

INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo
19940

Arilda
Flatschart
12/01/01
25289

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Análise funcional de genes regulados por glicocorticóides
na reversão fenotípica tumoral-normal de células ST1 de
glioma de rato.**

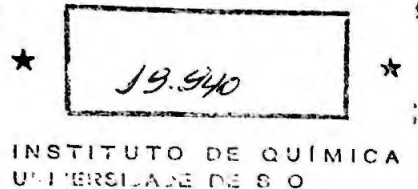
ROBERTO BECHT FLATSCHART

TESE DE DOUTORADO

Orientadora: Dra. Mari C. Sogayar

T
574.88
F586a

São Paulo
2001



DEDALUS - Acervo - CQ



30100004447

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

Flatschart, Roberto Becht
F586a **Análise funcional de genes regulados por glicocorticóides na reversão fenotípica tumoral-normal de células ST1 de glioma de rato / Roberto Becht Flatschart. -- São Paulo, 2001. 126p**

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Sogayar, Mari Cleide

1. Biologia molecular 2. Bioquímica 3. Biologia celular
I. T. II. Sogayar, Mari Cleide, orientador.

574.88 CDD

I Q – U S P

**“Análise Funcional de Genes Regulados Por
Glicocorticóides na Reversão Fenotípica Tumoral-
Normal de Células ST1 de Glioma de Rato”**

ROBERTO BECHT FLATSCHART

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

Aprovado por:

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ - USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. CARLOS FREDERICO MARTINS MENCK
ICB - USP

Profa. Dra. EUGENIA COSTANZI
ICB - USP

Profa. Dra. VILMA REGINA MARTINS
CTP-HC

Prof. Dr. LUIZ FERNANDO LIMA REIS
LUDWIG

SÃO PAULO
20 DE FEVEREIRO DE 2001.

Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Biologia Celular e Molecular
Departamento de Bioquímica
Instituto de Química
Universidade de São Paulo

e contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

FAPESP (bolsa Processo 95/3626-8)
CNPq, ICGEB, PADCT II e PRP-USP

Agradecimentos

À Profa. Mari C. Sogayar.

Aos colegas e ao corpo técnico do Laboratório de Biologia Celular e Molecular.

Aos amigos, Cleber Vedoy, Eugenio Aztiria e Áurea Folgueras-Flatschart

A Carlos Aita, Irenice Cairo, Elisabeth Oliveira, Marcos Demasi e Débora de Souza

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Células da neuroglia e o crescimento de gliomas	1
1.2. Controle de proliferação e expressão gênica por glicocorticóides	3
1.3. O modelo celular C6/ ST1/ P7	5
1.4. Genes induzidos por glicocorticóides nas células ST1	5
1.4.1. Metalotioncínas	6
1.4.2. Glicoproteína α -1-ácida	7
1.4.3. Retrovírus endógenos	8
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo geral	10
2.2. Objetivos específicos	10
3. Material e Métodos	11
3.1. Manutenção e caracterização <i>inicial</i> dos plasmídeos C27, C36, C41 e CV2.	11
3.1.1. Transformação de <i>E. coli</i> com DNA plasmideal	11
3.1.2. Extração de DNA plasmideal	12
3.1.2.1. Bandeamento do DNA de “midipreps” em gradiente de CsCl -	13
3.1.2.2. Precipitação do DNA de “midipreps” com PEG	13
3.1.2.3. Seqüenciamento de DNA	13
3.1.2.4. Análise de seqüências	14
3.2. Cultura celular	15
3.3. “Northern-blots”	15
3.3.1. Extração de RNA celular	15
3.3.2. Eletroforese e transferência dos RNAs	16
3.3.3. Hibridização	16
3.3.4. Lavagem das membranas	17
3.4. Inibição de genes através de oligonucleotídeos “antisense”	17
3.4.1. Transfecção de oligonucleotídeos “antisense” através de lipossomos	18
3.4.2. Ensaio de incorporação de Timidina tritiada em DNA	19
3.4.3. Marcação de oligonucleotídeos com maleimido-fluoresceína	19
3.4.4. Transfecção com oligonucleotídeos fluorescentes e Cytofectin™	20
3.5. Preparo dos vetores pOPI3cat e pOPRSV1cat	20
3.6. Preparo dos cDNAs	21
3.6.1. Preparo dos insertos das Metalotioneína 1 e 2 por ligação a “adapters” <i>BamH I/Not I</i>	21
3.6.2. Preparo dos cDNAs por PCR (sub-clonagem intermediária em pUC18)	21
3.6.3. Recuperação dos cDNAs completos de glicoproteína α -1-ácida e <i>env</i>	22
3.6.3.1. Titulação e “Screening” da biblioteca de cDNA original	22
3.6.3.1.1. Preparo de “Plating bacteria” para titulação e “screening” da biblioteca	22
3.6.3.1.2. Titulação da biblioteca de cDNA	23
3.6.3.1.3. Triagem de biblioteca de cDNA	23

3.6.3.1.3.1. Adsorção dos fagos a membranas (“plaque lifts”)	23
3.6.3.1.3.2. Marcação isotópica de sondas de oligonucleotídeos e hibridização	23
3.6.3.1.4. Isolamento e eluição dos fagos	24
3.6.3.1.5. Seleção dos clones isolados (por PCR)	24
3.6.4. Clonagem dos cDNAs codificantes completos da glicoproteína $\alpha 1$ ácida e <i>env</i> por PCR	24
3.7. Isolamento dos cDNAs com sítios <i>Not I</i>	26
3.8. Clonagem e estabelecimento de linhagens transfectantes de ST1 e P7 expressando o repressor do Operon <i>Lac</i> de <i>E. coli</i> (<i>LacI</i>)	27
3.8.1. Determinação da sensibilidade das células ST1 e P7 a higromicina	27
3.8.2. Transfecção de ST1 e P7 com o repressor pCMV- <i>LacI</i> através de lipossomos	27
3.8.3. Seleção de transfectantes resistentes a higromicina	28
3.8.4. Clonagem celular	28
3.8.5. Extração de RNA de células em cultura	29
3.8.6. Imobilização do RNA em membrana	29
3.8.7. Preparo da sonda <i>LacI</i>	29
3.8.7.1. Isolamento do segmento de DNA correspondente ao Repressor <i>Lac</i>	29
3.8.7.2. Marcação não-isotópica da sonda	29
3.8.8. Triagem dos clones celulares transfectantes através de hibridização RNA-DNA (“Dot-blot”) (“Slot-blot”)	30
3.8.9. Confirmação da expressão do repressor <i>Lac</i> (“Northern-blot”)	30
3.9. Estabelecimento de linhagens de ST1 <i>LacI</i> e P7 <i>LacI</i> expressando mRNAs “sense” e “antisense”	30
3.9.1. Determinação da sensibilidade das células ST1 e P7 a geneticina	30
3.9.2. Transfecção de células ST1 <i>LacI</i> e P7 <i>LacI</i> com construções induzíveis	31
3.9.3. Triagem de transfectantes expressando Transcritos “sense” e “antisense”	31
3.9.3.1. Condições de cultura e indução com IPTG	31
3.9.3.2. Imobilização do RNA em membrana	31
3.9.4. Emprego de sondas fita-específicas para detecção dos transcritos “sense” e “antisense” nos transfectantes induzíveis com IPTG.	32
3.10. Estabelecimento de linhagens de ST1e P7 expressando mRNAs “sense” e “antisense” através de vetores retrovirais	32
3.10.1. Subclonagem dos cDNAs em pRetro-On	32
3.10.2. Transfecção de células empacadoras	33
3.10.3. Coleta e titulação dos sobrenadantes	33
3.10.4. Determinação da sensibilidade de células ST1 e P7 a puromicina	34
3.10.5. Infecção de células ST1 e P7 com retrovirus recombinantes	34
3.10.6. Seleção e clonagem de células infectadas	34
3.11. Purificação de anticorpos monoclonais contra gp70 e p15e de MuLV	35
3.12. Ensaio de expressão para triagem de clones celulares	35
3.13. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose	37
4. Resultados	39
4.1. Análise dos clones de cDNA C27, C36, C41 e CV2 isolados por VALENTINI, 1993.	39
4.2. Transfecção de células ST1 com oligonucleotídeos “antisense”	44
4.3. Preparo dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 (subclonagem intermediária em pUC18	51
4.3.1. Preparo dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 por ligação a adaptadores <i>BamH I</i> / <i>Not I</i>	51
4.3.2. Amplificação dos insertos das metalotioneínas 1 e 2 por PCR	51
4.3.3. Isolamento dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 com sítios <i>Not I</i>	52
4.4. Subclonagem dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 nos vetores de expressão pOPI3 e pOPRSVI	52

4.5. Obtenção dos cDNAs completos de glicoproteína α -1-ácida e <i>env</i>	54
4.5.1. Busca dos cDNAs completos da glicoproteína α 1 ácida e de <i>env</i> em biblioteca de cDNA	54
4.5.2. Síntese dos cDNAs completos da glicoproteína α 1 ácida e de <i>env</i> por RT-PCR	56
4.6. Estabelecimento de linhagens transfectantes de ST1 e P7 expressando o repressor do Operon <i>Lac</i> de <i>E. coli</i> (<i>LacI</i>)	64
4.7. Verificação da expressão do repressor <i>Lac</i> nos clones resistentes a higromicina	64
4.8. Estabelecimento de linhagens de ST1 <i>LacI</i> e P7 <i>LacI</i> expressando mRNAs “sense” e “antisense”	67
4.9. Estabelecimento de linhagens de células ST1 e P7 expressando mRNAs “sense” e “antisense” através de vetores retrovirais	76
4.9.1. Subclonagem dos cDNAs em pRetro-On	76
4.9.2. Infecção de células ST1 e P7 com retrovirus recombinantes	77
4.9.3. Padronização do ensaio de expressão para triagem de clones celulares	78
4.10. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose	83
4.11. Triagem funcional	84
4.11.1. Isolamento de clones na Triagem funcional	96
5. Discussão	102
6.1. Isolamento de genes diferencialmente expressos durante a transformação maligna	102
6.2. Análise funcional de genes relacionados a transformação e proliferação celular	103
6.3. Elaboração de construções induzíveis para análise funcional de genes envolvidos na reversão fenotípica de células ST1	103
6.4. Análise funcional de genes envolvidos na reversão fenotípica de células ST1 através de oligonucleotídeos “antisense”	104
6.5. Análise funcional de genes envolvidos na reversão fenotípica de células ST1 através de construções induzíveis	105
6.6. Triagem funcional	107
6.7. Significado da expressão dos genes em estudo na proliferação de tumores	108
6.7.1 – Metalotioneínas	108
6.7.2 – Glicoproteína α 1-ácida	109
6.7.3 – Retrovirus endógenos	111
6. Conclusões	113
7. Bibliografia	114
<i>Curriculum Vitae</i>	126

Lista de Figuras

Figura 1 – Aspecto morfológico de células ST1 transfectadas com 50nM de oligonucleotídeos “antisense” e tratadas por 24 h com hidrocortisona.

Figura 2 – Aspecto morfológico de células ST1 transfectadas com 100nM de oligonucleotídeos “antisense” e tratadas por 24 horas com hidrocortisona.

Figura 3 – Aspecto morfológico de células ST1 co-transfectadas com 100 nM de oligonucleotídeos “antisense”.

Figura 4 – Fluorescência de oligonucleotídeo, marcado com fluoresceína, 36h após a transfecção de células ST1.

Figura 5- Confirmação da subclonagem e determinação da orientação do cDNA de Metalotioneína 1 (C27) em pOPI3.

Figura 6 – Triagem (“screening”) de biblioteca de cDNAs para recuperação dos cDNAs completos da glicoproteína α -1-ácida e *env*.

Figura 7 - PCR com "primers" do cDNA e vetor para triagem de cDNAs recuperados da biblioteca.

Figura 8 - Triagem por PCR dos clones de glicoproteína α -1-ácida recuperados de biblioteca de cDNAs.

Figura 9 – RT-PCR para síntese do cDNA completo do gene da glicoproteína α 1-ácida

Figura 10 - RT-PCR para síntese do cDNA completo do gene *env*.

Figura 11 - Triagem por PCR de possíveis clones contendo o cDNA completo de glicoproteína α 1-ácida no vetor pGEM-T Easy.

Figura 12 - Triagem por PCR de possíveis clones contendo o cDNA completo de *env* no vetor pGEM-T Easy.

Figura 13 - “Dot blot” de RNA para triagem dos clones celulares de P7 e ST1 expressando *LacI*.

Figura 14 - “Northern-blot” com os RNAs de 12 clones de células P7 transfectadas com pCMV*LacI*, isolados por seleção com higromicina e apresentando sinais de hibridização intensos em “dot-blot”.

Figura 15 - “Slot blot” de RNA de clones de células ST1 transfectadas com pCMV-*LacI* e isoladas após seleção com higromicina).

Figura 16 - “Dot-blot” de RNA total de clones de células P7*LacI* transfectadas com construções "sense" de metalotioneína 2.

Figura 17 - "Dot-Blot" de diluições de RNA total de 1 clone celular de ST1*LacI* transfectada com construção "sense" de metalotioneína 1.

Figura 18 - "Dot-Blot" de diluições de RNA total dos clones de células ST1*LacI* transfectadas com construções "antisense" de metalotioneína 2.

Figura 19 - Crescimento de ST1*LacI* MT1A (clone 7) sobre substrato sólido e em suspensão de agarose.

Figura 20 - Crescimento de ST1*LacI* MT2A (clone 12) sobre substrato sólido e em suspensão de agarose.

Figura 21 - Crescimento de P7*LacI* MT2A (clone 10) sobre substrato sólido e em suspensão de agarose.

- Figura 22** - Crescimento em suspensão de agarose de células *ST1LacI* transfectadas com construções de Metalotioneína 1.
- Figura 23** - Crescimento em suspensão de agarose de células *ST1LacI* transfectadas com construções de Metalotioneína 2.
- Figura 24** - Crescimento em suspensão de agarose de células *ST1LacI* transfectadas com construções de Glicoproteína α -1-ácida.
- Figura 25** - Crescimento em suspensão de agarose de células *ST1LacI* transfectadas com construções de *env*.
- Figura 26** - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfectadas com construções de Metalotioneína 1.
- Figura 27** - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfectadas com construções de Metalotioneína 2.
- Figura 28** - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfectadas com construções de Glicoproteína α -1-ácida.
- Figura 29** - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfectadas com construções de *env*.
- Figura 30** - Crescimento de um clone de células *ST1LacI*, selecionado na triagem funcional, contendo construção “antisense” induzível de Metalotioneína 1 em pOPRSVI (clone 15).
- Figura 31** - Crescimento de um clone de células *ST1LacI*, selecionado na triagem funcional, contendo construção “antisense” induzível de Metalotioneína 2 em pOPRSVI (clone 35).
- Figura 32** - Crescimento de um clone de células *ST1LacI*, selecionado na triagem funcional, contendo construção “antisense” induzível de glicoproteína α -1-ácida em pOPRSVI (clone 48).
-

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Efeito da transfecção com oligos "antisense" (2-1000 nM) na incorporação de timidina tritiada em DNA em células ST1.

Gráfico 2 - Efeito da transfecção com oligos "antisense" (5-600 nM) na incorporação de timidina tritiada em DNA em células ST1.

Gráfico 3 - Padronização da diluição de uso dos anticorpos no ELISA imunocitoquímico (MICE).

Gráfico 4 – Expressão relativa de metalotioneínas, glicoproteína α -1-ácida e *env* em células ST1 (linhagem parental) através de ELISA imunocitoquímico (MICE) entre células tratadas e não tratadas com hidrocortisona.

Gráfico 5 – Expressão relativa e densidade celular de clones de células ST1 contendo construções "sense" induzíveis, selecionados na triagem por MICE.

Gráfico 6 - Expressão relativa e densidade celular de clones de células ST1 contendo construções "antisense" induzíveis, selecionados na triagem por MICE.

Gráfico 7 - Expressão de metalotioneínas e densidade celular em um clone de células ST1*LacI* contendo construção "antisense" induzível de Metalotioneína 1 em pOPRSVI (clone 15), selecionado na triagem funcional. Os níveis de expressão estão comparados com os das células parentais ST1*LacI*.

Gráfico 8 - Expressão de metalotioneínas e densidade celular em um clone de células ST1*LacI* contendo construção "antisense" induzível de Metalotioneína 2 em pOPRSVI (clone 35), selecionado na triagem funcional. Os níveis de expressão estão comparados com os das células parentais ST1*LacI*.

Gráfico 9 - Expressão de glicoproteína α -1-ácida e densidade celular em um clone de células ST1*LacI* contendo construção "antisense" induzível de glicoproteína α -1-ácida em pOPRSVI (clone 48), selecionado na triagem funcional. Os níveis de expressão estão comparados com os das células parentais ST1*LacI*.

Lista de Quadros

Quadro 1 - Esquema das construções dos clones C27, C36, C41 e CV2 no vetor pBluescript SK(-)

Quadro 2 - Desenho dos oligonucleotídeos "antisense".

Quadro 3 - Esquema dos adaptadores Bam HI/ Not I.

Quadro 4 - Esquema da subclonagem no vetor pUC18 e posição dos "primers" T3, M13 e "Not I primer adaptor". (adaptado do manual "ZAP cDNA Synthesis Kit", Stratagene e do catálogo GIBCO-BRL 1996)

Quadro 5 - Mapa do Vetor pGEM T Easy

Quadro 6 - Esquema dos vetores pOPI3 (a) e pOPRSVI (b). (adaptado do manual Stratagene).

Quadro 7 - Vetor pCMV*LacI* (esquema do manual Stratagene).

Quadro 8 - Vetor pRetro-On. Mapa circular e descrição dos marcadores e características de maior importância.

Quadro 9 - Alinhamento da seqüência determinada para o clone C27.

Quadro 10 - Alinhamento da seqüência determinada para o clone C36.

Quadro 11 - Alinhamento da seqüência determinada para o clone C41.

Quadro 12 - Seqüência determinada para o inserto correspondente ao clone CV2.

Quadro 13 - Alinhamento múltiplo de seqüências de *env* assemelhadas disponíveis no GenBank.

Quadro 14 - Alinhamento múltiplo de seqüências de *env* disponíveis no Genbank.

Quadro 15 - BlastN da seqüência do cDNA do gene da glicoproteína $\alpha 1$ ácida

Quadro 16 - BlastN da seqüência do cDNA do gene *env*

Quadro 17 - Viabilidade de transfectantes de ST1 expressando constitutivamente os cDNAs em estudo ao longo de 2 a 3 passagens.

Quadro 18 - Títulos (colônias puro^f em NIH-3T3) de retrovírus obtidos a partir da transfecção de células empacotadoras ϕ nx Amphi e ϕ nx Eco com construções de vetores derivados de retrovírus contendo os cDNAs dos genes em estudo.

Quadro 19 - Clones (puro r⁺) isolados de células ST1 e P7 infectadas por retrovírus contendo construções induzíveis de pRetro-On com os diferentes cDNAs.

Quadro 20 - Ensaio de crescimento em suspensão de agarose de células ST1*LacI* transfectadas com construções "sense" e "antisense" em pOPRSVI.

Quadro 21 - Ensaio de crescimento em suspensão de agarose de células P7*LacI* transfectadas com construções "sense" e "antisense" em pOPRSVI.

Lista de Abreviaturas

α -1 – glicoproteína α -1-ácida
A-1-A – glicoproteína α -1-ácida
ASO – (Antisense Oligo) oligonucleotídeo “antisense”
b – base
BSA – (Bovine Serum Albumin) soro albumina bovina
cDNA – (complementary DNA) DNA complementar, DNA cópia
cfu - (colony-forming unit) unidades formadoras de colônias
CMV. – (human Cytomegalovirus) citomegalovirus humano
dATP – (deoxy Adenosine-5'-Triphosphate) desoxi-adenosina trifosfato
dCTP – (deoxy Cytidine- 5'-Triphosphate) desoxi-citidina trifosfato
DEPC – (diethyl pyrocarbonate) dietil pirocarbonato
DMEM – (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium) meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA – (deoxy ribonucleic acid) ácido desoxi-ribonucleico
dNTP – (deoxy Nucleotide Triphosphate) desoxi-nucleotídeo trifosfato
DTT - (Dithiothreitol) ditioneitol
dUTP – (deoxy Uridine -5'-Triphosphate) desoxi-uridina trifosfato
EDTA – (Ethylenediaminetetraacetic acid) ácido etileno diamino tetra-acético
EGF – (Epidermal Growth Factor) fator de crescimento epidérmico
ELISA - (Enzyme Lynked ImmunoSorbent Assay) ensaio imunoenzimático em fase sólida
FGF – (Fibroblast Growth Factor) fator de crescimento de fibroblasto
g – aceleração da gravidade
GAPDH – (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GIF – (Growth Inhibitory factor) fator de inibição de crescimento
GRE – (Glucocorticoid Responsive Element) Elemento responsivo a glicocorticóide
h - horas
HSP - (Heat Shock Protein) Proteína de choque térmico
Hy – (hydrocortison) hidrocortisona
IFN – (Interferon) interferon
IGF – (Insulin-like Growth Factor) fator de crescimento semelhante a insulina
IgG – Imunoglobulina G
IL – (Interleukin) interleucina
IPTG - (Isopropyl-b-D-Thiogalactoside) isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
Kb - Kilo bases
Kpb - kilo pares de bases
LB – (Luria-Bertani Medium) Meio Luria-Bertani
LTR - (Long Terminal Repeat) repetição terminal longa
MCS – (Multiple Cloning Site) sítio múltiplo de clonagem
MICE – (Microtiter ImmunoCytochemical ELISA) ensaio imunocitoquímico enzimático em microplaca
MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) vírus do tumor mamário de camundongo
Mo-MSV - (Moloney Murine Sarcoma Virus) vírus do sarcoma murino de Moloney
MoMuLV – (Moloney Murine Leukemia Virus) vírus da leucemia muri na de Moloney

MOPS - (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid) ácido 3-n-morfolino propano sulfônico
mRNA – (messenger RNA) RNA mensageiro
Mt1 –(MT1) metalotioneína 1
Mt2 – (MT2) metalotioneína 2
NF-κB – (Nuclear Factor κB) fator nuclear κB
NLS - (Nuclear Localization Sequences) seqüências de localização nuclear
NZY – (NZ amino-Yeast Extract Medium)
OPD – (ortho Phenylene diamine) orto-fenileno diamina
pb – par de bases
PMA – (Phorbol-12-myristate-13-acetate)
PBS – (Phosphate Buffered Saline) salina tamponada com fosfato
PBSA - PBS sem cálcio ou magnésio
PCR – (Polymerase Chain Reaction) reação em cadeia pela polimerase
PDGF – (Platelet Derived Growth Factor) fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG – (Polyethylene Glycol) polietilenoglicol
pfu – (plaque forming unit) unidade formadora de placa de lise
PminCMV – (human Cytomegalovirus minimal promoter) promotor mínimo do Citomegalovírus humano
POPOP - 1,4-Bis[5-phenyloxazol-2-yl]benzene
PPO – (2,5-Diphenyloxazole)
puro r+ - fenótipo de resistente a puromicina
RNA– (ribonucleic acid) ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
RT-PCR – (Reverse Transcriptase – PCR) transcrição reversa - PCR
SDS – (Sodium Dodecyl Sulfate) Dodecil sulfato de sódio
SM – (Salt/Magnesium) (10 mM MgSO₄; 20 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl),
SNC – sistema nervoso central
SO – (Sense Oligo) oligonucleotídeo “sense”
SSC – (Standard Sodium Citrate) Solução de citrato de sódio padrão (150 mM NaCl, 15 mM Citrato de sódio, pH 7,0)
SSPE – (Standard Sodium Phosphate/EDTA) Solução de fosfato de sódio e EDTA padrão
TAE – (Tris/Acetate/EDTA Buffer) tampão Tris/Acetato/EDTA (40 mM Tris-acetato pH 7,8; 1 mM EDTA)
TBE – (Tris/Borate/EDTA Buffer) tampão Tris/Borato/EDTA (0.089M Tris pH 8,3, 0.089M Ácido Bórico, 0.0025M EDTA,)
TBS – (Tris Buffered Saline) Salina tamponada com Tris (50 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl)
TCA – (Tri-chloro acetic acid) ácido tricloroacético
TE – (Tris/EDTA) tampão Tris/EDTA (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA).
TNF – (Tumor Necrosis Factor) fator de necrose de tumor
TPA – (Tetradecanoyl Phorbol Acetate) tetra-decanoil forbol acetato
TRE - (Tetracycline-responsive element) elemento responsivo a tetraciclina
Tris - (Tris-[hydroxymethyl]amino-methane) Tris-hidroximetil amino metano
UV – ultra violeta
X-gal – (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galacto-piranosídeo
SFB -Soro Fetal Bovino

Resumo

As linhagens celulares ST1 e P7 (ARMELIN e ARMELIN, 1983), isoladas no laboratório a partir da linhagem C6 de glioma de rato, constituem modelos interessantes para o estudo da ação de glicocorticóides por mostrarem, respectivamente, hiperresponsividade e resistência ao tratamento com o hormônio quando observados morfologia, tempo de dobramento, densidade de saturação, crescimento em suspensão de agarose e tumorigenicidade em camundongos “nude”.

Em trabalhos anteriores, foram isoladas de bibliotecas de cDNA de células ST1, através de hibridização diferencial, seqüências correspondentes a metalotioneína 1, metalotioneína 2, glicoproteína α -1 ácida e pelo menos um transcrito de um retrovírus endógeno (clones C27, C36, C41 e CV2, respectivamente) (VALENTINI e ARMELIN, 1996).

Para comprovar o envolvimento das proteínas Metalotioneína 1, Metalotioneína 2, Glicoproteína α -1-ácida e *env* na reversão fenotípica observada nas células ST1 tratadas com hidrocortisona, duas abordagens diferentes foram usadas: a inibição da expressão dessas proteínas com oligonucleotídeos ou construções “antisense” e a super-expressão dessas proteínas usando vetores de expressão induzíveis.

Nos ensaios de crescimento em suspensão de agarose, levados a cabo com populações de células transfectadas com construções induzíveis contendo os cDNAs de interesse nas orientações “sense” ou “antisense”, o padrão de crescimento das células transfectadas, na ausência ou na presença de hidrocortisona e/ou indutor permitiu confirmar o possível papel das proteínas correspondentes na reversão fenotípica induzida por hidrocortisona. Os resultados mostraram que transcritos “antisense” de glicoproteína α -1-ácida, metalotioneína 2, metalotioneína 1 e *env* foram capazes de inibir, em maior ou menor grau, o efeito de hidrocortisona em células ST1 transfectadas. Por outro lado, a indução da expressão de Metalotioneína 1 e *env* foram capazes de inibir, parcialmente, a formação de colônias em células ST1 e P7 transfectadas com construções “sense”.

Summary

ST1 and P7 cells, isolated in the laboratory from the C6 rat glioma cell line (ARMELIN and ARMELIN, 1983), constitute interesting models for the study of glucocorticoids action showing, respectively, sensibility and resistance to the hormone when observed morphology, doubling time, saturation density, growth in agarose suspension and tumorigenicity in nude mice.

In a previous work, ESTs sequences corresponding to metallothionein 1, metallothionein 2, α -1-acid glycoprotein and the *env* gene of a endogenous retrovirus were isolated (VALENTINI and ARMELIN, 1996).

To prove the involvement of metallothioneins 1 and 2, α -1-acid glycoprotein and *env* in the observed phenotypical reversion in ST1 cells dealt with hydrocortisone, two different approaches had been used: the inhibition of the expression of these proteins with antisense cDNA constructs and the overexpression of these proteins using inducible vectors.

In agarose suspension growth assay, performed with populations of cells transfected with inducible constructs carrying the cDNAs in sense and antisense orientations, the growth of the transfected cells, in the absense or the presence of hydrocortisone and / or inducer allowed us to confirm the role of the corresponding proteins in the hydrocortisone-induced phenotypic reversion. The results showed that antisensa transcripts of α -1-acid glycoprotein, metallothionein 2, metallothionein 1 and *env* inhibited, in greater or minor degree, the effect of hydrocortisone in transfected ST1 cells. On the other hand, induction of Metallothionein 1 and *env* expression was able to inhibit, partially, the formation of colonies from ST1 and P7 cells transfected with sense constructs.

1. Introdução

1.1. Células da neuroglia e o crescimento de gliomas

O tecido cerebral é constituído por dois grupos predominantes de células, que são classificados funcionalmente como células nervosas, os neurónios, que transmitem sinais eléctricos e células gliais, a neuroglia, que envolve os neurónios e os isolam dos numerosos vasos sanguíneos que irrigam o cérebro. A neuroglia constitui metade da massa cerebral e as células que a compõe superam em quase 10 vezes o número de neurónios, cumprindo papéis acessórios ao metabolismo, função e regeneração do sistema nervoso central (SNC), da mesma forma que o tecido conjuntivo. De acordo com seu formato, tamanho e interação com os neurónios, os tipos celulares que compõe a neuroglia são classificados como astrócitos (50% das células gliais), oligodendrócitos (40%), endimócitos (5%) e células microgliais (até 5%) - (KUMARI, 2000).

Os endimócitos são células cuboidais ou colunares derivadas do epitélio germinativo do tubo neural, sendo semelhantes a células epiteliais. Ao contrário de outras células epiteliais, no entanto, as células endimais não se posicionam sobre uma membrana basal, mas possuem processos afilados que se entrelaçam com os processos dos astrócitos subjacentes. No SNC, os endimócitos formam a camada que recobre as cavidades cerebrais denominadas ventrículos e o canal central da medula espinhal. Na região denominada plexo coróide, os endimócitos próximos à *pia mater* (a mais interna das meninges, que recobre todo o cérebro e a medula espinhal) mostram-se especialmente diferenciados, exibindo cílios e secretando o fluido cérebro-espinhal (BLOOM e FAWCETT, 1994).

As células microgliais não tem a mesma origem das outras células da glia, sendo provenientes da mesoderme, derivadas do mesênquima da medula óssea. Seu acesso ao SNC ocorre através de vasos sanguíneos, nos estágios iniciais de desenvolvimento do cérebro. As células microgliais são células da linhagem monocítica do sangue, derivadas de macrófagos e, desta forma atuam de maneira similar às células dendríticas apresentadoras de antígeno do sistema imune. Dispersas por todo o cérebro, as células da microglia geralmente apresentam-se pequenas, alongadas, com vários processos ramificados e um núcleo em forma de bastão. Células microgliais com estas características são chamadas ramificadas e estão quiescentes. Por ocasião de infecções ou trauma cerebral, as células tornam-se arredondadas e fagocíticas e são chamadas células microgliais reativas ou células de Gitter. A ativação por dano também faz as células se dividirem ativamente, expressar receptores de complemento, antígenos do MHC e apresentar antígenos. Atuando como macrófagos, estas células participam da remoção de microorganismos e de células nervosas danificadas (BLOOM e FAWCETT, 1994).

Os oligodendrócitos constituem a segunda maior população de células do cérebro, muito abundantes, em especial na matéria branca e em torno dos neurónios, comumente

dispostos em fileiras. São células volumosas, com 6 a 8 μm de diâmetro, citoplasma denso com abundantes microtúbulos e retículo endoplasmático evidente, além de um núcleo pequeno, arredondado e denso, semelhante ao de linfócitos. O citoplasma possui poucos processos curtos e pouco ramificados, que se estendem na direção dos neurônios próximos, envolvendo os axônios. Os oligodendrócitos são responsáveis pela formação da mielina no SNC. Cada célula é capaz de envolver uma secção de axônio de diversos neurônios, recobrando-a com mielina, enquanto outras porções do mesmo axônio podem ser mielinizadas por oligodendrócitos consecutivos, formando uma bainha. Oligodendrócitos são capazes de produzir vários fatores neurotróficos como nerve growth factor (NGF), neurotrophin-3 e glial-derived growth factor (GDNF).

Os astrócitos, por fim, constituem a maior parte da glia, distribuídos tanto na matéria branca como na cinzenta, em toda a volta dos vasos sanguíneos e dos neurônios, com exceção das fendas sinápticas. Os astrócitos são células grandes, com 6 a 12 μm de diâmetro, exibindo um núcleo oval ou ligeiramente irregular com a cromatina bem dispersa. O citoplasma possui diversos processos muito finos, irradiando em todas as direções e chegando a circundar ou tomar contato com até 99% da superfície dos capilares do cérebro. Os processos contêm uma forma de filamento intermediário do citoesqueleto, composto por uma proteína específica de astrócitos, denominada Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Na superfície do cérebro, os processos de vários astrócitos se diferenciam, formando pedículos que se fundem com a *pia mater*, de modo a recobri-la totalmente como uma camada que isola o SNC das meninges. Pedículos também envolvem todos os capilares que irrigam o cérebro, evitando o contato direto entre neurônios e os vasos sanguíneos. A interação destes processos com o endotélio vascular cerebral restringe a permeabilidade das "tight junctions" entre as células endoteliais, o que constitui a barreira hemato-encefálica. (BLOOM e FAWCETT, 1994). Os pedículos de astrócitos também cumprem papel importante no isolamento elétrico de neurônios não mielinizados e da membrana nodal exposta dos axônios (junto aos nodos de Ranvier). Entre os processos e pedículos, o citoplasma dos astrócitos forma uma ponte, por onde fluem compostos solúveis e íons das paredes capilares para o espaço extracelular em torno dos neurônios. O citoplasma também acumula uma grande reserva de glicogênio que é hidrolisado no lactato consumido pelos neurônios. Os astrócitos removem íons de potássio do espaço extracelular e, como ligam-se uns aos outros através de "gap junctions", formam um reservatório dinâmico destes íons, que podem ser redistribuídos remotamente como em uma rede. Os astrócitos executam uma função crítica no metabolismo do glutamato e do ácido gama aminobutírico, que são neurotransmissores. O glutamato, cuja presença em altas concentrações no espaço sináptico é tóxica para os neurônios, é captado pelos astrócitos que o convertem a glutamina, liberada para os neurônios, que a convertem novamente para glutamato, secretando-o como neurotransmissor.

Astrócitos sintetizam vários fatores neurotróficos bastante conhecidos, como neurotrofina-3, NGF e GDNF, que se supõe serem secretados, atuando em neurônios durante o desenvolvimento do SNC e na manutenção do tecido nervoso maduro. Citocinas como interleucinas 1 e 2 (POLITIS e LINDSAY, 1988) também são secretadas, indicando possível papel destas células no controle da resposta inflamatória, fagocítica e proliferativa. Supõe-se que ao longo do desenvolvimento embrionário, as células da glia direcionam a

migração dos neurônios e o crescimento de seus axônios e dendritos. Por ocasião de infecções e traumatismos que causam danos ao SNC, os neurônios e outras células mortas e danificadas são removidos pela microglia e por astrócitos fagocíticos, sendo a lacuna reparada pela proliferação de astrócitos, que formam a cicatriz glial.

Os neurônios, por serem essencialmente pós-mitóticos, não estão associados às neoplasias do SNC, com a exceção dos meduloblastomas infantis, que são tumores provenientes de células precursoras de neurônios (LOUIS *et al.*, 2001). Por outro lado a neuroglia retém a capacidade mitótica e esta plasticidade reflete-se também na possibilidade de proliferar de maneira descontrolada, originando tumores coletivamente chamados gliomas. Entre os tumores primários do cérebro, 90% são de origem glial. No entanto, os tipos celulares que originam a maioria dos tumores primários não são conhecidos nem reconhecíveis pela classificação histológica atual (LOUIS *et al.*, 2001). De acordo com o grau de malignidade, os gliomas de suposta origem astrocítica são classificados como astrocitoma, astrocitoma anaplástico e glioblastoma multiforme (MORRIS, 1989). Os astrocitomas anaplásticos e glioblastomas multiformes são os tumores intracranianos primários mais comuns entre adultos, enquanto na população pediátrica, os meduloblastomas, astrocitomas e astrocitomas anaplásticos pilocíticos representam em conjunto a segunda maior causa de morte. Os glioblastomas multiformes correspondem a até 40% de todos os tumores intracranianos primários.

Apesar do progressivo avanço no tratamento do câncer em diferentes tecidos, os tumores malignos no cérebro ainda estão entre as formas mais agressivas e fatais de câncer conhecidas (BECKER *et al.*, 1998). Mesmo com o emprego de abordagens terapêuticas drásticas como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o prognóstico para os portadores de gliomas é sempre desfavorável. A sobrevida descrita para portadores de glioblastoma multiforme é de 17 semanas (BADIE e SCHARTNER, 2001) a um ano (DAÍ e HOLLAND, 2001), sendo a recorrência do tumor, no local originário ou na sua proximidade, a principal responsável por esta baixa expectativa de vida.

1.2. Controle de proliferação e expressão gênica por glicocorticóides

Os hormônios glicocorticóides tem importância no desenvolvimento do cérebro, por interferirem na proliferação e diferenciação celular (mcEWEN *et al.*, 1986) e tem sido amplamente empregados como terapia adjuvante no tratamento de gliomas, por diminuírem a progressão tumoral e reduzirem a pressão intracraniana (FRESHNEY, 1984). Apesar da sua importância, o emprego terapêutico de glicocorticóides é bastante empírico, e os mecanismos que medeiam seus efeitos benéficos no tratamento do câncer ainda não estão claros (KAUP *et al.*, 2001).

Hormônios e fatores de crescimento desempenham papéis-chave regulando diversos aspectos da proliferação e diferenciação (EASTMAN-REKS e VEDECKIS, 1986; RAMEH e ARMELIN, 1992). Eventos regulatórios do crescimento celular podem envolver

uma complexa rede de sinalização intercelular, na qual atuam conjuntamente diferentes fatores de crescimento, hormônios esteróides como o cortisol e hormônios peptídicos como a insulina (ARMELIN, 1989; CROSS e DEXTER, 1991). Fatores de crescimento ligam-se a receptores na membrana plasmática, desencadeando um sinal para o núcleo através de proteínas regulatórias presentes no citoplasma. A resposta a este sinal envolve mudanças na expressão gênica (COCHRAN *et al.*, 1983; COCHRAN *et al.*, 1984; ALMENDRAL *et al.*, 1988), que muitas vezes são dependentes da translocação de receptores nucleares ligados a hormônios (BEATO *et al.*, 1996). O desenvolvimento celular normal é consequência destes diferentes estímulos, que favorecem de forma controlada a proliferação ou a diferenciação. Alterações nestes eventos de sinalização intercelular que resultem em quebra do balanço entre proliferação e diferenciação podem resultar em predominância da atividade proliferativa, desencadeando a tumorigênese (CROSS e DEXTER, 1991).

A participação de glicocorticóides em eventos relacionados a proliferação é bastante conhecida em vários tecidos e modelos celulares. Corticóides são capazes de inibir a proliferação de muitos tipos celulares, como linfócitos-T (PALACIOS e SUGAWARA, 1982) e fibroblastos (DURANT *et al.*, 1986). Tumores induzidos por carcinógenos em pulmão de camundongo (DROMS *et al.*, 1993), pele de camundongo (STRAWHECKER e PELLING, 1992) e cólon de rato (DENIS *et al.*, 1992) também tem o seu crescimento inibido por estes hormônios. No caso de células transformadas em cultura, a resposta frente a glicocorticóides tanto pode ser inibição quanto proliferação exacerbada (o'BANION *et al.*, 1992), dependendo do tipo celular, condições de cultura, do agente transformante e da influência potencial do hormônio sobre este agente. Por exemplo, hidrocortisona pode facilitar a transformação de células epiteliais humanas infectadas pelo vírus do sarcoma murino de Kirsten (DURST *et al.*, 1989), por ser potente ativador de transcrição gênica a partir de alguns LTRs.

Ao contrário dos hormônios peptídicos, que possuem receptores na membrana plasmática, os hormônios esteróides possuem receptores intracelulares que permanecem no citoplasma ligados a um complexo multimérico em torno da proteína Hsp90 ("Heat shock protein") que encobre as NLSs ("Nuclear Localization Sequences") presentes na molécula do receptor (YAMAMOTO, 1985; BEATO, 1996). O complexo denominado foldossomo, inclui as proteínas Hsp90, Hsp56, Hsp70, p23 e eventuais ciclofilinas, mantendo o receptor em uma conformação acessível ao ligante (BEATO, 1996). A ligação do hormônio ao receptor, desfaz a interação deste com pelo menos uma parte do foldossomo, expondo as NLSs e permitindo que o complexo hormônio-receptor migre para o núcleo, ligando-se como dímeros a seqüências que contém GREs ("Glucocorticoid Responsive Elements") em seus promotores (SILVER, 1991; BARNES, 1995; BEATO, 1996).

Estima-se que quase uma centena de genes seja regulada diretamente por esteróides, enquanto muitos outros possam ainda ser indiretamente controlados através da interação com outros fatores de transcrição (BARNES, 1995). A interação dos GRs com promotores ocorre em seqüências palindrômicas com o consenso GGTACAnnnTGTTCT ou, no caso de trans-repressão, ATYACnnTnTGATCn (o chamado GRE negativo), através de interações do tipo "zinc finger". Interações com seqüências distintas destes consensos podem ocorrer nos chamados GREs compostos, que requerem a ligação conjunta de outros

fatores de transcrição, como AP1, CREB, ATF e NF-AT, tornando a regulação a partir destes promotores muito mais complexa e variável (BARNES, 1995; BEATO, 1996).

1.3. O modelo celular C6/ ST1/ P7

A linhagem astrocítica C6 foi estabelecida em cultura a partir de um glioma quimicamente induzido em rato, por injeção de N-nitrosometiluréia. (BENDA *et al.*, 1968). Hormônios glicocorticóides alteram a velocidade de proliferação das células C6 e reduzem sua densidade de saturação assim como sua eficiência de plaqueamento em substrato sólido (ARMELIN e ARMELIN, 1978; ARMELIN e ARMELIN, 1983; FRESHNEY, 1984). O tratamento com hidrocortisona também leva a uma redução reversível do aspecto transformado destas células.

A partir da linhagem C6, foram obtidos variantes sensíveis (P2 e ST1) e resistentes (P5, P7 e P11) a glicocorticóides. Os variantes ST1 e P7, em particular (ARMELIN *et al.*, 1982; ARMELIN e ARMELIN, 1993), são tidos como modelos interessantes para o estudo da ação de glicocorticóides por exibirem, respectivamente, hiper-responsividade e resistência ao tratamento com o hormônio. Hidrocortisona é capaz de inibir significativamente o crescimento da variante celular ST1 em monocamada. Após 14-15 horas da adição de hidrocortisona, o tempo de dobramento das células ST1 aumenta de 12 para 24 horas (ARMELIN *et al.*, 1983). Além disso, hidrocortisona restaura reversivelmente a dependência de soro, a densidade de saturação e a necessidade de ancoragem, além de suprimir a formação de tumores em camundongos *nude*, o que caracteriza uma reversão fenotípica tumoral-normal completa, tanto *in vitro* como *in vivo* (ARMELIN e ARMELIN, 1978). Em contrapartida, a linhagem celular P7 mostra-se resistente ao tratamento com o hormônio em culturas mantidas em monocamada e em suspensão de agarose. Paralelamente à perda do fenótipo tumoral, observou-se que o tratamento com hidrocortisona induz nas células ST1 a produção de partículas de retrovírus do tipo C (ARMELIN *et al.*, 1983).

Estes sistemas celulares estão sendo empregados no laboratório para analisar os mecanismos moleculares da ação anti-tumoral dos hormônios glicocorticóides. Como a reversão fenotípica de células ST1 promovida por hidrocortisona pode revelar a ação de genes que estejam atuando como supressores de tumor, uma grande parte dos esforços do laboratório tem sido dedicada à clonagem de genes associados a este processo.

1.4. Genes induzidos por glicocorticóides nas células ST1

O isolamento de genes possivelmente envolvidos na reversão fenotípica tumoral-normal e associados ao controle da proliferação celular, baseia-se na possibilidade de

detectar ou isolar diretamente cDNAs correspondentes aos transcritos expressos em culturas de células ST1 tratadas com o hormônio e que não estão sendo expressas (ou que são menos expressas) nas culturas não tratadas. Técnicas como hibridização diferencial de biblioteca de cDNA, “differential display” de mRNA, hibridização subtrativa de cDNAs e subtração de cDNAs por supressão seletiva de PCR, são as ferramentas que tem sido exploradas até o momento.

Utilizando uma biblioteca de cDNA de células C6/ST1 tratadas com hidrocortisona por 5 horas na presença de inibidor de síntese protéica (cicloheximida) e a metodologia de hibridização diferencial, foram isolados cDNAs oriundos de transcritos celulares (C27 que corresponde ao gene de metalotioneína 1; C41, correspondente a metalotioneína 2 e C36, que corresponde à glicoproteína- α -1-ácida de rato) e um cDNA de transcrito viral (CV2), homólogo a um segmento do locus *env* de retrovírus murino (VALENTINI, 1993; VALENTINI e ARMELIN, 1996).

Através de “differential-display”, novamente foram isolados fragmentos de cDNA correspondentes a transcritos de metalotioneína I (SASAHARA *et al.*, 1996).

Mais recentemente, empregando-se subtração por supressão de PCR, diversos outros transcritos foram identificados: talina, calciclina, oncogene *Sno*, dUTPase, proteína A20, tenascina X e transcritos com homologia a retrovírus do tipo A e C (VEDOY e ARMELIN, 1997; VEDOY, 2000 – Tese; VEDOY *et al.*, em preparação).

1.4.1. Metalotioneínas

Metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteína, que tem a capacidade de se ligar a alguns metais pesados. Vários agentes induzem a expressão destas proteínas, entre eles: metais pesados, hormônios glicocorticóides, citocinas (IL-1 e IFN gama) e TPA (KARIN, 1985; HAMER, 1986; KÄGI e SCHAFFER, 1988, BREMNER e BEATTIE, 1990). Por se ligarem a metais, as metalotioneínas podem estar associadas à proteção celular contra metais pesados, ao controle do metabolismo de zinco e cobre e à regulação do metabolismo celular envolvendo enzimas que necessitam de zinco e cobre (KARIN, 1985; BREMNER e BEATTIE, 1990; EBADI, 1991). Estas proteínas também estão associadas com detoxificação de radicais livres do tipo hidroxila *in vitro* (THORNALLEY e VASAK, 1985) e peróxidos *in vivo* (DALTON *et al.*, 1994).

O envolvimento de metalotioneínas com proliferação celular foi evidenciado pela observação de que células de leucemia mielomonocítica aguda apresentam rearranjo no cromossomo 16, envolvendo a quebra no gene de metalotioneína (le BEAU *et al.*, 1985). Procurando explicar este fenômeno, foi sugerido que durante esse rearranjo ocorreria a ativação de um proto-oncogene por elementos regulatórios dos genes de metalotioneínas ou, então, que a própria perturbação na expressão de metalotioneínas poderia estar envolvida no desenvolvimento tumoral (KARIN, 1985).

A observação de que fibroblastos humanos quiescentes contém níveis menores de mRNA para metalotioneínas do que fibroblastos em proliferação, também mostra a possível participação destas proteínas no controle de crescimento celular (KARIN, 1985). As metalotioneínas estão associadas, ainda, com proliferação de queratinócitos (KARASAWA *et al.*, 1991), sendo expressas em altos níveis em papilomas induzidos por TPA (HASHIBA *et al.*, 1989; ISLAM e TOFTGARD, 1992).

O papel das metalotioneínas na proliferação celular foi evidenciado por MULDER *et al.* (1992), que verificaram menor expressão de metalotioneínas nas metástases hepáticas de câncer colo-retal que nas células hepáticas normais. Tumores hepáticos induzidos por nitrosodietilamina apresentam baixos níveis de metalotioneínas e a expressão destas proteínas é reduzida durante a transformação espontânea de uma linhagem de células hepáticas (CHERIAN *et al.*, 1993). Estas observações são contrárias às anteriores, que mostram células normais expressando mais metalotioneínas do que as células tumorais.

Interleucina-1 promove a proliferação de células U373MG, derivadas de astrocitoma humano. O tratamento destas células com IL-1 ou metal pesado leva a um aumento na expressão de metalotioneínas (KIKUCHI *et al.*, 1993), sugerindo sua participação na proliferação de gliomas.

1.4.2. Glicoproteína α -1-ácida

Proteínas de fase aguda regulam a resposta imune inespecífica, funcionando como mediadores e inibidores de processos inflamatórios, agindo como carreadoras de produtos gerados no processo inflamatório ou participando do reparo e cicatrização do tecido lesado (IBELGAUFTS, 1999). A síntese das proteínas de fase aguda pelos hepatócitos normalmente é estimulada por citocinas secretadas pelas células apresentadoras de antígeno. Como resultado da produção de proteínas de fase aguda, diversos processos como febre, fagocitose, secreção de citocinas, gluconeogênese e produção de cortisol, insulina e hormônio adrenocorticotrófico são estimulados (van MIERT, 1991). Algumas das proteínas de fase aguda atuam como citocinas, ativando mitogênese ou fornecendo sinais quimiotáticos.

A glicoproteína α -1 ácida é uma das proteínas de fase aguda fortemente induzidas *in vivo* por glicocorticóides (SAVOLDI *et al.*, 1997). Linhagem celulares, como hepatoma de rato, também podem ter a expressão desta proteína induzida por dexametasona, um glicocorticóide sintético (BAUMANN *et al.*, 1993). Algumas citocinas (IL-1, TNF α e IL-6) regulam a produção desta proteína (BAUMANN e GAULDIE, 1990; SAVOLDI *et al.*, 1997) que, por sua vez, pode ter sua expressão exacerbada pela administração concomitante de glicocorticóides (van MIERT, 1991). O promotor do gene glicoproteína α -1 ácida possui diferentes elementos de resposta como C/EPB, Barbie Box, Sp1 e MRE (FOURNIER *et al.*, 1994; SAVOLDI *et al.*, 1997; YANGOU *et al.*, 1991), indicando uma variedade de possíveis respostas, frente à combinação de diversos estímulos.

Entre os possíveis papéis da glicoproteína α -1 ácida estão a capacidade de alerar a ativação de neutrófilos no curso do processo inflamatório (van MIERT, 1991), a redistribuição de metais como zinco e cobre no soro e tecidos, ao longo da prenhez e organogênese de embriões de rato (DASTON *et al.*, 1994), cooperando com metalotioneínas e imunossupressão por inibição de proliferação de linfócitos-T (SHIYAN *et al.*, 1993).

