACTHR) diminuindo seu efeito. Usando-se concentrações 10^2 - 10^3 x maiores de competidor em relação ao ACTH₃₉, os resultados obtidos mostram que há um bloqueio do efeito inibitório de ACTH sobre AKT fosforilada (Figura 42).

Figura 42. “Western blot” mostrando o bloqueio do efeito inibitório de ACTH₁₋₃₉ sobre AKT fosforilada, pelo peptídeo competidor ACTH₇₋₃₈, em células Y-1 carenciadas.

Agentes que elevam níveis intracelulares de cAMP, ativando PKA, foram utilizados a fim de se mimetizar os efeitos, ativador de PKA e inibidor de PKB, apresentados por ACTH. Usando-se toxina de cólera (CTX = ativador de proteína G α), forskolina (Fk = ativador de adenilato ciclase) e dibutilil-cAMP ou 8Br-cAMP (8Br = ativadores de PKA), foram realizados experimentos de “western blot” para

AKT fosforilada e os resultados estão mostrados nas Figuras 43A, B e C, respectivamente. Pode-se observar que todos os agentes testados, mesmo na presença de ACTH, apresentam o mesmo efeito de ACTH em reduzir drasticamente os níveis constitutivos de AKT ativada. Isto implica que a via de PKA está mediando o efeito inibitório de ACTH sobre AKT nas células Y-1.

Figura 43. “Western blot” mostrando ativadores da via de PKA que mimetizam os efeitos inibitórios de ACTH sobre AKT ativada. A) Toxina de cólera (CTX), ativador de proteína $G_{s\alpha}$; B) Forskolina (Fk), ativador de adenilato ciclase; C) 8Br-cAMP (8Br), ativador de PKA.

Como outra forma de se comprovar o envolvimento da via de cAMP/PKA na redução de AKT fosforilada por ACTH, utilizou-se o inibidor específico de PKA, H89, em células Y-1 carenciadas para soro e estimuladas com ACTH e, também, utilizou-se clones de Y-1 deficientes em PKA ou PKA⁻ (PKA-R1, dominante negativo de PKA) nas mesmas condições (Figuras 44A e B, respectivamente). Nota-se que ACTH não inibe o basal de AKT fosforilada de células Y-1 na presença do inibidor H89, como o faz sozinho. Além disso, em clones Y-1 PKA⁻, nem ACTH e tampouco

8Br-cAMP são capazes de reduzir o basal de AKT fosforilada, como o faz eficientemente wortmanina.

Figura 44. A) “Western blot” mostrando a inibição do efeito inibitório de ACTH sobre AKT fosforilada em células Y-1 pelo inibidor específico de PKA H89. B) “Western blot” para AKT fosforilada em um clone Y-1 PKA⁻ mostrando que ACTH não reduz os níveis constitutivos de AKT ativada.

IV.3.4 - A REDUÇÃO DE AKT ATIVADA POR ACTH NÃO DEPENDE DE PKC OU MAPK

Evidências experimentais de diferentes origens tem constatado o envolvimento das vias de PKC e MAPK nos efeitos de ACTH. A partir destes resultados iniciou-se uma investigação farmacológica, com o uso de inibidores de PKC (GF 109203X e Go 6983) e MEK1 (PD 98059) para testar o possível envolvimento destas vias com a via de PI3K/PKB. Tratamentos prévios com inibidores de PKC não interferem com a redução de AKT fosforilada promovida por ACTH em células Y-1 carenciadas (Figuras 45A e B).

Da mesma forma, a Figura 45C mostra que o inibidor de MEK1, PD 98059, não interfere com a redução de AKT ativada promovida por ACTH, sugerindo que a via de ERK1,2 não está envolvida nesta ação do hormônio.

Figura 45. A e B) “Westerns blot” mostrando que inibidores de PKC não bloqueiam o efeito inibitório de ACTH sobre AKT fosforilada em Y-1. C) “Western blot” mostrando que o inibidor de MEK-1 não bloqueia o efeito inibitório de ACTH sobre AKT fosforilada em células Y-1.

IV.3.5 - ACTH NÃO REGULA A EXPRESSÃO OU ATIVIDADE DE AKT EM CLONES AR-1 E 3T3 ACTHR

Clones transfectantes de fibroblastos 3T3 ACTHR e de células AR-1 ACTHR, responsivos a ACTH, foram testados para ativação ou inibição da fosforilação de AKT, quando estimulados com ACTH e outros agentes mitogênicos. Pode-se notar da Figura 46 que os clones 3T3 ACTHR apresentam ativação de AKT quando estimulados com soro, FGF e insulina enquanto que ACTH e PMA não apresentam qualquer efeito ativador ou mesmo inibitório sobre AKT, mesmo após estimulação por FGF2, soro ou insulina. Diferentemente da linhagem Y-1, nota-se que estas células não apresentam níveis basais de AKT fosforilada detectáveis.

Figura 46. “Western blot” mostrando o efeito de agentes mitogênicos na ativação de AKT em clones de fibroblastos 3T3 e a ausência dos efeitos de ACTH na regulação de AKT.

Na Figura 47 pode-se observar que clones AR-1 ACTHR respondem a soro e insulina para ativação de AKT, sendo que insulina é um fraco ativador e em apenas alguns clones. ACTH, PMA e FGF não ativam AKT nestes clones AR-1.

Figura 47. “Western blot” mostrando o efeito de agentes mitogênicos na ativação de AKT em clones de AR-1 e ausência dos efeitos de ACTH na regulação de AKT.

V. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

V.1 - GERAÇÃO DE CLONES TRANSFECTANTES DE AR-1 E 3T3 EXPRESSANDO ACTHR FUNCIONAL

A clonagem do receptor de ACTH da linhagem Y-1 de camundongo e expressão heteróloga em fibroblastos 3T3 e células AR-1 não apresentou problemas que impedissem a obtenção de um bom rendimento de clones (Tabelas I e II). Embora durante a subclonagem do cDNA do ACTHR tenha sido perdido um fragmento de ~50pb (Figura 15), na região compreendida pelo “upstream primer” usado por Cammas e colaboradores (**Cammass et al, 1995**), este precede o códon de iniciação e, pelo que aparentam os resultados em geral, não afetou a expressão do mRNA do receptor (Figura 17) e tampouco comprometeu seriamente a estrutura da proteína, como mostraram os experimentos de RT/PCR e produção de cAMP (Figuras 18 e 19), respectivamente. Este mesmo autor mostrou a expressão funcional deste mesmo receptor na linhagem HeLa de células humanas, a partir de um cDNA contendo o fragmento de ~50pb na região 5’ não traduzida. Este resultado associado aos nossos comprovam que a região 5’ não traduzida do exon codificante (último) do ACTHR não interfere com a expressão e funcionalidade da proteína nos dois sistemas celulares escolhidos.

A organização genômica da superfamília dos GPCRs conserva uma característica em quase todos os genes destas proteínas: eles possuem vários exons curtos que não codificam parte alguma da proteína (e não tem função conhecida) e o último exon, que é grande, é o que carrega a sequência codificante dos receptores. O gene do ACTHR possui, em média, 3 ou 4 exons, variando com a espécie por “splicing” alternativo do 2º ou 3º exon. Entretanto, os 2 ou 3 exons

iniciais, bem como alguns poucos pares de bases das regiões 3' e 5' do último exon não codificam parte alguma da proteína (Figura 10). A própria presença ou então pequenas diferenças nos exons iniciais não codificantes parecem limitar a eficiência da expressão de GPCRs em alguns sistemas celulares (**Mountjoy et al, 1992; Weber et al, 1993; Schimmer et al, 1995**). De qualquer forma, os clones transfectantes de AR-1 e 3T3 expressando o receptor de ACTH são seguramente estáveis até a 20ª passagem em cultura e, após isto, alguns podem deixar de responder ao estímulo por ACTH na ativação de adenilato ciclase apresentando, inclusive, um crescimento celular acelerado em meio 10% FCS.

A Figura 48 mostra um esquema ilustrativo para a estrutura bidimensional do ACTHR de camundongo mostrando as regiões mais prováveis de α -hélice transmembranares (TM), alças intra (IC) e extracelulares (EC) e sítios de modificação pós-traducional, obtidos a partir de análise da sequência primária do ACTHR pelos programas FASTA e PREDICT (MAXHOM). A sequência primária deste receptor também foi alinhada (usando os programas SIM, PREDICT PROTEIN e MAXHOM ALIGNMENT) com a dos receptores humano, bovino e de hamster e as 4 proteínas mostraram possuir domínios TM com ~100% de homologia, embora no geral possuam homologia em torno de 80-90%. Ao ser alinhada (usando o programa TM PREDICT) com a sequência primária de receptores de rodopsina bovina, de bacteriorodopsina, opióides (mu humano) e purinérgicos (P2Y1 de pinto), a sequência do ACTHR humano apresentou identidade inferior a 30% para os 7 domínios TM, onde também se observa aqueles resíduos altamente conservados entre os GPCRs (**Forti, Oyama & Armelin, resultados não publicados**). O ACTHR de camundongo possui um aminoácido triptofano (W) a menos que os receptores

humano e bovino e, assim como estes, possui N e C-terminais curtos. Também possuem o 5º domínio TM razoavelmente curto comparado com receptores da superfamília. Todos os receptores da subfamília dos MC-Rs possuem as alças EC2 e EC3 bastante curtas e faltam cisteínas na alça EC2 de todos os receptores. Embora os receptores de ACTH de camundongo e hamster possuam uma cisteína no N-terminal do TM3 (enquanto que os ACTHR bovino e humano não tem), não há possibilidade de formação de ponte de dissulfeto com a alça EC2. O aspártico (D) no TM2 e a tríade DRY no final (C-terminal) do TM3 ou início (N-terminal) da alça IC2 também são conservados em todos estes receptores, assim como resíduos volumosos como isoleucina (I) e fenilalanina (F) após a tríade DRY na alça IC2, nas proximidades da posição 131. O ACTHR de camundongo possui: uma glutamina (Q) em substituição a uma asparagina, conservada na posição 257 do TM7 da subfamília dos MC-Rs; uma sequência de reconhecimento por peroxissomos (que pode ser SKL ou outras) no C-terminal; 2 sítios de glicosilação (N-X-S/T) no N-terminal (N12 e N17); sítios de fosforilação por PKA, PKG [(RK)-2X-(ST)] e PKC [(ST)-X-(RK)] nas alças IC2 e IC3 (T143, S202, S208, T209); e um sítio de palmitoilação no C-terminal (C293). Nada se sabe sobre a interação do ACTHR com $G\alpha$, porém como a maioria dos GPCRs e segundo o modelo tridimensional recentemente desvendado para a rodopsina (**Palczewski et al, 2000**), as alças IC2, IC3 a região de α -hélice do C-terminal (considerada como o 8º domínio TM) são as mais prováveis nesta interação. Os ACTHRs também possuem uma arginina (R) conservada no C-terminal, cerca de 10 resíduos antes do sítio de palmitoilação (cisteína), considerada envolvida na interação (do tipo salina) com um aspartato (D) de uma das α -hélices ($\alpha 5$) da subunidade α de proteínas G (**Oliveira et al, 1999**).

