INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

PROLACTINA HUMANA PSEUDOFOSFORILADA (S179D-hPRL) É UM POTENTE FATOR ANTI-ANGIOGÊNICO IN VITRO E IN VIVO

ERIC KINNOSUKE MARTINS UEDA

Tese apresentada como parte dos Requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador: Dr. PAOLO BARTOLINI

São Paulo

2006

"... it's not who you are underneath, it's what you do that defines you..."

Rachel Dawes, Gothan City, 2005

AGRADECIMENTOS

À "Buttercup" por ter acreditado em planos mirabolantes

Aos meus pais por também acreditarem em planos mirabolantes

Ao Dr. Paolo Bartolini pela orientação, incentivo e conselhos (tanto acadêmicos como sobre a vida lá fora)

Ao Dr. Carlos Soares pela paciência, insistência e bom humor nas horas negras (e não foram poucas)

À Dr. Tereza Ribela pelas idéias e conselhos nos corredores, além de seu otimismo (diria quase utópico) que certamente muito adicionaram a esse trabalho

Aos amigos João de Oliveira, José Maria, Rosângela, Junqueira, Cláudia e Taís por agüentarem meu mau humor de manhã, minhas reclamações de tarde, e desabafos durante o dia, todos incluindo a palavra prolactina

À minha amiga Jana que sempre respondeu meus emails desesperados e nunca me deixou esquecer um relatório ou uma matrícula sequer

À minha amiga Renata "Milani" pelas conversas sobre depleção de serotonina

À Dra. Ameae Walker pela colaboração, idéias, e estímulo que foram vitais quando estive em seu laboratório

Aos colegas Wei, Tan, Yen-Hao, Mark, Lisa, Ariel e Valencia que tornaram minha estadia na UCR menos estressante

À Dr. Mary Lorenson pelas dicas, conselhos bizarros e por me fazer entender que nem tudo que é novo é necessariamente melhor

Ao Dr. Lo pela paciência e criatividade

Ao CNPq pelo apoio financeiro

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização desse trabalho

PROLACTINA HUMANA PSEUDOFOSFORILADA (S179D-hPRL) É UM POTENTE FATOR ANTI-ANGIOGÊNICO *IN VITRO* E *IN VIVO*

Eric Kinnosuke Martins Ueda

RESUMO

S179D prolactina (hPRL) é uma mímica molecular da prolactina humana fosforilada. Demonstrou-se que a S179D-hPRL era anti angiogênica nos ensaios de angiogênese baseados na membrana corialantóica de galinha e na córnea de camundongos. Investigações posteriores realizadas empregando modelos in vitro demonstraram que o tratamento com S179D-hPRL diminuiu o número de células viáveis, reduziu a formação de túbulos em Matrigel e interferiu com a migração e invasão da matriz extracelular. A análise dos fatores de crescimento de células endoteliais humanas tratadas com S179D-hPRL revelou: uma diminuição na expressão ou liberação da PRL endógena, da heme-oxigenase-1, do fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e um aumento na expressão de dois inibidores teciduais de metaloproteases. A S179D-hPRL também bloqueou a sinalização provocada por bFGF nessas células. Nós concluímos que essa mímica molecular do hormônio pituitário fosforilado é uma potente proteína antiangiogênica, em parte devido á sua habilidade de reduzir o estímulo autócrino de fatores de crescimento de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), por sua capacidade de bloquear a sinalização promovida pelo bFGF e por sua habilidade de interferir na migração endotelial.

Também foi estudada a influência da S179D-hPRL na apoptose em células endoteliais humanas, empregando caspase-8 como um marcador da via extrínseca, e a liberação de citocromo C como um marcador da via intrínseca. As duas cascatas convergem na ativação da caspase-3, que cliva a fator de fragmentação de DNA (DFF45). Uma incubação de três dias com 50 ng/mL de S179D-hPRL quadruplicou o número de células apoptóticas; esse efeito duplicouse com uma concentração de 100 ng/mL e atingiu um ápice com 500 ng/mL. A clivagem de DFF45 e da pro-caspase-8 foi detectado com 100 ng/mL. Citocromo C, porém, só foi observado com concentrações de 500 ng/mL. O

1

regulador de ciclo celular p21 (um marcador pró-apoptótico) elevou-se com 100 ng/mL, enquanto que um incremento do supressor tumoral p53 necessitou três vezes o tempo de incubação e 500 ng/mL. A atividade do promotor de p21 foi máxima com 50 ng/mL do análogo de hPRL, enquanto que 500 ng/mL foram necessários para se visualizar uma alteração significativa na atividade do promotor de Bax (um indicador da atividade de p53). Como previamente demonstrado na bloqueou a fosforilação literatura, S179D-hPRL da quinase regulada extracelularmente (ERK) em resposta ao bFGF, mas também causou uma ativação tardia e prolongada da ERK. PD 98059 [inibidor específico da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPkinase)] inibiu essa ativação tardia e sustentada assim como outros efeitos da S179D-hPRL, exceto aquele sobre a indução de p53 e ativação do promotor de Bax. Podemos concluir que baixas doses de S179D-hPRL bloqueiam a sinalização de ERK induzida por bFGF e concomitantemente ativam a ERK em um tempo diferente, resultando na elevação de p21 e ativando a via extrínseca de apoptose. Maiores tempos de incubação e concentração, entretanto, ativam a via intrínseca empregando uma cascata intracelular diferente.

Esses achados sugerem que níveis circulantes de PRL fosforilada podem inibir a progressão do câncer e, portanto, S179D-hPRL poderia ser um agente anti-angiogênico útil na terapêutica.

PHOSPHORYLATED HUMAN PROLACTIN (S179D-hPRL) IS A POTENT ANTI-ANGIOGENIC HORMONE IN VITRO AND IN VIVO

Eric Kinnosuke Martins Ueda

ABSTRACT

S179D-prolactin (hPRL) is an experimentally useful mimic of naturally phosphorylated human prolactin. S179D-hPRL, but not unmodified PRL, was found to be anti-angiogenic in both the chorioallantoic membrane and corneal assays. Further investigation using human endothelial in vitro models showed reduced cell number, reduced tubule formation in Matrigel, and reduced migration and invasion, as a function of treatment with S179D-hPRL. Analysis of growth factors in human endothelial cells in response to S179D-hPRL showed a decreased expression or release of endogenous PRL, heme-oxygenase-1, basic fibroblast growth factor (bFGF), angiogenin, epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor and an increased expression of inhibitors of matrix metalloproteases. S179D-hPRL also blocked signaling from bFGF in these cells. We conclude that this molecular mimic of a pituitary hormone is a potent anti-angiogenic protein, partly as a result of its ability to reduce utilization of several well-established endothelial autocrine growth loops, partly by its ability to block signaling from bFGF and partly because of its ability to decrease endothelial migration.

We also examined the influence of S179D-hPRL on apoptosis in human endothelial cells, using procaspase-8 as a marker of the extrinsic pathway, and cytochrome C release as a marker of the intrinsic pathway. Both pathways converge at caspase-3, which cleaves DNA fragmentation factor (DFF45). A 3-day incubation with 50 ng/ml S179D-hPRL quadrupled the early apoptotic cells; this effect was doubled at 100 ng/ml and maximal at 500 ng/ml. DFF45 and procaspase 8 cleavage were detectable at 100 ng/ml. Cytochrome C, however, was unaffected until 500 ng/ml. p21 increased at 100 ng/ml, whereas a change in p53 activity required both triple the time and 500 ng/ml. p21 promoter activity was maximal at 50 ng/ml, whereas 500 ng/ml were required to see a significant change in the Bax promoter (a measure of p53 activity). As previously shown, S179D-hPRL blocked extracelular regulated kinase (ERK) phosphorylation in response to bFGF, but, in addition, continued co-incubation showed a delayed and prolonged activation of ERK. PD98059 [a specific mitogen-activated protein kinase (MAPkinase) inhibitor] inhibited this delayed activation of ERK and the effects of S179D-hPRL on all parameters except p53, or activity of the Bax promoter. We conclude that low doses of S179D-hPRL block bFGF-induced ERK signaling and yet activates ERK in a different time frame to elevate p21, and activate the extrinsic pathway. Longer incubations and higher concentrations, however, additionally activate the intrinsic pathway using an alternate intracellular signal.

These findings suggest that circulating levels of phosphorylated hPRL may reduce the progression of cancer and, furthermore, that S179D-hPRL may be a useful anti-angiogenic therapeutic.

SUMÁRIO

1.0. Introdução	
1.1. Câncer e Prolactina (PRL)	10
1.1.1. Câncer de mama	
1.1.2. Câncer de próstata e hiperplasia benigna da próstata (HPB)	
1.2. Efeitos da S179D-hPRL como antagonista da PRL em estudos i	n vitro e in
vivo	14
1.3. S179D-hPRL como agonista: vias de sinalização celular da S17	9D-hPRL.16
1.4. Outros antagonistas de PRL	20
1.5. Angiogênese	21
1.6. Angiogênese e câncer	
1.7. Angiogênese e PRL	
1.8. Apoptose e ciclo celular: considerações gerais	
1.8.1. Via extrínseca (receptores da morte)	
1.8.2. Via intrínseca (mitocôndrial)	
1.8.3. Controle do ciclo celular	
1.8.4. S179D-hPRL, apoptose e regulação do ciclo celular	
2.0. OBJETIVOS	
3.0. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Produção de PRL e S179D-hPRL como corpos de inclusão rena	turados48
3.1.1. Subclonagem e mutação sítio específica	
3.1.2. Expressão das proteínas e renaturação dos corpos de inclus	ao 49
3.2. Produção de PRL e S179D-hPRL em células humanas (HEK 29	3)50
3.2.1. Cultura de células e vetores de expressão	50
3.2.2. Transfecção transiente de células HEK-293 para expressão	das PRLs 51
3.3. Determinação de proteínas (ensaio de Bradford e radioimunoens	saio)52
3.4. Densitometria a laser dos géis de SDS-PAGE corados com Coo	massie Blue
	53
 3.5. Determinação da atividade biológica (potência) da PRL não mod 	lificada53
3.6. Determinação da atividade biológica (potência) da S179D-hPRL	54
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	54
3.8. Western Blots (Imunoblots) e imunoprecipitação (IP)	55
3.8.1. Preparação de lisado de extrato celular total	55
3.8.2. Preparação de lisado de extrato celular citosólico	55
3.8.3. Western blots (imunoblots)	55
3.8.4. Imunoprecipitação e Western blotting (imunoblot)	
3.9. Espectrometria de massa (MALDI-TOF)	57
3.10. Determinação dos níveis de endotoxina (LPS)	57
3.11. Ensaio de angiogênese na membrana coriolantóica de embriõe	s de galinha
(CAM)	58
3.12. Ensaio de angiogênese na córnea de ratos	58
3.13. Cultura de células endoteliais humanas	59
3.14. Ensaio de proliferação celular	59
3.15. Formação de túbulos endoteliais em Matrigel	60
3.16. Análise por citometria de fluxo	60

3.16.1. Análise do conteúdo de DNA (fragmentação de DNA)	. 60
3.16.2. Dupla visualização com anexina V (V) e jodeto de propídio (PI)	
(externalização de fostatidilserina [PS])	. 61
3.17. Ensaio de migração celular ("Cloning ring assay")	.61
3.18. Ensaio de guimiotaxia celular	.62
3.19. Cultura de anéis de aorta de rato (ensaio ex vivo)	.63
3.20. Avaliação qualitativa e quantitativa do crescimento endotelial no ensaio	de
anéis de aorta	.63
3.21. Estudo da expressão gênica por RT-PCR e real time RT-PCR	.64
3.21.1. RT-PCR semiquantitativo	. 66
3.21.2. "Real time" RT-PCR quantitativo	. 66
3.22. Protein array (arranjo de proteínas)	.66
3.23. Estudo da atividade dos promotores das proteínas p21 e Bax (ensaios o	е
transativação do gene repórter)	.67
3.23.1. Construções (plasmídeos-gene repórter Luciferase)	. 67
Para os ensaios com PD 98059 empregamos um controle consisitindo de un	na
construção que codifica uma forma mutante de ERK, com efeito dominante	
negativo (pERK-DN) (145)	. 67
3.23.2. Transfecção transiente e quantificação das atividades da luciferase	Э
da β -galactosidase	. 67
3.24. Análise estatística	.68
3.25. Manipulação de animais	.68
4.0. RESULTADOS	. 69
4.1. Caracterização das preparações de S179D-hPRL e PRL produzidas em I	Ξ.
	.69
4.1.1. SDS-PAGE, Western Blot e espectrometria de massa das preparaçõe	es
	. 69
4.1.2. Avallação da atividade biológica (potencia)	. 72
4.2. Ensaios <i>IN VIVO</i>	.74
4.3. Elisalo sobre a proliferação celular endotellar	.//
4.4. Eleitos sobre a migração celular	10. 86
4.5. Efeito da S179D-IFINE sobre a expressão genica de hovecommunados á	.00
andiogânese	88
4.7 Efeito da S179D-bPRI, sobre a apontose e ciclo celular de células	.00
endoteliais	91
4.8 Efeitos da S179D-hPRL sobre a sinalização pela via da MAPkinase	00
5.0. DISCUSSÃO	106
6.0. CONCLUSÃO	114
7.0. REFERÊNCIAS	115

1.0. INTRODUÇÃO

A prolactina (PRL) é um hormônio pituitário envolvido em um amplo espectro de atividades biológicas, possuindo mais ações biológicas que todos os outros hormônios pituitários combinados. O número de diferentes atividades biológicas desse versátil hormônio pode chegar a 300 funções separadas em vertebrados. O primeiro passo para a ação fisiológica da PRL, assim como para todos os outros hormônios, é a sua ligação ao um receptor de membrana específico, o chamado receptor de PRL (PRLR) (23,91). Estudos sobre a estrutura secundária da PRL, tais como dicroísmo circular (CD), demonstraram que a PRL possui 50% de α-hélices, enquanto que o restante da molécula se organiza em estruturas desorganizadas tipo alça ("loop"). Tentativas iniciais de se determinar à estrutura terciária da PRL (difração de raios-X, ressonância magnética) não foram bem sucedidas. A única informação antes disponível sobre a estrutura terciária da PRL foi fornecida por modelos baseando-se em sua homologia com o hormônio do crescimento (GH), empregando-se a estrutura do GH porcino (1,95). Como antecipado, a PRL se organiza como um ramo de guatro α -hélices e compartilha com os GHs, a disposição de dois pares de α -hélices antiparalelos (figura 1 e 2). Recentemente a estrutura da PRL foi revelada por ressonância magnética nuclear (RMN) (119,230) e maiores detalhes sobre suas características puderam ser observados. Pôde-se observar que o modelo baseado na estrutura do GH porcino estava correto, com algumas discretas variações (119). Em ambos os trabalhos referentes à estrutura 3D da PRL, constatou-se que a PRL em solução adota a clássica conformação de outras proteínas da família das citocinas hematopoiéticas (ex. GH, figura 2).



Figura 1. Estrutura da PRL humana. (a) Visão estérica da estrutura resolvida por espectroscopia de RMN. Os átomos C, C^{α} e N das quatro principais hélices (Leu15- Arg43, Lys78-Arg103, Ala111-Val137 e Glu161-Ile193) foram empregados para alinhamento das estruturas. (b) Representação de fitas da estrutura das hélices como indicadas. (230).



Figura 2. Diagrama de fitas da estrutura resolvida por espectroscopia RMN pelo grupo de Hodsdon (119). (a) Estrutura da PRL obtida por espectroscopia RMN; (b) estrutura do GH obtida por difração de raios-X.

Os receptores de hPRL (PRLRs) são membros da superfamília de receptores de citocinas classe I, e como tais possuem uma série de características em comum com receptores de citocinas clássicos (56,57,88). Essa superfamília de receptores possui as seguintes características estruturais: (1) todos possuem domínios transmembrânicos que se associam com quinases efetoras ao invés de possuírem uma atividade de quinase intrínseca e (2) a formação de homo ou heteromultímeros de isoformas dos receptores envolvidos é teoricamente iniciada pela interação com seu ligante (ex. PRL), que por sua vez leva a transfosforilação da quinase associada e iniciação de diversas cascatas de sinalização intracelular (51,61) (figura 3). Para o PRLR, a dimerização é considerada suficiente para iniciar a sinalização intracelular e correspondente efeito biológico (51). Esse modelo, onde a dimerização se dá pela formação do complexo ternário (dímero de PRLR e PRL), foi desenvolvido pela análise de hormônios análogos (ex. GH) e é apoiado por estudos onde duas cópias do domínio extracelular do PRLR de rato formam um complexo com o lactogênio placentário ovino (40). Ao contrário da PRL, onde um gene dá origem a apenas uma proteína madura, o gene do PRLR, através de "splicing" alternativo, dá origem á varias isoformas de PRLR. Em ratos, as diversas isoformas diferem em seu comprimento e composição de sua porção intracelular e são denominados formas curta, intermediária e longa (figura 4) (89,120). Formas solúveis também foram identificadas em humanos, onde apenas o domínio extracelular é secretado, não sabendo-se se esta isoforma deriva de um produto de "splicing" alternativo ou proteólise do PRLR (ntegro (figura 4) (47,64).



Figura 3. Relação estrutura-função do domínio citoplasmático da forma longa de PRLR (LF-PRLR). A região "Box 1" é necessária para a ligação com JAK2; não se sabe contudo se essa ligação é direta ou necessita de uma proteína adaptadora. Os dois resíduos de leucina (aa 259-260), identificados na forma curta do PRLR (SF-PRLR), são provavelmente envolvidos na internalização de todas as isoformas do PRLR. Seis tirosinas (das nove presentes no PRLR de rato) são possíveis alvos de fosforilação. A extremidade C-terminal (Y580) é necessária para ativação da Stat5, e é proposto como o principal sítio de ligação da proteína Stat5. Y479 e Y473 também podem ativar Stat5, mas são sítios de menor afinidade. Stat1 e Stat3 provavelmente interagem com regiões do receptor próximas à membrana; locais candidatos seriam Y309 no receptor ou tirosinas a serem identificadas da JAK2. A região do receptor próxima à membrana é comum à todas as isoformas de receptores e é necessária para ativação e ativação de JAK2, Fyn e MAP quinases assim como também para ativação da proliferação



celular e transcrição de proteínas do leite (ex. Beta-caseína). (23).

Figura 4. Todo o receptor de hPRL tem domínios transmembrânicos únicos e suas regiões transmembrânica e extracelular possuem seqüência de aminoácidos idênticas. Todos os receptores possuem um sítio "box 1" conservado, que é importante para a ligação de JAK2. A função da região conservada "box 2" é atualmente desconhecida mas, para alguns membros da superfamília de citocinas, a região "box 2" não parece ser necessária para a ativação de JAK2. Pode ser que seja requerida para a ancoragem de outras moléculas de sinalização ainda a serem definidas. Os números sob os receptores indicam o número de aminoácidos da seqüência. IF, receptor forma intermediária; LF receptor forma longa; SF, receptor forma curta; Y, tirosina. (246).

Em humanos, além da forma solúvel (PRLbp), temos outras formas de receptores de membrana, produzidas por "splicing" alternativo que foram recentemente identificadas (110,236). Foram identificadas duas isoformas curtas, somando-se a forma longa (LF-PRLR) e a forma intermediária (IF-PRLR), clonadas de células de câncer de mama humano (25,125). As denominações desses receptores como LF-PRLR, IF-PRLR e formas curtas (SF-PRLR), entretanto é um pouco equivocada, visto que a IF-PRLR é de fato menor que

uma das SF-PRLR. LF-PRLR possui 598 aminoácidos, enquanto que a IF-PRLR possui 325 aminoácidos, sendo menor que a forma curta 1a (SF1a-PRLR) de 352 aminoácidos e maior que a isoforma curta 1b (SF1b-PRLR) de 264 aminoácidos (25,125).

Apesar da hPRL possuir apenas um transcrito, a proteína sofre diversas modificações pós traducionais tais como proteólise, glicosilação e fosforilação (167,219). Foi demonstrado que modificações, tais como proteólise e fosforilação, podem dar origem a diferentes atividades biológicas de hPRL. A clivagem da prolactina em um produto denominado 16K-PRL apresentou atividade antiangiogênica em sistemas in vitro e modelos in vivo (43,44,45,46,74,143). De forma similar o grupo de Walker observou que preparações de PRL humana guando defosforiladas apresentavam uma maior atividade biológica que amostras não digeridas com fosfatase (250). Baseando-se nessas observações iniciais, postulou-se que a hPRL fosforilada (hPRL-P) estaria agindo como um antagonista da isoforma não modificada (hPRL). Observação similar foi reportada para a PRL de origem bovina (259). Como a quantidade de hPRL-P é muito baixa, e sua separação da hPRL não fosforilada complexa (35), optou-se pela síntese de uma isoforma pseudofosforilada onde a serina 179 foi substituída por um resíduo de aspartato, criando-se assim uma conformação e cargas similares à forma fosforilada da PRL. Tal metodologia é extensamente empregada na produção de formas pseudofosforiladas de outras proteínas, onde os sítios de fosforilação são substituídos por resíduos ácidos como aspartato (65,66,235). O resíduo de serina 179 seria o sítio mais provável de fosforilação da PRL humana (237), baseando-se na homologia com o sítio de fosforilação da PRL de ratos, o resíduo de serina 177 (249). Essa isoforma pseudofosforilada mostrou-se um antagonista da PRL em ensaios in vitro (35) e abriu novas possibilidades de estudo sobre o papel da PRL em doenças como câncer de mama (50) e câncer de próstata (205).

1.1. Câncer e Prolactina (PRL)

1.1.1. Câncer de mama

Evidências recentes sugerem que a PRL é produzida localmente em diversos órgãos, incluindo o tecido da mama, o endométrio e células T (48,172). Sabe-se também que a PRL age como um fator autócrino/parácrino no tecido mamário (87,257). Diversos estudos têm demonstrado que mRNA de PRL é produzido no epitélio mamário humano e que células de câncer mama produzem quantidades significativas de PRL *in vitro* (201). Nos anos 80, diversas pesquisas clínicas foram realizadas para estudar a possibilidade do uso de drogas que pudessem inibir a produção de PRL em câncer de mama. Os resultados, porém, foram negativos, provavelmente devido ao fato que estas drogas apenas inibiam a produção de PRL pituitária, e não interferiam na produção de PRL pelo tecido mamário. Mais recentemente, vários estudos in vivo e in vitro indicam que a PRL pode estar envolvida na formação de tumores (50) estimulando a proliferação e sobrevivência celular (97,159,196,214), aumentando a motilidade celular (163) e promovendo a vascularização tumoral (50,224). Vários fatores indicam que a PRL tem múltiplos efeitos sobre células normais e tumorais. Está bem estabelecido que a PRL tem um efeito mitogênico em células de mama (50). Em linhagens de células de câncer de mama, a administração de PRL exógena aumentou a proliferação celular (32,150,214), e em outro estudo a PRL reverteu os efeitos inibitórios do ciclo celular provocados pela radiação (32). De forma similar, quando uma linhagem celular de câncer de mama foi induzida a produzir altos níveis de PRL endógena, observou-se um aumento de 1,5 vezes da proliferação comparando com os controless, sendo que o efeito da PRL foi exacerbado pela co-administração de estradiol (97). A administração de anticorpos contra PRL é capaz de inibir a proliferação celular e coibir a progressão do ciclo celular in vitro (37,85,155). Postula-se que a PRL influencia a proliferação e crescimento

celular alterando a ciclina D1, uma importante proteína reguladora do ciclo celular (28,50). A prolactina endógena aumenta os níveis de ciclina D1, e esse efeito pode ser magnificado com a adição de estradiol, o que sugere que a PRL poderia aumentar a sensibilidade das células aos efeitos estrogênicos (97). A prolactina também parece possuir efeito anti-apoptótico em células de câncer de mama (10). De fato foi também descrito que a PRL endógena estava negativamente correlacionada com apoptose induzida por C2-cermida (50,196). A adição de anticorpos anti-PRL resultou em um aumento de morte celular em cerca de três a dez vezes no mesmo modelo. De forma análoga, a adição de PRL exógena diminui o número de células apoptóticas em 30%/100 ng/mL de S179D-hPRL (196). Dados em animais também são consistentes com o papel da PRL no processo de formação de tumores. Entre 65 e 80% dos camundongos transgênicos com expressão constante de PRL no epitélio mamário desenvolveram carcinomas, em comparação com os controles (5%) (206). A expressão transgênica resultou em um aumento da porcentagem de células na fase S, aos seis meses de idade. De forma similar todos os animais transgênicos expressando prolactina desenvolveram carcinomas mamários aos 11-15 meses de idade, enquanto os controles apresentaram tecido mamário normal (257). Ratos que receberam xenoimplantes de células tumorais expressando altos níveis de PRL tiveram uma progressão do tumor mais rápida e um aumento no número de metástases em comparação aos controles (150).

Existe evidência limitada que sugere que a PRL está associada com uma maior motilidade celular e angiogênese. Em um estudo, a PRL promoveu um aumento significativo na migração de células de câncer de mama; sendo que 70% das células migraram em direção ao gradiente de PRL (163). Esses dados, combinados com os resultados *in vivo*, onde a administração de PRL aumenta o número de metástases (150), sugerem que existe envolvimento da PRL no processo de metástase tumoral.

O PRLR foi detectado por imunohistoquímica (IHC) em tecidos normais e em tumores de mama. Entretanto, a concentração de receptores foi maior em tecidos tumorais, com 70-95% dos tumores positivos para PRLR (83,150,166,191,201,234). Aparentemente a localização dos PRLRs também foi diferente, sendo que em células normais a localização foi ao longo da borda luminal, enquanto que a localização em células cancerosas era primariamente no citoplasma (83). Apesar destes dados, uma análise em busca de mutações no PRLR em tumores não observou nenhum tipo de mutações (86). A presença de PRLRs em tumores de mama não esteve associado com várias características clínicas incluindo grau de desenvolvimento do tumor (86), mas pode estar associado com diferenciação tumoral (199). Presença do hormônio PRL também foi observada em tumores malignos da mama. Dois estudos reportaram que cerca de 80% dos tumores de mama eram positivos para PRL no citoplasma (22). Um aumento da positividade estava significantemente associado com um aumento no tamanho tumoral, malignidade, envolvimento de nódulos (22). Além disso, a presença de PRL estava positivamente associada com a presença de seu receptor (22). Embora a positividade de PRL esteja associada com o estágio do tumor e presença de receptor, a presença de receptor por si só não estava associada com o estágio tumoral (22).

1.1.2. Câncer de próstata e hiperplasia benigna da próstata (HPB)

Devido ao aumento na expectativa de vida, doenças como HPB e câncer de próstata se tornaram comuns. Câncer de próstata é agora a primeira causa de óbitos provocados por câncer em homens. O crescimento, diferenciação e apoptose de células da próstata são regulados principalmente por androgênios. Por esta razão, o tratamento principal de tumores prostáticos consiste na inibição da síntese ou ação dos androgênios. Infelizmente, na maioria dos casos, o volume do tumor sofre um decréscimo inicial, mas células malignas continuam a divisão celular.

Embora o papel da PRL na fisiologia da próstata tem sido colocado em evidência por algum tempo (58,142), a importância da PRL em doenças da próstata foi subestimada devido a vários estudos clínicos que falharam ao tentar encontrar uma correlação clara entre níveis circulantes de PRL e a presença ou

ausência de doença (101,185,211). Existem duas razões importantes para esse fato. A primeira razão é que a PRL é secretada em uma variedade de isoformas com modificações pós-traducionais, que por sua vez não são igualmente reconhecidas por imunoensaios sendo que algumas têm demonstrado diferentes atividades biológicas (219). Dessa forma, níveis séricos de PRL poderiam estar elevados sem um aumento concomitante na atividade estimulatória da próstata e *vice-versa*. O segundo motivo, seria a produção de PRL prostática. Se a fonte de PRL extrapituitária, que inclui uma grande quantidade de tecidos (15), contribui coletivamente com cerca de 10-20% dos níveis circulantes de PRL, um aumento de duas vezes ou mais de PRL na próstata não acarretaria um aumento detectável nos níveis séricos totais. Entretanto esse aumento regional de PRL poderia ter efeitos significativos sobre a proliferação de células na próstata.

Está bem definido que outros fatores não-androgênicos interferem com esse fenômeno. Demonstrou-se que PRL é um dos fatores não esteroidais que se supõe estar envolvido tanto na proliferação celular (179), como também no desenvolvimento da HPB e câncer da próstata (116,179,180,241,242). O papel da PRL na fisiopatologia da próstata se torna mais importante com a idade. De fato, os níveis de PRL prostática aumentam de acordo com a idade (146), enguanto que os níveis de testosterona diminuem (176). Além disso, a próstata sintetiza PRL (179), que provavelmente deve atuar via os PRLRs localizados no lado apical das células do epitélio acinar prostático. Esse fato poderia levar a uma estimulação parácrina/autócrina induzida por PRL da proliferação das células prostáticas. A PRL é capaz de produzir hiperplasia do estroma e displasias intraepiteliais quando é empregada em longa exposição (258). O mecanismo da ação da PRL é complexo. A PRL pode influeciar a próstata indiretamente via regulação dos níveis de receptores de hormônio luteinizante testicular e enzimas esteroidogênicas para aumentar a produção de testosterona. Em humanos as glândulas adrenais produzem precursores androgênicos, DHEA е dehidroepiandrosterona, em grandes quantidades em resposta a PRL (3). A PRL pode também agir diretamente; PRL e PRLR são expressos na próstata humana e de ratos (180) pelas células epiteliais. In vitro, a PRL é mitogênica para células

epiteliais de próstata cultivadas (165) e em culturas de órgãos a morfologia é melhor conservada pela adição de andrógeno à PRL (182). A expressão de PRL e PRLR é aumentada por tratamento com andrógeno *in vivo,* e os níveis de PRLR também aumentam em resposta à PRL (180,181). A PRL também desempenha um papel em doenças da próstata de forma direta e indireta. Células tumorais e células hiperplásicas da próstata mantêm a expressão de PRLR (116,180).