1.4.3. Retrovírus endógenos

Tumores podem ser originados a partir de danos genéticos induzidos em algumas poucas células pela ação de agentes físicos, químicos e por determinados vírus, causando a perda de controle do crescimento celular normal (BULL *et al.*, 1989). Alguns retrovírus possuem a capacidade de desencadear rapidamente o processo tumoral devido à presença de oncogenes no seu genoma. Apesar de codificados pelo genoma viral, estes oncogenes não participam do processo de replicação do vírus mas tomam parte na patogenia induzida no organismo hospedeiro (COOPER, 1990; DULBECCO, 1988). Genes homólogos a estes oncogenes virais são expressos ao longo do ciclo celular normal ou em determinadas etapas de diferenciação. Mutações na região codificante ou promotora destes proto-oncogenes, assim como a integração de provírus, permitiria que a temporalidade, a intensidade e a função da expressão destas proteínas escapasse do controle celular (DULBECCO, 1988; ARMELIN, 1989; COOPER, 1990; LEWIS, 1991). Esta hipótese tem sido confirmada pois a maioria dos proto-oncogenes codifica proteínas relacionadas a eventos da proliferação celular (BISHOP, 1991; CANTLEY *et al.*, 1991). Foi mostrado, por exemplo, que o PDGF presente no soro, induz a expressão de alguns proto-oncogenes (*c-fos*, *c-myc*, *c-jun* e *c-rel*), evidenciando a participação destes proto-oncogenes na proliferação celular normal (COCHRAN *et al.*, 1984; ALMENDRAL *et al.*, 1988; LAMPH *et al.*, 1988; BULL *et al.*, 1989). O desenvolvimento de tumores a partir de alguns retrovírus que não possuem oncogenes no seu genoma, depende da integração viral próxima a um proto-oncogene (DULBECCO, 1988; COOPER, 1990).

Retrovírus endógenos diferem daqueles adquiridos por infecção por estarem integrados como provírus no genoma de células germinativas de várias espécies de vertebrados sendo, portanto, transmitidos verticalmente. Estes vírus podem ser transcritos de forma espontânea ou através de agentes indutores, podendo acarretar o desenvolvimento de infecção produtiva que, na maioria das vezes, é benigna (WEISS, 1982). Os retrovírus endógenos parecem não estar comumente associados a oncogenes mas sua expressão pode ser importante para o desenvolvimento celular normal. Foi sugerido, por exemplo, que a expressão do gene *env* é essencial para a diferenciação de linfócitos murinos (WEISS, 1982).

Diversos promotores de retrovírus possuem GREs. Os LTRs (Long Terminal Repeat) dos vírus MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) e Mo-MSV (Moloney Murine Sarcoma Virus) apresentam GREs, sendo induzidos por hormônios glicocorticóides. A dexametasona, um glicocorticóide sintético, aumenta a expressão de MMTV (PARKS *et al.*, 1974; RINGOLD, 1983) levando à formação de adenocarcinomas mamários. No caso

de retrovírus endógenos, HELMBERG *et al.* (1990) verificaram que um dos genes induzidos por estes hormônios correspondia à p15E, levando os autores a sugerir a participação desta proteína na imunossupressão induzida por glicocorticóides.

Para compreender melhor o fenômeno de reversão fenotípica induzida por glicocorticóides em células derivadas de glioma, este trabalho procurou avaliar o papel das proteínas codificadas pelos genes metalotioneína 1, metalotioneína 2, glicoproteína α -1 ácida e ao transcrito *env* de retrovírus endógeno (VALENTINI e ARMELIN, 1996). As estratégias adotadas para este estudo foram a inibição de expressão destes genes nas células ST1 e P7 e sua super-expressão nas células ST1.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Partindo dos clones C27, C36, C41 e CV2, correspondentes a genes diferencialmente expressos em células ST1 mantidas na presença de glicocorticóides, este trabalho teve como objetivo comprovar o envolvimento das proteínas Metalotioneína 1, Metalotioneína 2, Glicoproteína α -1-ácida e *env* na reversão fenotípica induzida por hormônios glicocorticóides em células ST1, através da análise funcional de seus genes correspondentes.

2.2. Objetivos específicos

a) Determinar a seqüência de nucleotídeos dos clones C27, C36, C41 e CV2 visando obter os cDNAs completos correspondentes

Verificar a integridade de cada um dos clones de cDNA através de seqüenciamento e a busca dos cDNAs completos. Definir nesta etapa as estratégias de subclonagem dos cDNAs nos vetores de expressão escolhidos (seleção das enzimas de restrição, dos vetores, necessidade de empregar adaptadores ou PCR, etc.) para transfecção em células ST1 e P7.

b) Analisar o efeito de oligonucleotídeos ou construções “antisense” dirigidos aos transcritos de Metalotioneína 1, Metalotioneína 2, Glicoproteína α -1-ácida e *env*, nas células ST1 tratadas com hidrocortisona.

Se a expressão destes genes é crítica para a reversão fenotípica das células ST1 mantidas sob a ação de glicocorticóides, a inativação da expressão de um ou mais destes genes através da ligação de oligonucleotídeos ou transcritos "antisense" a seus mRNAs, deveria bloquear a tradução das proteínas correspondentes, podendo tornar estas células refratárias à ação do hormônio.

c) Analisar o efeito da super-expressão dos genes codificantes de Metalotioneína 1, Metalotioneína 2, Glicoproteína α -1-ácida e *env*, nas células ST1 e P7

Se os produtos destes genes são importantes na reversão fenotípica do variante ST1 que é hiper-responsivo a glicocorticóides, é de se esperar que a super-expressão destas seqüências mimetize a ação hormonal. Além disso, se um destes genes estiver envolvido no mecanismo de resistência da variante P7 à ação de hidrocortisona, espera-se que a super-expressão destes genes leve ao aparecimento de características fenotípicas normais quando tratadas com hidrocortisona.

Nas etapas de subclonagem em plasmídeos contendo o marcador *LacZ*, foram adicionados ao meio de cultura isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo - IPTG (0,5 mM) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galacto-piranosídeo - X-gal (40 μ g/mL). A partir de colônias isoladas das placas, culturas foram crescidas durante a noite em tubos com caldo LB ou "Terrific broth" (TARTOF e HOBBS, 1987) contendo ampicilina.

3.1.2. Extração de DNA plasmideal

O DNA plasmideal foi isolado por diferentes metodologias, de acordo com a quantidade ou pureza necessárias para os diferentes experimentos.

As preparações de DNA em pequena escala para verificação de clonagens, digestões analíticas com enzimas de restrição e seqüenciamento rápido de construções foram feitas a partir de culturas de 3 mL em LB ou "Terrific broth" com ampicilina, inoculadas com uma colônia transformante bem isolada das placas de LB ágar.

Para estas "minipreps", as bactérias de 1,5 mL da cultura foram centrifugadas e submetidas a lise alcalina, sendo o DNA plasmideal purificado por adsorção a partículas de sílica em presença de iodeto de sódio - kit FlexiPrep (Amersham-Pharmacia Biotech - Upsala - SE) ou por colunas de troca iônica Qiaprep spin tip20 (Qiagen - Hilden - D), conforme as instruções dos fabricantes. Foram empregadas, também, "minipreps" convencionais por lise alcalina / extração com fenol clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1988), seguidas (ou não) de purificação por precipitação com polietilenoglicol (PEG), de acordo com protocolo do Joslin Diabetes Center (Boston, MA - USA) para purificação de "templates" para seqüenciamento fluorescente automatizado, disponível em <http://134.174.243.149/core/pegprotocol.html>. O DNA plasmideal purificado foi diluído em 10 a 30 μ L de TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA).

Para preparo de estoques de vetores, transfecções, seqüenciamento completo dos cDNAs e preparo de sondas para hibridização, foram feitas preparações de plasmídeos em média escala, a partir de culturas crescidas em 50 mL de meio de cultura "Terrific broth" contendo ampicilina, inoculadas com 500 μ L de pré-culturas caracterizadas após "miniprep". Estas "midipreps" foram feitas por lise alcalina das bactérias centrifugadas seguida de purificação do DNA através de colunas de troca iônica - Tip500 (Qiagen) ou adsorção a partículas de sílica - FlexiPrep (Amersham-Pharmacia), seguindo-se as instruções dos fabricantes. Foram empregadas, também, "midipreps" convencionais por lise alcalina / extração com fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1988), seguidas de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cézio ou de precipitação com polietilenoglicol (PEG) descritos a seguir.

3.1.2.1. Bandeamento do DNA de “midipreps” em gradiente de CsCl -

O DNA precipitado do “midiprep” foi ressuspense em 4 mL de TE, adicionando-se 4,4 g de cloreto de céσιο e 4 mg de brometo de etídeo. A solução foi transferida para tubos de centrífuga de 5 mL e selados, sendo centrifugados em rotor vertical P65VT2 (Hitachi Koki, Tóquio - JP) a 400.000 xg por 6 horas a 20°C. O DNA dos plasmídeos foi coletado furando-se o tubo, com uma agulha hipodérmica 20G, logo abaixo da banda inferior, visualizada sub luz ultravioleta. O brometo de etídeo foi removido da solução por sucessivas extrações com butanol. O DNA foi precipitado com etanol e dissolvido em TE (AUSUBEL *et al.*, 1994).

3.1.2.2. Precipitação do DNA de “midipreps” com PEG -

O DNA precipitado do “midiprep” foi ressuspense em 2 mL de TE e precipitado com polietilenoglicol 8.000 (8,6% final) e cloreto de sódio (0,46 M final) por 16 horas a 4°C. O DNA foi recuperado por centrifugação a 10.000 xg por 20 minutos a 4°C, ressuspense em 1 mL de TE, precipitado com etanol e novamente ressuspense em TE (AUSUBEL *et al.*, 1994).

A quantificação das preparações de plasmídeos foi feita pela leitura da absorbância a 260 nm de uma diluição das mesmas, enquanto a pureza do DNA foi estimada através da relação entre as absorbâncias da solução a 260 nm e 280 nm.

A identidade dos plasmídeos foi verificada após cada preparação de DNA através de corte com enzimas de restrição seguida de eletroforese em gel de agarose.

3.1.2.3. Seqüenciamento de DNA

As seqüências completas dos cDNAs dos plasmídeos C27, C36, C41 e CV2 foram determinadas através de seqüenciamento manual radioativo, usando o método de terminação por incorporação de di-desoxinucleotídeos (SANGER *et al.*, 1977). Os insertos, clonados direcionalmente (VALENTINI, 1993) no sítio múltiplo de clonagem (“polylinker”) do plasmídeo pBluescript SK(-), foram estendidos, pela DNA polimerase nativa do bacteriófago T7, a partir dos sítios de ligação das RNA polimerases dos fagos T3 e T7 presentes no vetor, empregando-se “primers” complementares a estas seqüências promotoras. As seqüências determinadas a partir do “primer” T3 correspondem às extremidades 5' dos cDNAs, enquanto aquelas determinadas a partir do “primer” T7 correspondem às extremidades 3' poliadeniladas. As reações de seqüenciamento foram feitas nos dois sentidos, para permitir a superposição das leituras, confirmando-as. Quando a superposição não foi possível devido ao tamanho do cDNA, como foi o caso do plasmídeo CV2, foram sintetizados “primers” a partir das seqüências recém determinadas, para permitir a continuidade da leitura até cobertura total da seqüência nos dois sentidos.

Nas reações de seqüenciamento foi empregado o kit "T7 Sequencing System" (Amersham-Pharmacia) e o isótopo $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (New England Nuclear, Boston, MA - USA), seguindo-se as instruções dos fabricantes, com modificações apenas nas etapas de desnaturação do DNA e "annealing" dos "primers", descritas a seguir.

O DNA plasmideal empregado foi purificado por precipitação com PEG a partir de "minipreps" ou por bandeamento em cloreto de céσιο.

Foram desnaturados 5 μg de DNA, com hidróxido de sódio por 10 minutos a 20°C (0,4 N final em volume de 40 μL). A solução foi neutralizada adicionando-se acetato de amônio (2 M final) e o DNA foi precipitado com 120 μL de etanol. O precipitado foi dissolvido em 10 μL de água, adicionando-se 10 pmol do "primer" e 2 μL do "annealing buffer" do kit, incubando-se a solução a 65°C por 5 minutos e resfriando-a gradualmente, de 65°C para 30°C, em um intervalo de 30 minutos.

A separação dos produtos das reações de seqüenciamento foi feita em géis de matriz uniforme de poliacrilamida 6% ou 8% em tampão 1x Tris-Borato-EDTA (TBE), contendo uréia 7 M como desnaturante (AUSUBEL *et al.*, 1994). Os géis foram montados entre 2 placas com 500 mm de comprimento, separadas por espaçadores com espessura uniforme de 0,35 mm. Foram usadas concentrações diferentes de tampão nos reservatórios inferior (1x TBE) e superior (0,7x TBE).

A eletroforese foi conduzida a 38 W constantes durante toda a corrida. Após a metade do tempo de corrida, solução 3 M de acetato de sódio em 1x TBE foi adicionada ao reservatório de tampão inferior até a concentração final de 1M. O sal adicionado causa um aumento localizado e progressivo na força iônica (e na condutividade) e, à medida que se difunde durante a eletroforese, forma um gradiente de intensidade do campo elétrico ao longo do comprimento do gel (SHEEN e SEED, 1988). O gradiente assim formado diminui a mobilidade dos fragmentos menores de DNA, tornando o espaçamento entre as bandas mais uniforme.

Após a corrida eletroforética, os géis foram fixados com solução de ácido acético (10%) e metanol (10%), transferidos para folhas de papel de filtro Whatman 3MM e secos a vácuo por 2 horas a 80°C sendo, então, colocados em "cassettes" metálicos para expor os filmes de raios X (Kodak X-Omat K) a -70°C.

3.1.2.4. Análise de seqüências

Para verificar a similaridade de cada um dos clones com dados publicadas por outros pesquisadores, sua identidade e integridade, as seqüências de DNA determinadas foram confrontadas com bancos de dados de seqüências de DNA (GenBank, EMBL, dBEST, etc) no National Center for Biotechnological Information, através do algoritmo BLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1990) em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

3.2. Cultura celular

As células ST1 e P7 empregadas neste trabalho foram crescidas em garrafas (T25 e T75) e placas plásticas do tipo Petri (P35, P60, P100 e P150) ou do tipo "cluster" (de 6, 12, 24, 48 e 96 cavidades), em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Sigma – Saint Louis, MO - USA) contendo 5% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas – SP), renovado a cada 2 ou 3 dias. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C sob atmosfera com 5% de CO₂.

Outras linhagens celulares, como fibroblastos normais (células A31 - Balb-3T3) e NIH 3T3 foram cultivados em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino.

O acompanhamento das culturas foi feito por observação ao microscópio invertido (Nikon Diaphot) sob contraste de fase. Fotografias das células visualizadas com as objetivas 4x e 10x foram feitas empregando-se câmara Nikon N601, acoplada ao "photo port", no modo de exposição "P" ("program"). O filme empregado foi Kodak Kodacolor Gold ULTRA – ISO 400.

As sub-culturas foram feitas por tripsinização de culturas próximas da confluência, aspirando-se o meio de cultura, lavando a superfície das garrafas com PBSA (PBS sem cálcio ou magnésio), e adicionando pequeno volume de solução de tripsina 0,01%; EDTA 0,1 mM em PBSA. Após desagregação das células da placa, a suspensão resultante foi diluída em DMEM contendo 5% de soro fetal bovino, contada em hemacitômetro (câmara de Neubauer), empregando-se ou não azul de trypan, rediluída para a concentração adequada, plaqueada e incubada.

Os tratamentos com glicocorticóides foram sempre feitos através da adição de hidrocortisona (100 ng/mL final) às células da cultura ainda sub-confluentes, exceto quando especificado de outra maneira.

3.3. "Northern-blots"

3.3.1. Extração de RNA celular

As células aderidas à placa de cultura foram lavadas 2 vezes com PBS gelado e lisadas com solução de isotiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 25 mM e β-mercapto-etanol 0,1 M (CHIRGWIN *et al.*, 1979). O lisado foi coletado, colocado sobre um "colchão" de solução de cloreto de cézio 5,7 M; acetato de sódio 25 mM pH 5,0 (GLISIN *et al.*, 1974) e centrifugado a 180.000 xg por 14 horas em rotor P55ST2 (Hitachi) a 20°C. O sobrenadante foi removido com pipeta Pasteur e as paredes do tubo

cuidadosamente limpas com papel absorvente antes da dissolução do sedimento de RNA em água estéril.

A quantificação dos RNAs foi feita pela leitura da absorbância a 260 nm de diluições da solução, enquanto sua pureza foi estimada através da relação entre as absorbâncias da solução a 260 nm e 280 nm.

3.3.2. Eletroforese e transferência dos RNAs

Volumes correspondentes a 10 µg de cada RNA extraído foi ajustado para 5 µL, misturado com 2 µL de MOPS 5x, 3,5 µL de formaldeído (37%) e 10 µL de formamida, incubado por 15 minutos a 65°C para desnaturação e misturado com 4 µL de tampão de amostra 6x.

O fracionamento dos RNAs por eletroforese em gel desnaturante de agarose-formaldeído-MOPS corado com brometo de etídio e a sua transferência para membranas de nylon, por capilaridade ascendente, foram feitos da maneira descrita por THOMAS, 1980.

Sondas foram preparadas removendo-se o cDNA de cada plasmídeo (DNA de “midipreps” precipitado com PEG) por digestão com as enzimas de restrição *Ava* I (C27, C36 e C41) ou *Pst* I (CV2). Os fragmentos correspondentes a cada inserto foram isolados por eletroeluição do DNA das bandas visualizadas em transiluminador ultra-violeta após eletroforese em gel de agarose-TAE (40 mM Tris acetato pH 7,8; 1 mM EDTA) contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Para controle quantitativo, foi empregado, como sonda, o fragmento *Pst* I (1,2 kb) do cDNA do gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de rato (FORT *et al.*, 1985).

As sondas foram marcadas com 50 µCi de $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (New England Nuclear) por “random-primer extension” (kit Ready-to-go -dCTP Random Priming Labeling System - Amersham-Pharmacia) a 37°C por 16 horas e purificadas por gel-filtração em colunas centrifugáveis de Sephacryl S-300 (MicroSpin - Amersham-Pharmacia). As sondas purificadas foram desnaturadas por fervura durante 5 minutos, imediatamente antes da adição à solução de hibridização.

3.3.3. Hibridização

A hibridização dos RNAs imobilizados nas membranas com as sondas marcadas foi feita da forma descrita por SAMBROOK *et al.*, 1988. Cada membrana foi hidratada com 6x SSC, colocada em tubo e incubadas a 42°C sob rotação lenta (5 rpm), por pelo menos 6 horas em solução de pré-hibridização contendo 50% formamida, 5x SSPE, 5x solução de Denhardt; 0,1% SDS; 100 µg/mL DNA de esperma de salmão recém desnaturado e, em

seguida, hibridizada por 14 a 24 horas a 42°C em solução de hibridização contendo, além dos mesmos componentes, sulfato de dextran 5% e a sonda desnaturada.

3.3.4. Lavagem das membranas

As membranas foram lavadas 1 vez em 2x SSC; 0,1% SDS por 15 minutos a temperatura ambiente; 1 vez na mesma solução por 15 minutos a 42°C e 2 vezes em 0,1x SSC; 0,1% SDS por 15 minutos a 55°C. A seguir, as membranas foram envolvidas em plástico para expor um filme de raios-X (Kodak X-Omat K) em "cassete" metálico a -70°C por tempo variável.

3.4. Inibição de genes através de oligonucleotídeos "antisense"

Para o desenho dos oligos "antisense" contra os mRNAs das metalotioneínas 1 e 2 foram analisadas as seqüências dos insertos dos clones C27 e C41. Para o projeto do oligo "antisense" contra o mRNA da glicoproteína α -1-ácida, foi tomada como base a seqüência disponível no GenBank, pois a seqüência deste clone mostrou homologia total com apenas este gene, apesar de o cDNA não estar completo.

Não puderam ser projetados oligos "antisense" contra o mRNA de *env*. Além do fato de CV2 não conter a extremidade 5' do cDNA de *env*, as informações disponíveis no GenBank sobre seqüências do locus *env* com alguma similaridade com a de CV2, não forneciam informação suficiente sobre a região do início de tradução para permitir o desenho de oligos que pudessem ser eficientes.

Na tentativa de escolher oligos que não formassem dímeros em ensaios de co-transfecção múltipla, vários oligos desenhados foram confrontados dois a dois para se verificar o número de bases contíguas pareadas em cada dupla de oligos analisada. Este tipo de abordagem não permitiu a escolha de oligos que pudessem ser usados simultaneamente para inibir a tradução dos mensageiros correspondentes às duas metalotioneínas, devido à grande complementariedade entre as seqüências dos oligos selecionados a partir da extremidade 5' dos genes de metalotioneína 1 e 2.

Foram sintetizados os oligos "antisense" contra metalotioneína 1 (Quadro 2, oligo Mt 1 c), glicoproteína α -1-ácida (Quadro 2, oligo α -1 a) e um oligo "sense" controle, dirigido contra uma região próxima ao codon de terminação do mRNA da glicoproteína α -1-ácida. Estes oligonucleotídeos, do tipo fosforotioato com as bases pirimídicas modificadas (C-5-propinil 2' desoxi-uridina e C-5 propinil 2' desoxi-citidina), foram dissolvidos em água estéril, quantificados por absorbância a 260 nm e diluídos até concentração conveniente para o uso nos experimentos de transfecção.

Quadro 2 - Desenho dos oligonucleotídeos “antisense”.

Foram projetados vários oligonucleotídeos “antisense” a partir das seqüências dos genes das metalotioneínas 1 e 2 e da glicoproteína α -1 ácida de rato. Os oligos mostrados foram escolhidos pela proximidade com o início de tradução e por não formarem “loops” (de acordo com o programa Oligo v3.0). A trinca de nucleotídeos em azul corresponde ao “antisense” do *codon* de iniciação (ATG, em vermelho, no sentido “sense”).

<u>Metalotioneína 1</u>			
antisense	Mt1 a	3'	TAGAGCCTTACCTGG
	Mt1 b	3'	AGAGCCTTACCTGGG
	Mt1 c	3'	GAGCCTTACCTGGGG
mRNA alvo	5'		...CAGATCTCGGAATGGACCCCAACT...
<u>Glicoproteína α-1 ácida</u>			
antisense	α -1 a	3'	CTCACAGAAGCCGTA
	α -1 b	3'	ACTCACAGAAGCCGT
	α -1 c	3'	GACTCACAGAAGCCG
	α -1 d	3'	AGACTCACAGAAGCC
mRNA-alvo	5'		...GCCTCTGAGTGTCTTCGGCATGGCGCT.
<u>Metalotioneína 2</u>			
antisense	Mt2 a	3'	CGGAGGTAAGCGGTA
	Mt2 b	3'	GCGGAGGTAAGCGGT
	Mt2 c	3'	GGCGGAGGTAAGCGG
	Mt2 d	3'	CGGCGGAGGTAAGCG
mRNA-alvo	5'		...GTTGATCTCCAAGTCCCGCTCCATTGCGCCATGGAC...

3.4.1. Transfecção de oligonucleotídeos “antisense” através de lipossomos

Células ST1 foram distribuídas em placas de 48 cavidades em densidades equivalentes a $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ (sub-confluentes) ou $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ (esparsas) e incubadas por aproximadamente 12 horas na presença de 2% de soro.

Misturas-estoque de Lipofectin (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD - USA) e OptiMEM (Gibco BRL) sem soro, na proporção de 1 μL (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para 5 μL finais e de Cytofectin GS2888 (cedido por Gilead Sciences, Foster City, CA - USA) e OptiMEM na proporção de 1 μL (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para 40 μL finais foram feitas em tubos de poliestireno.

Em microplaca de poliestireno de 96 cavidades com fundo em “U”, diferentes quantidades de oligonucleotídeos foram misturadas com OptiMEM sem soro. Igual volume de mistura-estoque de lipídeo foi distribuído em cada uma das cavidades da microplaca contendo a mistura oligonucleotídeo-OptiMEM. O conteúdo da microplaca foi misturado suavemente em agitador orbital por 1 minuto e incubado a temperatura ambiente por 30

minutos para a formação do complexo lipíde-DNA. Após a incubação, foi adicionado OptiMEM sem soro a cada uma das cavidades com o complexo, diluindo-o 10 vezes. Após homogeneização, as misturas resultantes foram distribuídas nas placas com as células, previamente lavadas com DMEM sem soro. Para Lipofectin, a concentração final nos ensaios foi de 20 µg/mL e a de oligonucleotídeos variou de 2 a 1.000 nM, enquanto para Cytfectin GS2888, foi de 2,5 µg/mL e a de oligonucleotídeos variou de 5 a 600 nM.

Duas horas após a transfecção, foi adicionado DMEM contendo soro fetal bovino submetido a tratamento com carvão ativado para eliminar traços de esteróides (ARMELIN e SATO, 1974). A concentração final de soro foi ajustada para 0,2% ou 2%, conforme o ensaio. Neste momento foi adicionada hidrocortisona. Os ensaios foram conduzidos em triplicata para cada condição.

3.4.2. Ensaio de incorporação de Timidina tritiada em DNA

Vinte e quatro horas após a transfecção, foi adicionada timidina tritiada (0,25 µCi/mL; 0,1 µM) a cada pocinho da placa, que retornou à estufa para incubação durante mais 4 horas.

O meio de cultura foi removido e cada cavidade lavada 2 vezes com ácido tricloroacético (TCA) 5% gelado, incubando-se a placa por 5 minutos em gelo durante as lavagens. O TCA foi removido batendo-se a placa varias vezes sobre papel absorvente.

Em cada cavidade foram colocados 200 µL de hidróxido de sódio 0,5 N, incubando-se a placa por 30 minutos a 37°C, colocando-se em seguida uma tira numerada de papel de filtro de 10x15 mm para absorver o lisado de cada cavidade. Os filtros foram agrupados em um “beaker”, lavados com TCA 5% gelado por 5 minutos, a seguir, 2 vezes com etanol 90% gelado e uma vez com acetona. Os filtros foram secos ao ar, colocados em vial contendo 3 mL de líquido de cintilação (PPO 4 g/L; POPOP 0,1 g/L em tolueno) e levados ao contador de contilação para contagem da radioatividade da timidina tritiada incorporada em DNA.

3.4.3. Marcação de oligonucleotídeos com maleimido-fluoresceína

Uma alíquota correspondente a 16 nmol do oligonucleotídeo controle “sense” foi marcada com fluoresceína na extremidade 5’ com o kit “FluoroAmp T4 kinase green oligonucleotide labeling system” (Promega). Resumidamente, o oligo foi fosforilado com T4 polinucleotídeo quinase e adenosina 5’-O-(3-tiotrifosfato) – (γS-ATP) e precipitado. A extremidade tiol-reativa adicionada foi ligada, por aquecimento a 68°C durante 1 hora, a fluoresceína maleimido-ativada. O produto da reação foi separado da fluoresceína-maleimido livre por gel filtração em Sephadex G50.

3.4.4. Transfecção com oligonucleotídeos fluorescentes e Cytofectin™

Células ST1 foram distribuídas em densidades equivalentes a $2,5 \times 10^4$ células/cm² sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro colocadas em placas de 24 poços, sendo incubadas por 12 horas na presença de 2% de soro.

A mistura OptiMEM, Cytofectin GS2888 e oligo marcado com foi feita da maneira descrita anteriormente. A concentração final de oligo na mistura foi de 150 nM e a de Cytofectin foi de 2,5 µg/mL. Uma mistura contendo apenas o lípide e OptiMEM foi feita para servir como controle.

As células foram lavadas com DMEM sem soro e 200 µL da mistura lípide-oligo-OptiMEM (ou lípide OptiMEM) foi distribuída sobre os pocinhos. Após 2 horas de transfecção, os pocinhos receberam DMEM contendo soro fetal bovino, de modo a manter as células em 2% de soro durante o tempo restante do ensaio.

Em períodos de tempo definidos (3, 6, 12, 24 e 36 horas), cada série de lamínulas foi retirada do meio de transfecção, lavada uma vez em PBS, fixada em metanol por 10 minutos e enxaguada 2 vezes em PBS. O excesso de líquido foi removido tocando a borda da lamínula em papel absorvente. Sobre a superfície com as células foram colocados 15 µL de solução de montagem (0,1 M Tris HCl pH 8,5; 25% glicerol; 10% Mowiol 4-88, 0,1% p-fenilenodiamina), colocando a lamínula sobre uma lâmina. A observação foi feita em microscópio Nikon Fluophot sob epi-iluminação com objetivas CF Fluor 40x e 20x, o conjunto de filtros/espelhos “B” e o filtro auxiliar 460 para reduzir o sinal de autofluorescência das células. Os campos observados por epi-iluminação foram também visualizados sob contraste de fase. As imagens foram registradas em filme Kodacolor Gold Ultra - ISO 400, empregando-se o conjunto de fotomicrografia Microflex UFX no modo de exposição automático.

3.5. Preparo dos vetores pOPI3cat e pOPRSVIcat

Os DNAs de “midipreps” dos vetores pOPI3cat e pOPRSVIcat (Stratagene) foram clivados com a enzima de restrição *Not* I e desfosforilados com fosfatase alcalina intestinal bovina (Amersham-Pharmacia). Os produtos de clivagem desfosforilados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose de modo a separar o fragmento do vetor daquele correspondente ao gene *cat* (cloranfenicol acetil transferase), originalmente presente nos plasmídeos. As bandas dos vetores foram recortadas do gel e o DNA eletroeluído e precipitado (conforme SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.6. Preparo dos cDNAs

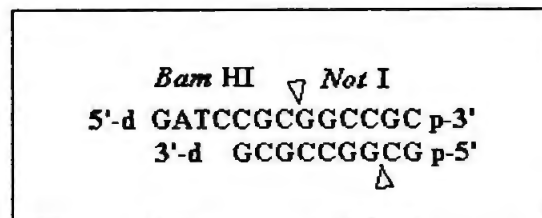
3.6.1. Preparo dos insertos das Metalotioneína 1 e 2 por ligação a adaptadores *Bam*H I / *Not* I

Os insertos correspondentes aos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 foram removidos dos plasmídeos C27 e C41 por digestão com as enzimas de restrição *Kpn* I e *Sac* I. Os fragmentos correspondentes aos insertos foram isolados por eletroforese em agarose e eletroeluição. Após precipitação, o DNA foi clivado com a enzima *Hae* III. Alternativamente, fragmento foi preenchido com dNTPs pelo fragmento Klenow da DNA polimerase I. O produto foi ligado a adaptadores *Bam*H I / *Not* I (Amersham-Pharmacia) com T4 DNA ligase. O excesso de adaptadores foi removido por gel-filtração em colunas de Sephacryl S300 e o produto de ligação foi fosforilado. Os fragmentos contendo adaptadores, foram ligados com o plasmídeo pUC18 previamente linearizado por clivagem com a enzima *Bam*H I e desfosforilado. O produto de ligação foi usado para transformar bactérias competentes.

Esta subclonagem intermediária foi feita devido ao fato de o sítio *Not* I do adaptador (Quadro 3) não ser terminal e a clivagem com *Not* I junto a extremidades de fragmentos ser descrita como ineficiente (catálogo New England Biolabs, 1998).

Quadro 3 - Esquema dos adaptadores *Bam* HI/ *Not* I.

Representação da seqüência e sítios de clivagem e fosforilação (adaptado da bula do produto “*Bam* HI / *Not* I adapter”, Pharmacia).



3.6.2. Preparo dos cDNAs por PCR (sub-clonagem intermediária em pUC18)

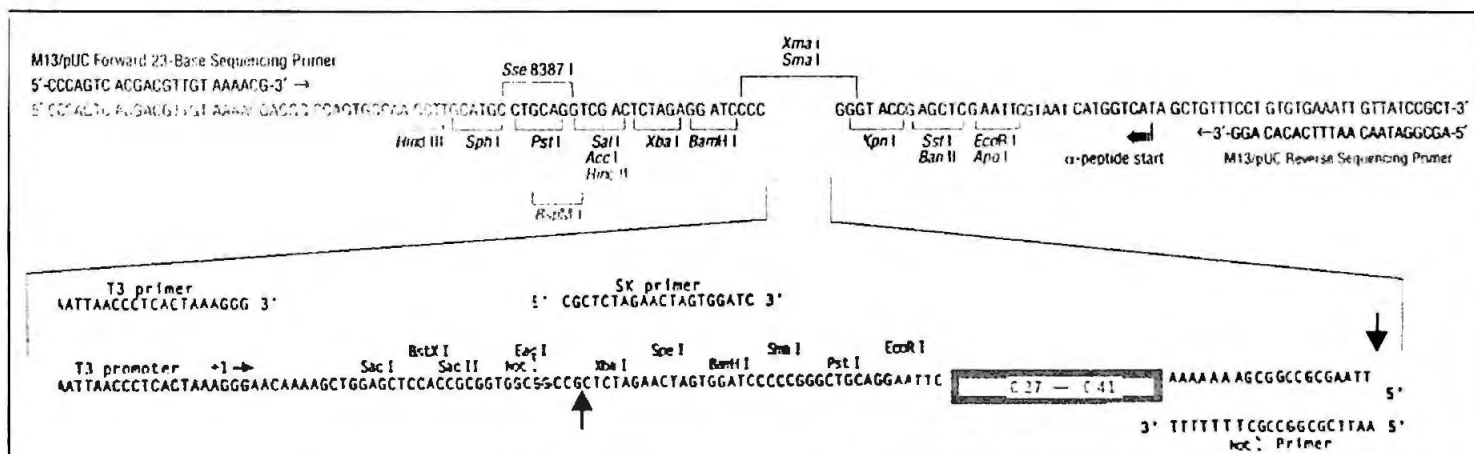
Empregando o “primer” T3 de sequenciamento e um “primer-adaptor” *Not* I/(dT)₁₈, normalmente usado para síntese de primeira fita de cDNA (Promega – Madison, WI – USA), foi feita a amplificação por PCR dos cDNAs originalmente clonados em pBluescript SK(-). Os produtos desta amplificação contém parte do “poly-linker” do pBluescript SK(-) entre o promotor T3 e o sítio de clonagem *Eco*R I (incluindo um sítio *Not* I), o cDNA de cada gene até a região poliadenilada e outro sítio de *Not* I presente no “primer-adaptor”.

Os segmentos amplificados foram ligados com T4 DNA ligase em pUC18 linearizado com *Sma* I (kit SureClone - Amersham-Pharmacia) (Quadro 4). O produto desta ligação foi usado para transformar bactérias Inv α F' competentes.

Os clones estabelecidos da forma descrita acima foram submetidos a "screening" por PCR de colônia com "primers" M13 "forward" 23 e M13 "reverse" 17 (Gibco - BRL). Algumas das colônias positivas por PCR foram crescidas em 2 mL de caldo LB-ampicilina e 300 μ L da cultura foram usados para preparações de DNA plasmideal, sendo uma alíquota digerida com *Not* I. Para cada um dos cDNAs foi feito o seqüenciamento de 2 dos "minipreps" que, nas digestões, mostraram fragmentos com o tamanho esperado.

Quadro 4 - Esquema da subclonagem no vetor pUC18 e posição dos "primers" T3, M13 e "Not I primer adaptor".(adaptado do manual "ZAP cDNA Synthesis Kit", Stratagene e do catálogo GIBCO-BRL 1996)

Seqüência do sítio múltiplo de clonagem do vetor pUC18, mostrando a posição dos "primers" M13 "forward" e "reverse", usados para o seqüenciamento dos cDNAs de C27 / C41 amplificados por PCR com "primer" T3 e *Not* I "primer-adaptador".



3.6.3. Recuperação dos cDNAs completos de glicoproteína α -1-ácida e *env*

3.6.3.1. Titulação e "Screening" da biblioteca de cDNA original

3.6.3.1.1. Preparo de "Plating bacteria" para titulação e "screening" da biblioteca

A partir de uma única colônia de XL1-Blue MRF', crescida em LB agar, foi feita uma cultura em meio NZY contendo 10 mM MgSO₄ e 0,2% de maltose até a absorbância a 600 nm (DO_{600nm}) da suspensão atingir 1,0. A cultura crescida foi centrifugada a 2.000 xg por 10 minutos em rotor SS34 (Sorvall-Kendro - Hanau - D) a 4°C e as bactérias foram ressuspensas delicadamente na metade do volume original em 10 mM MgSO₄. A DO_{600nm}

foi novamente determinada e, em seguida, foi feita a diluição até DO_{600nm} de 0,5 com a mesma solução.

3.6.3.1.2. Titulação da biblioteca de cDNA

Diluições seriadas de 10^{-3} a 10^{-9} das bibliotecas previamente preparadas no laboratório foram feitas e empregadas para o isolamento dos clones C27, C36, C41 e CV2 por hibridização diferencial (VALENTINI e ARMELIN, 1996). De cada diluição foram tomados 10 μ L e adicionados a 100 μ L de “plating bacteria”. A mistura foi mantida a 37°C por 15 minutos sob agitação suave. Após essa incubação, cada suspensão foi misturada com 3 mL de ágar NZY (0,7%) a 37°C e imediatamente colocada sobre placas com ágar NZY (1,5%) preparadas com antecedência de pelo menos 3 dias. Depois de 10 minutos sobre a bancada, as placas foram incubadas a 37°C por 10-12 horas para contagem.

3.6.3.1.3. Triagem de biblioteca de cDNA

Com o título determinado, uma diluição da biblioteca foi usada para infectar “plating bacteria” como descrito para a titulação, de modo a conseguir o equivalente a 50.000 pfu (“plaque forming units”) para cada plaqueamento em placas de Petri de 150 mm de diâmetro. Doze placas de Petri foram preparadas, sendo 6 destinadas ao “screening” do cDNA da glicoproteína α -1 ácida e 6 ao de *env*.

3.6.3.1.3.1. Adsorção dos fagos a membranas (“plaque lifts”)

Após a incubação por tempo suficiente para as placas de lise apresentarem um diâmetro de 1 mm (em torno de 12 horas), as placas foram retiradas da estufa e mantidas em geladeira por pelo menos 1 hora. Filtros de nylon cortados com o diâmetro da placa de Petri foram colocados sobre a superfície do ágar, marcados (de modo a localizar a posição das placas de lise com o filme radioautográfico) e mantidos por 2 minutos para adsorção dos fagos.

5 minutos. Duplicatas foram feitas colocando novos filtros sobre o ágar por 4 minutos.

As membranas foram seqüencialmente colocadas sobre papéis de filtro embebidos em 0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl (por 5 minutos), 0,5 M Tris HCl pH 7,4; 1,5 M NaCl (5 minutos) e 2x SSC (5 minutos), sempre com a face que entrou em contato com o ágar voltada para cima. Em seguida, foram secas ao ar por 15 minutos, empilhadas separadas por folhas de papel de filtro, prensadas entre 2 placas de vidro e secas por 2 horas a 80°C sob vácuo.

3.6.3.1.3.2. Marcação isotópica de sondas de oligonucleotídeos e hibridização

Sondas de oligonucleotídeos correspondentes aos genes da glicoproteína α -1 ácida (RATAGPA 204-187) e *env* (MURENV 4239-19) foram marcadas com γ - ^{32}P ATP e T4 polinucleotídeo quinase e purificados por troca iônica (NACS column, GIBCO - BRL). A pré-hibridização dos discos de membrana foi feita em 6x SSC, 5x solução de Denhardt, 0,05% pirofosfato de sódio, 100 μ g/mL DNA de espermatozoides de salmão, 0,5% SDS por 6

horas. A hibridização foi feita com todo o volume da sonda marcada em 6x SSC, 1x solução de Denhardt, 0,05% pirofosfato de sódio e 100 µg/mL DNA de esperma de salmão, por 16 horas. Os discos de membrana foram lavados 2 vezes com 2x SSC, 0,1% SDS a 42°C e 2 vezes com 0,5x SSC, 0,1% SDS a 45°C antes da exposição.

3.6.3.1.4. Isolamento e eluição dos fagos

Os filmes de raios-X com os sinais de hibridização foram alinhados com as placas de Petri correspondentes. Uma porção de ágar contendo a placa de lise correspondente a cada sinal positivo foi retirada da placa de Petri perfurando a superfície de ágar com uma pipeta Pasteur estéril. O fragmento de ágar foi colocado em tubo contendo 1 mL de tampão SM (10 mM MgSO₄; 20 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1 M NaCl), sendo mantido como estoque a 4°C.

3.6.3.1.5. Seleção dos clones isolados (por PCR)

Alíquotas de cada um dos estoques de fagos, eluídos por 24 horas, foram reunidas em "pools" organizados na forma de linhas e colunas de uma matriz (ALPHEY, 1997) e submetidos a PCR, empregando como "primer antisense" o oligonucleotídeo usado no "screening" e como "primer sense" o oligo T3 localizado na região 3' do "polylinker" do fago LambdaZap II (Stratagene) no qual foi construída a biblioteca. O(s) tubo(s) correspondente(s) à(s) intersecção(ões) entre cada linha e coluna positivos por PCR foram submetidos a novo PCR com os mesmos "primers" para confirmar a amplificação esperada. A suspensão de cada tubo "positivo" foi titulada e plaqueada em baixa densidade para isolamento do clone puro.

3.6.4. Clonagem dos cDNAs codificantes completos da glicoproteína α 1 ácida e *env* por PCR

RNA total foi extraído de células ST1 tratadas com hidrocortisona por 24 horas. O mRNA foi isolado de 30 µg de RNA total por captura com oligo-(dT) celulose e lavagem em "batch" (QuickPrep-Micro - Amersham-Pharmacia), conforme as indicações do fabricante.

A síntese da primeira fita do cDNA foi feita a 40°C, durante 30 minutos, com 400 U da enzima Superscript II (Gibco - BRL), 1x tampão de primeira fita (50 mM Tris HCl pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂), 0,25 mM dNTPs, 10 mM DTT e 0,1 mM (dT)₂₅ em volume final de 50 µL.

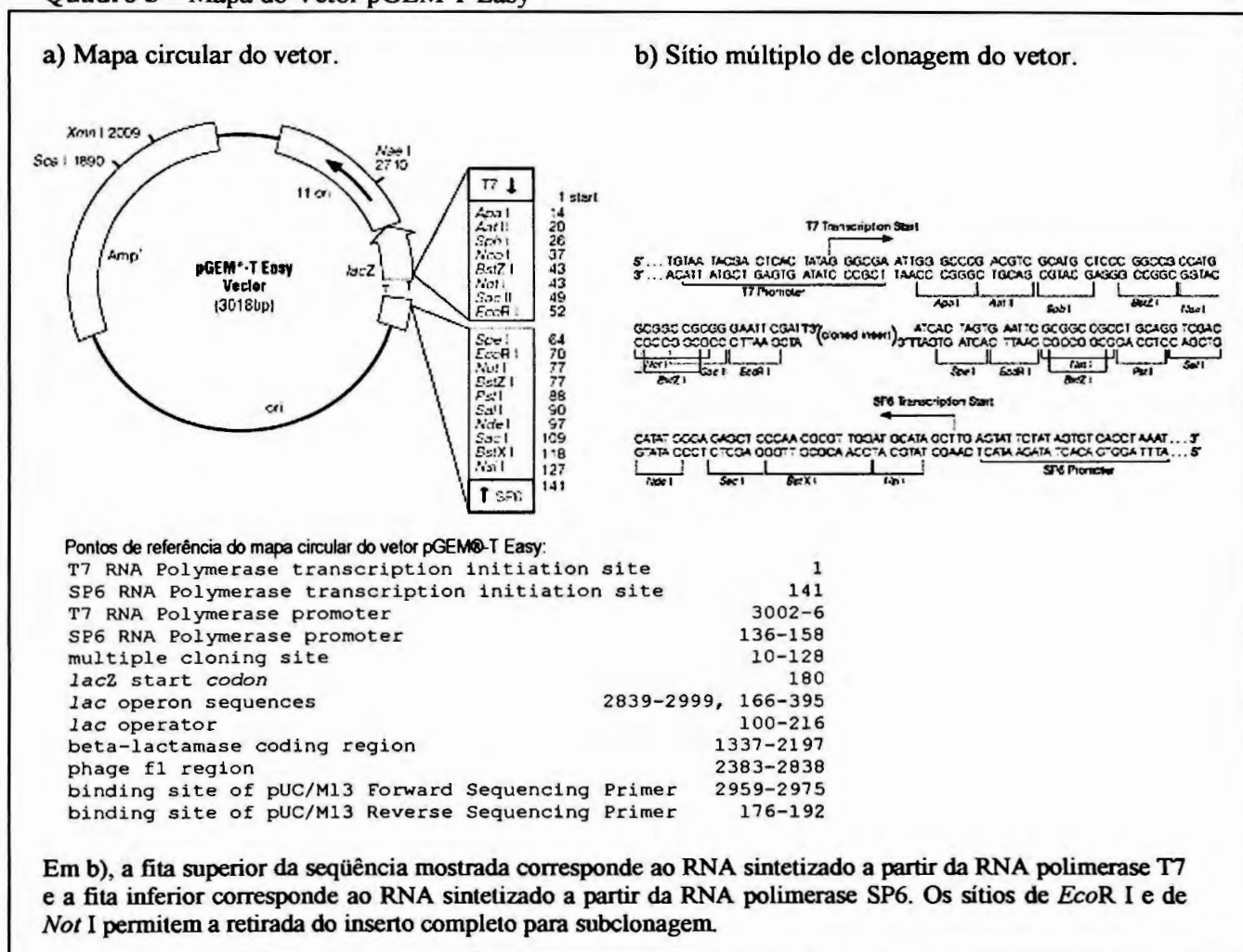
Foi utilizado 0,5 µL da reação de transcrição reversa para a PCR. Para a glicoproteína α 1-ácida foram usados os "primers" RATAGPA1/12-29 e RATAGPA1/724-05. Para o *env* foram usados os "primers" MURENV/1.960-78 e MURENV/4.239-19.

As reações foram feitas em volume final de 50 µL, contendo 1x PCR buffer, 0,2 µM de cada "primer", 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq Polimerase (todos os reagentes da Amersham-Pharmacia). A mistura foi incubada usando-se o seguinte programa: 95°C 1'30"; 25 ciclos de 93°C 25"; 58°C 30"; 72°C 1'20" e um ciclo com extensão final de 72°C por 5'.

Os produtos de reação foram fracionados por eletroforese em gel de agarose TAE e visualizados em transiluminador UV. As bandas correspondentes aos tamanhos esperados foram recortadas do gel, sendo o DNA extraído por adsorção em sílica (Qiaex gel extraction kit - Qiagen).

Aliquotas correspondentes a 50 ng do DNA da banda de glicoproteína α1-ácida e 150 ng da de *env* foram ligados a 20 ng do vetor pGEM-T Easy (Promega) (Quadro 5).

Quadro 5 – Mapa do Vetor pGEM T Easy



Após transformação em *E. coli* JM109, foram feitas "minipreps" de 16 colônias brancas de cada construção. Foi utilizado 0,5 µL de cada "miniprep" para confirmação da clonagem por PCR. Para PCR confirmatório da clonagem da glicoproteína α1-ácida foram empregados os "primers" RATAGPA1/12-29 e RATAGPA1/204-187 em programa semelhante ao descrito acima, mas com temperatura de "annealing" de 49°C. Para o *env*, foram empregados os "primers" MURENV/3.500-17 e MURENV/4.040-23 com "annealing" a 52°C.

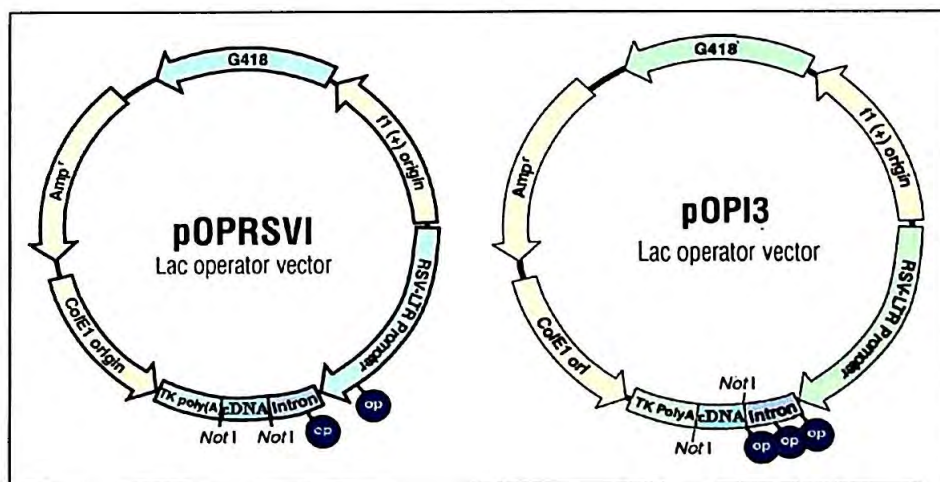
O DNA das "minipreps" de 2 clones positivos por PCR para cada cDNA foi seqüenciado com di-desoxinucleotídeos fluorescentes ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing mix 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA - USA), de acordo com as instruções do fabricante, usando se "primer" T7. O fracionamento e a detecção foram feitos em seqüenciador automatizado ABI 377 (Applied Biosystems).

3.7. Isolamento dos cDNAs com sítios *Not* I

Um clone correspondente a cada construção intermediária em pUC18 (metalotioneínas 1 e 2) e pGEM-T easy (glicoproteína α1-ácida e *env*), caracterizado da forma descrita no item anterior, foi destinado à subclonagem.

Os cDNAs foram removidos destas construções por digestão com *Not* I e transferidos para pOPI3 e pOPRSVI (Quadro 6) com extremidades *Not* I expostas, preparado como descrito anteriormente. O produto de ligação foi usado para transformar *E. coli* XL1 Blue-MR.

Quadro 6 - Esquema dos vetores pOPI3 (a) e pOPRSVI (b). (adaptado do manual Stratagene).



Alíquotas do DNA de cada “miniprep” resultante das colônias foram digeridas com *Not* I para confirmação da existência do inserto e com *Bam*H I ou *Pst* I para determinação de sua orientação em relação ao promotor de CMV.

Um clone correspondente a cada forma (“sense” e “antisense”) foi selecionado e crescido em 50 mL de caldo LB / ampicilina, sendo o DNA plasmideal extraído e purificado em colunas Qiagen tip 500 para as transfecções.

3.8. Clonagem e estabelecimento de linhagens transfectantes de ST1 e P7 expressando o repressor do Operon *Lac* de *E. coli* (*LacI*)

3.8.1. Determinação da sensibilidade das células ST1 e P7 a higromicina

Células ST1 e P7 foram distribuídas em placas de 48 cavidades em densidades equivalentes a 1×10^4 células/cm² (5.000 células por cavidade) e incubadas durante a noite. Higromicina foi adicionada no dia seguinte de modo a obter concentrações finais de 0, 50, 100, 150, 250, 400, 600 e 900 µg/mL em diferentes séries de cavidades. Foram feitas 4 réplicas para cada diluição do antibiótico. O meio de cultura foi trocado a cada 4 dias. A concentração escolhida para seleção de transfectantes foi a menor concentração capaz de matar as células das 4 réplicas de cada concentração do antibiótico até o décimo quinto dia após sua adição.

