

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Análise de expressão gênica por
microarrays de cDNA em linhagens de
células adrenais tumorigênicas
tratadas com FGF2 e ACTH

Paula Fontes Asprino
Tese de doutorado

Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

São Paulo
13/02/2006

Agradecimentos

Bem, já que esta é a única parte da tese que TODOS realmente lêem, convém caprichar e não esquecer de ninguém (tarefa impossível).

Obrigada ao prof. Hugo Armelin, meu orientador desde a iniciação científica, ou seja, há quase oito anos! Obrigada pela oportunidade e pela orientação, pelas conversas formais e pelos causos contados no almoço (meu preferido é o do papagaio da vizinha que mandava o senhor tomar banho). Obrigada por orientar mesmo em circunstâncias não relacionadas à tese, por me animar nos momentos finais e por servir de exemplo de dedicação.

Obrigada à minha família pelo apoio. Aos meus pais que acreditaram em mim e sempre estiveram ao meu lado, obrigada por proporcionarem os estudos que me permitiram chegar até aqui. À Anna, minha mãe, por oferecer um ombro amigo. Ao Vicente, meu pai, que infelizmente não poderá assistir ao término desta etapa, obrigada por mostrar o valor do trabalho e por se dispor a assistir prévias de seminário mesmo não entendendo nada do assunto ("O que é este mega-watt (mw)?").

Ao meu irmão Tiago, obrigada por topar ler a introdução, por ajudar no churrasco com o pessoal do laboratório no sítio, por distrair a Pedrita enquanto eu precisava me concentrar e por trazer balas-de-goma para ajudar na escrita. À Pedrita, obrigada por me fazer companhia, dormindo ao meu lado enquanto eu escrevia a tese. À minha tia Yara por estar sempre disposta a ajudar e por fazer gostosuras propiciando intervalos da tese e diversão simultaneamente.

Obrigada ao Érico por tudo. Impossível colocar aqui todos os momentos, melhor apenas exemplificá-los. Obrigada por ficar comigo no laboratório quando já estava tarde, por me ajudar a replicar a infundável biblioteca de ESTs; pelas invenções-tabajara tão úteis; por me ajudar a limpar a centrífuga após o acidente com a sonda radioativa; pela sinceridade ao dizer que não acreditava na "minha técnica"; por ouvir e ajudar quando eu achava que tudo estava perdido, pela paciência em todas as minhas crises de desespero/mau-humor... enfim, obrigada pelo companheirismo e pela cumplicidade.

Obrigada a todos os colegas e amigos do laboratório, aqueles que ainda nos acompanham e aqueles que já seguiram novos rumos.

Maria do Céu, "catana querida", obrigada por deixar o laboratório "uma b'leza" e por tornar cada momento tão "deeberteado".

Kátia (Katita), Telma (Telmita), Miriam (Mira) e Carol (Cabrita), as "splicing-girls". Obrigada por estarem sempre dispostas a ajudar e a esclarecer quaisquer dúvidas e,

acima de tudo, obrigada pela amizade de cada uma de vocês, cada qual com suas qualidades especiais. A serenidade da Mira, a determinação da Carol, o humor cheio de trocadilhos da Telma e a força que a Katita tem de forma tão natural que nem ela se dá conta! Eu realmente admiro vocês!

Ana Lepique e Claudimara (Cau), obrigada por todas as aulas informais, protocolos, dicas e sugestões. E obrigada pelo exemplo.

Às minhas colegas atuais, Jacqueline (Jac) e Tatiana (Tati), a dupla-dinâmica! Obrigada pela amizade, pelas discussões, pelos assuntos sérios e pelos momentos de brincadeira. Não poderia deixar de fora a nossa querida amiga agregada ao lab, Paromita (Parô), que está sempre presente nos melhores momentos. Obrigada meninas.

Fábio Forti, meu co-orientador de iniciação científica, obrigada pela paciência de ensinar não apenas as técnicas e seus princípios, mas também as práticas básicas de laboratório. Aos meninos do laboratório Ivan, Gilson, Matheus e Alê, obrigada pela convivência, pelas discussões e pela cooperação.

Aos meninos do laboratório de maneira geral, obrigada por me tornar uma pessoa mais forte, já que nunca ninguém se dispunha trocar o galão de água.

Fábio Nakano, o "garoto-bombom" que sabe fazer de tudo, de dançar tango a calcular a razão de expressão gênica em ensaios de microarray. Obrigada por toda a sua ajuda (que não foi pouca), por todo o empenho que você tem tido em aprender a parte biológica do problema tão bem quanto entende a parte matemática, por topar rever a análise estatística aos 44 do segundo tempo e obrigada por servir de exemplo de calma, serenidade, inteligência e determinação. Ainda tenho muito que aprender com você.

Obrigada a todos do laboratório da professora Bianca Zingales.

Obrigada por emprestar reagentes para testes comparativos (extrato de levedura; bactérias competentes; primers); por deixar que eu usasse o eletroporador, o termociclador de placas (com gradiente!), o shaker; a super-cuba-que-cabe-placa-de-96; replicador etc. Obrigada ao Marcelo por abrir as garrafas radioativas de Escalibur quando eu já acreditava que os ensaios estavam perdidos. Obrigada ao Aurélio e à Margot por estarem dispostos a ajudar até nos momentos mais improváveis (altas horas, sábados, domingos e feriados). Ao Cássio e à Camila, obrigada pelas dicas de microarray.

Obrigada a todos do laboratório da professora Mari Sogayar: Ana Paula, André; Antero-Flô; Cleber; Fernando; Irê; Leonardo; Karin; Letícia; Marcos; Pipoca-Gabriela; Theri; Wagner; Zizi. Desculpe pessoal, com certeza estou me esquecendo de alguém, é muita gente. Obrigada pelas sugestões em nossos seminários de sexta-feira. Obrigada

especialmente ao Christian que além de prestar atenção em meu seminário resolveu meu problema que já durava meses ao me dar seu protocolo de "blunt-kinase" e 1uL e seu super plasmídeo pUC18. Obrigada à prof. Ana Carla e ao Mário pela sugestão de fazer alterações no protocolo de northern blot. Funcionou! Obrigada à Fernanda que me ajudou nos primeiros passos de real-time. Obrigada a todos por me deixarem usar a centrífuga de placas tooodas as vezes em que eu precisei, por emprestar a multicanal para eu fazer meus macroarrays-tabajara, pelos reagentes emprestados...e pela confiança. Obrigada.

Obrigada aos colegas do laboratório do Prof. Sérgio Verjovski. Ao Renato, por me ensinar seu protocolo de seqüenciamento cheio de pegadinhas. À Katlin, por me ajudar com a Hydra e ao Eduardo pelos esclarecimentos a respeito de microarray.

A todos os amigos que eu fiz ao longo do caminho. Fábio Siviero, o "tio" da Pedrita, obrigada por me ajudar com o bendito Linux-phred-phrap. Adriana e Denise, as meninas do CAGE, obrigada por manter tudo em ordem, por me ajudar nos ensaios iniciais de array e pelas conversas informais tão engraçadas. Edlaine e Noboru, pelas conversas às vezes tão superficiais e às vezes tão profundas, sempre proveitosas.

Obrigada à FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

Obrigada a Deus por todas as oportunidades que têm oferecido... embora nem sempre eu saiba aproveitá-las com sabedoria.

Este projeto contou com o apoio financeiro da FAPESP e do CNPq.

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 7 |
| RESUMO | 8 |
| SUMMARY | 9 |
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 1.1. CRESCIMENTO E DIVISÃO CELULAR | 10 |
| 1.1.1. FASES DA DIVISÃO CELULAR | 11 |
| 1.1.2. CONTROLE DO CICLO CELULAR | 13 |
| 1.2. PAPEL DO ACTH NO DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DO CÓRTEX DA ADRENAL | 14 |
| 1.2.1. AS GLÂNDULAS ADRENAIS | 14 |
| 1.2.2. O HORMÔNIO ADRENOCORTICOTRÓPICO (ACTH) | 15 |
| 1.2.3. TRANSDUÇÃO DO SINAL DE ACTH | 16 |
| 1.2.4. ACTH- HORMÔNIO TRÓFICO? | 17 |
| 1.2.5. LINHAGEM CELULAR Y1 DE CÉLULAS ADRENOCORTICAIS | 18 |
| 1.3. FGF2: ATIVIDADE MITOGÊNICA E INDUÇÃO DE MORTE CELULAR | 20 |
| 1.3.1. FGF2 - FIBROBLAST GROWTH FACTOR 2 | 20 |
| 1.3.2. TRANSDUÇÃO DO SINAL DE FGF2 | 21 |
| 1.3.3. RESPOSTA DA LINHAGEM ADRENOCORTICAL Y1 A FGF2: ATIVIDADE MITOGÊNICA E INDUÇÃO DE MORTE CELULAR | 23 |
| 1.3.4. INTEGRINAS, FATORES DE CRESCIMENTO E PROLIFERAÇÃO CELULAR | 25 |
| 1.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA | 26 |
| 1.4.1. SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION - SSH | 27 |
| 1.4.2. MICROARRAY | 28 |
| 1.4.3. PCR EM TEMPO REAL | 30 |
| 1.5. OBJETIVO | 31 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 32 |
| 2.1. CULTURA CELULAR | 32 |
| 2.2. EXTRAÇÃO DE RNA | 32 |
| 2.2.1. PROTOCOLO DE TRATAMENTO | 32 |
| 2.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL POR TRIZOL | 33 |
| 2.2.3. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL POR GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO | 33 |
| 2.2.4. EXTRAÇÃO DO MRNA – POLI A+ | 33 |
| 2.3. SSH - SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION | 34 |
| 2.3.1. OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS | 34 |
| 2.3.2. REAÇÃO DE BLUNTING KINASE | 38 |
| 2.3.3. PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS OBTIDOS PELO MÉTODO | 38 |
| 2.3.4. REAÇÃO DE LIGAÇÃO EM PUC 18 | 38 |
| 2.3.5. PREPARAÇÃO DE BACTÉRIAS DH10B ELETROCOMPETENTES | 38 |
| 2.3.6. ELETROTRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES | 38 |
| 2.3.7. SELEÇÃO E CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS | 39 |
| 2.3.8. PCR DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS | 39 |
| 2.3.9. BOILING PREP | 39 |
| 2.3.10. SEQÜENCIAMENTOS | 40 |

| | |
|--|------------|
| 2.3.11. PREPARAÇÃO DE DOT BLOTS DE CDNA A PARTIR DE REAÇÕES DE PCR | 41 |
| 2.3.12. PREPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS USADOS COMO SONDA DE CDNA PARA DOT BLOT | 42 |
| 2.3.13. REAÇÃO DE MARCAÇÃO DE RNA PARA REVERSE NORTHERN BLOT | 42 |
| 2.3.14. APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE BIOINFORMÁTICA | 43 |
| 2.4. MICROARRAY | 45 |
| 2.4.1. CONSTITUIÇÃO DO CHIP DE CDNA | 45 |
| 2.4.2. SELEÇÃO VIRTUAL DOS CLONES PARA A LÂMINA | 46 |
| 2.4.3. SELEÇÃO DOS CLONES PARA A LÂMINA | 46 |
| 2.4.4. PCR DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS | 47 |
| 2.4.5. PURIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR | 47 |
| 2.4.6. IMPRESSÃO DAS LÂMINAS | 48 |
| 2.4.7. MARCAÇÃO DO ALVO | 49 |
| 2.4.8. PURIFICAÇÃO DO ALVO | 50 |
| 2.4.9. HIBRIDIZAÇÃO | 50 |
| 2.4.10. LAVAGENS DAS LÂMINAS | 51 |
| 2.4.11. SCANNER | 51 |
| 2.4.12. ANÁLISE DAS IMAGENS | 52 |
| 2.4.13. NORMALIZAÇÃO | 52 |
| 2.4.14. DETERMINAÇÃO DAS PROBABILIDADES DE EXPRESSÃO GÊNICA | 55 |
| 2.4.15. SELEÇÃO DE GENES REGULADOS | 57 |
| 2.4.16. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS GENES | 58 |
| 2.5. OUTRAS TÉCNICAS DE ANÁLISE DE ÁCIDOS NUCLÉICOS | 62 |
| 2.5.1. AMPLIFICAÇÃO DO CDNA POR PCR | 62 |
| 2.5.2. NORTHERN BLOT | 62 |
| 2.5.3. REMOÇÃO DAS SONDAS RADIOATIVAS DA MEMBRANA | 62 |
| 2.5.4. MARCAÇÃO DE SONDAS | 62 |
| 2.5.5. PCR RELATIVO/SEMI-QUANTITATIVO | 62 |
| | |
| 3. RESULTADOS | 65 |
| <hr/> | |
| 3.1. BIBLIOTECAS DE SSH | 65 |
| 3.1.1. GERAÇÃO DE BIBLIOTECA DE SSH PARA GENES ESTIMULADOS POR FGF2 | 65 |
| 3.1.2. GERAÇÃO DE CLONES SSH-FGF2 EM PLASMÍDEOS PUC18 | 69 |
| 3.1.3. ARRANJO DOS CLONES EM CONTIGS E ANOTAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS | 70 |
| 3.1.4. GERAÇÃO DE BIBLIOTECA DE SSH PARA GENES ESTIMULADOS POR ACTH | 75 |
| 3.1.5. SELEÇÃO DE CLONES DAS BIBLIOTECAS SSH-FGF2 E SSH-ACTH POR ENSAIOS DE DOT BLOT E REVERSE NORTHERN BLOT | 80 |
| 3.2. MICROARRAYS | 81 |
| 3.2.1. TRATAMENTOS DE FGF2 | 81 |
| 3.2.2. TRATAMENTOS DE ACTH | 86 |
| 3.2.3. CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS: GENES REGULADOS POR FGF2 | 91 |
| 3.2.4. CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS: GENES REGULADOS POR ACTH | 94 |
| 3.2.5. ESTÍMULO MITOGÊNICO E MORTE CELULAR DISPARADOS POR FGF2 | 96 |
| 3.2.6. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE MORTE CELULAR PROGRAMADA | 108 |
| | |
| 4. DISCUSSÃO | 110 |
| <hr/> | |
| 4.1. AS BIBLIOTECAS SSH DE GENES ESTIMULADOS POR FGF2 E POR ACTH | 110 |
| 4.1.1. CLONAGEM EM PLASMÍDEOS PUC18 | 112 |
| 4.1.2. ARRANJO DOS CLONES EM CONTIGS E ANOTAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS | 112 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.3. SELEÇÃO DE CLONES DAS BIBLIOTECAS SSH-FGF2 E SSH-ACTH POR ENSAIOS DE DOT BLOT E REVERSE NORTHERN BLOT | 113 |
| 4.2. MICROARRAYS | 114 |
| 4.2.1. MICROARRAYS E SSH | 114 |
| 4.2.2. DESENHO EXPERIMENTAL | 115 |
| 4.2.3. DETERMINAÇÃO DOS PROCESSOS CELULARES | 117 |
| 4.2.4. GENES REGULADOS POR FGF2 | 118 |
| 4.2.5. GENES REGULADOS POR ACTH | 121 |
| 4.2.6. ESTÍMULOS ANTAGÔNICOS DISPARADOS POR TRATAMENTOS DE FGF2. | 123 |
| 5. CONCLUSÕES | 128 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 129 |
| 6.1. LIVROS | 129 |
| 6.2. ARTIGOS | 129 |
| 6.3. ENDEREÇOS DE CONSULTA NA INTERNET | 136 |
| <i>CURRICULUM VITAE</i> | 137 |

Abreviaturas

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico
AKT ou PKB –proteína quinase B
cAMP –adenosina monofosfato cíclico
CDK- quinase dependente de ciclina
cDNA – DNA complementar
chx- cicloheximida
DEPC – Dietilpirocarbonato
DMEM – “Dulbecco's modified eagle's medium”
DMSO -dimetil sulfóxido
dNTPs – desoxinucleotídeos trifostato
DTT – ditioneitol
ECM - matriz extracelular
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
FCS – soro fetal bovino
FGF2 – fator de crescimento de fibroblasto 2
GDP – guanosina difosfato
GEF - fator de troca de nucleotídeo guanine
GTP – guanosina trifosfato
IPTG - isopropilthiogalactoside
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA – RNA mensageiro
PBS – solução salina tamponada
PBSA - solução salina tamponada sem Cálcio e Magnésio
PCR- reação em cadeia da polimerase
PI3K – fosfatidilinositol-3 quinase
PKA – proteína quinase dependente de cAMP
TAE - Tris acetato EDTA
TBE - Tris borato EDTA
TKR - receptor de tirosina quinase
SDS - dodecil sulfato de sódio
SSC - solução salina com citrato de sódio
SSH –“suppressive subtractive hybridization”
Tris- Tris(hidroximetil) aminometano
x-gal – 5-bromo-4cloro-indolil- β -D-galactopiranosídeo

Resumo

Uma premissa da Biologia Molecular atual estabelece a ativação de programas de transcrição voltados a processos biológicos específicos. Neste trabalho o objetivo é descrever genes regulados que, uma vez agrupados, são capazes de indicar os programas disparados na linhagem corticoadrenal murina Y1 quando tratada com o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) ou pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH).

O papel de ACTH em células Y1 ainda não está bem estabelecido quanto ao seu potencial mitogênico, uma vez que este hormônio é capaz de agir por diferentes vias de sinalização, apresentando um comportamento dual. Ao traçar o perfil de genes regulados por este hormônio, comparando com o padrão observado por tratamentos de indutores clássicos, espera-se determinar o papel de ACTH frente ao ciclo celular.

FGF2 é classicamente conhecido por sua atividade mitogênica, de forma que, em células Y1, é capaz de induzir a passagem $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ do ciclo celular. Recentemente foi descrita uma nova e surpreendente ação de FGF2, como um indutor de morte seletivo, agindo apenas em células potencialmente tumorigênicas (Costa e Armelin, dados não publicados).

Foram feitos estudos de expressão gênica com ensaios de *microarray*, observando-se o padrão de transcrição da linhagem Y1, bem como de sub-linhagens de Y1 resistentes a morte desencadeada por FGF2, submetidas a tratamentos de FGF2, ACTH e soro.

Os resultados indicam que a) o padrão de expressão gênica observado quando a linhagem Y1 é submetida a tratamentos de ACTH é diferente daqueles desencadeados por mitógenos clássicos; b) o tratamento de FGF2 regula genes envolvidos na via de MAPK, controle do ciclo celular e genes relacionados a processos de adesão, comunicação intercelular e sinalização a partir da matriz extracelular (ECM); c) o comportamento de morte induzida por FGF2 está relacionado a alterações na estrutura da célula, envolvendo mecanismos de adesão, remodelagem de citoesqueleto e transdução de sinais a partir da ECM.

Summary

Nowadays, a molecular biology premise establishes the activation of transcription programs related to specific biological processes. At this work the objective is to describe regulated genes that, once clustered, are able to indicate the running programs when murine adrenocortical lineage Y1 is treated with fibroblast growth factor (FGF2) or by adrenocorticotropin hormone (ACTH).

The mitogenic potential of ACTH treatments in Y1 cells is not well established since this hormone acts by different signaling pathways, presenting a dual behavior. By tracing the profile of genes regulated by this hormone and comparing it to the transcription patterns observed in response to classic mitogens it is expected to determine the ACTH role in the cell cycle.