1.2. Efeitos da S179D-hPRL como antagonista da PRL em estudos *in vitro* e *in vivo*

A S179D-hPRL foi primeiramente descrita como um antagonista da PRL empregando-se como modelo, o ensaio in vitro que utiliza células de linfoma de rato Nb2 que são lactogênio-dependentes para sua proliferação (35). 0 antagonismo observado nesse estudo provou que a S179D-hPRL apresentava um antagonismo competitivo e dose dependente no ensaio in vitro com células Nb2. Observou-se ainda nesse trabalho, a importância da Serina 179 para a atividade geral da PRL selvagem, sendo que o mutante de alanina demonstrou uma baixa atividade biológica. Quatro grupos de pesquisa independentes demonstraram o antagonismo de S179D-hPRL em diferentes sistemas (136,178,213,265,267). A partir do estudo inicial de Chen et al. (35), diversos outros trabalhos mostraram o efeito da S179D-hPRL. Levando em conta que STAT5a e STAT5b estão envolvidas na sinalização de PRL, foi investigado o efeito da S179D-hPRL sobre a fosforilação destas duas proteínas intracelulares e demonstrou-se que S179DhPRL inibe a ativação da STAT5b. Essa inibição na fosforilação, resultou na menor formação de heterodímeros de STA5a-STAT5b, culminando numa menor proliferação das células Nb2 (57). Em outro estudo o antagonista S179D-hPRL inibiu os efeitos da PRL selvagem sobre os níveis de ciclina D1, a ativação da STAT5a na tirosina Y694 e a duração da ativação da quinase regulada extracelularmente (ERK), que estão ligados à proliferação de células tumorais de câncer de mama (213). Também foi demonstrada a atividade antagonista da

S179D-hPRL em ensaios *in vitro* com células tumorais de próstata LnCap, DU 145 e PC3, onde o antagonista inibiu a proliferação celular e em modelos *in vivo* onde S179D-hPRL inibiu o crescimento tumoral de xenoimplantes de células DU145 em camundongos nude (265). Em sistemas *in vitro*, onde a S179D-hPRL foi empregada para antagonizar os efeitos da PRL selvagem e concentrações dessa última são precisamente quantificadas (ex. em casos onde não há produção de PRL pela célula ou organismo em tratamento), a quantidade de S179D-hPRL eficaz para o antagonismo é cerca um décimo da concentração de PRL no sistema (213). Sob essas condições, a S179D-hPRL bloqueia a sinalização iniciada pela isoforma longa do PRLR, através da via de sinalização JAK-STAT (figura 5), resultando numa inibição da proliferação celular (213).



Figura 5. Representação esquemática da via de sinalização JAK-STAT do PRLR. PRLR ativa Stat1, Stat3 e principalmente Stat5. Interações de Stat5 como o receptor de glucocorticóides (GR) já foram descritas (23).

1.3. S179D-hPRL como agonista: vias de sinalização celular da S179D-hPRL

Apesar da S179D-hPRL possuir efeito antagonista da PRL em diversos sistemas *in vitro* e *in vivo* (35,136,178,213,265,267), sabe-se também que esse antagonista pode atuar como agonista parcial da PRL em certas circunstâncias (18,21), o que gerou certa controvérsia sobre o real papel dessa molécula

(18,21). S179D-hPRL também é capaz de promover a diferenciação celular (137,262,263) e induzir apoptose (239,267,268), via ativação prolongada da quinase regulada extracelularmente (ERK 1/2) (262,263). A PRL é capaz de ativar tanto a cascata de sinalização da JAK-STAT, como a via da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). No caso da via da MAPK, a ativação pela PRL se dá nos primeiros minutos de ativação, diferente da ativação tardia e prolongada provocada pela S179D-hPRL (240,262,263) (figura 6). Isso sugere que a diferença entre as conformações da PRL e S179D-hPRL, causaria uma diferença também nos complexos receptor-ligante iniciando diferentes sinais intracelulares (figura 7).



Figura 6. A transdução de sinal pelo PRLR ativa múltiplas cascatas de sinalização. A ativação induzida pelo ligante do complexo de PRLR ativa as vias de sinalização JAK-STAT, MAPK e Fyn. O "cross talk" entre essas vias de sinalização parece ser mais comum do que a ativação específica de uma única cascata de sinalização intracelular (49).



Figura 7. Diagrama da ativação do PRLR. **A**-A figura mostra de forma simplificada o receptor (PRLR) e seu ligante (PRL), sendo que se sugere que os receptores estejam pré-dimerizados e que a PRL não seja simétrica bilateralmente. Estudos de mutagênese claramente apóiam a teoria de um processo de dois passos na ligação da PRL ao PRLR. Em primeiro lugar ocorre a interação com o primeiro receptor, que gera uma mudança conformacional na PRL, que então se liga ao segundo sítio no segundo receptor. A formação do complexo PRLR-PRL, gera por sua vez uma mudança conformacional do receptor em seu domínio intracelular que permite as JAKs associadas se aproximarem entre si e iniciar a transfosforilação. Y, tirosina. **B**-Ativação do PRLR pela S179D-hPRL. Diagrama mostrando como um ligante de conformação diferente pode alterar a **18**

sinalização intracelular. Um ligante alterado pode interagir de forma diferente com os receptores causando uma mudança conformacional que inibiria a ligação de STAT (ilustrado aqui como o impedimento estérico dos sítios ligantes de STAT), enquanto que manteria a ativação das JAKs associadas e efeitos "dowstream" associados. Evidências que apóiam esse tipo de modelo são demonstradas em Seubert et al (216). S179D inibe a fosforilação de STAT induzida pela PRL (213) e é um agonista fraco quando empregado sozinho, produzindo uma baixa ativação de STAT (262). No entanto S179D-hPRL é um ótimo ativador da cascata da MAPK (240,262,263). Tal modelo poderia fornecer uma explicação para o modo de ação deste análogo.

A S179D-hPRL possuiria dessa forma, algumas vantagens pelo fato de não ser um antagonista puro de PRL, como no caso da G129R-hPRL (37), possuindo na mesma molécula, propriedades de antagonista e agonista:

- S179D-hPRL diminui a proliferação de células de próstata humana em modelos *in vivo* e *in vitro* bloqueando a estimulação autócrina de PRL (265);

- S179D-hPRL induz a expressão da proteína reguladora de ciclo celular p21, um marcador pró-apoptótico, e do receptor da vitamina D, sendo que os efeitos de S179D-hPRL e 1,25-dihidroxivitamina D_3 são adititivos para a inibição da proliferação de células tumorais de próstata (263);

- Em glândulas mamárias e próstata, S179D-hPRL promove a expressão de genes tecido-específicos levando essas células á um estado mais diferenciado (137,262,263);

- O antagonista S179D-hPRL diminui os níveis séricos de testosterona e dihidrotestosterone (266), um efeito que parece ser mediado por uma ação direta sobre as células de Leydig;

- A forma pseudofosforilada ainda demonstrou propriedades anti-inflamatórias, sendo que essa característica foi demonstrada através uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (158). Sabe-se que a inflamação frequentemente precede o processo de câncer (96);

- também demonstramos que a S179D-hPRL é um potente agente antiangiogênico *in vitro* e *in vivo* (239), uma propriedade que provavelmente contribui para sua ação anti-tumoral *in vivo*.

Como resultado da combinação dessas propriedades, pode-

19

se afirmar que a S179D-hPRL é mais potente em modelos *in vivo* que em ensaios *in vitro*, Como exemplo podemos citar que o antagonista pode inibir o crescimento das glândulas mamárias em concentrações séricas de 50 ng/mL (administração de 25 µg/Kg/dia) (137) e o de xenoimplantes tumorais humanos andrógenodependentes, em doses de 170 µg/Kg/dia (265).

1.4. Outros antagonistas de PRL

Baseando-se no desenvolvimento do antagonista de GH humano, o G120R GH (36), e pela sua analogia estrutural do GH com a PRL, Chen et al e Kelly et al produziram independentemente o antagonista G129R-hPRL (37,89). Nesse mutante o sítio modificado tinha um resíduo hidrofóbico que foi substituído por um resíduo de caráter hidrofílico, dessa forma interferindo com a ligação ao segundo sítio de ligação do PRLR. Ambos os autores foram capazes de demonstrar a habilidade desse mutante em inibir o crescimento de células de câncer mama in vitro (37,155,194), porém apenas Chen et al foi capaz de obter os mesmos resultados in vivo (34). Entretanto, em modelos in vivo, foi necessário o uso de grandes concentrações para obter o efeito antagonista desejado (8 mg/Kg/dia) (34). Estudos posteriores de Kelly et al tentaram, através de mutações adicionais, aumentar a afinidade e potência da G129R-hPRL, porém sem sucesso (89,124). Embora o antagonista G129R-hPRL tenha sido considerado "puro", mais tarde se demonstrou que este análogo possuía propriedades agonistas tal como S179DhPRL (18), sendo que o agonismo ou antagonismo poderia variar de acordo com a sensibilidade do ensaio utilizado (18). Na busca de um antagonista "puro", Kelly et al. observaram que deleções da porção N-terminal da PRL tinham um impacto significativo na afinidade ao PRLR (19). Combinando essa alteração com a mutação G129R, Kelly et al. conseguiram produzir antagonistas puros que porém se mostraram menos potentes que a G129R-hPRL original e portanto ainda sem aplicação na terapêutica (20).

O grupo de Chen et al. (14) adotou outra abordagem e sintetizou G129RhPRL como proteína de fusão com uma variedade de moléculas. A idéia principal era empregar a porção G129R-hPRL como antagonista de PRL bloqueando a atividade autócrina e endócrina da PRL e também direcionando a ação da proteína de fusão para células que expressam PRLR. Combinando-se a mutação G129R com a interleucina-2, visou-se estimular a morte de células expressando PRLR por células T (274). A fusão com endostatina associou os efeitos antiproliferativos do mutante e o efeito anti-angiogênico da endostatina (14), enquanto que a combinação com a exotoxina A visou a morte seletiva de células PRLR positivas (140). Todas as proteínas de fusão mantiveram ambas as atividades biológicas dos componentes combinados. As duas primeiras proteínas de fusão demonstraram uma eficácia maior in vivo na redução de xenoimplantes de células tumorais em comparação com as proteínas separadas. As dose empregadas, entretanto, foram muito altas para uso clínico (a proteína de fusão G129Rendostatina foi testada na concentração de 5 mg/Kg/dia) (14). Outra limitação encontrada com a proteína G129R-exotoxina A foi a necessidade de uma cuidadosa titulação para produzir a morte apenas das células com alta expressão de PRLR, sem efeitos colaterais significativos em outro tecidos sadios que também expressam o receptor (68,80,98,125,159,194,236,244,272).

1.5. Angiogênese

Angiogênese é o processo biológico pelo qual novos vasos capilares são formados podendo ser observada em vários processos fisiológicos e patológicos. O termo angiogênese, ou neovascularização se refere a todo processo de angiogênese posterior à fase embrionária, caso contrário a denominação correta seria vasculogênese. O processo se assemelha muito à vasculogênese embrionária, e segue o mesmo padrão onde ocorre a angiogênese associada á expansão tecidual. Esse processo inclui o crescimento e desaparecimento de capilares e a formação de arteríolas e vênulas (112,203,204). O processo de angiogênese é controlado pelo equilíbrio entre diversas moléculas que possuem atividade regulatória positivas e negativas, o que levou à criação do termo "interruptor angiogênico" ("angiogenic switch"), que dependeria de sua ativação pela produção de um ou mais elementos angiogênicos (202). Este processo envolve a diferenciação e organização de células endoteliais em tubos capilares e a interação entre citocinas e fatores de crescimento. As etapas da angiogênese podem ser visualizadas na tabela 1 em forma resumida. Moléculas de adesão celular geralmente mediam inúmeras interações célula-célula ou célula-matriz extracelular (ECM). Estas moléculas, em conjunção com a captação de células de apoio pré endoteliais, fornecem a manutenção e as funções moduladoras para os vasos. Células associadas incluem periócitos nos pequenos capilares e células da musculatura lisa em vasos de maior calibre (79,99,112). A angiogênese ocorre em situações fisiológicas tais como na recuperação de traumas e ferimentos, e na restauração do fluxo sanguíneo para tecidos que foram lesados ou danificados. Em mulheres também ocorre durante o ciclo reprodutivo (para a formação do tecido uterino e maturação dos óvulos durante a ovulação) e durante a gravidez (para a formação da placenta e circulação entre mãe e feto) (figura 8). Em certas doenças, o controle da angiogênese é perdido. Em doenças angiogênesedependentes a formação de novo vasos é excessiva ou insuficiente. Com relação aos casos em que ocorrem processos exacerbados de angiogênese, podemos citar até 70 condições patológicas. Entre elas vários tipos de câncer, cegueira relacionada a diabetes (retinopatia diabética), degeneração macular relacionada ao envelhecimento, artrite reumatóide, hemangiomas juvenis e psoríase (74,113,126,198). Nessas condições, tais como certos tipos de câncer, a formação de vasos tem a função de alimentar o tumor, destruir tecidos para expansão e invasão tumoral, além de permitir que células tumorais migrem pela circulação permitindo assim a formação de metástases em outros focos no organismo (figura 9 e 10). Em guadros onde existe uma deficiência na formação de novos vasos, o crescimento inadequado de capilares impede a circulação sanguínea apropriada, levando á necrose e morte tecidual, devido à produção insuficiente de fatores angiogênicos. A angiogênese é essencial especialmente em doenças onde a formação de vasos ocorre em resposta à lesão tecidual (130,134,209,233). São

exemplos de doenças envolvendo processos com deficiência de angiogênese a doença coronária arterial, acidentes vasculares cerebrais e problemas com cicatrização de feridas (76). A tabela 2 fornece os vários tipos de doenças relacionadas com a angiogênese.



Figura 8. Processos fisiológicos onde ocorre um aumento na angiogênese.(177).



Figura 9. A angiogênese é iniciada pela liberação de fatores pró angiogênicos e fatores quimiotáticos pelas células tumorais que, em contrapartida, atraem e ativam as células endoteliais da microvasculatura para a formação de novos capilares. bFGF, fator de crescimento de fibroblastos básico. (177)

Tabela 1. Eventos chave no processo angiogênico			
Fase	Evento chave		
Ativação de células endoteliais e pericito	Mundanças morfológicas de células endoteliais preparando-as para proliferação e secreção, vasodilatação local, aumento da permeabilidade vascular, acumulação de fibrina extra		
Degradação da membrana basal Migração de células endoteliais	Estímulo angiogênico resulta na degradação da membrana basal vascular Fatores quimiotáticos produzidos por fibroblastos, monócitos e plaquetas induzem migração e ramificação de células endoteliais		
Proliferação de células endoteliais Diferenciação de células endoteliais	Mitogênios produzidos localmente induzem síntese de DNA e mitose em células endoteliais Proliferação das células endoteliais diminui e contato célula-célula é restabelecido, ramos formam lúmen		
Reconstituição da membrana basal	A maturação dos vasos é realizada pela reconstituição da membrana basal sintetizada pelas células endoteliais e pericitos		
Maturação e estabilização da vasculatura	Remodelagem capilar por estabilização e regressão		

Tabela 2. Doenças relacionadas com deficiências no processo angiogênico(Polverini, 2002)

Neoplasia Tumores sólidos e líquidos (leucemias) Malformações e neoplasias vasculares Angiofibroma Malformações arteriovenosas Hemangiomatose Desordens do aparelho reprodutor Endometriose Insuficiência placentária Pré-eclâmpsia Doença do Sistema Nervoso Central, Cardiovascular e Pulmonar Aterosclerose Adesões vasculares Demência vascular Restenose/lesão de reperfusão Fibrose pulmonar Doença de Alzheimer CADASIL (arteriopatia dominante autossômica cerebral com infartos subcorticais e leucoencefalopatia) Síndromes Discondrosplasia com harmatomas vasculares (síndrome de Maffuci) Telangiectasia hemorrágica hereditária (síndrome de Rendu-Osler-Weber) Síndrome de Von Hippel-Lindau **Desordens Oculares** Neovascularização de enxerto córneo Retinopatia diabética Retinopatia isquêmica Glaucoma neovascular Fibroplasia retrolental Retinopatia prematura tracoma

1.6. Angiogênese e câncer

A vascularização de tumores tem sido observada por muitos anos (26). Alguire notou que a formação de novos vasos era estimulada pelo tumor em crescimento: "Uma característica marcante do tumor em crescimento é sua capacidade de produzir um novo endotélio capilar a partir do hospedeiro" (4). Tannock mostrou que a taxa de divisão de células tumorais diminue na proporção em que estas se afastam dos vasos sanguíneos e relacionou esse efeito à diminuição no fornecimento de oxigênio (228). Além disso, ele demonstrou que a taxa global de crescimento do tumor era ditado não pela proliferação das células tumorais mas pela baixa taxa de proliferação das células endoteliais, concluindo que o fornecimento de oxigênio e nutrientes é crítico para o crescimento da massa tumoral.

A vascularização é um processo vital para a progressão de uma neoplasia partindo de um tumor pequeno e localizado para uma massa tumoral maior, com a habilidade de formar metástases (figura 10) (78,152). O conceito terapêutico de anti-angiogênese surgiu no início dos anos 70 baseado nas observações de que tumores que não desenvolviam vascularização não progrediam para massas maiores de cerca de poucos milímetros de diâmetro (77). Comparando-se o crescimento de tumores transplantados para o humor aquoso avascular de coelhos com aqueles implantados na íris vascular, Folkman pode mostrar as fases vascular e avascular do crescimento tumoral. O início da fase vascular coincidiu com a expansão de tumores maiores que 2-3 mm³ e um aumento de cerca de 20 vezes na velocidade de crescimento do tumor. Tumores implantados no humor aquoso tiveram sua entrada na fase vascular inibida e permaneceram dormentes (84). Concluiu-se que a vascularização era essencial para o crescimento do tumor e inferiu-se que a prevenção dessa vascularização poderia ser uma abordagem terapêutica viável.

O endotélio adulto é essencialmente quiescente, mas em resposta a estímulos fisiológico ou patológico o endotélio pode mudar de estado e passar a proliferar-se. A angiogênese fisiológica pode ser rapidamente inibida, indicando um controle fisiológico estringente, ainda podendo ser ativada com um estímulo adequado, mecanismo análogo ao da cascata de coagulação.

O tumor altera a resposta vascular dos vasos do hospedeiro, interrompendo localmente o equilíbrio entre reguladores positivos e negativos. Esse "interruptor angiogênico" é necessário para o crescimento do tumor e pode limitar a sua taxa de crescimento (100). Existem evidências convincentes mostrando que tumores sofrem uma mudança para uma fase angiogênica de acordo com a sua progressão. Em carcinoma cervical, por exemplo, o desenvolvimento de vasculatura pode ser associado com a evolução de um estágio pré maligno não invasivo para um estado de carcinoma invasivo (221). A densidade da microvasculatura é um poderoso indicador prognóstico independente de metástase e sobrevida, sugerindo que a vascularização tumoral se correlaciona com o potencial de metástase e progressão (252).

Os primeiros estudos e teorias sobre a angiogênese tumoral se concentraram nos efeitos de novos vasos sobre a expansão tumoral e o potencial de se inibir esse crescimento com inibidores de angiogênese. O que foi de certa forma subestimado foi o papel da angiogênese na metástase tumoral e que tumores altamente vascularizados tem um potencial de produzir um número maior de metástases que tumores menos vascularizados. Além de seu efeito positivo sobre a expansão do tumor, a angiogênese fornece uma rota para células tumorais deixarem o tumor primário e entrarem na circulação, facilitando o processo de metástase (figura 10 e 11). A angiogênese aumenta a entrada de células tumorais na circulação fornecendo uma maior densidade de capilares imaturos e altamente permeáveis que possuem uma membrana basal menor e também um menor número de complexos juncionais intercelulares que a vasculatura normal (71). Cerca de 2 x 10⁶ células de carcinoma mamário/dia podem ser lançadas na circulação a partir de um tumor primário de 1 cm (31), apesar de apenas poucas destas formem metástases. O número de metástases formadas é geralmente proporcional ao número de células tumorais liberadas. Consequentemente, uma diminuição na angiogênese em um dado tumor poderia produzir uma diminuição no número de células lançadas na circulação, resultando numa menor fregüência de metástases.

A correlação entre angiogênese e metástase tumoral pode ser claramente vista em experimentos onde animais com tumores primários estabelecidos são tratados com inibidores de angiogênese. Uma diminuição na vascularidade do tumor primário é sempre associada com uma diminuição da formação de

colônias metastásicas. Este fato foi primeiramente demonstrado com o inibidor de angiogênese, sulfato de protamina (229). Resultados similares têm sido relatados para quase todos os compostos anti-angiogênicos descobertos, independente de seu mecanismo de ação. As listas de inibidores de angiogênese, que também inibem a metástase de tumores, incluem esteróides angiostáticos (59), talidomida (60), o análogo da fumagilina TNP-470 (114,129,174), trombospondina (256), angiostatina (189), endostatina (190), fator de plaqueta 4 (128) e o inibidor de protease sintético BB94 (251).



Figura 10. Angiogênese e formação de metástase a partir de tumor primário (estágio 1) (104).


Figura 11. Componentes vasculares de uma metástase tumoral. Os passo da via metastática que envolve interações com vasos sanguíneos: (a) tumores primários pequenos (< 2mm) permancem avasculares até (b) invadirem a membrana basal epitelial local. Se o tumor produzir fatores pró angiogênicos (c) o processo de angiogênese é iniciado, permitindo a expansão do tumor. (d) Os novos capilares fornecem uma rota de entrada na circulação sanguínea (geralmente vênulas) de órgãos distantes. (f) as células tumorais extravasam através da parede do vaso e então (g) migram para sítios próximos às arteríolas onde seu crescimento é estimulado. (h) Micrometástases podem ficar dormentes por períodos prolongados, nos quais a angiogênese está suprimida. (i) Iniciação de angiogênese no sítio secundário libera as colônias metastáticas de seu estado dormente e permite assim uma rápida progressão (273).

1.7. Angiogênese e PRL

Pensava-se que a diversidade funcional da PRL pudesse ser explicada, em parte, pela heterogeneidade molecular do hormônio (219), mas na verdade

existem poucos exemplos que apóiam essa noção. A atividade biológica dos diferentes membros da família da PRL sobre a angiogênese fornece um dos exemplos mais claros correlacionando diversidade funcional com heterogeneidade estrutural. Como exemplo tem-se o efeito da PRL sobre o crescimento dos vasos sanguíneos que recentemente foi observado como pró-angiogênico em modelo *in vivo* (224), em oposição à forma clivada 16K-PRL (43) e à forma pseudofosforilada da PRL (239), que são potentes agentes anti-angiogênicos *in vitro* e *in vivo*.

Os efeitos da PRL sobre a angiogênese eram amplamente desconhecidos, uma vez que a maioria dos estudos não foram bem sucedidos em demonstrar efeitos significativos da PRL, empregando ensaios in vitro e modelos in vivo de angiogênese (43,69,74). Apesar disso, evidências recentes mostraram que a PRL pode estimular o processo angiogênico, mas sua ação biológica depende do modelo utilizado e das condições locais do endotélio vascular (168,224). Esse fato é melhor exemplificado por estudos que visavam identificar o papel da PRL no ensaio da membrana coriolantóica de galinha (CAM). Esta é uma abordagem experimental, usada tradicionalmente por embriologistas, que envolve análise do potencial de desenvolvimento de implantes na membrana corioalantóica do embrião de galinha (52). A CAM aparece no saco vitelino após 48 horas de incubação do ovo fertilizado, tornando-se vascularizada e crescendo rapidamente nos próximos 6-8 dias e finalmente interrompendo seu crescimento após 11 dias (8). Dessa forma, o ensaio CAM pode ser realizado em dois diferentes estágios: antes do 11°, quando as células endoteliais estão se dividindo ativamente (bioensaio no estágio inicial) e após o 11° dia , quando as células endoteliais se dividem menos frequentemente e gradualmente se diferenciam (bioensaio no estágio final). A PRL não teve nenhum efeito sobre o crescimento capilar no bioensaio de estágio inicial, ou seja, sobre vasos sanguíneos em desenvolvimento (43,224). Porém, a PRL demonstrou a habilidade de estimular a formação de novos capilares quando testada em vasos sanguíneos quiescentes no biosensaio CAM de estágio final (224). Esses resultados paradoxais sugerem que a PRL talvez apenas promova a angiogênese em estados mais maduros de desenvolvimento, a por isso sua atividade biológica dependa do estado

31

local da vasculatura. A PRL pode agir indiretamente através da estimulação de fatores angiogênicos produzidos por tipos celulares não endoteliais, ou ainda por células endoteliais maduras em estágios mais avançados de desenvolvimento, que poderiam expressar o PRLR e assim responder diretamente a PRL. De fato, essas observações podem ser o reflexo da regulação da expressão do PRLR em células endoteliais. De acordo com essa possibilidade, o PRLR não é encontrado em todos os tipos de células endoteliais. Por exemplo, nenhum sítio de ligação da PRL foi encontrado na membrana de células endoteliais capilares da retina de rato (46) assim como a expressão do mRNA de PRLR não foi detectada nesse mesmo modelo (184). Da mesma forma, estudos com essas células falharam ao tentar demonstrar efeitos diretos da PRL sobre a proliferação celular (43,74,184,224), como também falhou a formação de túbulos em gel de colágeno tipo I (43), e a expressão do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) (224). PAI-1 é um conhecido inibidor do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) e acredita-se que esteja envolvido na estimulação de alguns passos iniciais da angiogênese (ex. remodelagem proteolítica da matriz protéica local e migração de células endoteliais) (9).

Entretanto, em contraste com os estudos citados acima, um estudo demonstrou que células endoteliais de artéria pulmonar bovina expressam mRNA do PRLR e que estas células respondem à PRL (168). Nesse estudo, monocamadas de endotélio de artéria pulmonar bovino foram submetidas à lesão mecânica e então tratadas com PRL. A PRL interferiu com a estrutura do citoesqueleto de actina, produziu mudanças no formato celular e reduziu a adesão das células ao substrato (168). Não investigou-se, porém, se a expressão de PRLRs e a ação da PRL dependiam da condição empregada (lesão mecânica) ou do tipo de endotélio (artéria pulmonar bovina). Da mesma forma, as implicações funcionais dessas ações não são claras. Possíveis implicações seriam as alterações da função de barreira e da migração de células endoteliais, sendo que ambas são essenciais na formação de capilares e dessa forma a PRL desempenharia um papel no processo angiogênico associado com a lesão tecidual. Mais recentemente nosso laboratório demonstrou a presença de

32

PRLRs em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) e em células endoteliais microvasculares humanas (HmVEC), sendo observadas as proteínas correspondentes às duas isoformas curtas do PRLR (S1a e S1b) e detectados os mRNAs das formas longa, curtas (S1a e S1b) e deletada, onde uma porção do domínio extracelular é ausente (239).

1.8. Apoptose e ciclo celular: considerações gerais

A apoptose é um processo ativo que leva à morte celular, que é mediada por vias de sinalização programadas, cuja ativação pode ser iniciada por uma grande variedade de estímulos intracelulares ou extracelulares. O processo de apoptose descreve as mudanças morfológicas da célula que incluem o encolhimento do citoplasma, degradação da membrana, compactação da cromatina nuclear, fragmentação de DNA cromossômico e a formação de pequenas vesículas (chamados de corpos apoptóticos). Essas células terminam por ser fagocitadas por macrófagos e outras células epiteliais vizinhas (5). Essas mudanças morfológicas resultam da ativação de uma série de cascatas de sinalização apoptóticas.

A apoptose desempenha um papel importante em uma variedade de processos fisiológicos normais. Estes incluem processos de auto organização funcional no sistema imune e no sistema nervoso central, mudanças morfogênicas durante o desenvolvimento embrionário, homeostase tecidual em adultos e remoção de células danificadas (5). A apoptose também está profundamente envolvida na patogênese de muitas doenças humanas, como câncer, AIDS e outras doenças imunes, doenças cardiovasculares e muitas doenças neurodegenerativas incluindo doença de Alzheimers, doença de Parkinson, AVC e isquemia (231). Dessa forma, o estudo da apoptose é importante, não apenas para se entender os mecanismos regulatórios de processos fisiológicos normais, mas também para definir os mecanismos pato-fisiológicos de muitas doenças humanas.

Numerosos fatores celulares que estão associados com as cascatas de sinalização apoptóticas têm sido identificados na última década. Estes

incluem os receptores de superfície celular (receptores da morte celular da superfamília do receptor de TNF), reguladores de ciclo celular (pRb e proteínas inibitórias Cdk), enzimas proteolíticas (caspases e calpaina), membros da família Bcl-2, inibidores da proteína apoptótica (IAPs), muitas proteínas de resposta ao stress ("heat shock proteins") e proteínas de adesão celular. A maquinaria celular ligada à apoptose parece ser bem conservada entre os organismos multicelulares, desde vermes como C. elegans, até mamíferos, incluindo humanos. Horvitz et al demonstraram que diversos genes, incluindo ced-3, ced-4 e ced-9, estão envolvidos nos processos apoptóticos durante o desenvolvimento embrionário de C. elegans (169). A proteína codificada por ced-3 possui a mesma função que outras cisteína-proteases conhecidas como caspases e expressas em mamíferos. As caspases são proteases ("Cysteine proteASE cleaving after ASPartic acid") que são produzidas na forma de pró enzimas, e podem ser ativadas por meio de proteólise em resposta a diversos estímulos apoptóticos. Cada caspase é clivada para produzir uma subnunidade grande (pL) e outra pequena (pS), dessa forma dando origem a uma forma ativa tetramérica (pL₂pS₂) oriunda de duas próenzimas (135).