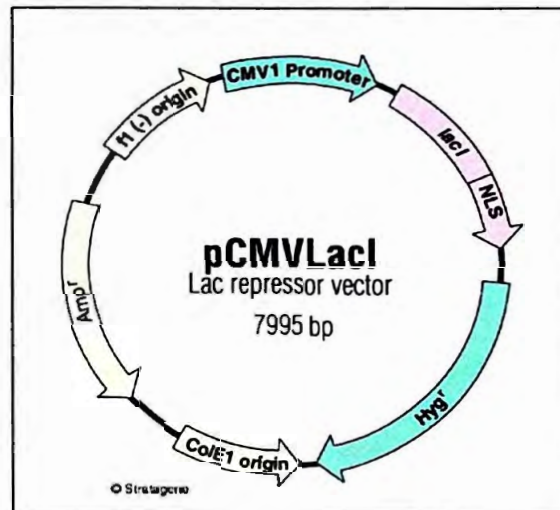
3.8.2. Transfecção de ST1 e P7 com o repressor pCMV-LacI através de lipossomos

Células ST1 e P7 foram plaqueadas em P35 em densidade equivalente a $2,5 \times 10^4$ células/cm² e incubadas por 16 horas. Em tubos de poliestireno foram misturados 8 µL de Lipofectamine (Gibco - BRL) com 100 µL de DMEM sem soro. Em outra série de tubos de poliestireno, 5 µg de DNA do plasmídeo pCMV-LacI (Quadro 7) foram misturados com DMEM sem soro em volume final de 100 µL. Um tubo contendo 100 µL de meio de cultura serviu como controle da transfecção para a etapa de seleção com higromicina. A solução Lipofectamine-DMEM foi misturada com a solução contendo o DNA ou meio de cultura como controle, agitada suavemente e incubada à temperatura ambiente por 30 minutos para a formação do complexo lipíde-DNA. Após a incubação, foram adicionados 800 µL de DMEM sem soro a cada um dos tubos.

As culturas de células foram lavadas com DMEM sem soro e a mistura DMEM-lipíde-DNA foi colocada sobre as células. As placas foram incubadas por 8 horas com esta mistura, recebendo, em seguida, uma suplementação de 1 mL de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte, foi feita uma troca de meio de cultura (contendo

5% de soro) e no terceiro dia após a transfecção, foi iniciada a seleção das células transfectantes.

Quadro 7 – Vetor pCMVLacI (esquema do manual Stratagene).



3.8.3. Seleção de transfectantes resistentes a higromicina

A placa contendo as células transfectadas foi tripsinizada e a suspensão de células resultante foi distribuída em 3 placas, de modo a obter 1/10, 1/50 e 1/100 da densidade original de células. A seleção foi feita em DMEM contendo 5% de soro fetal bovino e higromicina (400 µg/mL). As trocas do meio seletivo foram feitas a cada 3 dias até a visualização de colônias isoladas aderidas ao fundo da placa.

3.8.4. Clonagem celular

A posição das colônias melhor isoladas foi assinalada no fundo da placa com caneta marcadora. Várias colônias foram tripsinizadas individualmente, isoladas com anéis de aço inoxidável com uma face (a que toca o fundo da placa) recoberta com fina camada de graxa de silicone estéril. A suspensão resultante da tripsinização de cada colônia foi transferida para uma placa de 24 cavidades contendo meio seletivo.

As placas contendo estes clones foram incubadas até o crescimento confluyente das células. Cada cavidade foi então tripsinizada, destinando-se parte da suspensão para extração de RNA (em tubo de microcentrífuga) e parte para a manutenção dos clones (na mesma placa). Os tubos contendo as células de cada clone foram centrifugados a 80 g por 3 minutos, removendo-se o sobrenadante e congelando o sedimento de células imediatamente em gelo seco, estocando-o a -70°C.

3.8.5. Extração de RNA de células em cultura

O RNA das células de cada clone foi extraído com o reagente Trizol (Gibco-BRL) de acordo com as instruções do fabricante. O sedimento de RNA obtido foi dissolvido em 20 µL de água estéril tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e estocado a -20°C. Uma alíquota da solução foi usada para quantificação do RNA total, por leitura da absorbância a 260 nm.

3.8.6. Imobilização do RNA em membrana

O volume correspondente a 10 µg de cada um dos RNAs extraídos foi ajustado para 50 µL, misturado com 35 µL de 20x SSC e 20 µL de formaldeído (37%) e incubado por 15 minutos a 65°C para desnaturação. Uma membrana de nylon foi imersa em água estéril tratada com DEPC, em 20x SSC e posicionada entre as placas da unidade de “dot-blot” ou “slot-blot”. As cavidades foram lavadas individualmente com 500 µL de 20x SSC. As amostras foram aplicadas e as cavidades novamente lavadas com 500 µL de 20x SSC. As membranas foram removidas do aparelho, secas ao ar, colocadas entre 2 folhas de papel de filtro e 2 placas de vidro e secas em forno a vácuo por uma hora a 80°C (de acordo com www.msifilters.com/msi_p92.htm).

3.8.7. Preparo da sonda *LacI*

3.8.7.1. Isolamento do segmento de DNA correspondente ao Repressor *Lac*

O plasmídeo p3'SS (da geração anterior do sistema LacSwitch, correspondente ao atual pCMV-LacI) foi digerido com as enzimas de restrição *Xba* I e *Nar* I de modo a liberar um segmento de 1010 pares de bases contendo parte da região codificante do repressor *Lac*. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose-TAE para separar o fragmento de 1010 pares de bases dos fragmentos correspondentes ao vetor. A banda correspondente ao *LacI* foi recortada do gel com bisturi e o DNA foi purificado empregando-se o kit Qiaex II (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8.7.2. Marcação não-isotópica da sonda

Uma alíquota de 50 ng do fragmento *LacI* foi marcada com fluoresceína dUTP empregando-se o kit GeneImages – Labeling Module (Amersham- Pharmacia). A reação de marcação foi incubada a 37°C por 12 horas e inativada por aquecimento a 65°C por 15 minutos. A eficiência de marcação foi verificada aplicando-se 10% do volume de reação de 50 µl em membrana de DEAE celulose, que foi em seguida lavada com 2x SSC a 65°C e observada em transiluminador contra diluições de fluoresceína-11-dUTP aplicadas em

outra membrana (não lavada). A sonda marcada foi estocada a -20°C até o momento de uso.

3.8.8. Triagem dos clones celulares transfectantes através de hibridização RNA-DNA (“Dot-blot”) (“Slot-blot”)

As membranas foram hidratadas e pré-hibridizadas nas condições descritas inicialmente para “Northern-blot”. Para hibridização, foram empregados 5 μL da sonda marcada com fluoresceína (10% do volume total da sonda marcada) para cada membrana. A hibridização foi feita por 12 horas à temperatura de 42°C . As membranas foram lavadas 2 vezes com 2x SSC, 0,1% SDS a 42°C e 2 vezes com 0,1x SSC, 0,1% SDS a 55°C ,

Cada membrana lavada foi incubada por uma hora com a solução de bloqueio do kit GeneImages – Detection Module, sendo depois feita a incubação com uma diluição 1:5.000 do anticorpo anti-fluoresceína conjugado com fosfatase alcalina durante uma hora. Cada membrana foi lavada 3 vezes com solução 0,1 M Tris HCl pH 9,5; 0,3 M NaCl; 0,1% Tween 20 e em seguida coberta com a solução de detecção CDP Star por 5 minutos antes de ser usada para expor filmes de raios X (Kodak X-Omat K) durante 2 minutos a 1 hora.

Após a exposição, as membranas foram lavadas 2 vezes com solução fervente de 0,1% SDS; 1 mM EDTA para remoção da sonda *LacI* e posterior re-hibridização com sonda de GAPDH para verificar se a aplicação de RNA total foi equivalente em todas os “slots”.

3.8.9. Confirmação da expressão do repressor *Lac* (“Northern-blot”)

A expressão do repressor *Lac* nos transfectantes de ST1 e P7 positivos por “dot-blot” e “slot-blot” foi analisada por “Northern-blot” da maneira já descrita para confirmar os resultados. A membrana também foi re-hibridizada com GAPDH.

3.9. Estabelecimento de linhagens de ST1*LacI* e P7*LacI* expressando mRNAs “sense” e “antisense”

3.9.1. Determinação da sensibilidade das células ST1 e P7 a geneticina

A sensibilidade das células ST1 e P7 a Geneticina - G418 foi determinada da maneira descrita para higomicina. Geneticina (Mediatech–Cellgro - Herndon, VA - USA) foi adicionada ao meio de cultura de modo a obter concentrações finais de 0 (controle),

400, 500, 600 e 800 µg/mL e as células foram observadas até o décimo quinto dia após a adição do antibiótico.

3.9.2. Transfecção de células *ST1LacI* e *P7LacI* com construções induzíveis

Células *ST1LacI* e *P7LacI* foram transfectadas com as construções “sense” e “antisense” nas condições descritas anteriormente para transfecção com pCMV-LacI e selecionadas na presença de 600 µg/mL de geneticina e 150 µg/mL de higromicina. As colônias resultantes foram distribuídas em “clusters” de 24 cavidades para expansão, caracterização e posterior estocagem dos clones, mantendo-se sempre a seleção com antibióticos.

3.9.3. Triagem de transfectantes expressando Transcritos “sense” e “antisense”

3.9.3.1. Condições de cultura e indução com IPTG

Células de cada clone, obtido a partir da transfecção de *P7LacI* e *ST1LacI* com as construções em pOPI3, foram transferidas para 2 cavidades de placas de 12 cavidades e incubadas até atingirem aproximadamente 80% de confluência. Para indução dos transcritos, foi adicionado IPTG (solução 500 mM em PBS) até a concentração final de 5 mM a uma das cavidades. Na outra cavidade correspondente ao mesmo clone foi adicionado volume equivalente de PBS. As células foram incubadas nas condições normais de crescimento por 16 horas, extraído-se o RNA total de cada par de clones (induzido / não induzido) da maneira anteriormente descrita para os clones transfectantes de pCMV-LacI.

3.9.3.2. Imobilização do RNA em membrana

O volume correspondente a 10 µg de cada um dos RNAs extraídos foi ajustado para 50 µL, misturado com 35 µL de 20x SSC e 20 µL de formaldeído (37%) e incubado por 15 minutos a 65°C para desnaturação. Uma membrana de nylon foi imersa em água estéril tratada com DEPC e em 20x SSC, sendo em seguida posicionada entre as placas da unidade de “dot-blot” ou “slot-blot”. As cavidades foram lavadas individualmente com 500 µL de 20x SSC. As amostras foram aplicadas e as cavidades novamente lavadas com 500 µL de 20x SSC. As membranas foram removidas do aparelho, secas ao ar, colocadas entre 2 folhas de papel de filtro e 2 placas de vidro e secas em forno a vácuo por uma hora a 80°C (de acordo com http://www.msifilters.com/msi_p92.htm).

Para transfectantes de *P7LacI* com as construções induzíveis, alíquotas correspondentes a 10 µg de cada um dos RNAs extraídos foram processadas e aplicadas à membrana da maneira já descrita.

Para os transfectantes de ST1*LacI*, foram feitas diluições seriadas dos 10 µg iniciais, sendo aplicados 5, 2,5, 1,25 e 0,625 µg, da primeira à última linha de "dots". Quando a extração do RNA de uma amostra não permitiu a obtenção dos 10 µg necessários a todas as aplicações, quantidade de RNA correspondente à diluição seguinte foi empregada. A desnaturação das amostras e sua aplicação foram feitas como anteriormente.

Aliquotas de 50 ng dos insertos de cDNAs de metalotioneínas 1 e 2, glicoproteína α -1-ácida e *env* foram marcadas com fluoresceína dUTP, usando-se 10% do volume marcado para hibridizar cada membrana da maneira descrita. As membranas foram re-hibridizadas com sonda de GAPDH.

3.9.4. Emprego de sondas fita-específicas para detecção dos transcritos "sense" e "antisense" nos transfectantes induzíveis com IPTG.

Sondas fita-específicas foram sintetizadas por PCR unidirecional a partir dos clones originais C27 (metalotioneína-1), C36 (glicoproteína α 1-ácida), C41 (metalotioneína-2) e CV2 (*env* retroviral) em pBluescript II SK-. As sondas para detecção de transcritos "sense" foram obtidas pela extensão a partir do sítio de pareamento do "primer" T7, usando-se como "template" o plasmídeo linearizado com *Bam*H I. Para a detecção de transcritos "antisense", a extensão foi feita a partir do sítio de pareamento do "primer" SK, com o "template" linearizado por *Kpn* I. A síntese da sonda marcada não radioativamente foi feita a partir de 20 ng do DNA "template" em volume final de 50 µL, contendo 1x PCR buffer, 50 nM de "primer" (T7 ou SK), 10 µL de 5x Nucleotide Mix (Kit GeneImages), 2,5 U de Taq Polimerase (todos os reagentes da Amersham-Pharmacia). A mistura foi incubada usando-se o seguinte programa: 95°C 1'30"; 25 ciclos de 94°C 25"; 45°C 20"; 70°C 40" e um ciclo com extensão final de 70°C por 5'. A eficiência de marcação foi verificada da maneira descrita para a marcação padrão do kit

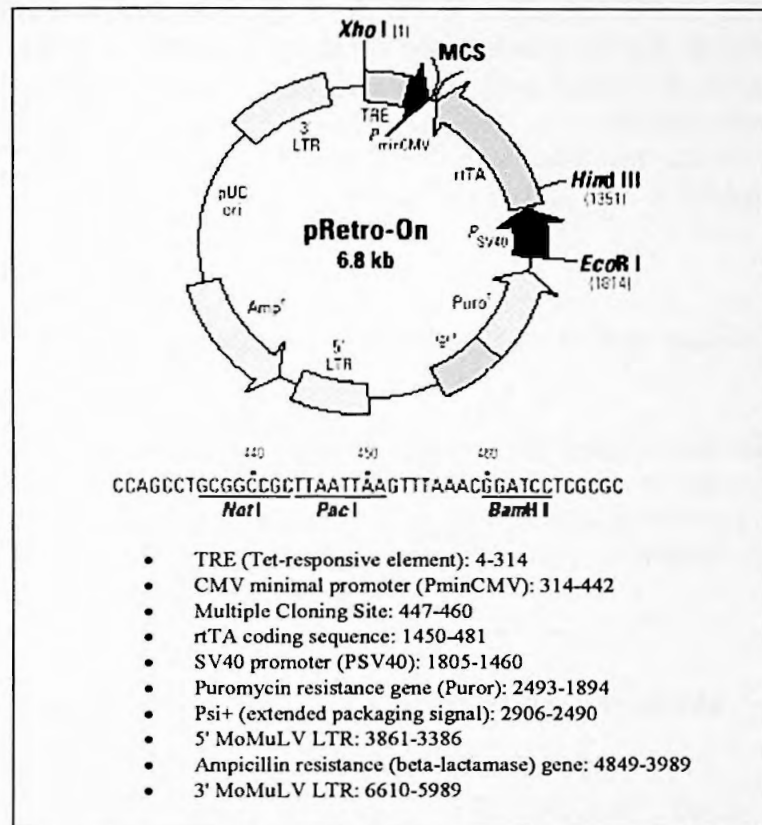
3.10. Estabelecimento de linhagens de ST1e P7 expressando mRNAs "sense" e "antisense" através de vetores retrovirais

3.10.1. Subclonagem dos cDNAs em pRetro-On

Os cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 nas construções intermediárias em pUC18 e da glicoproteína α -1-ácida e de *env* nas construções intermediárias em pGEM-T easy foram removidos dos vetores por digestão com *Not* I e transferidos para o vetor pRetro-On (Clontech) (Quadro 8) de forma semelhante à descrita para a subclonagem em pOPI3. Os produtos de ligação foram usados para transformar *E. coli* Dh5 α . O DNA das "minipreps" das colônias resultantes foi submetido a digestão com *Not* I para confirmar a presença do inserto e com *Bam*H I para determinação de sua orientação. Um clone de cada construção

em cada orientação foi crescido em 50 mL de caldo LB / ampicilina, sendo o DNA plasmideal extraído e purificado em colunas Qiagen tip 500.

Quadro 8 - Vetor pRetro-On. Mapa circular e descrição dos marcadores e características de maior importância.



3.10.2. Transfecção de células empacotadoras

Células empacotadoras ϕ nx Eco e ϕ nx Amphi (fornecidas pelo Dr. Gary Nolan – Univ. de Stanford, CA - USA) foram plaqueadas em “clusters” de 6 cavidades (2×10^5 células/cavidade) em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e incubadas por 12 horas. As células foram transfectadas com as construções em pRetro-On da forma já descrita.

3.10.3. Coleta e titulação dos sobrenadantes

A partir da 36^a hora após a adição do meio com soro, o sobrenadante de cada placa foi coletado a cada 8 horas até a 76^a hora, adicionando-se 1 mL de DMEM contendo 5% de soro a cada coleta. Os sobrenadantes de cada coleta foram filtrados em filtro de acetato de

celulose 0,45 μm (Nalge-Nunc – Rochester, NJ - USA), reunidos em “pool” e congelados a -70°C .

Os sobrenadantes foram titulados em células NIH-3T3 plaqueadas em “clusters” de 6 cavidades (1×10^5 células/cavidade) com 2 mL de DMEM, incubadas por 12 horas. Foram preparados 6 tubos contendo 1,35 mL de DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e 8 $\mu\text{g/mL}$ de polybrene. Ao primeiro tubo foram adicionados 150 μL de sobrenadante filtrado e, após agitação foram transferidos 150 μL para o tubo seguinte e, assim, sucessivamente até o último tubo. Foi retirado 1 mL de meio de cada cavidade do “cluster” e substituído por 1 mL de cada diluição. Após 48 horas de incubação o meio foi trocado por meio contendo puromicina (1 $\mu\text{g/mL}$), incubando-se as placas por 8 dias para contagem das colônias formadas.

3.10.4. Determinação da sensibilidade de células ST1 e P7 a puromicina

A concentração necessária de puromicina para a seleção das células ST1 e P7 foi determinada de maneira semelhante à descrita anteriormente para os outros agentes seletivos. As células foram plaqueadas em “clusters” de 96 cavidades em duas densidades diferentes (100 e 2.500 células/cavidade), verificando-se a sobrevivência das células após 10 dias na presença de 0,1 a 5 $\mu\text{g/ml}$ de puromicina.

3.10.5. Infecção de células ST1 e P7 com retrovirus recombinantes

Células ST1 e P7 foram plaqueadas em “clusters” de 6 cavidades (5×10^5 células/cavidade) e incubadas por 12 horas. Sobrenadante viral correspondente a 5×10^6 cfu (“colony-forming units”) foi aplicado a cada cavidade, incubando-se os “clusters” por 24 horas. Na 48ª hora após a infecção, as células de cada cavidade foram tripsinizadas, diluídas e transferidas para placas P100.

3.10.6. Seleção e clonagem de células infectadas

As placas P100 foram incubadas por 12 horas, substituindo-se, então, o meio por meio contendo puromicina. As colônias formadas após 10 dias foram clonadas empregando-se discos de papel-filtro embebidos em tripsina e distribuídas em microplacas de 96 cavidades, mantendo-se a seleção com puromicina.

3.11. Purificação de anticorpos monoclonais contra gp70 e p15e de MuLV

Hibridomas secretores de IgG anti gp70 (CRL1913) e anti p15e (CRL1893) foram adquiridos da ATCC e propagados para a produção de anticorpos monoclonais. Os hibridomas foram expandidos em meio RPMI1640 contendo 50 mM β -mercaptoetanol e 15% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em garrafas de 75 cm² em densidade de $1-6 \times 10^6$ células/mL, trocando-se o meio a cada 7 dias. O meio retirado das culturas foi centrifugado a 80 xg por 5 minutos em centrífuga clínica Fanem para remoção de células e o sobrenadante foi congelado até a obtenção de volume conveniente para purificação de imunoglobulinas.

A IgG foi parcialmente purificada por precipitação com volume igual de solução saturada de sulfato de amônio, adicionado gota a gota sob agitação lenta, em banho de gelo/água. A solução foi mantida a 4°C por 16 horas e centrifugada a 10.000 rpm em rotor GSA por 30 minutos a 4°C (HARLOW e LANE, 1988). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em PBS na proporção de 10% do volume original e dialisado contra PBS (3 trocas) por 24 horas. As imunoglobulinas foram alíquotadas e estocadas a -20°C até o momento de uso.

3.12. Ensaio de expressão para triagem de clones celulares

Para a padronização do ensaio de expressão, células STI foram plaqueadas em microplacas de 96 cavidades (5×10^4 células por cavidade) recobertas com poli-L-lisina (100 μ g/mL, 1 hora; enxagüe com água estéril, 5 minutos; secagem – conforme CELIS, 1998; HARLOW e LANE, 1988) e incubadas por 12 horas. Nas colunas pares, o meio foi renovado e nas colunas ímpares, o meio de cultura foi substituído por DMEM contendo hidrocortisona, incubando-se a placas por mais 16 horas.

Após remoção do meio das placas, as células foram fixadas com paraformaldeído (2% em PBS pH 7,2) por 15 minutos, permeabilizadas com saponina (0,05% em TBS - 50 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) por 15 minutos e tratadas com H₂O₂ (0,03% em TBS) por 10 minutos. Cada etapa foi feita sob agitação e seguida de 3 lavagens com TBS por 2 minutos, também com agitação. As placas foram em seguida bloqueadas por 15 minutos (TBS contendo leite em pó 2% ou BSA 0,5% ou SuperBlock 50% – Pierce, Rockford, IL - USA) sendo, em seguida, aplicado o anticorpo primário em diluições (em TBS contendo 0,05% de Tween 20 e 0,5% de BSA) crescentes no sentido das linhas (A até H). Os anticorpos usados foram anti metalotioneína monoclonal - clone E9 (Dako – Carpinteria, CA - USA), anti glicoproteína α -1 ácida monoclonal (Calbiochem – San Diego, CA - USA), anti gp70 e anti p15e do vírus da leucemia murina de Friend monoclonais (produzidos a partir de hibridomas adquiridos da ATCC).

As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes, como descrito acima, antes da aplicação do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Amersham-Pharmacia). Este anticorpo foi aplicado aos pares (para células tratadas e não tratadas com hidrocortisona), em diluições crescentes no sentido das colunas (de 1-2 até 11-12), incubado por 30 minutos e lavado 3 vezes, como descrito acima. A detecção foi feita com 0,2 mg/mL OPD (orto fenileno diamina), 0,4 µL/mL de H₂O₂ 30% em tampão citrato pH 4,5. A leitura da reação foi feita a 492 nm após a parada do desenvolvimento de cor com H₂SO₄ 4 N.

Após a leitura, as placas foram lavadas com TBS e coradas com Coomassie Brilliant Blue 0,05% em metanol 40%; ácido acético 10% por 10 minutos. O corante foi removido, por lavagem em água corrente, até não ser mais observada liberação de cor. As placas foram então secas ao ar e o corante ligado às proteínas foi solubilizado com SDS 1% em TBS. A absorbância foi medida a 620 nm, refletindo a densidade celular em cada cavidade.

A relação entre a absorbância da reação com os anticorpos e a da coloração com Coomassie permite estimar a expressão relativa da proteína em estudo. As diluições dos anticorpos primário e secundário, determinadas neste ensaio preliminar, foram empregadas no “screening” dos clones com expressão induzível.

Uma vez padronizado o ensaio de expressão para a triagem, os clones celulares, gerados a partir dos experimentos de transfecção com construções em pOPI3 e de infecção com construções retrovirais, foram tripsinizados das microplacas de 96 cavidades nas quais foram originalmente crescidos. A suspensão celular resultante foi distribuída em 8 cavidades de microplacas de 96 cavidades recobertas com poli-L-lisina. Foi plaqueado 1/10 do volume da suspensão por cavidade e o volume restante da suspensão foi mantido em cultura na placa original. As placas contendo as 8 subculturas de cada clone foram mantidas em cultura nas condições usuais por 48 horas. O meio de cultura das placas foi então substituído da seguinte maneira:

primeira coluna de cavidades: renovação do meio de cultura

segunda coluna: meio de cultura contendo hidrocortisona

terceira coluna: meio de cultura contendo 5 mM de IPTG ou 5 µg/mL de doxiciclina

quarta coluna: meio de cultura contendo hidrocortisona e IPTG ou hidrocortisona e doxiciclina.

As placas com o meio de cultura substituído foram incubadas por 24 horas antes do processamento para o ensaio de ELISA imunocitoquímico (baseado em de la MONTE *et al.*, 1999).

Após remoção do meio de cultura das placas, as células foram fixadas com paraformaldeído (2% em PBS pH 7,2) por 15 minutos, permeabilizadas com saponina (0,05% em TBS) por 15 minutos e tratadas com H₂O₂ (0,03% em TBS) por 10 minutos. Cada etapa foi feita sob agitação e seguida de 3 lavagens com TBS por 2 minutos, também sob agitação. As placas foram bloqueadas por 15 minutos (SuperBlock 50% em TBS – Pierce) sendo, em seguida, aplicado o anticorpo primário (diluído em TBS contendo 0,05%

de Tween 20, 5% SuperBlock e 1% de soro normal de cavalo) nas concentrações determinadas por “block-titration”.

Para a detecção das proteínas de interesse, os anticorpos usados foram anti-metalotioneína monoclonal - clone E9 (Dako), anti-glicoproteína α -1 ácida monoclonal (Calbiochem) e monoclonal anti-gp70 (ATCC). As placas contendo os anticorpos foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas 3 vezes, da maneira descrita acima, antes da aplicação do anticorpo secundário

O anticorpo secundário biotilado - IgG de cavalo anti-IgG de camundongo (Pierce) foi diluído na proporção de 1:10.000 em TBS contendo 5% Superblock, incubado por 30 minutos e lavado 3 vezes. O complexo avidina-biotina-peroxidase (Pierce) foi diluído em TBS, conforme indicação do fabricante, incubado por 30 minutos e lavado da placa como acima. A detecção foi feita com tetrametilbenzidina (Pierce) de acordo com as recomendações do fabricante. A leitura da reação foi feita a 450 nm após a parada do desenvolvimento de cor com H_2SO_4 2N.

Após a leitura, as placas foram lavadas com TBS e coradas com Coomassie Blue (0,05% em metanol 40% / ácido acético 10%) por 10 minutos. O corante foi removido por lavagem em água corrente até não ser mais observada liberação de cor. As placas foram secas ao ar e o corante ligado às proteínas foi solubilizado com SDS 1% em TBS. A absorbância foi medida a 620 nm. Tabulações, cálculos, gráficos e análises estatísticas foram feitos com o emprego dos programas Excel (planilha) e Statistica.

3.13. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose

Um gel de agarose / DMEM foi preparado misturando-se quantidades iguais de gel de agarose 0,6% (em água), fundido e equilibrado a 42°C com DMEM 2x concentrado, também equilibrado a 42°C, contendo 10% de soro fetal bovino, na presença ou na ausência de hidrocortisona (100 ng/mL) e indutor (IPTG 5 mM ou doxiciclina 5 μ g/mL). O gel foi distribuído em “clusters” de 24 cavidades e gelificado a temperatura ambiente. Células transfectantes derivadas de ST1 e P7 foram tripsinizadas, contadas e distribuídas sobre a superfície gelificada, nas cavidades, em densidades definidas. Outro gel de agarose / DMEM, preparado da maneira descrita acima, porém com agarose 0,3%, foi aplicado sobre as células e gelificado a temperatura ambiente. A superfície foi coberta com meio de cultura líquido (DMEM contendo 5% de soro), na presença ou na ausência de hidrocortisona e/ou indutor. Cada condição de linhagem celular, densidade e tratamento foi mantida em duplicata. O meio de cultura líquido foi renovado a cada 3 dias, até o final do ensaio (20 dias). O meio de cultura líquido foi, então, removido e as células foram fixadas com formaldeído 3,7% em PBS, sendo estocadas para posterior contagem de colônias.

Os dados de eficiência de plaqueamento foram tabulados. Para a análise de significância estatística, foram tomados como base a média e o desvio padrão das

eficiências de plaqueamento determinadas para as células parentais *ST1LacI* e *P7LacI*. Alterações de eficiência de plaqueamento maiores que duas vezes o desvio padrão são significativas com 95% de intervalo de confiança. Tabulações, cálculos e análises estatísticas foram feitos com o emprego dos programas Excel (planilha) e Statistica.

4. Resultados

4.1. Análise dos clones de cDNA C27, C36, C41 e CV2 isolados por VALENTINI, 1993.

O seqüenciamento parcial dos insertos dos plasmídeos C27, C41, C36 e CV2, abrangendo 100 a 150 bases a partir das extremidades 3' destes cDNAs, já havia permitido a identificação dos genes correspondentes a cada um dos clones como sendo induzidos por hidrocortisona em ST1 (VALENTINI, 1993; VALENTINI e ARMELIN, 1996).

O seqüenciamento completo do inserto correspondente ao clone C27 e o alinhamento desta seqüência com aquelas disponíveis nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos, através do programa BLASTN, mostraram a presença da porção codificante completa do cDNA de metalotioneína 1 (Quadro 9).

A seqüência correspondente ao cDNA do clone C36 na extremidade adjacente ao "primer" T3, ao ser alinhada através de BLASTN, mostrou que a extremidade 5' do inserto não contém 119 dos nucleotídeos iniciais da porção codificante do mRNA da glicoproteína α -1-ácida, sendo portando um cDNA incompleto (Quadro 10).

Para o clone C41 a seqüência de DNA determinada mostrou a presença da porção codificante completa de metalotioneína 2 (Quadro 11).

O tamanho do inserto do clone CV2 (aproximadamente 1,5 kpb estimado em eletroforese em gel de agarose-TBE), fazia prever que este cDNA também estivesse incompleto, pois os transcritos *env* dos vírus de leucemia murina assemelhados possuem usualmente entre 1,8 e 2,5 kb. A seqüência adjacente ao "primer" T3 confirmou que o início do inserto do clone CV2 não coincide com o início do transcrito *env* de retrovírus homólogos.

A seqüência completa do inserto do clone CV2 foi determinada, mostrando 1.330 pares de bases. Em comparação com seqüências similares de retrovírus murinos, este tamanho corresponderia a 50 a 75% do transcrito *env* completo (Quadro 12).

Quadro 9 - Alinhamento da seqüência determinada para o clone C27.

O alinhamento da seqüência do inserto correspondente ao clone C27, com a seqüência do cDNA de metalotioneína I disponível em bancos de dados de seqüências de nucleotídeos (gb|J00750|RATMETI - Rat metallothionein-1 mRNA), foi feito com o programa CLUSTAL. A seqüência codificante está representada em maiúsculas.

CloneC27 J00750	-----acttcagcagcccgactgccttcttgctcgcttacaccggttgctcc tcccgacttcagcagcccgactgccttcttgctcgcttacaccggttgctcc *****
cloneC27 J00750	agattcaccatcccgacttcagcagcccgactgccttcttgctcgcttacaca agattcaccatcccgacttcagcagcccgactgccttcttgctcgcttacaca *****
cloneC27 J00750	ccgttgctccagattcaccagatctcggaATGGACCCCAACTGCTCCTGC ccgttgctccagattcaccagatctcggaATGGACCCCAACTGCTCCTGC *****
cloneC27 J00750	TCCACCGGCGGCTCCTGCACCTGCTCCAGCTCCTGCGGCTGCAAGAAGTGC TCCACCGGCGGCTCCTGCACCTGCTCCAGCTCCTGCGGCTGCAAGAAGTGC *****
cloneC27 J00750	CAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCGTGGGCT CAAATGCACCTCCTGCAAGAAGAGCTGCTGCTCCTGCTGCCCGTGGGCT *****
cloneC27 J00750	GCTCCAAATGTGCCAGGGCTGTGTCTGCAAAGGTGCCTCGGACAAGTGC GCTCCAAATGTGCCAGGGCTGTGTCTGCAAAGGTGCCTCGGACAAGTGC *****
cloneC27 J00750	ACGTGCTGTGCCTgaagtgacgaacagtgctgctgccctcaggtgtaaat ACGTGCTGTGCCTgaagtgacgaacagtgctgctgccctcaggtgtaaat *****
cloneC27 J00750	aatttccggaccaactcagagtttgcggtacacctccaccagtttact aatttccggaccaactcagagtttgcggtacacctccaccagtttact *****
cloneC27 J00750	aaaccccgttttctaccgagcatgtgaataataaaagcctgtttattct aaaccccgttttctaccgagcatgtgaataataaaagcctgtttattct *****

Quadro 10 - Alinhamento da seqüência determinada para o clone C36.

O alinhamento da seqüência correspondente ao inserto do clone C36 com a seqüência de cDNA da glicoproteína- α -1-ácida, disponível em bancos de dados de seqüências de nucleotídeos (gb|J00696| RATAGPA1-Rat alpha 1-acid glycoprotein/AGP - mRNA.), foi feito com o "software" CLUSTAL. A seqüência codificante está representada em maiúsculas.

Notar que o clone C36 é um cDNA incompleto na extremidade 5'.

C36 J00696	----- ctcttcctgggcccgggtgcctctgagtgctcttcggcATGGCGCTGCACATGGTTCTTGTCG
C36 J00696	----- TTTTGAGCCTCCTGCCCTTGTTGGAAGCTCAGAACCAGAACCTGCCAACATCACCTAG
C36 J00696	-----CTCAGACAAATGGTTTACATGGGAG GCATACCTATTACCAATGAGACCCTGAAATGGCTCTCAGACAAATGGTTTACATGGGAG *****
C36 J00696	CAGCTTCCGAGACCCCGTGTTCAAGCAGGCAGTTCAAACGATACAGACGGAATATTTTT CAGCTTCCGAGACCCCGTGTTCAAGCAGGCAGTTCAAACGATACAGACGGAATATTTTT *****
C36 J00696	ACCTTACCCCCAACTTGATAAACGACACAATTGAACTTCGGGAGTTTCAGACCACAGACG ACCTTACCCCCAACTTGATAAACGACACAATTGAACTTCGGGAGTTTCAGACCACAGACG *****
C36 J00696	ACCAGTGTGTCTATAAATTACCCATCTAGGAGTCCAGAGAGAGAATGGGACCTTATCCA ACCAGTGTGTCTATAAATTACCCATCTAGGAGTCCAGAGAGAGAATGGGACCTTATCCA *****
C36 J00696	AGTGTGCAGGAGCAGTGAAAATCTTTGCCATTTGATAGTGCTGAAGAAACATGGGACCT AGTGTGCAGGAGCAGTGAAAATCTTTGCCATTTGATAGTGCTGAAGAAACATGGGACCT *****
C36 J00696	TCATGCTTGCCTTTAACCTGACAGATGAGAACCAGGGGGCTGTCCTTCTATGCTAAAAAGC TCATGCTTGCCTTTAACCTGACAGATGAGAACCAGGGGGCTGTCCTTCTATGCTAAAAAGC *****
C36 J00696	CAGACTTGTCCCCAGAGCTGCGGAAAATATTCCAGCAGGCTGTCAAAGATGTGGGCATGG CAGACTTGTCCCCAGAGCTGCGGAAAATATTCCAGCAGGCTGTCAAAGATGTGGGCATGG *****
C36 J00696	ATGAATCAGAAATCGTATTTGTGCGACTGGACAAAGGATAAGTGCAGTGAGCAGCAGAAGC ATGAATCAGAAATCGTATTTGTGCGACTGGACAAAGGATAAGTGCAGTGAGCAGCAGAAGC *****
C36 J00696	AGCAGCTGGAGCTGGAGAAGGAGACTAAGAAGGAGACCAAGAAGGATCCTtaggccaagc AGCAGCTGGAGCTGGAGAAGGAGACTAAGAAGGAGACCAAGAAGGATCCTtaggccaagc *****
C36 J00696	atgaactcagctctctgaactccggggactgtcccatgc----- atgaactcagctctctgaactccggggactgtcccatgcccactctacccccactcctg *****
C36 J00696	----- tgcacctcgattctatTTTccacaataataaaggTTTggTTaaacaatc

Quadro 11 - Alinhamento da seqüência determinada para o clone C41.

O alinhamento da seqüência do inserto correspondente ao clone C41 com a do gene da metalotioneína 2, disponível em bancos de dados de seqüências de nucleotídeos (gb| M11794| RATMT12C - Rat metallothionein-2), foi feito com o “software” CLUSTAL.

A seqüência codificante está representada em maiúsculas.

cloneC41 M11794	ggaattcggcagcagaggtccgcgtgcttctctccatcacgctcctagaac -----atcacgctcctagaac *****
cloneC41 M11794	tctacagcgatctctcgttgatctccaactgccgcctccattcgccATGG tctacagcgatctctcgttgatctccaactgccgcctccattcgccATGG *****
cloneC41 M11794	ACCCCAACTGCTCCTGTGCCACAGATGGATCCTGCTCCTGCGCTGGCTCC ACCCCAACTGCTCCTGTGCCACAGATGGATCCTGCTCCTGCGCTGGCTCC *****
cloneC41 M11794	TGCAAATGCAAACAATGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAAAGCTGCTGTTC TGCAAATGCAAACAATGCAAATGCACCTCCTGCAAGAAAAGCTGCTGTTC *****
cloneC41 M11794	CTGCTGCCCCGTGGGCTGTGCGAAGTGCTCCCAGGGCTGCATCTGCAAAG CTGCTGCCCCGTGGGCTGTGCGAAGTGCTCCCAGGGCTGCATCTGCAAAG *****
cloneC41 M11794	AGGCTTCGGACAAGTGCAGCTGCTGCGCCTgaagtggggcgctcctcaca AGGCTTCGGACAAGTGCAGCTGCTGCGCCTgaagtggggcgctcctcaca *****
cloneC41 M11794	atggtgtaaataaaacaacgtaaggaacctagcctttttttgtacaaccc atggtgtaaataaaacaacgtaaggaacctagcctttttttgtacaaccc *****
cloneC41 M11794	tgaccggttctccacacttttttctataaagcatgtaactgacaataaaa tgaccggttctccacacttttttctataaagcatgtaactgacaataaaa *****
cloneC41 M11794	taaaaaaacttgacttgattaacccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaactcgag taaaaaaacttgacttgatta----- *****

Quadro 12 – Sequência determinada para o inserto correspondente ao clone CV2.

```
1 GCTCTAGAACTAGTGGACCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGAGACA
51 AGCGATGGGTCCTACTATTTGACCGCTCCCACAGGAACTACCTGGGCTTG
101 TAGTACTGGACTCACTCCCTGTATCTCAACCACCATACTTGACCTACCA
151 CCGATTACTGTGTCCTGGTCGAGCTTTGGCCAAGGGTGACCTACCATTCC
201 CCTAGTTATGTTTACCACCAATTTGAAAGACAAGCCAAATATAAAAAGAGA
251 ACCCGTCTCACTAACTCTGGCCTACTATTAGGAGGACTCACTATGGGCGG
301 AATGCCCCGTGGAGTGGGAACAGGGACTACCGCCTAGTTGGCACTCAGCAG
351 TTCAACAACCTCAGGCTGCCATGCACGATGACCTTAAAGAAGTTGAAAAGT
401 CCATCACTAATCTAGAAAAATCTTTGACCTCCTTGTCCGAAGTACGCTTA
451 CAGAATCGTAGAGGCCTAGATCTACTATTCCTAAAAGAGGGAGGTTTGTCT
501 GCCTTAAAAGAAGAATGCTGTTTCTATGCCGACCAGAGAGGATTGGTACG
551 GATAGCATGGCCAACTTAGAGAAGATTGGAGGTGAGAGACAAGCTCTTT
601 GATCCAACAGGTGTTGAGCTGAGGGCTGTTTAATAAGTCCCCTTGGTTCA
651 CCACCCTGATATCCACCATCATGGGTCCCCTTGATAATCCTCTTGTTAAT
701 TTTACTCTTTGGGCCTTGTATTCTCAATCGCCTTGGTCCAGTTTATCAA
751 GACAGGTTTCGGTAGTGCAGGCCCTGGTCTGACTCAACAATATCATCAA
801 CTTAAGACAATAGGAGATTGTAATCACGTGAATAAAAGATTTTATTCAG
851 TTTACAGAAAGAGGGGGGAATGAAAGACCCCTTCATAAGGCTTAGCCAGC
901 TAACTGCAGTAACGCCATGTTGCAAGGCATGGGAAAATACCAGAGCTGAT
951 GTTCTCAGAAAAACAAGAACAAGAAAGTACAGAGAGGCTGGAAAGTACCG
1001 GGACTAGGGCCAAGCAGGATATCTGTGGTCAAGCACTAGGCCCCGCCAG
1051 GGCCAAGAACAGATGGTCCCAGAAATAGCTAAAACGAACCGAACAGTTTC
1101 AAGAGACCCAGAACTTGGTCTCAAGGTTCCCAGATGAGGCCCCATTC
1151 ACCCCAAGCCTCATTTAAACTAACCAATCAGCTCGCTTCTCGCTTCTGTA
1201 CCCGCGCTTATTCTGCCAGCTCTATAAAAAGGGTAAAACCCACACTC
1251 GCGCGCCAGTCTCCGATAGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCA
1301 ATAAAGCCTTTTGTCTTGCATCCGAAAA
```

O inserto do clone CV2 inclui as regiões R e U3 que compõe o LTR 3', a sequência codificante completa da porção transmembrana p15E e parte da região que codifica a glicoproteína gp70 da superfície do envelope viral (descrita por KOCH *et al.*, 1984).

Em relação aos *env* que mostram maior "score" BLASTN, a sequência do cDNA de CV2 mostra uma semelhança muito grande, porém incompleta, com *env* de diversos retrovírus murinos endógenos, infectivos ecotrópicos e xenotrópicos, não possuindo, porém, homologia total com nenhum deles.

O preparo das construções para expressão induzível foi iniciado com os cDNAs das metalotioneínas 1 e 2, já que a integridade destes cDNAs foi confirmada pelo seqüenciamento dos clones C27 e C41.

Para a elaboração de construções contendo os cDNAs da glicoproteína α -1-ácida e do *env* viral, os cDNAs contidos nos plasmídeos C36 e CV2 não tiveram utilidade, por estarem incompletos. Na tentativa de obter estes cDNAs íntegros, recorreu-se à triagem

(“screening”) de bibliotecas de cDNA e ao RT-PCR de células ST1 tratadas com hidrocortisona.

4.2. Transfecção de células ST1 com oligonucleotídeos “antisense”

Para avaliar o papel das proteínas correspondentes às seqüências anteriormente isoladas (VALENTINI, 1993; VALENTINI e ARMELIN, 1996), a primeira abordagem deste trabalho foi buscar inibir a tradução dos RNAs mensageiros (mRNAs) através da transfecção de células ST1 com oligonucleotídeos “antisense”. Para tanto, foram desenhados e sintetizados oligos com este potencial (Quadro 2).

Em ensaios de transfecção de células ST1 com oligos “antisense” procurou-se observar o possível efeito morfológico de inibição da reversão fenotípica causada por glicocorticóides na célula ST1.

Experimentos foram feitos empregando 50 nM de oligos. A hidrocortisona foi adicionada em dois diferentes tempos, após 6 ou 24 horas da transfecção. Na observação, 24 horas após a adição de hidrocortisona, também não foi verificada qualquer mudança morfológica das células transfectadas com “antisense” em relação aos controles (Figura 1).

Outra série de experimentos foi feita com 100 nM de oligonucleotídeos. Novamente não foi observada alteração de fenótipo nas células tratadas com hidrocortisona após 6 h ou 24 h (Figura 2) da transfecção.

Foram realizados experimentos de transfecção conjunta dos oligos “antisense” contra metalotioneína 1 e glicoproteína α -1-ácida. Nestes ensaios, também, não foi observada qualquer diferença morfológica das células co-transfectadas em relação aos controles (Figura 3).

A observação da morfologia de células ST1 transfectadas com oligonucleotídeos “antisense”, não indicou inibição da reversão fenotípica por glicocorticóides, seja com o emprego isolado ou conjunto de oligos “antisense” contra metalotioneína 1 e glicoproteína α -1-ácida, mesmo tendo sido empregadas concentrações relativamente elevadas de oligonucleotídeos (50 e 100 nM).

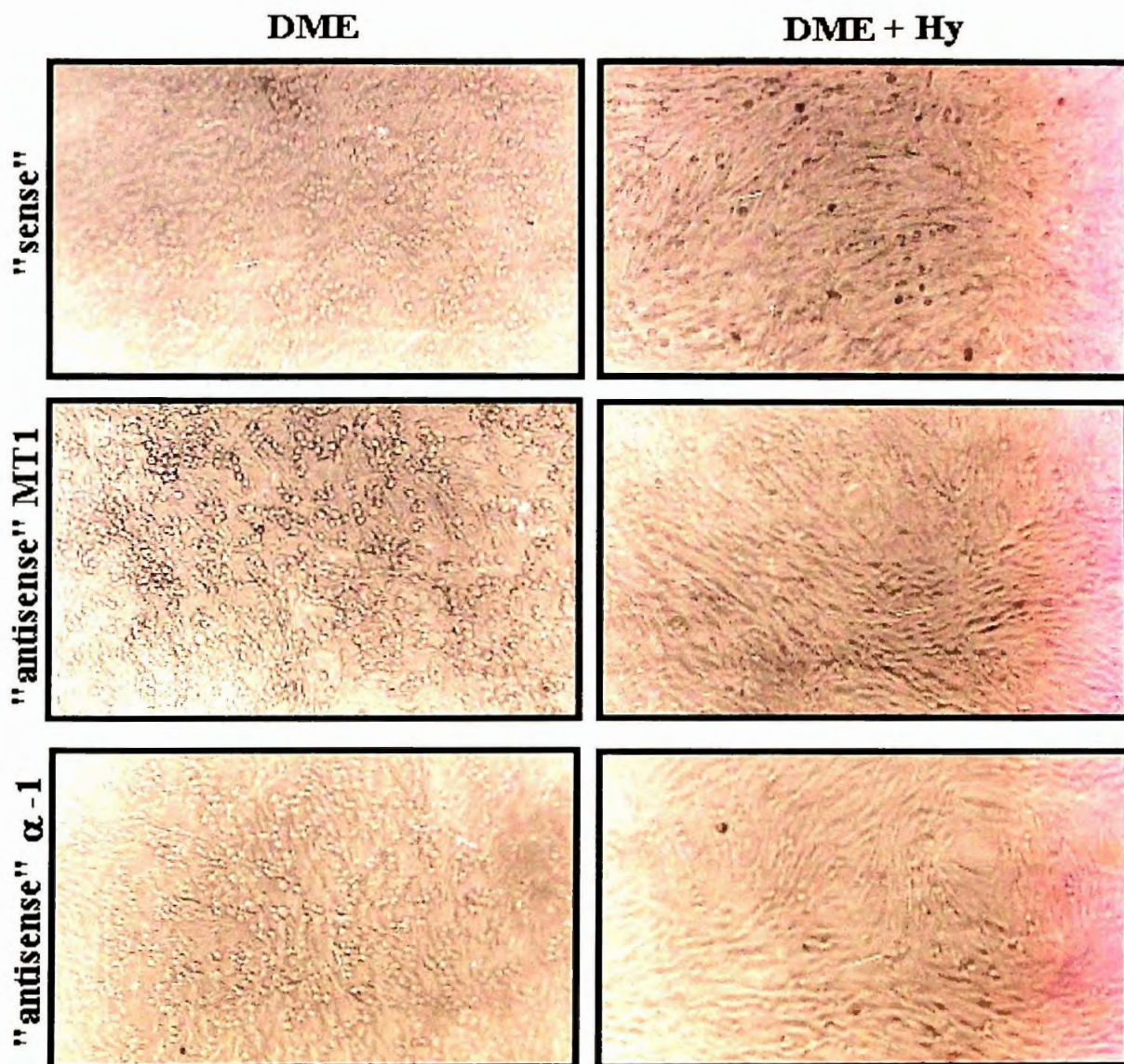


Figura 1 – Aspecto morfológico de células ST1 transfectadas com 50nM de oligonucleotídeos “antisense” e tratadas por 24 h com hidrocortisona.

Os oligos “antisense” empregados foram dirigidos contra mRNAs de metalotioneína 1 (MT1) ou contra glicoproteína alfa-1-ácida (α -1). Oligo “sense”, de glicoproteína alfa-1-ácida (α -1), foi usado como controle.

A observação foi feita 24h após o tratamento com hidrocortisona (Hy) e 48 h após a transfecção.

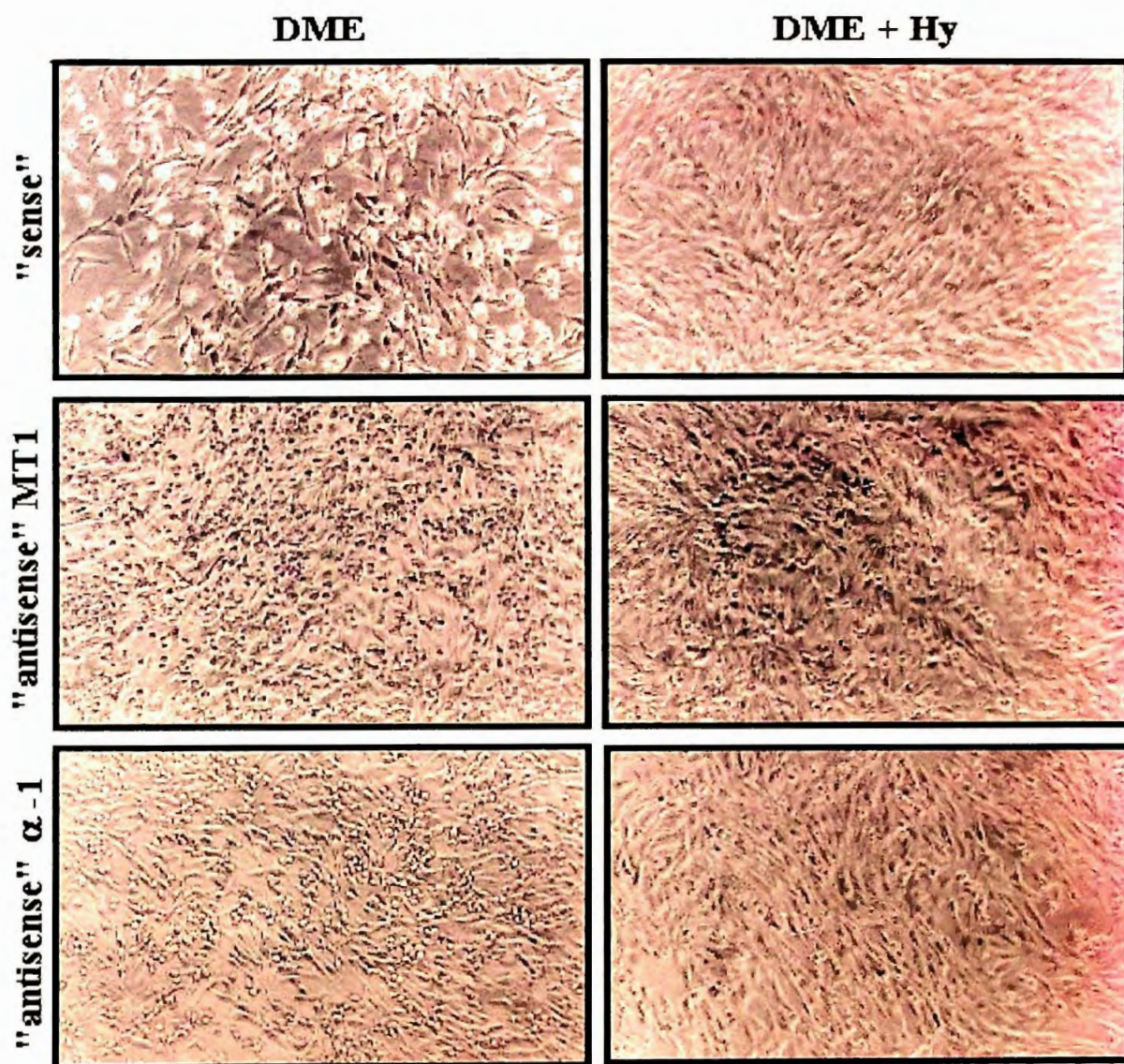


Figura 2 – Aspecto morfológico de células ST1 transfectadas com 100nM de oligonucleotídeos “antisense” e tratadas por 24 horas com hidrocortisona.