Figura 48. Esquema ilustrativo da estrutura molecular bidimensional do receptor de ACTH obtida por programas de modelagem molecular mostrando as alças intra e extracelulares, as regiões de α -hélices transmembranares e os prováveis sítios de modificação pós-traducional (Forti, Oyama & Armelin, resultados não publicados).

O teste indireto da funcionalidade dos clones transfectantes AR-1 e 3T3 estimulados com ACTH, por medida da ativação da adenilato ciclase através da produção de cAMP, mostra que boa parte dos clones expressando o ACTHR obtidos são funcionais e, em alguns casos, apresentam níveis de ativação muito superiores ao observado em células parentais Y-1 (Figuras 18 e 19), embora alguns destes clones apresentem baixa expressão do mRNA do ACTHR (Figura 17). De qualquer forma, os níveis de expressão do ACTHR parecem não refletir diretamente na funcionalidade do GPCR e, conseqüentemente nas respostas intracelulares analisadas e observadas. A falta de um anticorpo comercial que reconheça especificamente este receptor para estudos de “western blot”, a perda da atividade

biológica do ACTH gerada pela marcação com I^{125} para estudos de “binding”, bem como as dificuldades da técnica de medida de incorporação e hidrólise de $GTP-\gamma S^{35}$ pela proteína G, levaram-nos a adotar a ativação de adenilato ciclase como uma forma de medida qualitativa de expressão da proteína funcional (Figuras 20 a 22).

A grande variabilidade de expressão e funcionalidade do ACTHR detectada nos clones AR-1 e 3T3 põe em dúvida um conceito clássico de que a eficiência do acoplamento entre um GPCR e uma proteína G depende única e exclusivamente da razão entre eles e sua concentração absoluta na membrana. Além disso, levanta outra questão importante em farmacologia, que adota a expressão ectópica de receptores funcionais para os estudos de interação agonista-receptor, onde se afirma que a eficácia de um dado agonista (capacidade de se ligar e ativar um receptor) depende apenas da ligação específica e precisa ao seu receptor e onde se ignora muitas vezes que um agonista pode regular muitos parâmetros específicos (outros efeitos biológicos intracelulares), como a atividade de proteínas efetadoras de sinais intracelulares (ciclo ativação/desativação), tais como as proteínas G por exemplo. Assim, é possível que agonistas possuam realmente eficácias múltiplas na regulação de proteínas efetadoras ao se ligarem a seus receptores, bem como é possível que agonistas competidores (parciais) ou antagonistas possam, além de interferir na ligação específica do agonista ao seu receptor, disparar efeitos biológicos intracelulares significativos possuindo, portanto, uma eficácia muitas vezes desprezada.

A dificuldade de se determinar precisamente as razões de GPCR-proteína G usando os sistemas de expressão atualmente disponíveis tem sido resolvida, ao menos em parte, pela expressão de proteínas de fusão GPCR- $G\alpha$ que, em alguns

sistemas celulares e para alguns receptores, ativam adenilato ciclase mais eficientemente do que as proteínas expressas separadamente (Seifert et al, 1999).

V.2 - INDUÇÃO DE c-FOS POR ACTH EM TRANSFECTANTES AR-1 E 3T3 ACTHR

Ativadores clássicos de adenilato ciclase ou PKA causam ativação do fator de transcrição CREB para induzir a transcrição de genes que possuem o elemento CRE em seu promotores, como c-fos. Clones transfectantes ACTHR não apresentam correlação obrigatória e linear entre ativação de adenilato ciclase e indução do proto-oncogene c-fos, como mostrado na Tabela IV. O aumento promovido por ACTH no nível basal de cAMP provavelmente não é suficiente para promover uma ativação de PKA que leve a uma ativação de CREB nos clones transfectantes ACTHR. Associado à estes resultados está a diferença de “backgrounds” metabólicos entre os clones.

Diferentemente dos clones 3T3 ACTHR, os clones AR-1 ACTHR apresentam baixa ativação de adenilato ciclase por ACTH e também por agentes que elevam os níveis intracelulares de cAMP, como forskolina e toxina de cólera (Figura 18). Isto independe da expressão do ACTHR e pode estar sendo causado por um comprometimento na transdução de sinal ao nível da membrana para o interior da célula, mais especificamente na unidade proteína G/adenilato ciclase, tratando-se de uma característica da linhagem clonal AR-1 que possui várias diferenças significativas em relação as células Y-1 (Kimura et al, 1983). Além disso, clones AR-1 ACTHR não são responsivos a ACTH quanto a ativação de c-FOS e este resultado não necessariamente implica que sua causa seja a baixa ativação de adenilato

ciclase por ACTH, mas sim que outros sistemas sinalizadores intracelulares estejam comprometidos nestas células.

Ao analisarmos que vias de transdução de sinal estão mediando a ativação de c-FOS por ACTH nos clones 3T3 ACTHR, verificamos que agentes que elevam os níveis intracelulares de cAMP (forskolina, 8Br-cAMP e db-cAMP) e ativam PKA levam a alta indução de c-FOS em células Y-1 (Figura 29A), assim como FGF2 e ACTH, porém não são capazes de ativar c-FOS nos clones 3T3 ACTHR. Estes resultados mostram que a via de cAMP/PKA/CREB, obrigatoriamente acionada em células adrenais Y-1, não está envolvida neste efeito nos clones ACTHR.

Quando os inibidores de MEK, PD98059, e de PKC, Go 6983, são utilizados previamente a estimulação das células com ACTH não se observa nenhuma inibição significativa na indução de c-FOS nos clones 3T3 ACTHR (Figuras 30A e 31, respectivamente). Além disso, tratamentos longos de ACTH e PMA não promovem aumentos sinérgicos significativos na indução de c-FOS em clones 3T3 ACTHR (Figura 30B). Estes resultados mostram que a ativação de c-FOS nestas células também não é mediada pelas vias de MAPK e PKC.

Em função da estrutura do promotor de c-FOS ser totalmente conhecida outras proteínas provavelmente envolvidas na ativação de c-FOS por ACTH foram examinadas tanto nas células Y-1 como nos clones 3T3 ACTHR (Figura 7).

ACTH promove fraca ativação das proteínas ERK1,2 da via das MAPK em células Y-1 carenciadas (Figura 24A), bem como em alguns dos clones AR-1 e 3T3 ACTHR (Figuras 25B e 24C, respectivamente). Por outro lado, ACTH ativa por fosforilação a isoforma p46 JNK2 ou SAPK α da via das MAPK em células Y-1, através da via de PKC, mas nenhum efeito ou ativação das proteínas JNK2 foi

observado nos clones 3T3 ACTHR (Figura 27). Ao se medir a ativação, por ACTH e FGF2, da família de fatores de transcrição CREB/ATF em células Y-1 detectamos uma estimulação da ativação do fator de transcrição p35 ATF-1 ou p37 CREM1 (e não de p43 CREB1) pelos dois mitógenos utilizados (Figura 28), mostrando uma comunicação entre a via das MAPK através de ERK1,2 e a via de PKA (**Seternes et al, 1998**). Embora em menor intensidade, os mesmos resultados são observados nos clones 3T3 ACTHR carenciados e estimulados com ACTH e FGF2 (Figura 28), vindo confirmar que a fraca ativação do gene c-fos observada pode estar ocorrendo através da ligação de fatores de transcrição da família CREB/ATF/CREM no elemento CRE do promotor deste gene. Por outro lado, a ativação de CREB por ACTH também não parece estar ocorrendo via cAMP/PKA, PKC/JNK e ERK1,2, mas sim por outras vias desconhecidas (Figura 2).

Os resultados obtidos com os clones ACTHR, associados aos de células Y-1, modificam o quadro atual de vias sinalizadoras e comunicação entre vias (Figura 11) envolvidas nos mecanismos moleculares de ação de ACTH na indução de genes de resposta primária em células adrenais, considerados os responsáveis pela fenomenologia complexa do efeito mitogênico deste hormônio. A Figura 49 apresenta um esquema ilustrativo do mecanismo de ação de ACTH na indução de genes de resposta primária, como c-fos, mostrando as vias de transdução de sinal e interações entre estas, que certamente estão sendo ativadas, e prováveis vias e inter-relações que podem estar sendo ativadas por ACTH na mediação de seus efeitos mitogênicos.

Figura 49. Esquema ilustrativo mostrando as atuais vias de transdução de sinal (PKA, PKC e MAPK) e comunicações entre vias (ERK1,2→ATF1/CREM1; JNK2→ATF1/CREM1; JNK2→TCF) envolvidas no mecanismo de ação de ACTH para ativação do gene *c-fos*, como parte dos efeitos mitogênicos promovidos pelo hormônio. O esquema também sugere prováveis interações de vias (PKA→Raf1; AC→EPAC; Rap1→Ras/Raf1; $\beta\gamma$ →JNK2; $\beta\gamma$ →RhoA; PKC→RhoA) envolvidas nos efeitos de ACTH em células adrenais Y-1.