A proteína equivalente ao *ced-9* foi identificada como Bcl-2, que é um típico fator anti-apoptótico pertencente à família Bcl-2 em células de mamíferos (107). O homólogo de *ced-4* em mamíferos é também identificado como um novo gene, que codifica uma nova proteína chamada de Apaf-1 (fator ativador de protease apoptótica-1) (277). Demonstrou-se que Apaf-1, na presença de citocromo C e dATP, ativa a pró-enzima caspase-9.

1.8.1. Via extrínseca (receptores da morte)

A via de sinalização da apoptose mais conhecida e estudada é a via das caspases. Uma das rotas para ativar a cascata das caspases é aquela iniciada a partir de receptores na superfície celular (117). Por exemplo, TNF ("tumor necrosis factor' ou fator de necrose tumoral) e FasL (ligante do receptor Fas), induzem a via da caspase pela ligação com seus respectivos receptores: receptor de TNF-1 ("tumor necrosis factor-1" ou fator de necrose tumoral-1) e Fas (um tipo de

receptor da morte) respectivamente. Esses receptores pertencem a superfamília de receptores de TNF na qual outros receptores relacionados, como TNFR, Fas/Apo-1/CD95, DR3, o receptor do fator de crescimento p75 e CD40 também estão incluídos (6). Muitos dos receptores da família TNFR contém o domínio da morte na região citoplásmica. Ligação de TNF ou FasL aos seus receptores induz a formação de um complexo homotrimérico de receptores e ligantes. Essa mudança estrutural parece aumentar a interação entre os domínios da morte dos receptores e proteínas citoplásmicas contendo também o domínio da morte, também chamadas de proteínas adaptadoras (117). Por exemplo, TNFR1 se associa com uma proteína com domínio da morte associada ao TNRF (TRADD) através da interação dos domínios da morte de ambos (figura 12). De forma similar, Fas associa-se com a proteína de domínio de morte associada ao Fas (FADD) através da interação DD-DD. A FADD possui outro importante domínio chamado de domínio efetor da morte (DED). Dessa forma, FADD ligado a Fas pode associar-se com a caspase-8, que também possui DED, através de uma interação DED-DED (figura 12). Esse complexo pode ainda recrutar as caspase-2 e -10 e ativá-las. A caspase-8 ativa é um mediador central da via de sinalização extrínseca. Essa proteína pode ativar diretamente a caspase-3, -6 e -7 e pode ativar indiretamente a cascata mitocôndrial (via intrínseca) pela clivagem e translocação da proteína Bid para a membrana mitocôndrial (figura 13). Quando a caspase-8 é capaz de ativar a cascata das caspases de forma efetiva e culminar na clivagem de substratos intracelulares e morte ceular programada, essa resposta é chamada de ativação da via extrínseca tipo I, e é dependente apenas da ativação de um ou mais tipos de DRs (ex. Fas, CD95, etc) (212). Quando o sinal gerado pelo receptor ativado não é suficiente para gerar a ativação da via das caspases efetoras e subsequente apoptose, ocorrendo amplificação deste sinal pela via mitocôndrial, essa resposta é denominada de via extrínseca do tipo II (157). A interconexão entre as vias extrínseca e intrínseca é realizada pelo membro da família Bcl-2, Bid (figura 13). A proteína Bid é clivada pela caspase-8 ativada via receptor DR e em sua forma truncada (tBid) é translocada até a membrana mitocôndrial, onde age em conjunto com outros membros pró

apoptóticos da família Bcl-2, Bak e Bax, para induzir a liberação no citoplasma de citocromo c e de outros fatores mitocondriais pró-apoptóticos. O citocromo c se liga à proteína Apaf-1 monomérica que, de uma forma dATP-dependente, oligomeriza e se liga ao apoptossomo, um complexo em forma de roda, que dispara a ativação da caspase-9 (2). A caspase-9 ativada por sua vez inicia uma cascata de ativações envolvendo caspases efetoras como as caspases-3, -6 e -7, resultando em morte celular (220).

Os receptores de membrana da morte (DRs) possuem domínios citoplásmicos adicionais, que recrutam proteínas adaptadoras adicionais como o já mencionado TRADD. TRADD, além de interagir com a proteína efetora caspase-8, pode interagir com a proteína de interação com receptor (RIP) e com o fator associado a TNRF 2 (TRAF-2), que resultam na ativação de dois importantes fatores de transcrição: o fator nuclear Kappa β (NF-kB) e o c-Jun.

1.8.2. Via intrínseca (mitocôndrial)

Além de amplificar e mediar sinais da via extrínseca de apoptose, a mitocôndria também desempenha um papel central na integração e propagação de sinalização de apoptose originados dentro da célula tais como fragmentação de DNA, estresse oxidativo, privação de nutrientes, assim como aqueles danos provocados por drogas quimioterápicas (118,248). A maioria das condições de indução à apoptose envolvem uma perturbação do potencial transmembrânico mitocôndrial ($\Delta\Psi$) interno assim como a transição de permeabilidade (PT), um aumento repentino na permeabilidade interna mitocôndrial para solutos com uma massa molecular menor que 1,5 KDa. Concomitantemente, o intumescimento osmótico mitocôndrial tem sido observado pelo influxo de água dentro da matriz e eventual ruptura da membrana da mitocôndria, resultando na liberação de proteínas próapotóticas do espaço intermembrânico mitocôndrial para o citoplasma (17,156). Proteínas que são liberadas seriam o citocromo C, que ativa o apoptossomo e por sua vez a cascata das caspases, mas também outros fatores como o AIF (fator

indutor de apoptose) (226), a endonuclease endoG (148), Smac/Diablo (243) e Htr/Omi (243).



Figura 12. Via extrínseca da apoptose. **A**, Fas, DR4 e DR5 são receptores transmembrânicos pertencentes à família de receptores da morte (DR). Em termos gerais, um DR é composto por um domínio extracelular contendo o sítio de

interação com o ligante, um domínio transmembrânico e um domínio intracelular, denominado de domínio da morte (DD), envolvido na transdução do sinal de apoptose. **B**, ligação dos receptores com seu ligante induz a ativação do receptor da morte por homotrimerização. **C**, uma vez ativados os DRs recrutam proteínas adaptadoras através da interação de seus DDs com os DDs das proteínas adaptadoras (proteínas com DDs) como FADD (ou TRADD). As proteínas adaptadoras possuem um domínio adicional, o chamado domínio efetor da morte (DED), necessário para recutamento da procaspase. **D**, no passo seguinte o DED da proteína adaptadora reage com o DED de uma enzima iniciadora de apoptose denominada de pró-caspase-8. o complexo formado é chamado de DISC. **E**, a pró-caspase-8 é sintetizada como um precursor inativo que é ativado por clivagem autoproteolítica depois de recrutada pelo DISC. **F**, a ativação da pró-caspase-8 inicia a ativação de caspases efetoras em um efeito cascata. A caspase-3 ativada é a responsável pela morte celular, devida à proteólise de substratos celulares (207).

Além da liberação desses fatores pró apoptóticos, a dissipação do $\Delta \Psi$ e do PT, também causa uma perda da homeostase bioquímica da célula: a síntese de ATP é bloqueada, moléculas como NADH, NADPH e glutationa são oxidadas e espécies reativas do O₂ são acumuladas (132,133). Outra via intrínseca menos estudada e caracterizada também já foi descrita. Trata-se da acumulação de proteínas com "folding" incorreto e alterações na homeostase do Ca²⁺ que podem levar a estresse do no retículo endoplasmático (ER) e levar á morte celular (figura 13) (200). Uma vez que PT, $\Delta \Psi$ e a liberação de proteínas da mitocôndria desempenham um papel central na mediação e amplificação das vias de apoptose, esses eventos devem ser submetidos a um controle estrito por mecanismos regulatórios que, sob diversas formas, são dependentes de membros da família Bcl-2.



Figura 13. Componentes principais da cascata apoptótica. As duas principais vias de apoptose: a via do receptor da morte (extrínseca) e a via mitocôndrial (intrínseca) estão representadas. A cascata extrínseca é deflagrada por estímulo extracelular, que é transduzido através de receptores de membrana da superfamília dos receptores de TNF ("Tumor Necrosis Factor"). O estímulo intracelular induz a apoptose através da mitocôndria e, em menor grau, pelo retículo endoplasmático (ER). TNFR I, receptor de TNF tipo I; FasL, ligante de Fas; TRADD, domínio da morte associado ao TNFR; FADD, domínio da morte associado com Fas; TRAF2, fator associado ao TNFR- membro 2; RIP, proteína de interação com receptor; c-IAP, inibidor celular da proteína apoptótica; IKK, complexo I-kapaB guinase; JNK, c-jun N-terminal guinase; NF-kB, fator nuclear kappa β; Apaf-1, fator ativador de proteases pró-apoptóticas; Bax, membro pró apoptótico da família Bcl-2; Bcl-2, membro anti apoptótico da família Bcl-2; Bcl-X, membro anti apoptótico da família Bcl-2; PTPC, complexo do poro de transição de permeabilidade na mitocôndria; Smac/Diablo, segundo ativador das caspases derivado da mitocôndria. (271).

Quando foram identificados homólogos da família Bcl-2, tornou-se aparente que a família Bcl-2 pode ser definida pela presença de seqüências conservadas conhecidas como domínios de homologia Bcl-2 (BH1 até BH4). Em mamiferos foram descritos, até 30 membros relacionados com esta família, sendo que uma parte pertence a um grupo anti apoptóticos e outro a um grupo pró apoptóticos (24). Em adição ao próprio Bcl-2, existem vários outros membros anti apoptóticos (ex. Bcl-X, Bcl-w, A1 e Mcl-1), sendo que todos possuem os domínios BH1-BH4. O grupo pró apoptótico dos membros Bcl-2 pode ser subdividido em dois subgrupos: a subfamília Bax consiste de Bax, Bak e Bok, todos com os domínios Bh1-BH3, enquanto que as proteínas com domínio BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrf, Noxa, Puma, Blk, NIP3 e Spike) possuem apenas este domínio, trata-se de um domínio de interação, necessário e suficiente para sua ação apoptótica (54,175).

1.8.3. Controle do ciclo celular

A ativação seqüencial dos complexos quinase ciclina-dependentes (Cdks)/Ciclinas regula a progressão através do ciclo celular (173). Complexos Cdk/ciclina fosforilam e inativam os membros da família da proteína retinoblastoma (Rb), que são os reguladores negativos da fase G1 e da fase S, levando à indução da expressão gênica regulada por E2F (fator de transcrição inibido por Rb) e à proliferação celular (217). Essas proteínas desempenham papéis importantes na regulação da proliferação durante o desenvolvimento e a diferenciação celular. Na ausência de fatores de crescimento ou de outros estímulos mitogênicos, as células cessam a proliferação e entram na fase G0, um estágio inicial e reversível do ciclo celular (figura 14).



Figura 14. Representação do ciclo celular eucariótico e das respectivas ciclinas e quinases ciclina dependentes (Cdks) envolvidas no processo. Fases: **M**, mitose, divisão nuclear e divisão celular (citoquinese) em duas células filhas; Cdk1 interage com Ciclinas B, que permanecem ativas nessa fase até a divisão completa. **G1** (GAP 1 ou fase 1), crescimento celular e aumento da sensibilidade a fatores de crescimento e contato célula-célula e síntese de RNA e proteínas. As quinases ciclina-dependentes (Cdks) Cdk4 ou Cdk6 são ativadas por ciclina tipo D (ciclina D) que formam o complexo ciclina D/Cdk 4-6 que fosforila a proteína Rb (proteína retinoblastoma), que age como inibidora de vários fatores de transcrição. **G0**, células em estado de quiescência, que saem do ciclo celular na fase G1. As células podem retornar da fase G0 e reentrar no início da fase G1. Células diferenciadas não voltam ao ciclo celular permanentemente. **S**, Síntese de DNA, regida por ciclinas D e E, e Cdk2. **G2** (GAP 2), a replicação de DNA cessa, Cdk1 substitui Cdk2 e acopla-se com as ciclinas A ou B. **PR**, ponto de restrição da fase G1, a célula que passa desse ponto está fadada a entrar para a fase S (173).

A proteína p21^{WAF1} (p21) exerce efeitos positivos e negativos sobre a progressão da fase G1 (217) (figura 15). Níveis basais de p21 são necessários para que os complexos Cdk/ciclina se formem e se tornem ativos; entretanto níveis elevados bloqueiam a atividade das Cdks. Os efeitos inibitórios de p21 são dominantes, uma vez que sua indução ou expressão além dos níveis basais inibe a atividade das Cdks, em especial do complexo Cdk2/ciclina E (264).



Figura 15. Controle positivo e negativo da progressão da fase G1 por p21^{WAF1}. p21 exerce um efeito negativo sobre a fase G1 inibindo a atividade do complexo Cdk2/ciclina E (1), assim como a função de PCNA na fase S (4). Entretanto p21 pode facilitar a progressão de G1 como fator de montagem para o complexo Cdk4/ciclina D (2). A indução de ciclinas tipo D na fase inicial de G1 recruta p21 nos complexos ativos Cdk4/ciclina D ou Cdk6/ciclina D, depletando a reserva de p21 disponível e diminuindo a inibição de p21 sobre o complexo Cdk2/ciclina E (3). PCNA, subunidade da DNA polimerase delta; CDK, quinase ciclina-dependente; Rb, proteína retinoblastoma; pRb, proteína retinoblastoma fosforilada (inativa); ~P, sítios fosforilados. (253).

Em contraste ao efeito de p21 sobre o complexo Cdk2/ciclina E, p21 não é capaz de inibir o complexo Cdk4/ciclina D em concentrações molares fisiológicas, sendo necessários maiores níveis para atingir a inibição (138). A atividade de inibição do crescimento de p21 é consistente com sua indução, observada durante a diferenciação de células e inibição da proliferação induzida por TGF- β e em células senescentes (102,159,171,223,232,253,276). Os efeitos positivos de p21 sobre a fase G1 são principalmente devido a sua função como fator de montagem para complexos ativos de Cdk/ciclina. De fato, p21 age como fator de recrutamento e é um integrante do complexo Cdk/ciclina (39,138). A incorporação de p21 nesses complexos Cdk/ciclina diminui os níveis de p21, o que acarreta uma menor inibição sobre os complexos Cdk2/ciclina 2, promovendo a

progressão do estágio final de G1. De acordo com a necessidade de p21 para a progressão através da fase G1, observa-se que em células quiescentes, os níveis de p21 são bastante reduzidos, e sua expressão é induzida por mitogênios, assim como a expressão de ciclinas tipo D, integrantes do complexo.

O p21 também exerce seu efeito inibitório, bloqueando o ciclo celular na fase S, devido à sua habilidade de se ligar e inibir a PCNA (245). Inibe também a interação entre a PCNA e a DNA metiltransferase, o que sugere que p21 possa regular o recrutamento de DNA metiltransferase para sítios de DNA recém sintetizado (41). Pode ainda interagir com E2F, assim inibindo a transcrição a partir do promotor da ciclina A, o que sugere um efeito sobre a transcrição de genes envolvidos na fase S (67).

O papel duplo de p21 como supressor do crescimento e estimulante da progressão do ciclo celular sugere que exista uma regulação delicada dos níveis de p21. A proteína p21 foi inicialmente isolada com base na sua indução por p53, mas constatou-se posteriormente que existem várias vias de indução de p21 que são p53 independentes (72,208). Existem múltiplos fatores que estão envolvidos na regulação de crescimento, desenvolvimento e diferenciação que induzem a expressão de p21 independente de p53, tais como fatores de crescimento, glucocorticóides, citocinas, e retinóides (53,63,153,170).

O supressor de tumor p53 já foi denominado "guardião da célula". Esta proteína no entanto não é essencial para a vida sendo que camundongos p53deficientes nascem aparentemente normais, mas ela é essencial para a proteção do organismo contra células anômalas. O supressor p53 regula duas vias: a via para a morte e a via para a sobrevivência celular. Quando ocorrem danos ao DNA (ex. fragmentação de DNA), a proteína p53 pode iniciar dois processos para isolar as células danificadas e prevenir seu crescimento descontrolado. O p53 pode inibir a divisão, deixando a célula estagnada no ponto de restrição da fase G1 do ciclo celular. Dessa forma a célula fica incapaz de se reproduzir, e seu genoma danificado é isolado de forma segura. O supressor p53 pode também iniciar um processo ainda mais permanente: morte celular programada.

O supressor tumoral p53 age como um ativador de transcrição,

controlando a expressão de uma variedade de genes importantes na regulação do ciclo celular e apoptose. A proteína p53, composta de quatro subunidades idênticas, se liga a um sítio específico do DNA, e interage com fatores de transcrição, levando a iniciação da transcrição pela RNA polimerase II. O p53 é presente em níveis muito baixos na maioria das células, e possui uma meia vida biológica de poucos minutos. Esses baixos níveis de p53 podem ser controlados gênicamente. Os níveis de p53 podem elevar-se rapidamente aumentando-se a sua expressão, e níveis elevados podem ser reduzidos rapidamente quando sua síntese é cessada. A indução da síntese de p53 é altamente regulada: apenas uma quebra de fita dupla de DNA pode induzir sua expressão. Após dano ao DNA, hipóxia, indução de oncogenes e depleção de nucleotídeos, p53 sofre várias modificações pós-traducionais que resultam numa maior interação de p53 com o DNA e ativação transcricional de vários genes alvos. Esses genes regulam diversos processos biológicos, sendo que os mais conhecidos são relativos à inibição do ciclo celular e da apoptose. O p53 desempenha um papel importante na regulação da via extrínseca que é ativada pelos receptores da morte (DRs) incluindo Fas, DR4 e DR5. Além disso, o p53 pode induzir ou potencializar a apoptose iniciada por TRAIL e por agentes quimioterápicos. O supressor p53 também possui um papel regulador da via intrínseca de apoptose, agindo com proteínas da família Bcl-2 e outras proteínas mitocondriais (270) (figura 16).

Por exercer esta função de detecção de alterações no DNA e conseqüente correção ou morte celular, a proteína p53 é considerada como uma guardiã do genoma, e é um importante elemento na prevenção do desenvolvimento de tumores, sendo seu gene codificador classificado como gene supressor de tumor. A relação entre a proteína p53 e a carcinogênese tem sido amplamente observada através do elevado índice de mutações de seu gene em tumores malignos de diferentes tecidos do organismo. Além disto, tem sido estudada sua possível atuação como elemento potencializador dos efeitos da quimioterapia e radioterapia. Numerosos estudos têm sido realizados com o objetivo de analisar seu potencial para utilização clínica, em especial como elemento de valor prognóstico.



Figura 16. Modelo dos alvos transcricionais do p53 no controle da apoptose. Em resposta à fragmentação de DNA ou a outros estresses, p53 é ativado após várias modificações pós traducionais, que ativam seus alvos e culminam em apoptose e inibição do ciclo celular. As diferentes modificações do p53 podem mediar suas interações com os cofatores transcricionais para controlar a expressão dos seus alvos. A indução da expressão desses alvos apoptóticos através de cofatores (ex. ASPP1, p63 e p73) pode promover a apoptose. A inibição do crescimento provocada por inibidores do ciclo celular (ex. p21) pode inibir a resposta apoptótica. A ativação de alvos apoptóticos por si só não é suficiente para induzir a apoptose em algumas células, se tornando necessária à inibição da indução de p21 e de outros reguladores do ciclo celular para provocar a morte celular programada.

1.8.4. S179D-hPRL, apoptose e regulação do ciclo celular

A PRL não modificada estimula o crescimento celular e induz a expressão de cilcina D1 de uma forma dose dependente em células de câncer de mama MCF-7 PRL-deficientes. A ciclina D1 desempenha um papel importante na transição da fase G1-S. Foi demonstrado que a forma pseudofosforilada S179DhPRL não possui efeitos detectáveis sobre os níveis de ciclina D1 guando empregada como tratamento único, a não ser que sejam empregadas altas doses (1000 ng/mL). No entanto quando S179D-hPRL pode competir efetivamente com a PRL não modificada, inibe a indução de ciclina D1 promovida por PRL. Em outra linhagens de células tumorais (MCF-7 e T47D) que expressam PRL, o tratamento com S179D-hPRL reduziu os níveis de ciclina D1 para níveis basais, provavelmente devido ao seu antagonismo pela PRL endógena dessas células tumorais (213). Além de seu efeito antagonista que bloqueia os efeitos proliferativos da PRL in vitro e in vivo (213,265), a S179D também, age como agonista parcial, apresentando efeitos sobre a diferenciação celular e ciclo celular, independentes da sua interferência sobre os efeitos autócrinos da PRL. S179DhPRL mostrou-se portanto capaz de induzir a expressão de β -caseína, um marcador de diferenciação de células epiteliais de mama, sugerindo que esse agonista parcial exerce efeitos sobre a transição da fase G1-G0 dessas células (137,227). S179D-hPRL ainda demonstrou a capacidade de promover a diferenciação do tecido mamário, em oposição à atividade mitogênica da PRL não modificada (137). Também foi demonstrado que a S179D-hPRL pode interferir no ciclo celular, graças á sua capacidade de induzir a expressão de p21, proteína que pode acarretar apoptose ou a paralização do crescimento celular (264). S179DhPRL induziu a expressão de p21 em células de câncer de próstata, DU 145, LnCap e PC3. O mecanismo de indução se deu pelo estímulo da expressão dos PRLRs de forma curta SF1a e SF1b (263).

2.0. OBJETIVOS

Baseando-se em observações de que a S179D-hPRL tem um efeito mais pronunciado em modelos *in vivo* que em ensaio *in vitro* devido á combinação de seus efeitos de antagonista e agonista parcial (246), postulou-se que os efeitos observados em ensaios *in vivo* poderiam envolver diferentes mecanismos de ação ou diferentes tipos celulares, não presentes em ensaios *in vitro* (ex. células endoteliais, periócitos).

A inibição do crescimento de xenoimplantes de células tumorais de próstata humana por parte da S179D-hPRL foi mais efetiva do que a inibição do crescimento das mesmas células *in vitro* (265). O crescimento tumoral e a formação de tumores secundários (processo de metástase) dependem de um maior suprimento de nutrientes e oxigênio, assim como de uma maior vascularização do perímetro tumoral. Sabe-se que o meio condicionado de células de tumor de próstata estimula o crescimento de células endoteliais, sugerindo que essas células produzem fatores pró angiogênicos. De fato, bFGF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e interleucina-8 (IL-8) foram observados na urina de pacientes com câncer de próstata (255).

Dessa forma empregamos vários ensaios *in vitro* para determinar a atividade de S179D-hPRL sobre a proliferação, migração, diferenciação de células endoteliais humanas de origem macrovascular (HUVEC) e microvascular (HmVEC). Os ensaios *in vitro* serão importantes para se determinar o potencial da S179D-hPRL como agente ativo sobre a formação de novos capilares. Sendo que outros tipos celulares, como por exemplo periócitos e células da musculatura lisa, também estáo envolvidos na angiogênese (112,79,99) também usaremos ensaios *in vivo* para a avaliação da ação desse antagonista sobre a formação de novos vaso. Dentre de todos os ensaios empregados (modelos *in vitro* e *in vivo*), dois modelos utilizados se destacam pela sua importância como ferramentas para o estudo da angiogênese: o ensaio in vitro do anel de aorta de rato e o ensaio *in*

vivo da córnea que são considerados os melhores modelos disponíveis para essa finalidade (7).

É importante frisar a orginalidade e relevância do trabalho, uma vez que a atividade desse antagonista sobre a angiogênese nunca foi avaliada antes, em contraste com outro antagonista da hPRL (G129R-hPRL) que náo demonstrou ação anti-angiogênica *in vitro*. Além desse fator, também ressaltamos a importância do estudo para uma melhor compreensão do papel da PRL na angiogênese fisiológica e em doenças angiogênese-dependentes.

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção de PRL e S179D-hPRL como corpos de inclusão renaturados

3.1.1. Subclonagem e mutação sítio específica

O clone de DNA contendo a seqüência complementar da PRL humana (pBR-hPRL) foi obtido da ATCC ("American Type Culture Collection", Manassas, VA, EUA). Um fragmento *Ppu*MI, contendo a sequência completa da PRL, foi subclonado em um sítion *Sma*l de um plasmídeo pUC118 (US Biochemical Corp., Cleveland, OH, EUA) onde o sítio *Bam*HI foi eliminado. Esse plasmídeo recombinante foi empregado para transformar uma cepa de *Escherichia coli* CJ236 [*dut-l ung-l thi-l relAI (*pCJ105 Cm^r)], capaz de produzir DNAss contendo deoxiuridina após infecção com fago M13K07 e incubação com 0,25 µg/mL de uridina.

A mutagênese sítio específica foi realizada empregando o kit de mutagênenese Muta-Gene (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O *primer* 5'-ACGCAGGGATGNKATAAAATCG-3' foi usado para substituição da Serina por Aspartato. Um segundo *primer* foi empregado para facilitar a clonagem em um vetor de expressão através da inserção do sítio *Nde*I. A mutação foi confirmada por sequenciamento. O DNA mutado foi subclonado no plasmídeo pT7-SCII (US Biochemical Corp.,OH, EUA), que foi usado para transformação de uma cepa de *E. coli* BL21 (DE3) [*F ompT hsd*S_B ($r_B m_B^-$) gal dcm] para expressão da proteína.

3.1.2. Expressão das proteínas e renaturação dos corpos de inclusão

As células foram cultivadas em meio Luria Broth (LB) com ampicilina (200 μ g/mL) a 37°C por 12 horas. A cultura então foi diluída 10 vezes no mesmo meio LB, e aliquotadas em frações de 250 mL, incubando a 37°C com agitação até que a densidade ótica (OD 600 nm) atingisse 0,55-0,60. Isopropil β -tiogalactosídeo (IPTG), 0,5 nM foi adicionado ao meio de cultura para induzir a expressão das proteínas. A padronização dos experimentos determinou que os melhores rendimentos, associados a uma melhor pureza, foram obtidos após um período de indução de duas horas. As bactérias então foram centrifugadas e o pellet ressuspendido em 50 mL de tampão Tris-HCI, 50 mM, pH 7,5, a 4°C. A suspensão de células então foi lisada empregando-se um Ultrasonicador MicroUltrasonic cell disrupter (Kontes, Vineland, NJ, EUA) com pulsos de 15 segundos na potência 9, em gelo, com um intervalo de 30 segundos entre os pulsos, depois centrifugadas à 14.000 g por 10 minutos a 4°C.

As PRLs foram expressas principalmente na forma de corpos de inclusão que precipitaram no pellet da centrifugação a 14.000 g. Após a lavagem dos Tris-HCI, 50 mΜ, 7.5. 4°C, pellets com tampão pН а OS corpos de inclusão foram desnaturados com uréia 8M, β-mercapetanol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 1% em tampão fostato de sódio 0,2 M, pH 7,0 e posteriormente dializados contra 20 volumes de tampão de NH₄HCO₃, 50 mM, realizando oito trocas em 3 dias a 4°C, obtendo uma concentração final em PRL de cerca de 0,1 mg/mL.

3.2. Produção de PRL e S179D-hPRL em células humanas (HEK 293)

3.2.1. Cultura de células e vetores de expressão

Foram empregadas células embrionárias de rin humano HEK-293 (ATCC, Manassas, VA, EUA) para a expressão das PRLs, secretadas no meio de cultura celular. As células foram mantidas a 37°C, em incubadora umidificada de CO₂, em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com soro fetal bovino (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 50 µg/ml streptomicina e 50 U/ml penicillina. O vetor de expressão empregado foi o pcDNA 3.1, comercialmente disponível (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Insertos *Bam*HI/*Hind*III, contendo as seqüências da PRL e S179D-hPRL, foram obtidos dos vetores de expressão p658-PRL (222) e p658-179 respectivamente e inseridos no vetor pcDNA 3.1 digerido com as mesmas enzimas, orginando os vetores pcDNA-PRL e pcDNA-179 (figura 17).



Figura 17. Construção dos vetores de expressão pcDNA-PRL e pcDNA-S179DhPRL a partir do vetor comercial pcDNA 3.1 e dos insertos contendo as seqüências que codificam PRL e S179D-hPRL provenientes dos vetores de expressão p658-PRL (222) e p658-179, todos digeridos com *Hind*III e *Bam*HI (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.2.2. Transfecção transiente de células HEK-293 para expressão das PRLs

Células HEK293 foram mantidas em meio DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) contendo 4.500 mg de D-glicose/L, 1mM piruvato de sódio, 1mM de hidrocloreto de pirodoxina, 2 mM de L-glutamina suplementada com 10% FBS,

100 U/mL penicilina e 0,7 µM de estreptomicina. As células foram semeadas com uma densidade de 5 x 10^5 células por poço, em placas de 6 poços (Corning, Acton, MA, EUA). As trasnfecções transientes foram realizadas no dia seguinte, quando a células estavam 90-95% confluentes, com o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Alíquotas de 2-4 µg de DNA foram usadas em cada poço. O DNA foi inicialmente incubado com meio "Opti-MEM I Reduced Serum" (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), sem FBS e antibióticos, e homogeneizado. foi então preparada uma diluição 1:25 de Lipofectamina 2000 em 250 µL do mesmo meio. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, o DNA diluído e a solução de Lipofectamina 2000 foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos para a formação dos complexos Lipofectamina 2000-DNA. Os complexos foram então adicionados às células sempre em meio sem soro e sem antibióticos, homogeneizando. Após um período de 48 horas em incubadora de CO₂ a 37°C, o meio condicionado contendo as diferentes PRLs foi coletado e concentrado usando-se Microcons YM-3 ("cutoff" de 3000 Da) (Millipore, Billerica, MA, EUA).