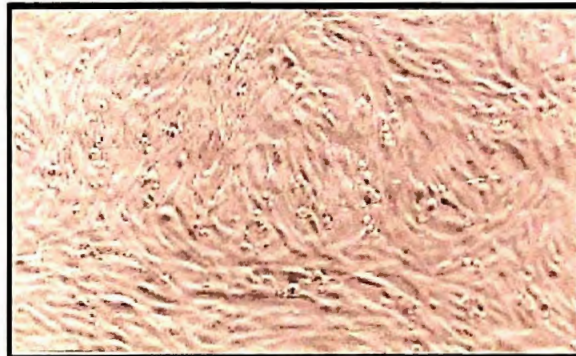
Os oligos “antisense” empregados foram dirigidos contra mRNAs de metalotioneína 1 (MT1) ou contra glicoproteína alfa-1-ácida (α -1). Oligo “sense”, de glicoproteína alfa-1-ácida (α -1), foi usado como controle.

A observação foi feita 24h após o tratamento com hidrocortisona (Hy) e 48h após a transfecção.

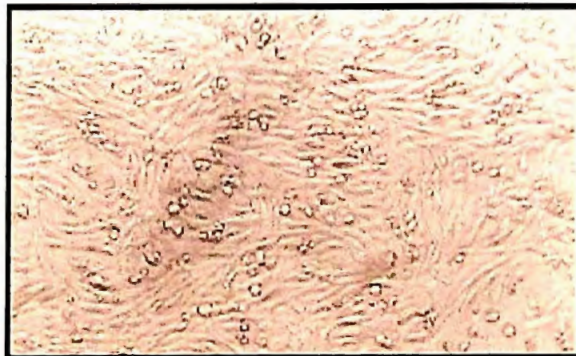
"antisenses" MT1 + A-1-A



DME



**DME + Hy
6h pós-transfecção**



**DME + Hy
24h pós-transfecção**

Figura 3 – Aspecto morfológico de células ST1 co-transfectadas com 100 nM de oligonucleotídeos “antisense”.

Os oligonucleotídeos “antisense” foram dirigidos contra mRNAs de metalotioneína 1 (MT1) e contra glicoproteína alfa-1-ácida (A-1-A). A observação das células foi feita 24h após o tratamento com hidrocortisona, 6h e 24h pós transfecção.

Apesar destes resultados, o papel na proliferação celular poderia ser ainda confirmado, por exemplo, em experimentos de incorporação de timidina tritiada através da comparação da síntese de DNA em culturas tratadas e não tratadas após a transfecção com oligos “antisense”.

Estes experimentos foram inicialmente realizados transfectando 2 a 1.000 nM de oligonucleotídeos “antisense” em células ST1 em duas diferentes densidades: sub-confluentes e esparsas. Como controle, foram usadas células ST1 não transfectadas, na presença de 2% de soro fetal bovino apenas ou acrescido de Lipofectamine e/ou hidrocortisona (Gráfico 1).

Estes experimentos foram repetidos em células ST1 sub-confluentes, com algumas modificações. Para evitar a toxicidade dos oligos, foi reduzida a faixa de concentração dos oligos (5 a 600 nM) e o lípide utilizado para transfecção foi mudado de Lipofectin para Cytofectin, que tem sido descrito na literatura como mais eficaz na transfecção com oligonucleotídeos (LEWIS *et al.*, 1996). (Gráfico 2).

Em ambos os experimentos, os controles empregados (células ST1 não tratadas e células ST1 tratadas com hidrocortisona) mostraram valores de incorporação de timidina radioativa compatíveis com o esperado, observando-se a característica redução de síntese de DNA nas células ST1 tratadas com hidrocortisona. Os mesmos controles de células ST1, incubadas na presença de lipossomos, não mostraram efeito apreciável.

Os resultados obtidos na presença de qualquer um dos oligos mostraram-se bastante semelhantes. Nem mesmo a associação dos oligonucleotídeos “antisense” contra metalotioneína e glicoproteína α -1-ácida na mesma transfecção mostrou efeito aditivo ou sinérgico em relação ao efeito dos oligos isoladamente, nas concentrações empregadas.

Chama a atenção o nível de incorporação de timidina tritiada obtido após a transfecção com o oligonucleotídeo “sense” ser semelhante ao obtido com os oligonucleotídeos “antisense”, levando a supor que qualquer efeito obtido seja inespecífico.

Da mesma forma que nos experimentos anteriores, não foi possível verificar o efeito de inibição da reversão fenotípica por glicocorticóides nos ensaios de incorporação de timidina tritiada, com o emprego de oligos “antisense” contra metalotioneína 1 e glicoproteína α -1-ácida, isoladamente ou associados.

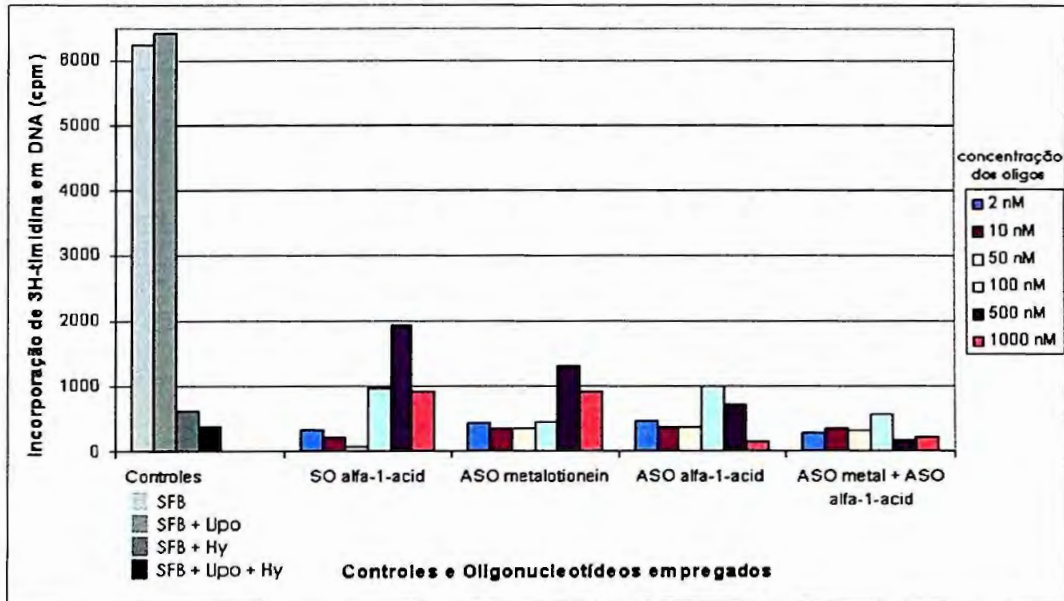
Gráfico 1 - Efeito da transfecção com oligos "antisense" (2-1000 nM) na incorporação de timidina tritiada em DNA em células ST1.

Foram usados oligo "sense" de glicoproteína α -1-ácida (SO alfa-1-acid) como controle" e oligos antisense" contra mRNA de metalotioneína (ASO metalotionein) e/ou glicoproteína α -1-ácida (ASO alfa-1-acid).

Células ST1 não transfectadas com oligos foram também usadas como controle (2% Soro Fetal Bovino (SFB), hidrocortisona (Hy) e/ou Lipofectin (Lipo))

As barras do gráfico correspondem ao valor médio de triplicatas.

a) Transfecção realizada em células ST1 SUB-CONFLUENTES



b) Transfecção realizada em células ST1 ESPARSAS

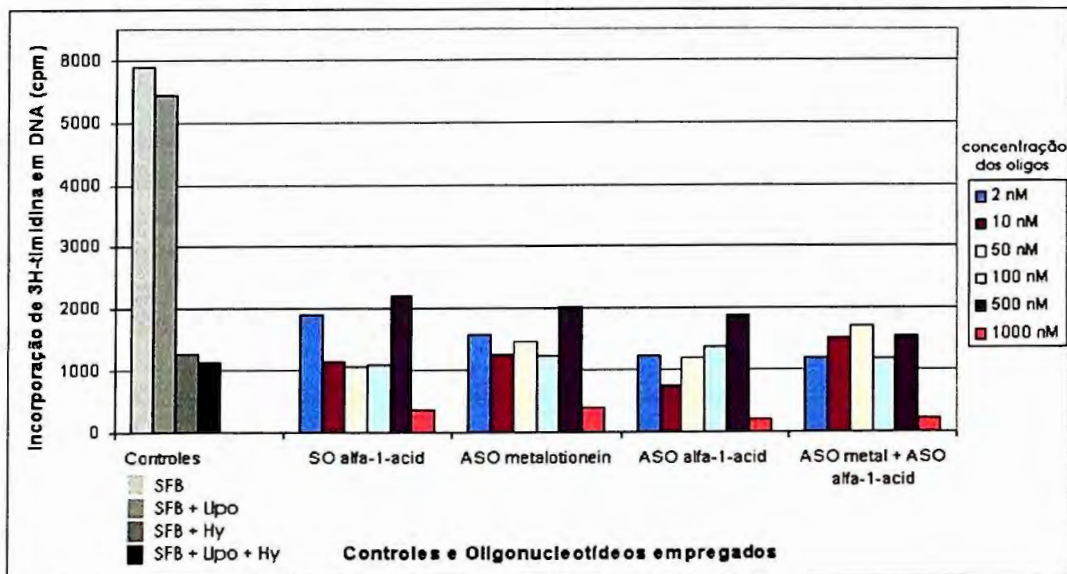


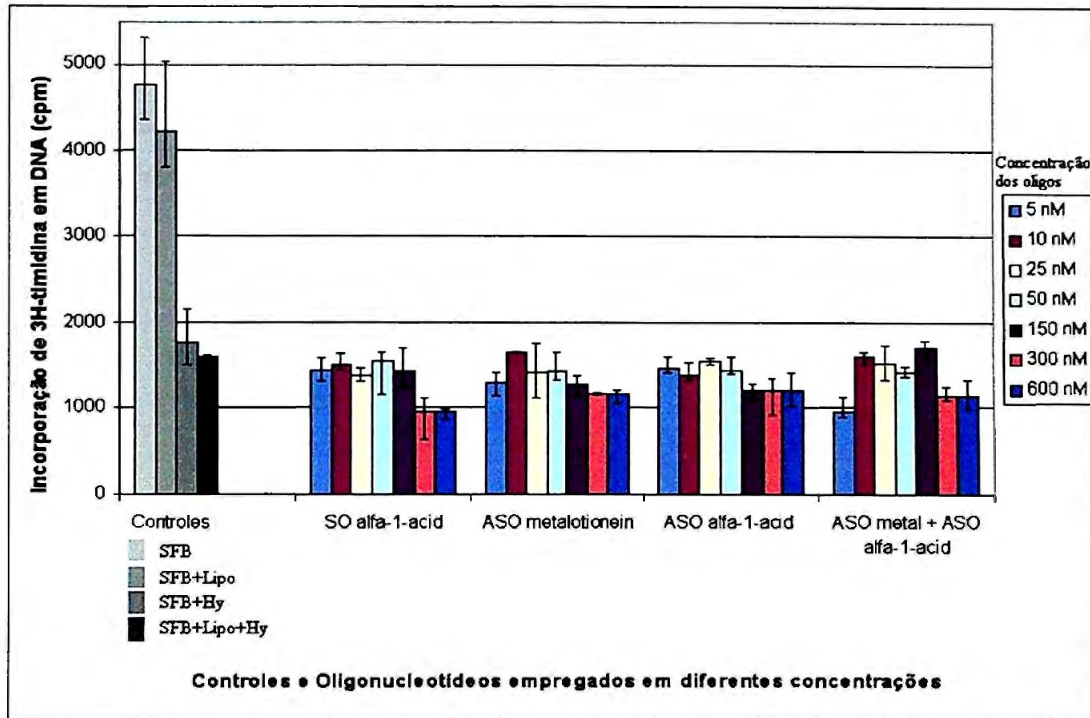
Gráfico 2 - Efeito da transfecção com oligos "antisense" (5-600 nM) na incorporação de timidina tritiada em DNA em células ST1.

Foram usados oligo "sense" de glicoproteína α -1-ácida (SO alfa-1-acid) como controle e oligos "antisense" contra mRNA de metalotioneína (ASO metalotionein) e/ou glicoproteína α -1-ácida (ASO alfa-1-acid).

Células ST1 não transfectadas com oligos foram também usadas como controle (2% Soro Fetal Bovino (SFB), hidrocortisona (Hy) e/ou "Cytofectin").

A transfecção foi realizada em células ST1 sub-confluentes.

As barras do gráfico correspondem ao valor médio de triplicatas.



Procurou-se correlacionar a aparente ausência de efeito dos oligonucleotídeos nas células ST1 transfectadas com uma possível degradação destes, o que não teria permitido a inibição da síntese das proteínas. Foram feitos ensaios para avaliar a estabilidade dos oligos "antisense" no interior das células através da transfecção de oligos marcados com fluoresceína. Estes ensaios (Figura 4) confirmaram a entrada dos oligos nas células e sua integridade por pelo menos 36 h após a transfecção.

Como não é possível excluir o papel das proteínas metalotioneína 1 e glicoproteína α -1-ácida na reversão fenotípica, sem a comparação dos níveis de expressão em culturas tratadas e não tratadas com oligos, procurou-se verificar a expressão através de imunofluorescência com anticorpos policlonais contra as duas proteínas. Nenhum resultado conclusivo foi obtido, no entanto, pois nas células ST1 tratadas com hidrocortisona não foi observada qualquer diferença de expressão em relação a controles de células não tratadas (dados não mostrados).

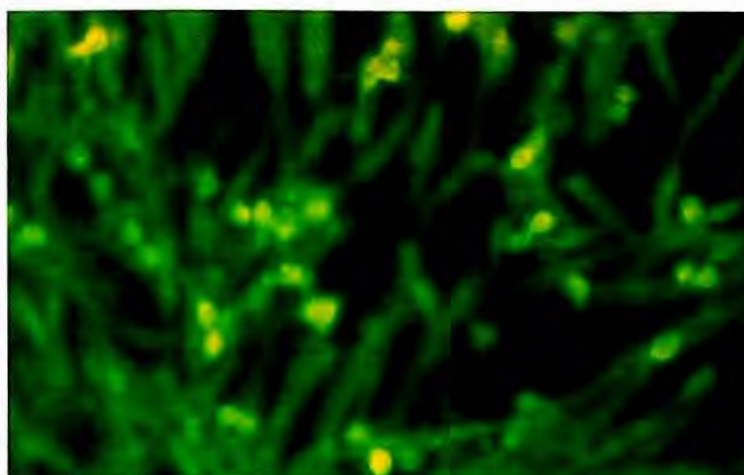


Figura 4 – Fluorescência de oligonucleotídeo, marcado com fluoresceína, 36h após a transfecção de células ST1.

4.3. Preparo dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 (subclonagem intermediária em pUC18)

4.3.1. Preparo dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 por ligação a adaptadores *BamH* I / *Not* I

Tentativas de ligação dos cDNAs “adaptados” e clivados com *Not* I, diretamente ao vetor pOPI3 / pOPRSVI não produziram colônias transformantes.

A transformação de bactérias *E. coli* com o vetor pUC18 ligado aos cDNAs “adaptados” não produziu nenhuma colônia. Supõe-se que uma falha da clivagem com *Hae* III na proximidade do sítio *Kpn* I (Quadro 1b) ou algum problema na etapa de preenchimento com Klenow possam ter inibido a ligação do adaptador à extremidade do inserto.

A subclonagem através de adaptadores *BamH* I / *Not* I não rendeu resultados após repetidas tentativas, mesmo modificando-se os parâmetros das etapas intermediárias.

4.3.2. Amplificação dos insertos das metalotioneínas 1 e 2 por PCR

Como segunda estratégia de subclonagem dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2, presentes nos plasmídeos C27 e C41, foi feita a amplificação da seqüência dos insertos, através de PCR com “primers” genéricos de seqüenciamento e de síntese de primeira-fita de cDNA (Quadro 4).

O local de pareamento do “primer” T3 no plasmídeo pBluescript SK(-), no qual os cDNAs foram originalmente clonados, localiza-se próximo a um sítio de restrição *Not* I. O pareamento do “primer-adaptor” com a seqüência poliadenilada do cDNA forneceu o segundo sítio de restrição *Not* I, necessário para a clonagem nos vetores de expressão pOPI3 e pOPRSVI (Quadro 6).

A reação de PCR dos plasmídeos C27 e C41 com o “primer” T3 e o “primer-adaptor” permitiu a amplificação de ambos os cDNAs com sucesso.

A proximidade do sítio *Not* I do “primer-adaptor” com a extremidade do segmento amplificado, levava a supor que a clivagem desta extremidade com *Not* I pudesse ser pouco eficiente. De fato, a ligação de pOPI3 e pOPRSVI com do produto de PCR clivado com *Not* I não produziu colônias transformantes.

Para permitir a clivagem do sítio *Not* I do “primer-adaptor”, o produto amplificado foi submetido a uma etapa intermediária de clonagem com extremidades cegas (“blunt”) no vetor pUC18 linearizado com *Sma* I (Quadro 4).

As transformações de 10% das ligações em pUC 18 renderam mais de 100 colônias recombinantes por construção. De 15 colônias de cada ligação, foram feitas “mini-preps” que, clivadas com *Not* I, confirmaram a existência dos dois sítios de restrição (o primeiro oriundo do sítio múltiplo de clonagem do pBluescript SK(-) e o segundo correspondente ao “primer-adaptor”), demonstrando a presença dos insertos com o tamanho previsto. O seqüenciamento de dois clones de cada uma das construções com “primers” M13 “forward” e “reverse”, mostrou os cDNAs correspondentes às metalotioneínas 1 e 2, conforme esperado. Um dos clones de cada cDNA foi usado para dar continuidade à subclonagem.

4.3.3. Isolamento dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 com sítios *Not* I

Os clones bacterianos selecionados, depois de crescidos em cultura, tiveram o DNA plasmídeo purificado e clivado com *Not* I. Os fragmentos correspondentes aos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 foram purificados a partir de bandas recortadas de gel de agarose e ligados aos vetores pOPI3 e pOPRSVI para estabelecimento das construções para expressão em células de mamífero.

4.4. Subclonagem dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 nos vetores de expressão pOPI3 e pOPRSVI

Os cDNAs das metalotioneínas 1 e 2 “adaptados” com *Not* I foram ligados aos vetores pOPI3 e pOPRSVI (Quadro 6) linearizados com *Not* I e desfosforilados. Os produtos de ligação dos cDNAs com os vetores foram usados para transformar *E. coli* XL1 Blue MR. Dez “mini-preps” das colônias resultantes foram feitas de cada uma das duas

construções. A clivagem com *Not* I permitiu identificar os clones com insertos mostrando o tamanho esperado. A clivagem com *Bam*H I ou *Pst* I permitiu determinar a orientação (“sense” ou “antisense”) dos cDNAs , em relação ao promotor dos vetores de expressão (como exemplificado na Figura 5).

NAME: pOPI3 (5512bp) com inserto de Mt1 sense (444bp)
 5956 BPS DNA CIRCULAR
 RESTRICTION MAP
 List of Expected Fragment Sizes, Sorted by Enzyme name

#cuts	Fragment size (bps)---			
<i>Not</i> I	2	5512	444	
<i>Bam</i> H I	3	5672	223	61
<i>Pst</i> I	3	3671	2088	197

Clone Manager V4.0

NAME: pOPI3 (5512bp) com inserto de Mt1 antisense (444bp)
 5956 BPS DNA CIRCULAR
 RESTRICTION MAP
 List of Expected Fragment Sizes, Sorted by Enzyme name

#cuts	Fragment size (bps)---			
<i>Not</i> I	2	5512	444	
<i>Bam</i> H I	3	5266	467	223
<i>Pst</i> I	3	3289	2470	197

Clone Manager V4.0

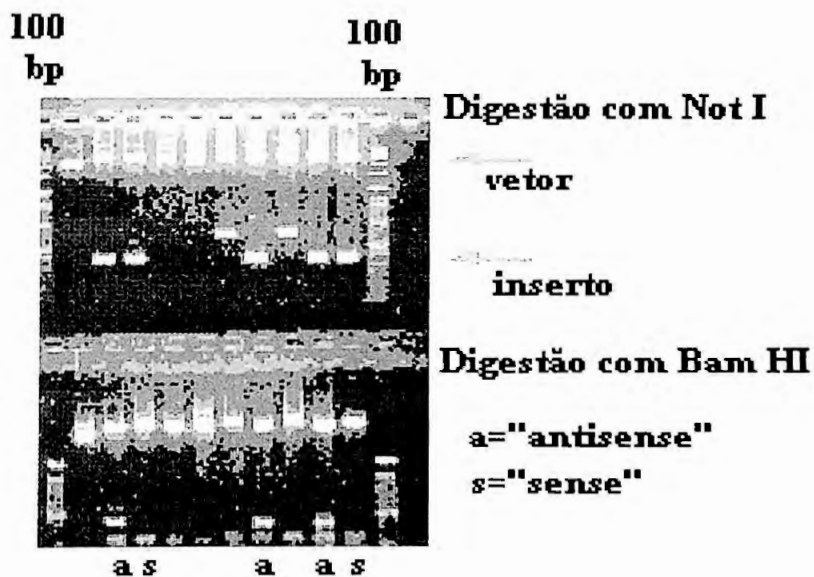


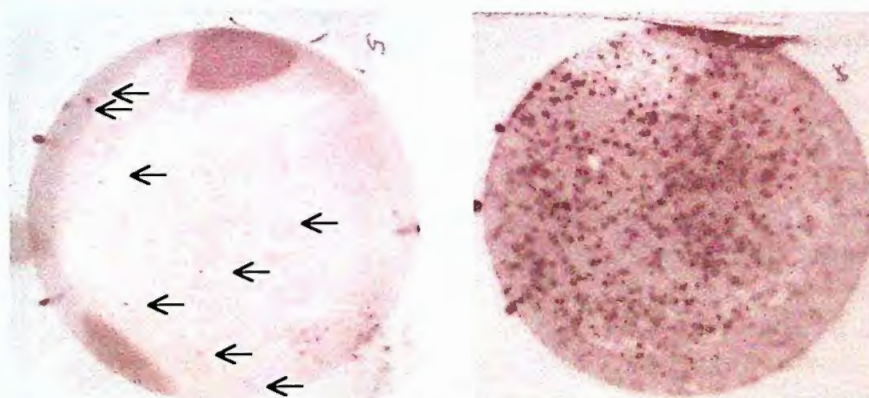
Figura 5- Confirmação da subclonagem e determinação da orientação do cDNA de Metalotioneína I (C27) em pOPI3.

Tamanhos de fragmentos de restrição previstos no programa CloneManager V4.0. A linha hachurada mostra o corte com enzima de restrição que indica a orientação (“sense” ou “antisense”) do inserto.

4.5. Obtenção dos cDNAs completos de glicoproteína α -1-ácida e *env*

4.5.1. Busca dos cDNAs completos da glicoproteína α 1 ácida e de *env* em biblioteca de cDNA

Para a obtenção dos cDNAs completos da glicoproteína α -1-ácida e do *env* retroviral, foi feita uma tentativa de isolamento a partir da biblioteca construída originalmente para o isolamento de genes diferencialmente expressos na presença de hidrocortisona (VALENTINI, 1993; VALENTINI e ARMELIN, 1996). Foram plaqueados 300.000 PFUs que, em “plaque lifts” hibridizados com oligonucleotídeo RATAGPA1/12-29 correspondente à extremidade 5' do cDNA da glicoproteína α -1-ácida, permitiram isolar 49 placas de lise (Figura 6a), que foram testadas por PCR em “pool”. A hibridização de outros 300.000 PFUs com oligo correspondente a *env*, não mostrou qualquer sinal de hibridização nas condições de lavagem empregadas nestas membranas. A hibridização das mesmas membranas com um fragmento do clone CV2 mostrou centenas de pontos de hibridização em cada membrana (Figura 6b). Foram selecionadas 100 placas de lise para uma triagem por PCR em “pool”.



a) sonda: glicoproteína α -1-ácida b) sonda: *env* retroviral

Figura 6 – Triagem (“screening”) de biblioteca de cDNAs para recuperação dos cDNAs completos da glicoproteína α -1-ácida e *env*.

- a) Hibridização de uma das placas com oligonucleotídeo marcado correspondente á glicoproteína α -1-ácida. Em seis placas, 49 placas de lise foram isoladas e testadas posteriormente por PCR em “pool”. As setas indicam a posição dos clones que foram isolados na placa correspondente.
- b) Hibridização de uma das placas com um fragmento de CV2 marcado. Das centenas de pontos de hibridização em cada membrana 100 placas de lise foram selecionadas para a triagem por PCR em “pool”.

O PCR feito com “primers” T3 (do vetor) e RATAGPA1/204-187 (da glicoproteína α -1-ácida) produziu, com o clone C36, uma banda de aproximadamente 150 pb enquanto o PCR feito com o “primer” T3 e MURENV/4239-19 (de *env*) produziu, com o clone CV2, uma banda de pouco menos de 1 Kpb (Figura 7). Um PCR feito com clones contendo cDNAs completos destes genes deve gerar produtos com 302 pb, para a glicoproteína α -1-

ácida, e com 1,5 a 2,3 kpb para *env* (de acordo com o tamanho de *env* de diferentes vírus de leucemia murina).

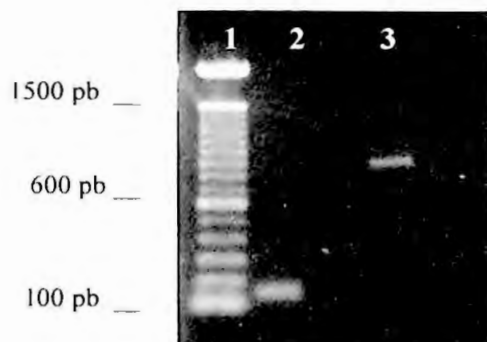


Figura 7 - PCR com "primers" do cDNA e vetor para triagem de cDNAs recuperados da biblioteca. Eletroforese em gel de agarose.

1 - Padrão de Peso Molecular - 100 bp ladder / Gibco BRL.

2 - Produto de PCR do clone C36 usando "primers" T3 (do vetor) e RATAGPA1/204-187 (da glicoproteína α -1-ácida) - banda de aproximadamente 150 pb.

3 - Produto de PCR do clone CV2 usando "primer" T3 (do vetor) e MURENV/4239-19 (de *env*) - banda de pouco menos de 1 Kpb.

As 100 placas de lise selecionadas na triagem com oligo CV2 foram agrupadas como uma matriz 10 x 10 da forma descrita por ALPHEY (1997), sendo feitas 20 PCRs. Os produtos de PCR gerados na triagem do *env* completo não mostraram nenhum produto maior que 700 pb, invalidando esta tentativa. Aparentemente o fragmento do clone CV2 usado como sonda não foi uma boa escolha. Regiões com repetições como LTRs (que não foram removidas do fragmento usado como sonda) podem ter produzido sinais de hibridização espúrios na triagem.

As 49 placas de lise obtidas a partir da triagem com o oligo RATAGPA1/204-187 (da glicoproteína α -1-ácida) foram eluídas, em tampão SM em tubos individuais, dispostos como uma matriz 7 x 7. Uma alíquota de 100 μ L de todos os tubos de cada linha foi coletada e reunida em tubo marcado com o número da linha correspondente. O mesmo foi feito com cada uma das colunas. Foram assim coletados 14 tubos de "pools" (7 "pools" de linhas e 7 "pools" de colunas), dos quais foram retirados 5 μ L para 14 PCRs com "primers" T3 e RATAGPA1/204-187.

Para os clones da glicoproteína α -1 ácida, foram observados diversos produtos de PCR maiores que os 302 pb esperados (Figura 8), indicando alguma inespecificidade deste oligo no PCR e, provavelmente na hibridização nas membranas. Curiosamente, alguns produtos de PCR que eram aparentes nas amplificações de "pools" de linhas, não foram observados em amplificações de "pools" de colunas, o que leva a supor um problema de amplificação com este oligo. Alguns dos produtos com tamanho próximo do esperado

(exemplo, linha 5 - coluna 3, correspondente à placa de lise 31 ou linha 5 - coluna 4, correspondente à placa de lise 32) e indicando possíveis placas de lise positivas, foram submetidos individualmente a PCR para verificar se a amplificação da mesma banda se repetia, mas sem sucesso.

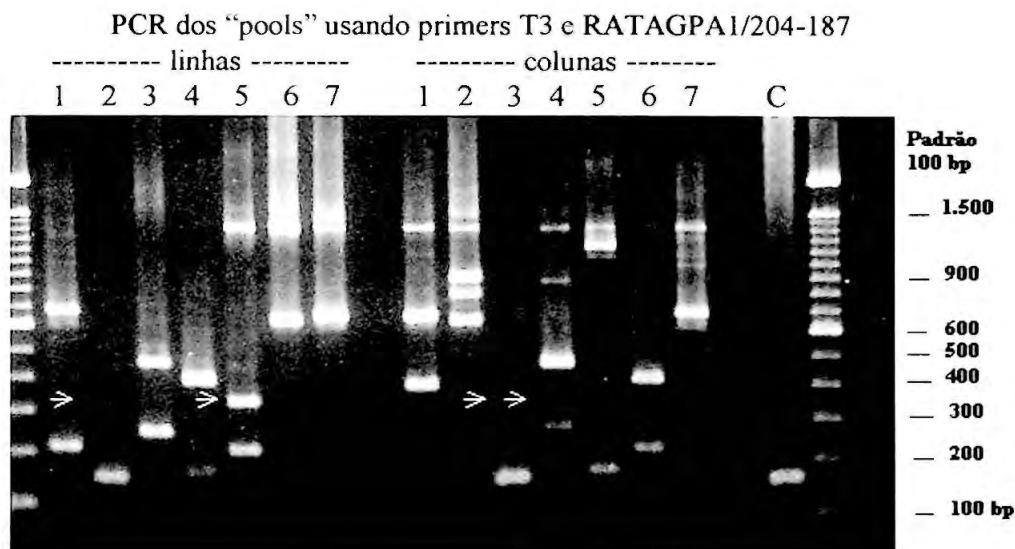


Figura 8 - Triagem por PCR dos clones de glicoproteína α -1-ácida recuperados de biblioteca de cDNAs.

Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCRs usando "primers" T3 e RATAGPA1/204-187 nos 14 "pools" (7 "pools" de linhas e 7 "pools" de colunas) preparados a partir de 49 placas de lise isoladas da biblioteca de cDNA. O produto gerado pela amplificação do clone C36 possuía aproximadamente 150 pb (canaleta C). As setas indicam fragmentos amplificados com o tamanho esperado para o cDNA completo da glicoproteína α -1-ácida. Padrão de Peso Molecular: 100 bp ladder (Gibco BRL).

Aliadas a estas falhas na triagem, alguns problemas também foram observados com a biblioteca. Não foi possível obter a amplificação de produtos maiores que 1.000 pb empregando-se os oligos T3 e MURENV/4239-19 com 5 μ L da biblioteca pura e nem maiores que 1.500 pb empregando os oligos T3 e T7 do vetor (resultados não mostrados), o que juntamente com evidências apontadas por colegas que também trabalharam com a mesma biblioteca, indicam que esta seja extremamente pobre em cDNAs longos, como aquele previsto para o gene *env*.

4.5.2. Síntese dos cDNAs completos da glicoproteína α 1 ácida e de *env* por RT-PCR

Depois das tentativas de triagem à procura de clones completos da glicoproteína α 1-ácida e do *env* nas bibliotecas de cDNA de células ST1 tratadas com hidrocortisona, decidiu-se pela clonagem destes cDNAs a partir de produtos de RT-PCR.

Foram desenhados oligonucleotídeos para permitir a amplificação de segmentos de cDNAs correspondentes às porções codificantes completas dos genes da glicoproteína α 1-ácida e do *env* retroviral.

Para a glicoproteína α 1-ácida, um oligo 3' de 20 nucleotídeos, localizado após o *codon* de terminação, foi projetado a partir da seqüência do clone C36. Para o projeto, foi empregado o programa Oligo V3.3 (RYCHLIK e RHOADS, 1989) para a verificação dos parâmetros T_m , ΔG , "self-dimers" e "internal loops". A escolha do oligonucleotídeo 5' foi feita com auxílio do mesmo programa, baseando-se na seqüência de rato disponível no Genbank (RATAGPA1). Foi escolhido um oligo de 20 nucleotídeos que não forma dímeros parciais com o oligo 3' e com T_m semelhante à deste.

O emprego dos "primers" RATAGPA1/12-29 e RATAGPA1/724-05 permitiu a amplificação de um único segmento (Figura 9, canaleta 2) com o tamanho previsto para o cDNA da glicoproteína α 1-ácida (712 pares de bases).

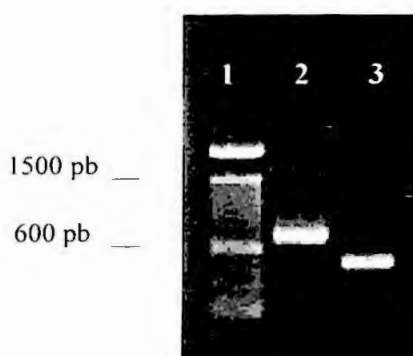


Figura 9 – RT-PCR para síntese do cDNA completo do gene da glicoproteína α 1-ácida

1 - Padrão de Peso Molecular: 100 bp ladder (Gibco BRL)

2 - Produto de PCR da primeira fita de cDNA de células ST1 tratadas com hidrocortisona, com os primers RATAGPA1/12-29 e RATAGPA1/724-05

3 - Controle: Produto de PCR da mesma síntese de cDNA, com primers correspondentes a GAPDH

Para a amplificação do *env* retroviral, um oligo 3' foi selecionado a partir da seqüência do clone CV2. Pela diversidade de retrovírus murinos com seqüência parcialmente semelhante à do *env* expresso em ST1, o oligonucleotídeo 5' não foi selecionado de forma direta como no caso da glicoproteína α 1-ácida.

A seqüência completa do clone CV2 foi confrontada com o Genbank através do programa BlastN (ALTSCHUL *et al.*, 1990). As seqüências com maior similaridade com CV2 foram extraídas do banco de dados. Uma região de 350 nucleotídeos próxima do início de *env* de cada uma destas 76 seqüências foi editada manualmente e submetida a alinhamento múltiplo com o programa Clustal-X (THOMPSON *et al.*, 1997). A partir deste primeiro alinhamento (Quadro 13), não foi possível definir uma região que permitisse a

construção de "primers" 5' para uma amplificação específica da seqüência completa do *env* expresso por ST1.

Para reduzir a introdução de ambigüidades na dedução de uma seqüência consenso, foram excluídas deste alinhamento múltiplo algumas seqüências que apresentaram apenas homologias localizadas, mesmo com o BlastN indicando um "score" (KARLIN e ALTSCHUL, 1990) local muito elevado.

Desta forma, foram alinhadas 21 seqüências que mostraram grande similaridade com o clone CV2 inteiro ou que mostraram regiões homólogas distribuídas uniformemente ao longo de toda a seqüência do clone CV2. Neste alinhamento (Quadro 14), ficam claras as regiões com maior similaridade entre os possíveis *env* homólogos ao de ST1. "Primers" foram construídos para permitir a sua amplificação.

Como não foi possível definir uma região consenso absoluta, mesmo nas porções mais conservadas do alinhamento, foram introduzidos nucleotídeos degenerados nas posições ambíguas para tornar possível a amplificação de *env* de retrovírus diferentes.

A região definida pelo alinhamento foi examinada no programa Oligo à procura de segmentos sem "loops" e "self-dimers". Na seleção final do oligo 5', teve-se o cuidado de manter qualquer destas degenerações tão distante quanto possível da extremidade 3' do oligo. Para evitar a introdução de mutações pelos "primers" na porção codificante do cDNA, houve também a preocupação de posicionar o oligo antes do(s) início(s) de tradução previsto(s), uma vez que há pelo menos dois inícios alternativos entre os diferentes retrovírus murinos.

A amplificação com os "primers" MURENV/1.960-78 e MURENV/4.239-19 produziram uma única banda (Figura 10, canaleta 3) com o tamanho na faixa do previsto para *env* (~2.280 pares de bases).

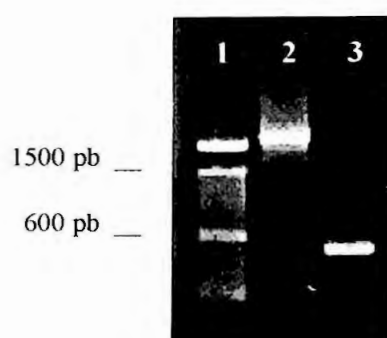


Figura 10 - RT-PCR para síntese do cDNA completo do gene *env*.

1 - Padrão de Peso Molecular: 100 bp ladder (Gibco BRL)

2 - Produto de PCR da primeira fita de cDNA de células ST1 tratadas com hidrocortisona, com os primers MURENV/1.960-78 e MURENV/4.239-19.

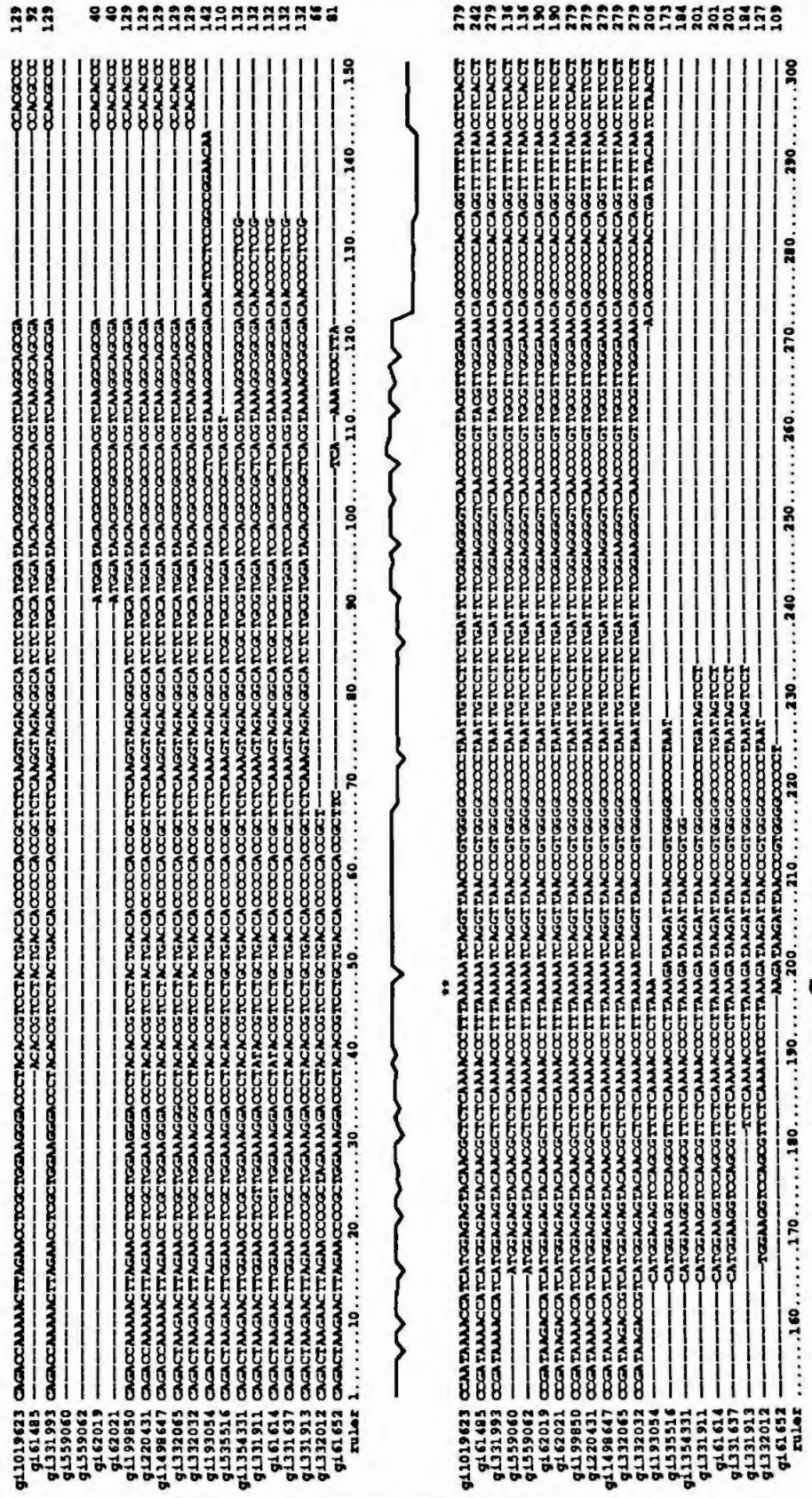
3 - Controle: Produto de PCR da mesma síntese de cDNA, com primers correspondentes a GAPDH.

Quadro 14 - Alinhamento múltiplo de seqüências de env disponíveis no Genbank.
Alinhamento múltiplo da região 5' terminal das 21 seqüências de env do Genbank com maior similaridade global com a seqüência toda do clone CV2.

CLUSTAL X (1.64b) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

Date: Sun Apr 18 23:11:13 1999

File: c:user bf odos2.ps
Page 1 of 2



A subclonagem anterior de metalotioneína 1, metalotioneína 2 e dos "antisense" incompletos da glicoproteína α 1-ácida e do *env* fez uso de PCR como artifício para a criação de um dos sítios de *Not* I. A amplificação do segmento resultou na introdução de mais de 40 bases de seqüência do vetor pBluescript na construção final clonada em pOPI3.

Para a nova subclonagem dos cDNAs completos da glicoproteína α 1-ácida e do *env*, o vetor pGEM-T Easy (Quadro 5a) foi usado em etapas intermediárias de clonagem dos cDNAs amplificados. Este vetor foi escolhido por permitir a remoção do produto clonado como um "cassete" (mostrado no Quadro 5b), com *Not* I, facilitando a subclonagem nos vetores de expressão.

A ligação do DNA da banda amplificada da glicoproteína α -1-ácida ao vetor pGEM-T Easy e posterior triagem dos transformantes através de PCR com o "primer" RATAGPA1/12-29 e "primer" interno RATAGPA1/204-187 permitiram o isolamento de três clones com o cDNA presumivelmente completo (Figura 11).

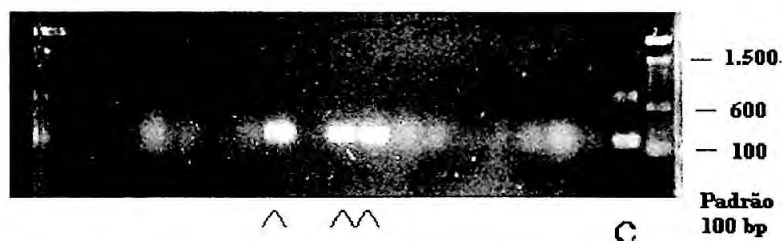


Figura 11 - Triagem por PCR de possíveis clones contendo o cDNA completo de glicoproteína α 1-ácida no vetor pGEM-T Easy.

Os clones foram resultantes da ligação do vetor pGEM-T-Easy com o produto de RT-PCR com os "primers" RATAGPA1/12-29 e RATAGPA1/724-05, correspondente à porção codificante completa da glicoproteína α 1-ácida. Padrão de Peso Molecular: 100 bp ladder (Gibco BRL).

^ - Clone positivo mostrando o produto de PCR com o "primer" RATAGPA1/12-29 e o "primer" interno RATAGPA1/204-187.

C - Controle: re-amplificação do produto de PCR utilizado como inserto na clonagem de glicoproteína α 1-ácida completa usando o "primer" RATAGPA1/12-29 e "primer" interno RATAGPA1/ 204-187.

O DNA da banda de *env* também foi ligado ao vetor pGEM-T Easy e os transformantes foram submetidos a triagem através de PCR com os "primers" internos MURENV/3.500-17 e MURENV/4.040-23 (usados no seqüenciamento do clone CV2), o que permitiu o isolamento de três possíveis clones com o cDNA completo (Figura 12).

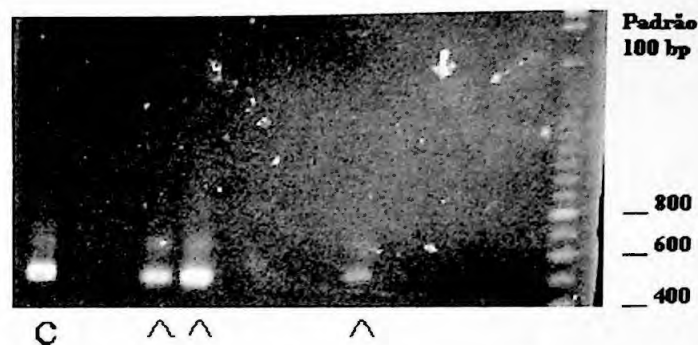


Figura 12 - Triagem por PCR de possíveis clones contendo o cDNA completo de *env* no vetor pGEM-T Easy.

Os clones foram resultantes da ligação do vetor pGEM-T-Easy com o produto de RT-PCR com "primers" MURENV/1.960-78 e MURENV/4.239-19, correspondente à porção codificante completa de *env*. Padrão de Peso Molecular: 100 bp ladder (Pharmacia).

^ - Clone positivo mostrando o produto de PCR com os "primers" internos MURENV/3.500-17 e MURENV/4.040-23.

C - Controle: amplificação a partir do clone CV2 com os "primers" internos MURENV/3.500-17 e MURENV/4.040-23.

O seqüenciamento dos clones da glicoproteína α -1-ácida com o "primer" T7 mostrou a seqüência esperada (Quadro 15).

A seqüência do cDNA de *env* clonado em pGEM-T easy foi verificada por seqüenciamento automatizado, confirmando a identidade deste cDNA como sendo realmente de *env* (Quadro 16).

A confirmação das seqüências destes cDNAs permitiu a continuidade da etapa de subclonagem nos vetores de expressão pOPI3 / pOPRSVI. A orientação dos cDNAs nestas construções foi determinada por clivagem com *Bam* HI e *Pst* I.

Com a subclonagem dos cDNAs e caracterização das 16 construções em pOPI3 / pOPRSVI, contendo cada um dos cDNAs nas orientações "sense" ou "antisense", foi possível prosseguir na obtenção de linhagens celulares expressando ou reprimindo, de maneira induzível, os genes em estudo. "Midipreps" destas construções caracterizados foram usados para transfectar células ST1LacI e P7LacI.

Quadro 15 - BlastN da seqüência do cDNA do gene da glicoproteína $\alpha 1$ ácida.

BlastN (KARLIN e ALTSCHUL, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1990) da seqüência do clone 9, contendo a porção codificante do gene da glicoproteína $\alpha 1$ ácida amplificada a partir de cDNA de células ST1.

```

gb|J00696|RATAGPA1 Rat alpha1-acid glycoprotein (AGP) mRNA, complete cds.
      Length = 770

Score = 795 bits (401), Expect = 0.0
Identities = 454/454 (100%), Gaps = 0/454 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 41  gccggtgccctctgagtgcttcctcggcatggcgctgcacatggttcttgcgttttgagcct 100
Sbjct: 12  gccggtgccctctgagtgcttcctcggcatggcgctgcacatggttcttgcgttttgagcct 71

Query: 101 cctgcccttgttgaagctcagaaccagaacctgccaacatcacctaggcatacctat 160
Sbjct: 72  cctgcccttgttgaagctcagaaccagaacctgccaacatcacctaggcatacctat 131

Query: 161  taccaatgagaccctgaaatggctctcagacaaatggtttacatgggagcagctttcog 220
Sbjct: 132 taccaatgagaccctgaaatggctctcagacaaatggtttacatgggagcagctttcog 191

Query: 221  agaccccggttcaagcagcaggttcaaacgatacagacggaatattttacctaccoc 280
Sbjct: 192  agaccccggttcaagcagcaggttcaaacgatacagacggaatattttacctaccoc 251

Query: 281  caacttgataaacgacacaattgaacttcgggagtttcagaccacagacgaccagtgtg 340
Sbjct: 252  caacttgataaacgacacaattgaacttcgggagtttcagaccacagacgaccagtgtg 311

Query: 341  ctataacttcacccatctaggagtcagagagagaatgggaccttatccaagtgtgcagg 400
Sbjct: 312  ctataacttcacccatctaggagtcagagagagaatgggaccttatccaagtgtgcagg 371

Query: 401  agcagtgaaaatctttgccatttgatagtgctgaagaacatgggaccttcagtctgc 460
Sbjct: 371  agcagtgaaaatctttgccatttgatagtgctgaagaacatgggaccttcagtctgc 431

Query: 461  ctttaacctgacagatgagaaccggggctgtc 494
Sbjct: 431  ctttaacctgacagatgagaaccggggctgtc 465
    
```

Quadro 16 - BlastN da seqüência do cDNA do gene *env*.