O sistema 3T3 ACTHR gerado pode também ser utilizado em outro tipo de abordagem para elucidar de vias de transdução de sinal envolvidas nos mecanismos moleculares de ação de ACTH. Trata-se de uma abordagem de complementação genética do “background” de células 3T3 com proteínas de células Y-1, que estão envolvidas com a indução de um gene repórter alvo, no caso *c-fos*. Esta abordagem foi iniciada com sucesso durante este projeto, porém não foi concretizada. A parte realizada consistiu em transfectar uma linhagem de fibroblastos transgênicos de

camundongo carregando o gene repórter fos-lacZ com a construção do receptor de ACTH (pSVACTHR). Os clones transfectantes gerados estimulados com ACTH, na presença de um substrato cromogênico para β -galactosidase, foram analisados por FACS e apresentaram a mesma ativação de c-fos observada em nossos clones Balb 3T3 ACTHR (~30%). Paralelamente, temos feito uma biblioteca de cDNA em vetor retroviral (pCLMFG) que será usada para infectar a linhagem carregando o gene repórter e o ACTHR. Células que apresentarem altas induções de c-fos ($\geq 50\%$) serão selecionadas por FACS-Gal "Sorting" e enriquecidas para recuperação do cDNA de interesse incorporado. Ao ser concretizada, o sucesso desta abordagem permitirá o seu uso com outros genes alvo, como por exemplo a proteína p27^{Kip1}, por se tratar de uma estratégia de amplo espectro de detecção que pode levar à descoberta de novos genes e seus produtos.

V.3 - INDUÇÃO DE OUTROS GENES: FAMÍLIAS FOS E JUN E O GENE c-MYC

A indução programada dos genes das famílias fos e jun e do gene c-myc, em fibroblastos NIH 3T3 de camundongo, por fatores peptídicos de crescimento clássicos como FGF2 e PDGF, constitui parte importante do mecanismo molecular de ação destes mitógenos. Em células Y-1, além de FGF2, ACTH também promove uma indução coordenada da transcrição dos genes fos e jun (Tabela V), porém não regula a transcrição de c-myc. Já nos clones transfectantes AR-1 e 3T3 ACTHR, ACTH não promove qualquer regulação da proteína c-Myc (Figura 23).

Nos clones transfectantes AR-1 ACTHR não se observa a ativação de c-FOS por ACTH, diferentemente dos clones 3T3 ACTHR (Tabela III). Quando outros genes das famílias fos e jun são analisados nos clones 3T3 ACTHR, nota-se que existe

uma baixa indução de alguns genes da família fos (FRA 1 e FRA 2) e da família jun (c-JUN e JUN B), porém nem toda a família de genes (FOS B e JUN D) é ativada e os clones não são capazes de induzir mais do que 2 genes destas famílias ao mesmo tempo (Tabela V). Estes resultados mostram que nestes clones 3T3 ACTHR ACTH ativa o receptor a ponto de iniciar sinais que chegam ao núcleo e induzem transcrição gênica, mas não são suficientes para desencadear uma resposta coordenada de expressão gênica, como ocorre em células Y-1.

V.4 - EFEITOS DE ACTH NO CRESCIMENTO DOS TRANSFECTANTES ACTHR

Uma resposta de crescimento celular, seja ela mitogênica ou anti-mitogênica, é uma resposta complexa que depende de um programa de expressão gênica diferencial, organizado e sincronizado, pois envolve a regulação de multicomponentes protéicos. Dos experimentos de ensaios de crescimento realizados (Figuras 32, 33 e 34), pode-se afirmar que praticamente não houve efeito relevante de ACTH na proliferação dos clones transfectantes ACTHR. Estes resultados são compatíveis com os sinais iniciados no ACTHR detectados na análise das vias de transdução de sinal e indução de genes de resposta primária, que não caracterizam o disparo de uma resposta coordenada, pois como mostrado nos itens anteriores: não há correlação entre ativação de adenilato ciclase e indução de c-fos; as vias de PKA, PKC e MAPK não estão mediando a indução de c-fos; não há indução ou inibição do gene c-myc; e apenas alguns genes das famílias fos e jun são fraca e desordenadamente ativados por ACTH nos clones transfectantes.

V.5 - A VIA DE PI3K/AKT EM CÉLULAS Y-1 E A RESPOSTA ANTI-MITOGÊNICA DE ACTH

A linhagem Y-1 de células adrenais de camundongo apresenta superexpressão do oncogene *ki-ras* e altos níveis da proteína Ki-Ras ativada (Figura 35). Tratamentos com ACTH₃₉ e mesmo FGF2 não modulam a atividade desta proteína em células carenciadas (Figura 35), porém são capazes de ativar a via de ERK1,2 (Figuras 24A) e induzir a expressão de genes de resposta primária, como *fos* e *jun* (Tabela V). Por outro lado, o proto-oncogene *c-myc*, que também é classicamente induzido por fatores de crescimento como FGF2, apresenta-se com níveis basais relativamente altos em células Y-1 carenciadas para soro (Figura 23) **(Kimura et al, 1993)**. A desregulação parcial do gene *c-myc* nestas células tem sido atribuída aos altos níveis basais de Ki-Ras; além disso a redução dos altos níveis da proteína *c-Myc* (por aumento de sua degradação) por ACTH tem sido considerada até agora como a principal causa dos efeitos anti-mitogênicos de ACTH **(Armelin et al, 1996; Lepique et al, 2000)**.

A proteína Ras é a mais importante e mais estudada GTPase envolvida com crescimento, proliferação e diferenciação celular sendo mediadora de muitas vias de transdução de sinal que estão por trás destes fenômenos celulares fundamentais **(Barbacid, 1987)**. Dentre estas vias, a mais recentemente descoberta (década de 90) e atualmente muito explorada está a via de PI3K/AKT, principalmente por ser mediadora de processos de apoptose, alteração de citoesqueleto e quiescência ou parada de crescimento **(Brunet et al, 1999)**, este último há anos documentado na linhagem Y-1 e causado por ACTH, porém através de mecanismos desconhecidos.

Verificamos, recentemente, que células Y-1 carenciadas ou em crescimento exponencial, apresentam níveis altos e praticamente constitutivos da proteína AKT/PKB ativada (Figura 36) (**Forti & Armelin, 2000**). Quando tratadas com inibidores de PI3K, wortmanina e LY, ocorre redução total de AKT ativada mostrando que este efeito é mediado por PI3K (Figuras 36 e 37). Quando inibidores de Src são usados nestes experimentos, nota-se que também ocorre uma redução total de AKT ativada (Figura 38), sugerindo que Src, assim como Ras, é outra proteína que pode estar promovendo uma ativação constitutiva de AKT nessa linhagem de células através de PI3K (**Liu et al, 1998**). É conhecido que Src ativa PI3K fosforilando a subunidade p85 desta e recrutando-a para a membrana; isto é mediado pela ativação da proteína adaptadora Cbl por Src. Por outro lado, a proteína tirosina fosfatase Shp-2 (que em alguns sistemas celulares é um substrato de Src) quando ativada por fosforilação, promove redução da ativação de AKT por PI3K pela desfosforilação da subunidade p85 (**Hakak et al, 2000**).

Quando células Y-1 são submetidas a tratamentos com ACTH (Figuras 40 e 41), forskolina, db-cAMP ou toxina de cólera (Figura 43) o mesmo efeito tem sido observado, ou seja, uma redução muito forte e rápida dos níveis de AKT fosforilada que, no caso de ACTH, independem da presença de soro ou FGF2 no meio e se mantém por até 4h (Figura 41). Estes resultados mostram o envolvimento de PKA, possivelmente indireto, na desfosforilação de AKT nestas células. Quando o inibidor de PKA H-89 e/ou clones de células Y-1 deficientes em PKA (Figura 44) são carenciados para soro e estimulados com ACTH, não ocorre redução dos altos níveis de AKT ativada, comprovando a mediação por PKA deste efeito inibitório de ACTH sobre esta via (**Forti & Armelin, 2000**). Além disso, este efeito inibitório de

ACTH é dependente do ACTHR (Figura 42) e célula-específico, pois transfectantes 3T3 e AR-1 ACTHR não possuem basal de AKT ativada e não apresentam qualquer efeito ativador ou inibitório de ACTH nesta proteína (Figuras 46 e 47).

Embora apenas uma proteína tirosina fosfatase tenha sido descrita ser regulada por ACTH em células adrenais através de PKA (**Sayed et al, 1997; Jones et al, 2000; Rocchi et al, 2000**), nossos resultados de redução dos níveis de AKT fosforilada sugerem que alguma proteína com atividade de tirosina, treonina ou serina fosfatase está sendo regulada por ACTH, muito provavelmente ao nível de atividade catalítica, através de fosforilação por PKA. Além disso, não existem dados descrevendo que PKB possui algum domínio de reconhecimento por PKA e seja um substrato direto desta quinase. Pelo contrário, os poucos trabalhos descrevendo alguma relação entre estas vias mostram que PKA pode promover ativação de PKB em outros sistemas celulares, provavelmente inibindo alguma fosfatase regulatória de AKT por fosforilação (**Van Obberghen et al, 1999**). Não podemos deixar de salientar também que este efeito de ACTH é mais um, dos poucos documentados até agora, onde um GPCR está regulando a atividade de AKT (Figura 50) (**Gutkind et al, 2000**).

Uma vez que os efeitos de ACTH em células Y-1 são mediados pelas vias de PKC e MAPK, é importante verificar se estas vias sinalizadoras participam, de alguma forma, no efeito inibitório de ACTH sobre AKT: mesmo na presença de inibidores específicos de MEK (PD 98059) e PKC (GF 109203X e Go6983) ACTH promove uma rápida e forte redução dos basais de AKT fosforilada (Figura 45), mostrando ser este um efeito exclusivamente dependente de PKA, segundo nossos resultados atuais. Além disso pode-se sugerir que, assim como os já conhecidos,

este novo efeito de ACTH está sendo mediado exclusivamente por proteínas Gs, pois pré-tratamentos com altas concentrações de toxina de pertussis não bloqueiam a redução de AKT ativada por ACTH (Figura 39).