3.3. Determinação de proteínas (ensaio de Bradford e radioimunoensaio)

A quantificação de proteínas (PRLs) foi realizada pelo método descrito por Bradford, 1976 (27) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) devido à maior rapidez e menor interferência encontradas quando comparadas às medidas realizadas pelo método de Lowry. A quantificação foi realizada em microescala em placas de ELISA (96 poços, Corning, NY, EUA) e as medidas realizadas em leitor de ELISA, modelo MR 4.000 (Dynatech Laboratories Inc., VA, EUA). Albumina sérica bovina (BSA, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi utilizada na curva padrão para calibração. O método foi padronizado comparando-se os resultados do ensaio de Bradford com os obtidos com o kit de radioimunoensaio (RIA) (Diagnostic Products Corp., CA, EUA). A detecção, quantificação e caracterização por RIA foi realizada comparando-se as PRLs recombinantes (corpos de inclusão renaturados e meio condicionado) com dois padrões de hPRL: hPRL I-8 e rPRL B7 (NIDDK, MD, EUA) dissolvidos em NH₄HCO_{3.} BSA altamente purificada (Sigma, MO, EUA) foi adicionada aos padrões de PRL usados no RIA para evitar proteólise ou adsorção das proteínas na parede dos tubos.

3.4. Densitometria a laser dos géis de SDS-PAGE corados com Coomassie Blue

A pureza das preparações de PRLs após SDS-PAGE foram determinadas por densitometria e a intensidade das bandas em Western blots. Utilizando um densitômetro CS 9301 Dual Wavelength Flying Spot Scanning (Shimadzu Scientific Instruments, MD, EUA), a intensidade das bandas sendo estimada pelo software CS 9301 PC 1.0 optical bench version.

3.5. Determinação da atividade biológica (potência) da PRL não modificada

A bioatividade das PRLs purificadas e das PRLs em meio condicionado foram avaliadas frente a uma preparação pituitária (hPRL WHO 84/500), no ensaio proliferativo usando células de linfoma Nb2 (94). A proliferação celular foi estimada mediante ensaio colorimétrico (Cell titer, Promega, WI, EUA). O ensaio se baseia na conversão de um composto de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H- tetrazólio ou MTS] que é bioreduzido pelas células em produto de formazana solúvel no meio de cultura. A conversão do MTS em formazana é realizada por desidrogenases encontradas em células metabolicamente ativas. A quantidade de formazana formada é monitorada a 490 nm, sendo que a absorbância é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes na cultura (111).

3.6. Determinação da atividade biológica (potência) da S179D-hPRL

Sabendo-se que a S179D-hPRL induz a expressão de β -caseína (137) foi utilizado um ensaio onde se avalia a capacidade da S179D-hPRL de promover a expressão desta proteína (227). O ensaio consiste na transfecção de células de câncer humano de mama T47D (ATCC, MD, EUA) com uma porção de 2,4-Kb do promotor da β-caseína em fusão ao gene repórter da luciferase. As células T47D foram utilizadas por possuírem altos níveis de PRLRs (194) e portanto mais sensíveis à S179D-hPRL. Para análise da bioatividade da S179D-hPRL, foram transfectados 2 μg da construção contendo a porção de 2,4-Kb do promotor de βcaseína e gene repórter da luciferase (pCasein-Luc). O meio foi trocado para DMEM sem soro contendo 1 µg/mL da preparação de S179D-hPRL 24 horas após a transfecção. Após a adição do antagonista e incubação de 24 horas, as células foram lavadas com solução salina fosfatada Dulbecco (DPBS), e após a lavagem, adicionou-se tampão de lise celular ("Reporter lysis buffer", Promega, WI, EUA). As células lisadas foram raspadas da placa e centrifugadas (12.000 g) por 5 minutos. Vinte microlitros do sobrenadante foram adicionados a tubos de luminômetro contendo 50 µL de reagente de ensaio de Luciferase e o substrato luciferina (Promega, WI, EUA). O sinal de luminescência relativo foi guantificado empregando-se um luminômetro Monolight 2010 (Analytical Luminescence, CA, EUA).

3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

SDS-PAGE descontínuo em gel de poliacrilamida a 12% foi realizado como descrito anteriormente (139) sob condições desnaturantes, empregando-se o reagente redutor 2-mercaptoetanol (Sigma, MO, EUA) no tampão da amostra. Coomassie Blue R250 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Upsala, Suécia) foi usado para visialização das bandas. hPRL (NIDDK-anti-hPRL-3, AFP-CII580) foi

usada como padrão a uma diluição de 1:5.000. Os padrões de peso molecular utilizados foram: fosforilase b (94 Kda), albumina bovina (67 Kda), ovoalbumina (43 Kda), anidrase carbônica (30 Kda), inibidor de tripsina (20,1 Kda) e α-lactoalbulmina (LMW Kit, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Upsala, Suécia).

3.8. Western Blots (Imunoblots) e imunoprecipitação (IP)

3.8.1. Preparação de lisado de extrato celular total

Para a obtenção de extratos celulares totais, as células foram lisadas com tampão de lise (Nonidet P-40 1%, 20 mM Tris, pH 8,0, 137 mM NaCl, Glicerol 10%, suplementado com um coquetel anti-protease (Boheringer, Mannheim, Alemanha) em gelo por 15 minutos.

3.8.2. Preparação de lisado de extrato celular citosólico

Para avaliar a liberação de citocromo C mitocondrial, extratos citosólicos foram obtidos de acordo como a modificação do protocolo descrito anteriormente (95). As células foram lavadas duas vezes com DPBS e os pellets de células foram ressuspendidos com 1 mL de tampão a 4°C contendo 20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl2, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT e 1 mM PMSF. O extrato citosólico foi obtido lisando-se as células através da passagem da suspensão de células por uma agulha calibre 22G (22G x 30mm) 3 vezes. O lisado foi centrifigado (10.000 g) por 10 minutos e o sobrenadante foi novamente centrifugado (10.000 g) por 1 hora.

3.8.3. Western blots (imunoblots)

Para detectar a clivagem das proteases pró-apotóticas (caspase-8 e DFF45), das quinases dependentes de ciclinas (CDKs, p21 e p53), ERK1/2, JNK e Akt, HUVECs confluentes cultivadas em placas de 100 mm (Corning, NY, EUA)

foram coletadas em DPBS a 4°C e seus respectivos extratos totais obtidos como descrito (240). Quantidades iguais de lisados totais de HUVEC (40 µg/poço para todos os imunoblots, exceto para os estudos de ativação/fosforilação de ERK1/2, JNK e Akt onde utilizaram-se 20 µg/poço) foram resolvidos por SDS-PAGE e transferidos para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA). Imunoblots foram realizados empregando-se uma variedade de anticorpos: anticaspase-8 (1:4000, BD Pharmigen, NJ, EUA), anti-DFF45/ICAD (1:1000, Santa Cruz biotechnology, CA, EUA), anti-p21 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-p52 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-ERK fosforilada (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). Para estimar a quantidade de citocromo C liberada para o citosol a partir de mitocôndrias, extratos citosólicos obtidos como descrito foram empregados e analisados (rabbit anti-human cytocrome C/ 1:1000; BD Pharmigen, NJ, EUA). Para normalizar a quantidade de lisado celular transferido para as membranas empregou-se anticorpos anti-actina humana (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) para todos os imunoblots exceto para os estudos de ativação de ERK 1/2, JNK e Akt onde anti-ERK total (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), anti-JNK2 total (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e anti-Akt total (1:1000, Cell Signaling, MA, EUA) foram usados respectivamente para a correção/normalização da transferência. A interação anticorpo-antígeno foi detectada usando-se um anticorpo secundário acoplado com peroxidase de rábano e sistema de quimioluminescência (sistema ECL, Amersham Biosciences, NY, EUA).

3.8.4. Imunoprecipitação e Western blotting (imunoblot)

Para a detecção das isoformas do PRLR, quantidades iguais de lisado total celular (1 mg proteína) de células HUVEC tratadas e não tratadas, foram imunoprecipitadas com 1 μ g de anticorpo de camundongo anti-PRLR, que reconhece a porção extracelular do receptor (Zymed, CA, EUA); os imunocomplexos foram capturados com 100 μ L de suspensão de pérolas de agarose com proteína A imobilizada (Upstate Biotechnology, Inc., NY, EUA)

e lavadas 3 vezes com DPBS. As pérolas foram então ressuspendidas em 50 µL de tampão de amostra de PAGE-SDS e, após fervura por 5 minutos, 20 µL do sobrenadante foram transferidos para uma membrana de PVDF (Amersham Biosciences, NJ, EUA). Anti-PRLR foi utilizado na diluição de 1:1000. A interação anticorpo-antígeno foi detectada usando-se um anticorpo secundário anti IgG de camundongo, acoplado com peroxidase de rábano e sistema de quimioluminescência (sistema ECL, Amersham Biosciences, NY, EUA).

3.9. Espectrometria de massa (MALDI-TOF)

As amostras de PRL/S179D-hPRL purificadas foram submetida à espectrometria de massa MALDI-TOF para uma determinação mais exata de sua massa molecular utilizando um espectrômetro de massa Voyager DETM (PE Biosystems, Foster City, CA, EUA). O instrumento foi calibrado com uma mistura de mioglobina e citocromo-C (Sigma Chemicals Co., MO, EUA). Amostras de PRL/S179D-hPRL purificadas foram testadas em uma concentração final 100 nM usando com matriz o ácido sinapínico (0,1 M ácido sinapínico em uma mistura de 1:1:1 de acetonitrila, metanol e H2O). As análises foram conduzidas em íon positivo a 40 kV (238).

3.10. Determinação dos níveis de endotoxina (LPS)

A contaminação por endotoxinas das preparações de PRLs (corpos de inclusão e meio condicionado) foi avaliada de forma semiquantitativa com o kit E-TOXATE (Sigma, MO, EUA) que emprega o ensaio do lisado de amebócito *Limulus* (LAL).

3.11. Ensaio de angiogênese na membrana coriolantóica de embriões de galinha (CAM)

Esses ensaios foram realizados empregando uma modificação da metodologia previamente utilizada (161). Dois mililitros da albumina foram retirados de ovos de 4 dias de idade para que a membrana CAM se separasse da casca. Janelas foram abertas por meio de perfuração 3 horas após e os ovos foram incubados até o dia 9. Pellets contendo as diferentes PRLs, bFGF ou anticorpos anti-hPRL foram preparados misturando-se uma solução de metilcelulose 1% (1:1) com 1 µg de PRL ou S179D-hPRL e 500 ng de bFGF em um volume total de 40 µL por pellet. Os pellets foram deixados a secar em condições estéreis por 2 horas. Esse procedimento rendeu discos de metilcelulose de cerca de 5 mm de diâmetro e 0,1 mm de espessura contendo as proteínas. Os discos então foram colocados sobre as membranas, pelas janelas, entre dois grandes vasos de CAMs de 9 dias de idade; 5 dias após o implante dos discos, os pellets e áreas adjacentes foram removidos, fixados e as CAMs examinadas para avaliação do grau de angiogênese. A angiogênese foi guantificada pela estimativa da área avascular. Os controles negativos utilizados foram pellets contendo metilcelulose e água somente, e pellets contendo S179D-hPRL e três vezes um excesso de anticorpo de coelho anti-PRL humana (NIDDK, MD, EUA). O pellet de bFGF (Invitrogen, CA, EUA) foi usado como controle positivo. O experimento foi realizado cinco vezes com 10 amostragens para cada tratamento.

3.12. Ensaio de angiogênese na córnea de ratos

O procedimento cirúrgico para a indução da angiogênese na córnea em ratos (122) foi modificado incorporando-se 2 pellets no interior do estroma da córnea ao invés de apenas um pellet. Confeccionou-se uma microbolsa ("pocket") próxima ao limbo (1,0 mm) onde forma introduzidos os dois pellets (192). Polihidroxietil metacrilato de liberação gradual (hydron) (Hydro Med Sciences, NJ, EUA) foi preparado para conter 45 µg de sal de alumínio do sulfato de sacarose

(sucralfate) (Sigma, MO, EUA), além de uma das três proteínas teste: 52,5 ng de S179D-hPRL, 52,5 ng de PRL e 90 ng de bFGF (Invitrogen, CA, EUA). Dez ratos (6 semanas de idade; C57BL/6) foram anestesiados com Avertin (Tribromoetanol, 0,015-0,017 mL/g peso corporal) e dois pellets foram introduzidos no estroma da córnea destes ratos à uma distância de 0,7 mm do limbo córneo-escleral. 10 olhos direitos receberam 2 pellets, sendo que um continha S179D-hPRL e outro bFGF. Os 10 olhos esquerdos correspondentes receberam 2 pellets, um contendo PRL e outro bFGF. Após 8 dias da cirurgia, os ratos foram examinados para avaliar-se a área de vascularização, como já descrito anteriormente (121,122).

3.13. Cultura de células endoteliais humanas

Células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e células endoteliais microvasculares humanas (HMVEc) foram obtidas da Clonetics (CA, USA). As células foram usadas até a passagem 5, mas em alguns experimentos foram empregadas células de passagem 10. HUVEC foram cultivadas em placas revestidas com colágeno (Sigma, MO, EUA) em meio M199 suplementado com Hepes 10 mM, 2,5 µg/mL de timidina, 140 unidades USP/mL de heparina, 5ng/mL de bFGF (Sigma, MO, EUA), 20% soro fetal bovino (FBS, Invitrogen, CA, EUA) como recomendado pelo fabricante. HMVEc foram cultivadas em meio de crescimento endotelial com fatores de crescimento (meio EGM-2MV, Clonetics, CA, EUA).

3.14. Ensaio de proliferação celular

HUVEC foram semeadas em placas de 24 poços (Corning, NY, EUA) em densidade de 3x10⁴ células/poço em 1 mL de meio. Após 24 horas, as células foram incubadas com S179D-hPRL ou PRL em meio de crescimento endotelial livre de soro, contendo bFGF (5 ng/mL, Sigma, MO, EUA) e fator de crescimento epidermal (Sigma, MO, EUA) (SFM). As células foram incubadas por mais 72 horas a 37°C. O número de células foi determinado empregando-se um ensaio

colorimétrico com as modificações estringentes descritas anteriormente (111).

3.15. Formação de túbulos endoteliais em Matrigel

Matrigel com baixa concentração de fatores de crescimento (BD Biosciences, CA, EUA), diluído 1:1 com meio SFM, foi adicionado em cada poço de uma placa de 24 poços (Corning, NY, EUA) em um volume de 350 μ L. Após sua polimerização, realizada a 37°C por 30 minutos, uma suspensão de 3x 10⁴ células HUVEC/poço em 400 μ L de meio SFM com bFGF (2,5 ng/mL) suplementado com 5% de FBS foi transferida para cada poço contendo o Matrigel previamente polimerizado. As células então foram tratadas com 1 μ g/mL de uma das duas PRLs. As células foram incubadas por 24 horas a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂. As estruturas tubulares foram observadas e quantificadas em seis campos microscópicos aleatórios adjacentes ao centro dos poço (magnificação de 20x).

3.16. Análise por citometria de fluxo

3.16.1. Análise do conteúdo de DNA (fragmentação de DNA)

HUVEC foram cultivadas por três dias em meo SFM com bFGF (2,5 ng/mL) suplementado com 5% de FBS, S179D-hPRL ou hPRL (1µL/mL). As células foram coletadas por tripsinização, lavadas com DPBS e fixadas com 75% etanol em DPBS a 4°C, por 30 minutos. Após centrifugação a 4°C (2000 g), o pellet de células foi resuspendido em 0,1% Triton X-100 (Sigma, MO, EUA) em DPBS contendo 200 µg/mL de RNase (Sigma, MO, EUA) e 10 µg/mL de iodeto de propídio (Sigma, MO, EUA), e incubado á temperatura ambiente por 30 minutos. A fluorescência das células individuais foi medida com um citofluorômetro FACScan equipado com o software CellQuest (Becton Dickinson, NJ, EUA). Quando houve tratamento com o inibidor específico da MAPkinase, PD 98059 (Sigma, MO, EUA), a duração do tratamento foi de 2 dias.

3.16.2. Dupla visualização com anexina V (V) e iodeto de propídio (PI) (externalização de fostatidilserina [PS])

A dupla visualização com anexina V-Isotiocianato de Fluoresceína (anexina V-FITC) e PI foi realizada para detectar o número de células em processo de morte celular programada (apoptose). Para esse propósito o kit BD apopalert Annexin-V (BD Biosciences Clontech, CA, EUA) foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. HUVEC foram coletadas por tripsinização, lavadas e incubadas com anexina V-FITC e PI como indicado. Análise bivariante da fluorescência-FITC (FL-1) e fluorescência PI (FL-3) rendeu diferentes populações celulares onde células FITC negativas (FITC-) e PI negativas (PI-) foram designadas como células viáveis; células FITC positivas (FITC+) e PI- foram designadas como células em processo de apoptose inicial e células FITC+ e PI positivas (PI+) foram designadas como células como células necróticas ou em estágio de apoptose avançado. A fluorescência individual das células foi medida com um citômetro de fluxo FACScan equipado com o software CellQuest (Becton Dickinson, NJ, EUA).

3.17. Ensaio de migração celular ("Cloning ring assay")

Um anel de clonagem foi empregado para criar uma área de contenção e assim criar uma monocamada circular de células. O anel de clonagem foi colocado no centro de uma placa de petri de 35 mm (Corning, NY, EUA) e um suspensão de 10⁴ HMVEc em 100 µL de meio EGM-2MV foi adicionada dentro do anel e incubada por 40 minutos a 37°C para permitir a aderência e formação da monocamada circular. O anel de clonagem foi cuidadosamente retirado, e as bordas da monocamada foram marcadas para referência. Foi então adicionado um mililitro de meio EGM-2MV [suplementado com bFGF (controle), hPRL+bFGF, S179D-hPRL+bFGF)]. As células foram tratadas por três dias e a migração celular

foi estimada no terceiro dia. A migração celular foi estimada pelo raio de migração celular a partir das bordas iniciais da monocamada circular inicial.

3.18. Ensaio de quimiotaxia celular

HMVEc (10⁶ células) em 100 µL de meio EGM-2MV foram plaqueadas na parte inferior de membranas tipo Boyden (6,5 mm transwell filter inserts; tamanho dos poros, 8 µm, Corning Costar Corporation, NY, EUA) invertendo-se o inserto/membrana. Incubaram-se as células e inserto para permitir-se a aderência, e após esse período, os insertos foram colocados nos poços na posição não invertida com as células aderidas á parte inferior (vide figura 18).



Figura 18. Diagrama do ensaio de quimiotaxia realizado com insertos Transwell® (câmara de Boyden).

Adicionou-se meio EGM-2MV as duas câmaras: 1000 µL na câmara inferior e 100 µL na câmara superior com bFGF apenas, bFGF com PRL e bFGF com S179D-hPRL (figura 18). As células foram incubadas por 4 horas para a migração em direção ao gradiente de bFGF na câmara superiora do inserto. Ao final do experimento, para a avaliação da migração, as células remanescentes na parte inferior do inserto (câmara inferior) foram removidas e as membranas foram fixadas e coradas com uma solução de toluidina azul em 4% de formaldeído. As células que migraram para a câmara superior do filtro foram fotografadas e contadas em dez campos microscópicos por filtro em magnificação 10x para se obter o número relativo de células migrantes por cada tipo de tratamento (149).

3.19. Cultura de anéis de aorta de rato (ensaio *ex vivo*)

A aorta proximal foi retirada de ratos adultos Sprague-Dawley como descrito anteriormente (247), e seccionada em anéis de 1 mm. Placas de 24 poços foram pré revestidas com 200 μ L de Matrigel (BD Biosciences, CA, EUA) diluído 1:1 com meio EGM-2MV. Um anel de aorta foi colocado em cima dessa camada previamente polimerizada e coberta com Matrigel líquido (200 μ L). Após a polimerização completa do Matrigel, 500 μ L de meio EGM-2MV contendo 2% de FBS (meio seletivo para crescimento de células endoteliais) foram adicionados aos poços. Os anéis de aorta em matrigel foram então incubados por 24 horas. Após essa incubação inicial, novo meio foi adicionado com S179D-hPRL ou PRL (1 ou 2 μ g/mL) e incubados por 8-10 dias adicionais.

3.20. Avaliação qualitativa e quantitativa do crescimento endotelial no ensaio de anéis de aorta

A avaliação qualitativa foi realizada como descrito anteriormente (Wang 2004) com a visualização com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio brometo). A avaliação quantitativa empregou o ensaio com MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2H-tetrazólio) para obter o número relativo de células viáveis que cresceram a partir do anel de aorta. Após o final do experimento, 300 μ L de solução recém preparada contendo 100 μ L de MTS e 1 μ g de PMS (fenazina metosulfato) em DPBS foram adicionados em cada poço, e

incubados por 24 horas a 37°C. O meio EGM-2MV empregado nesse estudo é seletivo para o crescimento de células endoteliais, embora o número total de celular também incluirá fibroblastos (103).

3.21. Estudo da expressão gênica por RT-PCR e real time RT-PCR

RNA total de HUVEC não confluentes (2 x 10^6 células/placa 100 mm) foi isolado com Trizol (Gibco/Invitrogen, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Os primers empregados para RT-PCR são apresentados na tabela 3. A expressão foi normalizada contra o mRNA de GAPDH (D-gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) para RT-PCR e contra mRNA de β -actina para "real time"RT-PCR.

 Tabela 3. Seqüências do oligonucleotídeos empregados.

PRLR-LF-reverse	GATTIGATGCTCATCTGTTGGA
PRLR-LF-forward	TCCAGGTATGTGGGTTTCAT
PRLR-S	ATCATGATGGTCAATGCCACTA
LF-forward	
PRLR-S	TGGGGTTCCTCACACTTTTC
LF-reverse	
PRLR-SF1A-reverse	GATAGTGAGGACCAGCATCTAATG
PRLR-SF1A-forward	TGGACTGTGGTCAATGTTGC
PRLR-SF1B-reverse	CATGAATGATACAACCGTGTGG
PRLR-SF1B-forward	CAACATCAAGGGGTCACCTC
PRL-EXON2	GCAGTTGTTGTTGTGGATGATT
PRL-EXON5	GATGCCAGGTGACCCTTCGAGA
BETA ACTIN-forward	AAAGACCTGTACGCCAACAC
BETA ACTIN-reverse	GTCATACTCCTGCTTGCTGAT
CTGF-forward	GAGGAAAACATTAAGAACGGCAAA
CTGF-reverse	CGGCACAGGTCTTGATGA
TIMP-1 forward	CTGCGGATACTTCCACAGGTC
TIMP-1 reverse	GCAAGAGTCCATCCTGCAGTT
TIMP-2 forward	TTGAGAGTGGACCACACTGCGC
TIMP-2 reverse	CTGGCAACCCTACAACAGACCC
IL-8 forward	ATAAGCAGGCCTCCAACGC
IL-8 reverse	GAGCTGGACCAGTCGAAACC
VEGF-forward	GCCTTGCTGCTCTACCTCCA
VEGF-reverse	CAAGGCCCACAGGGATTTT
HO-1-forward	CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC
HO-1-reverse	GATGTTGAGCAGGAACGCAGT
TSP-1-forward	CCCTTCAAAACAAATAGGAGTTCA
TSP-1-reverse	ATCCTGTGATTCCAAATGCCAG
ANG-2-forward	TGGGATTTGGTAACCCTTCA
ANG-2-reverse	GTAAGCCTCATTCCCTTCCC
ANG-1 forward	GCAACTGGAGCTGATGGACACA
ANG-1reverse	CATCTGCACAGTCTCTAAATGGT
FGF-forward	TGTGCTAACCGTTACCTGGCT
FGF-reverse	CAGIGCCACATACCAACIG
ANGIOGENIN-forward	IGGGCGTTTGTTGTTGTTGGTCTTC
ANGIOGENIN-reverse	CGTTTCTGAACCCCGCTGTGG
FGFR-reverse	GCCAGCAGTCCCGCATCATCAT
FGFR-forward	GACGCAACAGAGAGAGACTIGT
VEGER-1-reverse	GAIGIAGICITIACCAICCIG
VEGER-1-forward	
VEGER-2-reverse	TGUCAGUAGTCCAGCATGGTCTG
CADDU reverse	GAGGGGCCTCTCATGGTGATIGT
GAPDH-reverse	GGUATGGACTGTGGTUATGAG
GAPDH-IOIWard	TGUACUAAUTGUTTAGU

Primer 5'- sequência- 3'
3.21.1. RT-PCR semiquantitativo

Cinco microgramas de RNA total de cada amostra foi usado para a síntese de cDNA utilizando o Kit Super Script First Strand Synthesis (Invitrogen, CA, EUA). Um volume total de 2 µL de cDNA da reação de transcriptase reversa (RT) foi usado com o PCR Master Mix (Invitrogen, CA, EUA). O programa de amplificação consistiu de a 95°C, seguidos por 30 ciclos consistindo de uma etapa de desnaturação (95°C por 30 s), um passo de anelamento (55 ou 56°C) e uma etapa de extensão (72°C por 30 s). Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em géis de agarose 1% (Invitrogen, CA, EUA)/Tris-borato EDTA (tampãoTBE) (0,089 M Tris e borato, 0,002 M EDTA sódico) e coloração com brometo de etídeo.

3.21.2. "Real time" RT-PCR quantitativo

Vinte e cinco reações foram preparadas em placas de reação ótica de 96 poços (ABI Prism/ Applied Biosystems, CA, EUA) empregando SYBR green máster mix (ABI Prism/ Applied Biosystems, CA, EUA). Utilizando o termociclador ABI Prism 7700 (ABI Prism/ Applied Biosystems, CA, EUA), as amostras foram aquecidas por 2 minutos a 50 °C, seguidos por 10 minutos a 95°C, e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 55 ou 56°C por 1 minuto. Os dados de tempo real ("real time") foram analisados empregando o método comparativo $C_{\rm T}$ (30).

3.22. Protein array (arranjo de proteínas)

Com a finalidade de detectar a influência da S179D-hPRL sobre a liberação de fatores ligados á angiogênese, um arranjo de anticorpos contra determinadas proteínas foi utilizado para o estudo (Chemicon International Inc.Temecula, CHEMIARRAY human angiogenesis antibody array, CA, EUA). Para esse ensaio, um controle consistindo de HUVEC cultivadas em meio SFM suplementado com bFGF (2,5 ng/mL) e EGF (1ng/mL), e um grupo tratado com o mesmo meio adicionado de S179D-hPRL (1 µg/mL) foram usados. O meio condicionado foi

então coletado após um período de incubação de 24 horas. Empregou-se meio sem FBS para se reduzir a interferência de fatores de crescimento já presentes em soro fetal bovino. A normalização de um arranjo para outro utilizou os controles positivos incluídos no arranjo pelo fabricante.

3.23. Estudo da atividade dos promotores das proteínas p21 e Bax (ensaios de transativação do gene repórter)

3.23.1. Construções (plasmídeos-gene repórter Luciferase)

Para estudar a atividade do promotor da proteína p21, foi empregado uma construção (pp21-luc) contendo a seqüência completa da região promotora da proteína p21 em fusão com o gene da luciferase (repórter) (153). Para a via ativada por p53, empregou-se um plasmídeo (pBax-luc) com a região completa do promotor da proteína Bax, em fusão ao gene repórter da luciferase (210,215). A transativação do gene *Bax* é importante para a função supressora tumoral de p53 e a expressão desse gene é geralmente induzida quando os níveis de p53 aumentam em resposta a um evento apoptótico.

Para os ensaios com PD 98059 empregamos um controle consisitindo de uma construção que codifica uma forma mutante de ERK, com efeito dominante negativo (pERK-DN) (145).

3.23.2. Transfecção transiente e quantificação das atividades da luciferase e da β-galactosidase

Construções repórter e pSV– β -galactosidase (construção contendo o gene da β -galactosidase sob controle do promotor SV40, Promega, WI, EUA) foram usados para trasnfecção transiente de HUVEC. Os experimentos de transfecção foram realizados em HUVEC semiconfluentes (80% a 90% de confluência), antes da quatro passagens em placas de 35 mm, em triplicatas. Os complexos de DNA-lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA, EUA) foram obtidos mediante incubação do DNA (2 µg da construção do gene:repórter/ 2 µg do pSV- β -galactosidase) e Lipofectamina 2000 (8 µL), em meio endotelial de crescimento SFM (sem suplementos e antibióticos) por 20 minutos a temperatura ambiente (reação

por poço). As culturas de HUVEC foram então lavadas duas vezes com meio SFM e transfectadas transientemente com os complexos pré-formados de DNA-Lipofectamine 2000, no mesmo meio por 4 horas. Após a transfecção o meio SFM foi trocado por meio de crescimento completo suplementado. As células transfectadas foram tratadas com as diferentes PRLs e PD 98059 (inibidor seletivo da MAPkinase, Sigma, MO, EUA) 24 horas após a transfecção com Lipofectamina 2000. Os tratamentos foram realizados por 12 ou 24 horas. O plasmídeo de controle interno pSV- β -galactosidase foi empregado para normalização da transfecção (atividade da β -galactosidase) juntamente com a concentração total de proteínas (Bradford protein assay, Bio-Rad, CA, EUA). As atividades individuais da luciferase foram normalizadas/corrigidas com base na eficiência da transfecção, dividindo-se as unidades relativas de luminosidade pelas atividade de β -galactosidase (unidades arbitrárias, UA).