BlastN (KARLIN e ALTSCHUL, 1990; ALTSCHUL *et al.*, 1990) da leitura do seqüenciamento automático do cDNA clonado em pGEM-T easy, confirmando a identidade do cDNA de *env*.

```

gb|U63133|MMU63133 Mus musculus C-type ecotropic endogenous retrovirus, complete
mRNA
sequence Length = 8274
Score = 260 bits (131), Expect = 8e-68
Identities = 153/163 (93%)
Strand = Plus / Plus

Query: 1  accgtcctgntgaccacccccaccgctctcaaggtagacggcatctntgcatggatacac 60
Sbjct: 5678 accgtcctactgaccacccccaccgctctcaaggtagacggcatctctgcatggatacac 5737

Query: 61  gccgcccacgttaaggcagcgnccacacccccgatnaaacatcatggagagtncaacgc 120
Sbjct: 5738 gccgcccacgtcaaggcagcagccacacccccgataaaacatcatggagagtacaacgc 5797

Query: 121  tntcaaaacccttataaaatcaggttaaccntggggncct 163
Sbjct: 5798 tctcaaaacccttataaaatcaggttaaccntggggncct 5840
    
```

4.6. Estabelecimento de linhagens transfectantes de ST1 e P7 expressando o repressor do Operon *Lac* de *E. coli* (*LacI*)

Três séries de transfecções de células P7 com o plasmídeo pCMV-*LacI*, e subsequente seleção de transfectantes resistentes a higromicina, permitiram o isolamento de 72 colônias, que resultaram na obtenção de 53 clones celulares mantidos de maneira estável em meio seletivo (resistindo a múltiplas passagens). Das células ST1, apenas 7 clones estáveis foram obtidos a partir do mesmo número de transfecções (isolando-se, em média, 15 colônias por transfecção, das quais a maioria se perdeu em duas repicagens).

Estes 53 clones celulares derivados de P7 e 7 clones celulares derivados de ST1 foram submetidos a triagem através de “dot-blot” para selecionar linhagens celulares expressando o repressor *LacI*.

4.7. Verificação da expressão do repressor *Lac* nos clones resistentes a higromicina

Como controles positivos na membrana, foram usadas diluições do próprio plasmídeo pCMV*LacI*, na falta de RNA de uma linhagem celular expressando níveis conhecidos de mRNA do repressor *Lac*. Foram usados 100 ng, 1 ng e 10 pg, correspondendo respectivamente a 50%, 0,5% e 0,005% da fração de mRNA (em torno de 200 ng) contido em 10 µg de RNA total. Como controles negativos foram empregadas diluições de RNA de células P7 contendo 10, 1 e 0,1 µg de RNA total (Figura 13).

Dos 53 clones de células P7 transfectadas com pCMV*LacI*, sete clones (A4, B1, B2, B3, C8, D12 e E2) exibiram sinal de hibridização quase comparável àquele observado na hibridização a 1 ng de pCMV*LacI* (correspondendo a 1/200 da fração de mRNA presente na amostra) e 5 clones (A1, A2, A5, A7 e B7) mostraram sinal ainda mais intenso. Alguns clones quase não mostraram sinal de hibridização.

Dos 7 clones de células ST1 submetidos à triagem, 3 mostraram expressão do gene *LacI* ligeiramente superior à observada no controle com 10 pg de DNA. Os demais mostraram expressão igual ou pouco inferior. As expressões verificadas nos clones de ST1 são, portanto, muito inferiores àquelas obtidas em clones de P7.

Os controles negativos não mostraram sinal de hibridização em nenhuma das quantidades aplicadas, indicando que a hibridização e as condições de lavagem das membranas permitiram a detecção específica de transcritos de clones expressando *LacI*.

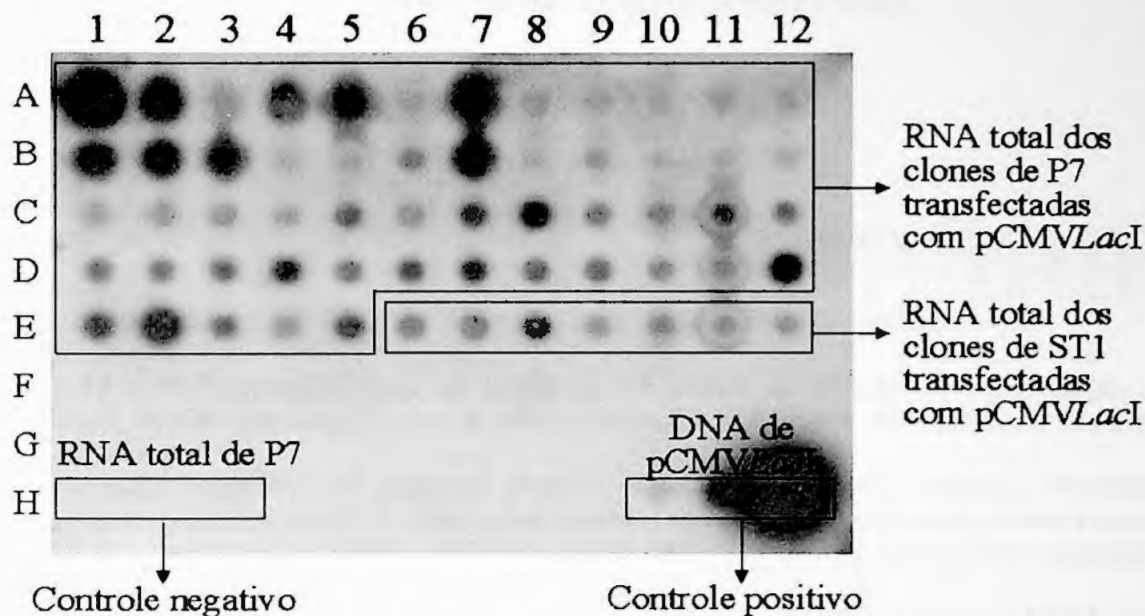


Figura 13 - “Dot blot” de RNA para triagem dos clones celulares de P7 e ST1 expressando *LacI*. Clones de P7*LacI* (filas A até E, indicadas no painel) e de ST1*LacI* (apenas fila E indicados no painel), transfectantes de pCMV*LacI*. Os controles estão indicados na fila H (H1 até H3: 0,1 µg., 1µg e 10µg de RNA total de P7; H10 até H12: 10 pg, 1 ng e 100 ng de DNA de pCMV*LacI*).

Os doze clones que apresentaram os sinais mais intensos nos “dot-blots”, sugerindo alta expressão de *LacI*, foram estocados em nitrogênio. RNA total destes 12 clones foi isolado por centrifugação em colchão de cloreto de céσιο e analisado através de “Northern-blots” no intuito de confirmar a expressão do repressor através da visualização dos transcritos esperados deste gene (um entre 1,5 e 2,0 kpb e outro entre 3,5 e 4,5 kpb segundo o manual do sistema LacSwitch). A hibridização com GAPDH no “Northern” indica que quantidades aproximadamente equivalentes de RNA total foram aplicadas em cada canaleta do gel (Figura 14b), permitindo comparar diretamente a intensidade da expressão de *LacI* entre os diferentes clones (Figura 14a).

Uma nova série de transfecções com pCMV*LacI* foi feita nas células ST1 para a obtenção de mais clones, esperando-se isolar clones com expressão mais elevada do gene *LacI*.

Após seleção com higromicina, foram tripsinizadas 24 colônias, transferidas para placas de 24 poços e crescidas até a confluência. Apenas dez destes clones sobreviveram às subseqüentes trocas de meio seletivo e puderam ser usadas para extração de RNA e posterior estocagem.

RNA total dos clones de células P7LacI

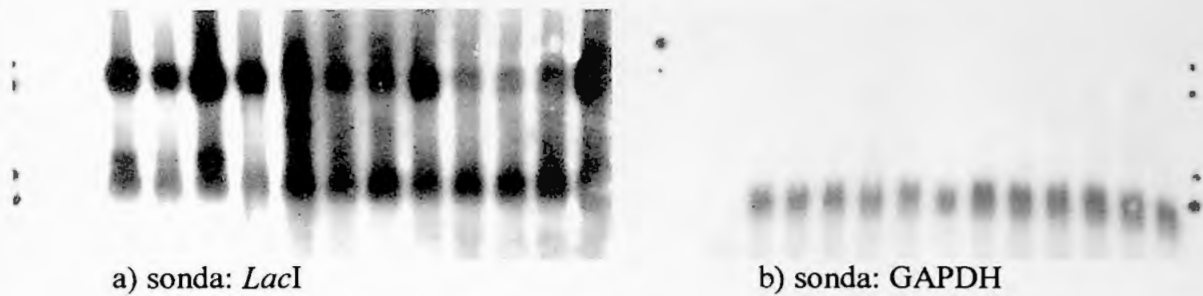


Figura 14 - “Northern-blot” com os RNAs de 12 clones de células P7 transfectadas com pCMVLacI, isolados por seleção com higromicina e apresentando sinais de hibridização intensos no “dot-blot” anterior.

a) Hibridização dos RNAs dos diferentes clones com sonda de *LacI* não isotópica. Observam-se bandas dos tamanhos esperados dos transcritos descritos no manual do sistema LacSwitch (um entre 1,5 e 2,0 kb – próximos aos pontos marcando o RNA 28S e outro entre 3,5 e 4,5 kb – próximos às marcas do RNA 18S).

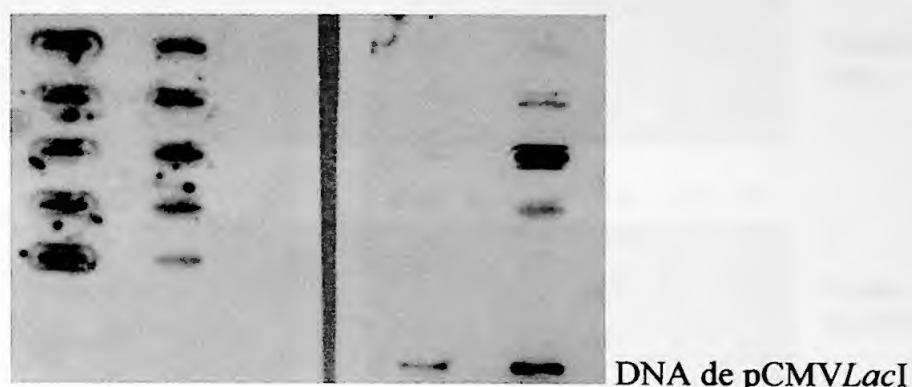
b) Hibridização dos RNAs dos mesmos clones com sonda controle não isotópica GAPDH (pouco abaixo das marcas do RNA 18S).

A hibridização do RNA dos clones de ST1 em “slot-blots” com a sonda *LacI* (Figura 15b) mostrou que em apenas três dos dez clones foi detectado sinal do repressor. Apenas um dos clones mostrou expressão em níveis apreciáveis. A hibridização da sonda GAPDH (Figura 15a) na mesma membrana indica que quantidades aproximadamente equivalentes de RNA total foram aplicadas em cada “slot”.

Das linhagens ST1 e P7 analisadas, foi selecionado o clone com a expressão mais elevada do repressor *Lac*, de acordo com a intensidade do sinal de hibridização em “dot-blot” ou “slot-blot”. A escolha dos clones com produção mais intensa do repressor baseou-se na capacidade do excesso de repressor reduzir, ao mínimo, a expressão basal do gene sob controle do promotor híbrido, (BAIM *et al.*, 1991), liberado apenas com a titulação do repressor com IPTG, adicionado ao meio de cultura quando se deseja induzir a expressão.

Com estas duas linhagens de células disponíveis, que foram denominadas ST1LacI e P7LacI, tornou-se possível a execução dos experimentos inicialmente propostos para este projeto e para outros que envolvam a expressão induzível de genes clonados nos vetores da série pOPI3 ou pOPRSVI, em linhagens ST1 e P7 derivadas de glioma de rato.

RNA total dos clones de células ST1*LacI*



a) sonda: GAPDH b) sonda: *LacI*

Figura 15 - “Slot blot” de RNA de clones de células ST1 transfectadas com pCMV-*LacI* e isoladas após seleção com higromicina.

a) Hibridização dos RNAs de 10 diferentes clones com sonda controle não isotópica de GAPDH.

b) Hibridização dos RNAs dos mesmos clones com sonda não isotópica de *LacI*. Os dois “slots” inferiores são DNAs controles de insertos de *LacI* contendo, da esquerda para a direita, 10 e 100 pg, respectivamente.

4.8. Estabelecimento de linhagens de ST1*LacI* e P7*LacI* expressando mRNAs “sense” e “antisense”

A partir das células ST1*LacI* e P7*LacI*, foram feitas transfecções com as construções “sense” e “antisense” nos vetores pOPI3 e pOPRSVI.

A obtenção de clones celulares a partir das transfecções de células P7*LacI* e ST1*LacI* com as construções induzíveis de pOPI3 / pOPRSVI foi mais simples que nas transfecções de P7 e ST1 com o vetor repressor. Uma vez isoladas, as colônias foram mantidas facilmente em cultura, em presença de geneticina até atingirem a confluência, sendo então usadas para etapas subseqüentes de triagem, ensaios funcionais e congelamento.

A hibridização de sondas correspondentes aos cDNAs, com o RNA dos transfectantes derivados de P7*LacI*, immobilizados nas membranas dos “dot-blots”, mostrou diferentes respostas à indução com IPTG. Foram obtidos clones expressando constitutivamente o transcrito, clones reprimidos por IPTG e clones adequadamente induzidos por IPTG em diferentes intensidades (exemplo na Figura.16)

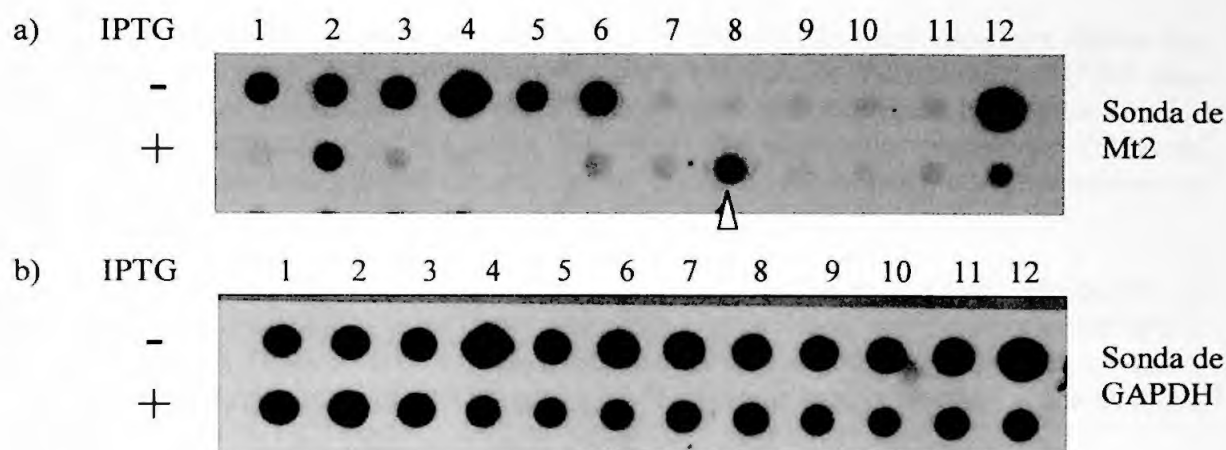


Figura 16 - "Dot-blot" de RNA total de clones de células *P7LacI* transfectadas com construções "sense" de metalotioneína 2.

- a) Hibridização de amostras de RNA de 12 clones celulares diferentes com sonda não isotópica, dupla fita, de metalotioneína 2. A seta indica o clone que apresentou maior indução.
 b) resultado da hibridização da mesma membrana com sonda não isotópica de GAPDH.

No exemplo acima, os sinais de hibridização dos RNAs de transfectantes de *P7LacI* Mt 2 "sense" com a sonda de metalotioneína 2 estão mostrados. Neste caso, de maneira semelhante ao que foi obtido nos demais transfectantes, apenas um clone (correspondente ao 8º "dot") mostra indução por IPTG. Outros clones mostram expressão constitutiva (clone 2), alta expressão basal do transcrito com repressão deste por IPTG (clones 1, 3, 4, 5, 6 e 12) e mesmo expressão desprezível (clones 7, 9, 10 e 11).

Na linhagem P7, a super-expressão de construções "sense" é de maior interesse, já que a inibição da expressão com construções "antisense" não permitiriam conclusões definitivas acerca do papel destes genes na reversão fenotípica de ST1. Entretanto, também foram feitas transfecções de células *P7LacI* com construções "antisense" e obtidos transfectantes.

No caso dos transfectantes de células *P7LacI* contendo construções de metalotioneínas "sense" e "antisense", a extração de RNA foi feita a partir de culturas quase confluentes por ocasião da adição de IPTG, o que pode ter mascarado a visualização de possíveis efeitos fenotípicos da indução ou repressão dos genes clonados como, por exemplo, alterações na morfologia das células e na velocidade de crescimento. Assim, não foram notados efeitos decorrentes da indução ou repressão destes genes, nesta fase de triagem.

As transfecções de células *ST1LacI* com as construções induzíveis de cDNAs "sense" e "antisense" também produziram clones celulares, que foram analisados por "dot-blot" com sondas correspondentes ao cDNA transfectado.

As células ST1 parentais apresentam níveis de expressão basal altos para alguns dos transcritos analisados, o que pode interferir com a visualização da indução por IPTG. Isto fica evidente nos transcritos relacionados ao retrovírus. Esta expressão basal pode levar a falsas interpretações no caso dos clones "antisense", por terem sido empregadas sondas de fita dupla geradas por "random-priming" e não sondas de fita simples, complementares ao transcrito "antisense", que seriam as ideais.

Para minimizar o efeito da expressão basal, decidiu-se analisar "dot-blots" de diluições seriadas dos RNAs extraídos das células induzidas e não induzidas com IPTG para cada clone. Desta forma foi possível discriminar níveis mínimos de indução, os quais, talvez não pudessem ter sido notados com a hibridização de uma quantidade única de RNA na membrana.

Assim como para os transfectantes de *P7LacI*, também foram observadas diferentes respostas à indução com IPTG nos transfectantes de *ST1LacI*, incluindo muitos clones com expressão basal muito alta. Parece haver, também nestes clones, um descontrole da expressão que pode dever-se à forma de inserção do plasmídeo no genoma.

Uma avaliação preliminar dos níveis de expressão de clones com aparente indução por IPTG foi feita visualmente, comparando os "dots" de cada clone induzido com os "dots" das diferentes diluições de RNA do mesmo clone não induzido.

A densitometria, essencial para quantificar o nível de indução, foi tentada no equipamento ImageMaster VDS (uma câmara CCD acoplada a um transiluminador) mas, para a maioria dos filmes, a análise não foi confiável devido à presença de manchas e pontos nos filmes de Raios X, que o software interpretou como sinal dos "dots".

Os resultados de hibridização do RNA de um dos clones transfectantes de *ST1LacI* com construções "sense" de metalotioneína 1 estão mostrados na Figura 17. A observação dos sinais de hibridização nos filmes parece indicar que esse clone celular (clone 3) é induzido pelo tratamento com IPTG. Pela comparação dos "dots" das diluições, o nível de indução deste clone parece ser de pelo menos duas vezes, sendo compatível com os níveis de indução obtidos com o tratamento das células com hidrocortisona (VALENTINI, 1993; VALENTINI e ARMELIN, 1996).

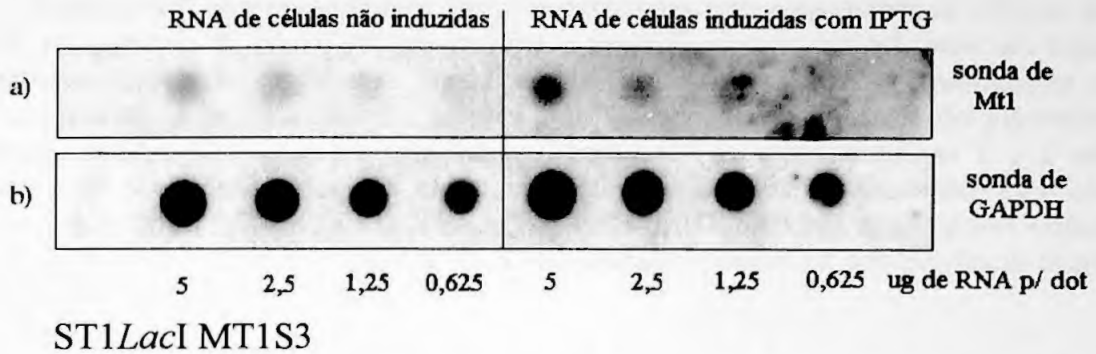


Figura 17 - "Dot-Blot" de diluições de RNA total de 1 clone celular de ST1*LacI* transfectada com construção "sense" de metalotioneína 1. Comparação dos sinais de hibridização das diluições de amostras de RNA total do clone 3 com sondas de a) metalotioneína 1 b) e GAPDH.

A hibridização dos RNAs de transfectantes de metalotioneína 2 "sense" com a respectiva sonda, indicou pelo menos um clone possivelmente induzido por IPTG (clone 9).

Dos transfectantes de ST1*LacI* com metalotioneína 1 "antisense" foi obtido um clone (clone 6) com indução por IPTG aparentemente maior que quatro vezes, pela comparação visual dos "dots".

Dos transfectantes de ST1*LacI* com metalotioneína 2 "antisense" dois clones (clones 5 e 9) mostraram ser induzidos por IPTG (Figura 18).

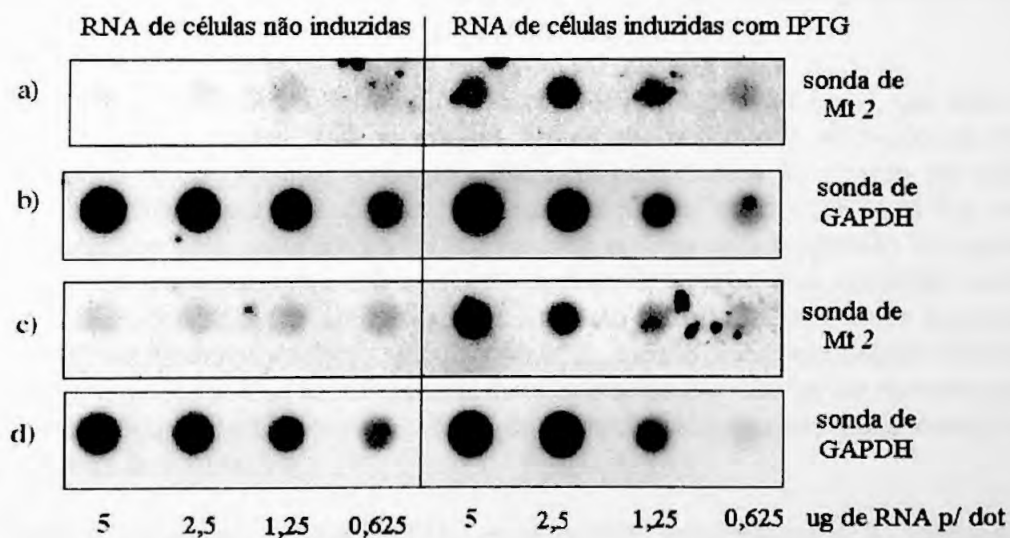


Figura 18 - "Dot-Blot" de diluições de RNA total dos clones de células ST1*LacI* transfectadas com construções "antisense" de metalotioneína 2. Comparação dos sinais de hibridização das diluições de amostras de RNA total do clones 5 e 9 com sondas de metalotioneína 2 { a) e c) e GAPDH { b) e d).

Células ST1 parentais também foram transfectadas com construções de cDNAs em pOPI3, na ausência do plasmídeo que codifica a proteína repressora *LacI*, para uso como controles de expressão constitutiva. Nestas condições, foram isolados 6 transfectantes de cada construção após uma primeira seleção com Geneticina. Na ausência do plasmídeo repressor, células ST1 contendo construções "antisense" de metalotioneínas 1 e 2 não resistiram às sucessivas passagens em meio seletivo, a despeito da facilidade com que foram estabelecidas na presença do plasmídeo repressor (Quadro 17). Estes dados podem indicar um papel crítico da expressão basal das metalotioneínas na sobrevivência destas células derivadas de C6 em cultura.

Quadro 17 - Viabilidade de transfectantes de ST1 expressando constitutivamente os cDNAs em estudo ao longo de 2 a 3 passagens.

As construções usadas foram de pOPI3, na ausência do vetor que expressa o repressor *LacI*. Nesta situação, a expressão destes genes é constitutiva.

Construções	Clones isolados	Clones sobreviventes
Metalotioneína 1 "sense"	6	5
Metalotioneína 1 "antisense"	6	0
Metalotioneína 2 "sense"	6	6
Metalotioneína 2 "antisense"	6	0
α -1-ácida "antisense"	6	4
<i>env</i> "antisense"	6	3

Os ensaios de crescimento em suspensão de agarose foram conduzidos com clones de células derivadas de P7 e de ST1 contendo construções induzíveis de metalotioneína 1 e 2. Em paralelo, foram feitas culturas em substrato sólido para verificar possíveis alterações na morfologia das células ou na sua forma de crescimento.

A observação da linhagem ST1*LacI* (expressando o repressor *LacI*), que deu origem às outras linhagens celulares aqui mostradas, indica que não houve alteração na resposta destas células à hidrocortisona, tanto no crescimento em suspensão quanto em substrato sólido. O comportamento da linhagem ST1 parental frente à hidrocortisona foi mantido nesta linhagem, ou seja, as células ST1*LacI* formam colônias em suspensão de agarose na ausência de hidrocortisona mas não na presença deste hormônio. Em substrato sólido, na ausência de hidrocortisona, as células exibem o mesmo aspecto transformado característico de ST1, que é também revertido com o tratamento. Para a linhagem celular ST1*LacI*, a adição de IPTG não altera as características de crescimento das células em monocamada ou em suspensão nem interfere com o efeito de hidrocortisona nestas duas condições de cultura (dados não mostrados).

Para a linhagem ST1*LacIMT1A*, expressando metalotioneína 1 "antisense", a cultura em agarose na ausência de hidrocortisona também produz colônias, tanto na ausência quanto na presença de IPTG (Figura 19e e 19g), da maneira prevista. Assumindo que a expressão aumentada de metalotioneína 1 (decorrente do tratamento com hidrocortisona) deveria reduzir a capacidade de crescimento das células em agarose, a

inibição desta expressão pelo “antisense” deveria restaurar esta capacidade. Nas culturas desta linhagem, mantidas na presença de hidrocortisona e IPTG simultaneamente, isto não foi observado (Figura 19h). Na cultura em substrato sólido com este mesmo tratamento, também não se observou a restauração do fenótipo transformado, que seria esperada no caso de metalotioneína 1 ter papel na reversão fenotípica (Figura 19d).

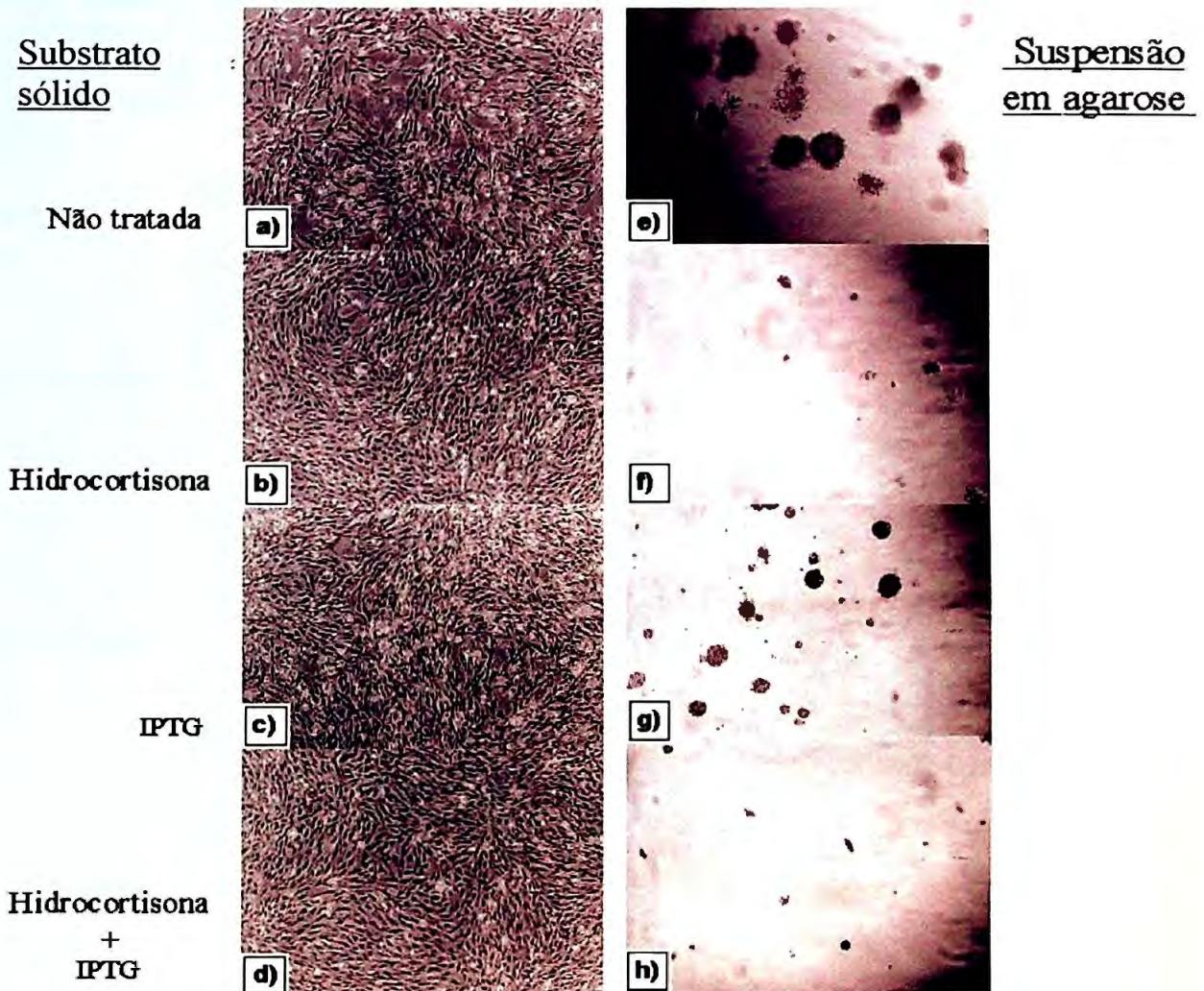


Figura 19 - Crescimento de ST1LacI MT1A (clone 7) sobre substrato sólido e em suspensão de agarose. Ensaio de crescimento em monocamada (48 horas) e em suspensão (20 dias) para as células ST1LacI MT1A (expressando Metalotioneína 1 “antisense”) submetidas a diferentes tratamentos: Não tratadas (controle); Hidrocortisona 100 ng/mL; IPTG 5 mM; Hidrocortisona 100 ng/mL + IPTG 5 mM.

A linhagem ST1LacI MT2A, expressando o transcrito “antisense” de metalotioneína 2, também responde a hidrocortisona, isoladamente, de maneira idêntica à célula parental, tanto sobre substrato sólido quanto em suspensão (Figura 20 a , 20b e 20f). Quando cultivada em monocamada na presença de IPTG (Figura 20c), observa-se uma redução no

número de células em divisão e um achatamento, que lembram a mudança observada com o tratamento com hidrocortisona. Esta observação contraria o esperado e, supondo-se funções semelhantes para metalotioneína 1 e 2, contrapõe-se ao observado na linhagem expressando o transcrito “antisense” de metalotioneína 1, (Figura 19c). Na presença simultânea de IPTG e hidrocortisona porém, o efeito do hormônio é abolido e as células exibem o mesmo padrão transformado de crescimento das células sem qualquer tratamento (Figura 20d), como esperado. Em suspensão, no entanto, a presença de IPTG não altera a capacidade da célula formar colônias, nem tampouco interfere no efeito de hidrocortisona em inibir sua formação (Figura 20g e 20h). Novamente o padrão de crescimento em monocamada não mostra paralelo com a capacidade de formar colônias em agarose.

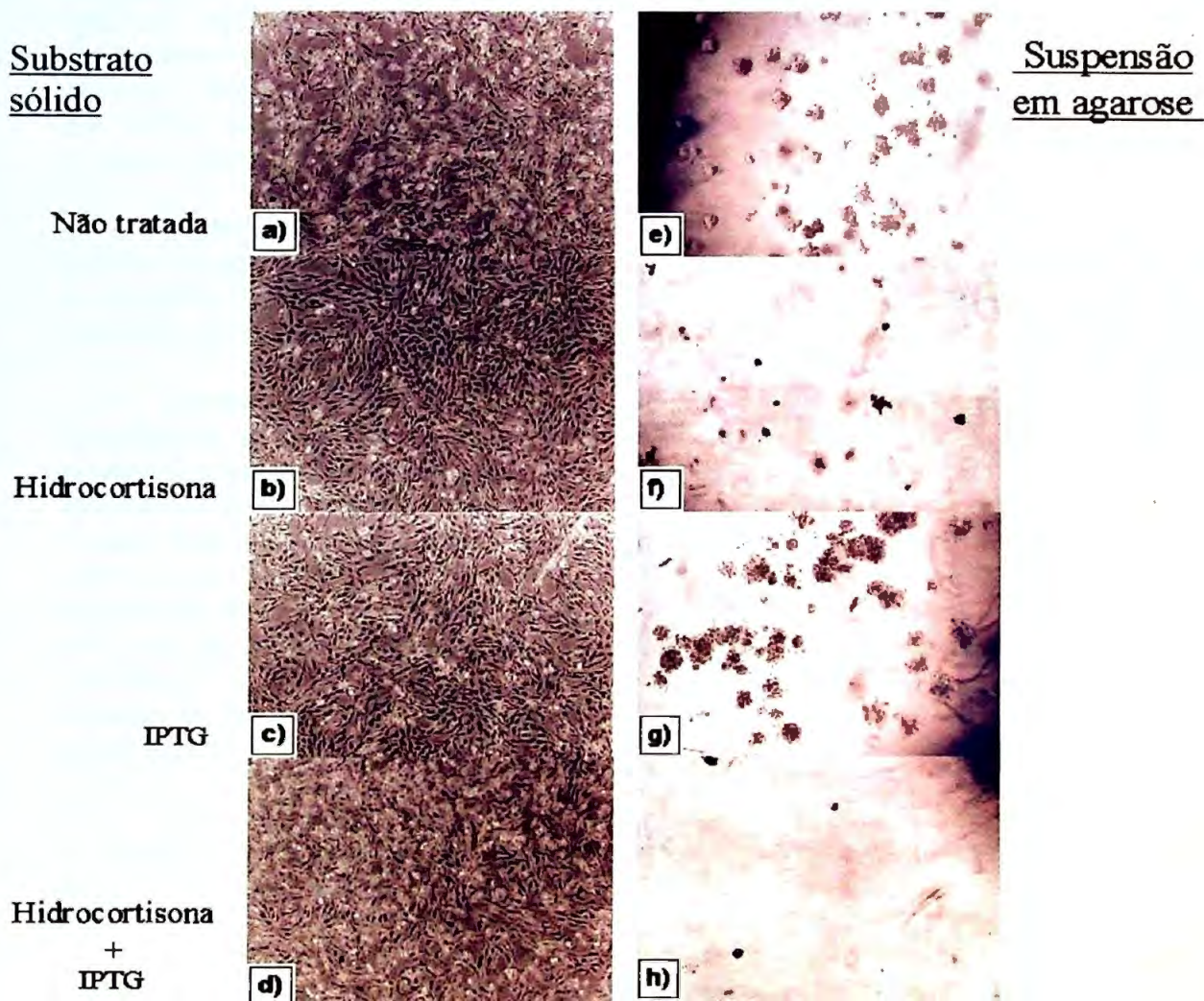


Figura 20 - Crescimento de ST1LacI MT2A (clone 12) sobre substrato sólido e em suspensão de agarose.

Ensaio de crescimento em monocamada (48 horas) e em suspensão de agarose (20 dias) para células ST1LacI MT2A (expressando Metalotioneína 2 “antisense”) submetidas a diferentes tratamentos: Não tratadas (controle); Hidrocortisona 100 ng/mL; IPTG 5 mM; Hidrocortisona 100 ng/mL + IPTG 5 mM.

A observação da linhagem *P7LacI* em cultura também mostra que não houve alteração visível na resposta destas células a hidrocortisona, em suspensão ou monocamada. As células *P7LacI*, como a linhagem parental *P7*, possuem a capacidade de formar colônias em agarose, na presença ou ausência de hidrocortisona e seu aspecto em monocamada é o mesmo nas duas condições.

A linhagem *P7LacI* MT2A10 (mostrada na Figura 21), expressando o transcrito “antisense” de metalotioneína 2, mostram, o mesmo fenótipo característico da linhagem parental: formação de colônias em agarose (Figura 21e e 21f) e aspecto transformado em monocamada, na presença ou ausência de hidrocortisona (Figura 21a e 21b). Neste clone, a adição de IPTG não causa qualquer alteração morfológica ou na sua capacidade de formar colônias. Esta observação coincide com o esperado, já que a expressão da proteína metalotioneína induzida pelo hormônio, no caso das células *P7* mostra-se insuficiente para reverter o fenótipo de tumoral para normal. A expressão do transcrito “antisense” induzida por IPTG, reduzindo a expressão da proteína metalotioneína, deve manter este fenótipo (Figura 21d e 21h).

Os ensaios de crescimento em suspensão na presença e ausência de hidrocortisona e indutor foram repetidos com outros clones de células *ST1LacI* e *P7LacI* contendo construções “sense” e “antisense” dos genes em estudo, sem a observação dos efeitos esperados de mudança no padrão de crescimento em cada condição.

Apesar de o número de clones resistentes a Geneticina obtido em todas as transfecções ter sido elevado, a coleta inicial foi limitada a 12 clones, uma vez que o manual LacSwitch II sugere a triagem de apenas 10 clones por construção. Estes números mostraram-se insuficientes para a produção de quantidade satisfatória de clones para os ensaios funcionais, principalmente levando-se em conta a necessidade de analisar múltiplos clones para verificar se o efeito biológico é observado de maneira consistente (ou, ainda, dependente do nível de expressão obtido). A frequência com que foram obtidas linhagens celulares reguladas de maneira adequada por IPTG foi muito baixa para todos os cDNAs clonados (1 a 2 clones em 12 clones analisados por construção) e, ainda, os níveis de indução e de expressão observados nesta triagem foram baixos para a maioria das construções.

Com o intuito de obter clones com maiores níveis de indução e expressão, optou-se por empregar, em paralelo, um outro sistema induzível, no qual a expressão regulada é melhor documentada na literatura.

Para permitir a análise de maior número de clones, selecionando as linhagens mais e melhor reguladas, decidiu-se também empregar outra metodologia de triagem.

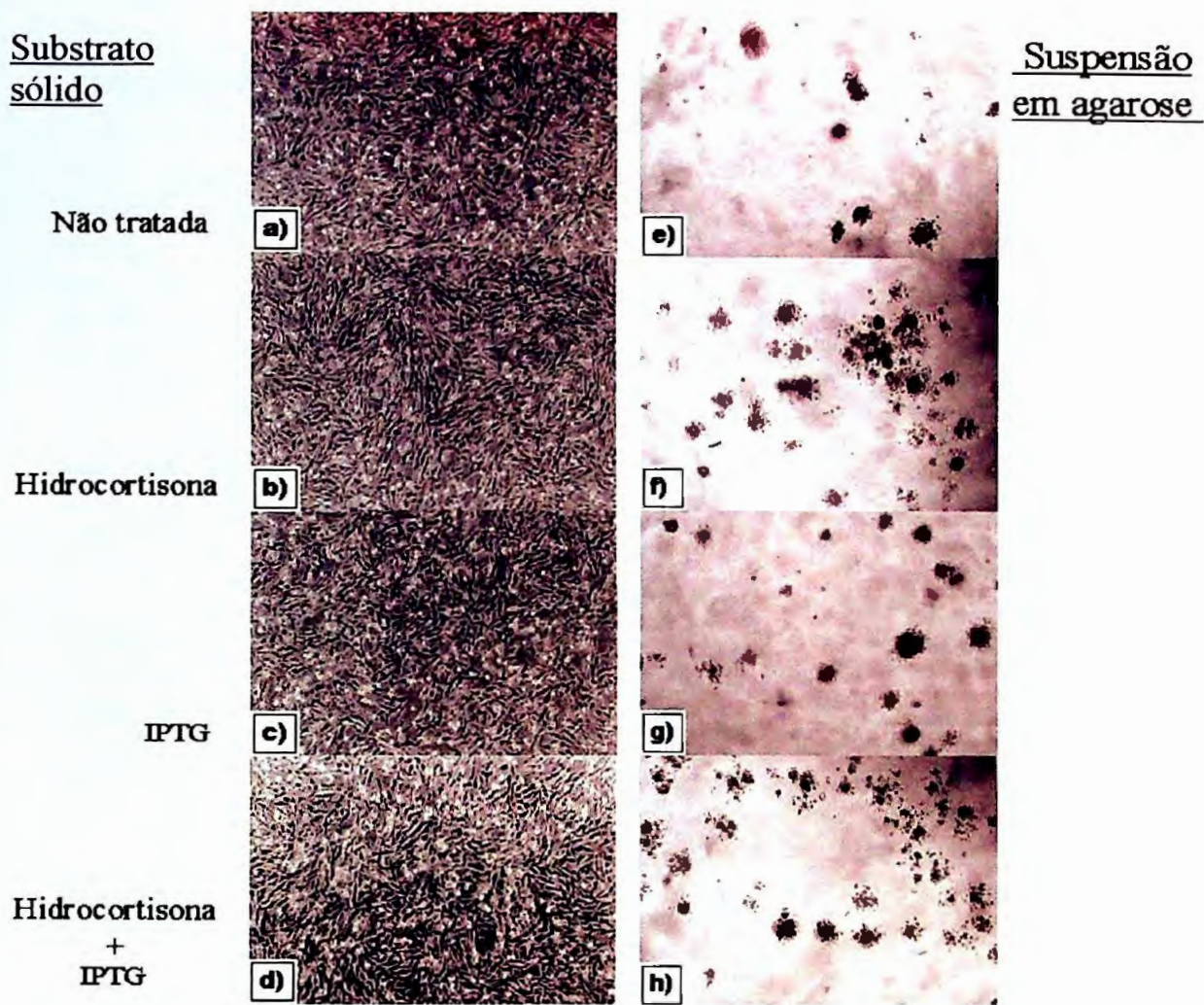


Figura 21 - Crescimento de P7LacI MT2A (clone 10) sobre substrato sólido e em suspensão de agarose.

Ensaio de crescimento em monocamada (48 horas) e em suspensão de agarose (20 dias) para as células P7LacIMT2A - clone 10 - (expressando Metalotioneína 2 “antisense”) submetidas a diferentes tratamentos: Não tratadas (controle); Hidrocortisona 100 ng/mL; IPTG 5 mM; Hidrocortisona 100 ng/mL + IPTG 5 mM.

4.9. Estabelecimento de linhagens de células ST1 e P7 expressando mRNAs “sense” e “antisense” através de vetores retrovirais

4.9.1. Subclonagem dos cDNAs em pRetro-On

O vetor escolhido foi pRetro-On (Clontech), no qual a expressão do transgene é controlada por um elemento responsivo a tetraciclina (TRE derivado do transposon Tn10).

O esqueleto do vetor pRetro-On (Quadro 8) é derivado do vírus da leucemia murina de Moloney (MoMuLV). O LTR 5' do vírus controla a expressão do transcrito que contém um sinal de empacotamento viral modificado (ψ^+) e o gene de resistência a puomicina (puo^r) para seleção. O vetor pode ser transfectado em células empacotadoras (gag^+ , pol^+ , $env^{+/-}$) para a produção de partículas retrovirais infecciosas mas incompetentes para a replicação (MILLER e ROSMAN, 1989; AUSUBEL *et al.*, 1999), uma vez que o transcrito empacotado nas partículas não contém os genes virais que permitem a formação de novas partículas nas células infectadas.

Neste sistema, diferentemente dos outros sistemas Tet (desenvolvidos a partir do trabalho de GOSSEN e BUJARD, 1992) ou mesmo de outros sistemas induzíveis, os elementos de transativação (rtTa) e de resposta (TRE) estão contidos no mesmo vetor, eliminando a necessidade de gerar, seqüencialmente, linhagens celulares expressando o transativador e contendo o cDNA clonado, evitando a execução de “screenings” separados para verificar a expressão da proteína controladora e do transgene sob seu controle.

O emprego de puomicina como agente seletivo também é vantajoso. A literatura menciona que a seleção com esta droga é extremamente rápida e eficiente, não se observando “background” de sobrevivência em células não infectadas / transfectadas.

A elaboração das construções de pRetro-On contendo os cDNAs de Metalotioneínas 1 e 2, da glicoproteína α -1-ácida e de *env* foi muito simples, pois os sítios de restrição *Not* I, gerados nas construções intermediárias necessárias à clonagem destes cDNAs em pOPI3, puderam ser diretamente empregados para subclonagem neste vetor. A determinação da orientação dos cDNAs neste vetor foi feita por clivagem com *Bam*H I, da mesma forma que com pOPI3 e pOPRSVI.

A produção das partículas virais no sobrenadante de cultura das células ϕ nx transfectadas com as diferentes construções de cDNAs foi muito eficiente, como foi verificado na titulação em células NIH-3T3 (Quadro 18), obtendo-se títulos da mesma ordem de grandeza para todos os cDNAs, com ambos os tipos de células empacotadoras empregadas.

Quadro 18 - Títulos (colônias puro^f em NIH-3T3) de retrovírus obtidos a partir da transfecção de células empacotadoras ϕ nx Ampho e ϕ nx Eco com construções de vetores derivados de retrovírus contendo os cDNAs dos genes em estudo.

Construção de pRetro-On	Títulos determinados através da infecção de NIH-3T3 com retrovírus ($\times 10^6$)	
	Anfotrópico	Ecotrópico
1 - Mt1 "sense"	8	7
2 - Mt1 "antisense"	7	8
3 - Mt2 "sense"	6	8
4 - Mt2 "antisense"	7	7
5 - α -1-ácida "sense"	4	3
6 - α -1-ácida "antisense"	6	6
7 - env "sense"	6	5
8 - env "antisense"	6	4

4.9.2. Infecção de células ST1 e P7 com retrovirus recombinantes

Para a infecção das células ST1 e P7 com os retrovírus gerados, foi inicialmente necessário determinar a concentração de puromicina necessária para a seleção das células na ausência do gene de resistência à droga. Após 10 dias de cultura na presença da droga, foi possível determinar a sensibilidade das células ST1 e P7.

A concentração de puromicina necessária para a seleção de clones de células P7 foi de 1,0 μ g/mL, observando-se perda de viabilidade das células nesta concentração em menos de 3 dias, mesmo com a remoção da droga e troca do meio de cultura. Para ST1, a concentração da droga necessária para o mesmo efeito foi de 5,0 μ g/mL. Estas foram as concentrações empregadas para a seleção das células infectadas com as construções retrovirais.

A infecção das células ST1 com os retrovírus gerados foi bastante eficiente para a maioria das construções (Quadro 19), permitindo o isolamento de um grande número de clones, de maneira relativamente uniforme para os diferentes cDNAs ou tipo de envelope (anfotrópico ou ecotrópico) empregados no empacotamento. Foi observada uma eficiência ligeiramente maior para as infecções com vírus anfotrópico. Em todos os casos, a coleta de clones foi limitada a 96 colônias no caso das infecções que produziram número maior que este. Foi observado um número ligeiramente reduzido de clones com a construção "sense" da glicoproteína α -1-ácida (com qualquer dos dois envelopes).

No caso das células P7, algumas infecções produziram número reduzido de clones para certo tipo de envelope em algumas das construções e elevado em outras. Algumas das infecções com vírus contendo construções, como *env* “sense”, produziram poucas colônias em P7, independente do envelope empregado, fato não observado em ST1. Não se observou um padrão de “preferência” de envelope para estas células, mas, curiosamente, a infecção mais eficiente para certo par construção/envelope no caso das células ST1 foi a menos eficiente para P7.

Vale observar que estes clones foram selecionados e mantidos na ausência do indutor Doxiciclina, o que indica que qualquer efeito decorrente de expressão de cada cDNA deva ser devido a um “escape” na regulação da expressão ou a algum efeito inesperado da simples presença de determinado cDNA na célula.

O Quadro 19 abaixo resume o número final de clones sobreviventes mantidos até a etapa de triagem. O número de clones perdidos ao longo de sua manutenção (trocas de meio de cultura e repiques) durante a etapa de triagem foi desprezível, o que indica a estabilidade inerente à forma como os retrovírus introduzem material genético nas células infectadas.

Quadro 19 - Clones (puro r⁺) isolados de células ST1 e P7 infectadas por retrovírus contendo construções induzíveis de pRetro-On com os diferentes cDNAs.

Construção de PRetro-On	No. de clones resultantes de ST1 infectada por retrovírus		No. de clones resultantes de P7 infectada por retrovírus	
	Anfotrópico	Ecotrópico	Anfotrópico	Ecotrópico
1 - Mt1 “sense”	90	80	7	44
2 - Mt1 “antisense”	95	75	7	56
3 - Mt2 “sense”	89	83	26	71
4 - Mt2 antisense”	83	89	14	82
5 - α -1-ácida “sense”	50	29	33	46
6 - α -1-ácida “antisense”	90	69	80	45
7 - <i>env</i> “sense”	60	85	16	15
8 - <i>env</i> “antisense”	92	95	85	33

4.9.3. Padronização do ensaio de expressão para triagem de clones celulares

A triagem para identificação dos clones celulares adequadamente induzíveis, foi feita usando uma modificação do método de ELISA imunocitoquímico (MICE – “Microtiter ImmunoCytochemical ELISA) (de la MONTE *et al.*, 1999). Esta metodologia já havia sido empregada, entre outras finalidades, para o “screening” de expressão diferencial de proteínas expressas no sistema LacSwitch II (de la MONTE *et al.*, 1998).

A relação entre a absorvância da reação com os anticorpos e a absorvância devida à coloração com Coomassie, permite estimar a expressão relativa da proteína em estudo em termos equivalentes a “expressão por célula” – “MICE Index” - (de la MONTE *et al.*, 1999). Além disso, a medida da absorvância da coloração com “Coomassie Brilliant Blue” reflete a densidade celular, podendo indicar se os tratamentos (no nosso caso, a possível indução de expressão) causam algum efeito no crescimento das células.