FGF2 is known by its mitogenic activity, inducing the $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ cell cycle transitions in Y1 cells. Recently it has been described a new and surprising feat of FGF2, acting as a selective death inducer, only in potentially tumorigenic cells (Costa and Armelin, unpublished data).

Microarray assays were used to determine the transcription patterns observed in Y1 lineage, as well as in FGF2 death-resistant Y1 sublineages, submitted to FGF2, ACTH and serum treatments.

The results indicate that a) the gene expression profile displayed when Y1 cells are under ACTH treatments is different from the patterns observed when this lineage is submitted to classic mitogens; b) FGF2 treatment regulates genes involved in the MAPK pathway, cell cycle control and genes related to adhesion processes, intercellular communication and signaling from the extracellular matrix (ECM); c) the death behavior initiated by FGF2 is related to structural alterations in the cell, involving adhesion mechanisms, cytoskeleton remodeling and signal transduction from the ECM.

1. Introdução

1.1. Crescimento e Divisão celular

O crescimento e a divisão celular são características biológicas fundamentais compartilhadas por células de todos os seres vivos, seja uma bactéria, um protozoário, um vegetal ou um mamífero. Uma célula parental cresce, duplica seu material genético e então sofre divisão, originando duas células-filhas que poderão perpetuar o processo. Esta descrição fenomenológica sumária e aparentemente simples esconde processos bioquímicos e moleculares complexos, cujo controle não comporta erros sob pena de comprometer a viabilidade dos organismos, sejam uni ou pluricelulares. Atualmente acredita-se que os mecanismos bioquímicos, moleculares e celulares subjacentes ao crescimento e desenvolvimento dos organismos estão sob o controle de uma vasta rede de sinalização de topologia ainda essencialmente desconhecida. Embora não se conheça a topologia da rede de sinalização celular, entende-se que o controle do ciclo de crescimento e divisão celular envolve três mecanismos bioquímicos fundamentais de regulação: a) transcrição de genes que codificam proteínas instáveis (Almendral *et al*, 1988; Herschman, 1991); b) ativação e inativação de proteínas estáveis por interações alostéricas ou modificações covalentes (Pavletich, 1999); e c) degradação proteolítica específica por ubiquitinação (Verma *et al*, 1997; Rocha *et al*, 2003). Esta tese tem como foco a análise de expressão gênica, com o objetivo de identificar programas de transcrição (ou grupos de genes de expressão coordenada) subjacentes à transição G0-G1-S do ciclo celular. Não cabem no escopo desta tese mecanismos bioquímicos ou processos de ativação e degradação de proteínas, apesar de serem mecanismos fundamentais do sistema de controle do ciclo celular.

Em mamíferos a coordenação do crescimento e divisão celular é exercida por fatores de crescimento e hormônios que estimulam ou inibem a duplicação das células de maneira a orquestrar todo o organismo de acordo com o estágio do desenvolvimento e as necessidades de cada situação.

Hormônios e fatores de crescimento podem ser secretados no meio tissular, atingindo células vizinhas (sinalização parácrina) ou a própria célula (sinalização autócrina); podem ativar células adjacentes mantendo-se covalentemente ligados à superfície da célula produtora (sinalização juxtácrina) ou ainda ser secretados na corrente sanguínea (sinalização endócrina) para alcançar células distantes, participando

da regulação sistêmica do organismo. Estas mensagens químicas extracelulares ativam receptores específicos, iniciando vias de transdução cujos sinais são integrados pela rede celular de comunicação. Nesta tese não estamos particularmente interessados nas etapas que compreendem a transferência de sinais dos receptores transmembranares para a cromatina. Nosso objetivo se restringe à identificação de conjunto de genes induzidos por fatores de crescimento e hormônios específicos.

1.1.1. Fases da divisão celular

Células normalmente se encontram em um estado denominado 'quiescência' ou G0. Neste estado estão fora do ciclo de divisão celular, mas permanecem aptas a responder a sinais mitogênicos externos. Em cultura, a retirada total ou parcial de soro do meio de cultura induz artificialmente ao estado de quiescência ou G0. Uma célula pode permanecer em G0 por dias, semanas ou mesmo por toda a vida do organismo, o que não significa que a célula esteja inativa, uma vez que pode estar exercendo seus papéis funcionais com total eficiência no tecido em que atua (Lodish, 2000).

O disparo de um sinal mitogênico é iniciado com a passagem da fase G0 para a fase G1 (Gap 1) do ciclo, isto é, com a saída do estado de quiescência (**figura1**). A fase G1 é o mais longo período do ciclo podendo durar muitas horas, conforme o tipo celular. Durante este período diversos sinais metabólicos e ambientais são integrados e interpretados, há crescimento do volume celular, com intensa produção de RNA, até a célula alcançar todas as condições para iniciar a fase S. Caso as condições para proliferação não estejam propícias a célula é capaz de abortar o ciclo, voltando para G0 ou desencadeando um processo controlado de morte. Esta é uma etapa do ciclo cuja regulação é peculiar de cada tipo celular e do contexto em que se encontra, diferente das etapas seguintes, de replicação do DNA e mitose, praticamente indistintos entre células diversas (Massagué, 2004).

A fase S é assim denominada por ser a fase de síntese, ou duplicação, do DNA. Esta fase dura entre 6 e 8 horas, ao fim da qual a célula diplóide (2n) passa a ser tetraplóide (4n). A seguir vem a fase G2 (Gap 2), quando mais uma vez a célula pode checar as condições para a divisão, aumentar sua massa e conferir se o material genético foi duplicado corretamente (Lodish, 2000; Cooper, 2000).

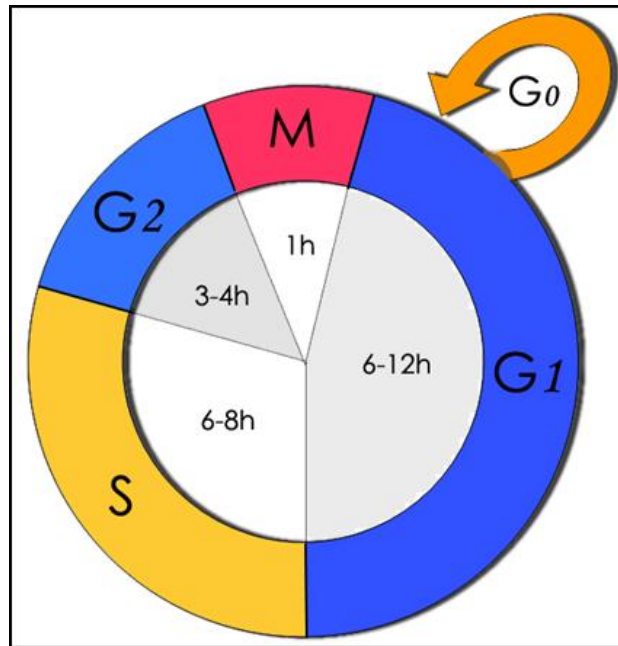


Figura 1: Modelo esquemático do ciclo celular de mamíferos. Quando as condições do meio não são adequadas, a célula interrompe o ciclo celular em um ponto de restrição, entrando em G0. A Intérfase compreende as fases G1, S e G2, enquanto a mitose (M) é dividida em subfases: prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese.

A fase seguinte a G2 é denominada M, de mitose, quando finalmente a célula-mãe é dividida em duas células-filhas de conteúdo celular equivalente. Sob a luz de um microscópio óptico comum, esta é a fase de maior destaque, quando é possível observar os cromossomos dispostos nas fibras do fuso direcionarem-se às extremidades da célula-mãe e em seguida a divisão celular propriamente dita. Durante esta fase há divisões em subfases (prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese), cada qual com suas especificações quanto à posição dos cromossomos, disposição das fibras do fuso, delimitações de carioteca, membrana plasmática etc.

Todo este processo de divisão geralmente leva várias horas, mas há exemplos em que são necessários apenas alguns minutos para que todo o processo seja concluído. Este é o caso de células embrionárias gigantes, logo após a fertilização, em que não há necessidade de crescer para então se dividir, desaparecendo as fase G1 e G2 (Alberts, 1994).

1.1.2. Controle do ciclo celular

Nos eucariotos diversos pontos de checagem ("check points") do ciclo celular são atualmente reconhecidos, ocorrendo nas transições G1/S, S/G2 e mesmo na mitose (Katan & Bartek, 2004; O'Connell & Cimprich, 2005; Kops *et al*, 2005). No fim da fase G1, há um ponto de restrição (Pardee, 1974 e 1989) além do qual, cumpridas todas as etapas anteriores a ele, o processo de início da duplicação do DNA é irreversível.

Para que a transição G0/G1 seja disparada e as células entrem no ciclo, o meio (meio de cultura numa placa ou meio interno num organismo intacto) deve estar propício, isto é, além dos nutrientes essenciais, há necessidade de um balanço favorável entre fatores de crescimento (positivos) e fatores inibitórios (negativos), como indutores de diferenciação, senescência ou morte, contato célula-célula etc. Se predominar a ligação de fatores favoráveis à proliferação celular, cascatas de fosforilação são iniciadas, terminando por desencadear o programa de expressão gênica voltado para a divisão celular (Almendral *et al*, 1988).

O programa proliferativo de expressão gênica é precedido pela rápida ativação de vias de sinalização características, como as vias de Ras/MAPK e de PI3K/AKT, que são ativadas por fosforilação em resposta a ativação de receptores de membrana (Massagué, 2004).

A primeira etapa desse programa envolve a indução dos genes de resposta imediata, ou resposta primária, cuja transcrição ocorre a partir de cinco a quinze minutos de estímulo, fenômeno somente possível porque a expressão destes genes não depende da síntese de novas proteínas. Entre os genes de resposta primária estão os proto-oncogenes *fos*, *jun* e *myc*. Posteriormente são expressos os genes tardios, dependentes da expressão de proteínas, que levam ao menos uma hora para ser expressos. É nessa ocasião que os genes das ciclinas, proteínas regulatórias de ciclo celular, são transcritos.

As ciclinas, proteínas de meia-vida curta, são moléculas assim denominadas devido a seu padrão de expressão, que acompanha o ciclo celular (Evans, 1983). Estas proteínas formam a parte regulatória do complexo ciclina-CDK (Cyclin dependent kinase), um dos principais componentes do sistema de controle do ciclo celular. As CDKs, quinases de serina e treonina, são proteínas estáveis, cuja ativação depende de ciclinas. Ciclinas e CDKs específicas associam-se ao longo do ciclo em fases bem definidas, agindo como chaves capazes de ativar e desativar a progressão durante as etapas do ciclo celular (Pavletich, 1999). Ciclinas D, induzidas pela via de MAPK, associam-se com CDK4 e CDK6 no início de G1 sendo este complexo transportado para o núcleo, onde é fosforilado pela CAK (CDK-activating kinase), tornando-se capaz de fosforilar seus substratos.

Um dos substratos de ciclina D-cdk4/6 é o gene supressor de tumor Rb (retinoblastoma), cuja fosforilação é requisito para que a célula entre em S. Quando as células não estão em divisão, ou no início de G1, Rb encontra-se hipofosforilado. Nesta condição, Rb impede a expressão de genes essenciais para a entrada da célula em S de duas maneiras: ligando-se fortemente a segmentos do DNA e seqüestrando os fatores de transcrição do grupo E2F. Os principais complexos descritos como capazes de fosforilar Rb são ciclina D1,2,3-CDK4,6; sendo o complexo ciclina E-CDK2 também capaz de exercer tal função. Quando Rb é fosforilado em sítios específicos, libera E2F, permitindo a expressão de genes necessários para a progressão G1 → S como, por exemplo, ciclina E (Lewin, 2000). O *turnover* de ciclina D depende da inibição da via de PI3K/AKT, quando então a proteína deixa o núcleo e é degradada pelo sistema proteossomal dependente de ubiquitina.

Ciclina E forma um complexo com CDK2 na fase tardia de G1, regulando a transição para S. O complexo CDK2-Ciclina A atua em S enquanto complexos de CDK1-ciclina A/B participam das fases G2/M do ciclo celular.

Desta maneira, é lógico pensar que vários fatores que agem por estimular ou inibir a progressão no ciclo celular tenham de alguma forma ação dirigida a Rb/E2F. A ação de inibidores de CDK (cki) é uma forma de bloquear a progressão no ciclo celular. Da mesma forma que as ciclinas, os cki são proteínas instáveis, sendo sintetizadas e degradadas em períodos específicos do ciclo celular. Quando ativos estes inibidores ligam-se ao complexo ciclina-CDK, inativando-o. Existem duas famílias de inibidores de ciclinas, assim separados de acordo com sua estrutura e alvos de ação: os INK4 e CIP/Kip. A família dos inibidores INK4 (*inhibitors of CDK4*) é específica para CDK4 e CDK6 e abrange quatro membros: p16^{ink4a}; p15^{ink4b}, p18^{ink4c} e p19^{ink4d}. A família dos inibidores CIP/Kip, composta pelos membros p21^{Cip1/WAF1}; p27^{Kip1}; p57^{Kip2}, age sobre todas as CDKs de ação em G1 e S. Apesar de atuarem como inibidores fortes de CDK2 dependentes de ciclinas E e A, são reguladores positivos de quinases dependentes de ciclina D, garantindo a estabilidade do complexo (Sherr & Roberts, 1999, 2004).

1.2. Papel do ACTH no desenvolvimento e manutenção do córtex da adrenal

1.2.1. As glândulas adrenais

As glândulas adrenais, como o próprio nome diz, estão situadas junto aos rins, acima destes. São formadas por duas porções, com características e funções distintas. A porção central, equivalente a cerca de 20% do total da glândula, corresponde à medula, relacionada ao controle das funções de sistema nervoso simpático, sendo responsável pela síntese de adrenalina e noradrenalina.

O córtex da glândula adrenal, porção de origem mesodérmica, é responsável pela secreção de corticosteróides, hormônios sintetizados a partir de colesterol, com estruturas químicas bastante semelhantes. Mais de 50 diferentes esteróides já foram isolados a partir da adrenocórtex, sendo os dois hormônios principais a aldosterona, um mineralocorticóide, e o cortisol, um glucocorticóide.

A principal função dos mineralocorticóides é promover o transporte de sódio e potássio (minerais) por certas porções dos rins, havendo conseqüências para o volume dos fluidos extracelulares e pressão arterial, exercendo controle osmótico no organismo.

O cortisol está relacionado à manutenção da glicemia, agindo sobre o metabolismo de proteínas e de ácidos graxos. Seus efeitos levam à redução dos estoques de proteínas por todos os tecidos, com exceção do fígado, e à mobilização de ácidos graxos dos tecidos adiposos. Sua ação está também vinculada à redução de sua resposta inflamatória, bem como a resposta a alergias (Guyton, 1996).

O córtex da glândula adrenal é composto por três camadas distintas. A *zona glomerulosa* é a região mais externa e delgada, responsável pela secreção de aldosterona. A *zona fasciculata* situa-se na região intermediária, envolvendo a *zona reticulada*. Estas duas são responsáveis pela produção de cortisol e andrógenos.

1.2.2. O hormônio adrenocorticotrópico (ACTH)

A liberação de CRH (corticotropin releasing hormone) pelo hipotálamo induz a secreção do hormônio adrenocorticotrópico pela hipófise.

O hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) é proveniente da clivagem da proteína POMC (pró-opiomelanocortina) por células localizadas na porção anterior da hipófise. ACTH é um peptídeo composto por 39 aminoácidos, sendo que os 24 aminoácidos da região N-terminal são determinantes para o desencadeamento da resposta. A liberação de ACTH na corrente sanguínea ocorre de maneira concomitante com a liberação de outros fatores, também originários da clivagem de POMC: pro- γ -MSH (pro- γ -melanocyte-stimulating hormone) e β -LPH (β -lipotrophin).

1.2.3. Transdução do sinal de ACTH

A ação do ACTH na célula-alvo inicia-se com a ligação a um receptor transmembranar do tipo sete hélices, associado à proteína G (**figura 2**). A proteína G é constituída por três subunidades: α , β e γ . A subunidade α encontra-se ligada a uma molécula de GDP enquanto a proteína está inativa. Após a ligação do hormônio ao receptor ocorre uma mudança conformacional na proteína G de maneira que a subunidade α troca a molécula de GDP associada por GTP e dissocia-se do subcomplexo $\beta\gamma$. Desta maneira são formados dois componentes ativos: a subunidade α e o complexo $\beta\gamma$. Devido à sua atividade GTPásica, a proteína G é capaz de voltar à forma inativa por si só, catalisando sua própria inativação.

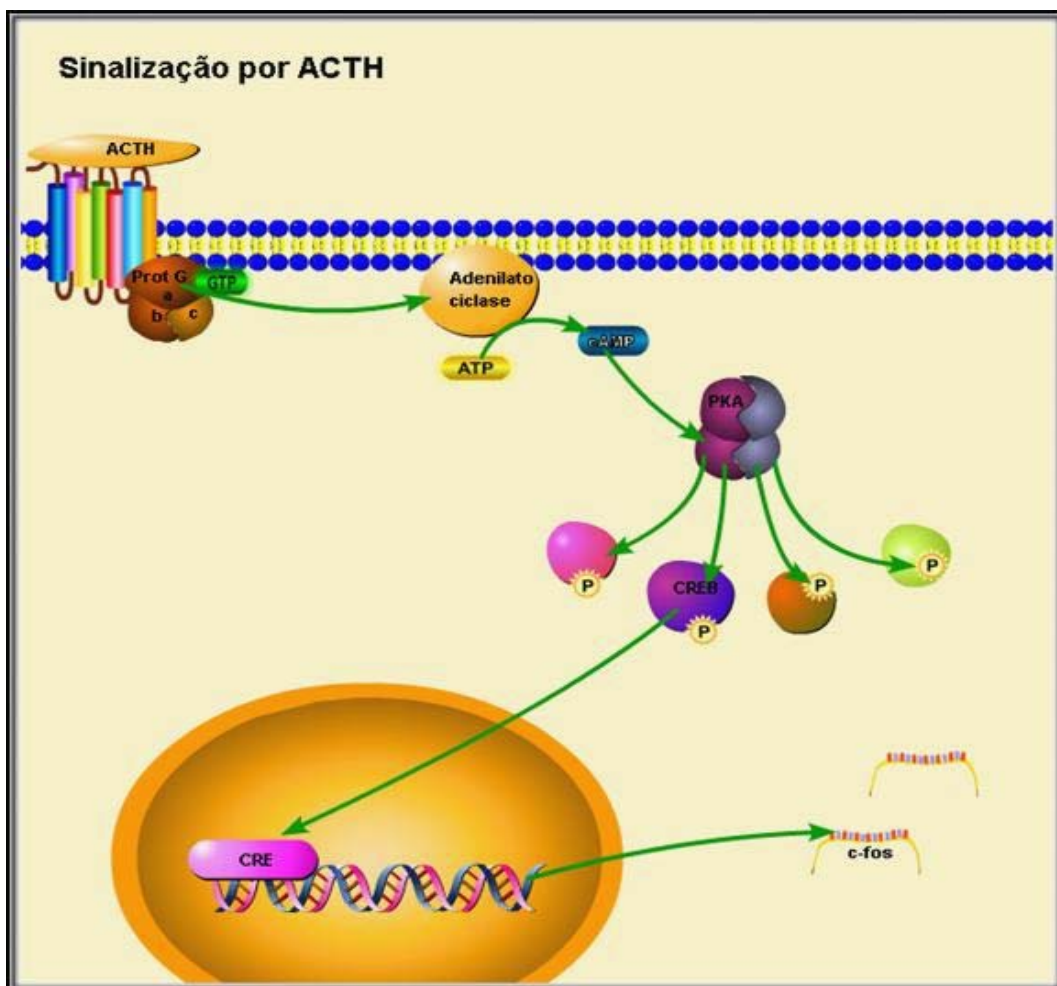


Figura 2: Esquema ilustrativo da principal via de transdução de sinal por ACTH.