3.24. Análise estatística

Todos os dados numéricos apresentados são a média±desvio padrão (SD) exceto onde indicado. Todos os experimentos utilizaram pelo menos triplicatas e foram conduzidos por um mínimo de três vezes. A significância estatística foi calculada empregando o texto do *t* Student para a comparação das médias individuais, com ou sem correções de Bonferroni. Um valor de < 0,05 para *P* foi considerado como significante. Para o ensaio de angiogênese na córnea, os dois grupos foram comparados com o teste de Mann-Whitney.

3.25. Manipulação de animais

Todos os procedimentos envolvendo os animais receberam aprovação prévia dos comitês institucionais e foram realizados em concordância com as diretrizes da "American Association for Laboratory Animal Care", "The United States Department of Agriculture" e do "National Institutes of Health (NIH)".

4.0. RESULTADOS

4.1. Caracterização das preparações de S179D-hPRL e PRL produzidas em *E. coli*

4.1.1. SDS-PAGE, Western Blot e espectrometria de massa das preparações de hormônios

Após a renaturação dos corpos de inclusão purificados, analizaram-se as preparações de hPRL e S179D-hPRL para verificar a pureza das amostras (figura 19 A). O rendimento para ambas as PRLs foi similar, assim como sua pureza que foi de cerca de 97% estimada por densitometria. Como as células endoteliais são sensíveis á endotoxina, os níveis de lipopolissacarídeos (LPS) foram avaliados em ambas as preparações. Tanto as amostras de S179D-hPRL como a de PRL também apresentaram baixos níveis de LPS (>0,0015 EU/mL) e portanto foram consideradas apropriadas para ensaios *in vitro* com células endoteliais. Sendo que as duas proteínas são expressas nos mesmo níveis, e purificadas em paralelo, os contaminantes provenientes do processo (como por exemplo LPS e as proteínas derivadas das células hospedeiras) também devem estar presentes nas mesmas concentrações.



Figura 19. Caracterização das preparações de PRL e S179D-hPRL. (A) grau de pureza estimado por SDS-PAGE, 12,5 % acrilamida em condições redutoras e coloração realizada mediante Coomassie Blue; 1, marcador de peso molecular (Sigma, MO, EUA); 2 e 3, hPRL expressa em *E. coli*; 4 e 5, S179D-hPRL expressa

em *E. coli*; 6, PRL hipofisária em empregada como padrão (NIDDK, MD, EUA). Números á esquerda indicam peso molecular em KDa (B) Imunoblots, as preparações foram analisados por Western blot para confirmar sua identidade imunológica frente a anticorpos anti-PRL (NIDDK, MD, EUA). As PRLs apresentaram padrão idêntico ao da preparação pituitária utilizada como referência (NIDDK, MD, EUA), confirmando sua imunoreatividade. *E. coli,* PRLs expressas em *E. coli* na forma de corpos de inclusão renaturados; HEK 293, PRLs expressas em células humanas transfectadas com vetor de expressão codificando para as PRLs (PRL e S179D-hPRL); PRL NIDDK, padrão hipofisário empregado.

As preparações foram analisadas também por Western blot para confirmar sua identidade imunológica frente a anticorpos anti-PRL (figura 19 B). As PRLs apresentaram padrões idênticos ao da preparação pituitária utilizada como referência (NIDDK, MD, EUA), confirmando sua imunoatividade e identidade.

Para se determinar as massas precisas das S179D-hPRLs estas foram submetidas à espectrometria de massa MALDI-TOF. A massa molecular para S179D-hPRL obtida do meio condicionado de HEK 293 transfectadas foi de 22.939 Da (figura 20 A), compatível com o valor calculado com base no valor para a hPRL de 22.927, considerando a mutação. Também resultou compatível o valor de 23.065 Da para S179D-hPRL obtida em *E. coli* (figura 20 B) levando-se em conta a mutação pontual e a metionina, característica de proteínas citoplásmicas expressas na forma de corpos de inclusão (Massa teórica de 22.076). As diferenças são aceitáveis sendo que o método prevê erros entre 10 e 50 Da para proteínas com mesma massa molecular da ordem de 10.000 Da (183), ou cerca de 0,1% de erro (~ 22,9 Da e 23,1 Da de erros para a S179D-hPRL de *E. coli* e S179D-hPRL de HEK 293, respectivamente) de acordo com a calibração do instrumento (260).



Figura 20. Espectrometria de massa (MALDI-TOF) de amostras de S179D-hPRL. (A) S179D-hPRL sintetizada em células humanas HEK 293 (meio condicionado). (B) S179D-hPRL sintetizada em *E. coli* a partir da renaturação de corpos de inclusão Os resultados são expressos como a razão massa/carga (m/z). As massas das espécies monoprotonadas estão indicadas acima do pico correspondente.

4.1.2. Avaliação da atividade biológica (potência)

A bioatividade da PRL obtida de corpos de inclusão renaturados e de meio condicionado de células HEK 293 transfectadas foi avaliada frente a uma preparação pituitária de referência (PRL, NIDDK, MD, EUA) em ensaio proliferativo baseado em células Nb2 de linfoma de rato (94). Os dados obtidos indicam que a potência da PRL expressa em *E. coli* é de cerca de $38,0 \pm 1,5$ uUI/mg (n=3) enquanto que a potência da PRL expressa em células eucarióticas é de $35,9 \pm 1,2$ UI/mg (n=3), indicando que não existe uma diferença significativa na atividade biológica dessas preparações frente a preparação pituitária de referência (potência nominal de 35,0 UI/mg, (figura 21 A), sendo portanto as preparações recombinantes indistinguíveis da PRL natural em termos de atividade biológica. A proliferação celular foi estimada por ensaio colorimétrico com modificações que diminuíram as interferências (111).





В

Figura 20. Bioatividades da PRL (A) e da S179D-hPRL (B). (A) a bioatividade da PRL foi avaliada pelo ensaio *in vitro* com células Nb2 de linfoma de rato como anteriormente descrito (94) comparando-se as PRLs com a PRL pituitária de referência (atividade nominal de 35,0 UI/mg). (B) bioatividade da S179D-hPRL avaliada pela sua capacidade de induzir a expressão de β -caseína (137,227). Células T47D transfectadas com construção contendo o gene repórter da luciferase sob controle do promotor da β -caseína foram empregadas nesse ensaio de potência (bioatividade).

O ensaio com células Nb2 também poderia ser empregado para avaliação do antagonismo da S179D-hPRL, que possui um perfil de antagonista competitivo nesse ensaio *in vitro* (35). No entanto esse ensaio não permite avaliar a atividade do antagonista, que no caso da S179D-hPRL pode ser estimada com base em sua capacidade de induzir a expressão de β -caseína (ensaio de diferenciação) (137). O ensaio utilizado é uma modificação do ensaio já descrito na literatura (227) e que emprega células de câncer de mama humano T47D, que possuem uma alta densidade de PRLRs (194). Nesse bioensaio, demonstrou-se que as preparações de S179D-hPRL de *E. coli* e de células humanas (HEK 293) possuíam praticamente a mesma capacidade de induzir a expressão de luciferase por ativação do promotor da β -caseína, apresentando portanto ambas uma bioatividade equivalente (figura 21 B).

4.2. Ensaios in vivo

O ensaio baseado em CAM de galinhas permitiu a investigação *in vivo* dos efeitos de S179D-hPRL e da hPRL sobre um tecido em processo de angiogênese fisiológica. A hPRL não demonstrou efeitos detectáveis e por esse motivo foi empregada como um dos controles nesse ensaio (figura 22 A e 22 B).





Figura 22. Efeitos da S179D-hPRL sobre o ensaio *in vivo* CAM. (A) A CAM tratada com PRL não mostrou diferenças significativas das CAMs não tratadas. (B) CAM tratada com S179D-hPRL. As flechas brancas indicam as bordas dos pellets implantados que continham 1 μ g de cada uma das PRLs e 500 ng de bFGF. (C)

Quantificação da área avascular e resultados do bloqueio da atividade da S179DhPRL com anticorpo anti-PRL (NIDDK, MD, EUA). * P < 0,05 com relação ao controle de solução salina (C) ou a hPRL.

O efeito inibitório sobre a angiogênese é evidente: não se levando em conta os dois vasos entre os quais o pellet com S179D-hPRL foi implantado, as amostras tratadas com S179D-hPRL se apresentaram essencialmente avasculares sob a área ocupada pelo mesmo pellet. Mesmo ao redor do perímetro do pellet, a formação de novos capilares foi menor que a observada nos controles com PRL. Os efeitos anti-angiogênicos da S179D-hPRL foram quantificados pela área avascular presente (figura 22 C), onde a área avascular sob o perímetro do pellet foi quantificada. O efeito anti-angiogênico da S179D-hPRL foi quase completamente revertido pela presença de anti-PRL.

Além do teste in vivo no sistema CAM de galinhas, a S179D-hPRL também foi testada em outro ensaio in vivo, aquele baseado na angiogênese aa córnea de ratos. Nesse ensaio a córnea, naturalmente avascular, desenvolve capilares em resposta a um composto pró angiogênico como bFGF. O bFGF é colocado em um pellet de hydron de liberação gradual próximo a outro pellet contendo a substância teste em área adjacente no mesmo olho (PRL ou S179D-hPRL). A alta sensibilidade desse ensaio in vivo também permitiu a análise de concentrações bem menores de S179D-hPRL e PRL em comparação ao ensaio CAM. Devido ao fato que a PRL não demonstrou nenhuma propriedade detectável sobre a angiogênese in vivo no ensaio CAM e em ensaios preliminares in vitro, a PRL foi empregada como controle para o ensaio com S179D-hPRL uma vez que difere da proteína teste em apenas um aminoácido. Como demonstrado na figura 23, quantidades de apenas 52 ng de S179D-hPRL foram capazes de diminuir a angiogênese induzida por 90 ng de bFGF em 50%. Em termos de concentração molar, a S179D-hPRL era metade da concentração de bFGF empregada no estudo da córnea.



S179D PRL

Figura 23. S179D-hPRL se mostrou um composto anti-angiogênico no ensaio baseado na córnea de ratos com dois pellets de hydron. (A) escassez de formação de novos capilares induzidos por bFGF (90 ng/pellet) em córnea tratada com S179D-hPRL (52,5 ng/pellet). (B) Abundância de novos capilares induzidos por bFGF na córnea tratada com hPRL (52,5 ng/pellet). Setas indicam vasos penetrando na córnea a partir do limbo. P indica a localização dos pellets de hydron implantados. Escala, 250 µm em A e B. (C) A magnitude da angiogênese na córnea induzida por bFGF foi significantemente menor (0,2827 mm²) em córneas tratadas com pellets de hydron contendo S179D-hPRL do que em córneas tratadas com pellets de hydron contendo hPRL (0,5717 mm²) (Teste de Mann-Whitney, P= 0,0147).

PRL

4.3. Ensaio sobre a proliferação celular endotelial

Uma vez que a S179D-hPRL provou ser anti-angiogênica *in vivo*, decidiu-se investigar o mecanismo de ação da S179D-hPRL sobre o processo de angiogênese. Em primeiro lugar verificou-se que isoformas do PRLR estariam sendo expressas em células endoteliais humanas. A figura 24 A mostra os produtos de PCR obtidos com primers desenhados para serem específicos para as duas isoformas curtas (SF1a e SF1b) e para a forma longa do PRLR humano. Os amplicons foram seqüenciados para verificação de suas identidades. A figura 24 B mostra que o mRNA das duas formas curtas, PRLR-SF1a e PRLR-SF1b são traduzidas para as respectivas proteínas, que são reconhecidas pelo anti-PRLR dirigido contra o domínio extracelular do receptor (ECD).



Figura 43. Expressão de PRLR em HUVEC. RT-PCR (A) e imunoprecipitação e Western blotting (B) das isoformas de PRLR. (A) coluna 1 contém um marcador de peso molecular; coluna 2, o produto do PRLR forma longa (200 bp); coluna 3, o produto da isoforma curta PRLR-SF1a (174 bp); coluna 4, o produto da isoforma curta PRLR-SF1a (179 bp). (B) colunas 1 e 2 mostram lisados de células HEK 293 transfectadas com quantidades iguais de vetores de expressão codificando para as isoformas do PRLR-SF1b e PRLR-SF1a respectivamente como controles; coluna 3 mostra o imunoprecipitado do extrato de HUVEC não tratadas. H, cadeia pesada; L, cadeia leve; SF1a, PRLR-SF1a; SF1b, PRLR-SF1b. Os números a direita indicam as massas moleculares estimadas a partir dos marcadores de peso molecular. (C) amplicons de PCR de HMVEc. FLF, amplicon da forma longa do PRLR; DFL, amplicon da isoforma apresentando uma deleção no domínio extracelular da FLF. Células de câncer de próstata humana PC3, controle positivo para expressão da FLF e DLF; EC, célula endotelial.

Nenhuma banda com peso molecular compatível com a forma longa do PRLR foi detectada, mesmo com 1 mg de proteína sendo utilizado para a imunoprecipitação. Experimentos posteriores determinaram que uma proporção significativa dos amplicons que tínhamos identificado como PRLR de forma longa (FLF) eram na verdade isoformas de PRLRs com parte do ECD deletado (DLF). A figura 24 C mostra o resultado de PCRs que indicam a presença de ambas as isoformas: FLF e DLF. Uma variante similar, com a porção S1 do ECD deletada, já foi descrita em uma grande variedade de tecidos (125).

Para determinar o efeito da S179D-hPRL sobre a proliferação de células endoteliais, um ensaio que mede a quantidade de células viáveis foi conduzido em um período de três dias de incubação. Para a sobrevivência de células endoteliais, HUVEC em particular, é necessário o uso de bFGF e heparina para a completa atividade biológica do bFGF, FBS e EGF. O efeito da S179D-hPRL sofreu portanto, a interferência de todos esses fatores pró angiogênicos necessários para o crescimento endotelial. Como pode ser visto na figura 25 A, altas concentrações de S179D-hPRL (500-1000 ng/mL) causaram uma diminuição no número de células viáveis. Na maioria dos ensaios, a resposta foi modesta, em cerca de 25% de inibição da proliferação (como representado em 25 A), podendo chegar a 40%.





Figura 25. Efeitos da S179D-hPRL sobre a proliferação de HUVEC e fragmentação de DNA (conteúdo de DNA). (A) resposta frente a 500 ng/mL (S) e 1

 μ g/mL (S') de S179D-hPRL, 1 μ g/mL PRL (U) ou 0,02 EU/mL de endotoxina (L) (10x a concentração de endotoxina nas preparações de proteína recombinante de *E. coli*). As barras brancas representam proteína recombinante expressa em *E. coli*, e as barras listradas representam a mesma concentração de proteínas expressas em células eucarióticas. O.D. 492, densidade ótica em 492 nm. (B) proteína recombinante de *E. coli* com (barras negras) ou sem polimixina B (barras brancas). (C) análise por citometria de fluxo da fragmentação de DNA (conteúdo de DNA) de células HUVEC tratadas com 0,02 EU/mL de endotoxina (LPS), 1 μ g/mL de S179D-hPRL (S) e controle (C). Legenda:1, sub G₀/G₁; 2, G₀/G₁; 3, G₂/M.

Baixas concentrações de S179D-hPRL não produziram efeito sobre a fragmentação de DNA (conteúdo de DNA), assim como altas concentrações de PRL também foram sem efeito. Essas observações confirmam a especificidade da preparação de S179D-hPRL que difere apenas em um aminoácido da amostra de PRL. Devido ao efeito nocivo da endotoxina sobre as células endoteliais, empregamos controles de endotoxina além da dosagem de LPS na amostras usadas (>0,015 EU/mL ou cerca de 0,00166 EU/µg de proteína recombinante). O controle utilizado empregou concentrações 10 vezes maiores de LPS que as encontradas nas preparações e nenhum efeito foi observado no número de células viáveis (designado "L" na figura 25 A).

Para certificar-se que o efeito observado não era devido ao *folding* incorreto da preparação de S179D-hPRL, realizamos, além do teste de sua atividade biológica *in vitro* (ensaio de indução do gene da β -caseína, figura 21 B), um ensaio controle em paralelo empregando meio condicionado com a mesma concentração de S179D-hPRL, expressa em sistema de expressão eucariótico (HEK 293) (barras listradas na figura 25 A). Proteínas sintetizadas em eucariotos possuem o *folding* correto devido ao fato que sistema de expressão eucarióticos possuem uma variedade de sistemas de verificação e eliminação de proteínas com *folding* aberrante (131). Um outro controle empregado para verificar a contaminação de endotoxina foi o uso de amostras de PRL e S179D-hPRL tratadas com polimixina-B (10 µg/mL). A polimixina-B possui a propriedade de se ligar e inativar LPS bacteriano. Esse pré tratamento também não afetou a atividade da S179D-hPRL (figura 25 B). pode-se concluir portanto, que apesar das altas concentrações de

S179D-hPRL (1 µg/mL) necessárias para se inibir a proliferação endotelial nas condições usadas, o efeito observado é de fato específico.

Análise da fragmentação de DNA ao fim de um tratamento de três dias com S179D-hPRL resultou em um aumento de oito vezes na porcentagem de células em processo de apoptose (população sub G_0/G_1) (figura 24 C). Portanto a morte celular programada induzida por S179D-hPRL contribuiu para um menor número de células viáveis. Mais uma vez o controle de endotoxina não apresentou nenhum efeito sobre a indução de apoptose (fragmentação de DNA).

4.4. Efeitos sobre a migração celular

As células endoteliais necessitam migrar através da matriz extracelular para formar novos capilares com base nesse fato, testamos a habilidade da S179DhPRL de interferir no processo de migração celular. Novos capilares são formados principalmente a partir da microvasculatura, dessa forma as HUVEC não seriam muito apropriadas como modelo para o estudo de migração, uma vez que são de origem macrovascular. Dessa forma utilizamos células de origem microvascular HMVEc para essa parte do estudo. Quando HMVEcs foram semeadas dentro do anel de clonagem e posteriormente incubadas para avaliação da migração radial a partir da monocamada circular formada pelas células no anel, S179D-hPRL reduziu a distância percorrida pelas células em 40% (figura 26 A e B). Levando-se em conta que a migração celular poderia ter sido afetada pela proliferação celular ao longo dos três dias do experimento, realizou-se um ensaio de quimiotaxia, onde a migração é avaliada a curto prazo e portanto livre de interferência do número de células viáveis. Nesse ensaio a S179D-hPRL reduziu a migração em direção a um gradiente de bFGF em mais de 60% (figura 27 A e B).

Outra forma de se estudar a migração é o ensaio *in vitro* de formação de túbulos em Matrigel. Células semeadas aleatoriamente digerem a matriz extracelular ao seu redor e formam estruturas tubulares em Matrigel. A S179DhPRL foi capaz de inibir esse processo de formação e arranjo de túbulos de HUVECs semeadas em Matrigel (figura 28).



Figura 26. Efeito da S179D-hPRL sobre a migração celular de HMVEc no ensaio do anel de clonagem. (A) fotos representativas do experimento; linhas negras e circulares e setas brancas indicam bordas da monocamada de HMVEcs no início do ensaio. Barra branca, 20 μ m. (B) gráfico demonstrando a quantificação dos valores de migração em μ m. Controle negativo, sem adição de bFGF; FGF, bFGF. * indica *P*<0,05 com relação ao controle positivo de bFGF.



Figura 27. Ensaio de quimiotaxia de curto prazo (4 horas). (A) fotos representativas mostrando os filtros com a HMVEcs que migraram em direção ao gradiente de bFGF na câmara superior do inserto. (B) Quantificação das HMEVcs nos filtros ao final do ensaio, utilizou-se as médias de 10 campos microscópicos.

Controle negativo, sem adição de bFGF. * indica *P*<0,05 com relação ao controle positivo.



Figura 28. Ensaio de formação de túbulos em Matrigel. Experimento empregado para verificar a habilidade da S179D-hPRL de interferir nos processos de migração, digestão da matriz extracelular e quimiotaxia entre HUVECs, em Matrigel.

Em todos os experimentos, empregamos células endoteliais primárias (HUVEC e HMVEc), até a passagem cinco, mas era desejável usar células endoteliais nunca antes cultivadas. Para isso, empregamos um modelo *ex vivo* denominado de ensaio de angiogênese do anel de aorta, onde secções de uma aorta de rato são colocadas em Matrigel, e células endoteliais crescem a partir das paredes do anel de aorta original. O crescimento pode ser avaliado por ensaio colorimétrico empregando MTS e pode ser visualizado com o reagente MTS. Os resultados da figura 29 A e B indicam uma diminuição de 50% no número de células quando se utiliza S179D-hPRL como tratamento.

PRL





Figura 29. Ensaio de angiogênese do anel de aorta (*ex vivo*). (A) A atividade anti angiogênica da S179D-hPRL avaliada pelo ensaio do anel de aorta. As culturas foram tratadas com PRL, S179D-hPRL e não tratadas (C) por 8-10 dias. A atividade anti-angiogênica foi estimada aplicando o ensaio colorimétrico MTS/PMS nas culturas de anéis. (B) A formação de ramificações de células endoteliais (e células associadas) foi visualizada mediante coloração com MTT.

Pelos ensaios de angiogênese realizados *in vitro*, pode-se afirmar que a S179D-hPRL afeta claramente tanto o número de células viáveis, como também a capacidade migratória das células endoteliais que crescem a partir da macrovasculatura e microvasculatura.

85

A

4.5. Efeito da S179D-hPRL sobre a expressão gênica de HUVEC

Para determinar de que forma PRL e S179D-hPRL exercem diferentes efeitos sobre as células endoteliais, estudamos a expressão de PRLR em uma variedade de moléculas angioativas. Como demonstrado na figura 30 A, os resultados obtidos com RT-PCR semi-quantitativo mostra que PRL e S179D-hPRL possuem efeitos diferentes sobre certos genes relacionados á angiogênese (29,70,162,270,275). Nessa fase do estudo, a hPRL aumentou a expressão de PRL endógena e heme-oxigenase-1 (HO-1), mas além desses genes, a hPRL não afetou a expressão dos outros genes estudados. Isso pode ser mais bem visualizado na figura 30 B, onde os resultados de "real time" RT-PCR são mostrados para 8 dos 17 mRNAs mais afetados pelo tratamento. hPRL aumentou a expressão de HO-1 em HUVEC.





Figura 30. Análise da expressão gênica em HUVEC tratadas com S179D-hPRL e PRL. (A) RT-PCR semi-quantitativo de HUVEC tratadas com PRL (P), S179D-

87

В

hPRL (S) ou sem tratamento(C); TSP, trombospondina. Todas as outras abreviações são abreviações padrão. (B) "Real time" RT-PCR (RT-PCR em tempo real) da expressão de PRL, HO-1, bFGF, VEGF, PRLR-SF1a e PRLR-SF1b onde a expressão gênica foi normalizada contra o controle endógeno de β -actina como referencia. * indica *P* <0,05 versus controle.

Ao contrário da hPRL que aumentou de ~3 vezes, a S179D-hPRL diminui a expressão de hPRL endógena em ~50% e a expressão de HO-1 (em cerca de 25%), não teve efeito detectável sobre a expressão da forma longa do PRLR (que inclui tanto a forma longa como a forma com deleção) e aumentou (em cerca de 50%) a expressão das duas formas curtas do PRLR (PRLR-SF1a e PRLR-SF1b). A S179D-hPRL também diminuiu a expressão de bFGF (em 75%) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF; em cerca de 50%), sem efeito significativos na expressão de seus respectivos receptores. Trombospondina, angiogenina, angiopoietinas 1 e 2, e fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) não foram afetados pelo tratamento por S179D-hPRL. Trombospondina e CTGF foram incluídos no estudo porque a expressão destes dois genes além de estar envolvida no processo angiogênico, também foi afetado em células da glândula mamária de ratos tratados com S179D-hPRL (178).

4.6. Efeito da S179D-hPRL sobre a secreção de fatores relacionados á angiogênese

O meio condicionado de HUVEC tratadas com S179D-hPRL foi analisado por meio de um *protein array* (arranjo de anticorpos contra diferentes proteínas) para se avaliar se os efeitos observados em nível de mRNA foram traduzidos em proteínas secretadas para o meio de cultura. Usou-se o meio condicionado de 24 horas de tratamento para evitar a interferência de liberação não específica de fatores devido à morte programada e posterior lise celular. A figura 31 A mostra o resultado obtido no "protein array" com os respectivos genes alterados quantificado no painel C (figura 31 C).





А

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	POS	POS	NEG	NEG	Ang	EGF	EAN- 78	bFGF
в	POS	POS	NEG	NEG	Ang	EGF	EAN- 78	bFGF
u	GRO	IFN- 7	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTI N	MCP-1	PDGF- BB
D	GRO	IFN- 7	IGF-I	IL-6	IL-8	LEPTI N	MCP-1	PDGF-BB
m	PIGF	RANT ES	TGF- p1	TIMP. 1	TIMP- 2	TPO	VEGF	VEGF-D
F	PIGF	RANT ES	TGF- β1	TIMP- 1	TIMP- 2	TPO	VEGF	VEGF-D
G	x	x	x	x	x	x	NEG	POS
н	x	x	x	x	x	x	NEG	POS

С

в



Figura 31. Estudo dos fatores relacionado á angiogênese liberados no meio de cultura de HUVEC tratadas com S179D-hPRL (avaliação por "protein array"). (A) Fatores relacionados a angiogênese detectados por arranjo de anticorpos no **90**

meio condicionado de HUVEC tratadas com S179D-hPRL ou no controle (HUVEC não tratadas) por 24 horas. (B) Painel do arranjo de proteínas; Ang, angiogenina, TPO, trombopoietina; PIGF, fator de crescimento placentário; RANTES, "regulated and activated normal T cells excreted and secreted protein"; TIMP, inibidor tecidual de metaloproteinase; ENA-78, proteína quimiotática de células epiteliais derivada de neutrofilos; MCP, proteína quimiotática de monócitos séricos; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; GRO, "growth regulated oncogene"; X, branco; NEG, controle negativo; POS, controle positivo; outras abreviações usadas são abreviações padrão. (C) Quantificação densitométrica das proteínas avaliadas nos arranjos. *P < 0,05; # P < 0,01 versus controle.

Na figura 31 C pode-se observar que a S179D-hPRL diminui a secreção de angiogenina, EGF e bFGF. O efeito observado para EGF e bFGF pode ter sido mais pronunciado uma vez que ambos são necessários em baixas concentrações quando se emprega-se meio de cultura sem FBS. S179D-hPRL afetou também uma série de outras proteínas angiogênicas secretadas, diminuindo a probabilidade de que estas interajam com seus respectivos receptores, interferindo nos próprios efeitos autócrinos.

Dos outros compostos angioativos examinados no meio condicionado, três deles tiveram sua secreção elevada no tratamento com S179D-hPRL: inibidores teciduais de metaloproteinase 1 e 2 e, inesperadamente, VEGF.

4.7. Efeito da S179D-hPRL sobre a apoptose e ciclo celular de células endoteliais

Nos testes preliminares *in vitro* demonstramos que S179D-hPRL foi capaz de induzir fragmentação de DNA em HUVEC (figura 25 C), uma das características da apoptose (106,118). Para melhor investigar a via de apoptose ativada pela S179D-hPRL em células endoteliais, decidiu-se estudar duas das principais vias de apoptose: a via extrínseca (receptor da morte) e a via intrínseca (mitocondrial) (106,118). Os primeiros estudos empregaram altas doses de S179D-hPRL (1 µg/mL) comparando-se os resultados com as mesmas concentrações de PRL. Decidimos realizar estudos mais detalhados empregando uma curva de dose-resposta avaliando também o efeito em diferentes tempos de tratamento com S179D-hPRL. Mais umas vezes controles de LPS foram

empregadas devido à sensibilidade das HUVEC frente à endotoxina bacteriana (LPS). Como tanto a via intrínseca e a via extrínseca convergem na ativação da caspase-3 e clivagem do DFF45 (ICAD, "inhibitor of caspase activated DNAse"), foi estudado o efeito da S179D-hPRL sobre esse inibidor em lisados totais de HUVEC. Como pode ser visto na figura 32 A, o tratamento de S179D-hPRL afetou a clivagem caspase-dependente do DFF45 de uma forma dose dependente. Podese observar que nesse ponto de convergência das duas vias de sinalização da apoptose uma resposta pode ser vista com 100 ng/mL (figura 32 A). Ao olharmos para marcadores das vias do receptor da morte e mitocondrial podemos observar que houve uma diminuição da procasapase-8 (indicativo de formação de caspase-8 ativa) e a liberação de citocromo C mitocondrial com relação dose resposta, frente ao tratamento com S179D-hPRL (figura 32 B e C), sendo que o tratamento com PRL não produziu efeitos detectáveis sobre esses mercadores de morte programada celular. A formação de caspase-8, assim com o DFF45, é aparente a partir da concentração de 100 ng/mL de S179D-hPRL (figura 32 B), entretanto, é necessária uma concentração de 500 ng/ML para que citocromo C seja detectado nos lisados citosólicos (figura 32 C). A regulação do ciclo celular via p21 e p53 geralmente precede o evento de apoptose. A quantidade de p21 nos lisados totais dobra em 24 horas (figura 33 A) enquanto que os níveis de p53 não apresentam mudança visível nesse intervalo de tempo (dados não apresentados). Após 72 horas de tratamento os níveis de p53 se elevam em resposta a S179D-hPRL em cerca de 100% (figura 33 B). Os dois reguladores de ciclo celular (p21 e p53) também apresentaram uma elevação dependente da concentração do antagonista. Análise do p21 demonstrou que 100 ng/mL foram suficientes para uma mudança detectável, enquanto que nenhuma mudança foi observada até doses de 500 ng/mL para p53 (figura 33 A e B). Empregando-se um ensaio para verificar se a ativação destes reguladores está sendo também realizada em nível de transcrição (ensaio de transativação de gene repórter) pudemos constatar que o tratamento com S179D-hPRL ativou o promotor de p21 e de Bax, um dos principais alvos de p53 na indução da apoptose (12) e responsável pelos efeitos de p53 ativado. Ambos os promotores também foram ativados de acordo com

uma relação dose-resposta. Nesse ensaio a atividade do promotor do p21 foi máxima com 50 ng/mL, enquanto que para o promotor do p53 foi necessário uma maior concentração de S179D-hPRL (500 ng/mL) que teve sua atividade ainda aumentada quando doses maiores foram empregadas (1000 ng/mL) (figura 34).