A padronização do teste, através da escolha dos anticorpos primários, de suas concentrações e da concentração de uso do anticorpo secundário foram determinadas por “block titration”, de modo a permitir a maior discriminação possível entre os sinais da reação de células tratadas e não tratadas (Gráfico 3). As diluições de cada anticorpo que apresentaram maiores diferenças de “MICE Index”, entre células tratadas e não tratadas com hidrocortisona, foram empregadas posteriormente para a triagem de clones regulados. Nestas condições de ensaio padronizadas, o “MICE Index” permitiu discriminar as alterações na expressão pelo tratamento com hidrocortisona, com intervalo de confiança maior que 95% para todas as proteínas analisadas.

Ensaio preliminares confirmaram a capacidade do MICE em detectar o aumento de expressão das proteínas em exame nas células ST1 tratadas com hidrocortisona (Gráfico 4). A coloração de Coomassie, por sua vez, mostra o efeito de inibição de crescimento observado em células ST1 tratadas com hidrocortisona.

Foram analisados 24 clones de células ST1 infectadas com retrovirus contendo cada tipo de construção de cDNA nas orientações “sense” e “antisense”.

No caso das células contendo construções “sense”, o objetivo do ensaio foi identificar os clones nos quais ocorre aumento de expressão na cavidade contendo o indutor, em comparação com a cavidade contendo apenas o meio de cultura (nível basal). Procurou-se obter clones com expressão provocada pelo indutor tão alta quanto aquela observada na cavidade contendo as células tratadas com hidrocortisona.

Para os clones “antisense”, procurou-se identificar clones nos quais a expressão observada na cavidade contendo o indutor e hidrocortisona é reduzida, em comparação com aquela contendo apenas hidrocortisona. Neste caso, o clone ideal deve mostrar o restabelecimento de níveis de expressão equivalentes ao basal, verificado na cavidade contendo meio de cultura sem aditivos, inibindo a expressão induzida por hidrocortisona.

Gráfico 3 - Padronização da diluição de uso dos anticorpos no ELISA imunocitoquímico (MICE).

a), c), e) Expressão relativa das proteínas *env*, glicoproteína α -1-ácida e metalotioneínas, respectivamente, em células ST1 sem tratamento (c) e tratadas com hidrocortisona 100 ng/mL (hy). MICE INDEX corresponde à razão entre a absorbância da imuno-reação e a absorbância da coloração de Coomassie, que indica densidade celular.

b), d), f) Absorbância da coloração de Coomassie indica densidade celular na ausência (c) e presença de hidrocortisona 100 ng/mL. (hy) em cada pocinho.

A cada gráfico de MICE INDEX corresponde o gráfico ao lado, de Coomassie.

Obs: O quadro azul marca a diluição do anticorpo selecionada para a etapa de triagem.

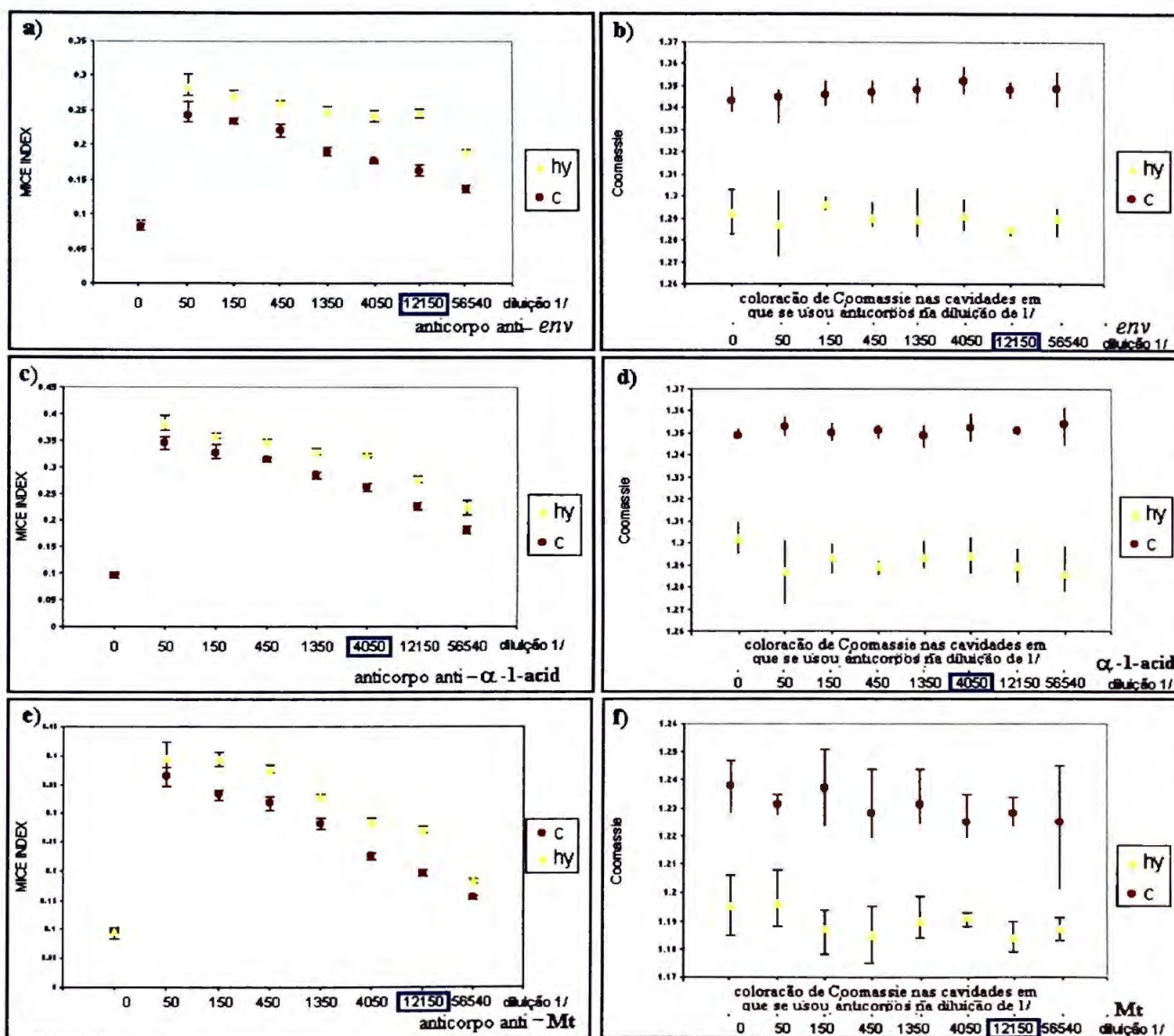
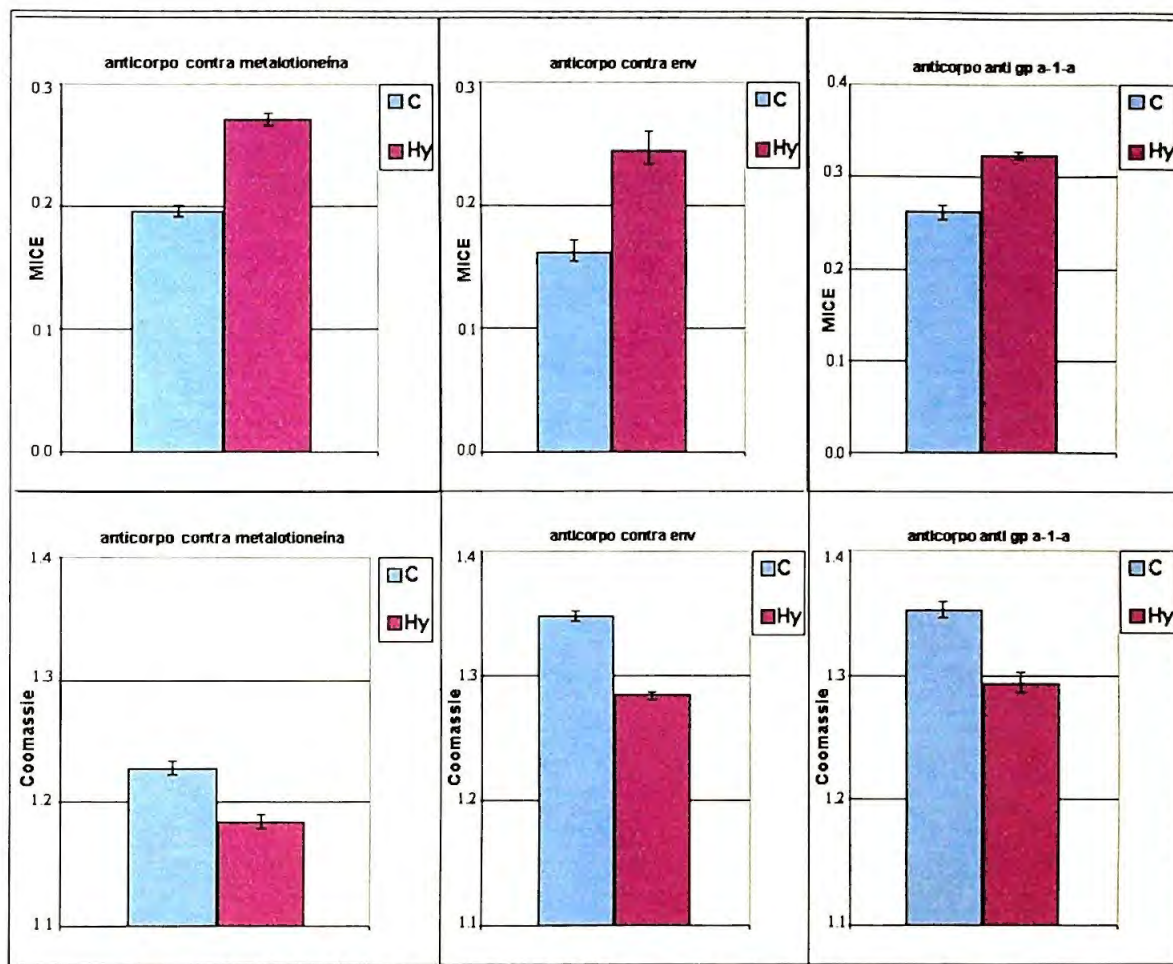


Gráfico 4 – Expressão relativa de metalotioneínas, glicoproteína α -1-ácida e *env* em células ST1 (linhagem parental) através de ELISA imunocitoquímico (MICE) entre células tratadas e não tratadas com hidrocortisona.

Notar aumento de expressão das proteínas *env*, glicoproteína α -1-ácida e metalotioneínas (MICE - gráficos superiores) e inibição de crescimento (Coomassie – gráficos inferiores) nas células tratadas com hidrocortisona (Hy) em relação às células controle(C), sem tratamento



No caso dos clones contendo construções "sense", de maneira geral, os níveis de expressão induzível obtidos foram menores que os observados nas células tratadas com hidrocortisona. Para os clones contendo construções "antisense", a adição do indutor foi capaz de produzir decréscimo observável nos níveis de proteína detectada, chegando, em alguns casos, a restituir a expressão a níveis próximos do basal ou menores como previsto para um "antisense" funcional.

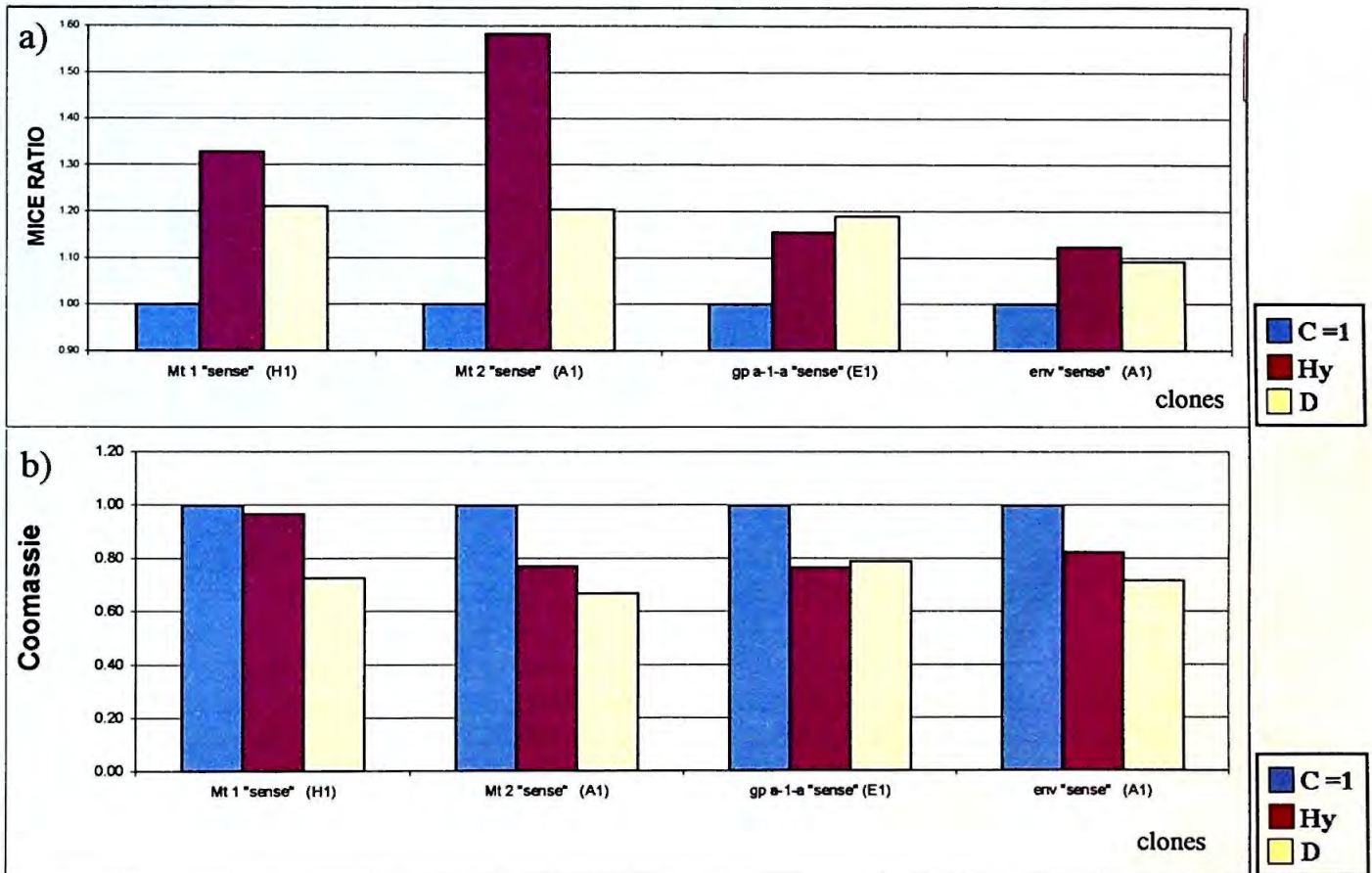
Observando estes parâmetros, foi selecionado um clone de cada um dos tipos de construção.

Os clones contendo construções “sense”, quando induzidos, apresentaram níveis de expressão maiores que os níveis basais das células não tratadas e, apenas para o clone da glicoproteína α -1-ácida, esta expressão foi ligeiramente maior que a das células tratadas com hidrocortisona. Todos os clones “sense” apresentaram menor densidade celular quando tratadas com o indutor. Apenas o clone de glicoproteína α -1-ácida exibiu densidade ligeiramente menor do que a observada nas células tratadas com hidrocortisona (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Expressão relativa e densidade celular de clones de células ST1 contendo construções “sense” induzíveis, selecionados na triagem por MICE.

a) Expressão relativa (MICE) de Metalotioneína 1 e 2, Glicoproteína α -1-ácida e *env*.

b) Densidade celular (Coomassie) dos clones de células ST1 “sense” selecionados para os ensaios funcionais.

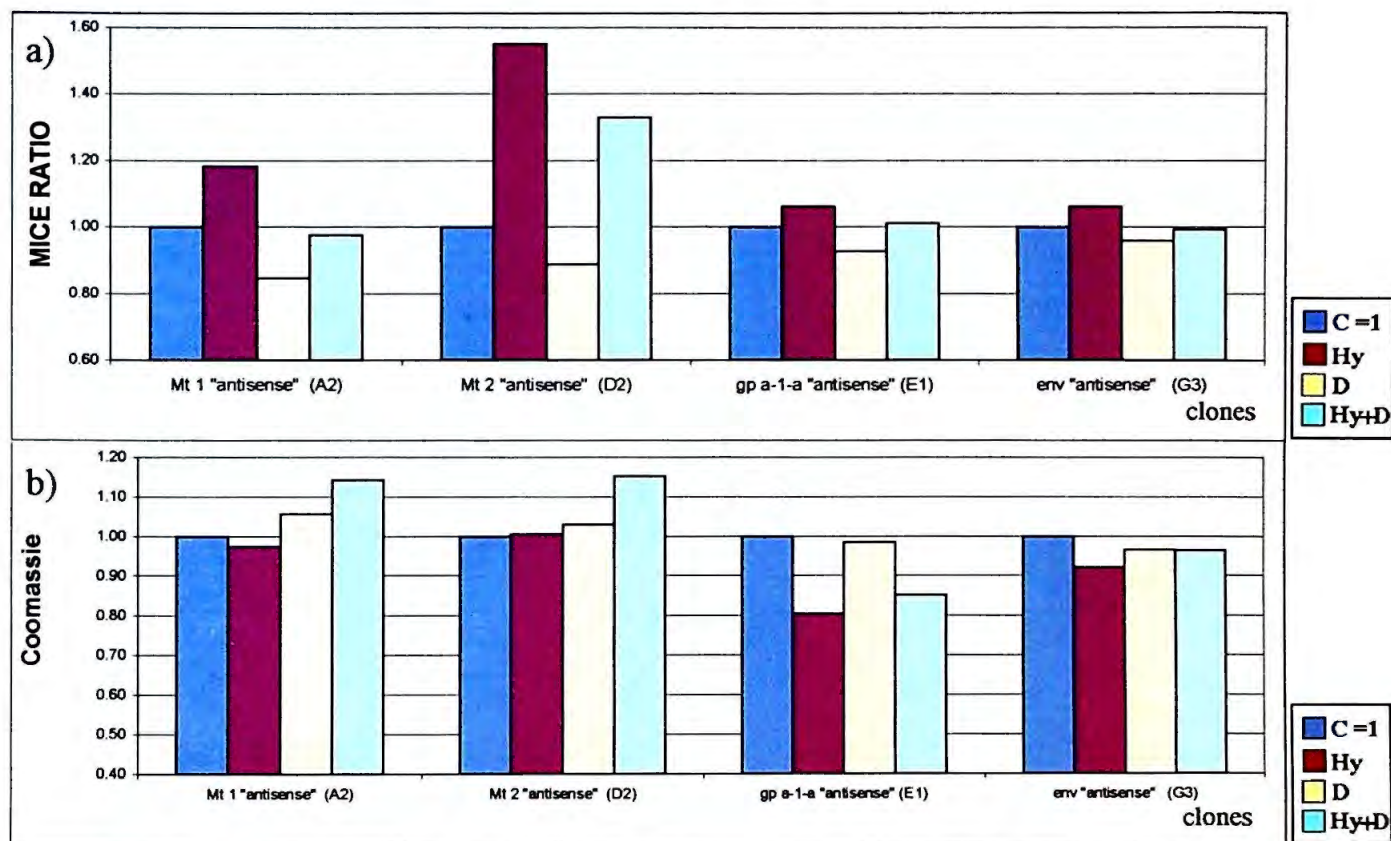


Os clones contendo construções “antisense”, quando induzidos, apresentaram níveis de expressão menores, inclusive, que os níveis basais das células não tratadas (Gráfico 6). Além disto, na presença de hidrocortisona, a indução dos “antisense” foi capaz de reduzir os níveis das proteínas em relação ao tratamento com o hormônio. O aumento da densidade celular quando induzida a expressão das construções “antisense” foi observado apenas nos clones das Metalotioneína 1 e 2.

Gráfico 6 - Expressão relativa e densidade celular de clones de células ST1 contendo construções “antisense” induzíveis, selecionados na triagem por MICE.

(a) Expressão relativa (MICE) de Metalotioneínas 1 e 2, Glicoproteína α -1-ácida e *env*.

(b) Densidade celular (Coomassie) dos clones de células ST1 “antisense” selecionados para os ensaios funcionais.



Os clones isolados de P7 foram submetidos ao mesmo processo de triagem, nas condições de ausência e presença de hidrocortisona e/ou indutor, para seleção dos clones melhor regulados. Da mesma forma que para ST1, com base dos resultados do MICE, foi obtido um pequeno número de clones induzíveis que apresentaram certa variedade de respostas de crescimento celular associada a níveis semelhantes de expressão. Este fato, aliado à ausência de resultados conseguidos com os clones de ST1 (seção 4.10.) nos levou a não prosseguir os experimentos com estes clones celulares derivados de P7.

4.10. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose

Cada um dos clones de células ST1 selecionados, contendo construções induzíveis “sense” e “antisense” dos cDNAs de Metalotioneína 1, Metalotioneína 2, Glicoproteína α -1-ácida e *env*, foram avaliados em ensaios de crescimento em suspensão de agarose na presença de hidrocortisona e/ou indutor.

Nos clones contendo as construções “sense” e tratados com indutor, ou seja, induzindo-se a expressão das proteínas correspondentes aos genes clonados, houve crescimento dos clones em suspensão de agarose, de maneira semelhante à observada nas células não tratadas (controle).

Já nos clones contendo as construções “antisense”, tratados com hidrocortisona e indutor, para os quais se espera a inibição da expressão das proteínas induzidas por hidrocortisona, não ocorreu a formação de colônias, tal qual na linhagem parental.

4.11. Triagem funcional

Nas células ST1 transfectadas com os vetores induzíveis, o emprego do esquema tradicional de determinação de função via super-expressão (isolamento de clones – triagem/análise de expressão – ensaio funcional) não permitiu verificar qualquer efeito dos genes em estudo no fenômeno de reversão fenotípica, tornando necessária outra estratégia de análise.

Células ST1*LacI* e P7*LacI* foram transfectadas com as construções “sense” e “antisense” e mantidas na presença de Geneticina por 4 dias. O “pool” de células transfectadas e brevemente selecionadas foi tripsinizado, sendo as células viáveis contadas com azul de Trypan e divididas para plaqueamento em suspensão de agarose nas quatro condições descritas anteriormente (sem tratamento, hidrocortisona, indutor e indutor + hidrocortisona; 5.000 células por condição). O crescimento das colônias em cada condição foi registrado para cada série de transfectantes com as diferentes construções de cDNAs.

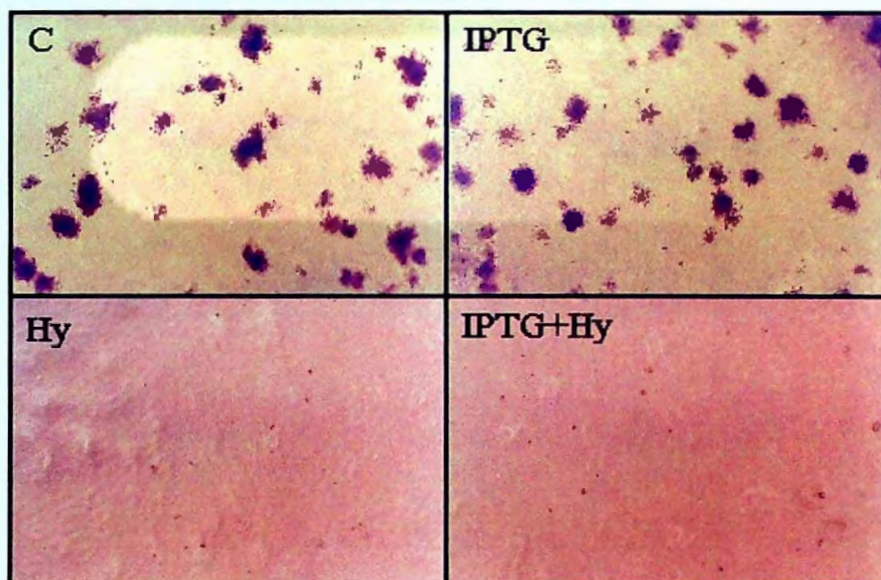
Nos ensaios realizados com células ST1*LacI* transfectadas com construções “sense” (Figuras 22, 23, 24 e 25, painéis superiores), não foi observado o crescimento de colônias na presença de hidrocortisona ou de hidrocortisona + IPTG, conforme o previsto. O plaqueamento das transfecções feitas com construções “sense” de *env* e de metalotioneína 1 (Figuras 22) produziram número inferior de colônias com IPTG adicionado ao meio de cultura, em relação à condição controle. Para os transfectantes “sense” de metalotioneína 2 (Figuras 23) e da glicoproteína α -1-ácida (Figuras 24), o crescimento de colônias foi praticamente o mesmo na ausência e presença de IPTG.

Nas células ST1*LacI* transfectadas com construções “antisense” (Figuras 22, 23, 24 e 25, painéis inferiores), foi observado o crescimento de colônias na presença de hidrocortisona e de hidrocortisona + IPTG para todos os cDNAs. O crescimento de colônias na presença de hidrocortisona foi expressivo para a glicoproteína α -1-ácida (120) (Figuras 24), metalotioneína 1 (71) (Figuras 22) e 2 (37) (Figuras 23), indicando o “vazamento” de expressão observado frequentemente nos “dot-blots” vistos anteriormente.

Nos ensaios de crescimento em suspensão de agarose feitos com ST1*LacI*, a eficiência de plaqueamento variou de 30 a 41% entre os diferentes transfectantes não

tratados (com as células não transfectadas exibindo eficiência de plaqueamento de 34%) (Quadro 20).

Metalotioneína 1 "sense"



Metalotioneína 1 "antisense"

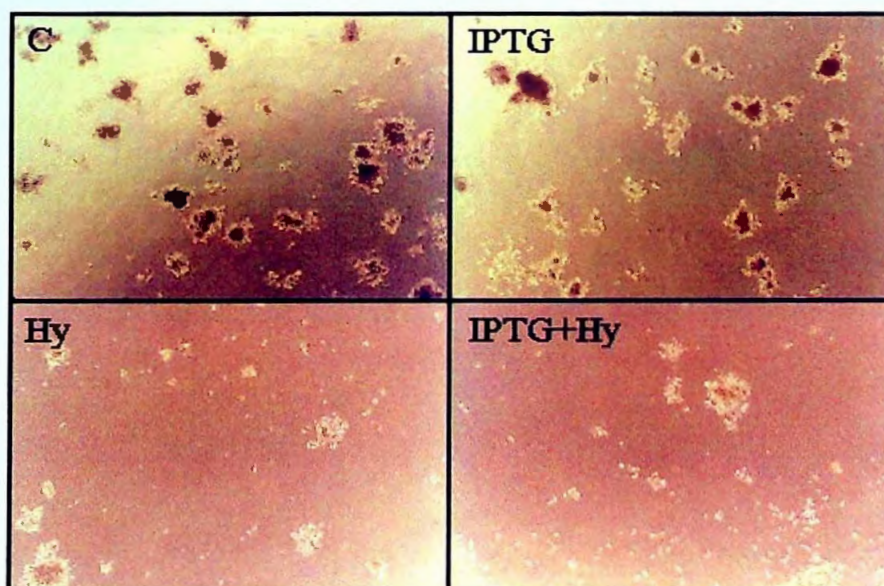
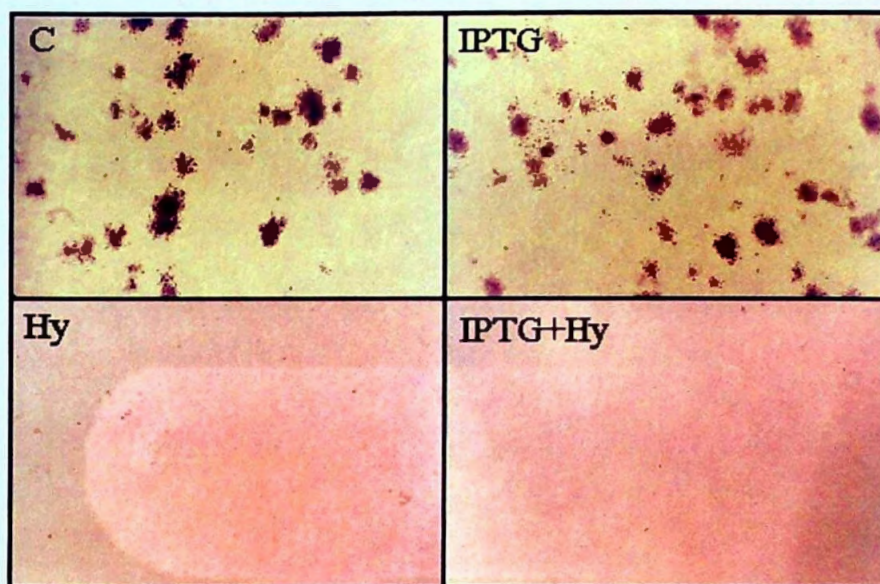


Figura 22 - Crescimento em suspensão de agarose de células *ST1LacI* transfectadas com construções de Metalotioneína 1.

Ensaio de suspensão de agarose para triagem funcional de clones de células *ST1LacI* transfectadas com construções "sense" e "antisense" de Metalotioneína 1 em pOPRSVI.

Metalotioneína 2 "sense"



Metalotioneína 2 "antisense"

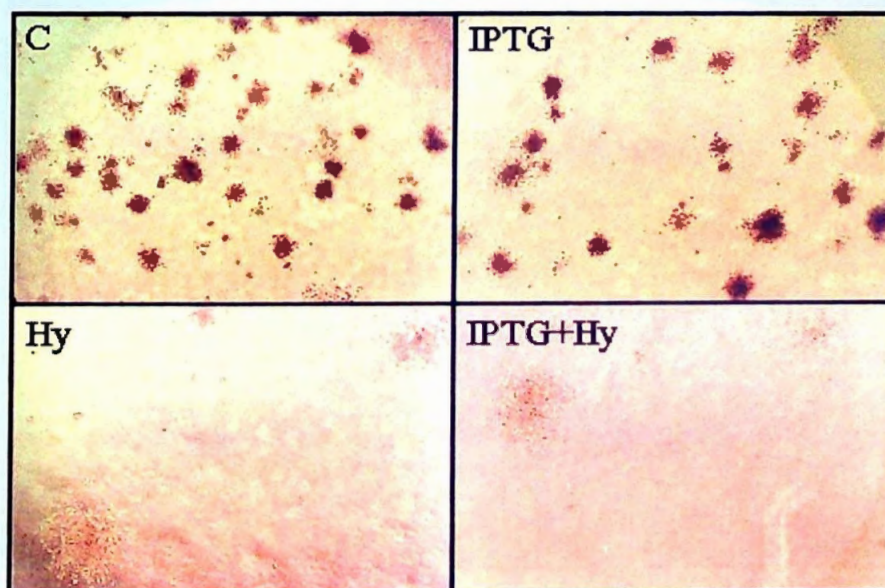
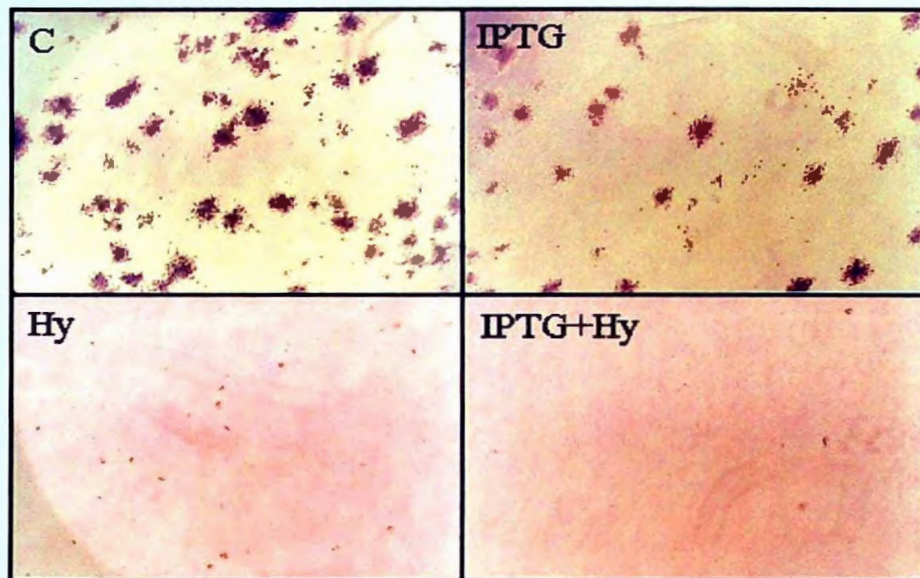


Figura 23 - Crescimento em suspensão de agarose de células ST1LacI transfetadas com construções de Metalotioneína 2.

Ensaio de suspensão de agarose para triagem funcional de clones de células ST1LacI transfetadas com construções "sense" e "antisense" de Metalotioneína 2 em pOPRSVI.

Glicoproteína alfa-1-ácida "sense"



Glicoproteína alfa-1-ácida "antisense"

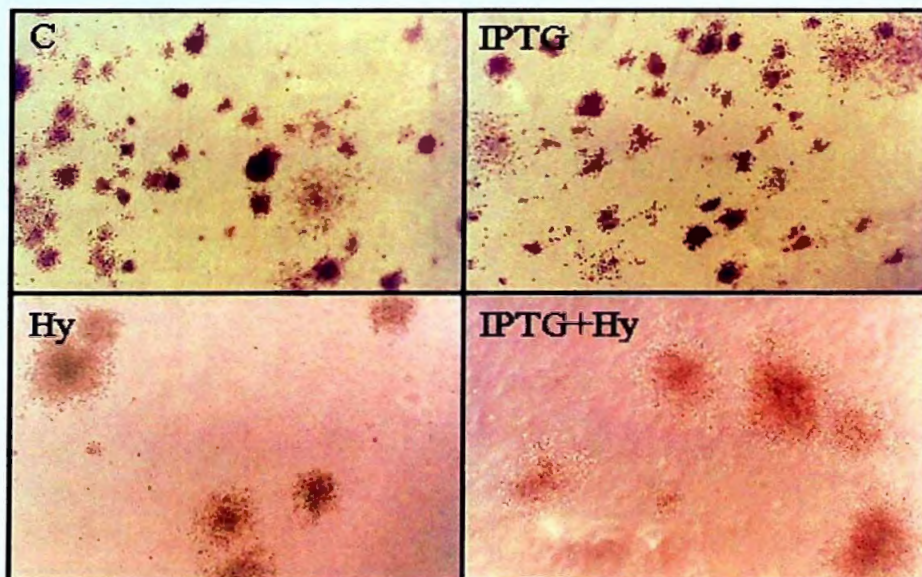
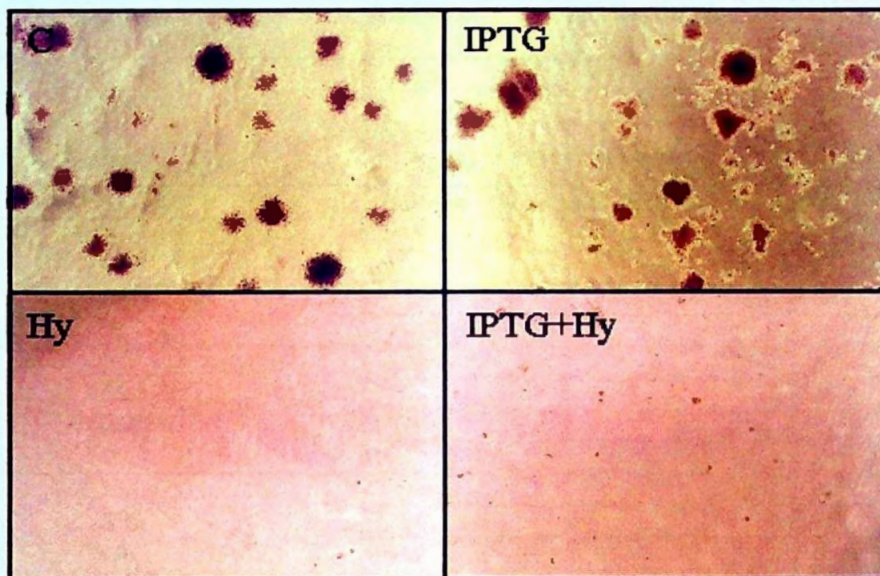


Figura 24 - Crescimento em suspensão de agarose de células ST1LacI transfetadas com construções de Glicoproteína α -1-ácida.

Ensaio de suspensão de agarose para triagem funcional de clones de células ST1LacI transfetadas com construções "sense" e "antisense" da Glicoproteína α -1-ácida em pOPRSVI.

env "sense"



env "antisense"

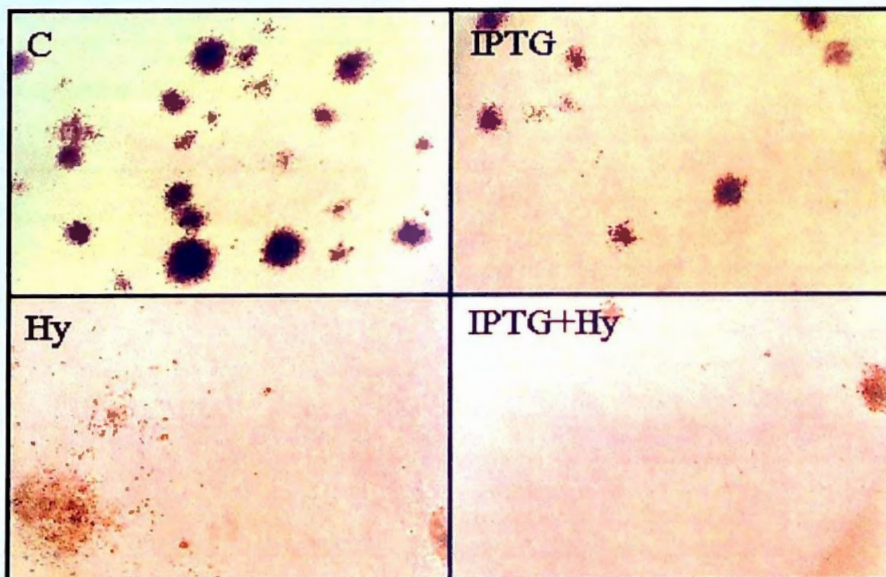


Figura 25 - Crescimento em suspensão de agarose de células *ST1LacI* transfetadas com construções de *env*.
Ensaio de suspensão de agarose e Triagem funcional de clones de células *ST1LacI* transfetadas com construções "sense" e "antisense" de *env* em pOPRSVI.

Quadro 20 - Ensaio de crescimento em suspensão de agarose de células *ST1LacI* transfectadas com construções “sense” e “antisense” em pOPRSVI.

Crescimento em suspensão em agarose do pool de células <i>ST1LacI</i> transfectadas com construções em pOPRSVI			
Controle	Tratamento	No. de colônias	Eficiência de Plaqueamento (%)
<i>ST1LacI</i>	Controle	1706	34,12
	Hy	0	0
	IPTG	1755	35,10
	Hy + IPTG	0	0
Construção	Tratamento	No. de colônias	
Mt1 “sense”	Controle	2102	42,04
	Hy	0	0
	IPTG	1878	35,56
	Hy + IPTG	0	0
Mt1 “antisense”	Controle	1792	35,84
	Hy	71	1,42
	IPTG	1844	36,88
	Hy + IPTG	64	1,28
Mt2 “sense”	Controle	1501	30,02
	Hy	0	0
	IPTG	1490	26,80
	Hy + IPTG	0	0
Mt2 “antisense”	Controle	2061	41,22
	Hy	37	0,74
	IPTG	1641	32,82
	Hy + IPTG	55	1,10
Glicoproteína alfa-1-ácida “sense”	Controle	1877	37,54
	Hy	0	0
	IPTG	1861	37,22
	Hy + IPTG	0	0
Glicoproteína alfa-1-ácida “antisense”	Controle	1604	32,08
	Hy	120	2,40
	IPTG	1656	33,12
	Hy + IPTG	139	2,78
env “sense”	Controle	1320	26,40
	Hy	0	0
	IPTG	1293	25,86
	Hy + IPTG	0	0
env “antisense”	Controle	1530	30,60
	Hy	25	0,50
	IPTG	1344	26,88
	Hy + IPTG	7	0,14

Nota: Para a análise de significância estatística, foram tomados como base a média e o desvio padrão das eficiências de plaqueamento determinadas para as células parentais *ST1LacI* na condição controle e IPTG. Alterações de eficiência de plaqueamento maiores que 1,38% são significativas com 95% de intervalo de confiança.

Para os plaqueamento das células *P7LacI* transfectadas, por outro lado, foi observada uma dramática variedade de respostas à presença dos cDNAs, à adição do indutor e mesmo de hidrocortisona. Enquanto as células não transfectadas mostraram eficiência de plaqueamento de 31,5% (em média), entre os transfectantes foram obtidas eficiências de plaqueamento que variaram entre 4,8 e 45% (na condição controle) (Figuras 26, 27, 28 e 29 e Quadro 21).

Nas células *P7LacI* transfectadas com construções “sense” de metalotioneína 1, foi observada redução expressiva no número de colônias crescidas na presença de IPTG, em relação ao plaqueamento controle, com eficiência de plaqueamento passando de 18,5% para 8,5%. Diferentemente, nos plaqueamentos de transfecções feitas com construções de metalotioneína 2 “sense”, foi observado um aumento na eficiência de plaqueamento na indução com IPTG em relação ao controle (de 6,3% para 16,1%)(Quadro 21).

Apesar destas diferenças, nas transfecções feitas com as construções “sense” das metalotioneínas, a presença conjunta de IPTG e hidrocortisona produziu redução na eficiência de plaqueamento quando comparada com indução com IPTG (de 8,5% para 5,8% para Mt1 “sense” e de 16,1% para 10,8% para Mt2 “sense”). Este efeito do tratamento de hidrocortisona não é observado quando comparamos o tratamento com hidrocortisona em relação ao controle (Quadro 21).

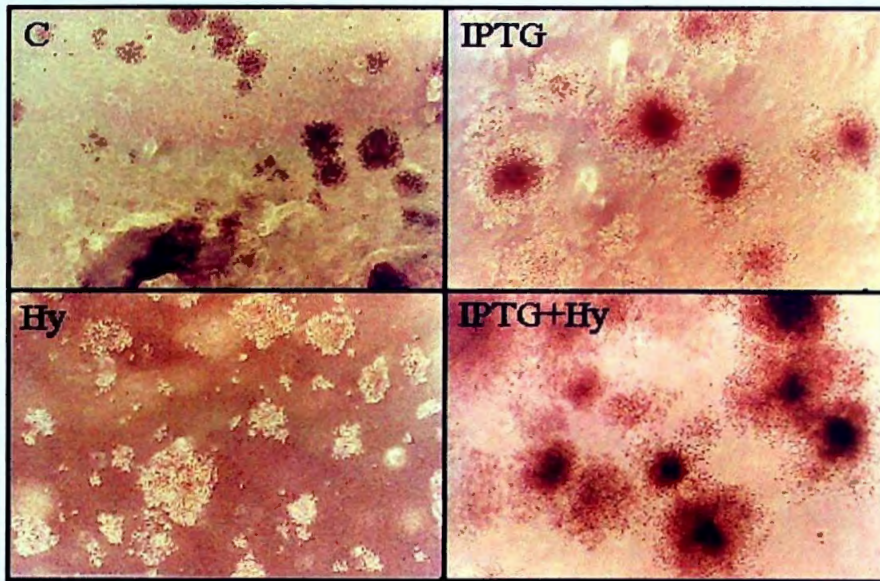
Na transfecção feita com a construção “sense” da glicoproteína α -1-ácida em *P7LacI*, a indução dessa construção por IPTG causou um considerável aumento no número de colônias crescidas em relação ao controle (variando a taxa de eficiência de plaqueamento de 4,84% para 8,28%) (Quadro 21).

Em *P7LacI*, os plaqueamento das transfecções feitas com a construção “sense” de *env*, na presença de IPTG, resultaram numa grande redução do número de colônias em comparação ao controle (reduzindo de 43,9% para 19,9% a eficiência de plaqueamento).

Estes ensaios com as construções “sense”, por terem sido feitos com um “pool” heterogêneo, permitem observar redução no número de colônias crescidas na presença de indutor sem, no entanto, abolir por completo seu crescimento, o que mimetizaria o efeito dramático de hidrocortisona observado nas células ST1.

Possíveis diferenças na eficiência de transfecção e seleção nos “pools” e na expressão a partir de cada construção podem não permitir a comparação imediata entre transfectantes de séries de plaqueamentos diferentes ou contendo cDNAs diferentes.

Metalotioneína 1 "sense"



Metalotioneína 1 "antisense"

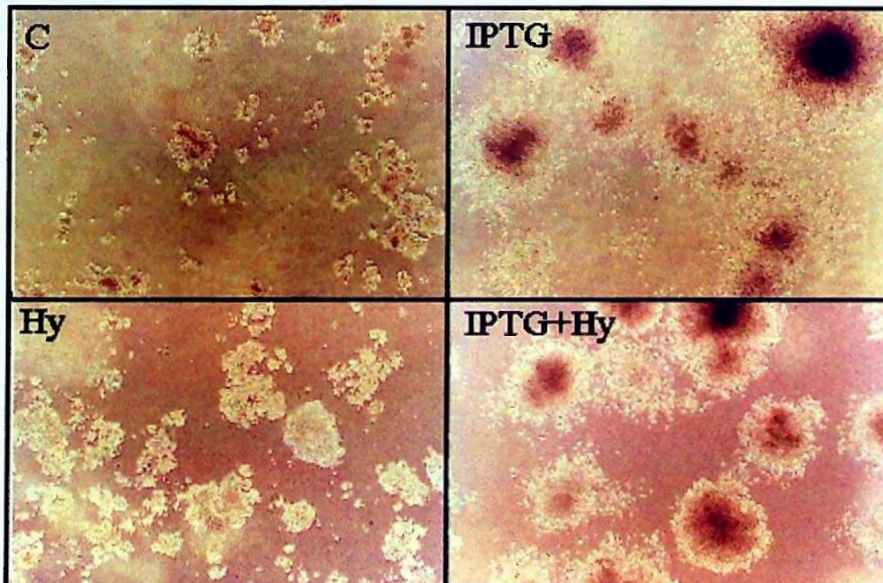
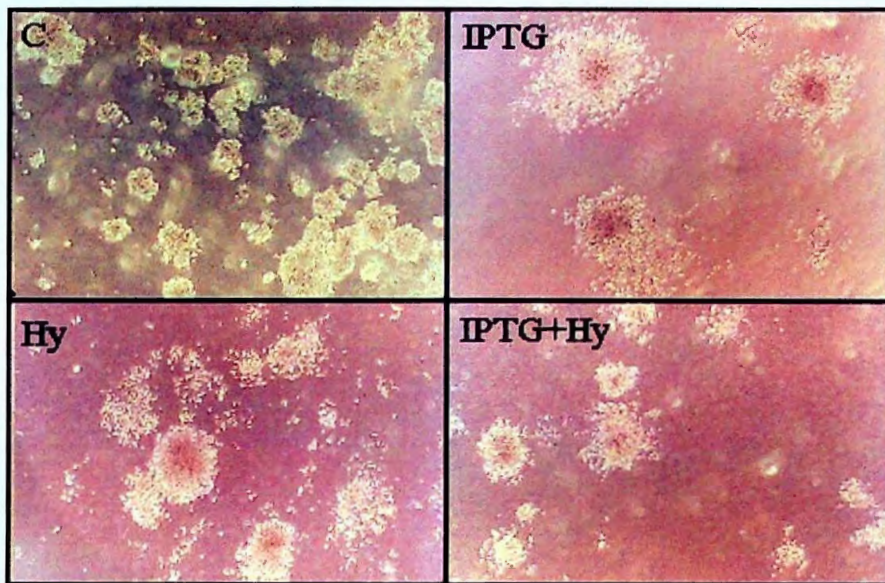


Figura 26 - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfetadas com construções de Metalotioneína 1.

Ensaio de suspensão de agarose para triagem funcional de clones de células *P7LacI* transfetadas com construções "sense" e "antisense" de Metalotioneína 1 em pOPRSVI.

Metalotioneína 2 "sense"



Metalotioneína 2 "antisense"

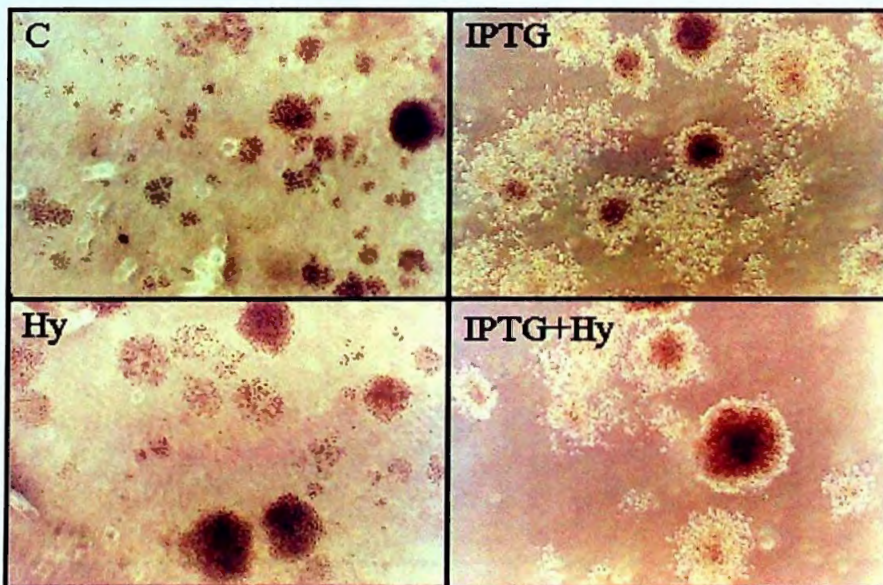
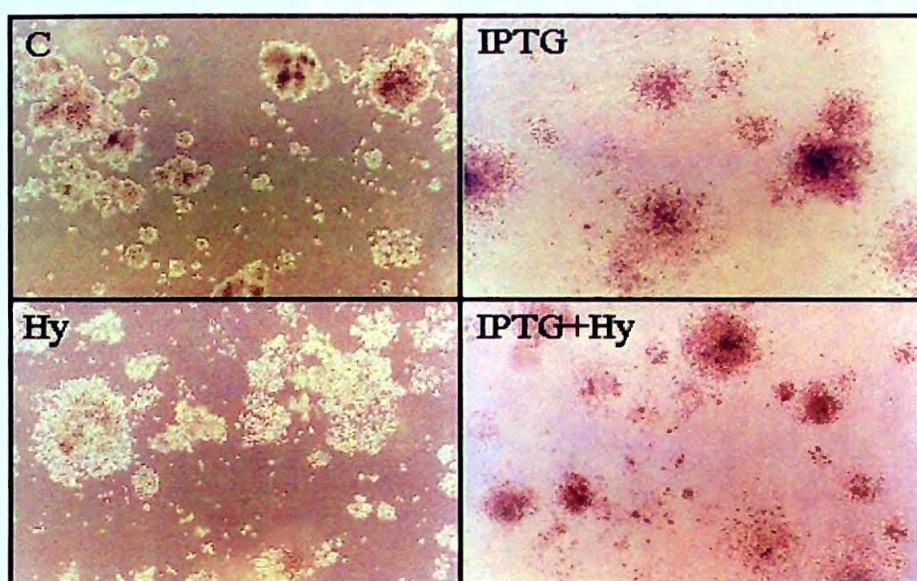


Figura 27 - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfetadas com construções de Metalotioneína 2.