Recentemente, identificou-se em linhagens de mamíferos genes “correspondentes” aos descritos em *C. elegans* (daf-16), envolvidos com senescência ou parada de crescimento celular. Os produtos destes genes correspondem a proteínas da família de fatores de transcrição conhecida como “Forkhead” (AFX, FKHR, FKHR-L1), que são mediadores da via de PI3K/AKT (**Medema et al, 2000**). Estes fatores de transcrição, quando superexpressos, são conhecidos por promoverem a inibição de crescimento de diversas linhagens celulares, incluindo células transformadas com Ras ou que não expressam o gene supressor de tumor PTEN, que codifica para uma proteína fosfatase de fosfolípidos de membrana envolvidos na regulação da atividade de PKB e outras vias (**Graff et al, 2000**). Como mediadores da via de PI3K/AKT e promotores de inibição de crescimento, as proteínas “Forkhead” regulam a transcrição do gene $p27^{Kip1}$, aumentando a expressão da proteína $p27^{Kip1}$ que leva a inibição dos complexos CiclinaD/Cdk4 ou CiclinaE/Cdk2 (Figura 8), fazendo com que a célula estacione na fase G1 do ciclo celular (**Collado et al, 2000**). Este fenômeno mantém as células num estado de quiescência (senescência replicativa) ou parada de crescimento, após vários ciclos de divisão *in vivo* ou *in vitro*, como um caminho alternativo à apoptose. Esta parada de crescimento descrita se assemelha muito aos efeitos anti-mitogênicos de ACTH (inibição de crescimento e bloqueio da transição G1→S) em células adrenais Y-1, uma vez que após a retirada do estímulo hormonal, estas células podem reentrar na fase S e progredir pelo ciclo celular.

Em colaboração com uma aluna de doutorado do laboratório, iniciamos uma investigação da expressão da proteína p27^{Kip1} a fim de saber se a inibição de AKT promovida por ACTH pode estar envolvida com os efeitos anti-mitogênicos de ACTH. Experimentos de “western blot” em células Y-1 carenciadas para soro e estimuladas com agentes mitogênicos como FGF2 e soro ou agentes anti-mitogênicos como ACTH (por 5h de estimulação) e wortmanina, notamos que ACTH promove uma forte indução da expressão de p27^{Kip1} sobre os níveis basais, mesmo na presença de soro ou FGF2, os quais promovem uma redução da expressão desta proteína. Já o inibidor de PI3K, wortmanina, na presença ou não de ACTH, também leva a aumentos da expressão de p27^{Kip1} conduzindo as células à uma parada de crescimento **(Forti, Schwindt & Armelin, manuscrito em preparação)**.

Uma vez que a inibição de AKT por ACTH é dependente de PKA, ao utilizarmos clones de Y-1 deficientes em PKA ou o inibidor H-89, obtivemos como resultados um bloqueio da indução de p27^{Kip1} por ACTH **(Forti, Schwindt & Armelin, manuscrito em preparação)**. Assim sendo, a ativação da expressão de p27^{Kip1} bem como a ativação da desfosforilação de AKT, promovidas por tratamentos com ACTH, são dependentes de PKA e decorrentes da seguinte via de sinalização: ACTHR → cAMP/PKA –| Akt –| AFX/FKHR → p27^{Kip1}, conforme esquematizado na Figura 50.

Figura 50. Esquema ilustrativo mostrando as vias de transdução de sinal que contribuem para o mecanismo de ação de ACTH em células adrenais Y-1 assim descrito: “ACTH se liga ao ACTHR que ativa Gs, cuja Gs α ativa a adenilato ciclase a produzir cAMP. cAMP ativa PKA que deve estar ativando uma fosfatase inibidora de AKT ativada, por desfosforilação. Os níveis constitutivos de AKT ativada, por sua vez, são mantidos por Ras-GTP e ou Src, através da ativação de PI3K. Ao ser inibida, AKT deixa de inibir, por fosforilação, os fatores de transcrição da família dos “Forkhead” (AFX/FKHR) (que se dissociam da proteína adaptadora 14-3-3 no citoplasma e migram para o núcleo), ligando-se então a elementos promotores de vários genes, dentre estes o de p27^{Kip1}, cuja transcrição é aumentada (e a expressão da proteína também). Uma vez no citoplasma, p27^{Kip1} inibe a atividade de complexos Ciclina/Cdk bloqueando o ciclo celular. O esquema também sugere prováveis vias e comunicações entre vias que podem estar mediando e contribuindo para os efeitos anti-mitogênicos de ACTH nestas células.

VI. CONCLUSÕES

1. Os clones transfectantes AR-1 e 3T3 ACTHR expressam estavelmente o receptor de ACTH funcional. A construção gerada e utilizada não apresenta limitações de expressão e atividade da proteína produzida. A ativação de adenilato ciclase por ACTH, exibida por estes transfectantes, tem cinética e intensidade de ativação muito semelhantes às células adrenais Y-1. Isto mostra que os sinais estão sendo iniciados no ACTHR que foi transfectado (exógeno expresso).
2. ACTH ativa fracamente a expressão de c-FOS em clones 3T3 ACTHR bem como outras proteínas das famílias FOS e JUN, porém não tem efeito na expressão de c-MYC. A ativação destes genes por ACTH não se correlaciona com a ativação de adenilato ciclase exibida pelos clones, indicando que a via de PKA não é importante na mediação deste efeito.
3. Tratamentos curtos de ACTH ativam fracamente a fosforilação de ERK1,2 e do fator de transcrição p35 ATF1/p37 CREM1 nos clones 3T3 ACTHR, porém não tem efeitos na atividade de JNK/SAPK. Por outro lado, as vias de PKA, PKC e MAPK não estão envolvidas diretamente na indução da expressão de c-FOS em clones 3T3 ACTHR.
4. Estes resultados levam-nos a concluir que ACTH está se ligando especificamente ao receptor funcional expresso nas células 3T3 e AR-1. ACTHR é capaz de promover a ativação de $G\alpha_s$ /AC e provocar aumentos de cAMP intracelular, que aparentemente, não são responsáveis pela indução de c-FOS via PKA. Além disso, ACTHR inicia outros sinais ao nível da membrana que estão ativando vias ainda não identificadas promovendo uma indução não coordenada dos genes fos e jun, e que podem até ser atribuídas às subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G.

5. ACTH não regula os níveis constitutivos da proteína Ras-GTP em células adrenais Y-1 que, por sua vez, apresentam níveis constitutivos da proteína AKT/PKB ativada (fosforilada), independentemente da fase do ciclo celular em que se encontram, e que são dependentes de Ras/PI3K ou Src/Cbl/Shp2/PI3K.
6. ACTH promove de forma rápida e forte uma redução dos níveis constitutivos de AKT fosforilada, efeito este que se mantém por algumas horas. O efeito inibitório de ACTH sobre AKT está sendo mediado pela via de PKA, que provavelmente ativa alguma proteína serina/treonina fosfatase que desfosforila e inativa AKT.
7. Tratamentos longos de ACTH ativam a expressão da proteína p27^{Kip1} em células Y-1 carenciadas de uma forma também dependente da via de PKA.
8. Estes resultados documentam, pela primeira vez, que um sinal iniciado num receptor do tipo GPCR que se acopla exclusivamente a Gs, no caso o ACTHR, pode promover a desativação de AKT. Aparentemente, a desativação de AKT é suficiente para levar à indução da expressão de p27^{Kip1}, mecanismo que contribui para explicar a ação anti-mitogênica de ACTH em células adrenais, fenômeno descrito há décadas, mas cujo mecanismo permanece não esclarecido.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaronson, S. A. and Todaro, G. J. (1968). "Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40". J. Cell. Physiol. 72 (2), 141-8.
- Aaronson, S. A. (1991). "Growth factors and cancer". Science. 254, 1146-1153.
- Alberts, A. S.; Geneste, O. and Treisman, R. (1998). "Activation of SRF-regulated chromosomal templates by Rho-family GTPases requires a signal that also induces H4 hyperacetylation". Cell. 92, 475-487.
- Armelin, H. A. (1973). "Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth". Proc. Natl. Acad. Sci. 70 (9), 2702-2706.
- Armelin, H. A. and Armelin, M. C. S. (1977). "Selection of adrenal cell mutants resistant to adrenocorticotropin (ACTH)". An. Acad. Brasil. Ciênc. 49, 487.
- Armelin, M. C. S.; Gambarini, A. G. and Armelin, H. A. (1977). "On the regulation of DNA synthesis in a line of adrenocortical tumor cells: effect of serum, adrenocorticotropin and pituitary factors". J. Cell. Physiol., 93: 1-9.
- Armelin, H. A. Lotfi, C. F. P. and Lepique, A. P. (1996). "Regulation of growth by ACTH in the Y-1 of mouse adrenocortical cells". Endocr. Res. 22, 373-383.
- Armelin, H. A. and Lotfi, C. F. P. (1999). "Control of the adrenocortical cell cycle: interaction between FGF2 and ACTH". Braz. J. Med. Biol. Res. 32 (7), 841-3.
- Barbacid, M. (1987). "ras genes". Ann. Rev. Biochem. 56, 779-827.
- Benya, R. V.; Fathi, Z.; Kusui, T.; Pradhan, T.; Battey, J. F. and Jensen, R. T. (1994). "gastrin-releasing peptide receptor-induced internalization, down regulation, desensitization and growth: possible role for cyclic AMP". Molecular Pharmacology. 46, 235-245.
- Berman, D. M. and Gilman, A. G. (1998). "Mammalian RGS proteins: barbarians at the gate". J. Biol. Chem. 273 (3), 1269-77.

- Blackwood, E. M. and Eisenman, R. N. (1991). "Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with myc". Science. 251, 1211-1217.
- Blackwood, E. M.; Luscher, B. and Eisenman, R. N. (1992). "Myc and Max associate *in vivo*". Genes Dev. 6, 71-80.
- Blumberg, P. M. (1988). "Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters. Sixth rhoads memorial award lecture". Cancer Res. 48, 1.
- Bos, J. L. and Burgering, B. M. T. (1995). "Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat". TiBS. 20, 18-21.
- Boston, B. A. and Cone, R. D. (1996). "Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line". Endocrinology. 137, No. 5, 2043-2050.
- Bourne, H. R. (1997). "How receptors talk to trimeric G proteins". Curr. Opin. Cell Biol. 9, 134-142.
- Bravo, R.; Burckhardt, J.; Curran, T. and Muller, R. (1986). "Expression of c-fos in NIH3T3 cells is very low but inducible throughout the cell cycle". EMBO J. 5, 695-700.
- Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond M. J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S.; Anderson, M. J.; Arden, K. C.; Blenis, J. and Greenberg, M. E. (1999). "AKT promotes cell survival by dephosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor". Cell. 96 (6), 857-868.
- Buckley, D. I. and Ramachandran, J. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 (12), 7431-7435.
- Buonassisi, V.; Sato, G. and Cohen, A. 1962. Hormone-Producing Cultures of Adrenal and Pituitary Tumor Origin. Biochemistry. 48, 1184-1190.
- Campbell, J. S.; Seger, R.; Graves, J. D.; Graves, L. M.; Jensen, A. M. and Krebs, E. G. (1995). Recent Prog. Horm. Res. 50, 131-159.