A subunidade α ativada age estimulando a adenilato ciclase, uma enzima presente na membrana celular que converte ATP em cAMP (AMP cíclico). O cAMP age como segundo mensageiro, ativando PKA (proteína quinase dependente de cAMP). Esta

enzima é constituída por duas subunidades catalíticas e duas subunidades reguladoras. A ligação de cAMP nas subunidades reguladoras libera as subunidades catalíticas a fosforilarem suas proteínas-alvo, como por exemplo, CREB (*cAMP -response element binding*). CREB é capaz de ligar-se à região do DNA denominada região CRE (*cAMP-response element*), promovendo a transcrição de genes específicos, como por exemplo, o gene *c-fos*. Além desta via canônica, ACTH, através de seus receptores específicos, ativa outras vias sinalizadoras como, por exemplo, a via de PKC, por mecanismos ainda obscuros.

1.2.4. ACTH- hormônio trófico?

O ACTH é um hormônio que regula a função esteroidogênica, além do crescimento e da proliferação celular no córtex da adrenal. Enquanto sua ação esteroidogênica se apresenta bem elucidada (Stocco, 2000), o papel de regulador no crescimento e de proliferação celular ainda não está totalmente esclarecido.

Por muito tempo ficou estabelecido que ACTH agia como um importante fator de manutenção da glândula adrenal (para uma revisão, Bicknell 2002). A remoção da hipófise ou a supressão de corticotropina causam a atrofia da glândula adrenal e, de maneira inversa, o tratamento com ACTH causa o aumento do tamanho da adrenal (Bransome, 1968). Em 1978 Rao e colaboradores observaram que ratos que recebiam anticorpos anti-ACTH, neutralizando o hormônio, embora apresentassem redução da atividade esteroidogênica, mostravam um aumento mitogênico da glândula adrenal. A estes dados contraditórios somou-se o fato que embora *in vivo* a elevação dos níveis circulantes de ACTH levava a hiperplasia da glândula adrenal, em linhagens celulares e em culturas primárias da glândula adrenal, a resposta ao tratamento de ACTH parecia ser inversa, com inibição de crescimento.

Foram estudados outros peptídeos derivados de POMC como possíveis candidatos ao fator de estímulo mitogênico da adrenal e verificou-se que pro- γ -MSH, após sofrer clivagens por tripsina e perder a porção referente ao γ -MSH era capaz de exercer atividade mitogênica em células adrenais tanto *in vivo* como *in vitro* (Estivariz *et al*, 1982), entretanto, este peptídeo não era encontrado na circulação sanguínea.

Em 2001 foi descrita uma proteína até então desconhecida, contendo o sítio de catálise de tripsina e com seqüência-sinal para secreção, sendo denominada AsP - adrenal secretory protease (Bicknell *et al*, 2001). Esta proteína teve expressão detectada nas zonas glomerulosa e fasciculata da adrenal, bem como na linhagem adrenocortical

Y1. AsP é responsável por clivar pro γ -MSH, liberando a porção N-terminal (N-POMC 1-52), responsável pela ação mitogênica na célula corticoadrenal.

Trabalhos de Lotfi e colaboradores (1997) mostram que em cultura de células de camundongo, ACTH pode ter um papel dual, exercendo ação de proliferação celular e ação antimitogênica por vias de sinalização distintas, sendo o estímulo de proliferação mediado por vias independentes de cAMP, mas dependentes da via de MAPK, enquanto o efeito de antimitógeno parece ser dependente de cAMP/PKA. Pulsos curtos de ACTH, de até duas horas, são capazes de ativar proteínas (ERK1 e 2) e transcrever genes (fos e jun) relacionadas com a proliferação celular, induzir a progressão à fase S e estimular a proliferação; enquanto tratamentos longos ou pulsos durante a fase intermediária de G1, acabam por bloquear o efeito mitogênico deste hormônio (Lotfi *et al*, 1997, 2000, 2001).

Em células tumorais adrenocorticais de camundongo, linhagem Y1, que apresentam amplificação do proto-oncogene c-ki-Ras e superexpressão de seu produto na forma ativa (c-Ki-Ras-GTP), ACTH é capaz de desativar proteínas de vias mitogênicas constitutivamente ativadas por Ki-Ras, como P-AKT (Forti *et al*, 2002), agindo, desta forma, como um supressor de tumor (Costa *et al*, 2004).

Nesta tese procuramos identificar grupos de genes de expressão coordenada sob regulação de ACTH em comparação com FGF2 e soro, agentes reconhecidamente capazes de iniciar uma resposta mitogênica.

1.2.5. Linhagem celular Y1 de células adrenocorticais

A linhagem celular Y1 é um dos modelos escolhidos pelo laboratório para estudar os mecanismos de controle do ciclo celular (**figura 3**). Trata-se de uma linhagem proveniente de um tumor funcional de córtex da glândula adrenal de camundongo (Yasumura, 1966). Apesar de sua origem tumoral a linhagem Y1 é estável e seu comportamento fisiológico é bastante semelhante às células da região fasciculata (região intermediária) do córtex da glândula adrenal, sendo considerado um dos modelos mais robustos para estudos sobre mecanismos de ACTH em adrenais (para uma revisão, Rainey *et al*, 2004).

O uso da linhagem Y1 de células adrenais traz vantagens metodológicas fundamentais: a) isolamento da célula do controle homeostático do organismo; b) ensaios quantitativos através das técnicas em cultura de células de mamífero e c) abordagem genética de células somáticas através de transgênese com DNA

recombinante em vetores plasmidiais ou virais. Além destas vantagens metodológicas oferece a conveniência de evitar o uso de tecidos humanos e/ou sacrifício de animais.

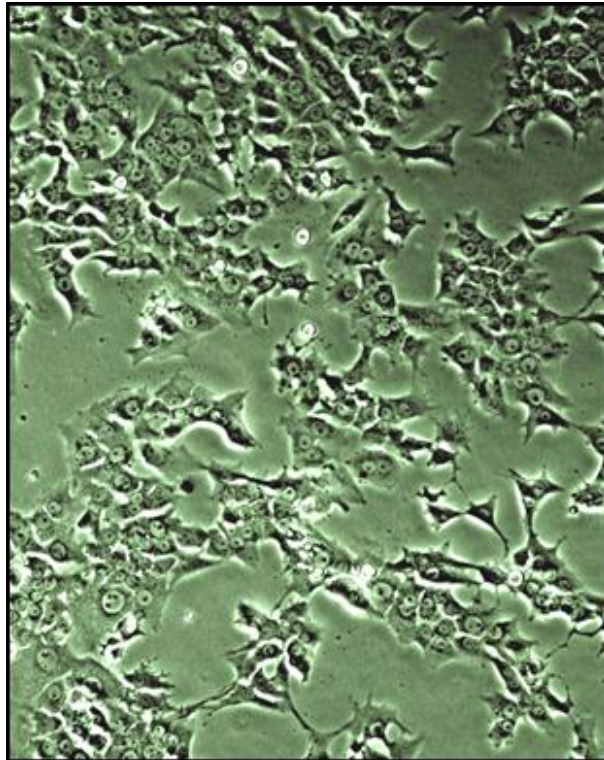


Figura 3: Linhagem adrenocortical murina Y1.

Uma das características que confere o caráter transformado à linhagem Y1 é a amplificação genotípica do proto-oncogene *c-kis-Ras* por cerca de 50 a 80 vezes. Isso faz com que o RNA e a proteína *c-Ki-Ras* sejam superexpressos e, conseqüentemente, proteínas a jusante desta via apresentem níveis basais de ativação como, por exemplo, a proteína antiapoptótica AKT/PKB (Forti & Armelin, 2000; Forti *et al*, 2002), que por sua vez confere níveis basais da proteína *c-Myc* (Lepique *et al*, 2004).

Esta linhagem responde ao hormônio ACTH com arredondamento celular e ativação aguda da esteroidogênese, além de rápida transcrição de proto-oncogenes das famílias *fos* e *jun* (Kimura *et al.*, 1993; Lotfi, *et al*, 2000) e desestabilização da proteína *c-Myc* (Lepique *et al*, 2000). Como resultado final, ACTH é capaz de, agindo por vias paralelas e independentes, induzir a síntese de hormônios esteróides e atuar na regulação da transição $G0 \rightarrow G1$ do ciclo celular.

1.3. FGF2: atividade mitogênica e indução de morte celular

1.3.1. FGF2 - Fibroblast growth factor 2

O primeiro fator de crescimento de fibroblasto (FGF) foi inicialmente descrito em 1973 por Armelin, ao constatar a presença de “fatores” em extrato de hipófise com ação mitogênica em fibroblastos 3T3. Desde então os estudos sobre FGF avançaram bastante e atualmente os FGFs constituem uma família de 22 membros agrupados por sua estrutura primária e 3D em barril-beta (**figura 4**). Esta família de proteínas é bastante conservada evolutivamente, havendo membros descritos desde nematóides até mamíferos. Em humanos são descritos 18 membros, com homologia variável de 15 a 85% (Mohammadi *et al*, 2005).

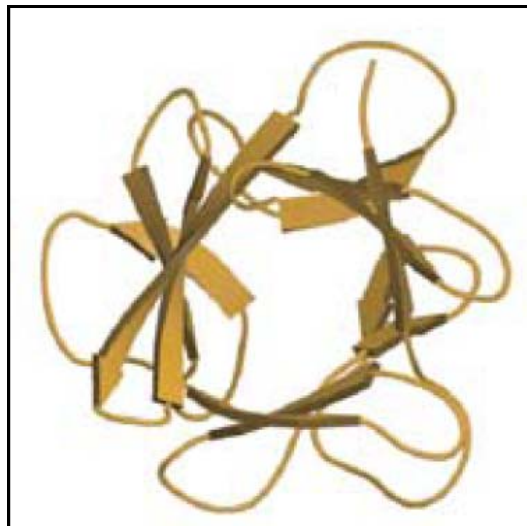


Figura 4: Estrutura tridimensional de FGF2 (extraído de Mohammadi, 2005).

Os FGFs são peptídeos envolvidos em diversos processos biológicos, tais como desenvolvimento embrionário, migração celular, cicatrização, angiogênese, diferenciação etc. A expressão de FGFs pode ser bastante variável, sendo FGF2 o mais ubíquo, enquanto outras formas, como FGF4, são expressas em situações bastante específicas durante o desenvolvimento embrionário (Dailey *et al*, 2005).

A sinalização por FGF ocorre através da ligação e ativação de receptores localizados na membrana celular e, posteriormente, à internalização e translocação deste complexo até o núcleo (Maher, 1996; Keresztes *et al.*, 1999; Bossard *et al*, 2003).

FGF2, ou FGF básico, apresenta 5 isoformas que variam de 18kDa a 34kDa. Estas isoformas são decorrentes dos diferentes sinais para início de tradução: três codons de início de tradução CUG e um códon AUG (Prats *et al*, 1989; Vagner *et al.*, 1996). A isoforma de 18kDa, de baixo peso molecular, é a única secretada pelas células, através de mecanismos não canônicos ainda desconhecidos. Neste trabalho foi usada a isoforma recombinante de 18kDa produzida em *E. coli*.

1.3.2. Transdução do sinal de FGF2

Externamente à célula, FGF é capaz de ligar-se a receptores com atividade intrínseca de tirosina quinase (RTK), localizados na membrana plasmática. Atualmente existem quatro genes descritos para receptores de FGF (FGFR), com suas variantes devido ao *splicing* alternativo, o que pode conferir uma enorme gama de possibilidades entre ligante e receptor, com diferenças de afinidades e especificidade (Ornitz *et al.*, 1996).

Os FGFR específicos são ativados após a ligação de FGF, na presença de proteoglicanos de membrana (heparan sulfato) (**figura 5**). A ligação destes fatores bem como a própria interação receptor-receptor é capaz de estabilizar a forma ativada dimérica de FGFR. Assim é alterado o equilíbrio entre as configurações do receptor: fechada autoinibida ou dimérica ativada (Schlessinger, 2003). Após a ligação de FGF, os receptores tornam-se dímeros capazes de fosforilar sítios de tirosina em suas porções intracelulares, bem como proteínas citoplasmáticas.

O domínio SH2 presente na proteína citoplasmática adaptadora GRB2 (growth factor receptor protein bound 2) é capaz de reconhecer e interagir com resíduos citoplasmáticos específicos do complexo ativo de FGFR. Os domínios SH3 presentes em GRB2 são capazes de interagir com os domínios ricos em prolina de SOS, tornando-os constitutivamente associados. SOS é um fator de troca de nucleotídeo guanina (guanine nucleotide-exchange protein-GEF) com papel atuante na proteína Ras. A ligação destas proteínas na porção interna da membrana plasmática forma um grande complexo formado pelo TKR ativado, GRB2 e SOS que então é capaz de trocar o GDP ligado à proteína Ras por GTP, ativando-a.

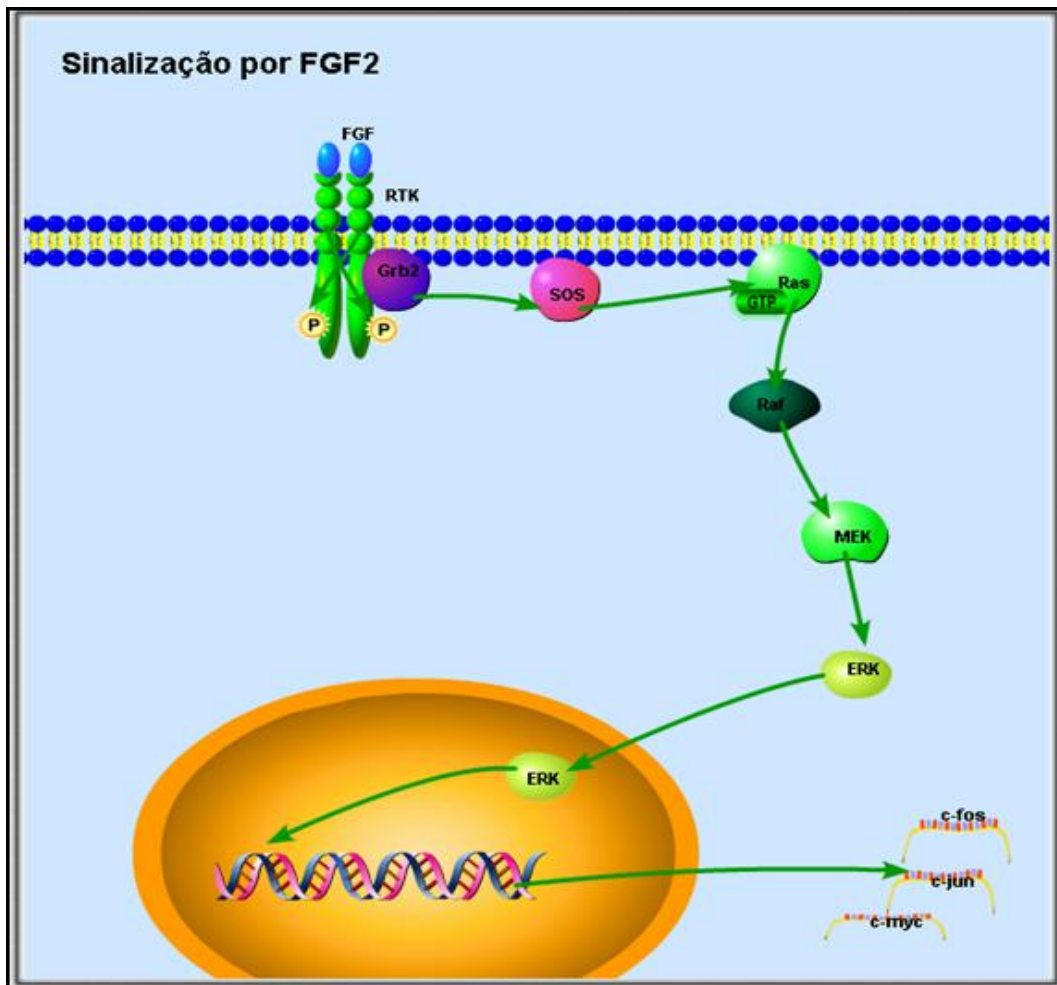


Figura 5: Esquema ilustrativo da principal via de transdução de sinal por FGF2.

Ras é encontrado ligado à membrana interna da célula, bem como a membranas de organelas intracelulares, como os endossomos ou Golgi. Isto pode ser decorrência da internalização do complexo ligante-receptor, bem como das proteínas associadas, o que teria consequências para a duração do estímulo, uma vez que se cria um microambiente no qual as proteínas necessárias para a transdução do sinal ficam próximas (Sorkin & von Zastrow, 2002).

As três isoformas de Ras descritas (K-Ras, N-Ras e H-Ras) apresentam o mesmo tipo de domínio efetor, no entanto, a porção hidrofóbica que ancora cada uma à membrana é distinta, determinando sítios preferenciais de localização para cada isoforma e conseqüentemente respostas específicas mediadas por cada uma. Recentemente foi descrito um padrão de localização subcelular de Ras de acordo com o padrão de palmitoilação-depalmitoilação (Rocks *et al*, 2005).

A cascata de sinalização é prosseguida com a ativação da proteína Raf (MAP-kinase-kinase-kinase), que se desloca até a membrana e é ativada por Ras. Raf por sua vez fosforila MEK (MAP-kinase-kinase), que finalmente ativa MAPK (mitogen activated protein kinase) ao fosforilar duplamente em resíduos de treonina e tirosina. A proteína ativada se desloca até o núcleo, induzindo a transcrição de genes específicos, como *c-fos*, *c-jun* e *egr1*.

1.3.3. Resposta da linhagem adrenocortical Y1 a FGF2: atividade mitogênica e indução de morte celular

FGF2 é um mitógeno clássico em fibroblastos normais 3T3. Em células Y1 FGF2 é capaz de: a) ativar de forma rápida e transiente as proteínas ERK1 e 2 (5 minutos); b) aumentar os níveis basais de P-AKT; c) induzir a transcrição gênica dos proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* (30 minutos); d) induzir as proteínas c-Fos e c-Myc (1 hora) e ciclina D1 (5 horas); e) iniciar a síntese de DNA (8-9 horas) (Lotfi *et al*, 1997; Lotfi & Armelin, 2001; Rocha *et al*, 2003; Schwindt *et al*, 2003). Este padrão de resposta a FGF2 pode ser observado em tratamentos sustentados ou em pulsos curtos, de até duas horas (Lotfi & Armelin, 2001), indicando que o disparo do programa de transcrição mitogênico que garante a expressão gênica necessária às células para a passagem pelas fases $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$, é desencadeado em apenas duas horas de estímulo.