Ensaio de suspensão de agarose para triagem funcional de clones de células *P7LacI* transfetadas com construções "sense" e "antisense" de Metalotioneína 2 em pOPRSVI.

Glicoproteína alfa-1-ácida "sense"



Glicoproteína alfa-1-ácida "antisense"

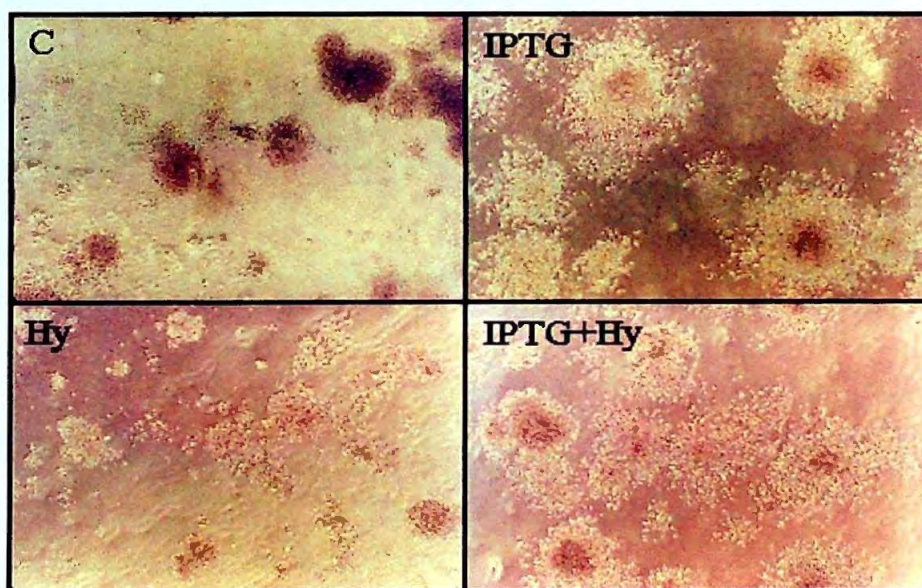
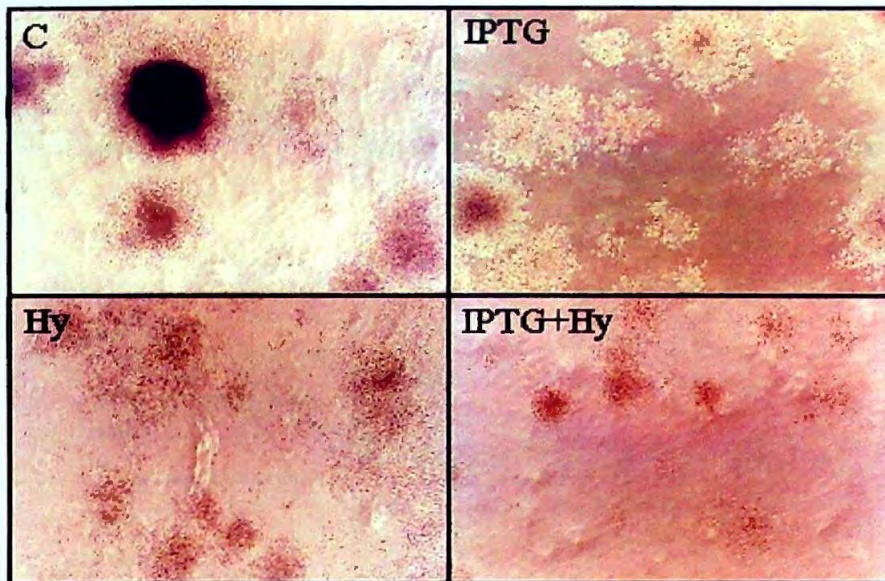


Figura 28 - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfectadas com construções de Glicoproteína α -1-ácida.

Ensaio de suspensão de agarose para triagem funcional de clones de células *P7LacI* transfectadas com construções "sense" e "antisense" da Glicoproteína α -1-ácida em pOPRSVI.

env "sense"



env "antisense"

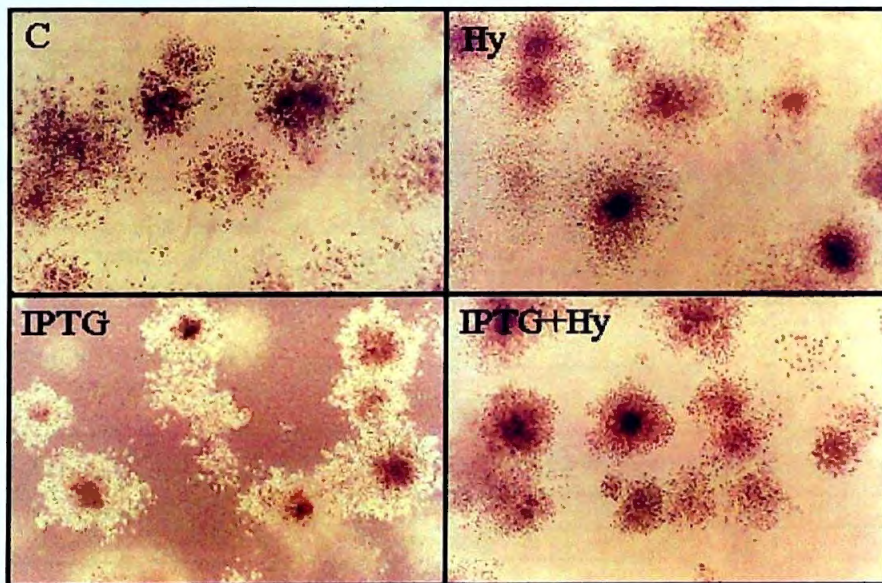


Figura 29 - Crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfectadas com construções de *env*.

Ensaio de suspensão de agarose para triagem funcional de clones de células *P7LacI* transfectadas com construções "sense" e "antisense" de *env* em pOPRSVI.

Quadro 21 - Ensaio de crescimento em suspensão de agarose de células *P7LacI* transfectadas com construções “sense” e “antisense” em pOPRSVI.

Crescimento em suspensão em agarose do pool De células <i>P7LacI</i> transfectadas com construções em pOPRSVI			
Controle	Tratamento	No. de colônias	Eficiência de plaqueamento (%)
<i>P7LacI</i>	Controle	1574	31,48
	Hy	1455	29,10
	IPTG	1611	32,22
	Hy + IPTG	1508	30,16
Construção	Tratamento	No. de colônias	
Mt1 “sense”	Controle	927	18,54
	Hy	909	18,18
	IPTG	423	8,46
	Hy + IPTG	289	5,78
Mt1 “antisense”	Controle	397	7,94
	Hy	377	7,54
	IPTG	423	8,46
	Hy + IPTG	539	10,78
Mt2 “sense”	Controle	316	6,32
	Hy	354	7,08
	IPTG	803	16,06
	Hy + IPTG	541	10,82
Mt2 “antisense”	Controle	1206	24,18
	Hy	1087	21,74
	IPTG	1311	26,22
	Hy + IPTG	468	9,36
Glicoproteína alfa-1-ácida “sense”	Controle	242	4,84
	Hy	287	5,74
	IPTG	414	8,28
	Hy + IPTG	354	7,08
Glicoproteína alfa-1-ácida “antisense”	Controle	2262	45,24
	Hy	1353	27,06
	IPTG	962	19,24
	Hy + IPTG	608	12,16
env “sense”	Controle	2197	43,94
	Hy	865	17,30
	IPTG	995	19,90
	Hy + IPTG	1159	23,18
env “antisense”	Controle	1676	33,52
	Hy	954	19,08
	IPTG	1265	25,30
	Hy + IPTG	1406	28,12

Nota: Para a análise de significância estatística, foram tomados como base a média e o desvio padrão das eficiências de plaqueamento determinadas para as células parentais *P7LacI*. Alterações de eficiência de plaqueamento maiores que 2,78% são significativas com 95% de intervalo de confiança.

4.11.1. Isolamento de clones na Triagem funcional

As colônias derivadas das transfecções de construções “antisense” em *ST1LacI* plaqueadas em agarose, na presença simultânea de IPTG e hidrocortisona, foram isoladas da agarose e expandidas em cultura

Foram retiradas até 12 colônias derivadas de cada plaqueamento/transfecção. Os clones celulares isolados a partir dos plaqueamentos de transfecções de *env* não puderam ser expandidos, pois as células das colônias retiradas não cresceram em cultura, mostrando-se inviáveis.

Os clones estabelecidos a partir das colônias resultantes das transfecções feitas com as construções de glicoproteína α -1-ácida e metalotioneínas foram caracterizados em ELISA imunocitoquímico e em novo ensaio de crescimento em suspensão de agarose (na ausência e presença de indutor e/ou hidrocortisona).

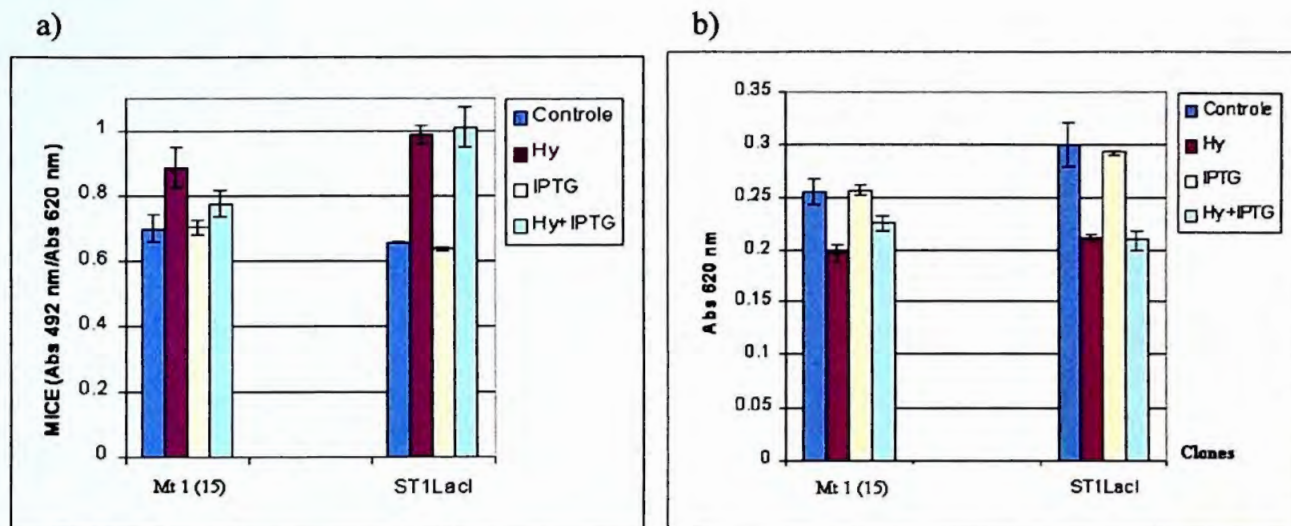
Nesta caracterização, procurou-se verificar se, entre os clones, os níveis de expressão basal e induzida por hidrocortisona eram semelhantes aos observados na linhagem parental *ST1LacI*. Destes clones, foram ensaiados em agarose, aqueles nos quais a adição de IPTG provocou queda da expressão induzida por hidrocortisona, comparando-se expressão na presença de hidrocortisona *versus* hidrocortisona e IPTG.

Desta maneira foi possível isolar clones celulares contendo construções “antisense” verdadeiramente induzíveis por IPTG. Ao mesmo tempo foi comprovada, por “perda de função”, a necessidade da expressão de cada gene no fenótipo observado no ensaio biológico.

No caso da transfecção com construções “antisense” de metalotioneína 1, foram isoladas 12 colônias dentre as 64 crescidas no plaqueamento contendo IPTG e hidrocortisona. Destes clones, 2 mostraram-se bem regulados por IPTG, produzindo colônias na presença de hidrocortisona apenas quando IPTG foi também adicionado. A pequena proporção de clones bem regulados aparece evidente no Quadro 20. Na presença de hidrocortisona 71 clones foram capazes de crescer, o que evidencia o “vazamento” de expressão deste transcrito “antisense”. Como na presença de hidrocortisona e IPTG o número de clones crescidos foi menor (64 colônias), o isolamento de 2 clones regulados nem seria esperado. Um destes clones está mostrado na Figura 30, e os níveis de expressão de metalotioneína correspondentes a cada tratamento estão mostrados no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Expressão de metalotioneínas e densidade celular em um clone de células *ST1LacI* contendo construção “antisense” induzível de Metalotioneína 1 em pOPRSVI (clone 15), selecionado na triagem funcional. Os níveis de expressão estão comparados com os das células parentais *ST1LacI*.

(a) Expressão relativa (MICE) de Metalotioneínas e (b) Densidade celular (Coomassie).



Para as construções “antisense” de metalotioneína 2, das 55 colônias celulares crescidas no plaqueamento contendo IPTG e hidrocortisona (Quadro 20), também 12 foram isoladas. Destes, 1 clone regulado foi selecionado (clone 35) em ELISA imunocitoquímico por (Gráfico 8). Em novos experimentos de crescimento em suspensão em agarose, este clone também conseguiu formar colônias na presença de hidrocortisona apenas quando IPTG foi também adicionado (Figura 31).

Das 139 crescidas no plaqueamento contendo IPTG e hidrocortisona no ensaio funcional (Quadro 20), novamente 12 colônias foram isoladas também no caso da transfecção com construções “antisense” de glicoproteína α -1-ácida. Destes clones, 2 mostraram-se bem regulados por IPTG, produzindo colônias na presença simultânea de hidrocortisona e IPTG. Um destes clones está mostrado na Figura 32, e os níveis de expressão de glicoproteína α -1-ácida correspondentes a cada tratamento estão mostrados no Gráfico 9.

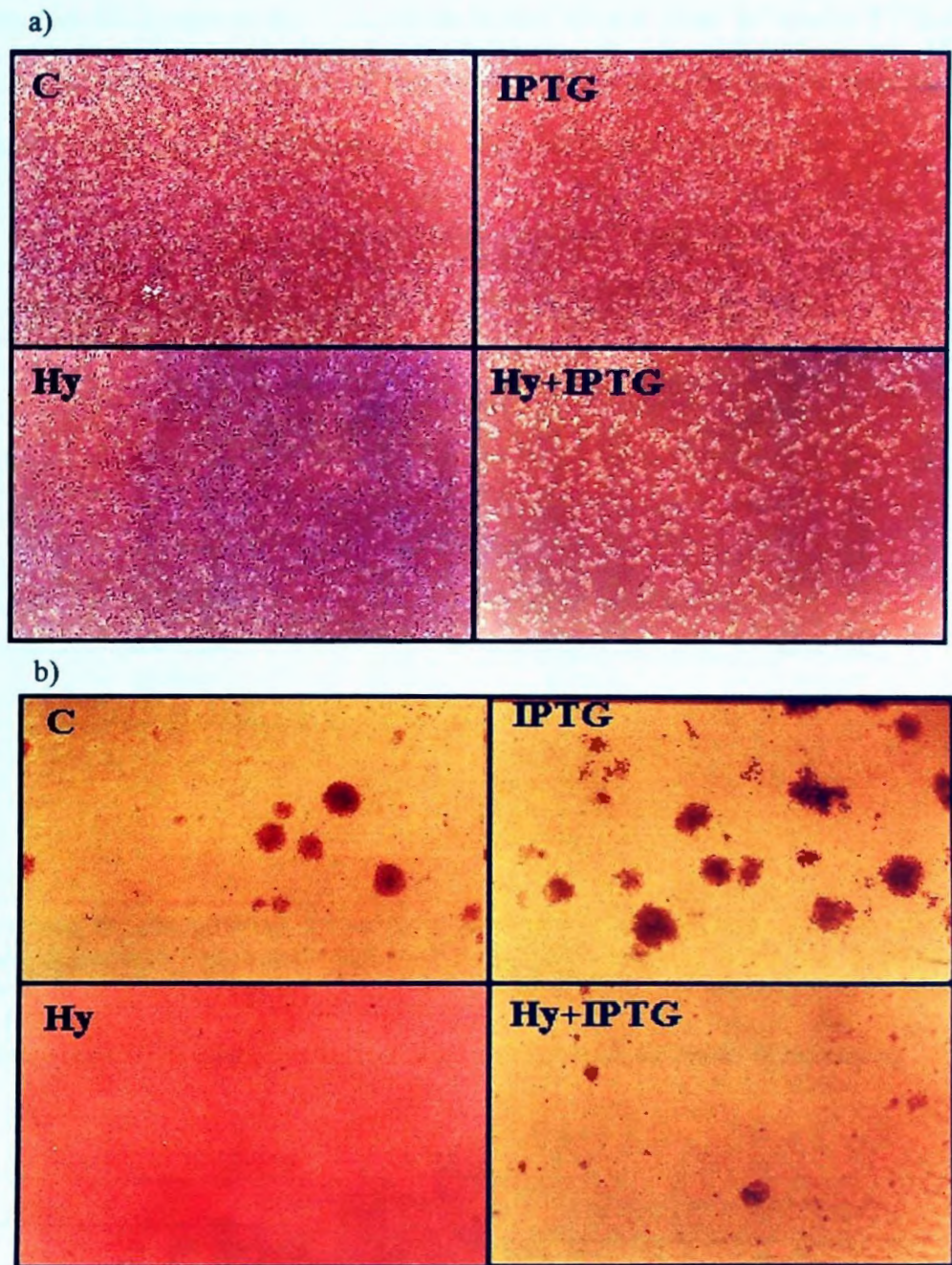


Figura 30 - Crescimento de um clone de células *ST1LacI*, selecionado na triagem funcional, contendo construção “antisense” induzível de Metalotioneína 1 em pOPRSVI (clone 15). (a) Morfologia das células crescidas sobre substrato sólido (48 horas) e (b) crescimento em suspensão de agarose (20 dias) sob diferentes condições: Não tratadas (C); hidrocortisona 100 ng/mL (Hy); IPTG 5 mM (IPTG); hidrocortisona 100 ng/mL + IPTG 5 mM (Hy+IPTG).

Gráfico 8 - Expressão de metalotioneínas e densidade celular em um clone de células *ST1LacI* contendo construção “antisense” induzível de Metalotioneína 2 em pOPRSVI (clone 35), selecionado na triagem funcional. Os níveis de expressão estão comparados com os das células parentais *ST1LacI*.

(a) Expressão relativa (MICE) de Metalotioneínas e (b) Densidade celular (Coomassie).

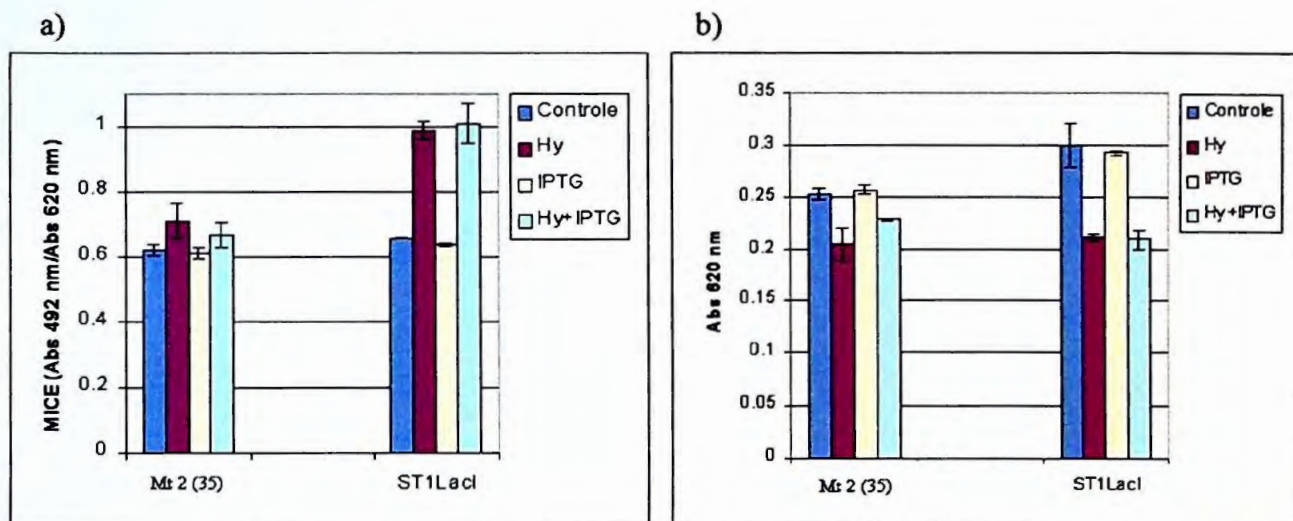
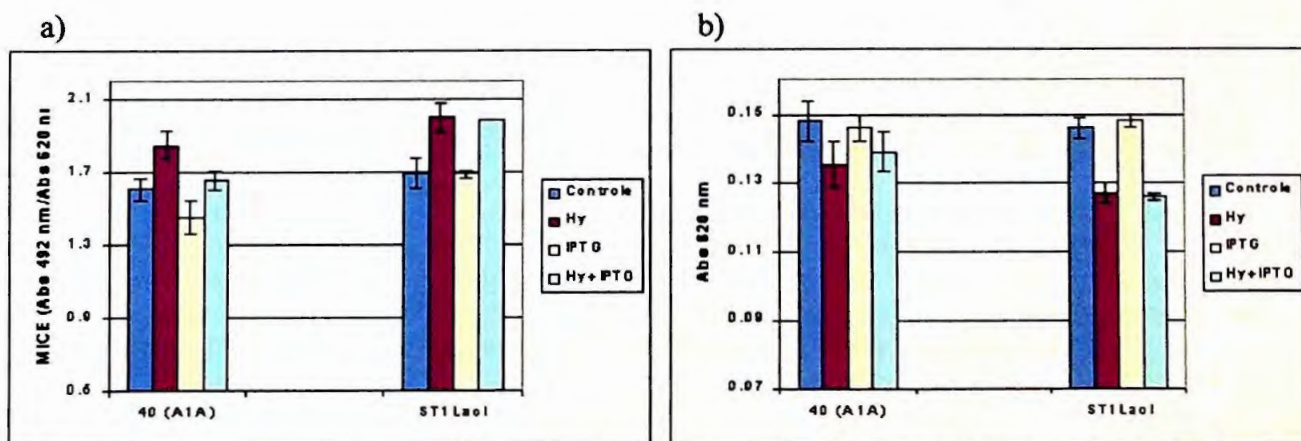


Gráfico 9 - Expressão de glicoproteína α -1-ácida e densidade celular em um clone de células *ST1LacI* contendo construção “antisense” induzível de glicoproteína α -1-ácida em pOPRSVI (clone 48), selecionado na triagem funcional. Os níveis de expressão estão comparados com os das células parentais *ST1LacI*.

(a) Expressão relativa (MICE) de glicoproteína α -1-ácida e (b) Densidade celular (Coomassie).



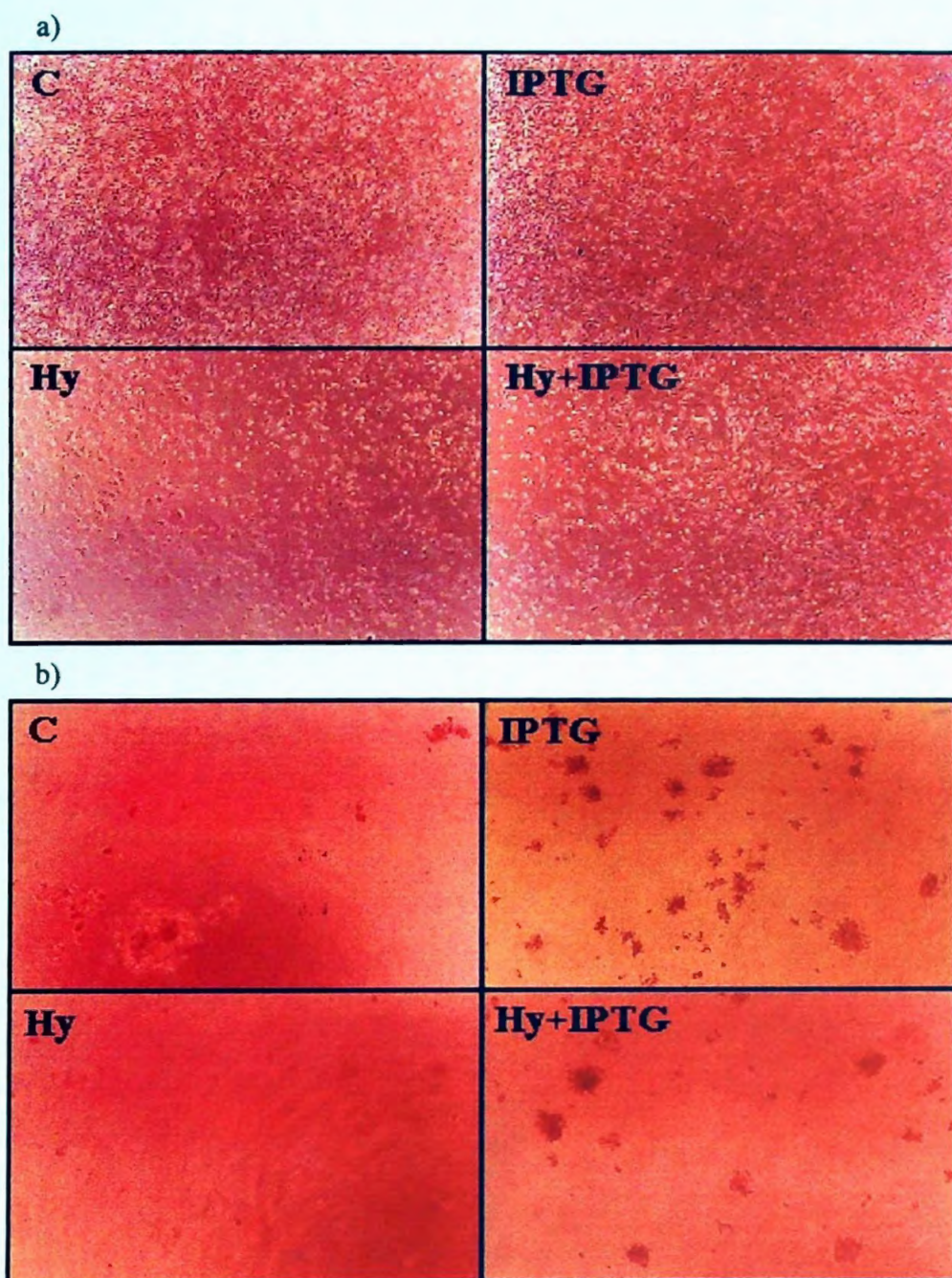


Figura 31 - Crescimento de um clone de células *ST1Lacl*, selecionado na triagem funcional, contendo construção “antisense” induzível de Metalotioneína 2 em pOPRSVI (clone 35). (a) Morfologia das células crescidas sobre substrato sólido (48 horas) e (b) crescimento em suspensão de agarose (20 dias) sob diferentes condições: Não tratadas (C); hidrocortisona 100 ng/mL (Hy); IPTG 5 mM (IPTG); hidrocortisona 100 ng/mL + IPTG 5 mM (Hy+IPTG).

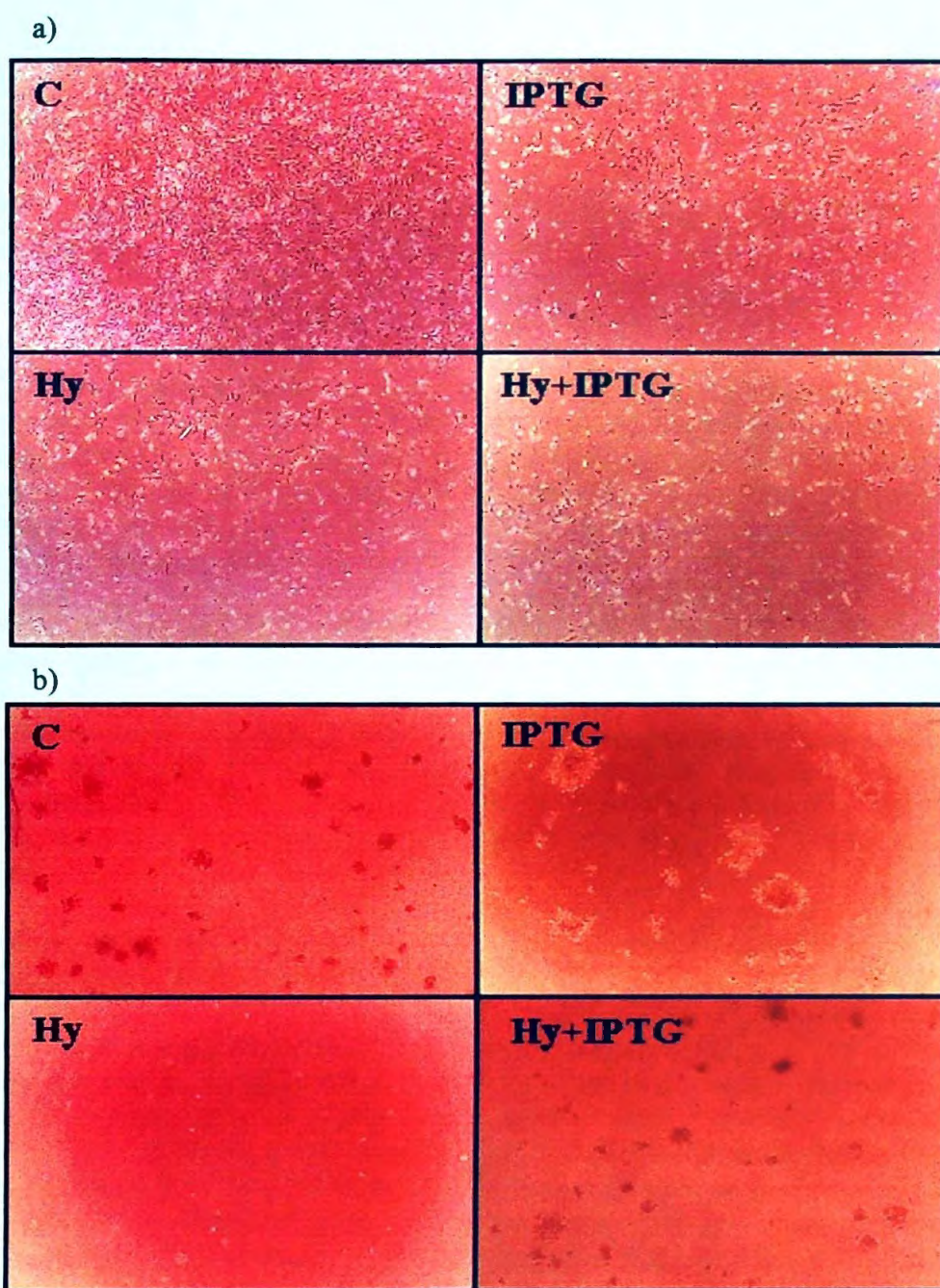


Figura 32 - Crescimento de um clone de células ST1Lacl, selecionado na triagem funcional, contendo construção “antisense” induzível de glicoproteína α -1-ácida em pOPRSVI (clone 48). (a) Morfologia das células crescidas sobre substrato sólido (48 horas) e (b) crescimento em suspensão de agarose (20 dias) sob diferentes condições: Não tratadas (C); hidrocortisona 100 ng/mL (Hy); IPTG 5 mM (IPTG); hidrocortisona 100 ng/mL + IPTG 5 mM (Hy+IPTG).

6. Discussão

6.1. Isolamento de genes diferencialmente expressos durante a transformação maligna

A identificação de genes ou de conjuntos de genes associados à manifestação do fenótipo tumoral é de grande interesse científico e clínico, pois permite refinar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação, controle da divisão celular, transformação maligna e oncogênese. Seqüências ou produtos de genes assim identificados podem ser empregados como marcadores (servindo para diagnóstico e acompanhamento da progressão e tratamento da doença), ou como alvos para terapia (estimulando ou reprimindo-se artificialmente sua expressão).

Genes diferencialmente expressos podem ser isolados pela comparação entre perfis de expressão gênica, obtidos em duas situações distintas como, por exemplo, células tumorais *versus* células normais (ou submetidas a tratamento indutor de proliferação celular, apoptose, diferenciação, quiescência, etc.). Métodos empregados para esta análise incluem hibridização diferencial, hibridização subtrativa, “differential display”, “Serial Analysis of Gene Expression” – SAGE, “Representative Differential Analysis” – RDA, subtração por PCR supressivo e “microarrays” de oligos ou de cDNAs (revisto por VEDOY *et al.*, 1999).

Para identificar genes expressos durante a reversão fenotípica tumoral-normal, induzida por glicocorticóides em células ST1, inicialmente foi empregada a hibridização diferencial de uma biblioteca de cDNA construída a partir de células ST1 tratadas com hidrocortisona, contra duas populações de cDNAs marcados radioativamente, provenientes de células ST1 não tratadas e tratadas com o hormônio. Esta metodologia permitiu o isolamento de quatro cDNAs distintos, confirmados como diferencialmente expressos através de “Northern-blot”. A identidade dos genes correspondentes foi determinada por seqüenciamento da extremidade 3’ de cada clone. A baixa expressão das metalotioneínas 1 e 2 e a total ausência de expressão de glicoproteína α -1-ácida e de *env* observada em “Northern-blots” nas células P7 (fenotipicamente não responsiva a glicocorticóides), fazia supor que estes genes pudessem estar envolvidos no controle da proliferação das células ST1 (VALENTINI, 1993; VALENTINI e ARMELIN, 1996).

O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel destes genes na reversão fenotípica de células ST1, através de um enfoque funcional.

6.2. Análise funcional de genes relacionados a transformação e proliferação celular

O papel de produtos gênicos *in vitro* (em células em cultura) ou *in vivo* (em organismos completos como, por exemplo, camundongos) pode ser determinado em experimentos de: a) “ganho de função”, através da super-expressão transitória ou estável, em animais transgênicos ou suas células ou ainda por microinjeção de DNA ou proteínas; b) “perda de função”, através do uso de oligonucleotídeos ou construções com cDNAs “antisense”, ribozimas, microinjeção de anticorpos, oligos “antigene” e em animais “knock-out” ou suas células (revisto em FLATSCHART e SOGAYAR, 1999).

A super-expressão é uma ferramenta poderosa para o estudo de genes associados com ciclo celular, proliferação e oncogênese. Por outro lado, a super-expressão constitutiva de genes supressores de tumor ou de “antisense” contra genes relacionados a proliferação, pode representar uma desvantagem seletiva (ROZNITZKY *et al.*, 1994). Sistemas de expressão induzíveis permitem contornar este problema, pois oferecem a possibilidade de controlar a expressão, o que pode ser importante no caso de construções cuja expressão descontrolada seja prejudicial ao isolamento ou à manutenção estável de linhagens celulares (GUTHRIDGE *et al.*, 1997). O estímulo externo para induzir a expressão, pode ser fornecido apenas no momento desejado para a execução do ensaio. Por fim, a mesma linhagem celular, não induzida, deve constituir o melhor controle negativo do efeito que se pretende observar.

6.3. Elaboração de construções induzíveis para análise funcional de genes envolvidos na reversão fenotípica de células ST1

Antes da elaboração de construções para expressão “sense” e “antisense” dos genes em questão, os insertos dos plasmídeos C27, C36, C41 e CV2 foram seqüenciados para verificação da integridade dos cDNAs. Verificou-se que os clones C27 e C41 continham os cDNAs completos de Metalotioneína 1 e 2, respectivamente. Por outro lado, os clones C36 e CV2 revelaram seqüências incompletas de glicoproteína α -1-ácida e *env*.

Os cDNAs correspondentes às duas metalotioneínas, por estarem completos, foram os primeiros a serem subclonados. De início, tentou-se removê-los do vetor original, através de enzimas de restrição, para ligá-los aos vetores de expressão, através de adaptadores, sem sucesso. Seguiu-se a amplificação dos insertos por PCR com “primers” de seqüenciamento e de síntese direcional de cDNA. O produto foi clonado em um vetor intermediário (pUC18), seqüenciado e subclonado nos vetores de expressão.

Para a obtenção dos cDNAs correspondentes à glicoproteína α -1-ácida e *env*, inicialmente tentou-se a triagem (“screening”) da biblioteca de cDNA que deu origem aos

clones isolados por hibridização diferencial (VALENTINI, 1993). Após análise por PCR das placas de lise, não foram encontrados insertos com os tamanhos previstos para os cDNAs completos entre os clones detectados através de hibridização com oligos ou fragmentos de cDNA marcados. PCRs feitos com alíquotas da biblioteca também não mostraram, na distribuição de segmentos amplificados, tamanhos compatíveis com aqueles previstos para os cDNAs completos. Procurou-se, então sintetizar os cDNAs, através de RT-PCR, partindo de mRNA de células ST1 tratadas com hidrocortisona. Para a glicoproteína α -1-ácida foram empregados oligos projetados a partir da seqüência do cDNA correspondente disponível no GenBank. Para *env*, o oligo 3' foi desenhado a partir da seqüência 3', determinada no clone CV2, enquanto o oligo 5' foi deduzido a partir de seqüências assemelhadas. Os cDNAs completos obtidos foram subclonados nos vetores de expressão.

6.4. Análise funcional de genes envolvidos na reversão fenotípica de células ST1 através de oligonucleotídeos “antisense”

Paralelamente às etapas de clonagem destes cDNAs, foram realizados ensaios com oligonucleotídeos “antisense” para procurar inibir os efeitos morfológico e de crescimento observados em culturas de células ST1 tratadas com hidrocortisona.

Oligos contra metalotioneínas e glicoproteína α -1-ácida foram projetados, a partir das seqüências disponíveis em bancos de dados (coincidentes com as seqüências determinadas), com auxílio do programa Oligo V3.0. Foram considerados parâmetros como a estabilidade do oligo com a seqüência-alvo (T_m e ΔG), ausência de “loops” internos, de auto-pareamento (“self-annealing”) e de pareamento com os outros oligos, em ensaios de transfecção múltipla. Para metalotioneína 2, estes parâmetros não puderam ser satisfeitos. Oligos para *env* não foram projetados por falta de informações disponíveis, nesta ocasião, sobre sua seqüência 5'.

Os oligos contra metalotioneína 1 e glicoproteína α -1-ácida foram sintetizados com dois tipos de modificações: a) ligações fosforotioato entre os nucleotídeos, que os torna mais resistentes à ação de nucleases que as ligações fosfodiéster naturais e b) adição de grupos propinil no carbono 5 das bases pirimídicas, que torna mais estável a interação do oligo com o mRNA-alvo (WAGNER, 1994).

Lipofectin foi empregada inicialmente para introduzir estes oligos nas células ST1, mas o composto Cytfectin, descrito como mais eficiente para esta finalidade (LEWIS *et al.*, 1996) também foi testado. Apesar dos cuidados no projeto, das modificações de síntese nos oligos e dos diferentes lípidos empregados para a transfecção, o uso dos oligos não permitiu restaurar, nas células tratadas com hidrocortisona, o aspecto transformado das células não tratadas.

Em ensaios de incorporação de timidina tritiada em DNA, células ST1 tratadas com hidrocortisona e transfectadas com oligos e Lipofectin mostraram ligeiro aumento de incorporação, previsto no caso de os genes inativados terem papel de inibição da proliferação (Gráfico 2b, metalotioneína >150 nM; α -1-ácida >150 nM). Entretanto o mesmo aumento de incorporação foi observado nas células transfectadas com o oligo “sense” controle (glicoproteína α -1-ácida), sugerindo que qualquer efeito decorrente dos oligos tenha sido inespecífico.

A transfecção de um dos oligos marcado com fluoresceína, mostrou a internalização nas células com sucesso e confirmou a sua permanência no interior destas por mais de 36 h, como relatado em www.idtdna.com/html/tech/Thioate.htm. Entretanto, a inibição das proteínas não pôde ser confirmada através de imunofluorescência com os anticorpos disponíveis na ocasião.

6.5. Análise funcional de genes envolvidos na reversão fenotípica de células ST1 através de construções induzíveis

Para verificar a função dos genes através de expressão ectópica ou inibição de transcritos endógenos, foram estabelecidas linhagens celulares estáveis, contendo construções induzíveis dos cDNA nas orientações “sense” e “antisense”. Estas construções foram feitas em vetores plasmídeos do sistema LacSwitch, que foi escolhido por permitir a indução através da adição de IPTG, um composto não metabolizável e que, portanto, não deve induzir efeitos pleiotrópicos nas células ST1 e P7 em cultura (WYBORSKY e SHORT, 1991).

Para o emprego deste sistema, inicialmente devem ser estabelecidas linhagens celulares expressando, de maneira constitutiva, o repressor *LacI*, a partir do promotor IE1 de hCMV. O gene de interesse é clonado em outro vetor, sob o controle do LTR do Vírus do Sarcoma de Rous, mas separado deste por sítios operadores. Em linhagens transfectantes duplas (expressando o repressor *LacI* e contendo o cDNA de interesse), o repressor recém produzido é dirigido ao núcleo e liga-se às seqüências operadoras, bloqueando o acesso de parte do aparato transcricional e impedindo a transcrição do cDNA clonado. A adição de IPTG e sua conseqüente ligação ao repressor, permite titulá-lo, liberando a transcrição de maneira dose-dependente.

Linhagens de células ST1 e P7 expressando o repressor foram isoladas e submetidas a triagem, através de “dot-blot” de RNA total, contra uma sonda de fragmento de DNA do repressor. As linhagens selecionadas, chamadas *ST1LacI* e *P7LacI*, conservaram a responsividade a hidrocortisona das células parentais, quando observados morfologia sobre substrato sólido e crescimento em suspensão de agarose.

Construções contendo os cDNAs “sense” e “antisense”, nos plasmídeos pOPI3 e pOPRSVI, foram transfectadas nas linhagens *ST1LacI* e *P7LacI*. Os clones celulares

resultantes foram submetidos a triagem, com sondas correspondentes a cada cDNA através de “dot-blots” de RNA extraído com Trizol, o que permitiu o manuseio de um grande número de linhagens celulares, cultivadas na presença e na ausência de IPTG. De 12 clones celulares analisados para *ST1LacI* e *P7LacI* transfectadas com cada uma das 8 construções, foi possível isolar 1 ou, no máximo, 2 clones celulares regulados de maneira adequada, enquanto nos clones restantes foi observada toda a gama de variações possível: expressão constitutiva, ausência de expressão e repressão por IPTG. Mesmo em clones corretamente regulados, os níveis de indução obtidos não foram altos, observando-se, também, expressão basal elevada (“vazamento” ou “escape” de expressão).

Na presença e na ausência de hidrocortisona ou IPTG, culturas sobre substrato sólido dos melhores clones isolados, mostraram algumas diferenças morfológicas em relação ao observado nas linhagens parentais. Clones “sense” de metalotioneína 1 e 2 na presença de IPTG exibiram leve achatamento e crescimento ligeiramente mais organizado, porém não de maneira tão intensa quanto aquela observada na presença de hidrocortisona, situação na qual as células mostram aspecto semelhante ao de fibroblastos. A confluência das culturas na presença de IPTG, porém foi atingida ao mesmo tempo que na condição controle, sem mostrar a parada de crescimento provocada por hidrocortisona. A indução com IPTG, em células contendo construções “antisense”, não provocou mudanças morfológicas notáveis nem aboliu o efeito de hidrocortisona em culturas.

As ligeiras alterações de fenótipo observadas em substrato sólido não foram acompanhadas de alterações na resposta a hidrocortisona em ensaios de crescimento em suspensão de agarose.

A pequena proporção de clones apresentando regulação adequada, os níveis baixos de expressão e o comportamento dos clones nos ensaios de crescimento em suspensão de agarose, levaram-nos a testar outro sistema induzível, baseado em uma proteína de fusão da proteína repressora mutante rTetR do transposon Tn10 com a proteína transativadora VP16 do vírus herpes simplex humano. O emprego de sistemas baseados neste ativador transcricional é bastante difundido, sendo muito frequentes na literatura descrições de seu emprego.

Para facilitar a triagem em larga escala de clones celulares, foi empregada uma metodologia de análise da expressão de proteínas, através de imunoensaio *in-situ*, nas células crescidas em micropalacas (MICE - de la MONTE *et al.*, 1999). O mesmo ensaio permitiu acompanhar variações de densidade celular decorrentes dos diferentes tratamentos.

Células ST1 infectadas com retrovírus contendo construções de cDNAs “sense” e “antisense” foram selecionadas, sendo os clones resultantes submetidos a triagem por MICE, após tratamento e/ou indução. Desta vez, 24 clones contendo cada construção foram analisados.

Nas triagens através de MICE, a expressão de proteína e a densidade celular em cada condição de cultura (na ausência ou na presença de hidrocortisona e/ou indutor) permitiu observar que a expressão induzida de cada uma das proteínas foi acompanhada de menor densidade celular, no caso dos clones “sense”, para todas as construções. Para os

clones “antisense”, a inibição da expressão foi acompanhada de ligeiro aumento na densidade celular para as metalotioneínas apenas. Entretanto, ao serem analisados quanto a alterações no crescimento em suspensão de agarose, novamente os clones mais responsivos na triagem não mostraram alterações de fenótipo, em relação ao observado nas linhagens parentais ST1 e P7. Assim, a expressão a partir das construções “sense” não mimetizou a ação de hidrocortisona e a expressão das construções “antisense” não foi capaz de neutralizar o efeito de hidrocortisona em nenhum dos clones celulares.

6.6. Triagem funcional

A estratégia de análise de clones individuais foi reconsiderada após as várias tentativas infrutíferas de isolar, triar clones e identificar, depois, alterações quanto à clonogenicidade na presença de hidrocortisona. Apesar de ter sido possível identificar clones celulares com expressão induzível das proteínas de interesse, os níveis de indução foram, quase invariavelmente, menores que aqueles obtidos na presença de hidrocortisona, sendo sempre observada alguma expressão basal. Entre os diversos clones submetidos à triagem, foi observada alguma variabilidade na densidade celular entre clones, sem que fosse verificada a correspondente diferença na expressão.

Assim, ao invés de analisar cada clone isolado quanto a sua inducibilidade para, a seguir, verificar seu fenótipo, passou-se a selecionar, na população transfectada, clones exibindo fenótipos aberrantes do restante da população para, em seguida, individualizá-los e analisar a expressão da proteína correspondente, nas condições de tratamento e/ou indução.

Na análise das populações de células ST1 e P7 transfectadas, procurou-se observar as possíveis alterações de eficiência de plaqueamento em suspensão de agarose em cada uma das condições testadas (na ausência ou na presença de hidrocortisona e/ou indutor).

No caso de construções “sense”, a expressão das metalotioneínas e de *env* correlacionam com ligeira diminuição na eficiência de plaqueamento, o que permite supor algum envolvimento destas proteínas no controle da proliferação celular.

Resultados ainda mais dramáticos foram obtidos na análise da eficiência de plaqueamento das populações de células ST1 transfectadas com construções “antisense”. No plaqueamento destas transfecções em agarose, surgiram colônias capazes de crescer na presença de hidrocortisona. Foram observadas colônias nos plaqueamentos correspondentes aos quatro cDNAs “antisense”, sendo estas mais frequentes nos plaqueamentos da glicoproteína α -1-ácida, seguida de metalotioneína 2, metalotioneína 1 e, por fim, de *env*.

Clones isolados a partir das colônias que cresceram na presença de hidrocortisona e indutor foram analisados por MICE. Os clones nos quais o cDNA foi induzido por IPTG, foram submetidos, novamente, a ensaios de crescimento em suspensão de agarose e

plaqueados sobre substrato sólido, na presença e na ausência de hidrocortisona e/ou indutor. Os clones com maior indução (baixa expressão basal e alta expressão na presença de IPTG) mostraram, no ensaio em suspensão, inibição da reversão causada por hidrocortisona. Este resultado é compatível com a possibilidade de envolvimento das metalotioneínas e da glicoproteína α -1-ácida no processo de reversão fenotípica tumoral-normal das células ST1. Com a inibição da expressão destas proteínas pode ser anulado o efeito da hidrocortisona.

Infelizmente, não foi possível expandir clones derivados da transfecção com construções contendo o cDNA “antisense” de *env*.

6.7. Significado dos genes em estudo na proliferação de tumores

6.7.1. Metalotioneínas

O zinco é um elemento-traço essencial, sendo depois do ferro, o metal de transição mais abundante em sistemas biológicos. Íons zinco foram identificados como constituintes estruturais ou catalíticos de diversas proteínas, enzimas e fatores de transcrição. As metalotioneínas, que compõe a principal classe de proteínas intracelulares que se ligam a zinco, são proteínas de baixo peso molecular (~6 a 7 kDa – 64 a 68 resíduos de aminoácidos), ricas em cisteína (18 a 20 resíduos), que são capazes de ligar íons de metais de transição essenciais como zinco e cobre ou tóxicos como cádmio e mercúrio, entre outros. A ligação com íons metálicos ocorre através das cisteínas, organizadas em motivos Cys – Cys e Cys – Xxx – Cys. Estes motivos estão distribuídos em dois domínios globulares, formando “clusters” metal-tiolato, cuja estrutura é evolutivamente conservada (KÄGI, 1991) de leveduras a mamíferos e invertebrados, mesmo na ausência de homologia de seqüência de aminoácidos. Em vertebrados, as metalotioneínas são encontradas em pelo menos duas isoformas distintas, chamadas MT-1 a MT-4. Nos mamíferos, as isoformas 1 e 2 ocorrem em vários órgãos, enquanto a isoforma 3 é encontrada exclusivamente no cérebro e a 4 apenas em certos tecidos estratificados (VAŠÁK e HASLER, 2000).