- Cammas, F. M.; Kapas, S.; Barker, S. and Clark, A. J. L. (1995). "Cloning, characterization and expression of a functional mouse ACTH receptor". Biochemical and Biophysical Research Communications. 212 (3), 912-918.
- Cammas, F. M.; Pullinger, G. D.; Barker, S. and Clark, A. J. L. (1997). "The mouse adrenocorticotropin receptor gene: cloning and characterization of its promoter and evidence for a role for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1". Molecular Endocrinology. 11 (7), 867-876.
- Carlson, A. D.; Obeid, J. S.; Kanellopoulou, N.; Wilson, R. C. and New, M. Y. (1999). J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 69, 19-29.
- Chiu, R.; Boyle, W. J.; Meek, J.; Smeal, T.; Hunter, T. and Karin, M. (1988). "The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes". Cell. 54, 541-552.
- Chomczynsky, P. and Sacchi, N (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". Anal. Biochem. 162, 152-159.
- Clemens, M. J.; Trayner, I. and Menaya, J. (1992). "The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation". J. Cell. Sci. 103, 881-887.
- Collado, M.; Medema, R. H.; Garcia-Cao, I.; Dubuisson, M. L.; Barradas, M.; Glassford, J.; Rivas, C.; Burgering, B. M.; Serrano, M. and Lam, E. W. (2000). "Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27^{Kip1}". J. Biol. Chem. 275 (29), 21960-21968.
- Cooper, G. M.; Aktas, H. and Cai, H. (1997). "Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the CDK inhibitor p27^{Kip1}". Mol. Cell. Biol. 17 (7), 3850-3857.
- Cosenza, S. C.; Yumet, G.; Soprano, D. R. and Soprano, K. J. (1994). "Induction of c-fos and c-jun mRNA at the M/G1 border is required for cell cycle progression". J. Cell. Biochem. 55, 503-512.

- Côte, M.; Payet, M. D. and Payet, N. G. (1997). "Association of α s-subunit of the Gs protein with microfilaments and microtubules: implication during adrenocorticotropin stimulation in rat adrenal glomerulosa cells". Endocrinology. 138, No. 1, 69-78.
- Coughlin, S. R. (1994). "Expanding horizons for receptors coupled to G proteins: diversity and disease". Curr. Opin. Cell Biol. 6, 191-197.
- Curran, T. and Franza, B. R. (1988). "FOS and JUN: the AP-1 connection". Cell. 55, 395.
- Dallman, M. F.; Akana, S. F.; Jacobson, L.; Levin, N.; Cascio, C. S. and Shinsako, J. (1987). "Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion". Ann. New York Acad. Sci. 512, 402-414.
- Daksis, J. I.; Lu, R. Y.; Facchini, L. M.; Marhin, W. W. and Penn, L. J. (1994). "Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo synthesis and links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle". Oncogene. 12, 3635-3645.
- Daub, H.; Ulrich Weiss, F.; Wallasch, C. and Ullrich, A. (1996). Nature. 379, 557-560.
- De Foresta, B.; Rogard, M. and Gallay, J. (1987). "Adenylate cyclase of bovine adrenal cortex plasma membranes. Divergence between corticotropin and fluoride combined effects with forskolin". FEBS Lett. 216 (1), 107-12.
- Della Rocca, G. J.; Maudsley, S.; Daaka, Y.; Lefkowitz, R. J. and Luttrell, L. M. (1999). "Pleiotropic coupling of G protein-coupled receptors to the mitogen-activated protein kinase cascade". The Journal of Biological Chemistry. 274 (20), 13978-13984.
- Denhardt, D. T. (1996). "Signal transduction protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potencial for multiplex signalling". Biochemical Journal. 318, 729-747.
- de Rooij, J.; Zwartkruis, F. J.; Verheijen, M. H.; Cool, R. H.; Nijman, S. M.; Wittinghofer, A. and Bos, J.L. (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP". Nature. 396 (6710), 474-7.

- Fantl, W. J.; Johnson, D. E. and Willians, L. T. (1993). "Signalling by receptor tyrosine kinases". Ann. Ver. Biochem. 62, 453-481.
- Faria, M. and Armelin, H. A (1996). "Antagonistic actions of phorbol ester in mammalian G0→G1→S cell cycle transition". Cell Growth and Differentiation. 7, 75-81.
- Feig, L. A. (1993). "The many roads that lead to Ras". Science. 260, 767-768.
- Feige, J. J.; Vilgrain, I.; Brand, C.; Baillys, S.; and Souchelnitskiy, S. (1998). "Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors". J. Endocrinol. 158, 7-19.
- Finn, F. M.; Widnell, C. C. and Hofmann, K. (1972). J. Biol. Chem. 247 (18), 5695-5702.
- Finn, F. M.; Johns, P. A.; Nishi, N. and Hofmann, K. (1976). J. Biol. Chem. 251 (12), 3576-3585.
- Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987). "Angiogenic factors". Science. 235, 442-447.
- Forti, F. L. and Armelin, H. A. (1998). "ACTH induces c-fos proto-oncogene in fibroblasts expressing the ACTH receptor". Endocrine Research. 24 (3 & 4), 433-437.
- Forti, F.L. and Armelin, H. A. (2000). "ACTH inhibits a Ras-dependent anti-apoptotic and mitogenic pathway in mouse Y1 adrenocortical cells". Endocrine Research. In Press.
- Francis, S. H. and Corbin, J. D. (1994). "Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases". Annu. Rev. Physiol. 56, 237-272.
- Friedman, D. L. (1976). "Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation". Physiological Reviews. 56 (4), 652-701.
- Frigeri, C. K. and Armelin, H. A. (1996). "Patterns of long-term steroidogenesis stimulation by ACTH and phorbol ester". Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 29, 343-345.
- Garren, L., Gill, G., Masui, H., and Walton, G. (1971). "On the mechanism of action of ACTH". Recent. Progr. Horm. Res. 27, 433-478.

- Godson, C. and Reppert, S. M. (1997). "The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways". Endocrinology. 138 (1), 397-404.
- Gonzalez, G. A. and Montminy, M. R. (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133". Cell. 59, 675-680.
- Graff, J. R.; Konicek, B. W.; McNulty, A. M.; Wang, Z.; Houck, K.; Allen, S.; Paul, J. D.; Hbailu, A.; Goode, R. G.; Sandusky, G. E.; Vassella, R. L. and Neubauer, B. L. (2000). J. Biol. Chem. 275 (32), 24500-5.
- Grennberg, M. E. and Ziff, E. B. (1984). "Stimulation of 3T3 cells induces transcription of c-fos proto-oncogene". Nature. 311, 433.
- Griffin, J. E. and Ojeda, S. R. (1996). "Textbook of Endocrine Physiology". 3rd Edition. Oxford University Press.
- Gudas, J. M.; Oka, M.; Diella, F.; Trepel, J. and Cowan, K. H. (1994). "Expression of wild-type p53 during the cell cycle in normal human mammary epithelial cells". Cell. Growth. Diff. 5, 295-304.
- Gupta, S.; Campbell, D.; Derijard, B. and Davis, R. J. (1995). "Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway". Science. 267, 389-393.
- Gutkind, J. S. (1998). J. Biol. Chem. 273 (4), 1839-1842.
- Gutkind, J. S.; Murga, C. and Fukuhara, S. (2000). "A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase β in signaling from G protein-coupled receptors to AKT". J. Biol. Chem. 275 (16), 12069-12073.
- Gusovsky, F. (1991). "Prostaglandin receptors in NIH 3T3 cells: coupling of one receptor to adenylate cyclase and of a second receptor to phospholipase C". Molecular Pharmacology. 40, 633-8.
- Gutkind, J. S. (1998). "Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration". Oncogene. 17, 1331-1342.
- Hagiwara, M.; Brindle, P.; Harootunian, A.; Armstrong, R.; Rivier, J.; Vali, W.; Tsien, R. and Montminy, M.R. (1993). "Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A". Mol. Cell. Biol. 13, 4852-4859.

- Hakak, Y.; Hsu, Y. S. and Martin, G. S. (2000). "Shp-2 mediates v-Src-induced morphological changes and activation of the anti-apoptotic protein kinase Akt". Oncogene. 19 (28), 3164-71.
- Hall, M.; Bates, S. and Peters, G. (1995). "Evidence for different modes of action of cyclin dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins". Oncogene. 11, 1581-1588.
- Hanukoglu, I., Feuchtwanger, R. and Hanukoglu, A. (1990). "Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells". J. Biol. Chem. 265 (33), 20602-20608.
- Heikkila, R.; Schwab, G.; Wickstrom, E.; Loke, S. L.; Pluznik, D. H.; Watt, R. and Neckers, L. M. (1987). "A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G0 to G1". Nature, 328: 445-449.
- Herschman, H. R. (1991). "Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters". Ann. Rev. Biochem. 60, 281-319.
- Hill, C. S.; Wynne, J. and Treisman, R. (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF". Cell. 81, 1159-1170.
- Hofmann, K.; Stehle, C. J. and Finn, F. M. (1988). Endocrinology. 123 (3), 1355-1363.
- Holt, J. T.; Gopal, T. V.; Moulton, A. D. and Nienhuis, A. W. (1986). Inducible production of c-fos antisense RNA inhibits 3T3 cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 4794-4798.
- Hornsby, P.J. (1985). Endocr. Res. 10, 259-281.
- Hunter, T. (1997). "Oncoprotein networks". Cell. 88, 333-346.
- Hunter, T. and Karin, M. (1992). "The regulation of the transcription by phosphorylation". Cell. 70, 375-387.
- Hurley, J. H. (1999). "Structure, mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclase". J. Biol. Chem. 274 (12), 7599-7602.