No trabalho desenvolvido por Érico T. Costa durante seu doutoramento com o Prof. Hugo Armelin foi observado que tratamentos de FGF2 apesar de induzirem a passagem $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ reduziam drasticamente a viabilidade das células Y1, incapacitando a linhagem de atingir a transição S/G2.

Ao observar o comportamento destas células quanto à capacidade de formação de colônias ou a contagem do número de células em curvas de crescimento, as células que haviam recebido estímulo de FGF2, mesmo na presença de soro, apresentavam redução drástica em sua capacidade de proliferação. Em ensaios *in vivo* foi observado que a capacidade das células Y1 de gerar tumor era reduzida em cerca de 50% quando os animais recebiam doses de FGF2. Neste trabalho, não foi detectado fragmentação de DNA (Tunel e fragmentação em gel de agarose), sugerindo que FGF2 ative uma via de morte celular independente da via canônica de apoptose (Costa *et al*, 2004, E. Costa, tese de doutoramento). Dados experimentais mostram que a resposta de morte induzida por FGF2 é desencadeada nas primeiras 2h de tratamento, à semelhança da resposta

mitogênica. Quando células Y1 bloqueadas na interface G0/G1 são tratadas com soro + FGF2 por 2 horas, entram na fase S 8-9 horas depois do tratamento, mas não completam a replicação do DNA e não atingem a mitose (Costa, 2005, tese de doutoramento). Portanto, é possível que FGF2 induza, nas células Y1, um conjunto de genes responsáveis pela morte celular, além dos genes primários cuja indução é sabidamente obrigatória para a célula progredir através de G1 e entrar na fase S (Lofti e Armelin, 2001). Um dos principais objetivos desta tese é testar esta hipótese, buscando os genes de morte celular induzidos por 2h de FGF2 em células Y1. Para tanto os genes induzidos por FGF2 foram comparados em células Y1 e sublinhagens de Y1 resistentes à morte provocada por FGF2.

Foram selecionadas a partir de células Y1 sublinhagens clonais resistentes à morte induzida por FGF2, as quais foram denominadas "FR", "FGF2 Resistant cells" (Costa, 2005, tese de doutoramento). As células do clone FR3 mostram os seguintes traços fenotípicos: a) não apenas resistem à morte por FGF2 como crescem melhor na presença deste fator; b) apresentam capacidade tumorigênica 50% menor em relação à linhagem parental; c) quando bloqueadas em G0/G1 mostram baixos níveis basais de síntese de DNA e, se estimuladas por soro e/ou FGF2, exibem um período de G1 de 11h até entrar na fase S, tempo muito superior ao G1 de 8-9h característico das células parentais Y1, sugerindo um fenótipo mais próximo ao de uma célula normal (Costa, 2005, tese de doutoramento). Apesar disso, as células Y1-FR3 mantêm altos níveis basais de K-Ras-GTP, por conseguinte é forçoso concluir que alterações desconhecidas à jusante de K-Ras-GTP devem responder pela resistência desta sublinhagem ao FGF2.

Há um outro exemplo interessante de sublinhagens de Y1 resistentes a FGF2, neste caso são clones estavelmente transfectados com o mutante dominante negativo H-rasN17, cujo produto reprime a ativação da proteína K-Ras superexpressa. Nas sublinhagens Y1-RasN17 a expressão da proteína RasN17 é condicionalmente dependente de indução por dexametasona. Um bom exemplar é o clone Y1-RasN17-3.1, que na ausência de dexametasona mostra fenótipo semelhante ao da linhagem parental Y1; mas, em presença de dexametasona as células Y1-RasN17-3.1 exibem altos níveis de RasN17 que causam redução drástica nos níveis basais de K-Ras-GTP, levando a traços fenotípicos encontrados nas células Y1-FR3: a) resistência à morte induzida por FGF2 e b) G1 de 11h quando células bloqueadas em G0/G1 são estimuladas por soro e/ou FGF2 para entrar na fase S (Forti *et al*, 2002; Moraes M., 2002, dissertação de mestrado). Em conclusão, duas sublinhagens de Y1, FR3 e RasN17-3.1+dexametasona mostram tempo mais longo na transição G0/G1/S que as parentais Y1 e provavelmente devem mostrar diferenças importantes no conjunto de genes induzidos por 2h de FGF2.

Estas considerações preliminares são importantes uma vez que nesta tese vamos comparar genes induzidos por 2 horas de FGF2 em linhagem que morre (Y1 parental) e sublinhagens que sobrevivem (FR3 e RasN17-3.1+dexametasona) em presença de FGF2, com o intuito de descobrir um conjunto putativo de genes cuja indução é parte do programa de morte induzido por FGF2.

1.3.4. Integrinas, fatores de crescimento e proliferação celular

As integrinas são uma grande família de receptores membranares com função primária de adesão. São proteínas heterodiméricas compostas por uma subunidade alfa (dezoito formas descritas) e outra beta (oito formas descritas), unidas por ligações não-covalentes. Foram inicialmente descritas como integrinas por causa de sua função de ligar matriz extracelular ao citoesqueleto. Atualmente sabe-se que estas proteínas desempenham outras funções, como regular as interações célula-célula, atuar como receptores de matriz para proteínas plasmáticas solúveis, e ainda serem capazes transmitir sinais não apenas para o interior, mas também para o exterior da célula (Miranti & Brugge, 2002).

Diferente de outros tipos de receptores de membrana, como receptores hormonais, as integrinas ligam-se a seu substrato com uma afinidade muito menor, de forma a não comprometer a liberdade de movimento da célula. Por outro lado, as integrinas estão representadas na superfície da célula por cerca de dez a cem vezes mais que receptores hormonais. A ligação entre integrinas e seus ligantes parece depender de íons bivalentes, como Ca^{2+} ou Mg^{2+} , nos sítios extracelulares da proteína. A ligação do tipo iônica pode influenciar tanto a afinidade quanto a especificidade da ligação (Alberts, 1994).

Muitos sinais extracelulares só conseguem ser transmitidos se a célula estiver devidamente aderida ao substrato, característica que é perdida por muitas células transformadas. A proliferação celular depende da coordenação de sinais provenientes de receptores de tirosina quinase (RTK) ativados por fatores de crescimento solúveis e de integrinas ativadas por proteínas da matriz extracelular.

A transdução do sinal das integrinas é iniciada pelo agrupamento das integrinas e polimerização de actinas, que fosforilam e ativam a proteína FAK (focal adhesion kinase). Esta recruta proteínas que contêm o domínio SH2 como Src e Fyn, esta, uma subunidade de PI3K. Desta forma são ativadas diversas vias a partir das integrinas, como a via de Ras/Erk; PI3K/Akt e Crk/Rac (Miranti & Brugge, 2002; Assoian & Schwartz, 2001).

A ativação combinada de RTK e integrinas garante a sustentação do sinal das MAPK (ERK1 e ERK2) e de rho GTPases (Rho, CDC42, Rac), levando a indução de ciclina D1, a redução dos inibidores de ciclina-CDK p21^{cip} e p27^{kip}, a fosforilação de Rb e progressão para a fase S do ciclo (Assoian & Schwartz, 2001). Lin e colaboradores (1997) mostraram que a ativação de RTKs e de Ras são eventos independentes da ancoragem em células de fibroblasto NIH3T3, no entanto a progressão do sinal por Raf, Mek e Erk são dependentes da adesão celular. De acordo com este autor, embora as integrinas compartilhem alguns pontos da via de sinalização de MAPK com os fatores de crescimento (Raf, Mek, Erk), o sinal mediado por integrinas é independente da ativação de Ras.

A atividade das integrinas pode ser modulada por sinais gerados no interior da célula. Este tipo de regulação conhecida como "inside-out" é dependente da proteína talina, que serve como conector entre integrinas e o citoesqueleto de actina. A sinalização de dentro para fora da célula pode ocorrer com a fosforilação da cauda citoplasmática da integrina, de forma a alterar a conformação protéica e conseqüentemente modular a afinidade pelo ligante ou ainda com a redistribuição protéica na superfície celular (Alberts, 1994; Arias-Salgado *et al*, 2005).

Fica claro que o sinal de proliferação não depende apenas da presença de mitógenos, mas também do ambiente e da condição em que a célula se encontra, de modo que as integrinas agem como um conjunto de sensores físicos e químicos capazes de informar e conduzir a célula à decisão final.

1.4. Análise de expressão gênica

Uma premissa básica da biologia molecular e celular atual pressupõe que a cada função celular importante existe subjacente um programa coordenado de transcrição gênica. Por conseguinte, há um grande interesse em analisar expressão gênica com vista a: definir marcadores para tipos celulares específicos; entender os mecanismos de resposta celular a drogas; elucidar vias de sinalização; caracterizar estágios de desenvolvimento; revelar marcadores específicos para diagnóstico de doenças; etc.

Dada a importância da análise de expressão gênica muitas abordagens tem sido desenvolvidas para esse fim. De forma isolada ou combinada, é possível citar: northern blot (Sambrook, 1989), differential display (Liang & Pardee, 1992); PCR e PCR em tempo

real (Higuchi *et al*, 1992, 1993; Holland *et al*, 1991); SAGE - análise seriada da expressão gênica (Velculescu *et al*, 1995); microarray (Schena *et al*, 1995); SSH - hibridização por subtração supressiva (Diatchenko *et al*, 1996; Gurskaya *et al*, 1996; Diatchenko *et al*, 1999); MPSS- seqüenciamento de assinatura massiva em paralelo (Brenner *et al*, 1999, 2000). Neste trabalho foram usadas as técnicas de SSH, microarray, Northern Blot, e PCR em tempo real.

1.4.1. Suppression Subtractive Hybridization - SSH

A técnica de hibridização por subtração supressiva "suppression subtractive hybridization - SSH" (Diatchenko *et al*, 1996; Gurskaya *et al*, 1996; Diatchenko *et al*, 1999) permite a seleção de moléculas de RNA mensageiro expressas diferencialmente quando são comparadas duas populações. Estas populações de RNA podem ser procedentes de: tecido normal versus tecido doente; células de dois tecidos diferentes; células estimuladas com uma droga versus controle etc. A técnica é capaz de selecionar os mensageiros diferencialmente expressos, sendo que seu maior mérito está em ressaltar aqueles de baixa representatividade. Para que sejam observados genes de expressão elevada e também genes de expressão reduzida são necessárias duas partidas de SSH, uma vez que só é possível observar os genes regulados positiva ou negativamente em cada vez.

O passo de normalização equaliza a abundância de cDNA dentro da população alvo enquanto a subtração simultânea exclui as seqüências comuns às duas populações comparadas (uma vez que é colocado excesso do material a ser subtraído). Em alguns casos, os níveis dos cDNAs diferencialmente expressos podem ser enriquecidos em até 1000 vezes (Diatchenko *et al*, 1999), aumentando o número de genes regulados pelo tratamento de interesse capazes de serem detectados.

Esta técnica, diferente de outras que indicam a intensidade de expressão dos genes (microarray ou SAGE), tem como principal vantagem destacar a variedade de genes regulados, mesmo em condições de baixa variação, havendo a clonagem cega de fragmentos originados dos genes de expressão alterada e a possibilidade de encontrar novos genes.

1.4.2. Microarray

A técnica de microarray foi primeiramente descrita em 1995 (Schena *et al*) e desde então tem sido amplamente utilizada para analisar o padrão de expressão gênica, uma vez que permite a verificação da manifestação de milhares de genes simultaneamente.

Trata-se de uma lâmina de vidro sobre a qual são impressas seqüências de DNA conhecidas (produtos de PCR, oligonucleotídeos), as chamadas sondas. A partir do RNA de duas condições distintas é preparado o cDNA, aos quais são incorporados nucleotídeos marcados com fluorescência distinta (Cy3 e Cy5). As duas populações de cDNA marcados são submetidas, simultaneamente, à hibridização com a lâmina contendo as sondas de interesse, permitindo que os alvos presentes em solução sejam pareados e assim possam revelar a expressão dos genes. Haverá competição entre as duas populações de cDNA pelas sondas, e a resposta final é um resultado relativo de expressão entre as duas populações (figura 6).

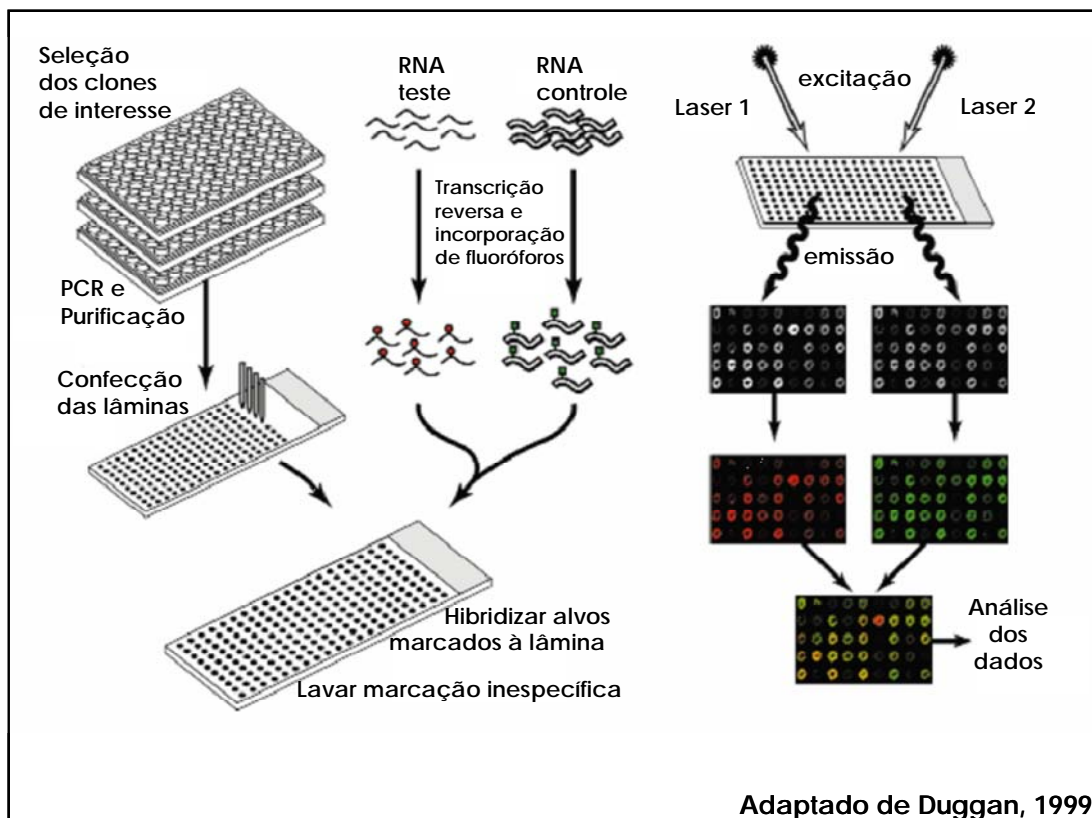


Figura 6: Esquema da técnica de microarray. Clones selecionados são amplificados por PCR, purificados e, com o uso de um robô (spotter) são impressos em uma lâmina de vidro. Duas amostras de RNA, teste e controle, são submetidas a reações de transcrição reversa em paralelo, cada uma recebendo um corante

diferente Cy3 (verde) ou Cy5 (vermelho). As duas amostras são purificadas, desnaturadas e colocadas simultaneamente para hibridizar com a lâmina contendo os clones de interesse. Após as devidas lavagens, a lâmina é lida em um scanner, a imagem é interpretada por um software específico e os dados são analisados por ferramentas estatísticas.

O maior mérito desta técnica está na possibilidade de observar o padrão de expressão de um grande número de genes em um único ensaio. Lâminas de oligonucleotídeos de alta densidade chegam a conter representantes de todo o genoma de um organismo em uma única lâmina. Neste trabalho o número de seqüências estudadas restringiu-se a cerca de mil, contemplando genes envolvidos no controle do ciclo celular; vias de transdução de sinal; reações de morte programada; genes de proteínas relacionadas a metabolismo etc. Acreditamos que ao agrupar os genes por padrão de expressão, elevado ou reduzido, e inferir as funções e processos em que estes genes estão envolvidos é possível elaborar uma hipótese a respeito dos mecanismos celulares ativados no contexto celular de interesse.

A enorme quantidade de dados gerada por esta técnica e a complexidade envolvida dificultam a comparação dos dados encontrados por diferentes grupos. Dados de microarrays geralmente não se apresentam em valores absolutos, mas em diferenças relativas. O contexto no qual cada ensaio é realizado; o organismo ou tipo celular utilizado; diferentes plataformas de microarray; formas diversas de extração de imagem e normalização de dados numéricos estão entre os principais fatores que dificultam a comparação e interpretação dos resultados de experimentos diferentes.

Com a intenção de organizar os dados gerados, um grupo de especialistas se reuniu para elaborar o MIAME - minimum information about a microarray experiment (Brazma *et al*, 2001). Neste tratado, são reunidas sugestões a respeito de informações sobre desenho do experimento; desenho do chip de DNA; tratamentos e obtenção das amostras de RNA; parâmetros de hibridização; medidas de imagens; formas de normalização e até mesmo vocabulário empregado. O objetivo é disponibilizar de forma ordenada informações que tornem mais fácil a interpretação correta dos dados gerados em cada experimento. Atualmente já existem alguns bancos de dados de expressão gênica que permitem a busca e comparação entre os resultados obtidos (Gene Expression Omnibus - NCBI; ArrayExpress – EBI; DNA database of Japan).

Ao facilitar a comparação entre dados provenientes de diversas fontes é possível inferir relações e associações até então impensadas. Como exemplo, é possível citar o trabalho feito por Stuart *et al* (2003) no qual dados de expressão em *Homo sapiens*,

Drosophila melanogaster, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* levaram a resultados de coexpressão mantida ao longo da evolução, elucidando funcionamento de redes de expressão.

1.4.3. PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real (real-time PCR) foi inicialmente descrita por Higuchi *et al* (1992, 1993) ao construir um sistema capaz de monitorar o acúmulo de produtos de PCR ao longo da reação. Este sistema consistia de um termociclador capaz de irradiar as amostras com luz UV e captar fluorescência com o uso de uma câmera CCD. Ao adicionar brometo de etídeo à reação, um intercalador de moléculas de DNA dupla-fita de uso comum em laboratórios de biologia molecular, haveria emissão de fluorescência, proporcional à quantidade disponível de dsDNA no tubo, aumentando de acordo com os ciclos da reação de PCR.

Alguns corantes são capazes de evidenciar moléculas de DNA dupla fita ao intercalarem-se entre às bases, como é o caso do brometo de etídeo. O corante Sybr Green1 evidencia a molécula de DNA dupla fita ao ligar-se ao "minor groove" do DNA. Estes corantes tornam a reação de PCR bastante sensível e econômica. A reação é sensível uma vez que várias moléculas de corantes se ligam a cada molécula de DNA formada. É econômica porque é capaz de detectar amplicons formados a partir de primers diversos, para qualquer gene, não sendo necessário desenhar sondas específicas marcadas com fluorocromos para cada par de primers a ser usado. Como desvantagem do método há a inespecificidade da detecção, uma vez que *amplicons* indesejados ou *primers* dimerizados são captados com a mesma eficiência do *amplicon* de interesse (Bustin, 2000).