Apesar da ampla distribuição nos tecidos e da marcante persistência evolutiva das metalotioneínas, várias décadas de pesquisa após sua descoberta (KÄGI e VALLEE, 1960 *apud* NORDBERG, 1998) ainda não permitiram definir sua função biológica com precisão. Experimentos recentes com camundongos transgênicos superexpressando MT-1 ou “knock-outs” para MT-1 e MT-2, mostraram pouco além do que já se conhecia ou indicaram apenas evidências de novas funções. Camundongos superexpressando MT-1 exibem fenótipo aparentemente normal, apesar de resistirem melhor a lesões decorrentes de isquemia e re-perfusão do coração (KANG *et al.*, 1999) e do cérebro (CAMPAGNE *et al.*, 1999), possivelmente por serem menos sensíveis à toxicidade por zinco livre e radicais livres que acompanham estas lesões.

Camundongos “knock-out”, também aparentando fenótipo normal (MICHALSKA e CHOO, 1993), exibem maior sensibilidade à intoxicação por cádmio (MASTERS *et al.*, 1994) e ao estresse oxidativo (SATO *et al.*, 1996). Estes animais são mais sensíveis à intoxicação por zinco (COYLE *et al.*, 1995; KELLY *et al.*, 1996), apesar de absorverem menor quantidade de zinco na dieta (COYLE *et al.*, 1999).

Diversos experimentos *in vitro* evidenciaram a mobilização de zinco entre metalotioneínas e proteínas dependentes de zinco, possivelmente entre mais de 200 metaloenzimas, incluindo timidina quinase, RNA polimerases e ribonucleases, com papéis fundamentais em replicação, transcrição e reparo (EBADI e SWANSON, 1988). As metalotioneínas 1 e 2 parecem funcionar como captadores e reservatórios de zinco, transferindo-o para apo-metaloproteínas recém sintetizadas (JACOB *et al.*, 1998), enquanto evitam a toxicidade pelo metal livre (SUHY *et al.*, 1999). A transferência de zinco mediada por metalotioneínas parece ser mais eficiente que a captação direta de íons livres por apo-proteínas, particularmente em compartimentos celulares nos quais o potencial redox é favorável (por exemplo, na presença de glutatona oxidada e reduzida - MARET e VALLEE, 1998).

As metalotioneínas também são capazes de modular a atividade de fatores de transcrição. Em fatores de transcrição do tipo “zinc-finger” como GRE (KOROPATNICK e de MOOR, 199x) e Tramtrack (ROESIADÍ *et al.*, 1998), metalotioneínas fornecem os íons zinco necessários à interação com o DNA. Em NF- κ B, metalotioneína liga-se à sub-unidade p50 e estabiliza a interação do dímero p65-p50 com o seu sítio de ligação no DNA (ABDEL-MAGEED e AGRAWAL, 1998). A proteína P53 também foi recentemente incluída entre os alvos de metalotioneínas para transferência de zinco, modulando sua conformação e atividade (MÉPLAN *et al.*, 2000).

Esta diversidade de alvos para a mobilização do zinco explica constatações recentes, que sugerem o envolvimento das metalotioneínas em processos tão diversos quanto proliferação, supressão de apoptose (via NF- κ B) e repressão de divisão celular.

A isoforma 3 de metalotioneína (MT-3), produzida predominantemente no cérebro, foi isolada inicialmente como uma proteína capaz de inibir o crescimento de neurônios e foi chamada Growth Inhibitory Factor – GIF (UCHIDA *et al.*, 1991). Esta função correlaciona com a expressão de metalotioneínas nas células ST1 tratadas com hidrocortisona, que também tem seu crescimento inibido.

6.7.2. Glicoproteína α -1-ácida

A glicoproteína α -1-ácida ou proteína orosomucóide é um membro do grupo das chamadas “proteínas de fase aguda”, composto por aproximadamente 30 proteínas não relacionadas bioquimicamente, cuja concentração plasmática pode ser elevada ou diminuída após estímulos inflamatórios, infecção, tumores, trauma ou estresse. Estas variações podem ser observadas em menos de 90 minutos após o estímulo, com certas

proteínas exibindo mudanças de concentração de até 1000 vezes em menos de 24 horas. As proteínas de fase aguda são sintetizadas predominantemente no fígado, sendo os hepatócitos capazes de sintetizar todo o seu espectro (IBELGAUFTS, 1999).

A chamada “resposta de fase aguda” inclui uma série de alterações, iniciadas a partir de uma inflamação local e chegando a uma resposta sistêmica. Células como macrófagos e neutrófilos, ao acumular no ponto onde ocorreu o estímulo, produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IFN- γ e TNF- α , e fatores de crescimento como TGF- β , estimulando a migração de células inflamatórias para o local, promovendo sua ativação, ativando a via de complemento, induzindo febre, alterações hormonais (incluindo elevação no cortisol), leucocitose e produção de mais citocinas. Estas citocinas alteram a produção de certas proteínas secretadas pelo fígado (inibidores de proteases, proteínas do complemento, albumina, etc). A maioria destas alterações sistêmicas tem por finalidade restaurar a homeostase do organismo, através do fornecimento de condições para compensar o estímulo agressor (JENSEN e WHITEHEAD, 1998). Os glicocorticóides tem importância particular na progressão da resposta de fase aguda pois sua síntese é influenciada por diversas citocinas e sua presença, por sua vez, também induz a secreção de citocinas. A remoção da hipófise, por exemplo, causa uma marcante diminuição na síntese de proteínas de fase aguda (IBELGAUFTS, 1999).

A expressão da glicoproteína α -1 ácida ocorre principalmente no fígado, apesar de outros tipos celulares já terem sido descritos como capazes de produzi-la. Sua expressão é fortemente estimulada por hormônios glicocorticóides, citocinas como IL-1, TNF α e IL-6 (BAUMANN e GAULDIE, 1990), fenobarbital (FOURNIER *et al.*, 1994) e metais pesados (YANGOU *et al.*, 1991).

Apesar das abundantes referências a glicoproteína α -1 ácida acumuladas desde a década de 1950, sua função até hoje permanece obscura e seu papel biológico exato ainda é desconhecido ou pelo menos não completamente entendido. Diversas funções, descritas como tendo significado fisiológico potencial, porém, indicam que esta proteína pode ser considerada como um agente imuno-modulador e anti-inflamatório (FOURNIER *et al.*, 2000).

Atualmente sabe-se que a resposta de fase aguda pode ser exercida por tipos celulares extra-hepáticos, podendo ser regulada por mediadores de inflamação da mesma maneira observada nos hepatócitos. O papel da expressão local da glicoproteína α -1 ácida expressão, porém, não é conhecido, supondo-se apenas que esta reação de fase aguda inicial, permita reduzir o dano local associado ao processo inflamatório, ou amplificar o sinal inflamatório inicial para produzir uma resposta sistêmica. (FOURNIER *et al.*, 2000).

A influência desta proteína em proliferação celular já foi descrita e mostrou-se dependente da célula-alvo e da forma de glicosilação da proteína. Em explantes de gânglios da raiz dorsal de embriões de galinha, a glicoproteína α -1 ácida e frações geradas por sua deglicosilação seqüencial, provocam a divisão de neurônios e a expansão de neuritos, sendo a fração asialo-orosomucóide a mais efetiva em promover divisão celular (LIU *et al.*, 1988). Células linfóides previamente tratadas com glicoproteína α -1 ácida, nas

concentrações observadas em pacientes com infecção aguda, deixam de ser induzidas a proliferar pela adição de mitógenos (CHERESH *et al.*, 1984), resultando em imunossupressão. As formas asialo e agalacto são capazes de inibir a resposta mitogênica de concanavalina-A e lipopolissacarídeos, em células do baço de camundongos (BENNETT e SCHMID, 1980).

O significado da expressão da glicoproteína α -1 ácida em células derivadas da glia, como a linhagem ST1 e sua progenitora C6 não é conhecido. A proteína e seu mRNA correspondente são descritos como não expressos, de maneira constitutiva ou induzível, no cérebro (KALMOVARIN *et al.*, 1991).

Por outro lado, certas células da glia são capazes de exercer funções como migração celular, fagocitose e secreção de citocinas que, em células dendríticas, monócitos macrófagos e neutrófilos, são estimuladas pela glicoproteína α -1 ácida, de maneira direta ou após secreção induzida de citocinas. Como a expressão da glicoproteína α -1 ácida pode ser regulada por corticóides (GRIMALDI *et al.*, 1989), que são conhecidos indutores de diferenciação, esta proteína poderia atuar como um intermediário entre glicocorticóides e a rede de citocinas

6.7.3. Retrovírus endógenos

A patogenia das infecções por retrovírus, muitas vezes inclui imunodeficiência, como resultado da multiplicação do vírus em células do sistema imune ou como requisito para permitir a multiplicação do vírus em outros tecidos. Nas infecções por vírus de leucemia murina, como o Friend leukemia virus (FLV), a doença é progressiva e fatal, sendo observada imunossupressão nos estágios finais da doença. O fato de FLV infectar linfócitos, contribui para a imunodeficiência (KOO *et al.*, 1971 apud BOWDEN *et al.*, 1999), uma vez que é observada queda do número de células-T e redução de suas funções, paralelamente ao aumento no número de linfócitos-s B no decorrer da doença (SIDWELL *et al.*, 1993).

Os mecanismos pelos quais alguns retrovírus exercem atividade imunossupressora permanecerem obscuros, mas a morte de células infectadas parece não ser o único fator envolvido. Evidências sugerem que o peptídeo transmembranar do envelope viral exerça parte da ação de imunossupressão. A forma como a imunidade celular é suprimida envolve a inibição da proliferação de linfócitos-T mediada por IL-1 e a inibição da secreção de IL-2 por timócitos estimulados com IL-1 (GOTTLIEB *et al.*, 1989) ou por esplenócitos estimulados por mitógenos (LOPEZ-CEPERO *et al.*, 1988). A atividade da proteína transmembrana p15E foi verificada através de ensaios empregando o vírus FLV completo, extratos de membrana rompidos (CIANCIOLO *et al.*, 1980) e peptídeos sintéticos como CKS-17 (CIANCIOLO *et al.*, 1985), cuja seqüência foi deduzida a partir de uma região de p15E conservada em retrovírus murinos, de felinos e de primatas, entre outros (HELMBERG *et al.*, 1990).

Peptídeos derivados de p15E são capazes de inibir a atividade da proteína quinase C (GOTTLIEB *et al.*, 1990) e / ou elevar os níveis intracelulares de cAMP (HARAGUCHI *et al.*, 1995c). Esta modulação pode bloquear a transdução de sinal do estímulo de IL-1, por exemplo, inibindo a produção de citocinas do tipo 1 - IL-2, IL-12, TNF- β e interferon γ , mas estimulando a produção de citocinas do tipo 2 - IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (HARAGUCHI *et al.*, 1995b).

A proteína transmembrana retroviral pode se produzir por retrovírus endógenos (HELMBERG *et al.*, 1990), expressos de maneira espontânea (COFFIN, 1984) ou induzida, por exemplo, por esteróides, vitamina D3, ácido retinóico ou citocinas (LARSSON *et al.*, 1996). Na linhagem monoblástica U-937, a produção do retrovírus endógeno humano ERV3 (HERV-R) induzida por estes agentes, é acompanhada por diferenciação (em monócito ou macrófago) e bloqueio da proliferação celular (LARSSON *et al.*, 1997) de maneira muito semelhante à observada nas células ST1 tratadas com hidrocortisona.

Expressão elevada de ERV3 também foi descrita em tecidos reprodutivos normais como placenta, vilo coriônico, testículo e epidídimo durante espermatogênese e em alguns tecidos embrionários (LARSSON *et al.*, 1994). Em biópsias de verrugas hidatiformes invasivas e coriocarcinomas, por outro lado, esta expressão não é observada (KATO *et al.*, 1988), novamente correlacionando com o observado nas células ST1.

O significado destes padrões de expressão de retrovírus endógenos é desconhecido, mas é possível supor que produtos da expressão destes retrovírus (talvez a proteína p15E) estejam modulando a produção de citocinas pelas células. As citocinas podem, assim, estar interferindo na proliferação das células, atuando de maneira autócrina, ou fornecendo condições para a permanência e sobrevivência das células em um ambiente ou condição desfavoráveis, atuando de maneira parácrina.

6. Conclusões

Os cDNAs que codificam as metalotioneínas 1 e 2, a glicoproteína- α -1-ácida e o *env* retroviral foram clonados, nas orientações “sense” e “antisense”, nos vetores de expressão induzível pOPI3, pOPRSVI e pRetro On. Nos clones celulares de ST1 e P7 isolados de transfecções ou infecções feitas com as construções “sense” ou “antisense”, a triagem feita pela análise de transcritos ou expressão de proteínas não permitiu a identificação de clones corretamente induzíveis ou com níveis de expressão adequados para os ensaios funcionais.

O emprego da triagem funcional, através do plaqueamento em suspensão de agarose de populações de ST1 transfectadas, permitiu observar que a indução das construções “antisense” dos cDNAs das metalotioneínas 1 e 2, da glicoproteína- α -1-ácida e do *env* foi capaz de abolir a reversão fenotípica induzida por hidrocortisona.

O mesmo ensaio funcional permitiu observar que a indução das construções “sense” de metalotioneínas 1 e *env* foi capaz de inibir, parcialmente, a formação de colônias em populações de células ST1 ou P7. Com a expressão dessas proteínas, foi possível reproduzir a inibição de crescimento em agarose que ocorre, naturalmente, no processo de reversão fenotípica induzida por hidrocortisona em células ST1.

A técnica de triagem funcional aplicada aos plaqueamentos de transfecções de ST1, permitiu isolar clones celulares capazes de crescer na presença de hidrocortisona, uma vez induzida a expressão a partir das construções “antisense”.

Nos clones celulares de ST1 isolados dos ensaios funcionais, a análise da expressão de proteínas permitiu identificar clones corretamente regulados. Nestes clones, a indução da expressão a partir das construções “antisense” das metalotioneínas 1 e 2 e da glicoproteína- α -1-ácida levou à redução da expressão da proteína e ao aumento da densidade celular em relação ao controle. Quando tratados com indutor, mesmo na presença de hidrocortisona, estes clones apresentam a capacidade de formar colônias quando plaqueados em suspensão de agarose.

7. Referências Bibliográficas

- ABDEL-MAGEED, A.B.; AGRAWAL, K.C. - Activation of nuclear factor kappa B: potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res.*, **58**: 2335-8, 1998.
- ADAMS, M.A.; OSBORNE, W.R.; MILLER, A.D. - R-region cDNA inserts in retroviral vectors are compatible with virus replication and high level protein synthesis from the insert. *Hum. Gene Ther.*, **9**: 1169-76, 1995.
- ALMENDRAL, J.D.; SOMMER, D.; MACDONALD-BRAVO, H.; BURCKHARDT, J.; PERERA J.; BRAVO, R. - Complexity of the early response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, **8**: 2140-8, 1988.
- ALPHEY, L. - PCR-based method for isolation of full length clones and splice-variants for cDNA libraries. *Biotechniques*, **22**: 481-4, 1997.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. - Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-10, 1990.
- ANSORGE, W.; LABEIT, S. - Field gradient improve resolution on DNA sequencing gels. *J. Bioch. Biophys. Meth.*, **10**: 237-43, 1984.
- ARMELIN, H. - Peptide growth factors and cell cycle control. *Biomed. and Pharmacother.*, **44**: 103-8, 1990.
- ARMELIN, H.A.; SATO, G. - Cell cultures as model systems for the study of growth control. In: **Chemical Carcinogenesis**. Tso, O.P.; Di-Paolo, J.A. (Eds.) Vol 4, pp 483-501, 1974.
- ARMELIN, M.C.S. - Fatores peptídicos de crescimento: papel na proliferação e diferenciação celular. p. 15-22. In: N. Setian (Ed.) **Endocrinologia pediátrica - aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente**. Sarvier. São Paulo. Brasil, 1989.
- ARMELIN, M.C.S.; SASAHARA, R.M.; FLATSCHART, R.; VEDOY, C. - Use cDNA cloning to study the mechanism of action of glucocorticoid hormones at the molecular level. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **29**: 1751-7, 1996.
- ARMELIN, M.C.S.; ARMELIN, H.A. - Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. *J. Cell Biol.*, **97**: 459-65, 1983.
- ARMELIN, M.C.S.; ARMELIN, H.A. - Steroid hormones mediate reversible phenotypic transition between transformed and untransformed states in mouse fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75**: 2805-9, 1978.
- ARMELIN, M.C.S.; GARRIDO, J.; ARMELIN, H.A. - RNA tumor virus accompanies the transformed phenotype change induced by hydrocortisone hormone in rat glioma cells. *Cell Biol. Int. Rep.*, **7**: 689-96, 1983.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. - **Current Protocols in Molecular Biology**. 8nd ed. John Willey and Sons, Massachusetts, USA, 2000.
- BADIE, B.; SCHARTNER, J. - Role of microglia in glioma biology. *Microsc. Res. Techn.*, **54**: 106-13, 2001.

- BAIM, S.B.; LABOW, M.A.; LEVINE, A.J.; SHENK, T. - A chimeric mammalian transactivator based on the *Lac* repressor that is regulated by temperature and isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **88**: 5072-6, 1991.
- o'BANION, M.K.; LEVENSON, R.M.; BRINCKMANN, U.G. - Glucocorticoid modulation of transformed cell proliferation is oncogene specific and correlates with effects on *c-myc* levels. *Mol. Endocrinol.*, **6**: 1371-80, 1992.
- BARNES, P.J. - Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids. *Chem. Soc. Transactions*, **23**: 940-5, 1995.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. - Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol. Biol. Med.*, **7**: 147-59, 1990.
- BAUMANN, H.; MORELLA, K.K.; CAMPOS, S.P. - Interleukin-6 signal communication to the alpha-1-acid glycoprotein gene, but not jun B, is impaired in HTC cells. *J. Biol. Chem.*, **268**: 10495-500, 1993.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. *Mol. Biol. Med.*, **7**: 147-59, 1990.
- BEATO, M.; CHÁVEZ, S.; TRUSS, M. - Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids*, **61**: 240-51, 1996.
- le BEAU, M.M.; DIAZ, M.O.; KARIN, M.; RROWLEY, J.D. - Metallothionein gene cluster is split by chromosome 16 rearrangements in myelomonocytic leukaemia. *Nature*, **313**: 709-11, 1985.
- BECKER, D.P.; de SALLES, A.; IANNIELLO, L.M.; NELSON, G.; RUBINO, G.J. - www.neurology.medsch.ucla.edu/brainm.htm, 1998.
- BEDGOOD, R.M.; STALLCUP, M.R. - A novel intermediate in processing of murine leukemia virus envelope glycoproteins. Proteolytic cleavage in the late Golgi region. *J Biol Chem*, **267**: 7060-5, 1992.
- BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.; SWEET, W. - Differentiated rat glial cell strain in tissue culture, *Science*, **161**: 370-1, 1968.
- BENNETT, M.; SCHMID, K. - Immunosuppression by human plasma alpha-1-acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 6109-13, 1980.
- BILELLO, J.A.; WIVEL, N.A.; PITHA, P.M. - Effect of interferon on the replication of mink cell focus-inducing virus in murine cells: synthesis, processing, assembly, and release of viral proteins. *J Virol.*, **43**: 213-22, 1982.
- BISHOP, J.M. - Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**: 235-48, 1991.
- BLOOM, D.W.; FAWCETT, J. - **A Textbook of Histology**. 12th Ed. Chapman & Hall, New York, 1994.
- BOWDEN, R.; TATE, S.M.; SOTO, S.; SPECTER, S. - Alteration of cytokine levels in murine retrovirus infection: modulation by combination therapy. *Intl. J. Immunopharm.*, **21**: 815-27, 1999.
- BREMNER, I. - Interactions between metallothionein and trace elements. *Experientia, Suppl.* **52**: 63-, 1987
- BREMNER, I.; BEATTIE, J.H. - Metallothionein and the trace minerals. *Ann. Rev. Nutr.*, **10**: 63-83, 1990.
- BULL, P.; HUNTER, T.; VERMA, I. - Transcriptional induction of the murine *c-rel* gene with serum and phorbol-12- myristate-13-acetate in fibroblasts. *Mol. Cel. Biol.*, **9**: 5239-43, 1989.

- BURFEIND P, CHERNICKY CL, RININSLAND F, ILAN J, ILAN J. - Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 7263-8, 1996.
- CAMPAGNE, M.V. ; THIBODEAUX, H. ; van BRUGEN.; N. ; CAIMS, B. ; GERLAI, R. ; PALMER, J.T. ; WILLIAMS, S.P. ; LOWE, D.G. - Evidence for a protective role of metallothionein-1 in the focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 12870-
- CANTLEY, L.C.; AUGER, K.R.; CARPENTER, C.; DUCKWORTH, B.; GRAZIANI, A.; KAPPELLER, R.; SOLTOFF, S. - Oncogenes and signal transduction. *Cell*, **64**: 281-302, 1991.
- CELIS, J.E. - *Cell Biology, A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Academic Press, San Diego 1998.
- CHERESH, D.A.; HAYNES, D.H.; DISTASIO, J.A. - Interaction of an acute phase reactant, alpha-1-acid glycoprotein (orosomuroid), with the lymphoid cell surface: a model for non-specific immune suppression. *Immunology*, **51**: 541-8, 1984.
- CHERIAN, M.G.; HUANG, P.C.; KLAASSEN, C.D.; LIU, Y-P.; LONGFELLOW, D.G.; WAALKES, M.P. - National cancer institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis. *Cancer Res.*, **53**: 922-5, 1993.
- CHESEBRO, B.; BRITT, W.; EVANS, L.; WEHRLY, K.; NISHIO, J.; CLOYD, M. - Characterization of monoclonal antibodies reactive with Murine Leukemia Viruses: use in analysis of strains of Friend MCF and Friend Ecotropic Murine Leukemia Virus. *Virology*, **127**: 134-48, 1983.
- CHESEBRO, B.; WEHRLY, K.; CLOYD, M.; BRITT, W.; PORTIS, J.; COLLINS, J.; NISHIO, J. - Characterization of mouse monoclonal antibodies specific for Friend Murine Leukemia Virus-induced erythroleukemia cells: Friend-specific and FMR-specific antigens. *Virology*, **112**: 131-44, 1981.
- CHIANG, M.Y.; CHAN, H.; ZOUNES, M.A.; FREIER, S.A.; LIMA, W.F.; BENNET, C.F. - Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **266**: 18162-71, 1991.
- CHIRGWIN, J.M.; PRZBYLA, A.E.; MacDONALD, R.J.; RUTTER, W.J. - Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**: 52-94, 1979.
- CHUAH, M.K.; VANDENDRIESSCHE, T.; MORGAN, R.A. - Development and analysis of retroviral vectors expressing human factor VIII as a potential gene therapy for hemophilia A. *Hum. Gene Ther.*, **6**: 1363-77, 1995.
- CHURCH, S.L.; GRANT, J.W.; RIDNOUR, L.A.; OBERLEY, L.W.; SWANSON, P.E.; MELTZER, P.S.; TRENT, J.M. - Increased management superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 3113-7, 1993.
- CIANCIOLO, G.J.; MATTHEWS, T.J.; BOLOGNESI, D.P.; SYNDERMAN, R. - Macrophage accumulation in mice is inhibited by low molecular weight products from murine leukemia viruses. *J Immunol.*, **124**: 2900-5, 1980.
- CIANCIOLO, G.J.; COPELAND, T.D.; OROSZLAN, S.; SNYDERMAN, R. - Inhibition of lymphocyte proliferation by a synthetic peptide homologous to retroviral envelope proteins. *Science*, **230**: 453-5, 1985.
- COATS, C.; FLANAGAN, W.M.; NOURSE, J.; ROBERTS, J.M. - Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, **272**: 877-80, 1996.

- COCHRAN, B.H.; REFFEL, A.C.; STILES, C.D. - Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell*, **33**: 939-47, 1983.
- COCHRAN, B.H.; ZULLO, J.; VERMA, I.M.; STILES, C.D. - Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet-derived growth factor. *Science*, **226**: 1080-2, 1984.
- COOPER, J.M. - **Oncogenes**. Jones and Bartlett Publishers. Boston, Mass, 1990.
- COYLE, P.; PHILICOX, J.C.; ROTE, A.M. - Hepatic zinc in metallothionein-null mice following zinc challenge – *In vivo* and *In vivo* studies. *Biochem. J.*, **309**: 25-31, 1995.
- COYLE, P.; PHILICOX, J.C.; ROTE, A.M. - Metallothionein-null mice absorb less Zn from an egg-white diet, but a similar amount from solutions, although with altered intertissue Zn distribution. *J. Nutr.*, **129**: 372-9, 1999.
- COYLE, P.; PHILCOX, J.C.; ROFE, A.M. - Hepatic zinc in metallothionein-null mice following zinc challenge – *in vivo* and *in vitro* studies. *Biochem. J.*, **309**: 25-31, 1995.
- COYLE, P.; PHILCOX, J.C.; ROFE, A.M. - Metallothionein-null mice absorb less Zn from an egg-white diet, but a similar amount from solutions, although with altered intertissue Zn distribution. *J. Nutr.*, **129**: 372-9, 1999.
- CROSS, M.; DEXTER, T.M. - Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, **64**: 271-80, 1991.
- DAI, C. ; HOLLAND, E.C. – Glioma Models. *Bioch. Bioph. Acta*, **1551**: M19-27, 2001.
- DALTON, T.; PALMITER, R.D.; ANDREWS, G. - Transcriptional induction of the mouse metallothionein-I gene in hydrogen peroxide-treated Hepa cells involves a composite inajor late transcription factor/ antioxidant response element and metal response promoter elements. *Nucleic Acids Res.*, **22**: 5016-23, 1994.
- DASTON, G.P.; OVERMANN, G.J.; BAINES, D.; TAUBENECK, M.W.; LEHMAN-mcKEEMAN, L.D.; ROGERS, J.M.; KEEN, C.L. – Altered Zn status by alpha-hederin in the pregnant rat and its relationship to adverse outcome. *Reprod. Toxicol.*, **8**: 15-24, 1994.
- DE, S.K.; McMASTER, M.T.; ANDREWS, G.K. - Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J. Biol. Chem.*, **265**: 15267-74, 1990
- DEUSCHLE, U.; HIPSKIND, R.A.; BUJARD, H. - RNA polymerase II transcription blocked by *Escherichia coli* Lac repressor. *Science*, **248**: 480-3, 1990.
- DUCH, M.; PALUDAN, K.; LOVMAND, J.; SORENSEN M.S.; JORGENSEN P.; PEDERSEN F.S. - The effect of selection for high-level vector expression on the genetic and functional stability of a single transcript vector derived from a low-leukemogenic murine retrovirus. *Hum. Gene Ther.*, **6**: 289-96, 1995.
- DULBECCO, R. - Oncogenic viruses II : RNA-containing viruses (retroviruses), p. 355-382. In: R. Dulbecco and H.S. Ginsberg (Eds.). **Virology**. 2nd ed. J.B. Lippincott Company. Philadelphia, 1988.
- DURANT, S.; DUVAL, D.; HOMO-DELARCHE, F. – Factors involved in the control of fibroblast proliferation by glucocorticoids: a review. *Endocr. Rev.*, **7**: 254-69, 1986.
- EASTMAN-REKS, S.B.; VEDECKIS, W.V. - Clucocorticois inhibition of c-myc, c-myb, and c-Ki-ras expression in a mouse lymphoma cell line. *Cancer Res.*, **46**: 2457-62, 1986.

- EBADI, M. - Metallothioneins and other zinc-binding proteins in brain. *Meth. Enzymol.*, **205**: 363-387, 1991.
- EBADI, M.; SWANSON, S. - The status of zinc, copper and metallothionein in cancer patients. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **259**: 161-75, 1988.
- mcEWEN, M.; GALLANOPOULOS, T.; NEVILLE-GOLDEN, J.; ANTONIADES, H.N. - Effect of the expression of TGF beta 2 in primary human glioblastomas on immunosuppression and loss of immune surveillance. *J. Neurosurg.*, **76**: 799-804, 1992
- FARREL, C.M.; LUKENS, L.N. - Naturally occurring antisense transcripts are present in chick embryo chondrocytes simultaneously with the down-regulation of the $\alpha 1(I)$ collagen gene. *J. Biol. Chem.*, **270**: 3400-8, 1995
- FENSTER, S.D.; WAGNER, R.W.; FROEHLER, B.C.; CHIN, D.J. - Inhibition of Human Immunodeficiency Virus type -1 *env* expression by C-5 propyne oligonucleotides specific for Rev-response element stem-loop V. *Biochemistry*, **33**: 8391-8, 1994.
- FIECK, A.; WYBORSKI, D.L.; SHORT, J.M. - Modifications of the *E.coli Lac* repressor for expression in eukaryotic cells: effects of nuclear signal sequences on protein activity and nuclear accumulation. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 1785-91, 1992.
- FLANAGAN, W.M.; KOTHA VALE, A.; WAGNER, R.W. - Effects of oligonucleotide length, mismatches and mRNA levels on C-5 propyne-modified antisense potency. *Nucleic Acids Res.*, **24**: 2936-41, 1996.
- FLATSCHART R.B.; SOGAYAR, M.C. - Functional analysis of newly discovered growth control genes: experimental approaches. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**: 867-75, 1999.
- FORT, P.; MARTY, L.; PIECHACZYK, M.; EL SABROUTY, S.; DANI, C.; JEANTEUR, P.; BLANCHARD, J.M. - Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 1431-42, 1985.
- FOURNIER, T.; MEDJOUBI, N.; PORQUET, D. - Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1482**: 157-71, 2000.
- FOURNIER, T.; MEJDOUBI, N.; MONNET, D.; DURAND, G.; PORQUET, D. - *Hepatology*, **20**: 1584-8, 1994.
- GLASEL, J.A. - Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*, **18**: 62-3, 1995.
- GLISIN, V.; CRKVENJAKOV, R.; BYUS, C. - Ribonucleic acid isolated by cesium chloride. *Biochemistry*, **13**: 2633-7, 1974.
- GOSSEN, M.; BUJARD, H. - Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 5547-51, 1992.
- GOTTLIEB, R.A.; KLEINERMAN, E.S.; O'BRIAN, C.A.; TSUJIMOTO, S.; CIANCIOLO, G.J.; LENNARZ, W.J. - Inhibition of protein kinase C by a peptide conjugate homologous to a domain of the retroviral protein p15E. *J. Immunol.* **145**: 2566-70, 1990.
- GRIMALDI, B.; HAMBERGER, C; TREMBLAY, D. - *Prog. Clin. Biol. Res.*, **300**: 445-8, 1989.
- HAMER, D.H. - Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**: 913-51, 1986.

- HARAGUCHI, S.; GOOD, R.A.; JAMES-YARISH, M.; CIANCIOLO, G.J.; DAY, N.K. - Differential modulation of Th1- and Th2-related cytokine mRNA expression by a synthetic peptide homologous to a conserved domain within retroviral envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 3611-5, 1995b.
- HARAGUCHI, S.; GOOD, R.A.; JAMES-YARISH, M.; CIANCIOLO, G.J.; DAY, N.K. - Induction of intracellular cAMP by a synthetic retroviral envelope peptide: a possible mechanism of immunopathogenesis in retroviral infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 5568-71, 1995c.
- HARLOW, E.; LANE, D. - **Antibodies** – A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratories. NY, 1988
- HASHIBA, H.; HOSOI, J.; KARASAWA, M.; YAMADA, SS.; NOSE, K.; KUROKI, T. - Induction of metallothionein mRNA by tumor promoters in mouse skin and its constitutive expression in papillomas. *Mol. Carcinog.*, **2**: 95-100, 1989.
- HELMBERG, A.; FASSLER, R.; GELEY, S.; JOHRER, K.; KROEMER G.; BOCK, G.; KOFLER, R. - Glucocorticoid-regulated gene expression in the immune system. *J.Immunol.*, **145**: 4332-7, 1990.
- HIGGINS, D.G.; SHARP, P.M. - CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene*, **73**: 237-44, 1988.
- HO, S.P.; BAO, Y.; LESCHER, T.; MALHOTRA, R.; MA, L.Y.; FLUHARTY, S.J.; SAKAI, R.R. - Mapping of RNA accessible sites for antisense experiments with oligonucleotide libraries. *Nature Biotechnology*, **16**: 59-63, 1998.
- HO, S.P.; BRITTON, D.H.; STONE, B.A.; BEHRENS, D.L.; LEFFET, L.M.; HOBBS, F.W.; MILLER, J.A.; TRAINOR, G.L. - Potent antisense oligonucleotides to human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic Acids Res.*, **24**: 1901-7, 1996.
- HU, M.C.; DAVIDSON, N. - The inducible *Lac* operator-repressor system is functional in mammalian cells. *Cell*, **48**: 555-66, 1987.
- IBELGAUFTS, H. - Cytokines online pathfinder encyclopaedia. www.copewithcytokines.de, 1999.
- IMBRA, R.J.; Karin, M. - Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C. *Mol. Cell Biol.*, **7**: 1358-64, 1987
- ISLAM, T.C.; TOFTGARD, R. - A subpopulation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced papillomas is not inhibited by retinoic acid. *Toxicology*, **75**: 199-208, 1992.
- JACOB, C.; MARET, W.; VALLEE, B.L. - Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 3489-94, 1998.
- JEANMOUGIN, F.; THOMPSON, J.D.; GOUY, M.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. - Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci.*, **23**: 403-5, 1998.
- KÄGI, J.H.R.; SCHAFFER, A. - Biochemistry of metallothionein. *Biochem.*, **27**: 8509-15, 1988.
- KÄGI, J.H.R. - Overview of metallothionein. *Methods Enzymol.*, **205**: 613-26, 1991.
- KALMOVARIN, N.; FRIEDRICH, W.E.; O'BRIEN, H.V.; LINEHAN, L.A.; BOWMAN, B.H.; YANG, F. - *Inflammation*, **15**: 369-70, 1991.
- KANG, Y.J.; LI, G.; SAARI, J.T. - Metallothionein inhibits ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Am. J. Physiol.*, **276**:H993-7, 1999

- KARASAWA, M.; NISHIMURA, N.; NISHIMURA, H.; TOHYAMA, C.; HASHIBA, H.; KUROKI, T. - Localization of metallothionein in hair follicles of normal skin and the basal cell layer of hyperplastic epidermis: possible association with cell proliferation. *J. Invest. Dermatol.*, **97**: 97-100, 1991.
- KARIN, M. - Metallothioneins: proteins in search of function. *Cell*, **41**: 9-10, 1985.
- KARLIN, S.; ALTSCHUL, S.F. - Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2264-8, 1990.
- KATO, N.; LARSSON, E.; COHEN, M. - Absence of expression of a human endogenous retrovirus is correlated with choriocarcinoma. *Intl. J. Cancer*, **41**: 380-5, 1988.
- KAUP, B.; SCHINDLER, I.; KNUPFER, H.; SCHLENZKA, A.; PREISS, R.; KNUPFER, M.M. - Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. *J. Neurooncol.*, **51**:105-10, 2001.
- KELLY, E.J. ; QUAIFE, C.J. ; FROELICK, G.J. ; PALMITER, R.D. - Metallothionein I and II protect against zinc deficiency and zinc toxicity in mice. *J Nutr.*, **126**: 1782-90, 1996.
- KIKUCHI, J.E.; IRIE, M.; KASAHARA, T.; SAWADA, J-I.; TERAOKA, T. - Introduction of metallothionein in a human astrocytoma cell line by interleukin-1 and heavy metals. *FEBS lett.*, **317**: 22-6, 1993.
- KITE, J.; DOOLITTLE, R.F. - A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-32, 1982.
- KOCH, W.; ZIMMERMANN, W.; OLIFF, A.; FRIEDRICH, R. - Molecular analysis of the envelope gene and long terminal repeat of Friend Mink cell focus-inducing virus: Implications for the functions of these sequences. *J. Virol.*, **49**: 828-40, 1984.
- KOJIMA, Y.; BERGER, C.; VALLE, B.L.; KÄGI, H.R. - Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **73**: 3413-7, 1976.
- KOSCHEL, K.; BRINCKMANN, U.; HOYNINGEN-HUENE, V.V. - Measles virus antisense sequences specifically cure cells persistently infected with measles virus. *Virology*, **207**: 168-78, 1995.
- KRYSTAL, G.W.; ARMSTRONG, B.C.; BATTEY, J.F. - N-myc forms an RNA-RNA duplex with endogenous antisense transcripts. *Mol. Cell. Biol.*, **10**: 4180-91, 1990.
- KUMARI, V. - <http://medocs.ucdavis.edu/CHAHPH/403/SYLLABUS/style.css>, 2000.
- LABOW, M.A.; BAIM, S.B.; SHENK, T.; LEVINE, A.J. - Conversion of the *Lac* repressor into an allosterically regulated transcriptional activator for mammalian cells. *Mol. Cell Biol.*, **10**: 3343-56, 1990.
- LAMPH, W.; WAMSLEY, P.; SASSONI-CORSI, P.; VERMA, I. - Induction of proto-oncogene jun/AP-1 by serum and TPA. *Nature*, **334**: 629-31, 1988.
- LARSSON, E. ; VENABLES, P.J.; ANDERSSON, A.C.; FAN, W.; RIGBY, S.; BOTLING, J.; OBERG, F.; COHEN, M.; NILSSON, K. - Expression of the endogenous retrovirus ERV3 (HERV-R) during induced monocytic differentiation in the U-937 cell line. *Int. J. Cancer*, **67**: 451-6, 1996.
- LARSSON, E.; ANDERSSON, A.C.; NILSSON, B.O. - Expression of an endogenous retrovirus (ERV3 HERV-R) in human reproductive and embryonic tissues – evidence for a function for envelope gene products. *Ups. J. Med. Sci.*, **99**: 113-20, 1994.

- LARSSON, E; VENABLES, PJ; ANDERSSON, AC; FAN, W; RIGBY, S; BOTLING, J; OBERG, F; COHEN, M; NILSSON, K. - Tissue and differentiation specific expression on the endogenous retrovirus ERV3 (HERV-R) in normal human tissues and during monocytic differentiation in the U-937 cell line. *Leukemia* 11: 142-4, 1997.
- LEWIN, B. - *Genes V*. Cap. 30. Oxford University Press. New York, 1994.
- LEWIN, B. - Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factor. *Cell*, 64: 303-12, 1991.
- LEWIS, J.G.; LIN, K.Y.; KOTHAVALE, A.; FLANAGAN, W.M.; MATTEUCCI, M.D.; DePRINCE, R.B.; MOOK, R.A.; HENDREN, R.W.; WAGNER, R.W. - Serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3176-81, 1996.
- LIN, Y.C.; CHOW, C.W.; YUEN, P.H.; WONG, P.K. - Establishment and characterization of conditionally immortalized astrocytes to study their interaction with ts1, a neuropathogenic mutant of Moloney murine leukemia virus. *J Neurovirol.*, 3: 28-37, 1997.
- LIU, H.M.; TAKAGAKI, K.; SCHMID, K. - In vitro nerve growth-promoting activity of human plasma alpha 1-acid glycoprotein. *J. Neurosci. Res.*, 20: 64-72, 1988.
- LOPEZ-CEPERO, M.; SPECTER, S.; MATTEUCCI, D.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. - Altered interleukin production during Friend leukemia virus infection. *PSEMB.*, 188: 353-63. 1988.
- LOUIS, D.N.; HOLLAND, E.C.; CAIRNCROSS, J.G. - Glioma classification. A molecular reappraisal. *Am. J. Pathol.*, 159: 779-86, 2001.
- MARET, W.; VALLEE, B.L. - Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3478-82, 1998.
- MASTERS, B.A.; KELLY, E.J.; QUAIFFE, C.J.; BRINSTER, R.L. - Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Biochemistry*, 91: 584-8, 1994.
- MÉPLAN, C.; RICHARD, M.-J.; HAINAUT, P. - Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators *in vitro* and in intact cells. *Oncogene*, 19: 5227-36, 2000.
- MICHALSKA, A.E. ; CHOO, K.H. - Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8088-92, 1993
- MICKEY, C. T.; DAVIDSON, N. - The inducible *lac* Operator-Repressor System is functional in mammalian cells. *Cell* 48: 555-66, 1987.
- van MIERT, A. J. S. P. A. M. - Acute phase response and non cellular defence mechanisms. *Flem. Vet J.*, 62 Suppl.1: 69-91, 1991.
- MILLER, A. D.; ROSMAN, G. J. - Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* 7: 980-2, 1989.
- MILNER, N.; MIR, K.U.; SOUTHERN, E.M. - Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*, 15: 537-44, 1997.
- de la MONTE, S.; GANJU, N.; WANDS, J.R. - Microtiter Immuncytochemical ELISA assay. *Biotechniques* 26: 1073-8, 1999.

- MORGAN, R.A.; NUSSBAUM, O.; MUENCHAU, D.D.; SHU, L.; COUTURE, L.; ANDERSON, W.F. - Analysis of the functional and host range-determining regions of the murine ectropic and amphotropic retrovirus envelope proteins. *J Virol.*, 67: 4712-21, 1993.
- MOULDS, C; LEWIS, J.G.; FROEHLER, B.C.; GRANT, D.; HUANG, T.; MILLIGAN, J.F.; MATTEUCCI, M.D.; WAGNER, R.W. - Site and mechanism of antisense inhibition by C-5 propyne oligonucleotides. *Biochemistry*, 34: 5044-53, 1995.
- MULDER, T.P.; JANSSENS, A.R.; VERSPAGET, H.W.; VAN-HATTUM, J.; LAWERS, C.B. - Metallothionein concentration in the liver of patients with Wilson's disease, primary biliary cirrhosis, and liver metastasis of colorectal cancer. *J. Hepatol.*, 16: 346-50, 1992.
- NAGANE, M; ASAI, A; SHIBUI, S; NOMURA, K; KUCHINO, Y. - Application of antisense ribonucleic acid complementary to O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase messenger ribonucleic acid for therapy of malignant gliomas. *Neurosurgery*, 41: 434-40, 1997.
- NO, D.; YAO, T.P.; EVANS, R.M. - Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 3346-51, 1996.
- NORDBERG, M. - Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46: 243-54, 1998.
- OLSSON, A.; MOKS, T.; UHLÉN, M.; GAAL, A.B. - Uniformly spaced banding pattern in DNA sequencing gels by use of field-strength gradient. *J. Bioch. Biophys. Meth.* 10: 83-90, 1984.
- OOSTENDORP, R.A.; SCHAAPER, W.M.; POST, J.; VON BLOMBERG, B.M.; MELOEN, R.H.; SCHEPER, R.J. - Suppression of lymphocyte proliferation by a retroviral p15E-derived hexapeptide. *Eur J Immunol.* 22: 1505-11, 1992.
- PACE, H.C.; KERCHER, M.A.; LU, P.MARKIEWICZ, P. MILLER, J.H.; CHANG, G. LEWIS, M. - *Lac* repressor genetic map in real space. *TIBS*, 22: 334-9, 1997.
- PALACIOS, R.; SUGAWARA, I. - Hydrocortisona abrogates proliferation of T-cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 producer cells unresponsive to interleukin-1 and unable to synthesize the t-cell growth factor. *Scand. J. Immunol.*, 15: 25-9, 1982
- PARKS, W.P.; SCOLNICK, E.M.; RANSOM, J.C. - Glucocorticoid induction of murine mammary tumor virus in vitro. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 39: 1151-8, 1974.
- PATZEL, V.; SCZAKIEL, G. - Theoretical design of antisense RNA structures substantially improves annealing kinetics and efficacy in human cells. *Nature Biotechnology*, 16: 64-8, 1998.
- PLEDGER, W.J.; STILES, C.D.; ANTONIADES, H.N.; SCHER, C.D. - Induction of DNA synthesis in Balb/c-3T3 cells by serum components: reevaluation of the commitment process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4481-4, 1977.
- POLITIS, M.J.; LINSAY, J.K.S. - Exogenous interleukin regulates growth of C6 tumors *in vivo*. *Acta Neuropathol.* , 77: 182-5, 1988
- PROSTKO, C.R.; ZHANG, C; HAIT; W.N. - The effects of altered cellular calmodulin expression on the growth and viability of C6 glioblastoma cells. *Oncol Res*; 9: 13-7, 1997.
- RAMEH, L.F.E.; ARMELIN, M.C.S. - Downregulation of JE and KC genes by glucocorticoids does not prevent the G0-G1 transition in Balb/3T3 cells. *Mol. Cell Biol.*, 12: 4612-21, 1992.

- REMINGTON, M.P.; HOFFMAN, P.M.; RUSCETTI, S.K.; MASUDA, M. - Complete nucleotide sequence of a neuropathogenic variant of Friend murine leukemia virus PVC-211. *Nucleic Acids Res.*, **20**: 3249, 1992.
- RESNITZKY, D. ; GOSSEN, M. ; BUJARD, H. ; REED, S.I. - Acceleration of the G₁/S phase by expression of cyclins D2 and E with inducible System. *Mol. Cell Biol.* **14**: 1669-79, 1994.
- RINGOLD, G.M. - Regulation of mouse mammary tumor virus gene expression by glucocorticoid hormones. In: M. Cooper *et al.* (Eds.). *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **106**: 79-103 , 1983.
- ROESIJADÍ, G.; BOGUMIL, R.; VAŠÁK, M.; KÄGI, J.H. - Modulation of DNA binding of a Tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein conjugate pair. *J.Biol. Chem.* **273**: 17425-32, 1998.
- RYCHLIK, W.; RHOADS, R.E. - A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 8543-51, 1989.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS T. - **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor. Planview, USA, 1989.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. - DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**: 5463-7, 1977.
- SASAHARA, R.M.; VALENTINI, S.R.; ARMELIN, M.C.S. - Molecular basis of glucocorticoid action in transformed to normal phenotypic reversion. Anais do Simposio Nipo-Brasileiro de Ciência e Tecnologia. 98-104, 1995.
- SATO, M. ; APOSTOOVA, M.D. ; HAMAYA, M. ; YAMAKI, J.; CHOO, K.H.A. ; MICHALSKA, A.E. ; KODAMA, N. ; TOHYAMA, C. - Susceptibility of metallothionein-null mice to paraquat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **1**: 221-5, 1996.
- SAVOLDI, G.; FENAROLI, F.; FERRARI, F.; RIGAUD, G.; ALBERINI, A.; DI LORENZO, D. - The glucocorticoid receptor regulates the binding of C/EPBbeta in the alpha-1-acid glycoprotein promoter in vivo. *DNA Cell Biol.* **16**: 1467-76, 1997.
- SEARLE, P.F.; STUART, G.W.; PALMITER, R.D. - Building a metal-responsive promoter with synthetic regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.*, **5**: 1480-9, 1985.
- SHEEN, J.Y.; SEED, B. - Electrolyte gradient gels for DNA sequencing. *Biotechniques*, **6**: 942-4, 1988
- SHIYAN, S.D.; NASONOV, V.V.; BOVIN, N.V.; MEDVEDEV, A.E. - Immunosuppressive activity of normal, embryonic and cancer alpha-1-acid glycoprotein and its molecular forms differing by glycosilation. *Experim. Oncol.*, **15**: 46-50, 1993.
- SIDWELL, R.W.; MORREY, J.D.; OKLEBERRY, K.M.; BURGER, R.A.; WARREN, R.P. - Immunomodulator effects on the Friend virus infection in genetically defined mice. *Ann NY Acad Sci.*, **685**: 432-47, 1993.
- SILVER, P.A. - How proteins enter the nucleus. *Cell* , **64**: 489-97, 1991.
- SUHY, D. A.; SIMON, K.D.; LINZER, D.I.; o'HALLORAN, T.V. - Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J.Biol. Chem.*, **274**: 9183-92, 1999.
- TAKENAGA K, NAKAMURA Y, SAKIYAMA S. - Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene*, **14**: 331-7, 1997.

- TARTOF, K.D.; HOBBS, C.A. - Improved media for growing plasmid plasmid and cosmid clones. *BRL focus*, **9**: 2-12, 1987.
- THOMAS, P.S. - Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**: 5201-5, 1980.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. - The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 4876-82, 1997.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. - CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* , **22**: 4673-80, 1994.
- THORNALLEY, P.J.; VASAK, M. - Possible role of metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Bioch. Bioph. Acta*, **827**: 36-44, 1985.
- UCHIDA, Y.; TAKIO, K.; TITANI, K.; IHARA, Y.; TOMONAGA, M. -The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimers's disease brain is a 68amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, **7**: 337-47, 1991.
- VALENTINI, S.R. - Bases moleculares da reversão fenotípica induzida por hormônios glicocorticóides nas células C6 de glioma de rato. Tese. Departamento de Bioquímica , Universidade de São Paulo. Nível Doutorado. 1993.
- VALENTINI, S.R.; ARMELIN, M.C.S. - Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. *J. Endocrinol.* **148**: 11-7, 1996.
- VANNICE, J.L.; RINGOLD, G.M.; MCLEAN, J.W.; TAYLOR, J.M. - Induction of the acute phase reactant, alfa 1-acid glycoprotein, by glucocorticoids in rat hepatoma cells. *DNA*, **2**: 205-12, 1983.
- VAŠÁK, M. ; HASLER, D.W. - Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology*, **4**: 177-83, 2000.
- VEDOY, C.G.; ARMELIN, M.C.S. - Cloning of glucocorticoid-regulated sequences using equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 1997.
- VEDOY, C.G.; BENGTONSON, M.H.; SOGAYAR, M.C. - Hunting for differentially expressed genes . *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**: 860-6, 1999.
- VEDOY, C.G. - Tese. Departamento de Bioquímica , Universidade de São Paulo. Nível Doutorado. 2000.
- WAGNER, R.W. - Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature*, **372**: 333-5, 1994.
- WAGNER, R.W.; MATTEUCCI, M.D.; GRANT, D.; HUANG, T.; FROEHLER, B.C. - Potent and selective inhibition of gene expression by an antisense heptanucleotide. *Nature Biotechnology*, **14**: 840-4, 1996.
- WEISS, R.A. - Perspectives on endogenous retroviruses in normal and pathological growth. In: Wecker, E.; Horak, I. (Eds.) *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **98**: 127-32, 1982.
- WELLING, G.W.; WEIJER, W.J.; VAN DER ZEE, R.; WELLING-WESTER, S. - Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.*, **188**: 215-8, 1985.

- WESTIN, G.; SCHAFFNER, W. - A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the mouse metallothionein-I gene. *EMBO J.*, 7: 3763-70, 1988.
- WILLIAMS, S.A.; SLATKO, B.E.; MORAN, L.S.; deSIMONE, S.M. - Sequencing in the fast lane: a rapid Protocol for [(-35S) dATP dideoxy DNA Sequencing. *Biotechniques*, 4: 138-47, 1986.
- WYBORSKI, D.L.; SHORT, J.M. - Analysis of inducers of the E.coli *Lac* repressor system in mammalian cells and whole animals. *Nucleic Acids Res.*, 19: 4647-53, 1991.
- YAMAMOTO, K.R. - Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Ann. Rev. Genet.*, 19: 209-52, 1985.