Figura 32. Análise da relação dose-resposta de marcadores de apoptose. HUVEC foram tratadas com diferentes concentrações de S179D-hPRL por 24 horas como indicado, em meio sem FBS. Western blots: (A) DFF45; (B) Porcaspase-8; (C) Citocromo C. Os dados são o resultado da média de três experimento independentes. Gráficos de barras representam a média±desvio padrão da densimetria das bandas obtidas de pelo menos três experimentos independentes. *indica *P* < 0,05 *vs*. controle (0 ng/mL de S179D-hPRL).



Figura 33. Análise da relação dose-resposta de reguladores do ciclo celular. HUVEC foram tratadas com diferentes concentrações de S179D-hPRL. Western blots: (A) p21 (24 hs em meio sem soro); (B) p53 (72 hs em meio sem soro). Os experimentos são o resultado da média de três experimentos independentes. Gráficos de barras representam a média±desvio padrão da densitometria das bandas obtidas em pelo menos três experimentos independentes. *indica P < 0,05*vs.* controle (0 ng/mL de S179D-hPRL).

Os próximos ensaios foram conduzidos para se obter outras formas de avaliar a apoptose das HUVEC tratadas com S179D-hPRL, analizando uma relação dose resposta desse antagonista. A figura 35 mostra a análise da quantidade de DNA por FACs. As figuras 35 A-H, mostra a varredura das células tratadas com diferentes concentrações de S179D-hPRL (0-1000 ng/mL). A porcentagem de células com quantidades de DNA sub G₁ após três dias de tratamento estão indicadas como pico "A" de apoptose e os valores numéricos da varredura são apresentados nos painéis. Como pode ser visto, o tratamento resultou em uma aumento significante de fragmentação de DNA, na concentração de 25 ng/mL (figura 35 I) enquanto que o controle de endotoxina (LPS) não apresentes nas preparações empregadas.



Figura 34. Análise da relação dose-resposta da atividade dos promotores de reguladores do ciclo celular (p21 e p53). HUVEC foram tratadas com diferentes concentrações de S179D-hPRL por 12 e 24 horas como indicado em meio sem FBS. Ensaios da atividade do promotor: (A) p21; (B) Bax. Os dados são o resultado da média de três experimentos independentes. Gráficos de barras representam a média±desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. *indica *P* < 0,05 *vs*. Controle (0 ng/mL de S179D-hPRL).



Figura 35. Efeito da concentração de S179D-hPRL na fragmentação de DNA em HUVEC. (A-H) Células foram cultivadas em meio de crescimento por 3 dias com diferentes concentrações de S179D- hPRL realizando seguida em

LPS 1002EU

500

,00 250

S179D PRL Concentração (ng/mL)

0

0 0 సా ŝ visualização com iodeto de propídeo (PI) e citometria de fluxo. Eventos abaixo do valor de escala 100 do canal FL2 foram considerados como apoptose decorrente de fragmentação de DNA. A, indica as porcentagens nos histogramas representam a proporção de células em processo de apoptose. (I) Células em apoptose (sub G₁) após tratamento com diferentes concentrações de S179D-hPRL ou 0,02 EU/mL LPS. Os dados são o resultado da média de quatro experimentos independentes. O gráfico de barras representa a média±desvio padrão de pelo menos quatro experimentos independentes. * indica P < 0,05 versus controle (0 ng/mL de S179D-hPRL).

Uma segunda avaliação da apoptose foi a análise da externalização de fosfatidilserina e a visualização com anexina-V-FITC. A co-visualização com PI é empregada como medida de viabilidade celular. Dessa forma células anexina V-FITC positivas e PI negativas foram consideradas como em processo inicial de apoptose e células anexina V e PI positivas como células em processo avançado de apoptose. Como apresentado na figura 36 (painéis A-F), o quadrante inferior direito representa a população em estágio inicial de apoptose, e o quadrante superior direito, a população em estágio avançado de apoptose. Na figura 36 B podemos constatar que 50 ng/mL de S179D-hPRL quadruplicou o número de células em estágio inicial de apoptose. Na concentração de 100 ng/mL, a população de células em fase incial apoptotica cresceu 10 vezes, e as em fase avançada de apoptose dobraram de número. Os níveis de apoptose atingiram um máximo nas concentrações de 500 ng/mL de S179D-hPRL.



Figura 36. Dupla visualização com PI/Anexina V de HUVEC tratadas com diferentes concentrações de S179D-hPRL com visualização dupla por PI/Anexina-V-FITC e analisadas por citometria de fluxo. (A-F) Gráficos dot blots representando células em estágio inicial de apoptose, quadrante inferior direito quadrante 99 (FITC+/PI-) e células em estágio avançado de apoptose,

superior direito (FITC+/PI+). Números nos quadrantes indicam a percentagem de células em apoptose (FITC+ e FITC+/PI-). (C) Gráfico de barras representam a média±desvio padrão de pelo menos quatro experimentos independentes. * indica P < 0.05 vs. controle (0 ng/mL de S179D-hPRL).

4.8. Efeitos da S179D-hPRL sobre a sinalização pela via da MAPkinase

Estudos em outros sistemas com a S179D-hPRL demonsotraram que este antagonista age de forma preferencial pela via da ERK 1/2 (213,263). Este fato é compartilhado pelo fator de crescimento de fibroblastos básico, que também age preferencialmente por esta via em células endoteliais, sendo porém um importante fator anti apoptótico (141). Em trabalho recente, este grupo demonstrou que S179D-hPRL bloqueou a ativação inicial da ERK 1/2 em resposta a bFGF, enquanto provocou uma ativação tardia e sustentada da ERK 1/2 (238). Essa observação foi confirmada e melhor estudada no presente trabalho. A figura 37 mostra o bloqueio da sinalização incicial do bFGF pela S179D-hPRL, com uma ativação sustentada e tardia da ERK de 40 a 140 minutos após o início do ensaio. Mais importante foi a especificidade dessa ativação que foi demonstrada pelo cotratamento com o inibidor específico da MAPkinase, PD 98059, que anulou o efeito da S179D-hPRL sobre a fosforilação de ERK.




Figura 37. Sinalização via ERK iniciada por bFGF na ausência e presença de S179D-hPRL. HUVEC confluentes foram deixadas em meio sem FBS e bFGF por 16 horas e depois tratadas com bFGF (25 ng/mL), bFGF com S179D-hPRL (1 μ g/mL) ou bFGF, S179D-hPRL e o inibidor específico da MPKinase PD 98059 (10 μ M) pelos tempos indicados antes da lise. Cada blot representa o representa o resultado típico observado de um mínimo de três experimentos independentes. Histogramas representam as respectivas densitometrias das bandas obtidas nos blots. * indica um valor de P < 0,05 vs. controle (tempo 0').

Devido ao fato de bFGF ser um componente essencial para as células endoteliais, necessário para a sobrevivência celular *in vitro*, a análise do papel da via de sinalização ERK, na iniciação da apoptose em resposta á S179D-hPRL, foi complicada pelo bloqueio desta via. Testes em diferentes tempos de incubação, entretanto, permitiram que pudéssemos realizar um ensaio de até dois dias sem uma interferência por apoptose por "negligência" (ex. falta de fator de crescimento). A figura 38 demonstra que, nesse intervalo de tempo de incubação, PD 98059 não aumenta a percentagem de células com quantidades de DNA sub G₁, enquanto que S179D-hPRL quadruplica essa quantidade. O co tratamento

com PD 98059 e S179D-hPRL mostra portanto que o inibidor bloqueia esse efeito apoptótico do antagonista. Alem da indução de apoptose, pode-se notar também que a S179D-hPRL influi no ciclo celular: o pico G_1 aumenta ~63% para ~80% quando S179D-hPRL é usada, enquanto que o pico G_2 cai de ~34% para ~16% no grupo tratado com o antagonista. Infelizmente o papel de ERK nesse fenômeno não pode ser analisado, uma vez que nesse intervalo de incubação, os efeitos do PD 98059 sobre a sinalização do bFGF já afetavam as fases G_1 e G_2 do ciclo celular das HUVEC.

Uma análise similar realizada sobre os efeitos do PD 98059 na sinalização apoptotica é apresentada na figura 39. Nesse ensaio, em que foi usado um menor tempo de incubação com a S179D-hPRL relativamente ao experimento da figura 36, o antagonista aumentou o número de células em apoptose inicial em cerca de três vezes quando comparado com o grupo controle. O efeito sobre o numero de células em fase avançada de apoptose foi completamente bloqueado pelo PD 98059, enquanto que foi quase completamente bloqueado por esse inibidor também o efeito sobre a população em estágio inicial de apoptose.



Figura 38. PD 98059 bloqueia a indução da fragmentação de DNA causada por S179D-hPRL. Células HUVEC foram cultivadas em meio de crescimento por dois dias com os vários tratamentos como indicados, realizando em seguida visualização por PI e citometria de fluxo. Eventos abaixo do valor de escala 100 do canal FL2 foram considerados como apoptose decorrente de fragmentação de DNA. A, As porcentagens indicadas nos histogramas representam a proporção de células em processo de apoptose; G1-0, células nas fase G_1/G_0 ; G-2, células nas

fases G₂/M. Os dados são o resultado da média de quatro experimentos independentes.



Figura 39. Redução na população de células apoptóticas no co-tratamento com S179D-hPRL e PD 98059. Dupla visualização com PI/Anexina V-FITC de células HUVEC tratadas com diferentes concentrações de S179D-hPRL e analisadas por citometria de fluxo. (A-E) Gráficos "dot blots" representando células em estágio inicial de apoptose, quadrante inferior direito (FITC+/PI-) e células em estágio avançado de apoptose, quadrante superior direito (FITC+/PI-). Os números nos quadrantes indicam a média da percentagem de células em apoptose ± desvio padrão.

A análise do papel da sinalização via ERK na produção de altos níveis de p21 e p53 mostrou que o PD 98059 bloqueou o efeito indutor da S179D-

hPRL sobre p21, mas não sobre os níveis de p53 (figura 40). A clivagem da DNAse DFF45 também foi inibida por PD 98059. Análise da ativação do promotor de p21 em resposta a bFGF ou S179D-hPRL mostrou que o bFGF não exerceu qualquer efeito e que PD 98059 bloqueou a capacidade da S179D-hPRL de ativar esse promotor. O efeito do inibidor da MAPKinase foi reproduzido na expressão de uma forma mutante dominante negativa de ERK (figura 41).



Figura 40. Análise de marcadores de apoptose e de reguladores de ciclo celular em resposta ao co tratamento com PD 98059 e S179D-hPRL. HUVEC foram tratadas por 24 horas como indicado, em meio sem FBS. Western blots: (A) p21; (B) p53; (C) DFF45. Os experimentos são o resultado da média de três experimentos independentes. Gráficos de barras representam a média±desvio padrão da densimetria das bandas obtidas de pelo menos três experimentos independentes. *indica *P* < 0,05 *versus* controle (0 ng/mL de S179D-hPRL).

Atividade do promotor de p21



Figura 41. Atividade do promotor da proteína reguladora de ciclo celular. Ensaio de transativação de gene repórter. HUVEC em crescimento exponencial foram transientemente co-trasnfectadas com pSV– β -galactosidase/ppluc-21 ou pSV– β -galactosidase/pERK-DN (ERK mutante dominante negativo), e após o período de recuperação foram tratadas/co-tratadas como indicado. Os dados refletem a média de três experimentos indenpendentes. Gráfico de barras representa as médias±desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. * indica um valor de *P* < 0,05 *versus* co-tratamento com PD 98059 e S179D-hPRL. ERK-, ERK dominante negativo.

5.0. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi demonstrado pela primeira vez que o análogo/antagonista S179D-hPRL pode ser um potente composto anti-angiogênico, sua atividade sendo melhor demonstrada pelo ensaio de angiogênese na córnea de rato. A S179D-hPRL demonstrou-se também efetiva quando testada em modelos *in vitro* empregando células da macrovasculatura e microvasculatura, e em modelos *in vivo* na formação de capilares em células endoteliais de galinha (ensaio CAM). Os experimentos *in vitro* demonstraram um efeito sobre a proliferação celular (número

de células viáveis) e sobre a capacidade de migração celular e formação de túbulos em Matrigel. O antagonista também foi capaz de interferir com a habilidade das células endoteliais de migrar em direção a um agente quimiotático (bFGF) em um curto intervalo de tempo (4 horas), não apresentando este ensaio interferência por parte da S179D-hPRL sobre a viabilidade celular, por causa do curto período de ensaio. Com base nesses dados, pode-se afirmar que a S179D-hPRL possui dois efeitos diretos e distintos sobre as células endoteliais: uma redução no número de células endoteliais viáveis (efeito sobre a proliferação celular) e uma interferência na capacidade migratória destas mesmas células. A redução no número de células viáveis após uma incubação de três dias com o antagonista teve uma boa correlação com o número de células contendo quantidades de DNA sub G₀/G₁ (apresentando fragmentação de DNA). Baseando-se nessa observação pode-se especular que o efeito sobre a viabilidade das células endoteliais da S179D-hPRL se deve em grande parte à sua capacidade de promover a apoptose.

A indução da morte celular programada pode ser deflagrada pela remoção de fatores de crescimento (apoptose por "negligência"), e demonstramos que S179D-hPRL de fato reduziu a expressão de quatro fatores pró angiogênicos importantes: angiogenina, EGF, bFGF e VEGF. Nos tempos de tratamento utilizados, VEGF foi reduzido apenas em nível de mRNA e a angiogenina diminuiu apenas em nível de proteína. Alguns dos efeitos sobre VEGF foram inesperados. Em primeiro lugar, embora o mRNA do VEGF fosse reduzido em três dias de tratamento, a quantidade de proteínas foi elevada em 24 horas de incubação com S179D-hPRL. A diminuição dos níveis de angiogenina sugere que sua liberação foi não específica, ou poderia ser uma resposta incial de stress celular à apoptose. Sempre se espera porém que menores níveis de mRNA, levem a uma menor quantidade da respectiva proteína. Em segundo lugar, observou-se que preparações de PRL heterogênea elevavam os níveis de mRNA de VEGF em outros tipos celulares (93,109), enquanto não foi observado efeito algum com hPRL ou uma diminuição desses níveis com S179D-hPRL. Essa discrepância pode estar relacionada com o tipo celular estudado e, portanto com os

107

tipos de PRLR presentes nas células do modelo empregado. A maioria das células expressa principalmente a forma longa do PRLR; em nosso estudo, porém observamos que a maior proporção do que detectamos como sendo a forma longa do receptor, era na verdade uma isoforma onde parte do domínio extracelular (ECD) é deletada, portanto com sua capacidade de interagir com o ligante (ex. hPRL ou S179D-hPRL) diminuída. As duas formas predominantes que puderam ser reconhecidas com um anticorpo contra a porção extracelular do PRLR foram as duas isoformas curtas do PRLR SF1a e SF1b. Uma vez que não observamos efeitos sobre a expressão da forma longa do receptor em resposta as duas PRLs e que parte dessa população de PRLR são isoformas com o ECD deletado (portanto pouco provável de se ligar a ambas as PRLs estudadas), é bem provável que a sinalização em células endoteliais humanas seja conduzida via as duas isoformas curtas do PRLR.

Embora a S179D-hPRL tenha reduzido nas HUVEC os níveis de bFGF, EGF, VEGF e angiogenina – e portanto, reduzindo o efeito autócrino desses fatores- os efeitos sobre a proliferação celular tenham ocorrido em presença de bFGF e EGF (uma vez que estes fatores de crescimento são componentes essenciais do meio de cultura endotelial), não ficou claro o mecanismo inibidor da S179D-hPRL sobre a atividade de bFGF. Já no ensaio de angiogênese da córnea, o efeito anti-angiogênico do antagonista claramente bloqueia a angiogênese induzida pelo bFGF e não apenas sua produção, como de fato ocorreu no ensaio in vitro. Esse efeito evidentemente não ocorreu via receptor de bFGF, uma vez que nenhuma alteração ocorreu em sua expressão, pelo menos nos seus níveis de mRNA. Sendo que foi descrito que a PRL humana se liga a heparina (123), e uma hipótese levantada foi que a S179D-hPRL poderia competir com bFGF (que necessita de heparina para sua atividade completa) pela heparina presente. No entanto quando incubamos S179D-hPRL com heparina, sua atividade anti angiogênica não se alterou (dados não apresentados) e, portanto essa teoria foi excluída.

S179DS PRL também diminuiu a expressão de PRL endógena, mas nossos dados até o presente momento são inconclusivos sobre o papel estimulante

autócrino da PRL em células endoteliais, uma vez que não foi possível demonstrar em nossos ensaios um efeito pró angiogênico da PRL em modelos in vivo e experimentos in vitro. Esses resultados estão de acordo com as observações descritas na literatura onde empregando-se as mesmas doses de PRL não resultou em efeitos visíveis sobre a proliferação de HUVEC ou no ensaio CAM utilizando neste último cerca de 5 vezes a dose que empregamos em nosso trabalho (43). Em outro estudo, PRL também não exerceu qualquer efeito angiogênico sobre células endoteliais bovinas, mas obteve uma resposta angiogênica in vivo no ensaio CAM em um estágio mais maduro que o empregando em nosso estudo, alem de ter utilizado doses 20 maiores que as usadas em nosso modelo CAM (224). O único resultado que pode revelar um possível papel pro angiogênico da PRL é seu efeito sobre a heme oxigenase-1. Essa enzima está relacionada com uma função protetora contra a apoptose (186) e por isso, mesmo que a PRL não seja capaz de estimular a proliferação celular nas doses e no sistema empregado: talvez possa proteger as células endoteliais contra a morte programada, sendo assim uma componente angiogênica em algumas circunstâncias. De acordo com essa idéia existem relatos dos efeitos anti-apoptóticos da PRL em outras células (127,196) e do efeito apoptótico da S179D-hPRL em outros tipos celulares (268).

Demonstrou-se que células endoteliais bovinas expressam a forma longa do PRLR (168), mas os "primers" utilizados neste experimento não podiam distinguir a forma normal (FLF) da forma com ECD deletado (DLF). É possível que células endoteliais bovinas ou outras células endoteliais também expressem isoformas com ECD deletado. A indução da expressão das isoformas curtas do PRLR pelo tratamento com S179D-hPRL sugere que essas variantes do PRLR possom exercer um papel importante na resposta anti angiogênica. Essas formas curtas são produzidas por "splicing" diferencial do mesmo transcrito da forma longa (LFL) (110,236) e a sinalização via essas isoformas tem sido observada em outros tipos celulares (262). Assim como em nosso estudo, a sinalização via isoformas curtas do PRLR resultou em uma ativação de longo prazo da ERK em outras células (262). Ao mesmo tempo a ativação de curto prazo deflagrada por

109

bFGF foi inibida. Esse resultado enfatiza a complexidade da natureza da sinalização celular e a importância de ensaios que levem em conta o tempo de tratamento em resposta aos ligantes que estão sendo estudados.

Nos ensaios *in vitro* de formação de túbulos em Matrigel, *ex vivo* do anel de aorta de ratos e nos modelos *in vivo* de angiogênese, a formação de novos capilares seria diminuída pelo aumento da expressão dos chamados inibidores de metaloproteinases (TIMPs), como foi observado nos tratamentos com o antagonista, uma vez que ao TIMPs são essenciais para migração através da matriz extracelular e para o crescimentos de ramificações a partir de vasos, *in vitro* e *in vivo* (42).

O desenvolvimento de vasos sanguíneos in vivo envolve a migração inicial das células endoteliais e dos periócitos, em resposta ao estímulo angiogênico, seguida por uma remodelação das redes microvasculares. Durante o processo de ramificação neovascular, uma comunicação extensiva ocorre entre periócitos e células endoteliais (11,16,73,79,105,151,193,197). Dessa forma, a S179D-hPRL deve possuir um efeito, direto ou indireto, sobre periócitos ou outros tipos celulares envolvidos na formação de novos vasos sanguineos. Com base nessa suposição, os resultados obtidos no ensaio CAM mostram que o antagonista não apenas bloqueou a formação inicial de capilares, mas também aparentemente limitou o desenvolvimento dos vasos já presentes na membrana. Embora a S179D-hPRL tenha se mostrado potente nos modelos in vivo, a sua atividade em ensaios in *vitro* com HUVEC e HMVEc requeriu maiores concentrações que as necessários in vivo. Isso em parte reflete a necessidade de um efeito marcante e rápido que possa ser detectado em um período de três dias, in vitro. Isso talvez também seja devido ao fato que existam diferenças importantes entre os microambientes in vitro e in vivo. Além disso, esses fatos podem sugerir que exista um mecanismo de ação indireto sobre tipos celulares não endoteliais, não presentes in vitro (ex. periócitos) que estejam sofrendo ação da S179D-hPRL.

Uma isoforma clivada e reduzida da PRL, a denominada 16K PRL, foi descrita como sendo anti angiogênica (46) e também aparentemente bloqueia a sinalização iniciada por bFGF (224). S179D-hPRL se mostrou mais potente

do que a 16K PRL em modelos *in vivo*. O antagonista se mostrou mais eficaz, requerindo metade da concentração molar do que bFGF no ensaio de angiogênese na córnea, enquanto que a forma clivada, em ensaio similar, necessitou de um excesso de 8 vezes a quantidade de bFGF (69). Em contraste, a 16K PRL possui uma maior atividade anti angiogênica *in vitro* (43,46), talvez sugerindo que essa forma clivada da PRL tenha um efeito mais direto sobre as células endoteliais. Outros membros da família da PRL também foram descritos como composto angioativos, exercendo papéis na iniciação e terminação da neovascularização placentária (115), ou em processos patológicos como a retinopatia diabética (81).

A partir dos experimentos realizados, ficou claro que parte dos efeitos da S179D-hPRL se deve á sua capacidade de promover apoptose em células endoteliais, sendo que os efeitos do antagonista puderam ser vistos em 24 horas como concentrações de S179D-hPRL entre 25 a 100 ng/mL, dependendo da sensibilidade do ensaio empregado. Esses efeitos pró-apoptóticos foram observados mesmo na presença de bFGF no meio de cultura. Dessa forma a S179D-hPRL não apenas é um indutor da apoptose como também anula os efeitos anti apoptóticos do bFGF.

As análises dose resposta demonstraram que para ativar a via de apoptose extrínseca necessitou-se de concentrações cinco vezes menores que as necessárias para ativação da via mitocondrial. Uma vez que baixas concentrações de antagonistas foram suficientes para detectar um efeito no ponto de convergência das duas vias apoptóticas, podemos sugerir que a via de apoptose extrinsica (receptor da morte) é a mais importante para mediação da morte celular programada induzida por S179D-hPRL. Em concentrações maiores, a S179D-hPRL estaria hiperativando a cascata extrinsica, o que poderia causar a co-ativação da via intrinsica (mitocondrial) via clivagem da proteína Bid pela caspase-8 e posterior liberação de citocromo C para o citosol (118). Embora níveis elevados de p53 também possam ativar a via mitocondrial e liberação de citocromo C, é improvável que o citocromo C observado no tratamento de 24 horas seja p53 dependente, uma vez que os níveis de p53 só se elevaram

111

após 72 horas de incubação com o antagonista. O efeito sobre a proteína reguladora de ciclo celular p21 foi observado com baixas concentrações de S179D-hPRL ocorrendo via ERK e, portanto seria considerado extrinsico. A análise de outras vias de sinalização, incluindo Akt e JNK não revelou qualquer efeito detectável da PRL ou do seu antagonista (dados não apresentados). A fosforilação de ERK, entretanto, não estava envolvida com o efeito da S179D-hPRL sobre a regulação do p53 ou ativação do promotor do Bax. Esse fato confirma o fato que a elevação de p21 não é uma conseqüência da ativação da via do p53. A indução da expressão do p53, provavelmente, está ligada á eventos mais tardios do processo apoptótico como dano do DNA (fragmentação de DNA) que induz o aumento dos níveis de p53 ativo (106), que podem também contribuir para a liberação de citocromo C mitocondrial e amplificação da via intrinsica. Outros compostos anti-angiogênicos também causam a indução da expressão de p21 e p53 (188,269) e também ativam ambas as vias de sinalização apoptóticas (33,38).

bFGF é um fator anti-apoptótico e promotor da proliferação de células endoteliais via a rápida ativação da MAPKinase (141). No presente trabalho, foi confirmada a rápida ativação de ERK 1/2 e também foi demonstrada a capacidade da PRL pseudofosforilada de inibir esse efeito além de promover ao mesmo tempo uma ativação/fosforilação tardia e sustentada da ERK. Outros estudos tem demonstrado que a indução da fosforilação de forma tardia e sustentada acarreta a elevação dos níveis de p21 (62,144,147,153). Também já foi demonstrado que a S179D-hPRL provocou o mesmo tipo de ativação da ERK e posterior aumento de p21 em outro sistema (263). Para verificar a especifidade da fosforilação da ERK e da indução de apoptose provocada por S179D-hPRL, usamos um inibidor especifico da MEK, o PD 98059 para bloquear essa cascata. O desenho dos experimentos foi complexo, uma vez que o fator bFGF, necessário para o crescimento e sobrevivência de HUVEC, também age por essa via. A padronização permitiu que empregássemos uma incubação de até 48 horas com deprivação de bFGF sem efeitos detectáveis em termos de fragmentação de DNA e dupla visualização com anexina-V/PI na análise por FACs. Após demonstar

112

que o PD 98059 bloqueou a reposta tardia e sustentada de ERK provocada pelo antagonista, mostramos que esse inibidor também bloqueou os efeitos da S179DhPRL sobre a fragmentação de DNA e exposição de fosfatidilserina em HUVEC (dupla visualização com anexina-V/PI). Resultados similares foram descrito para uma saponina com propriedades anti angiogênicas, que diminuiu a viabilidade de HUVEC através de uma fosforilação tardia e sustentada da ERK 1/2 (13). Outro composto, Paclitaxel, um potente agente quimioterápico, também requer uma ativação sustentada de ERK para indução da apoptose (187). Uma fosforilação sustentada da ERK também resultou numa diminuição da migração celular (261).

Em um período de 24 horas foi possível demonstrar que o PD 98059 bloqueou a clivagem do DFF45, e induziu a elevação de p21 assim como a ativação de seu promotor. Entretanto o PD 98059 não surtiu efeito sobre a elevação de p53 causada pelo antagonista. Os resultados obtidos com o PD 98059 sobre o promotor do p21 foram confirmados com a expressão de uma ERK mutante dominante negativa em HUVEC. Podemos concluir com essa série de experimentos que baixas concentrações de S179D-hPRL usam a via da MAPKinase para promover a apoptose. A indução dos níveis de p53 e ativação do pormotor de Bax, induzidos por altas concentrações do antagonista, entretanto, não dependem da via da MAPKinase. Uma vez que o bloqueio dessa via impediu o efeito pró apoptótico da S179D-hPRL, e que a quantidade de p53 não foi afetada por esse inibidor, pode-se afirmar que apenas a elevação de p53 não é suficiente para deflagrar a morte celular porgramada em HUVEC. Concluímos que a ativação de p21 foi necessária para a promoção da apoptose, o que é consistente com outros estudos demonstrando que a ativação de p21 estava relacionada com a ativação da via extrinsica de apoptose (92,108). A elevação de p21 também foi descrita como essencial para a morte celular programada (218). Esse indução da apoptose/p21 de forma independente de p53 é consistente com outros trabalhos que demosntram que na maioria dos tecidos a ativação de p21 não depende da transativação de p53 (82). Esse fato confirma estudo que mostra que HUVEC são resisntentes á apoptose induzida por p53 (164). Uma vez que bFGF não teve efeitos detectáveis sobre as atividades dos promotores de p21 e Bax, podemos

afirmar que os efeitos da S179D-hPRL sobre as proteínas p21 e p53 não estão relacionadas com o bloqueio do efeito do bFGF sobre a via da MAPKinase. Concluiu-se que o antagonista S179D-hPRL sinaliza via MAPkinase para a indução de p21 e promoção da apoptose em HUVEC.

6.0. CONCLUSÃO

Nesse trabalho demonstrou-se que um mecanismo que explica a maior potência antagonista da S179D-hPRL em modelos *in vivo* que em ensaios *in vitro* é, em parte, devido á sua atividade anti-angiogênica. Nesse estudo, a S179D-hPRL teve sua capacidade anti-angiogênica comprovada por vários ensaios de avaliação da angiogênese *in vivo* e *in vitro*. Sendo que se pode concluir que a S179D-hPRL é um potente composto anti-angiogênico *in vivo*.

Sua bioatividade anti-angiogênica pôde ser avaliada pelos dois testes *in vivo* mais utilizados na literatura: o teste em CAM de galinha e o ensaio de angiogênse em córnea, sendo este último considerado o ensaio *in vivo* mais completo sobre o teste de compostos angioativos.

Concluiu-se também que a antagonista S179D-hPRL sinaliza via MAPKinase para a indução de p21 e promoção de apoptose em HUVEC.