Tanto no uso de SybrGreen como em ensaios de TaqMan é definido o "threshold", ou seja, uma linha que determina a detecção acima do "background". O valor de Ct (cycle threshold) é o valor no qual a linha que representa a reação de PCR atinge o "threshold". Este ponto deve ser registrado na fase exponencial da amplificação, quando a eficiência da reação é máxima, para que o valor seja acurado. O valor de Ct é o valor usado para estimar a razão de expressão entre as diferentes amostras, de forma que quanto maior for a expressão de um determinado gene, menor será o valor de Ct, já que a reação de PCR é capaz de detectar sinal em um número menor de ciclos da reação.

1.5. Objetivo

Neste trabalho sabendo-se que duas horas é um intervalo suficiente para que sejam disparados os programas de transcrição de interesse. Desta maneira, espera-se que a partir dos genes selecionados, pertencentes a processos celulares específicos, seja possível inferir quais os programas de transcrição ativados em cada condição: a) progressão $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ iniciado por FGF2; b) morte celular programada disparada por FGF2, ocorrendo de forma simultânea, porém independente ao estímulo mitogênico; c) proliferação ou bloqueio disparados por ACTH.

2. Materiais e métodos

2.1. Cultura Celular

O estoque de de células foi mantido congelado em tanques de nitrogênio líquido em solução DMEM 10% FCS (*fetal calf serum*), 10% DMSO. Após o descongelamento de alíquotas, as células foram mantidas em meio DMEM/10%FCS em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a temperatura de 37°C.

Para a linhagem celular FR3, clone derivado de Y1 resistente a morte induzida por FGF2, foi adicionado 1nM de FGF2 à cultura, garantindo a manutenção do fenótipo de interesse e melhor desenvolvimento da cultura.

As células Ras3.1-N17, sublinhagem de Y1 transfectada com um plasmídeo contendo o gene mutante dominante negativo de Ha-Ras, foi adicionado ao meio de cultura 100mM de geneticina. A indução da expressão da proteína mutada foi feita com a adição de dexametasona (0,5µM) 24 horas antes do estímulo de interesse.

O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Quando a confluência atingia cerca de 80% as células eram subcultivadas aspirando-se o meio, lavando as células com PBSA e tripsinizando-as. Após cerca de 2 minutos, quando as células perdiam a aderência à garrafa de cultura, as células eram ressuspensas em meio de cultura e as alíquotas eram transferidas para outra garrafa de cultura ou plaqueadas para experimentos.

2.2. Extração de RNA

2.2.1. Protocolo de tratamento

Todos os experimentos descritos neste trabalho foram feitos utilizando-se células carenciadas para soro por 48 horas para que as células estivessem sincronizadas em G0 do ciclo celular no momento do estímulo. Para todas as linhagens usadas neste trabalho, Y1 e FR3 e Ras3.1-N17, o carenciamento foi feito aspirando o meio, lavando-se a placa de cultura com PBS duas vezes para que fosse retirado todo o soro, uma lavagem adicional com DMEM, sendo então as células mantidas em DMEM livre de FCS.

Os tratamentos com cicloheximida (concentração final 10 μ g/mL) foram feitos por 30 minutos antes do estímulo, quando indicado no experimento. Os tratamentos com FGF2 (concentração final 1nM), ACTH (Sigam, concentração final 1nM) ou soro (concentração final 10%) foram feitos por 30 minutos uma ou duas horas, de acordo com a indicação do experimento. O FGF2 recombinante bovino foi fornecido pelo laboratório do prof. Ângelo Gambarini e é armazenado em alíquotas (135 μ M) em PBSA e são diluídas em DMEM no momento do uso.

2.2.2. Extração de RNA total por Trizol

Método de extração de RNA total para ensaios de microarray, northern blot e real time PCR. Foi feita com o reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante.

2.2.3. Extração do RNA total por gradiente de Cloreto de Césio

Para os ensaios de biblioteca SSH foi usado o método de gradiente de Cloreto de Césio por garantir uma preparação de RNA mais pura. As células foram lavadas com PBS, adicionou-se à placa 1mL de solução D (4M de isotiocianato de guanidina; 25mM de citrato de sódio pH7,0; 0,5% sarcosil; 7% de β -mercaptoetanol) e, com o auxílio de um raspador policial, as células foram lisadas e armazenadas em tubo eppendorf.

Em tubos próprios para ultracentrífuga foram colocados 2mL de CsCl (5,7M) e, sobre este, 2mL do lisado celular. Os tubos foram pesados, balanceados e colocados em ultracentrífuga por 18 horas a 37.000 RPM, 20°C. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur e o pellet foi lavado com 1mL de etanol 70%. Após o pellet secar (cerca de 10 minutos), este foi ressuspendido em 40 μ L de água deionizada tratada com DEPC.

2.2.4. Extração do mRNA – poli A+

Quick Prep Micro mRNA Purification Kit Amersham -GE Health care e Oligotex mRNA mini kit (Qiagen), foram usados segundo o protocolo dos fabricantes. Este material foi usado na geração de bibliotecas de SSH.

2.3. SSH - Suppression Subtractive Hybridization

2.3.1. Obtenção de fragmentos

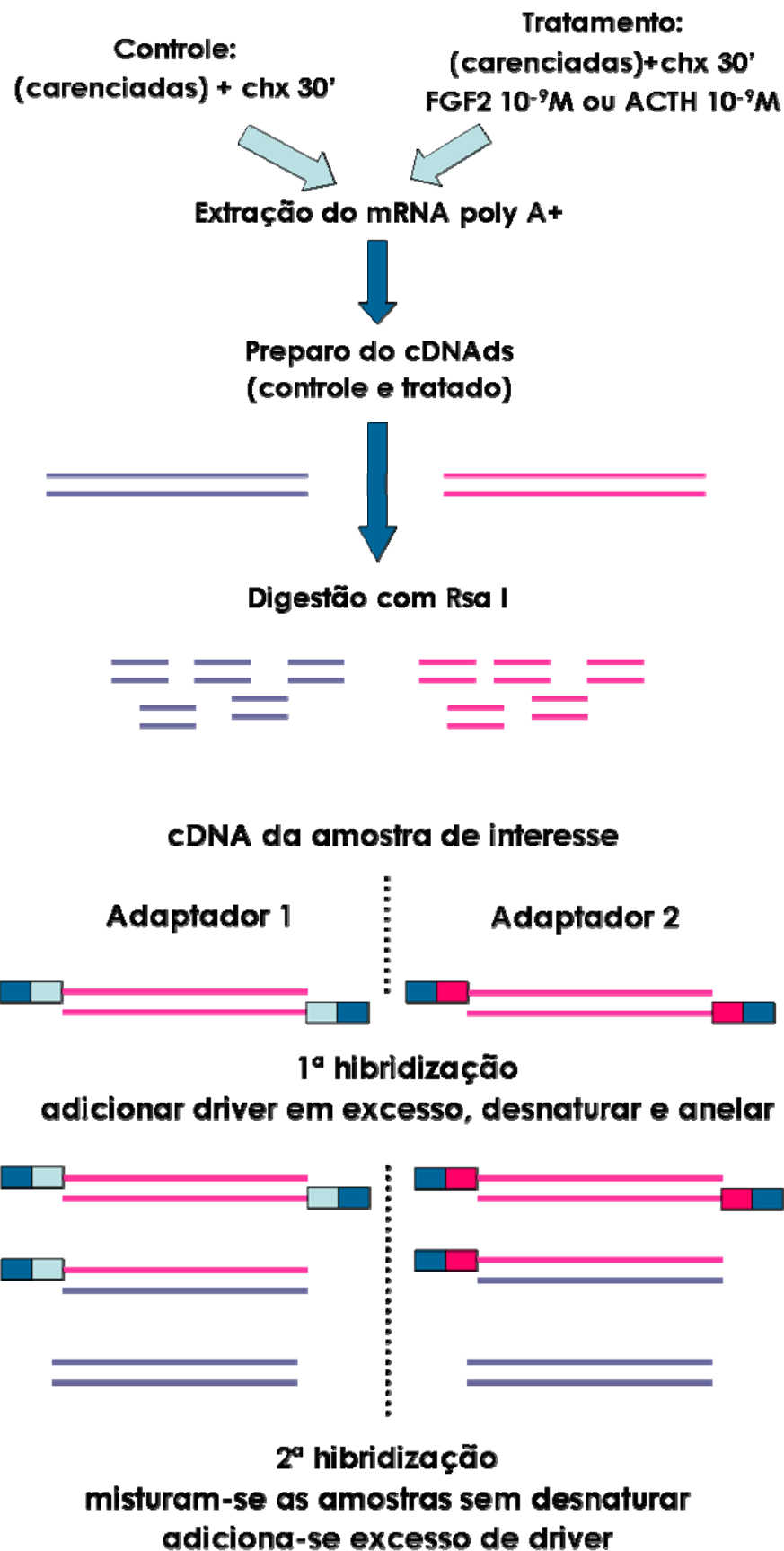
Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit foi usado seguindo as instruções do fabricante, sendo feita uma alteração quanto à enzima utilizada na reação de transcrição reversa: foi usada Superscript II em vez de AMV-RT (avian myeloblastosis virus), fornecida pelo kit. A superscript II é uma versão modificada da enzima MMLV-RT (Moloney murine leukaemia virus). A alteração foi feita esperando obter cDNAs mais longos, uma vez que a atividade de RNase H na Superscript II é reduzida por cerca de 10^6 vezes, evitando a degradação do RNA durante a síntese de cDNA. A descrição do método de SSH encontra-se na **figura 7**.

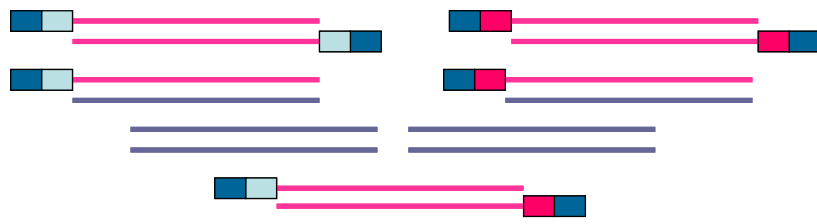
Após a extração do mRNA e preparo do cDNA, este é digerido com uma enzima de restrição e, apenas a população de interesse, é dividida em dois tubos, cada um recebendo adaptadores terminais distintos, a 5' do cDNA de interesse. Estes adaptadores serão necessários para a amplificação posterior em etapas de PCR. Após a ligação dos adaptadores os cDNAs das duas populações são desnaturados e misturados para que ocorra a hibridização. Nesta fase a população que deve ser subtraída é adicionada em uma concentração cerca de 30 vezes maior, sendo este o primeiro passo para a normalização da amostra. A seguir é feita uma segunda hibridização, na qual as duas hibridizações até então ocorrendo em paralelo são unificadas, e mais uma vez é adicionado à amostra que se deseja subtrair.

Na etapa seguinte são feitas as amplificações por PCR, nas quais apenas a amostra que recebeu os adaptadores (população que se deseja estudar) é amplificada. Nesta fase ocorre a equalização: as moléculas de cDNA pareadas com outras que receberam um adaptador igual (moléculas de alta expressão) vão acabar por fechar sobre si mesmas durante a fase de anelamento do PCR, impedindo a ligação dos primers e consequentemente a amplificação. Isto ocorre porque no primeiro ciclo do PCR as terminações serão completadas (cada molécula de cDNA serve de primer para seu par) tornando-se "blunt". Durante o ciclo do PCR, a complementaridade dos adaptadores faz com que a tendência de hibridização interna à molécula seja maior que a hibridização com outra molécula, no caso, um primer, levando à formação de estruturas conhecidas como "pan-like".

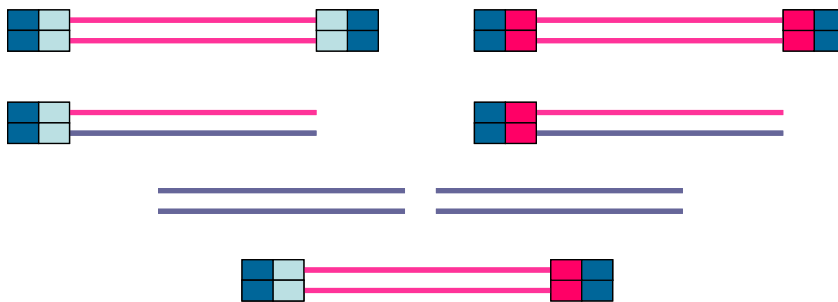
Assim, devido ao efeito de supressão, apenas as moléculas diferencialmente expressas são amplificadas exponencialmente. Esta supressão ocorre nas duas etapas de PCR, aumentando a concentração relativa dos fragmentos de interesse.

Descrição ilustrativa da técnica de SSH

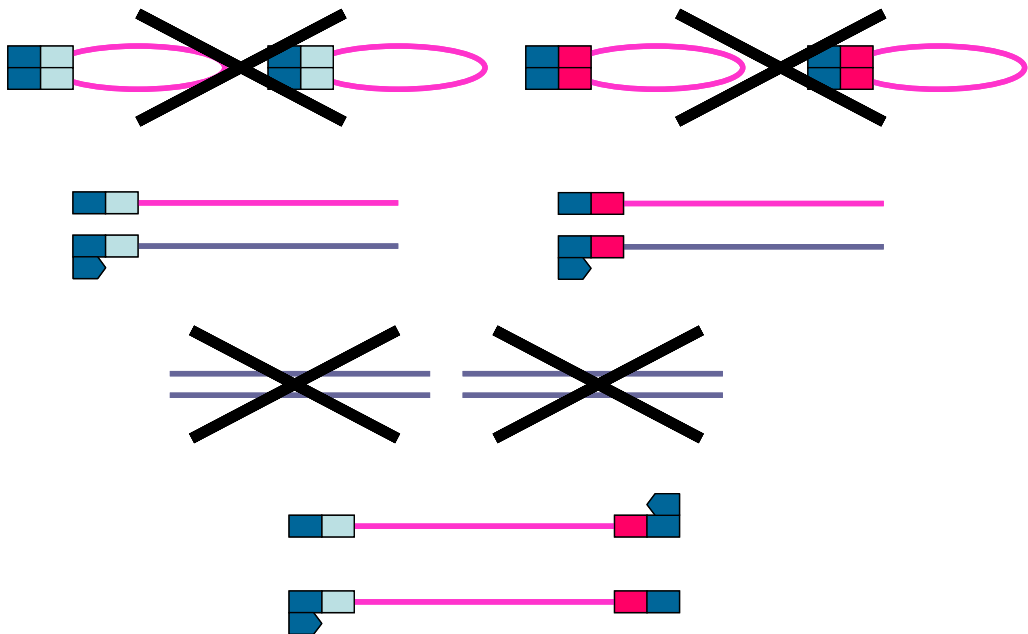




Completar terminações



Fragmentos amplificados



2º PCR : novos pares de primers

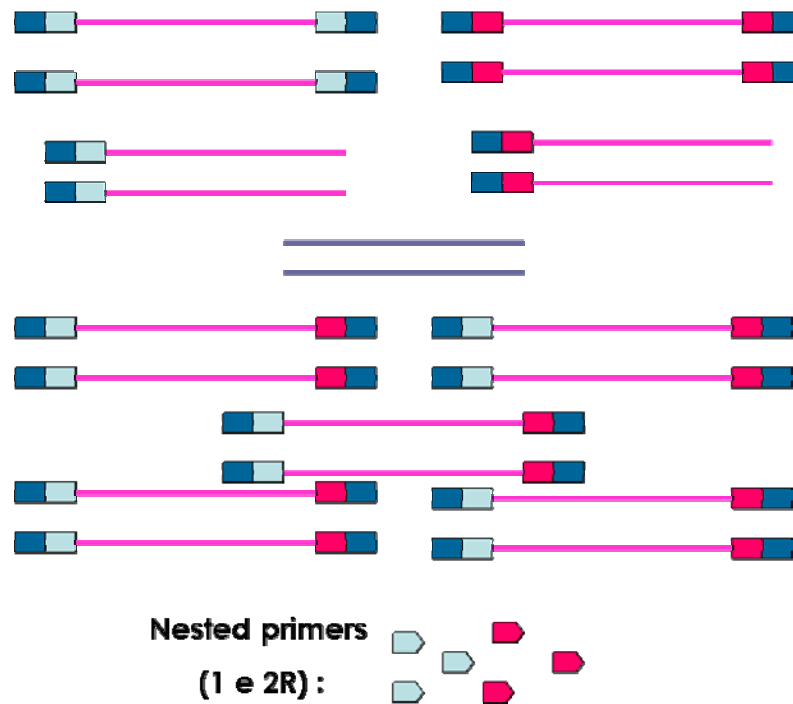


Figura 7: Esquema descritivo do método SSH. São considerados dois grupos: "tester" (grupo de interesse), no caso tratados com FGF2 ou com ACTH, e "driver" (grupo controle). O mRNA de cada grupo é isolado, e é feita reação de transcrição reversa. O próximo passo é digerir o cDNA com a enzima de restrição RsaI. O cDNA de interesse (tester) é separado em duas alíquotas iguais, que recebem adaptadores diferentes, porém com a mesma porção terminal. O cDNA controle (driver) não recebe o adaptador. É feita a 1ª hibridização entre cada grupo "tester" e "driver", este último em excesso. Na segunda hibridização as amostras são misturadas, híbridos com diferentes adaptadores são formados. As terminações referentes aos adaptadores são completadas e então são realizadas as reações de PCR em que ocorre amplificação diferencial de acordo com o tipo de molécula.

2.3.2. Reação de Blunting Kinase

Em tubo de 0,5mL foram colocados: 25,5µL de produto de PCR (produtos de SSH); 1µL de dNTPs (10mM); 3µL de ATP (10mM); 3,5µL de tampão tango10X; 1µL de T4 polinucleotídeo kinase (10U/µL); 1µL de Klenow (3U/µL). A reação foi incubada a 37°C por 45 minutos e purificada em coluna de GFX (GE-Health Care).

2.3.3. Purificação dos fragmentos obtidos pelo método

O Kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Health Care) foi usado segundo as especificações do fabricante. A única alteração foi feita após o uso do tampão de lavagem fornecido pelo próprio kit, quando o tubo coletor é esvaziado e centrifugando por uma vez adicional para remover o etanol residual que possa estar presente na amostra.

2.3.4. Reação de ligação em pUC 18

Em tubo eppendorf foi adicionado: 2µL de T4 DNA Ligase Buffer 10X; 16µL de produto de Blunt Kinase; 1µL de pUC18 Sma/BAP (GE Health Care, 50ng/µL); 1µL de T4 DNA Ligase. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 48 a 72 horas e inativada a 65°C por 15 minutos.