- Inglese, J.; Koch, W.J.; Touhara, K. and Lefkowitz, R.J. (1995). "G β γ interactions with PH domains and Ras-MAPK signaling pathways". TiBS. 20, 151-156.
- Ishizuka, T. (1995). "Molecular cloning and functional expression of a mouse adrenocorticotropin receptor gene". Hokkaido Igaku Zasshi. 70, 253-260.
- Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E.; Hurwitz, J.; Massagué, J. and Pavletich, N. P. (1995). "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA/CDK2 complex". Nature. 376, 313-320.
- Jewell-Motz, E. A.; Donnelly, E. T.; Eason, M. G. and Liggett, S. B. (1997). Biochemistry. 36, 8858-8863.
- Jiang, W.; Kahn, S. M.; Zhou, P.; Zhang, Y. J.; Cacace, A. M.; Infante, A. S.; Doi, S.; Santella, R. M. and Weinstein, J. B. (1993). "Overexpression of cyclin D1 in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression". Oncogene. 8, 3447-3457.
- Jones, P. M.; Sayed, S. B.; Persaud, S. J.; Burns, C. J.; Gyles, S. and Whitehouse, B. J. (2000). J. Mol. Endocrinol. 24 (2), 233-9.
- Joyce, D.; Bouzazhah, B.; Fu, M.; Albanese, C.; D'Amico, M.; Steer, J.; Klein, J. U.; Lee, R. J.; Segall, J. E.; Westwick, J. K.; Der, C. J. and Pestell, R. G. (1999). "Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor- κ B-dependent pathway". J. Biol. Chem. 274, No. 36, 25245-25249.
- Kapas, S.; Catt, K. J. and Clark, A. J. L. (1995). "Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor". J. Biol. Chem. 270 (43), 25344-25347.
- Kapas, S.; Cammas, F. M.; Hinson, J. P. and Clark, A. J. L. (1996). "Agonist and receptor binding properties of adrenocorticotropin peptides using the cloned mouse adrenocorticotropin receptor expressed in a stably transfected HeLa cell line". Endocrinology. 137, No. 8, 3291-3294.
- Kelly, K.; Cochran, B. A.; Stiles, C. D. and Leder, P. (1983). "Cell specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and PDGF". Cell. 35, 603.
- Kerkhoff, E.; Bister, K. and Klempnauer, K. H. (1991). "Sequence-specific DNA-binding by Myc proteins". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 4323-4327.

- Khawaja, A. (1999). "Akt is more than a Bad kinase". Nature. 401, 33-34.
- Kilpatrick, G. J.; Dautzberg, F. M.; Martin, G. R. and Eglen, R. M. (1999). "7TM receptors: the splicing on the cake". TIPS. 20, 294-298.
- Kimura, E. and Armelin, H. A. (1990). "Phorbol ester mimics ACTH action in adrenocortical cells stimulating steroidogenesis, blocking cell cycle, changing shape and inducing c-fos proto-oncogene expression". J. Biol. Chem. 265, 3518.
- Kimura, E. and Armelin, H. A. (1988). c-fos induction accompanies cell cycle block by ACTH. J. Cell. Biochem., 12A (Supl.): 220.
- Kimura, E.; Frigeri, C. K. and Armelin, H. A. (1993a). Kinetics of inhibition in c-myc proto-oncogene expression and DNA synthesis caused by ACTH, dibutyryl cAMP and phorbol ester in mouse adrenocortical cells. Biochem. (Life Sci. Adv.) 12: 103-108.
- Kimura, E.; Sonobe, M. H.; Armelin, M. C. S. and Armelin, H. A. (1993b). Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester but not by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives. Molecular Endocrinology, 7: 1463-1471.
- Kimura, E., Frigeri, C. K. and Armelin, H. A. (1993c). Relevance of c-fos proto-oncogene induction for the steroidogenic response to ACTH, dcAMP and phorbol ester in adrenocortical cells. Molecular and Cellular Biochemistry 124: 23-32.
- Kimura, E.; Armelin, M. C. S. and Armelin, H. A. (1983). "Isolation and characterization of variant clones resistant to adrenocorticotropin from Y-1 mouse adrenocortical carcinoma cell line". Brazil. J. Genetics. VI, 2, 211-227.
- Koch, K. J.; Hawes, B. E.; Allen, L. F. and Lefkowitz, R. J. (1994). "Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by beta gamma activation of p21^{Ras}". Proc. Natl. Acad. Sci. 91, 12706-12710.
- Kovary, K. and Bravo, R. (1991). "The Jun and Fos families are both required for cell cycle progression in fibroblast". Mol. Cell. Biol. 11, 4466-4472.

- Kubo, M.; Ishizuka, T.; Kijima, H.; Kakinuma, M. and Koike, T. (1995). "Cloning of a mouse adrenocorticotropin receptor-encoding gene". Gene. 153, 279-0.
- Larsson, O.; Lathan, C.; Zickert, P. and Zetterberg, A. (1989). "Cell cycle regulation of human diploid fibroblasts: possible mechanisms of platelet-derived growth factor". J. Cell. Physiol. 139, 447.
- Lefkovitz, R. J.; Roth, J.; Pricer, W. and Pastan, I. (1970). Proc. Natl. Acad. Sci. 65 (3), 745-752.
- Lepique, A. P.; Forti, F. L.; Moraes, M. S. and Armelin, H. A. (2000). "Signal transduction in G0/G1 arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2". Endocrine Research. In Press.
- Lewin, B. (1990). "Driving the cell cycle: M phase kinase, its partners and substrates". Cell. 61, 743-752.
- Liu, A. X.; Testa, J. R.; Hamilton, T. C.; Jove, R.; Nicosia, S. V. and Cheng, J. Q. (1998). Cancer Res. 58 (14), 2973-7.
- Lotfi, C. F. P., Todorovic, Z., Armelin, H.A. and Schimmer, B.P. (1997). "Unmasking a growth promoting effect of the adrenocorticotropic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells". J. Biol. Chem. 272 (47), 29886-29890.
- Lofti, C. F. P.; Lepique, A. P.; Forti, F. L.; Schwindt, T. T.; Eichler, C. B.; Santos, M. O.; Rebustini, I. T.; Hajj, G. N.; Juliano, L. and Armelin, H. A. (2000). Braz. J. Med. Biol. Res. 33 (10), 1133-1140.
- Luttrell, L.M.; Daaka, Y. and Lefkovitz, R.J. (1999). Curr. Op. Cell. Biol. 11, 177-183.
- McCormick, F. (1993). "How receptors turn Ras on". Nature. 363, 15-16.
- Marx, J. (1993). "How cell cycles toward cancer". Science. 263, 319-321.
- McMahon, M.; Woods, D.; Cherwinski, H.; Bosch, E. and Lees, E. (1997). "Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21^{Cip1}". Mol. Cell. Biol. 17 (9), 5598-5611.
- Medema, R. H.; Kops, G. J. P. L. Bos, J. L. and Burgering, B. M. T. (2000). "AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27". Nature. 404, 783-787.

- Miyazawa, K.; Backstrom, G.; Lappanen, O.; Persson, C.; Wenstedt, C.; Hellman, U.; Heldin, C.H. and Ostman, A. (1998). "Role of immunoglobulin-like domains 2-4 of the PDGF- α receptor in ligand-receptor complex assembly". J. Biol. Chem. 273 (39), 25495-25502.
- Moore, C. C. D. and Miller, W. L. (1991). "The role of transcriptional regulation in steroid hormone biosynthesis". J Steroid Biochem. Mol. Biol. 40, 517-525.
- Morgan, D. O. (1995) "Principles of CDK regulation". Nature. 374, 131-134.
- Mountjoy, K. G.; Robbins, L. S.; Mortrud, M. T. and Cone, R. D. (1992). "The cloning of a family of genes that encode melanocortin receptors". Science. 257, 1248-1251.
- Mountjoy, K. G.; Bird, I. M.; Rainey, W. E. and Cone, R. D. (1994). Molecular and Cellular Endocrinology. 99, R17-R20.
- Muller, R. and Sewing, A. (1994). "Protein kinase A phosphorylates cyclin D1 at three distinct sites within the cyclin box and at the C-terminus". Oncogene. 9, 2733-2734.
- Murray, A. (1994). "Cell cycle checkpoints". Curr. Opin. Cell. Biol. 6, 872-876.
- Nagata, A.; Ito, M.; Iwata, N.; Kuno, J.; Takano, H.; Minowa, O.; Chihara, K.; Mastui, T. and Noda, T. (1996). "G protein-coupled cholecystokinin-B/gastrin receptors are responsible for physiological cell growth of the stomach mucosa *in vivo*". Proc. natl. Acad. Sci. USA. 93, 11825-11830.
- Naville, D.; Barjhoux, L.; Jaillard, C.; Lebrethon, M. C.; Saez, J. M. and Bégeot, M. (1994). Molecular and Cellular Endocrinology. 106, 131-135.
- Neer, E. J. (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals". Cell. 80, 249-257.
- New, M. Y. (1998). Annu. Ver. Med. 49, 311-328.
- New, M. Y. and Wilson, R. C. (1999). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 26, 12790-12797.
- Nishizuka, Y. (1984). "The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promoter". Nature. 308, 693-698.

- Nishizuka, Y. (1988). "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation". Nature. 334, 661-665.
- Nishizuka, Y. (1992). "Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C". Science. 258, 607-614.
- Nishikura, K. and Murray, J. M. (1987). "Antisense RNA on proto-oncogene c-fos blocks renewed growth of quiescent 3T3 cells". Mol. Cell. Biol., 7, 639-649.
- O'Connell, M. and Nurse, P. (1994). "How cells know they are in G1 or G2". Curr. Opin. Cell. Biol. 6, 867-871.
- Oliveira, L.; Paiva, A. C. M. and Vriend, G. (1999). "A low resolution model for the interaction of G proteins with G protein-coupled receptors". Protein Engineering. 12 (12), 1087-1095.
- Olson, M. F.; Krolczyk, A. J.; Gorman, K. B.; Steinberg, R. A. and Schimmer, B. P. (1993). "Molecular basis for the 3', 5'- cyclic adenosine monophosphate resistance of Kin mutant Y-1 adrenocortical tumor cells". Mol. Endocrinol. 7 (4), 477-487.
- Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M. and Miyano, M. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor". Science. 289, 739-745.
- Pardee, A. B. "G1 events and regulation of cell proliferation". (1989). Science. 246, 603-608.
- Pawson, T. (1988). "Non-catalytic domains of cytoplasmatic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction". Oncogene. 3, 491-495.
- Pawson, T. and Schlessinger, J. (1993). "SH2 and SH3 domains". Current Biology. 3, 434, 442.
- Penhoat A.; Jaillard, C. and Saez, J.M. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 4978-4981.