7.0. REFERÊNCIAS*

- ABDEL-MEGUID, S.S.; SHIEH, H.S.; SMITH, W.W.; DAYRINGER, H.E; VIOLAND, B.N.; BENTLE, L.A. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Nat.I Acad. Sci. USA*, 1987, v. 84, p. 6434–6437.
- ACEHAN, D.; JIANG, X.; MORGAN, D.G.; HEUSER, J.E.; WANG, X.; AKEY, C.W. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell.*, 2002, v. 9, p. 423-432.
- 3. ADAMS, J.B. Control of secretion and the function of C19-delta 5-steroids of the human adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol.* 1985, v. 41(1), p. 11-17.
- ALGUIRE, G.H. The transparent chamber technique as a tool in experimental tumor therapy. In: Symposia: approaches to tumour chemotherapy. *Washington DC: American Association for the Advancement of Science*, 1947, 13-26.
- 5. ARENDS, M.J.; WYLLIE, A.H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Path.*, 1991, v. 32, p. 223-354.
- ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999, v. 11, p. 255-260.
- AUERBACH, R.; LEWIS, R.; SHINNERS, B.; KUBAI, L.; AKHTAR, N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin. Chem.*, 2003, v. 49(1), p. 32-40.
- AUSPRUNK, D.H.; KNIGHTON, D.R.; FOLKMAN, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Developmental Biology*, 1974, v. 38, p. 237–248.

[•] De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas: NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus.Bethesda: NLM, 1997.

- BACHARACH, E.; ITIN, A.; KESHET, E. In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, v. 89(22), p. 10686-10690.
- BAILEY, J.P.; NIEPORT, K.M.; HERBST, M.P.; SRIVASTAVA, S.; SERRA, R.A.; HORSEMAN, N.D. Prolactin and transforming growth factor-beta signaling exert opposing effects on mammary gland morphogenesis, involution, and the Akt-forkhead pathway. *Mol Endocrinol.*, 2004, 18(5):p. 1171-1184.
- 11.BALUK, P.; HASHIZUME, H.; MCDONALD, D.M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 2005, v. 15, p.102–111.
- 12. BARGONETTI, J.; MANFREDI, J.J. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr. Opin. Oncol.*, 2002, v. 14, p. 86-91.
- 13.BARTHOMEUF, C.; BOIVIN, D.; BELIVEAU, R. Inhibition of HUVEC tubulogenesis by hederacolchiside-A1 is associated with plasma membrane cholesterol sequestration and activation of the Ha-Ras/MEK/ERK cascade. *Cancer Chemother Pharmacol.*, 2004, v. 54, p. 432-440.
- 14.BECK, M.T.; CHEN, NY.; FRANEK, K.J.; CHEN, W.Y. Prolactin antagonistendostatin fusion protein as a targeted dual-functional therapeutic agent for breast cancer. *Cancer Res.*, 2003, v. 63(13), p. 3598-3604.
- BEM-JOHATHAN, N.; MERSHON, J. L.; ALLEN, D. L.; STEINMETZ, R. W. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.*, 1996, v. 17:, p. 639–669.
- 16.BERGERS, G.; SONG, S.; MEYER-MORSE, N.; BERGSLAND, E.; HANAHAN, D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, v. 111, p. 1287–1295.
- 17. BERNARDI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PETRONILLI, V.; DI LISA,
 F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.*, 1999, v. 264(3), p. 687-701.

- BERNICHTEIN, S.; JEAY, S.; VAUDRY, R.; KELLY, PA.; GOFFIN, V. New homologous bioassays for human lactogens show that agonism or antagonism of various analogs is a function of assay sensitivity. *Endocrine*, 2003, v. 20(1-2), p. 177-190.
- BERNICHTEIN, S.; JOMAIN, JB.; KELLY, P.A.; GOFFIN, V. The N-terminus of human prolactin modulates its biological properties. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2003, v. 208(1-2), p. 11-21.
- 20. BERNICHTEIN, S.; KAYSER, C.; DILLNER, K.; MOULIN, S.; KOPCHICK, J.J.; MARTIAL, J.A.; NORSTEDT, G.; ISAKSSON, O.; KELLY, P.A.; GOFFIN, V. Development of pure prolactin receptor antagonists. *J. Biol. Chem.*, 2003, v. 278(38), p. 35988-35999.
- 21.BERNICHTEIN, S.; KINET, S.; JEAY, S.; LLOVERA, M.; MADERN, D.; MARTIAL, J.A.; KELLY, P.A.; GOFFIN, V. S179D-human PRL, a pseudophosphorylated human PRL analog, is an agonist and not an antagonist. *Endocrinology*, 2001, v. 142(9), p. 3950-3963.
- 22. BHATAVDEKAR, J.M.; PATEL, D.D.; SHAH, N.G.; VORA, H.H.; SUTHAR, T.P.; CHIKHLIKAR, P.R. et al., Prognostic significance of immunohistochemically localized biomarkers in stage ii and stage iii breast cancer: a multivariate analysis. *Ann. Surg. Oncol.*, 2000, v. 7, p. 305–311.
- 23.BOLE-FEYSOT, C.; GOFFIN, V.; EDERY, M.; BINART, N.; KELLY, P.A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.*, 1998, v. 19, p. 225-268.
- 24.BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-ordeath decisions. *Mol. Immunol.*, 2003, v. 39(11), p. 615-47.
- 25. BOUTIN, J.M.; EDERY, M.; SHIROTA, M.; JOLICOEUR, C.; LESUEUR, L.; ALI, S.; GOULD, D.; DJIANE, J.; KELLY, P.A. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Mol. Endocrinol. Mol. Endocrinol.*, 1989, v. 3, p. 1455-1461.
- 26.BOWEN, W. The effects of surgical interference with the blood supply on the growth of transplanted carcinomata and sarcomata. *Sci*

Rep. Imperial Cancer Res. Fund., 1980, v. 3, p. 146-158.

- 27. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1978, v. 72, p. 248-254.
- BROCKMAN, J.L.; SCHROEDER, M.D.; SCHULER, L.A.; Prl activates the cyclin d1 promoter via the jak2/stat pathway. *Mol. Endocrinol.*, 2002, v. 16, p. 774–784.
- 29. BRUSERUD, O.; GROVAN, F.; LINDAS, R.; BLYMKE MOINICHEN, C.; OSTERHUS, K.K. Serum levels of angioregulatory mediators in healthy individuals depend on age and physical activity: studies of angiogenin, basic fibroblast growth factor, leptin and endostatin. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005, v. 65(6), p. 505-511.
- 30.BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, v. 25, p. 169–193.
- 31.BUTLER, T.P.; GULLINO, P.M.. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 1975, v. 35, p. 512–516.
- 32. CHAKRAVARTI, P.; HENRY, M.K.; QUELLE, F.W. Prolactin and heregulin override DNA damage-induced growth arrest and promote phosphatidylinositol-3 kinase-dependent proliferation in breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2005, v. 26(2), p. 509-514.
- 33. CHANDRASEKAR, B.; VEMULA, K.; SURABHI, R.M.; LI-WEBER, M.; OWEN-SCHAUB, L.B.; JENSEN, L.E.; MUMMIDI, S. Activation of intrinsic and extrinsic proapoptotic signaling pathways in interleukin-18-mediated human cardiac endothelial cell death. *J. Biol Chem.*, 2004, v. 7; 279(19), p. 20221-20233.
- 34. CHEN, N.Y.; HOLLE, L.; LI, W.; PEIRCE, S.K.; BECK, M.T.; CHEN, W.Y. In vivo studies of the anti-tumor effects of a human prolactin antagonist, hPRL-G129R. *Int. J. Oncol.*, 2002, v. 20(4), p. 813-818.
- 35. CHEN, T.J.; KUO, C.B.; TSAI, K.F.; LIU, J.W.; CHEN, D.Y.; WALKER, A.M. Development of recombinant human prolactin receptor

antagonists by molecular mimicry of the phosphorylated hormone. *Endocrinology.* 1998, v. 139(2), p. 609-616.

- 36.CHEN, W.Y.; CHEN, N.Y.; YUN, J.; WAGNER, T.E.; KOPCHICK, J.J. In vitro and in vivo studies of antagonistic effects of human growth hormone analogs. *J. Biol. Chem.*, 1994, v. 269(22), p. 15892-15897.
- CHEN, W.Y.; RAMAMOORTHY, P.; CHEN, N.; STICCA, R.; WAGNER, T.E. A human prolactin antagonist, hPRL-G129R, inhibits breast cancer cell proliferation through induction of apoptosis. *Clin. Cancer Res.*, 1999, v. 5, p. 3583-3593.
- 38. CHEN, Y.H.; WU, H.L.; CHEN, C.K.; HUANG, Y.H.; YANG, B.C.; WU, L.W. Angiostatin antagonizes the action of VEGF-A in human endothelial cells via two distinct pathways. *Biochem Biophys Res. Commun.*, 2003, v. 24; 310(3), p. 804-810.
- 39. CHENG, M.; OLIVIER, P.; DIEHL, J.A.; FERO, M.; ROUSSEL, M.F,.;ROBERTS, J.M.; et al. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO. J.*, 1999, v. 18, p. 1571-1583.
- 40. CHRISTINGER, H.W.; ELKINS, P.A.; SANDOWSKI, Y.; SAKAL, E.; GERTLER, A.; KOSSIAKOFF, A.A.; DE VOS, A.M. Crystallization of ovine placental lactogen in a 1:2 complex with the extracellular domain of the rat prolactin receptor. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 1998, v. 54, p.1408-1411.
- 41. CHUANG, L.S.; IAN, H.I,.; KOH, T.W.; NG, H.H.; XU, G.; LI, B.F. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, 1997, v. 277, p. 1996-2000.
- 42. CHUN, T.H.; SABEH, F.; OTA, I.; MURPHY, H.; MCDONAGH, K.T.; HOLMBECK, K.; BIRKEDAL-HANSEN, H.; ALLEN, E.D.; WEISS, S.J. MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the threedimensional extracellular matrix. *Journal of Cell Biology*, 2004, v. 167, p. 757–767.
- 43. CLAPP, C.; MARTIAL, J.A.; GUZMAN, R.C.; RENTIER-

DELRUE, F.; WEINER, R.I. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, 1993, v. 133, p. 1292–1299.

- 44. CLAPP, C.; MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G. Prolactins: novel regulators of angiogenesis. *News Physiol. Sci.*, 1997, v. 12, p. 231–237.
- 45. CLAPP, C.; TORNER, L.; GUTIERREZ–OSPINA, G.; et al. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14 kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, v. 91, p. 10384-10388.
- 46. CLAPP, C.; WEINER, R. A specific, high-affinity, saturable binding site for the 16-kDa fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*, 1992, v. 130, p. 1380–1386.
- 47. CLARKE, D.L.; LINZER, D.I.H. Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology*, 1993, v. 133, p. 224–232.
- 48. CLEVENGER, C.V.; CHANG, W.P.; NGO, W.; PASHA, T.L.; MONTONE, K.T.; TOMASZEWSKI, J.E. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am. J. Pathol.*, 1995, v. 146, p. 695–705.
- CLEVENGER, C.V.; FREIER, D.O.; KLINE, J.B. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *J Endocrinol.* 1998, v. 157(2), p. 187-97.
- SO. CLEVENGER, C.V.; FURTH, P.A.; HANKINSON, S.E.; SCHULER, L.A. The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr. Rev.*, 2003, v. 24(1), p. 1-27.
- 51.CLEVENGER, C.V.; RYCYZYN, M.A.; SYED, F.; KLINEJB. In: HORSEMAN, N.D. *Prolactin.* Kluwer Academic Publishers, Boston, 2001, p. 355-379.
- 52.COCKERILL, G.W.; GAMBLE, JR.; VADAS, M.A. Angiogenesis: models and modulators. *International Review of Cytology*, 1995, v. 159, p. 113– 160.

- 53.CORROYER, S.; NABEYRAT, E.; CLEMENT, A. Involvement of the cell cycle inhibitor CIP1/WAF1 in lung alveolar epithelial cell growth arrest induced by glucocorticoids. *Endocrinology*, 1997, v. 138, p. 3677-3685.
- 54. CORY, S.; ADAMS, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-ordeath switch. *Nat. Rev. Cancer.*, 2002, v. 2(9), p. 647-656.
- 55.COSMAN D, LYMAN SD, IDZERDA RL, BECKMANN MP, PARK LS, GOODWIN RG, MARCH CJ. A new cytokine receptor superfamily. *Trends Biochem Sci.*, 1990, v. 15, p. 265-270.
- 56. COSMAN, D. The hematopoietin receptor superfamily. *Cytokine*, 1993, v.5, p. 95-106.
- 57.COSS, D.; KUO, C.B.; YANG, L.; INGLETON, P.; LUBEN, R.; WALKER, A.M. Dissociation of Janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 5 activation after treatment of Nb2 cells with a molecular mimic of phosphorylated prolactin. *Endocrinology*, 1999, v. 140, p. 5087-5094.
- 58.COSTELLO, L. C.; FRANKLIN, R. B. Effect of prolactin on the prostate. *Prostate*, 1994, v. 24, p. 162–166.
- 59.CRUM, R.; SZABO, S.; FOLKMAN, J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. *Science*, 1985, v. 230, p. 1375–1378.
- 60. D'AMATO, R.J.; LOUGHNAN, M.S.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, v. 91, p. 4082–4085.
- 61. DARNELL, J.E. JR. The JAK-STAT pathway: summary of initial studies and recent advances. *Recent Prog. Horm. Res.*, 1996, v. 51, p. 391-403.
- 62. DAS, D.; PINTUCCI, G.; STERN, A. MAPK-dependent expression of p21 (WAF) and p27(kip1) in PMA-induced differentiation of HL60 cells. *FEBS Lett.*, 2000, v. 472, p. 50-52.
- 63. DATTO, M.B.; YU, Y.; WANG, X.F. Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem.*, 1995, v. 270, p. 28623-28628.

64. DAVIS, J.A.; LINZER, D.I.H. Expression of multiple forms of

the prolactin receptor. *Mol. Endocrinol.*, 1989, v. 3, p. 674-680.

- DEAN, A. M.; KOSHLAND, D. E. Electrostatic and steric contributions to regulation at the active site of isocitrate dehydrogenase. *Science*, 1990, v. 249, p. 1044–1046.
- 66. DEAN, A. M.; LEE, M. H. I.; KOSHLAND, D. E. JR. Phosphorylation inactivates Escherichia coli isocitrate dehydrogenase by preventing isocitrate binding. *J. Biol. Chem.*, 1989, v. 264,, p. 20482–20486.
- 67. DELAVAINE, L.; La THANGUE, N.B. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*, 1999, v. 18, p. 5381-5392.
- DOGUSAN, Z.; HOOGHE, R.; VERDOOD, P.; HOOGHE-PETERS, E.L. Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J. Neuroimmunol.*, 2001, v. 120(1-2), p. 58-66.
- 69. DUENAS, Z.; TORNER, L.; CORBACHO, A.M.; OCHOA, A.; GUTIERREZ-OSPINA, G.; LOPEZ-BARRERA, F.; BARRIOS, F.A.; BERGER, P.; MARTINEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1999, v. 40, p. 2498–2505.
- 70. DULAK, J.; LOBODA, A.; ZAGORSKA, A.; JOZKOWICZ, A. Complex role of heme oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxid Redox Signal.* 2004, v. 6(5), p. 858-866.
- 71. DVORAK, H.F.; BROWN, L.F.; DETMAR, M..; DVORAK, A.M.. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 1995, v. 146, p. 1029–1039.
- 72. EI DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V.E.; LEVY, D.B.; PARSON, S.R.; TRENT, J.M.; et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993, v. 75, p. 817-825.
- 73. ENGE, M.; BJARNEGARD, M.; GERHARDT, H.; GUSTAFSSON, E.; KALEN, M.; ASKER, N.; HAMMES, H.P.; SHANI, M.;

FASSLER, R.; BETSHOLTZ, C. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO Journal*, 2002, v. 21, p. 4307–4316.

- 74.FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.*, 1999, v. 5, p. 1359–1364.
- 75.FERRARA, N.; CLAPP, C.; WEINER, R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*. 1991, v. 129, p. 896–900.
- 76.FOLKMAN, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1995, v. 1, p. 27-31.
- 77. FOLKMAN, J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.*, 1972, v. 175, p. 409-416.
- 78.FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971, v. 285, p. 1182-6.
- 79. FOLKMAN, J.; D'AMORE, P.A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 1996, v. 87, p. 1153–1155.
- 80.FREEMARK, M. Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus: Roles in fetal development. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001, v. 29(2), p. 38-41.
- 81.FRYSTYK, J. The growth hormone hypothesis 2005 revision. *Hormone and Metabolism Research*, 2005, v. 37, p. 44–48.
- 82. GARTEL, A.L.; TYNER, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol, Cancer Ther.*, 2002, v. 1, p. 639-649.
- 83.GILL, S.; PESTON, D.; VONDERHAAR, B.K.; SHOUSHA, S. Expression of prolactin receptors in normal, benign, and malignant breast tissue: an immunohistological study. *J. Clin. Pathol.*, 2001, v. 54, p. 956–960.
- 84. GIMBRONE, M.; LEAPMAN, S.; COTRAN, R.; FOLKMAN, J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neo-vascularisation. *J. Exp. Med.*, 1972, v. 136, p. 261-276.
- 85.GINSBURG, E.; VONDERHAAR, B.K. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 1995, v. 55, p. 2591–2595.

86. GLASOW, A.; HORN, L.C.; TAYMANS, S.E.; STRATAKIS,

C.A.; KELLY, P.A.; KOHLER, U. et al., Mutational analysis of the prl receptor gene in human breast tumors with differential prl receptor protein expression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, v. 86, p. 3826–3832.

- 87.GOFFIN, V.; BERNICHTEIN, S.; TOURAINE, P.; KELLY, P.A. Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists. *Endocr. Rev.*, 2005, v. 26, p. 400–422.
- GOFFIN, V.; KELLY, P.A. The prolactin/growth hormone receptor family: structure/ function relationships. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 1997, v. 2, p. 7-17.
- 89. GOFFIN, V.; KINET, S.; FERRAG, F.; BINART, N.; MARTIAL, JA.; KELLY, P.A. Antagonistic properties of human prolactin analogs that show paradoxical agonistic activity in the Nb2 bioassay. *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271(28), p. 16573-16579.
- 90.GOFFIN, V.; MARTIAL, J.A.; SUMMERS, N.L. Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. *Protein Eng.*, 1995, v. 8, p. 1215–1231.
- 91. GOFFIN, V; BINART, N; CLEMENT-LACROIX, P.; BOUCHARD, B.; BOLE-FEYSOT, C.; EDERY, M.; LUCAS, B.K.; TOURAINE, P.; PEZET, A.; MAASKANT, R.; PICHARD, C.; HELLOCO, C.; BARAN, N.; FAVRE, H.; BERNICHTEIN, S.; ALLAMANDO, A.; ORMANDY, C.; KELLY, P.A. From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genet. Anal.*, 1999, v.15, p.189-201.
- 92.GOKE, R.; GOKE, A.; GOKE, B.; EL-DEIRY, W.S.; CHEN, Y. Pioglitazone inhibits growth of carcinoid cells and promotes TRAIL-induced apoptosis by induction of p21waf1/cip1. *Digestion*, 2001, v. 6, p. 75-80.
- 93. GOLDHAR, A.S.; VONDERHAAR, B.K.; TROTT, J.F.; HOVEY, R.C. Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2005, v. 23, p. 9–19.
- 94.GOUT, P.W.; BEER, C.T.; NOBLE, R.L. Prolactin-stimulated growth of cell cultures estabilished from malignant Nb rat linphomas. *Cancer Res.*, 1980, v. 40, p. 2433-2460.

- 95. GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; JIANG, H.; SHORE, G.C.; McMANUS, B.M.; HUNT, D.W. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy *FEBS Lett.*, 1998, v. 437, p. 5-10.
- 96. GUPTA, S.; ADHAMI, V.M.; SUBBARAYAN, M.; MACLENNAN, G.T.; LEWIN, J.S.; HAFELI, U.O.; FU, P.; MUKHTAR, H. Suppression of prostate carcinogenesis by dietary supplementation of celecoxib in transgenic and adenocarcinoma of the mouse prostate model. *Cancer Res.*, 2004, v. 64, p. 3334-3343.
- 97. GUTZMAN, J.H.; MILLER, K.K.; SCHULER, L.A. Endogenous human prolactin and not exogenous human prolactin induces estrogen receptor alpha and prolactin receptor expression and increases estrogen responsiveness in breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2004, v. 88, p. 69–77.
- 98. HAIR, W.M.; GUBBAY, O.; JABBOUR, H.N.; LINCOLN, G.A. Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: Localization and function. *Mol. Hum. Reprod.*, 2002, v. 8(7), p.606-611.
- 99. HANAHAN, D. Signalling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 1997, p. 48–50.
- 100. HANAHAN, D.; FOLKMAN, J.; Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, v. 86, p. 353-64.
- 101. HARPER, M. E.; PEELING, W. B.; COWLEY, T.; BROWNSEY, B. G.; PHILLIPS, M. E.; GROOM, G.; FAHMY, D. R.; GRIFFITHS, K. Plasma steroid and protein hormone concentrations in patients with prostatic carcinoma, before and during oestrogen therapy. *Acta Endocrinol.*, 1976, v. 81, p. 409–426.
- 102. HARVAT, B.L.; WANG, A.; SETH, P.; JETTEN, A.M. Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation. *J. Cell. Sci.*, 1998, v. 111, p. 1185-1196.
- 103. HATA-SUGI, N.; KAWASE- KAGEYAMA, R.;

WAKABAYASHI, T. Characterization of rat aortic fragment within collagen gel as an angiogenesis model; capillary morphology may reflect the action mechanisms of angiogenesis inhibitors. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, v. 25, p. 446–451.

- HAYES, A.J.; LI, L.Y.; LIPPMAN, M.E. Science, medicine, and the future. Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment. *B. M. J.*, 1999, v. 27; 318(7187), p. 853-856.
- HELLSTROM, M.; GERHARDT, H.; KALEN, M.; LI, X.; ERIKSSON, U.; WOLBURG, H.; BETSHOLTZ, C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *Journal of Cell Biology*, 2001, v. 153, p. 543–553.
- 106. HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, v. 407, p. 770-776.
- 107. HENGARTNER, M.O.; HORVITZ, H.R. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl2. *Cell*, 1994, v. 76, p. 665-676.
- HINGORANI, R.; BI, B.; DAO, T.; BAE, Y.; MATSUZAWA, A.; CRISPE, I.N. CD95/Fas signaling in T lymphocytes induces the cell cycle control protein p21cip-1/WAF-1, which promotes apoptosis. *J. Immunol.*, 2000, v. 164, p. 4032-4036.
- HOVEY, R.C,.; GOLDHAR, A.S.; BAFFI, J.; VONDERHAAR, B.K. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in epithelial and stromal cells during mouse mammary gland development. *Molecular Endocrinology*, 2001, v. 1, p. 819–830.
- 110. HU, Z.Z.; MENG, J.; DUFAU, M.L. Isolation and Characterization of Two Novel Forms of the Human Prolactin Receptor Generated by Alternative Splicing of a Newly Identified Exon 11. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, v. 276, p. 41086-41094.
- HUANG, K.T.; CHEN, Y.H.; WALKER, A.M. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids.
 Biotechniques, 2004, 3:406, 408, 410-2.

- 112. HUDLICKA, O.; WRIGHT, A.J.; ZIADA, A.M. Angiogenesis in the heart and skeletal muscle. *Can. J. Cardiol.*, 1986, v. 2, p. 120–123.
- HYDER, S.M.; STANCEL, G.M. Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol. Endocrinol.*, 1999, v. 13, p. 806 –811.
- INGBER, D.; FUJITA, T.; KISHIMOTO, S.; et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 1990, v. 348, p. 555–557.
- 115. JACKSON, D.; VOLPERT, O.V.; BOUCK, N.; LINZER, D.I. Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science*, 1994, v. 266, p. 1581–1584.
- 116. KADAR, T.; BEN-DAVID, M.; PONTES, J. E.; FEKETE, M.; SCHALLY, A. V. Prolactin and luteinizing hormone-releasing hormone receptors in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Prostate*, 1988, v. 12, p. 299–307.
- KAUFMANN, S. H.; HENGARTNER, M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.*, 2001, v. 11, p. 526-534.
- 118. KAUFMANN, S.H.; EARNSHAW, W.C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell. Res.*, 2000, v. 10; 256(1), p. 42-49.
- KEELER, C.; DANNIES, P.S.; HODSDON, M.E. The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *J. Mol. Biol.*, 2003, v. 328, p. 1105-1121.
- KELLY, P.A.; DJIANE, J.; POSTEL-VINAY, M.C.; EDERY, M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr. Rev.*, 1991, v. 12, p. 235–251.
- 121. KENYON, B.M.; BROWNE, F.; D'AMATO, R.J. Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. *Experimental Eye Research*, 1997, v. 64, p. 971–978.
- 122. KENYON, B.M.; VOEST, E.E.; CHEN, C.C.; FLYNN, E.; FOLKMAN, J.; D'AMATO, R.J. A model of angiogenesis in the mouse

cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 1996, v. 37, p. 1625–1632.

- 123. KHURANA, S.; KUNS, R.; BEN-JONATHAN, N. Heparinbinding property of human prolactin: a novel aspect of prolactin biology. *Endocrinology*, 1999, v. 140, p. 1026–1029.
- KINET, S.; BERNICHTEIN, S.; KELLY, PA.; MARTIAL, JA.; GOFFIN,
 V. Biological properties of human prolactin analogs depend not only on global hormone affinity, but also on the relative affinities of both receptor binding sites. *J. Biol. Chem.*, 1999, v. 274(370), p. 26033-26043.
- KLINE, J.B.; ROEHRS, H.; CLEVENGER, C.V. Functional characterization of the intermediate isoform of the human prolactin receptor. *J. Biol. Chem.*, 1999, v. 274, p. 35461-35468.
- 126. KOCH, A.E. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1998, v. 4, p. 951–962.
- 127. KOCHENDOERFER, S.K,.; KRISHNAN, N.; BUCKLEY, D.J.; BUCKLEY, A.R. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xl but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *Journal of Endocrinology*, 2003, v. 178, p. 265–273.
- KOLBER, D.L.; KNISELY, T.L.; MAIONE, T.E. Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995, v. 87, p. 304–309.
- 129. KONNO, H.; TANAKA, T.; MATSUDA, I.; et al. Comparison of the inhibitory effect of the angiogenesis inhibitor, TNP-470, and mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer. *Int. J. Cancer*, 1995, v. 61, p. 268–271.
- KOVACS, E.J.; DIPIETRO, L.A. Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.*, 1994, v. 8, p. 854–861.
- KRISHNA, M.M.; LIN, Y.; ENGLANDER, S.W. Protein misfolding: optional barriers, misfolded intermediates, and pathway heterogeneity. *Journal of Molecular Biology*, 2004, v. 343, p. 1095–1109.

- KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.*, 2000, v. 6(5), p. 513-519.
- 133. KROEMER, G.; Zamzami, N.; Susin, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, 1997, v. 18(1), p. 44-51.
- KRUPINSKI, J.; KALUZA, J.; KUMAR, P.; et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischaemic stroke. *Stroke*, 1994, v. 25, p.1794– 1798.
- KUMAR, S.; COLUSSI, P.A. Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.*, 1999, v. 24, p. 1-4.
- KUO, C.B.; COSS, D.; WALKER, A.M. Prolactin receptor antagonists.
 Endocrine., 1998, v. 9(2), p. 121-131.
- 137. KUO, C.B.; WU, W.; XU, X.; YANG, L.; CHEN, C.; COSS, D.; BIRDSALL, B.; NASSERI, D.; WALKER A.M. Pseudophosphorylated prolactin (S179D PRL) inhibits growth and promotes β-casein gene expression in the rat mammary gland. *Cell Tissue Res.*, 2002, v. 309, p. 429-437.
- LABAER, J.; GARRETT, M.D.; STEVENSON, L.F.; SLINGERLAND,
 J.M.; SANDHU, C.; CHOU, H.S.; et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.*, 1997, v. 11, p. 847-862.
- 139. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, v. 227, p. 680-685.
- 140. LANGENHEIM, J.F.; CHEN, W.Y. Development of a prolactin receptor-targeting fusion toxin using a prolactin antagonist and a recombinant form of Pseudomonas exotoxin A. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2005, v. 90(3), p. 281-293.
- 141. LANGFORD, D.; HURFORD, R.; HASHIMOTO, M.; DIGICAYLIOGLU, M.; MASLIAH, E. Signalling crosstalk in FGF2-mediated protection of endothelial cells from HIV-gp120. *BMC Neurosci.*, 2005, 6:8.
- 142. LEE, C.; KOZLOWSKI, J. M.; GRAYHACK, J. T. Etiology of benign prostatic hyperplasia. Urol. Clin. N. Am., 1995, v. 22, p. 237–246.

- 143. LEE, H.; STRUMAN, I.; CLAPP, C.; MARTIAL, J.; WEINER, R. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*, 1998, v. 139, p. 3696–3703.
- 144. LEE, J.K.; JUNG, J.C.; CHUN, J.S.; KANG, S.S.; BANG, O.S. Expression of p21WAF1 is dependent on the activation of ERK during vitamin E-succinate-induced monocytic differentiation. *Mol. Cells*, 2002, v. 13, p. 125-129.
- 145. LEE, K.H.; CHOI, E.Y.; KIM, M.K.; HYUN, M.S.; JANG, B.I.; KIM, T.N.; KIM, S.W.; SONG, S.K.; KIM, J.H.; KIM, J.R. Regulation of hepatocyte growth factor-mediated urokinase plasminogen activator secretion by MEK/ERK activation in human stomach cancer cell lines. *Exp. Mol. Med.*, 2006, v. 38, p. 27-35.
- 146. LEFF, M. A.; BUCKLEY, D. J.; KRUMENACKER, J. S.; REED, J. C.; MIYASHITA, T.; BUCKLEY, A. R. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology*, 1996, v. 137, p. 5456–5462.
- 147. LESSOR, T.; YOO, J.Y.; DAVIS, M.; HAMBURGER, A.W. Regulation of heregulin beta1-induced differentiation in a human breast carcinoma cell line by the extracellular-regulated kinase (ERK) pathway. *J. Cell. Biochem.*, 1998, v. 70, p. 587-595.
- 148. LI, L.Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.*, 2001, v. 412(6842), p. 95-9.
- 149. LI, Q.J.; YAO, M.; WONG, W.; PARPURA, V.; MARTINS-GREEN, M. The N- and C-terminal peptides of hIL8/CXCL8 are ligands for hCXCR1 and hCXCR2. *FASEB Journal*, 2004, v. 18, p. 776–778.
- 150. LIBY, K.; NELTNER, B.; MOHAMET, L.; MENCHEN, L.; BEN-JONATHAN, N. Prolactin overexpression by mda-mb-435 human breast cancer cells accelerates tumor growth. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2003, v. 79, p. 241–252.
- 151. LINDAHL, P.; JOHANSSON, B.R.; LEVEEN, P.;

BETSHOLTZ, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGFBdeficient mice. *Science*, 1997, v. 277, p. 242–245.