2.3.5. Preparação de bactérias DH10B eletrocompetentes

A cultura de bactérias foi crescida overnight em 1mL de meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10mM de NaCl -pH7,5) a 37°C, 220rpm. Foram adicionados 100mL do mesmo meio à preparação e crescidos até que atingissem uma confluência, a 600nm, de 0,6 OD de absorbância. Esta preparação foi resfriada em gelo por 30 minutos. As bactérias foram centrifugadas a 4000g por 15 minutos, 4°C e lavadas duas vezes com 50mL de glicerol 10% gelado. Por fim foram ressuspendidas em 0,2mL de GYT (10%glicerol; 0,125% extrato de levedura; 0,25% triptona) gelado, aliquoteadas e guardadas a -80°C.

2.3.6. Eletrotransformação de bactérias competentes

Em uma cubeta gelada foram colocados 100µL de bactérias competentes e 2µL da reação de ligação já inativada. A cubeta com seu conteúdo foi submetida a um

choque de 2,5kV com o uso de um capacitor de 25 μ F e uma resist \hat{e} ncia de 200 Ω . As bact \acute{e} rias foram rapidamente colocadas em meio SOC (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10mM de NaCl; 10mM de MgSO $_4$; 10mM de MgCl $_2$) a 37 $^{\circ}$ C e crescidas por 1 hora, com agita \c o constante. As bact \acute{e} rias foram espalhadas em placas de 150mm de di \hat{a} metro contendo LB agar + carbenicilina (50 μ g/mL), 90 μ L de IPTG (100mM) e 90 μ L de x-gal (50mg/mL), sendo incubadas durante a noite.

2.3.7. Sele \c o e crescimento de bact \acute{e} rias

As col \hat{o} nias brancas foram selecionadas com aux \acute{i} lio de palitos de dentes est \acute{e} reis e inoculadas em multi well 96 contendo 100 μ L de meio super broth (1mL de NaOH 1N; 5g de NaCl; 32g de peptonas; 20g de extrato de levedura), adicionado de carbenicilina (concentra \c o final 50 μ g/mL). As culturas foram crescidas por no m \acute{i} nimo seis horas, sendo poss \acute{i} vel o crescimento durante a noite, a 37 $^{\circ}$ C, sem agita \c o. Decorrido este per \acute{i} odo, as bact \acute{e} rias foram ressuspendidas com o aux \acute{i} lio de um v \acute{o} rtex em velocidade baixa por cerca de 1 minuto. Adicionou-se 100 μ L (1 volume) de glicerol 30% e as placas foram estocadas a -80 $^{\circ}$ C.

2.3.8. PCR de col \hat{o} nias de bact \acute{e} rias

As rea \c o \hat{e} s de PCR para clones de bact \acute{e} rias transformadas foram feitas em um volume final de 15 μ L para cada col \hat{o} nia, sendo montadas em placas de 96 wells. Em uma solu \c o-m \hat{a} e foram misturados os reagentes nas seguintes propor \c o \hat{e} s: 150 μ L de PCR buffer 10X; 30 μ L de dNTPs (10mM); 2,5 μ L de primer M13 forward (100 μ M); 2,5 μ L de primer M13 reverse (100 μ M); 45 μ L de MgCl $_2$ 50mM; 10 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L); H $_2$ O at \acute{e} completar 1500 μ L. As col \hat{o} nias foram inoculadas nos placas de PCR (multi 96) com o aux \acute{i} lio de um replicador. As condi \c o \hat{e} s de tempo/temperatura foram: 4 minutos a 94 $^{\circ}$ C; 40 ciclos de: 45 seg \rightarrow 94 $^{\circ}$ C; 45 segundos \rightarrow 60 $^{\circ}$ C ; 2 minutos \rightarrow 72 $^{\circ}$ C; 10 minutos a 72 $^{\circ}$ C.

2.3.9. Boiling prep

Adaptado de genoma4.iq.usp.Br/xanthomonas/protocolos.html.

As col \hat{o} nias de interesse foram crescidas em 1mL de meio Terrific Broth (12g de triptonas; 24g de extrato de levedura, para 1L) por 24 horas, em shaker a 300RPM.

A precipita \c o das bact \acute{e} rias foi feita centrifugando a placa de bact \acute{e} rias por oito minutos a 2700RPM a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado na pia e as

placas foram deixadas para secar emborcadas sobre um pedaço de papel-toalha por cinco minutos. Aos pellets foi adicionado 25µL de água MilliQ autoclavada e as bactérias foram ressuspensas em vórtex em baixa velocidade por cerca de cinco minutos. Foi adicionado 70µL de solução MW tween e a mistura foi homogeneizada em vórtex por mais 30 segundos, sendo incubadas a temperatura ambiente por cinco minutos.

-Solução de STET-TWEEN 20: 2,75g de tween 20; 1mL de NaCl (5M); 110µL de EDTA (0,5M) pH8,0; 800µL de Tris-Cl (1M) pH8,0; água milliQ para 50mL

-Solução RNase 10mg/mL: Dissolver em água milliQ e ferver por 15 minutos em banho-maria. Aliquotar e manter a 20°C.

-Solução MW-TWEEN – preparo no dia de uso: 50mL solução STET TWEEN 20; 25mg de lisozima (solubilizada em solução STET); 1,2mL RNase (10mg/mL)

Aquecimento em microondas:

O conteúdo da placa foi fervido em microondas em potência máxima por 1,5 a 2 minutos, virando a placa várias vezes para haver aquecimento homogêneo. Imediatamente após a fervura a placa foi retirada do forno de microondas e adicionou-se 300µL de água deionizada gelada. Foi colocado selante e a placa foi vortexada por 30 segundos. A placa foi deixada em banho de gelo e água por 10 minutos e em seguida foi centrifugada por 30 minutos a 4000RPM. Os 50µL de sobrenadante foram transferidos para uma microplaca e o restante, contendo o pellet, desprezado. A quantidade de DNA foi verificada em gel de agarose.

2.3.10. Seqüenciamentos

Os seqüenciamentos dos clones da biblioteca de FGF2 foram feitos no laboratório da professora Ana Cláudia Rasera, no Instituto de Química da USP. Após fazer “boilingprep”, foi utilizado o protocolo “PCR save money” : 4µL de DNA (200 a 400ng); 1µL de primer M13 forward (3,2 pmol/µL); 2µL de B Terminator Ready Reaction Mix (PerkinElmer); 20µL água milliQ; 6µL de Buffer Save Money (200mM Tris-Cl 1M pH9,0; 5mM Cloreto de Magnésio). A reação procedeu a 96°C por 10 segundos/50°C por 5 segundos/60 °C por 4 minutos; por 40 ciclos.

Após a reação adicionou-se 80µL de Isopropanol 75% e agitou-se levemente a placa, que então foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugou-se por 45 minutos a 4000RPM sendo o sobrenadante descartado. A placa foi submetida a 2 pulsos de 1000RPM emborcada em papel-toalha. O conteúdo foi ressuspensado em 2µL

de tampão Load Buffer (5:1 Formamida deionizada, 25mM EDTA; 50mg/mL Blue Dextran) e aquecido por 2 minutos a 94 °C. Foram aplicados no gel de seqüenciamento 1,5µL da amostra.

Os seqüenciamentos dos clones da biblioteca de ACTH foram feitos no laboratório do professor Sérgio Verjovski-Almeida. As reações de seqüenciamento foram feitas a partir do produto final dos PCRs de colônia diluídos 5 vezes, usando-se o kit DYEnamic ET – Dye Terminator Cycle sequencing kit for Megabace (Amersham, GE Health Care). Foi preparada uma solução-mãe com 800µl do kit ET terminator, 770µl de água destilada estéril e 30µl de primer M13 forward. Em cada poço da placa foram colocados 4µl de DNA (PCR de colônia diluído) e 16µl da solução mãe. Nesta reação, foram feitos 30 ciclos conforme se segue: 95°C 45 segundos; 57°C 45 segundos; 72°C 1 minuto.

A precipitação foi feita adicionando-se 2µl de acetato de amônio (7,5M) e vortexando vigorosamente a placa por cerca de 30 segundos. Adicionou-se 50µl de etanol absoluto e mais uma vez a placa foi vortexada por cerca de um minuto. A reação foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 3100xg por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado invertendo a placa na pia. Centrifugou-se a placa invertida, com um pedaço de papel-toalha embaixo, por 10 segundos, até atingir 1000xg. Adicionou-se 200µl de etanol 70% feito na hora e, da mesma forma, centrifugou-se a 3000xg por 10 minutos, mais uma vez descartando o sobrenadante invertendo a placa. Foram adicionados 10µl de "loading buffer" fornecido pelo kit e vortexados por cerca de 2 minutos.

2.3.11. Preparação de Dot Blots de cDNA a partir de reações de PCR

(Diatchenko *et al*, 1999; Sambrook *et al*, 1989; PCR select differential screening kit user manual - Clontech)

De cada reação de PCR de colônias foram retirados 5µL e misturados ao mesmo volume de NaOH (0,6N). Foram transferidos 1,5µL desta mistura para cada membrana de nylon com o auxílio de um micropipetador. Após secar, aproximadamente 10 minutos, as membranas foram neutralizadas em Tris-HCl 0,5M (pH 7,5) por 2-4 minutos e lavadas com SSC 2X. Para que o DNA fosse imobilizado, as membranas foram levadas ao forno por 1,5 hora a 75°C.

As membranas foram pré-hibridizadas com a solução de pré-hibridização (50% formamida; 5X SSPE; 5X Denhardt's Solution; 0,5%SDS; 100µg/mL de DNA esperma de salmão) por 2 horas a 42°C sob agitação. A hibridização foi feita a 42°C durante a noite

em solução de hibridização (50% formamida deionizada; 5X SSPE; 5X Denhardt's Solution; 5% sulfato dextrana; 0,1%SDS; 100µg/mL de DNA de esperma de salmão; sonda).

As lavagens foram feitas por 20 minutos a 68°C, sendo 4X com a solução de lavagem 1 (2% SDS; 0,5X SSC) e 2X com a solução de lavagem 2 (0,2% SSC; 0,5X SDS). A membrana foi exposta ao filme de raio X em um cassete e guardado a -80°C.

2.3.12. Preparação dos fragmentos usados como sonda de cDNA para Dot Blot

Nos ensaios de Dot Blot foram usados como sondas os próprios fragmentos gerados por SSH. Como sonda para os genes estimulados foi utilizado o mesmo pool de genes que foi submetido a clonagens. A outra sonda foi feita a partir dos fragmentos gerados pela subtração reversa (seleção dos genes inibidos), feitos exclusivamente para este fim e que, portanto, não foram clonados. Os clones de interesse são aqueles marcados apenas pela sonda feita a partir dos fragmentos clonados. Os clones que mostrarem marcação igual ou de intensidade de até três vezes maior são considerado como "background" e são descartados.

Para garantir a remoção dos adaptadores, o que poderia gerar um alto grau de "background", o PCR secundário gerado por SSH foi submetido a digestões com enzimas de restrição (New England Biotools).

Primeira etapa :

3µL de NEB buffer 4, 1µL de RsaI(1U/µL), água para 30µL →37°C, 1 hora

Segunda etapa (retirar adaptador 1):

1µL de SmaI(10U/µL)→25°C, 1 hora

Terceira etapa (retirar adaptador 2R):

Completar até 59µL com água, adicionar ao tubo 10µL NEB buffer 3; 1µL de EagI (10U/µL) e incubar a 37°C por 1 hora

A reação foi purificada em coluna de GFX (Amersham GE Health Care) e a marcação das sondas foi feita como descrito no específico.

2.3.13. Reação de marcação de RNA para Reverse Northern Blot

(Mikulits, 1999)

A um tubo foi adicionado 1µL de primer ancorado (10µM); 5 µg de RNA total e água DEPC para 30µL. O RNA foi desnaturado a 70°C por 5 minutos e em seguida submetido a gelo por 3 minutos. Adicionou-se à reação 6µL de 5X buffer; 3µL 0.1M DTT;

1,5µL d(ATG)TP; 1µL de RNase block; 5µL (50uCi)dCTP ³²P e incubou-se a 37°C por 2 minutos. Adicionou-se 1,5µL de Superscript II (Invitrogen) e incubou-se a 37°C por 1 hora. Ao fim da reação foram adicionados 7µL de NaOH 1,5N incubando-se a 68°C por 20 minutos. A reação foi neutralizada com 10µL de Tris pH7,4 (1M) e 10,5µL de HCl (1N).A purificação foi feita em coluna de Sephadex G50.

2.3.14. Aplicação de ferramentas de bioinformática

As leituras obtidas no seqüenciamento foram submetidas aos programas Phred, Phrap, Consed (Gordon, 1998; Ewing, 1998- www.phrap.org), fornecidos gratuitamente via Internet por Phill Green e Brent Ewing, da Universidade de Washington (www.phrap.org).

O programa PHRED é capaz de ler e interpretar as seqüências, conferir qualidade a cada base e armazenar as informações em formato FASTA, podendo ser usado pelo programa PHRAP ("phragment assembly program", ou "phill's revised assembly program"). Este por sua vez será o responsável por agrupar (empilhar e comparar) seqüências iguais ou contíguas, não apenas nas porções de melhor qualidade, mas em toda a extensão da leitura, construindo "contigs" (grupos) de leituras "forward" e "reverse" que representam um mesmo gene. Phred e Phrap foram rodados em sistema Unix pelo Dr. Fábio Siviero.

Os programas Phred e Phrap não possuem uma interface gráfica, sendo necessário o uso do programa Consed para este fim. Neste programa é possível visualizar a região em que cada leitura foi agrupada no contig, sendo eliminada automaticamente a região correspondente ao vetor (no caso, pUC 18), sendo apresentada uma seqüência consenso entre as leituras agrupadas (**figura 8**). Caso necessário, este programa permite a edição manual do resultado. A anotação das seqüências consenso foi feita usando-se BlastN e o programa PFAM, que encontra homologia entre domínios de proteínas (pfam.wustl.edu/).



Figura 8: Tela de apresentação do Consed para o um dos contigs formados na biblioteca SSH-FGF2. Quanto mais clara a cor em que a seqüência é apresentada, maior a qualidade e consequentemente, a confiança. Observa-se que há leituras a partir dos dois lados da fita (sense e anti-sense). Com bases nessas informações é gerada uma seqüência-consenso que será representativa do contig.

2.4. Microarray

A **tabela 1** abaixo representa o numero de ensaios realizados com a técnica de microarray. Cada "2" indica um experimento realizado em "swap", sendo necessárias 2 lâminas para cada condição. A indicação "2-2" indica que foram executadas duas marcações independentes em swap, com amostras diferentes, para que seja representada a variabilidade biológica do modelo.

Tabela 1: Condições testadas por microarray. Em vermelho estão as condições em que há inviabilidade celular. K-controle não tratado; F- FGF2 1nM ; A-ACTH 1nM; S-soro10%. Y1: linhagem celular Y1; FR3: clone derivado de Y1 resistente a morte induzida por FGF2; RasN17: linhagem Ras3.1-N17, derivada de Y1, na qual há expressão indutível (com dexametasona) do dominante negativo RasN17.

| | Y1 | FR3 | RAS N17 -dexa | RAS N17 +dexa |
|------|-------|-----|---------------------|---------------------|
| K | 2-2-2 | 2-2 | 2 | 2 |
| F30 | 2-2 | 2-2 | 2 | 2 |
| F2h | 2-2 | 2-2 | | |
| S30 | 2-2 | 2-2 | | |
| S2h | 2-2 | 2-2 | | |
| FS30 | 2-2 | 2-2 | | |
| FS2h | 2-2 | 2-2 | | |
| A30 | 2-2 | | | |
| A2h | 2-2 | | | |
| AF30 | 2-2 | | | |
| AF2h | 2-2 | | | |
| AS30 | 2-2 | | | |
| AS2h | 2-2 | | | |

2.4.1. Constituição do chip de cDNA

Foi construído um chip de cDNA contendo 1152 seqüências provenientes de 3 placas de 384 wells, além de uma quarta placa de referência (ScoreCard- Amersham GE-Health care).

As bibliotecas de cDNA geradas pela técnica de SSH na primeira parte deste projeto foram incluídas na construção do chip. São 168 seqüências das quais 120 foram identificadas na biblioteca SSH-FGF2 e 48 foram encontradas na biblioteca SSH-ACTH.

Foram ainda somados 28 genes provenientes do banco de plasmídeos do laboratório. Tratam-se de genes codificantes para fatores de crescimento e seus receptores; genes diretamente relacionados com o ciclo celular; genes que codificam enzimas participantes da síntese de esteróides, e outros de interesse direto do laboratório.

O restante, ou seja, a maior parte dos genes, foi selecionado a partir do unigene set de camundongo fornecida pelo prof. Marcelo Bento Soares. Das 10 placas de 96 wells provenientes deste unigenes set nove foram selecionadas a partir da lista de genes de interesse ao laboratório, a décima placa foi escolhida ao acaso.

2.4.2. Seleção virtual dos clones para a lâmina

O laboratório recebeu do professor Marcelo Bento Soares, da Universidade de Iowa, EUA, um unigene set com cerca de 35 mil clones provenientes de cérebro de camundongo. Estes genes, quando recebidos, já estavam seqüenciados, porém não estavam anotados, nem mesmo haviam sido submetidos ao "Blast".

Em paralelo, foi feita uma lista de cerca de mil genes de interesse do laboratório, elaborada pela pós-doutoranda Kátia M. Rocha. Todas as seqüências de nucleotídeos referentes aos clones da biblioteca recebida foram submetidas ao Blast de forma automática. A busca pelos genes de interesse foi feita individualmente dentro de um banco de dados interno desenvolvida para este fim por Márcio K. Oikawa (IME-USP). Neste banco de dados está armazenada a seqüência de cada clone, a posição na placa de origem e o resultado da busca no Blast, o que inclui o indexador de seqüência para busca na base de dados do NIH, em especial no UniGene.

A anotação manual foi feita buscando por palavras e pelo cruzamento dos dados do UniGene com o locuslink (atualmente Entrez Gene) dentro do conjunto de resultados do BLAST automático, sendo assim possível identificar quais os melhores representantes para o gene de interesse (menor *e-value* e maior *score*) entre os clones disponíveis.

Este processo foi feito individualmente sendo identificadas 858 seqüências, divididas em 831 clusters, o que quer dizer que são 831 genes diferentes, alguns representados por mais de um clone.

2.4.3. Seleção dos clones para a lâmina

Todos os clones do unigene set foram replicados manualmente e posteriormente foi feito o rearranjo dos clones de interesse. Os clones provenientes de placas de 96 wells foram rearranjados por um robô enquanto aqueles que estavam em placas de 384 wells

foram rearranjados manualmente, visto que o robô não reconhece este formato de placa.

Foram testados e otimizados os padrões de amplificação em PCR para os clones já rearranjados; as placas foram purificadas após a amplificação por PCR de colônia e o padrão encontrado em gel de agarose foi registrado de forma a conter um padrão de peso molecular que servia como forma de estimar a eficiência dos produtos de PCR.

2.4.4. PCR de colônias de bactérias

Foi feita uma solução-mãe contendo 500 μ L de buffer 10X; 150 μ L de MgCl₂ (50mM); 100 μ L de dNTP (10mM); 8,5 μ L de primer M13 forward (100 μ M); 8,5 μ L de primer M13 reverse (100 μ M); H₂O para 4995 μ L; 5 μ L Taq Polimerase (5U/ μ L) (Biolase).