- Perlman, S.; Costa-Neto, C. M.; Miyakawa, A. A.; Schambye, H. T.; Hjorth, S. A.; Paiva, A. C. M.; Rivero, R. A.; Greenlee, W. J. and Schwartz, T. W. (1997). "Dual agonistic and antagonistic property of nonpeptide angiotensin AT1 ligands: susceptibility to receptor mutations". Molecular Pharmacology. 51, 301-311.
- Qiu, R.; Frigeri, C. and Schimmer, B. P. (1998). "A role for guanyl nucleotide-binding regulatory protein β - and γ -subunits in the expression of the adrenocorticotropin receptor". Molecular Endocrinology. 12 (12), 1879-1887.
- Rae, P.A.; Gutmann, N.S.; Tsao, J. and Schimmer, B.P. (1979). "Mutations in cAMP dependent protein kinase and ACTH sensitive adenylate cyclase affect adrenal steroidogenesis". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 1869-1900.
- Raikhinstein, M.; Zohar, M. and Hanukoglu, I. (1994). "cDNA cloning and sequence analysis of the bovine adrenocorticotrophic hormone (ACTH) receptor". Biochimica et Biophysica Acta. 1220, 329-332.
- Reddy, G. P. V. (1994). "Cell cycle: regulatory events in G1→S transition of mammalian cells". J. Cell. Biochem. 54, 379-386.
- Robertson, L. M.; Kerppola, T. K.; Vendrell, M.; Luk, D.; Smeyne, R. J.; Bocchiaro, C.; Morgan, J. I. and Curran, T. (1995). "Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements". Neuron. 14, 241-252.
- Robinson-Benion, C.; Salhany, K. E.; Hann, S. R. and Holt, J. T. (1991). "Antisense inhibition of c-myc expression reveals common and distinct mechanisms of growth inhibition by TGF beta and TNF alpha". J. Cell. Biochem. 45, 188-195.
- Rocchi, S.; Gaillard, I.; Van Obberghen, E.; Chambaz, E. M. and Vilgrain, I. (2000). "Adrenocorticotrophic hormone stimulates phosphotyrosine phosphatase SHP2 in bovine adrenocortical cells: phosphorylation and activation by cAMP-dependent protein kinase". Biochem. J. 352, 483-490.
- Roussel, M. F.; Cleveland, J. L.; Shurtleff, S. A. and Sherr, C. J. (1991). "Myc rescue of a mutant CSF-1 receptor impaired in mitogenic signalling". Nature. 353, 361-363.

- Rozengurt, E. (1998). "Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists". Journal of Cellular Physiology. 177, 507-517.
- Ryder, K. and Nathans, D. (1988). "Induction of proto-oncogene c-jun by serum growth factors". Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8464-8467.
- Ryseck, R. P.; Hirai, S. I.; Yaniv, M. and Bravo, R. (1988). "Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts". Nature. 334, 535-537.
- Sanger, F.; Niklen, S. and Coulson, A. R. (1977). Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.
- Sassone-Corsi, P.; Ransone, L. J.; Lamph, W. W. and Verma, I. (1988). "Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the "leucine zipper" domain". Nature. 336, 692-695.
- Sayed, S. B.; Whitehouse, B. J. and Jones, P. M. (1997). J. Endocrinol. 154 (3), 449-458.
- Schertler, G. F. and Hargrave, P. A. (1995). "Projection structure of frog rodopsin in two crystal forms". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92, 11578-11582.
- Schimmer, B. P. (1972). "Adenylate cyclase activity in adrenocorticotrophic hormone-sensitive and mutant adrenocortical tumor cell lines". The Journal of Biological Chemistry. 247, No. 10, 3134-3138.
- Schimmer, B. P. (1981). in "Functionally Differentiated Cell Lines", G. Sato (Ed.), Liss, New York, 61-92.
- Schimmer, B. P.; Kwan, W. K.; Tsao, J. and Qiu, R. (1995). "Adrenocorticotropin-resistant mutants of the Y-1 adrenal cell line fail to express the adrenocorticotropin receptor". Journal of Cellular Physiology. 163, 164-171.
- Schimmer, B. P. and Parker, K. (1992). J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 43, 937-950.
- Schwab, M.; Alitalo, K.; Varmus, H.; Bishop, J. and George, D. (1983). "A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumor cells". Nature. 303, 497-501.

- Scweppe, R. E.; Ashley, A. F. B.; Hartmann-Gutierrez, A. and Bradford, P. (1997). "Functional components of fibroblast growth factor signal transduction in pituitary cells". J. Biol. Chem. 272 (49), 30852-30859.
- Seifert, W. (1976) "Cyclic Nucleotides and Cell Growth". Journal of Supramolecular Structure. 4:279 (239)-287 (247).
- Sellers, L. A. (1999). "Prolonged activation of extracellular signal-regulated kinase by a protein kinase C-dependent N17Ras-insensitive mechanism mediates the proliferative response of Gi/o-coupled somatostatin sst₄ receptors". J. Biol. Chem. 274 (34), 24280-24288.
- Seternes, O. M.; Sorensen, R.; Johansen, B.; Loennechen, T.; Aarbakke, J. and Moens, U. (1998). "Synergistic increase in c-fos expression by simultaneous activation of the ras/raf/map kinase- and protein kinase A signaling pathways is mediated by the c-fos AP-1 and SRE sites". Biochimica et Biophysica Acta. 1395, 345-360.
- Sherr, C. J. (1993). "Mammalian G1 cyclins". Cell. 73, 1059-1065.
- Sherr C. J. (1995). "D-type cyclins". TiBS. 20 (5), 187-190.
- Shimizu, C; Kubo, M.; Saeki, T.; Matsumura, T.; Ishizuka, T.; Kijima, H.; Kakinuma, M. and Koike, T. (1997). Gene. 188, 17-21.
- Simpson, E. R. and Waterman, M. R. (1988). "Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH". Ann. Ver. Physiol. 50: 427-440.
- Spaulding, S. W. (1993). "The ways in which hormones change cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases subunits, and how such changes affect cell behavior". Endocrine Reviews. 14, 632-650.
- Sporn, M. B. and Roberts, A. B. (1988). "Peptide growth factors are multifunctional". Nature. 332, 217-219.
- Stiles, C. D. (1984). "Autocrine control of growth?". Science. 311, 604-605.
- Stocco, D. M. and Clarck, B. J. (1997) "The role of steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis". Steroids. 62 (1), 29-36.

- Sun, Y.; Yamauchi, J.; Kaziro, T. and Itoh, H. (1999). "Activation of c-fos promoter by G β γ -mediated signaling: involvement of Rho and c-Jun N-terminal kinase". J. Biochem. 125, 515-521.
- Sutherland, E. W. and Rall, T. W. (1957). "The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg⁺² and epinephrine or glucagon". J. Am. Chem. Soc. 79, 3608.
- Sutherland, E. W. and Rall, T. W. (1958). "Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles". J. Biol. Chem. 232, 1077-1091.
- Sutherland, E. W.; Rall, T. W. and Menon, T. (1962). "Adenyl cyclase. I Distribution, preparation and properties". J. Biol. Chem. 237, 1220-1227.
- Tian, Y.; Smith, R. D.; Balla, T. and Catt, K. J. (1998). "Angiotensin II activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C and Ras/Raf-1 kinase in bovine adrenal glomerulosa cells". Endocrinology. 139 (4), 1801-9.
- Todaro, G. and Green, H. (1963). J. Cell. Biol. 17, 299.
- Uhler, M. D. and McKnight, G. S. (1987). "Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase". J. Biol. Chem. 262, 15202-15207.
- Vanderkuur, J. A.; Butch, E. R.; Waters, S. B.; Pessin, J. E.; Guan, K. L. and Carter-Su, C. (1997). "Signaling molecules involved in coupling growth hormone receptor to mitogen-activated protein kinase activation". Endocrinology. 138 (10), 4301-7.
- Van Obberghen, E.; Filippa, N.; Sable, C. I.; Filloux, C. and Hemming, B. (1999). "Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase". Molecular and Cellular Biology. 19 (7), 4889-5000.
- Viard, I.; Hall, S. H.; Jaillard, C.; Berthelon, M. C. and Seaz, J. M. (1992). "Regulation of c-fos, c-jun and junB mRNA by Angiotensin-II and corticotropin in ovine and bovine adrenocortical cells". Endocrinology. 130, 1193-1200.

- Watanabe, G.; Pena, P.; Albanese, C.; Wilsbacher, L. D.; Young, J. B. and Pestell, R. G. (1997). "Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo". J. Biol. Chem. 272 No. 32, 20063-20069.
- Waterman, M. R. (1995). "A rising StAR: An essential role in cholesterol transport". Science. 267, 1780-1781.
- Weber, A.; Kapas, S.; Hinson, J. P.; Grant, D. B.; Grossman, A. and Clark, A. J. L. (1993). "Functional characterization of the cloned human ACTH receptor: impaired responsiveness of a mutant receptor in familial glucocorticoid deficiency". Biochemical and Biophysical Research Communications. 197 (01), 172-178.
- Weidman, E. R. and Gill, G. N. (1977). "Differential effects of ACTH or 8Br-cAMP on growth and replication in a functional adrenal tumor cell line". J Cell. Physiol. 90, 91-103.
- Westphal, C. H.; Muller, L.; Zhou, X.; Booner-Weir, S.; Schambelan, M.; Steiner, D. F.; Lindberg, I. and Leder, P. (1999). Cell. 96, 689-700.
- Yasumura, Y.; Tashjian, A. H., Jr and Sato, G. (1966) "Establishment of four functional, clonal strains of animal cells in culture". Science 154, 1186-1189.
- Yasumura, Y.; Buonassissi, Y. and Sato, G. (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.
- Yoshizumi, M.; Abe, J.; Haendele, J. Huang, Q. and Berk, B. C. (2000). "Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species". J. Biol. Chem. 275, 16, 11706-11712.