- 152. LIOTTA, L.; KLEINERMAN, J.; SAIDEL, G.Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels and pulmonary metastasis following tumor implantation. *Cancer Res.*, 1974, v. 34, p. 997-1004.
- 153. LIU, M.; IAVARONE, A.; FREEDMAN, L.P. Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271, p. 31723-31728.
- LIU, M.; Lee, M.H.; COHEN, M.; BOMMAKANTI, M.; FREEDMAN,
 L.P. Transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Gene Dev.*, 1996, v. 10, p. 142-153.
- 155. LLOVERA, M.; PICHARD, C.; BERNICHTEIN, S.; JEAY, S.; TOURAINE, P.; KELLY, PA.; GOFFIN, V. Human prolactin (hPRL) antagonists inhibit hPRLactivated signaling pathways involved in breast cancer cell proliferation. *Oncogene*, 2000, v. 19(41), p. 4695-4705.
- 156. LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.*, 2000, v. 256(1), p. 19-26.
- 157. LUO, X.; BUDIHARDJO, I.; ZOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.*, 1998, v. 21;94(4), p. 481-490.
- MA, L.J.; GUZMAN, E.A.; DEGUZMAN, A.; WALTER, B.; MULLER, H.K.; WALKER, A.M.; OWEN, L.B. Unexpected effects of UVB in IL-10 transgenic mice: normalization of contact hypersensitivity response. *Arch. Dermatol. Res.*, 2006, v. 297, p. 417-420.
- MARTINEZ, L.A.; CHEN, Y.; FISCHER, S.M.; CONTI, C.J.
 Coordinated changes in cell cycle machinery occur during keratinocyte terminal differentiation. *Oncogene*, 1999, v. 18, p. 397-406.
- 160. MARTINEZ, L.B.; LEYVA, M.Z.; ROMERO, I.C. Prolactin

receptor in human endometriotic tissues. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2002, v. 81(1), p. 5-10.

- 161. MARTINS-GREEN, M.; KELLY, T. The chicken chemotactic and angiogenic factor (9E3 gene product): its angiogenic properties reside in the C-terminus of the molecule. *Cytokine*, 1998, v. 10, p. 819-830.
- MARUOTTI, N.; CANTATORE, F.P.; CRIVELLATO, E.; VACCA, A.; RIBATTI, D. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol.* 2006, v. 21(5), p. 557-566.
- MAUS, M.V.; REILLY, S.C.; CLEVENGER, C.V. Prolactin as a chemoattractant for human breast carcinoma. *Endocrinology*, 1999, v. 140, p. 5447–5450.
- 164. MAXWELL, S.A.; ACOSTA, S.A.; DAVIS, G.E. Induction and alternative splicing of the Bax gene mediated by p53 in a transformed endothelial cell line. *Apoptosis*, 1999, v. 4, p. 109-114.
- 165. MCKEEHAN, W.L.; ADAMS, P.S.; ROSSER, M.P. Direct mitogenic effects of insulin, epidermal growth factor, glucocorticoid, cholera toxin, unknown pituitary factors and possibly prolactin, but not androgen, on normal rat prostate epithelial cells in serum-free, primary cell culture. *Cancer Res.*, 1984, v. 44, p. 1998–2010.
- 166. MENG, J.; TSAI-MORRIS, C.H.; DUFAU, M.L. Human prolactin receptor variants in breast cancer: low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma. *Cancer Res.*, 2004, v. 64, p. 5677–5682.
- 167. MERCIER, L.; RENTIER-DELRUE, F.; SWENNEN, D.; LION, M.; LE GOFF, P.; PRUNET, P.; MARTIAL, J.A. Rainbow trout prolactin cDNA cloning in Escherichia coli. *DNA*, 1989, v. 8, p. 119–125.
- MERKLE, C.J.; SCHULER, L.A.; SCHAEFFER, R.C. Jr.; GRIBBON, J.M.; MONTGOMERY, D.W. Structural and functional effects of high prolactin levels on injured endothelial cells: evidence for an endothelial prolactin receptor. *Endocrine*, 2000, v. 1, p. 37–46.

169. METZSTEIN, M.M.; STANFIELD, G.M.; HORVITZ,

H.R. Genetics of programmed cell death in C. elegans: past, present and future. *Trends Genet*. 1998, v. 14, p. 410-416.

- MICHIELI, P.; CHEDID, M.; LIN, D.; PIERCE, J.H.; MERCER, W.E.; GIVOL, D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.*, 1994, v. 54, p. 3391-3395.
- MISSERO, C.; DI CUNTO, F.; KIYOKAWA, H.; KOFF, A.; DOTTO, G.P. The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev.*, 1996, v. 10, p. 3065-3075.
- MONTGOMERY, D.W.; LEFEVRE, J.A.; ULRICH, E.D.; ADAMSON,
 C.R.; ZUKOSKI, C.F. Identification of prolactin-like proteins synthesized by normal murine lymphocytes. *Endocrinology*, 1990, v. 127, p. 2601–2603.
- MORGAN, D.O. Principles of CDK regulation. *Nature*. 1995, v. 9;
 374(6518), p. 131-134.
- MORI, S.; UEDA, T.; KURATSU, S.; et al. Suppression of pulmonary metastasis by angiogenesis inhibitor TNP-470 in murine osteosarcoma. *Int. J. Cancer*, 1995, v. 61, p. 148–152.
- MUND, T.; GEWIES, A.; SCHOENFELD, N.; BAUER, M.K.; GRIMM,
 S. Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J.*, 2003, v. 17, p. 696-698.
- 176. NANKIN, H. R.; CALKINS, J. H. Decreased bioavailable testosterone in aging normal and impotent men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1986, v. 63, p.n1418–1420.
- 177. National cancer Institute-Bethesda, MD, EUA-<u>http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/angiogenesis</u>. Acesso em 26 Jun. 2006.
- 178. NAYLOR, M.J.; OAKES, S.R.; GARDINER-GARDEN, M.; HARRIS, J.; BLAZEK, K.; HO, T.W.; LI, F.C.; WYNICK, D.; WALKER, A.M.; ORMANDY, C.J. Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development. *Mol. Endocrinol.*, 2005, v. 19(7), p. 1868-1883.

- 179. NEVALAINEN, M. T.; VALVE, E. M.; AHONEN, T.; YAGI, A.; PARANKO, J.; HARKONEN, P. L. Androgen-dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium *in vivo* and in organ culture. *FASEB J.*, 1997, v. 11, p. 1297–1307.
- NEVALAINEN, M. T.; VALVE, E. M.; INGLETON, P. M.; NURMI, M.; MARTIKAINEN, P. M.; HARKONEN, P. L. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J. Clin. Invest.*, 1997b, v. 99, p. 618–627.
- NEVALAINEN, M.T.; VALVE, E.M.; INGLETON, P.M.; HARKONEN,
 P.L. Expression and hormone regulation of prolactin receptors in rat dorsal and lateral prostate. *Endocrinology*, 1996, v. 137, p. 3078–3088.
- 182. NEVALAINEN, M.T.; VALVE, E.M.; MAKELA, S.I.; BLAUER, M.; TUOHIMAA, P.J.; HARKONEN, P.L. Estrogen and prolactin regulation of rat dorsal and lateral prostate in organ culture. *Endocrinology*, 1991, v. 129, p. 612–622.
- NGUYEN, D.N.; BECKER, G.W.; RIGGIN, R.M. Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology. *J. Chromatogr. A.*, 1995, v. 705, p. 21-45.
- 184. OCHOA, A.; MONTES DE OCA, P.; RIVERA, J.C.; DUEÑAS, Z.; NAVA, G.; MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, G.; CLAPP, C. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2001, v. 42, p. 1639–1645.
- ODOMA, S.; CHISHOLM, G. D.; NICOL, K.; HABIB, F.K. Evidence for the association between blood prolactin and androgen receptors in BPH. *J. Urol.*, 1985, v. 133, p. 717–720.
- OHTA, K.; YACHIE, A. Development of vascular biology over the past
 years: heme oxygenase-1 in cardiovascular homeostasis. *Journal of Endovascular Therapy*, 2004, v. 1, p. II140–II150.
- 187. OKANO, J.; RUSTGI, A.K. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the

programmed cell death machinery. *J. Biol. Chem.*, 2001, v. 1; 276(22), p. 19555-19564.

- OKROJ, M.; KAMYSZ, W.; SLOMINSKA, E.M.; MYSLIWSKI, A.; BIGDA, J. A novel mechanism of action of the fumagillin analog, TNP-470, in the B16F10 murine melanoma cell line. *Anticancer Drugs*, 2005, v. 16, p. 817-823.
- 189. O'REILLY, M.S.; HOMGREN, L.; SHING, Y.; et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, v. 79, p. 315–328.
- O'REILLY. M.S.; BOEHM, T.; SHING, Y.; et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, v. 88, p. 1–20.
- ORMANDY, C.J.; HALL, R.E.; MANNING, D.L.; ROBERTSON, J.F.; BLAMEY, R.W.; KELLY, P.A.; et al., Coexpression and crossregulation of the prolactin receptor and sex steroid hormone receptors in breast cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1997, v. 82, p. 3692–3699.
- OZERDEM, U.; STALLCUP, W.B. Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis.*, 2004, v. 7(3), p. 269-276.
- 193. OZERDEM, U. Targeting neovascular pericytes in neurofibromatosis type 1. *Angiogenesis*, 2005, v. 7, p. 307–311.
- 194. PEIRCE, S.K.; CHEN, W.Y.; CHEN, W.Y. Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J. Endocrinol.*, 2001, v. 171(1), p. R1-R4.
- 195. PEIRCE, SK.; CHEN, W.Y. Human prolactin and its antagonist, hPRLG129R, regulate bax and bcl-2 gene expression in human breast cancer cells and transgenic mice. *Oncogene*, 2004, v. 23(6), p. 1248-1255.
- 196. PERKS, C.M.; KEITH, A.J.; GOODHEW, K.L.; SAVAGE, P.B.; WINTERS, Z.E.; HOLLY, J.M. Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 2004, v. 9, p. 305–311.
- 197. PIETRAS, K.; HANAHAN, D. A multitargeted, metronomic,

and maximum-tolerated dose 'Chemo-Switch' regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, v. 23, p. 939–952.

- POWELL, J. Update on hemangiomas and vascular malformations.
 Curr. Opin. Pediatr., 1999, v. 11, p. 457–463.
- 199. RAE-VENTER, B.; NEMOTO, T.; SCHNEIDER, S.L.; DAO, T.L. Prolactin binding by human mammary carcinoma: relationship to estrogen receptor protein concentration and patient age. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1981, v. 1, p. 233–243.
- RAO, R.V.; CASTRO-OBREGON, S.; FRANKOWSKI, H.; SCHULER, M.; STOKA, V.; DEL RIO, G.; BREDESEN, D.E.; ELLERBY, H.M. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1independent intrinsic pathway. *J. Biol. Chem.*, 2002, v. 277, p. 21836– 21842.
- REYNOLDS, C.; MONTONE, K.T.; POWELL, C.M.; TOMASZEWSKI, J.E.; CLEVENGER, C.V. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinology*, 1997, v. 138, p. 5555–5560.
- 202. RIBATTI, D.; VACCA, A.; PRESTA, M. The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen. Pharmacol.*, 2000, v. 35, p. 227-231.
- 203. RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997, v. 386, p.
 671–674.
- RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1995, v. 11, p. 73–91.
- 205. ROBERTSON, F.G.; HARRIS, J.; NAYLOR, M.J.; OAKES, S.R.; KINDBLOM, J.; DILLNER, K.; WENNBO, H.; TORNELL, J.; KELLY, P.A.; GREEN, J.; ORMANDY, C.J. Prostate development and carcinogenesis in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology*, 2003, v. 144(7), p. 3196-3205.
- 206. ROSE-HELLEKANT, T.A.; ARENDT, L.M.; SCHROEDER, M.D.; GILCHRIST, K.; SANDGREN, E.P.; SCHULER, L.A. Prolactin induces eralpha-positive and eralpha- negative mammary cancer in

transgenic mice. *Oncogene*, 2003, v. 22, p. 4664–4674.

- 207. ROSSI, D.; GAIDANO, G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*, 2003, v. 88, p. 212-218.
- RUSSO, T.; ZAMBRANO, N.; ESPOSITO, F.; AMMENDOLA, R.; CIMINO, F.; FISCELLA, M.; JACKMAN, J.; O'CONNOR, P.M.; ANDERSON, C.W.; APPELLA, E. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 1995, v. 270, p. 29386-29391.
- SABRI, M.N.; DISCIASCIO, G.; COWLEY, M.J.; et al. Coronary recruitment: functional significance and relation to rate of vessel closure.
 Am. Heart J., 1991, v. 121(3Pt1), p. 876–880.
- SAMUELS-LEV, Y.; O'CONNOR, D.J.; BERGAMASCHI, D.; TRIGIANTE, G.; HSIEH, J.K.; ZHONG, S.; CAMPARGUE, I.; NAUMOVSKI, L.; CROOK, T.; LU, X. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol. Cell.*, 2001, v. 8, p.781-794.
- SAROFF, J.; KIRDANI, R. Y.; CHU, T. M.; WAJSMAN, Z.; MURPHY,
 G. P. Measurements of prolactin and androgens in patients with prostatic diseases. *Oncology (Basel)*, 1980, v. 37, p. 46–52.
- SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; FRIESEN, C.; Li, F.; TOMASELLI, K.J.; DEBATIN, K.M.; KRAMMER, P.H.; PETER, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.*, 1998, v. 16; 17(6), p. 1675-1687.
- SCHROEDER, M.D.; BROCKMAN, J.L.; WALKER, A.M.; SCHULER, L.A. Inhibition of prolactin (PRL)-induced proliferative signals in breast cancer cells by a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL. *Endocrinology*, 2003, v. 144, p. 5300-5307.
- SCHROEDER, M.D.; SYMOWICZ, J.; SCHULER, L.A. Prl modulates cell cycle regulators in mammary tumor epithelial cells. *Mol. Endocrinol.*, 2002, 16:45–57.
- 215. SENOO, M.; MATSUMURA, Y.; HABU, S. Identification of a Novel Retrovirus Long Terminal Repeat (LTR) That Is Targeted by p51A
(TAp63g) and Selective Dominant-Negative Activity of p73L (DNp63a) toward p53-Responsive Promoter Activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, v. 286, p. 628–634.

- SEUBERT, N.; ROYER, Y.; STAERK, J.; KUBATZKY, K.F.; MOUCADEL, V.; KRISHNAKUMAR, S.; SMITH, S.O.; CONSTANTINESCU, S.N. Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol. Cell*, 2003, v. 12(5), p. 1239-1250.
- SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, 1999, v. 15; 13(12), p. 1501-1512.
- 218. SHIN, BA.; AHN, K.Y.; KOOK, H.; KOH, J.T.; KANG, I.C.; LEE, H.C.; KIM, K.K. Overexpressed human RAD50 exhibits cell death in a p21(WAF1/CIP1)-dependent manner: its potential utility in local gene therapy of tumor. *Cell Growth Differ.*, 2001, v. 12, p. 243-254.
- SINHA, Y.N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr. Rev.*, 1995, v. 16, p. 354–369.
- SLEE, EA.; HARTE, M.T.; KLUCK, R.M.; WOLF, B.B.; CASIANO, C.A.; NEWMEYER, D.D.; WANG, H.G.; REED, J.C.; NICHOLSON, D.W.; ALNEMRI, E.S.; GREEN, D.R.; MARTIN, S.J. Ordering the cytochrome cinitiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell. Biol.*, 1999, v. 25; 144(2), p. 281-292.
- 221. SMITH-MCCUNE, K.K.; WEIDNER, N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res.*, 1994, v. 54, p. 800-4.
- 222. SOARES, C.R.; MORGANTI, L.; MILOUX, B.; LUPKER, J.H.; FERRARA, P.; BARTOLINI, P. High-level synthesis of human prolactin in Chinese-Hamster ovary cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2000, v. 32, p. 127-135.
- 223. STEIN, G.H.; DULIC, V. Molecular mechanisms for the

senescent cell cycle arrest. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 1998, v. 3, p. 14-18.

- 224. STRUMAN; BENTZIEN, F.; LEE, H.; MAINFROID, V.; D'ANGELO, G.; GOFFIN V.; et al. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, v. 96, p. 1246–1251.
- 225. SUN, C.Y.; HU, Y.; WANG, H.F.; HE, W.J.; WANG, Y.D.; WU, T. Brain-derived neurotrophic factor inducing angiogenesis through modulation of matrix-degrading proteases. *Chin Med J.* 2006, v. 119(7), p. 589-595.
- 226. SUSIN, S.A.; LORENZO, H.K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; BRENNER, C.; LAROCHETTE, N.; PREVOST, M.C.; ALZARI, P.M.; KROEMER, G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med.* 1999, v. 189(2), p. 381-394.
- 227. TAN, D.; JOHNSON, D.A.; WU, W.; ZENG, L.; CHEN, Y.H.; CHEN, W.Y.; VONDERHAAR, B.K.; WALKER A.M. Unmodified prolactin (PRL) and S179D PRL-initiated bioluminescence resonance energy transfer between homo- and hetero-pairs of long and short human PRL receptors in living human cells. *Mol Endocrinol.*, 2005, v. 19, p. 1291-303.
- TANNOCK, I.F. The relationship between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br. J. Cancer*, 1968, v. 22, p. 258-273.
- TAYLOR, S.; FOLKMAN, J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis.
 Nature, 1982, v. 297, p. 307–12.
- TEILUM, K.; HOCH, J.C.; GOFFIN, V.; KINET, S.; MARTIAL, J.A.; KRAGELUND, B.B. Solution structure of human prolactin. *J. Mol. Biol.*, 2005, v. 351, p. 810-823.
- THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, v. 267, p. 1456-1462.
- 232. TODD, C.; REYNOLDS, N.J. Up-regulation of p21WAF1 by phorbol ester and calcium in human keratinocytes through a protein

kinase C-dependent pathway. Am. J. Pathol., 1998, v. 153, p. 39-45.

- 233. TOMANEK, R.J.; DOTY, M.K.; SANDRA, A. Early coronary angiogenesis in response to Thyroxine: growth characteristics and upregulation of basic fibroblastic growth factor. *Circ. Res.*, 1998, v. 82, p. 587–593.
- 234. TOURAINE, P.; MARTINI, J.F.; ZAFRANI, B.; DURAND, J.C.; LABAILLE, F.; MALET, C.; et al. Increased expression of prolactin receptor gene assessed by quantitative polymerase chain reaction in human breast tumors versus normal breast tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998, v. 83, p. 667–674.
- 235. TRAUTWEIN, C.; CAELLES, C.; VANDERGEER, P.; HUNTER, T.; KARIN, M.; CHOJKIER, M. Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain. *Nature*, 1993, v. 364, p. 544–547.
- 236. TROTT, J.F.; HOVEY, R.C.; KODURI, S.; VONDERHAAR, B.K. Alternative splicing to exon 11 of human prolactin receptor gene results in multiple isoforms including a secreted prolactin-binding protein. *J. Mol. Endocrinol.*, 2003, v. 30, p. 31-47.
- 237. TUAZON, P.T.; LORENSON, M.Y.; WALKER, A.M.; TRAUGH, J.A. p21-activated protein kinase gamma-PAK in pituitary secretory granules phosphorylates prolactin. *FEBS Lett.* 2002, v. 515(1-3), p. 84-88.
- 238. UEDA, .EK.; GOUT, P.W.; MORGANTI, L. Ni(II)-based immobilized metal ion affinity chromatography of recombinant human prolactin from periplasmic Escherichia coli extracts. *J Chromatogr. A.*, 2001, v. 922, p. 165-175.
- 239. UEDA, E.; OZERDEM, U.; CHEN, Y-H.; YAO, M.; HUANG, K.T.; SUN, H.; MANUELA MARTINS-GREEN, M.; BARTOLINI, P.; WALKER, A.M. A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. *Endocr. Relat. Cancer*, 2006, v. 13, p. 95-111.
- 240. UEDA, E.K.; LO, H.L.; BARTOLINI, P.; WALKER, A.M. S179D Prolactin (PRL) primarily uses the extrinsic pathway and MAPkinase

signaling to induce apoptosis in human endothelial cells. *Endocrinology.* 2006 em publicação.

- 241. VAN COPPENOLLE, F.; LE BOURHIS, X.; CARPENTIER, F.; DELABY, G.; COUSSE, H.; RAYNAUD, J. P.; DUPOUY, J. P.; PREVARSKAYA, N. Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of Serenoa repens (Permixon) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride. *Prostate*, 2000, v. 43, p. 49–58.
- 242. VAN COPPENOLLE, F.; SLOMIANNY, C.; CARPENTIER, F.; LE BOURHIS, X.; AHIDOUCH, A.; CROIX, D.; LEGRAND, G.; DEWAILLY, E.; FOURNIER, S.; COUSSE, H.; et al. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgen-dependence. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001, v. 280, p. E120–E129.
- 243. VERHAGEN, A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REID, G.E.; MORITZ, R.L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.*, 2000, v. 102(1), p. 43-53.
- 244. VLAHOS, N.P.; BUGG, E.M.; SHAMBLOTT, M.J.; PHELPS, J.Y.; GEARHART, J.D.; ZACUR, H.A. Prolactin receptor gene expression and immunolocalization of the prolactin receptor in human luteinized granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001, v. 7(11), p. 1033-1038.
- 245. WAGA, S.; HANNON, G.J.; BEACH, D.; STILLMAN, B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 1994, v. 369, p. 574-578.
- 246. WALKER, A.M. Prolactin receptor antagonists. *Curr. Opin. Investig.Drugs.*, 2005, v. 6, p.378-85.
- 247. WANG, H.S.; HWANG, L.L.; SUE, H.F.; LEE, K.M.; CHEN, C.T. A simple quantitative method for evaluation of angiogenesis activity. *Assay* and Drug Development Technologies, 2004, v. 2, p. 31–38.
- 248. WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, 2001, v. 15; 15(22), p. 2922-2933.

- 249. WANG, Y.F.; LIU, J.W.; MAMIDI, M.; WALKER, A.M. Identification of the major site of rat prolactin phosphorylation as serine 177. *J Biol. Chem.*, 1996, v. 271, p. 2462-2469.
- 250. WANG, Y.F.; WALKER, A.M. Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of Nb2 cell proliferation. *Endocrinology*. 1993, v. 133(5), p. 2156-2160.
- 251. WATSON, S.A.; MORRIS, T.M.; ROBINSON, G.; et al. Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models. *Cancer Res.*, 1995, v. 55, p. 3629–3633.
- 252. WEIDNER, N. Current pathological methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1996, v. 36, p. 169-180.
- 253. WEINBERG, W.C.; AZZOLI, C.G,.; CHAPMAN, K.; LEVINE, A.J.; YUSPA, S.H. p53-mediated transcriptional activity increases in differentiating epidermal keratinocytes in association with decreased p53 protein. *Oncogene*, 1995, v. 10, p. 2271-2279.
- 254. WEINBERG, W.C.; DENNING, M.F. P21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit. Rev. Oral. Bio.l Med.*, 2002, v. 13(6), p. 453-464.
- 255. WEINGARTNER, K.; BEN-SASSON, S.A.; STEWART, R.; RICHIE, J.P.; RIEDMILLER, H.; FOLKMAN, J. Endothelial cell proliferation activity in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: an in vitro model for assessment. *J. Urol.*, 1998, v. 159, p. 465-470.
- 256. WEINSTAT-SASLOW, D.L.; ZABRENETZKY, VS.; VANHOUTTE, K.; et al. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res.*, 1994, v. 54, p. 6504–6511.
- 257. WENNBO, H.; GEBRE-MEDHIN, M.; GRITLI-LINDE, A.; OHLSSON,C.; ISAKSSON, O.G.; TORNELL, J. Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of

mammary tumors in transgenic mice, *J. Clin. Invest.*, 1997, v. 100, p. 2744–2751.

- WENNBO, H.; KINDBLOM, J.; ISAKSSON, O.G.; TORNELL, J. Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology*, 1997, v. 138, p. 4410– 4415.
- WICKS, JR.; BROOKS, C.L. Biological activity of phosphorylated and dephosphorylated bovine prolactin. *Mol. Cell Endocrinol.*, 1995, v. 112(2), p. 223-229.
- WINKLER, M.A.; HICKMAN, R.K.; GOLDEN, A.; ABOLENNEN, H. Analysis of Recombinant Protein expression by MALDI-TOF Mass Spectrometry of Bacterial Colonies. *Biotechniques*, 2000, v. 28, p. 890-895.
- 261. WOODS, D,.; CHERWINSKI, H.; VENETSANAKOS, E.; BHAT, A.; GYSIN, S.; HUMBERT, M.; BRAY, P.F.; SAYLOR, V.L.; MCMAHON, M. Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 2001, v. 21, p. 3192-3205.
- WU, W.; COSS, D.; LORENSON, M.Y.; KUO, C.B.; XU, X.; WALKER, A.M. Different biological effects of unmodified prolactin and a molecular mimic of phosphorylated prolactin involve different signaling pathways. *Biochemistry*, 2003, v. 42(24), p. 7561-7570.
- 263. WU, W.; GINSBURG, E.; VONDERHAAR, B.K.; WALKER, A.M. Promotion of alternative splicing to produce the human short prolactin receptor 1b by S179D PRL upregulates vitamin D receptor and p21/Waf1 in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 2005, v. 65(16), p. 7509-7515.
- XIONG, Y.; HANNON, G.J.; ZHANG, H.; CASSO, D.; KOBAYASHI,
 R.; BEACH, D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 1993, v.
 366, p. 701-704.
- 265. XU, X.; KREYE, E.; KUO, C.B.; WALKER, A.M. A molecular mimic of phosphorylated prolactin markedly reduced tumor

incidence and size when DU145 human prostate cancer cells were grown in nude mice. *Cancer Res.*, 2001, v. 61(16), p. 6098-6104.

- 266. XU, X.; WU, W.; WILLIAMS, V.; KHONG, A.; CHEN, Y.H.; DENG, C.; WALKER A.M. Opposite effects of unmodified prolactin and a molecular mimic of phosphorylated prolactin on morphology and the expression of prostate specific genes in the normal rat prostate. *Prostate*, 2003, v. 54, p. 25-33.
- 267. YANG, L.; KUO, C.B.; LIU, Y.; COSS, D.; XU, S.; CHEN, C.; OSTER-GRANITE, M.L.; WALKER, A.M. Administration of unmodified prolactin (U-PRL) and a molecular mimic of phosphorylated prolactin (PP-PRL) during rat pregnancy provides evidence that the U-PRL:PP-PRL ratio is crucial to the normal development of pup tissues. *J. Endocrinol.*, 2001, v. 168(2), p. 227-238.
- 268. YANG, L.; LII, S.; KUO, B.; BUCKLEY, A.; BUCKLEY, D.; CHEN, C.; XU, X.; COSS, D.; WALKER, A.M. Maternal prolactin composition can permanently affect epidermal gammadeltaT cell function in the offspring. *Developmental and Comparative Immunology*, 2002, v. 26, p. 849–860.
- 269. YEH, J.R.; MOHAN, R.; CREWS, C.M. The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21CIP/WAF for endothelial cell growth arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, v. 97, p. 12782-12787.
- 270. YU, J.; ZHANG, L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, v. 10; 331(3), p. 851-8.
- 271. ZEISS, C.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol.*, 2003, v. 40(5), p. 481-495.
- 272. ZENKOVA, T.Y.; KULIKOV, A.V.; BOGORAD, R.L.; ROZENKRANTS, A.A.; PLATONOVA, L.V.; SHONO, N.I.; GAL'PERIN, E.I.; SMIRNOVA, O.V. Expression of prolactin receptors in human liver during cholestasis of different etiology and secondary liver cancer. *Bull .Exp. Biol. Med.*, 2003, v. 135(6), p. 566-569.
- ZETTER, B.R. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu. Rev. Med.*, 1998, v. 49, p. 407-424.

- 274. ZHANG, G.; LI, W.; HOLLE, L.; CHEN, N.; CHEN, W.Y. A novel design of targeted endocrine and cytokine therapy for breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2002, v. 8(4), p. 1196-1205.
- 275. ZHANG, Z.L.; LIU, Z.S.; SUN, Q. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006, v.12(26), p. 4241-4245.
- 276. ZHU, A.J.; WATT, F.M. Expression of a dominant negative cadherin mutant inhibits proliferation and stimulates terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J. Cell. Sci.*, 1996, v. 109(Pt 13), p. 3013-3023.
- 277. ZOU, H.; HENZEL, W.J.; LIU, X.; LUTSCHG, A.; WANG, X. APAF-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 1997, v. 90, p. 405-413.