Foi distribuído 50 μ L desta solução para cada poço de uma placa de 96 wells e, com o auxílio de um replicador de 96 dentes, as amostras de colônias foram transferidas para a placa de PCR. As condições da reação foram:

4 minutos a 94°C
40 ciclos { 45 Seg → 94°C
 { 45 Seg → 61°C
 { 2 minutos → 72°C
10 minutos a 72°C

2.4.5. Purificação das reações de PCR

Foram adicionados aos poços vazios da placa multiscreen 20 μ L de *PCR binding buffer* (7M guanidina HCl/ 200mM MES buffer pH 5,6; não deve ser usado após uma semana de preparo). A placa foi centrifugada a 2500 RPM por 1 minuto. Em seguida adicionou-se 100 μ L de *PCR binding buffer* em cada poço da placa de PCR a ser purificada, ressuspendendo o material por 5 vezes antes de transferir para placa multiscreen. Mais uma vez a placa foi centrifugada a 2500 RPM por 1 minuto. O material foi lavado por três vezes com 200 μ L de EtOH 80%, centrifugando a 2500 RPM, 1 minuto. A placa coletora foi esvaziada e centrifugada (sem adicionar EtOH) a 2500 RPM por 5 minutos. A eluição foi feita com 60 μ L de Tris-HCl 10mM pH 8 em placa 96 wells com fundo em U. Por fim 2 μ L da amostra foram analisados em gel de agarose 1% em TAE (**figura 9**).

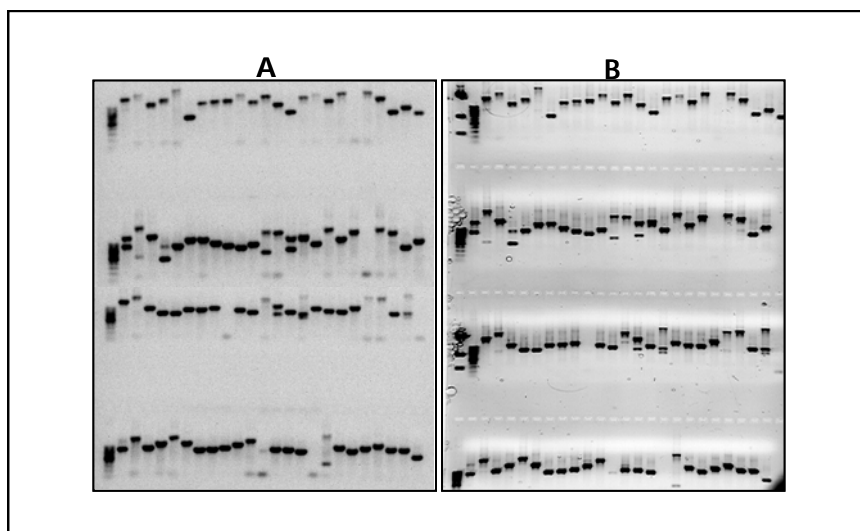


Figura 9: PCR de colônia da placa 2 (96 wells) antes (A) e após (B) a purificação.

2.4.6. Impressão das lâminas

O robô usado no processo de "spottagem", Molecular Dynamics Generation III Array Spotter, usa doze canetas para depositar nanolitros de amostra de cDNA amplificado em cada slide. As lâminas usadas, tipo 7star (Amersham - GE Health care), são espelhadas, o que segundo o fabricante garante sinal mais intenso na detecção do spot, principalmente da luz proveniente do fluoróforo Cy5. A camada de alumínio que torna a lâmina espelhada é uma forma de direcionar o espalhamento de luz, comum em lâminas de vidro, em direção ao detector. O sinal é ainda aumentado se acima da camada de alumínio houver um espaçador, sendo usada uma camada de dióxido de silício para este fim. Para que a detecção seja ótima a espessura da camada espaçadora deve ter $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda para excitação. Como não é possível obedecer a esta regra para os dois fluoróforos (Cy3 e Cy5), o fabricante opta por aperfeiçoar a lâmina para Cy5, balanceando a intensidade entre os dois canais (informações fornecidas pelo fabricante).

A ligação da molécula de DNA com a lâmina é feita na camada mais externa, tratada com 3-aminopropiltrimetoxisilano. As moléculas de DNA carregadas negativamente em seu grupo fosfato são ligadas às aminas de carga positiva expostas, e finalmente o material é fixado em "crosslink" por 30 segundos.

O chip apresenta três réplicas de todos os spots em cada lado da lâmina, em um total de seis réplicas por chip. Para que as réplicas não se acumulassem em uma mesma região da lâmina, durante a segunda impressão as placas de origem (contendo as

Apesar do procedimento escolhido incorrer em erros de incorporação do fluoróforo, o uso deste protocolo mostrou-se muito mais prático e no mínimo tão eficiente quanto o protocolo de marcação indireta. Para que possíveis erros de marcação relacionados com a incorporação dos fluoróforos pudessem ser corrigidos, todas as marcações foram feitas em "dye-swap", ou seja, sempre foi feita a marcação paralela das amostras com os fluoróforos trocados, de forma que cada condição necessita de duas lâminas para obter um resultado para análise.

2.4.8. Purificação do alvo

O procedimento foi realizado em placas Millipore Multiscreen Assay System 96-Well Filtration Plate. Adicionou-se 120µL de Binding Buffer (50mM de KAc, 5,3M de guanidina-pH4,8) à amostra, que foi centrifugada a 1000g por 1minuto a 25°C. O material foi lavado por quatro vezes com 200µL de EtOH 80%, centrifugando, em cada etapa, a 1000g 1min, 25°C. Por fim, foi feita uma centrifugação adicional de 3500RPM 5 min, 25°C, para retirar o excesso de etanol. A eluição foi feita com 45µL de 10mM Tris pH8, por duas vezes, centrifugando a 3000RPM por 5 min, 25°C, totalizando o material eluído cerca em 90µL.

Antes da hibridização os cDNAs marcados foram quantificados em espectrofotômetro em λ_{550} para Cy3, λ_{650} para Cy5, e λ_{260} para as duas amostras, permitindo estimar o rendimento das reações.

A estimativa de rendimento de incorporação é feita por

Cy3 λ_{550}

$$\lambda_{550} \times \text{Volume} = \frac{\text{pmol incorporado}}{0,15}$$

Cy5 λ_{650}

$$\lambda_{650} \times \text{Volume} = \frac{\text{pmol incorporado}}{0,25}$$

Após esta etapa o material submetido ao espectrofotômetro foi recolhido e seco em SpeedVac por cerca de 70 minutos a 30°C.

2.4.9. Hibridização

A cada par de alvos marcado (um com Cy3, outro com Cy5), já secos em SpeedVac, foram adicionados 15µL de água, agrupando as duas marcações em um único tubo. Adicionou-se 30µL de formamida e 15µL de Buffer V2 (fornecido pelo kit).

A solução foi desnaturada a 92°C por 2 minutos e colocada em gelo. A aplicação da solução na lâmina foi feita em uma linha central, entre os dois sets de spottagem, ao longo da lâmina. A lâmina foi coberta com uma lamínula de 24x60mm (Corning), com o cuidado de após encostar sua extremidade na solução, soltar a lamínula o mais próximo possível da lâmina de maneira a evitar a formação de bolhas. A preparação foi colocada dentro de uma câmara úmida vedada com parafilme sendo a hibridização feita em estufa a 42°C por 16 horas.

2.4.10. Lavagens das lâminas

A lavagem das lâminas foi feita em uma caixa de vidro com espaçador para lâminas. Foi feita uma lavagem inicial com solução 1XSSC; 0,2%SDS e duas lavagens com solução 0,1XSSC; 0,2%SDS. Estas três lavagens foram feitas com agitação a 55°C por 10 minutos. A quarta lavagem foi feita com solução 0,1XSSC por um minuto a temperatura ambiente. Por fim as lâminas foram submetidas a quatro mergulhos em água milliQ e logo em seguida secas com jatos de nitrogênio.

2.4.11. Scanner

Para que haja emissão de fluorescência a luz incidida no corante deve estar dentro do espectro em que este é capaz de absorver. A energia absorvida eleva um elétron a um estado excitado e, quando esta energia é liberada, o elétron retorna ao seu estado fundamental, emitindo luz em um comprimento de onda conhecido e superior ao da luz incidente. Para o corante Cy3, o pico de absorção acontece em 552nm, e o pico de emissão a 565nm. Para Cy5 o pico de absorção está em 650 e o pico de emissão em 667nm.

O equipamento Molecular Dynamics Generation III Scanner, usado nesta etapa, faz uso de dois lasers de excitação, um verde (532nm) e um vermelho (633nm), para a leitura das lâminas. O laser causa a excitação dos fluoróforos incorporados durante a marcação do cDNA, e é capaz de detectar a intensidade de cada canal. A emissão de cada fluoróforo é filtrada e amplificada em um tubo PMT (tubo fotomultiplicador). Um módulo eletrônico é então capaz de converter o sinal analógico em dados digitais e então armazenar os dados. As imagens formadas pelo scanner são armazenadas em arquivos tipo "gel", de propriedade do fabricante, com imagens de 16-bits. Segundo o fabricante há vantagens neste formato em relação ao formato "tif", já que incorpora informações a respeito de calibração de scanner, o que torna as imagens mais lineares.

2.4.12. Análise das imagens

Durante a análise ou extração dos dados os spots devem ser vinculados aos genes que representam, e a intensidade de fluorescência em cada canal deve corresponder ao grau de expressão relativa do gene.

Existe uma grande variedade de softwares disponíveis para a extração de dados das imagens de microarrays. Algumas opções de softwares gratuitos são o "Spotfinder" (The Institute for Genomic Research), o "ScanAlyse" (Eisen Lab, Universidade da Califórnia) e o "Bioinfo", desenvolvido no IME-USP, por Daniel Dantas. Entre os softwares comerciais é possível citar o "Quantarray" (Packard Biosciences), "ImaGene" (BioDiscovery), "GenePix" (Axon Instruments) e o "ArrayVision" (Imaging Research).

O Array Vision v6.0, usado neste trabalho, é capaz de encontrar a imagem do spot na lâmina, transformar a marcação encontrada por cada um dos dois canais em números e ainda diferenciar a imagem de interesse do ruído. O passo inicial desta etapa consistiu em "avisar" ao software qual o padrão de segmentação dos spots na lâmina, o que cria uma máscara que é usada no enquadramento dos spots para que sejam realizadas as etapas seguintes. O programa é capaz de encontrar automaticamente os spots uma vez que a máscara esteja construída e, se eventualmente houver erros na definição do spot, permite o ajuste manual ou mesmo a identificação de pontos de má qualidade no ensaio.

A intensidade de fluorescência de cada spot foi medida em RFU/ μm^2 , ou seja, reference fluorescence unit, uma unidade arbitrária, por micrômetro quadrado. A partir destes valores foi possível calcular a média apenas dos pixels considerados válidos para cada spot, medida denominada "MTM Dens", Median-based Trimmed Mean. A exclusão (trimming) dos pixels considerados artefato é feita quando um valor está muito distante da mediana calculada para aquele spot.

Para estimar o *background* de cada spot foi analisada a intensidade de fluorescência na região próxima ao spot (no caso, regiões superior e inferior à direita e à esquerda do spot). A mediana do *background* é subtraída do valor de MTMdens, sendo então denominado "sMTMdens", valor usado para a normalização e posteriormente análise estatística.

2.4.13. Normalização

A razão de expressão dos experimentos deveria variar apenas em função da questão biológica, e não da tecnologia empregada, no entanto, como qualquer outra tecnologia os microarrays têm seus limites e incorrem em erros que podem mascarar ou alterar o resultado da análise final. Alguns exemplos de fatores que podem gerar erros

são diferenças na eficiência de incorporação e de brilho dos dois fluoróforos usados; posição do spot no slide; intensidade do spot, qualidade do spotter; *background*; variações do scanner; variações entre experimentos etc. Estes erros sistemáticos são particularmente problemáticos quando são feitas buscas por variações sutis, quando é possível ocorrer o mascaramento ou mesmo sobreposição do erro sobre a leitura, causando erros de análise. A normalização é uma forma de compensar estes erros para que o resultado de análise seja um melhor representante da situação biológica.

É evidente que a normalização, bem como a análise estatística dos dados, é um passo determinante em ensaios de microarray e que requer pessoas capazes tanto de entender o processo biológico quanto de explorar estatisticamente os números obtidos em cada ensaio. Ricardo Z.N. Vêncio e Fábio Nakano, alunos de doutoramento orientados pelo professor Carlos A.B. Pereira (IME-USP) trabalharam em colaboração nesta etapa do projeto.

Em técnicas de análise em grande escala, como microarrays, em que a quantidade de dados gerada é muito grande, o tratamento e análise dos dados torna-se muito trabalhosa e sujeita a erros. Atualmente modelos matemáticos computacionais têm como função aumentar a precisão e confiança das análises, bem como fornecer a informação processada em formato simples. Bioinformatas de todo o mundo têm desenvolvido metodologias para a análise de experimentos biológicos, mas deve-se ressaltar que não existe modelo matemático perfeito e que, portanto, os resultados oferecidos devem sempre ser olhados com cautela e de forma crítica. Embora seja possível fazer generalizações e aproveitar modelos já existentes, cada caso deve ser estudado em seu caráter único, usando o que há de mais apropriado e implementando o que for necessário.

Em ensaios de microarray, a variável que se deseja analisar é a razão da hibridização entre duas amostras de cDNA que competem por um mesmo sítio, o que é obtido pela intensidade de fluorescência emitida por cada uma das amostras. O que torna a análise ainda mais complexa é a comparação de diversas amostras entre si, uma vez que os ensaios, neste caso, são feitos aos pares. Para tanto há que se fazer um plano experimental cuidadoso, levando em consideração a disponibilidade de material e a precisão do resultado final.

A razão de expressão costuma ser expressa em escala logarítmica. Ao chamar um dos canais de R (Red, cor associada ao corante Cy5) e o outro de G (Green, cor associada ao corante Cy3), é possível dizer que a razão de expressão entre os dois canais (M) é

$$M = \log_2 R - \log_2 G = \log_2 (R/G).$$

A intensidade dos spots costuma ser expressa pela equação, representadas por A:

$$A = (\log_2 R + \log_2 G) / 2, \text{ ou seja, a média dos logs das intensidades}$$

Foi feita a opção por trabalhar com um outro tipo de equação, uma vez que A seria incapaz de lidar com genes de expressão do tipo tudo-ou-nada, que nós consideramos de grande importância. Nestas condições, quando um dos canais tem valor "zero", não é possível definir um valor ($\log_2 0$). Para contornar este problema optamos por usar a intensidade total do spot (Koide *et al*, 2005).

$$S = \log_2 (R+G) / 2, \text{ ou seja, o log da média.}$$

Não existe um método ideal para a normalização dos dados de microarrays, mas diferentes métodos que são eficientes em condições específicas. Nós estamos usando dois métodos combinados e consecutivos para a normalização dos dados: dye-swap e lowess.

"Dye-swap" é um método experimental que visa corrigir erros decorrentes da marcação pelos fluoróforos. Desvios decorrentes do corante podem ter origem nas propriedades físicas do corante (meia-vida, sensibilidade a calor e luz); na eficiência de incorporação pela enzima ou mesmo de variações experimentais, como leitura do scanner. Para que seja feita a normalização por swap cada lâmina deve ter um par equivalente com marcação trocada. Por exemplo, em um experimento a amostra "A" é marcada com Cy5 (R) e a amostra "B" é marcado com Cy3 (G) enquanto em paralelo, no experimento "swap" a amostra "A" é marcada com Cy3 (G) e amostra "B" é marcada com Cy5 (R). Este tipo de normalização é calculado para as amostras "A" e "B", utilizando-se os corantes R (Red) e G (Green) da seguinte forma:

$$M_{\text{swap}} = 1/2 \log_2 ((R/G) / (R_{\text{swap}}/G_{\text{swap}})) = 1/2 \log_2 ((A/B) / (B'/A'))$$

Lowess - locally weighted linear regression (Cleveland, 1979), é um algoritmo que visa corrigir erros sistemáticos dependentes da intensidade do sinal. É notável que os dados gerados apresentam dependência da intensidade, de forma que ocorre um desvio do eixo zero, mais evidente em spots de baixa expressão. O primeiro passo do *lowess* é considerar janelas de intensidade. Para cada uma dessas janelas é traçada uma reta que tenta ajustar os pontos daquele intervalo a zero. As retas geradas em cada janela de intensidade são por fim ligadas, formando uma curva, a curva LOWESS. A

normalização ocorre ao ajustar os dados a esta curva final (Yang *et al* 2002; Quackenbush 2002). O ajuste *lowess* tem alguns parâmetros a serem definidos, sendo o mais importante o "span smooth", representado por "f". Ao determinar um valor para "f", determina-se a proporção de pontos que devem ser usados em cada janela de intensidade. Quanto maior este valor, maior serão os intervalos de intensidade e, portanto, mais suave será a curva final. Neste trabalho foi usado $f=0,25$, representando que foram usados 25% dos pontos em cada janela (**figura 11**).

É importante lembrar que estes ajustes não foram feitos utilizando todos os dados gerados no experimento, uma vez que em uma etapa anterior foi feito um corte em que foram excluídos os spots de baixa intensidade, ou seja, aqueles de menor confiança. Este corte foi feito para spots cuja intensidade era menor que o quantil 80% da distribuição do *background* local (ao redor do spot), ou seja, quando apenas 20% dos pixels do *background* são mais intensos que os pixels pertencentes aos spots correspondentes.

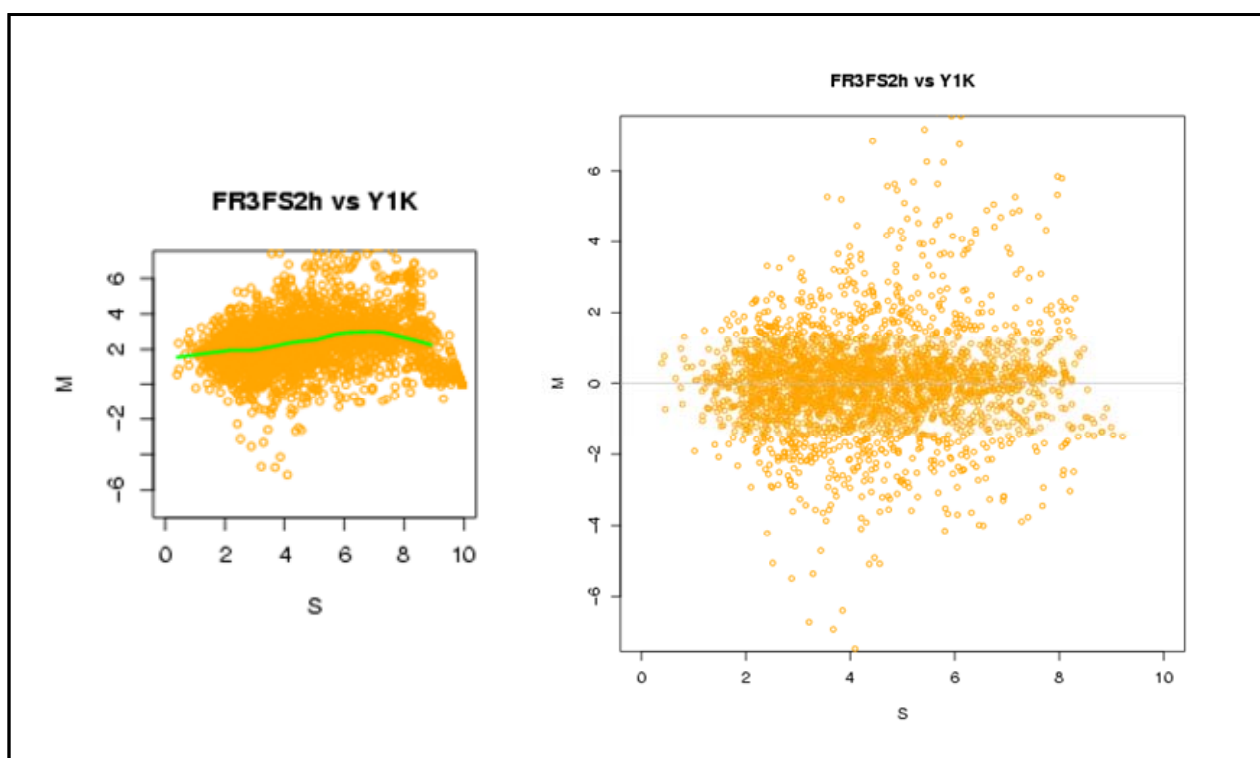


Figura 11: Gráficos SxM. Esquerda: após normalização por swap, antes da normalização por lowess; a linha representa a curva lowess. Direita: pontos normalizados por lowess.