CURRICULUM VITAE

Nome: Fábio Luis Forti

Local e data de Nascimento: **Piracicaba - SP em 19 de maio de 1969**

EDUCAÇÃO

E. E. P. S. G. “Dr. Jorge Coury”. 1977 a 1987. Piracicaba-SP.

Colégio e Cursinho Anglo Piracicaba. 1988. Piracicaba-SP.

Instituto de Química de São Carlos (IQSC), Universidade de São Paulo (USP), 1989 a 1992. **Bacharel em Química.**

Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos – USP, Grupo de Bioquímica e Biomateriais, 1993 a 1995. **Mestre em Química Analítica.**

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química – USP, Grupo de Pesquisa de Fatores de Crescimento, Hormônios e Ciclo Celular. 1996 a 2001. **Aspirante a Doutor em Bioquímica.**

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Fapesp sob orientação do Prof. Dr. Hugo A. Armelin, junto ao Grupo de Pesquisa de Fatores de Crescimento, Hormônios e Ciclo Celular, IQSP - USP. 1996-2000.

EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

Monitor do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE), da disciplina de Bioquímica, Depto de Bioquímica, IQ-USP, junto ao curso de Ciências Biológicas do IB-USP, 1996.

Supervisão e co-orientação de alunos de graduação em projetos de iniciação científica – bolsa FAPESP, Depto de Bioquímica, IQ-USP, 1997 a 1999.

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS NACIONAIS

III Encontro Nacional de Biomateriais, IPEN/CNEN-USP, São Paulo-SP, 9 a 10 de maio de 1996.

Trabalho: "Alterações estruturais e morfológicas na organização macromolecular de matriz de colágeno tratada com 1,4-dioxano: um estudo histológico e por microscopia eletrônica".

Autores: Forti, F. L.; Goissis, G. e Plepis, A. M. G.

XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú-MG, 03 a 06 de maio de 1997.

Trabalho: "Expression of ACTH receptor from mouse Y-1 adrenocortical cell line on 3T3 fibroblasts and AR-1 cells"

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A. -

XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Caxambú-MG, 27 a 30 de agosto de 1997.

Trabalho: "Expression of ACTH receptor from mouse Y-1 adrenocortical cell line on 3T3 fibroblasts and AR-1 cells"

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú-MG, 23 a 26 de maio de 1998.

Trabalho: "ACTH effects on fibroblasts expressing the ACTH receptor".

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

Trabalho: "Synthesis of FGF and PDGF by the mouse Y-1 adrenocortical cell line".

Autores: I. T. Rebustini; Forti, F. L.; Armelin, H. A.

XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú-MG, 22 a 25 de maio de 1999.

Trabalho: "Induction of FOS and JUN proteins by ACTH in Balb 3T3 fibroblasts transfected with the ACTH receptor".

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

Trabalho: "Expression of growth factors by the Y-1 adrenocortical cell line".

Autores: I. T. Rebustini; Forti, F. L.; Armelin, H. A.

XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise (SBMM) / X Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular (SBBC), Santos-SP, 13 a 16 de outubro de 1999.

Trabalho: "Study of structure and cytotoxicity of anionic and native collagen from bovine pericardium".

Autores: Bet, M. R.; Forti, F. L.; Goissis, G.

XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), Caxambú-MG, 27 a 30 de maio de 2000.

Trabalho: "ACTH effects in AR-1 cells expressing the ACTH receptor".

Autores: Forti, F. L.; Asprino, P. F.; Armelin, H. A.

Trabalho: "Expression of ACTH receptor into AR-1 cells".

Autores: Asprino, P. F.; Forti, F. L.; Armelin, H. A.

XV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Caxambú-MG, 23 a 26 de agosto de 2000.

Trabalho: "Effects of ACTH in mouse 3T3 fibroblasts and AR-1 cells expressing the ACTH receptor"

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

Trabalho: "Synthesis of growth factors by the mouse Y-1 adrenocortical cell line".

Autores: I. T. Rebustini; Forti, F. L.; Armelin, H. A.

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS CIENTÍFICOS INTERNACIONAIS

11th Meeting of the International Society for Artificial Organs (ISAO), Providence, R.I., USA, June 29-July 01, 1997.

Trabalho: "A Chemical Procedure for the Preparation of Cell Free Collagen Matrices for Biomaterial Applications".

Autores: Forti, F. L.; Goissis, G.; Plepis, A. M. G.

VIth International Symposium on Orthomolecular Medicine, Sao Paulo, SP, Brazil, August 13-15, 1997.

Trabalho: "Expression of ACTH receptor from mouse Y-1 adrenocortical cell line on 3T3 fibroblasts and AR-1 cells".

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

VIIIth Adrenal Cortex Conference, Manoir des Sables, Orford, Québec, Canada, june 13-16, 1998.

Trabalho: "ACTH induces c-fos proto-oncogene in fibroblasts expressing the ACTH receptor".

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

I International Symposium on Signal Transduction and Gene Expression in Cell Proliferation and Differentiation, São Paulo, SP, Brazil, august 31-September 2, 1998.

30th Gordon Research Conference in "Hormone Action", Kimball Union Academy, Meriden, New Hampshire, USA, july 25-30, 1999.

Trabalho: "Effects of ACTH in Balb 3T3 fibroblasts and AR-1 cells transfected with the ACTH receptor".

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

Salk/EMBL Oncogenes and Growth Control Meeting, The Salk Institute, San Diego, California, USA, august 18-22, 1999.

II International Congress On Biomaterials, Biomat'99, Havana, Cuba, November 2-6, 1999.

Trabalho: "Physicochemical properties and growth behaviour of collagen materials extracted in aqueous dimethylsulfoxide".

Autores: Bet, M. R.; Forti, F. L.; Moriwaki, C. M. E. Y.; Goissis, G.

IXth Adrenal Cortex Conference, The University of St. Michaels College, University of Toronto, Toronto, Canada, june 17-20, 2000.

Trabalho: "ACTH inhibits a Ras-Dependent Anti-Apoptotic and Mitogenic Pathway in Mouse Y1 Adrenocortical Cells".

Autores: Forti, F. L.; Armelin, H. A.

Trabalho: "Signal Transduction in G0/G1-Arrested Mouse Y1 Adrenocortical Cells Stimulated by ACTH and FGF2".

Autores: Lepique, A. P.; Forti, F. L.; Moraes, M. S. and Armelin, H. A.

APRESENTAÇÃO DE SEMINÁRIOS

VIth International Symposium on Orthomolecular Medicine, São Paulo-SP, Brazil, 14 de agosto de 1997. Título: "Expression of ACTH receptor from mouse Y-1 adrenocortical cell line on 3T3 fibroblasts and AR-1 cells".

"Molecular Biology and Virology Laboratory (MBVL)", The Salk Institute, San Diego, California, USA, 29 de outubro de 1999. Título: "Genetic identification of components of signaling initiated in ACTH receptors".

"Seminários Gerais em Bioquímica", Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP-SP, 15 de junho de 2000. Título: "Transdução de sinal pelo receptor de ACTH".

"I Jornada Regional de Iniciação Científica em Química", IFQSC-USP, São Carlos-SP, 18 de outubro de 1991. Título: "Preparação de carboximetilcelulose (CMC) a partir de bagaço de cana-de-açúcar".

Prêmio Jovem Cientista "Luiz Renato Caldas 2000", XV Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE 2000, Caxambú-MG, 25 de agosto de 2000. Título: "Effects of ACTH in mouse 3T3 and AR-1 cells expressing the ACTHR receptor".

PRÊMIO

2º LUGAR E MENÇÃO HONROSA com o Trabalho Entitulado: "Effects of ACTH in mouse 3T3 and AR-1 cells expressing the ACTHR receptor".

Prêmio Jovem Cientista "Luiz Renato Caldas 2000" realizado na XV Reunião da Federação das Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE 2000, Caxambú-MG, 23-26 de agosto de 2000.

ESTÁGIO NO EXTERIOR

Parte do projeto do doutorado (sub-projeto) realizada no Molecular Biology and Virology Laboratory (MBVL), The Salk Institute, San Diego, California, USA, de julho a dezembro de 1999. Título do projeto: "Genetic identification of components of signalling initiated in ACTH receptors". Colaboradores: Prof. Dr. Tony Hunter e Dr. Cláudio A. P. Joazeiro.

PUBLICAÇÕES

- Forti, F. L. and Armelin, H. A. (1998). **“ACTH induces c-fos proto-oncogene in fibroblasts expressing the ACTH receptor”**, Endocrine Research, 24 (3-4), 433-437.
- Bet, M. R.; Forti, F. L. and Goissis, G. (1999). **“Study of structure and citotoxicity of anionic and native collagen from bovine pericardium”**, Acta Microscópica, 8 (A), 15-16.
- Lotfi, C.F.P.; Lepique, A.P.; Forti, F.L.; Schwindt, T.T.; Eichler, C.B.; Santos, M.O.; Rebustini, I.T.; Hajj, G.N.M.; Juliano, L. and Armelin, H.A. (2000). **“Proliferative signalling initiated in ACTH receptors”**. Braz. J. Med. Biol. Res. 33 (10), 1133-1140.
- Forti, F.L. and Armelin, H.A. (2000). **“Inhibition of na anti-apoptotic pathway by ACTH: a Ras dependent survival of Y-1 adrenocortical cells”**. Endocrine Research. (In press).
- Lepique, A.P.; Forti, F.L.; Moraes, M.S. and Armelin, H.A. (2000). **“Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y-1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2”**. Endocrine Research. (In press).
- Forti, F.L.; Schwindt, T.T. and Armelin, H.A. **“Cell cycle inhibition by ACTH in Y1 mouse adrenocortical cells is AKT and p27^{Kip1}-dependent”**. Manuscrito em preparação.
- Forti, F.L. and Armelin, H.A. **“Using GPCR ectopic expression to understand signal transduction of ACTH/ACTHR system in adrenal cells”**. Manuscrito em preparação.