2.4.14. Determinação das probabilidades de expressão gênica

A análise estatística foi feita por Fábio Nakano, elaborando inicialmente uma tabela de probabilidades de expressão em relação às células Y1 não tratadas (controle)

para cada gene em cada condição testada. Probabilidade é uma medida que assume valores entre zero e um sendo que, no modelo utilizado, valores próximos a 0,5 indicam que não há variação no nível de expressão em relação ao controle, valores próximos de zero indicam inibição do gene em relação à célula Y1 não tratada e, de forma inversa, razões próximas de 1 indicam estímulo do gene. Esta probabilidade não indica a intensidade da expressão do gene, sendo que genes com variações sutis podem apresentar probabilidade de expressão de 1, bem como genes de expressão muito elevada. Desta forma, esta medida tem a qualidade de detectar genes com regulação muito controlada mesmo que apresentem baixa indução.

Como um exemplo são mostrados abaixo dois genes que apresentam probabilidade de expressão de "1" em tratamentos de FGF2 por 2 horas em células Y1 (figura 12). Apesar de ambos apresentarem o mesmo valor de probabilidade, o gene *jun-b* apresenta alta indução enquanto *desmin* apresenta baixa indução.

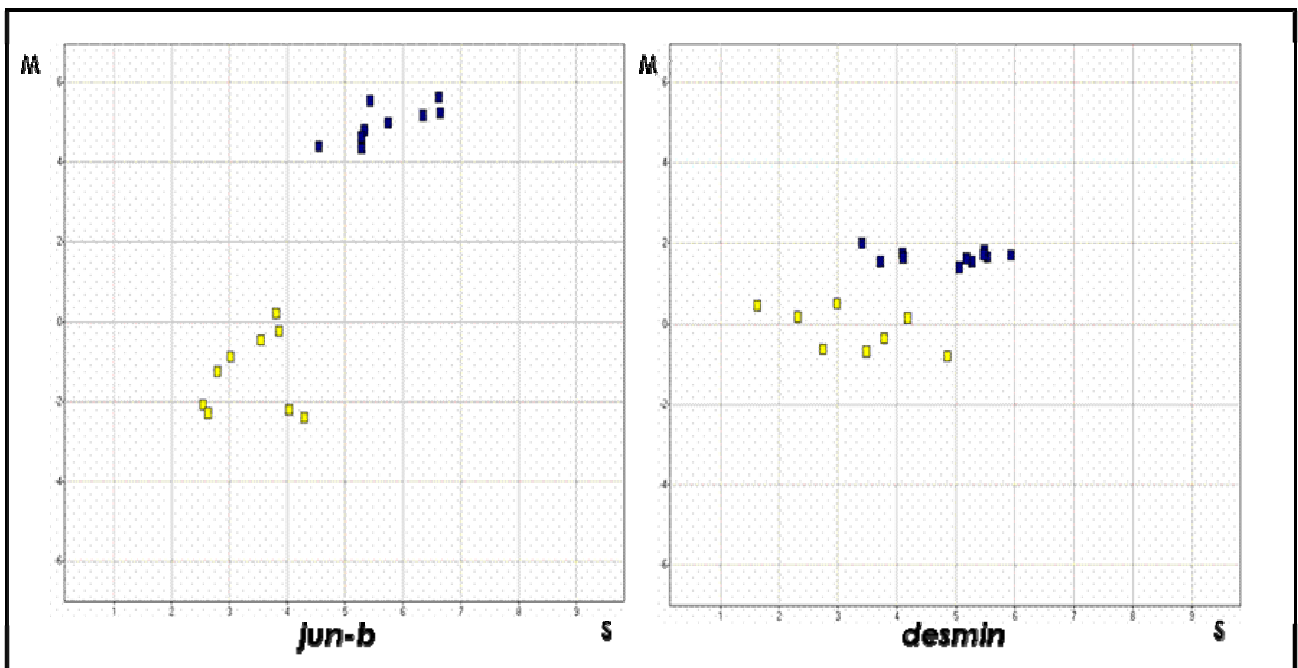


Figura 12: A figura mostra genes de razão de expressão diferentes (M médio), mas cuja probabilidade de expressão é igual para ambos ("1"). Os pontos escuros representam os genes em condição de tratamento (Y1 tratada com FGF2 por 2 horas) enquanto os pontos claros são os controles, indicando a variação intrínseca do experimento.

$$S = \log_2 \left(\frac{R+G}{2} \right) ; M = \log_2 \left(\frac{R}{G} \right).$$

O cálculo de probabilidade de expressão é feito projetando os pontos do gráfico acima em M (razão de expressão). A partir dos dados de média e variância destes pontos é calculada a área da curva normal obtida, acima e abaixo da projeção do zero, como exemplificado na figura 13.

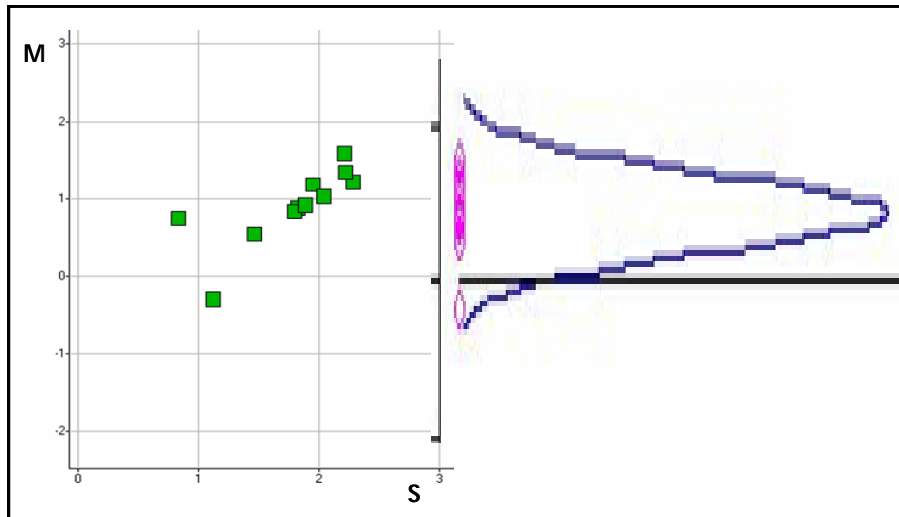


Figura 13: Exemplo ilustrativo de como é calculada a probabilidade de expressão de cada gene em cada condição. Neste caso, a área da curva acima da linha do zero compreende 97% da área total da curva, sendo este o valor de probabilidade obtido para este gene (*c-jun*) nesta condição (Y1 estimulada por ACTH por 30 minutos).

2.4.15. Seleção de genes regulados

Para a determinação dos genes regulados por FGF2 ou por ACTH foram feitas buscas no banco de dados Access de forma a selecionar os genes de probabilidade de expressão superior a 0,85; no caso de estímulo; ou inferior a 0,15; em casos de inibição. Este valor, escolhido arbitrariamente, visava determinar um corte alto, de forma a selecionar um número menor de genes, mas que estes fossem verdadeiramente regulados. Todos os genes selecionados apresentam no mínimo oito pontos, representando spots válidos. Estas condições deveriam ser cumpridas tanto em estímulos de trinta minutos quanto de duas horas, de forma a aumentar o grau de confiança nos dados.

O próximo passo foi anotar a função do gene e o processo celular em que participa, de acordo com as informações do Entrez-Gene. Em seguida, todos os genes selecionados foram submetidos ao KEGG ("color objects in KEGG pathways", Kanehisa, 2000) para que fossem destacadas as vias ativadas em cada condição.

Para a seleção de genes relacionados a vida ou morte das células a busca no Access foi um pouco diferente. Foram selecionados apenas com base na probabilidade (o número de pontos não foi levado em consideração) todos os genes de expressão induzida (0,7) ou reprimida (0,3) em condições de **estímulo mitogênico (E)**:

- Linhagem Y1 tratada com soro por 30 minutos (Y1S30)

- Linhagem Y1 tratada com soro por duas horas (Y1S2h)
- Linhagem FR3 tratada com soro por 30 minutos (FR3S30)
- Linhagem FR3 tratada com soro por 2 horas (FR3S2h)
- Linhagem FR3 tratada com FGF2+ soro por 30 minutos (FR3FS30)
- Linhagem FR3 tratada com FGF2+ soro por duas horas (FR3FS2h)
- Linhagem FR3 tratada com FGF2 por 30 minutos (FR3F30)
- Linhagem FR3 tratada com FGF2 por duas horas (FR3FS2h)

O mesmo tipo de seleção foi feito para condições de **morte celular programada (M)**:

- Linhagem Y1 tratada com FGF2+soro por 30 minutos (Y1FS30)
- Linhagem Y1 tratada com FGF2+ soro por duas horas (Y1FS2h)
- Linhagem Y1 tratada com FGF2 por 30 minutos (Y1F30)
- Linhagem Y1 tratada com FGF2 por duas horas (Y1F2h)

Para determinar os genes de expressão aumentada (UP) em condições de estímulo mitogênico (E) foi feita uma busca no Access de maneira que, a partir dos genes estimulados em condição de mitose, foram subtraídos aqueles que também eram estimulados em condição de morte: **(E)UP - (M)UP = estimulados apenas em condição de estímulo mitogênico.**

De modo semelhante, para determinar os genes inibidos em condição de "estímulo mitogênico", a partir dos genes inibidos (DOWN) foram subtraídos os genes que encontrassem representantes em condições de inibição em "morte programada": **(E)DOWN - (M)DOWN = inibidos apenas em condição de estímulo mitogênico.**

O mesmo tipo de busca foi feito, de maneira inversa, de forma a determinar os genes estimulados e inibidos em condições de morte celular programada.

Mais uma vez, foram anotados a função e o processo celular em que o gene está envolvido e foi feita a busca pelas vias alteradas no KEGG, como descrito acima.

2.4.16. Análise de correlação dos genes

Uma etapa de extrema importância em estudos de microarray é a determinação de padrões de expressão. Dado o grande número de genes que são analisados simultaneamente é necessário que seja feita uma análise global na qual grupos ("clusters") de genes de interesse sejam assinalados dentro do universo amostral.

O agrupamento ou "clusterização" é uma forma de estabelecer conjuntos de genes que apresentam comportamento semelhante entre as condições testadas. O intuito desta abordagem é encontrar vias e eventos que indiquem o "programa" ao qual a célula está respondendo, ou seja, indique os processos biológicos nos quais a célula está envolvida.

Para formação de "clusters" é necessário estabelecer regras para medidas de associação e de diferença entre os genes e entre os clusters formados. Dentre os algoritmos de *clusterização* usados em microarray, alguns dos mais comuns são o hierárquico e o *k-means* (Sherlock, 2001). O hierárquico é considerado um método aglomerativo no qual inicialmente cada gene é considerado um cluster, havendo "N" clusters iniciais. A cada passo são agrupados, de acordo com as regras estabelecidas, os clusters mais próximos formando (N-1) clusters no primeiro passo, (N-2) clusters no segundo passo e assim por diante, até que seja formado um único cluster contendo todos os genes. O resultado desta análise é apresentado na forma de dendogramas ou árvores filogenéticas, em que o gene apresenta maior grau de relação quanto maior for a proximidade com o outro gene na árvore. O "k-means" é divisivo, ou seja, a partir de um único cluster contendo todos os dados, há divisão em "k" clusters menores, de acordo com o número de clusters que se deseja formar. Dentro dos clusters não há indicação de conexão específica entre os genes.

A formação dos clusters pelo método hierárquico, em princípio, gerando dendogramas não foi capaz de esclarecer os processos biológicos em que a célula está envolvida. Neste trabalho Fábio Nakano utilizou a correlação de Pearson para estabelecer uma medida de coordenação entre os genes. Este tipo de análise gera, como resultado final, gráficos em que vários genes podem estar simultaneamente conectados de forma a indicar uma coordenação mútua.

A primeira etapa neste procedimento é selecionar os genes regulados, o que, neste caso, foi estabelecido o corte de 0,3; para os genes inibidos, ou 0,7; para os estimulados. A seguir foi montada uma matriz de correlação para todos os genes que se deseja estudar. Nesta matriz, sempre que houver intersecção do mesmo gene entre a coluna e a linha de referência, a correlação será igual a 1 (indicado na **tabela 2** em cinza). Desta maneira, é óbvio perceber que quanto mais próximos de 1 forem os índices de correlação, maior será a coordenação entre os genes. Na tabela exemplificada abaixo as letras A até F representam genes de interesse. Neste caso foi estabelecido um corte de "0,50" para determinar as interações de interesse, estabelecendo três relações coordenadas: entre os genes A-E; B-D e C-E.

Tabela 2: Matriz exemplificando valores de correlação entre genes hipotéticos (A a F).

| | A | B | C | D | E | F |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 1.00 | -0.22 | -0.41 | 0.12 | 0.51 | -0.11 |
| B | -0.22 | 1.00 | -0.07 | 0.91 | -0.24 | -0.16 |
| C | -0.41 | -0.07 | 1.00 | 0.08 | 0.57 | -0.50 |
| D | 0.12 | 0.91 | 0.08 | 1.00 | 0.24 | -0.44 |
| E | 0.51 | -0.24 | 0.57 | 0.24 | 1.00 | 0.26 |
| F | -0.11 | -0.16 | -0.50 | -0.44 | 0.26 | 1.00 |

Para determinar os valores de correlação é usada a seguinte equação:

$$Cor(X, Y) = \frac{\sum_k ((X_k - \mu_X)(Y_k - \mu_Y))}{\sqrt{Var(X)Var(Y)}}$$

Nesta equação, "X" e "Y" representam os genes entre os quais será estabelecida a correlação (Cor). "X_k" representa a razão de expressão do gene "X" na condição "k"; enquanto "μ_X" representa a média das razões de expressão de "X" em relação a todas as condições consideradas dentro do conjunto, sendo este o valor de referência. No denominador temos a variância, um parâmetro que indica a variabilidade das amostras dentro do conjunto, sendo expressa por $(X - \mu_X)^2 / (n - 1)$, onde n é o tamanho da amostra. O somatório indica que é feito este cálculo para todas as condições presentes no conjunto, estabelecendo um valor final, positivo ou negativo, de acordo com o comportamento geral dos genes.

Como a variância é um valor sempre positivo, o sinal do índice de correlação é determinado por seu numerador. Se $(X_k - \mu_X)$ é um valor positivo, ou seja, se as contribuições forem mais positivas (indução do gene) e $(Y_k - \mu_Y)$ da mesma forma é um valor positivo, o valor de correlação será positivo ((+) . (+) = positivo). De forma semelhante, se ambos os valores forem negativos, o valor de correlação também será positivo ((-) . (-) = positivo), ou seja, os genes estão agindo de forma coordenada, ambos reprimidos. O valor de correlação é negativo quando um dos genes apresenta valor positivo (indução) e o outro apresenta valor negativo (repressão).

Foram feitas as análises de correlação de Pearson em dois conjuntos de condições. Em um dos conjuntos foram incluídas todas as condições disponíveis (grupo

A) e no outro conjunto foram incluídas apenas as condições em que a célula sobrevive (grupo B) (tabela 1, materiais e métodos, item 2.4).

Grupo A: Y1K; Y1F30; Y1F2h; Y1S30; Y1S2h; Y1FS30; Y1FS2h; Y1A30; Y1A2h; Y1AF30; Y1AF2h; Y1AS30; Y1AS2h; FR3K; FR3F30; FR3F2h; FR3S30; FR3S2h; FR3FS30; FR3FS2h; RasN17+dexaK; RasN17-dexaK; RasN17+dexaF30; RasN17-dexaF30.

Grupo B: Y1K; Y1S30; Y1S2h; Y1A30; Y1A2h; Y1AS30; Y1AS2h; FR3K; FR3F30; FR3F2h; FR3S30; FR3S2h; FR3FS30; FR3FS2h; RasN17+dexaK; RasN17-dexaK; RasN17+dexaF30.

A análise foi focada em grupos específicos de genes, selecionando aqueles que eram pertencentes às vias de interesse, indicadas pelo KEGG. Essa foi uma maneira de reduzir a complexidade da amostra e facilitar a análise dos processos envolvidos. Para a determinação dos índices de correlação foram observados genes que, de acordo com o KEGG, pertenciam a vias de MAPK, ciclo celular, apoptose, adesão focal, síntese de ATP, genes ribossomais e pertencentes ao ciclo de Krebs.

O grupo de ciclo celular foi escolhido por motivos óbvios, uma vez que é o foco principal do laboratório. A via de MAPK é a principal via de sinalização de FGF, sendo esta via necessariamente ativada por mitógenos. Os genes relacionados a apoptose foram escolhidos pela observação de um processo de morte celular iniciada por FGF2, o que poderia ser evidenciado pela ativação de vias apoptóticas.

A adesão focal foi observada por conter a caveolina, proteína que dirige o sinal iniciado no receptor de FGF ao agrupar moléculas de h-ras. O ciclo de Krebs e síntese de ATP foram escolhidos uma vez que trabalhos do laboratório, na época, observavam vias alternativas de morte celular envolvendo a síntese de ATP.

Para que fosse determinada uma linha de corte acima da qual índices de correlação fossem considerados válidos foi usado um valor acima da maior correlação entre o gene normalizador *etfdh* e sua coordenação com todos os outros genes, sendo assim estabelecido o valor de 0,66 como "threshold".

Os clusters formados em cada condição, grupo A (todas as condições) e grupo B (condições de sobrevivência), foram comparados para evidenciar coordenações exclusivas de processos de morte programada, o que foi feito na forma de uma subtração de matrizes. As arestas (linhas de ligação entre os genes) comuns às duas condições são subtraídas, evidenciando exclusivamente as correlações de interesse. O comprimento das arestas não é proporcional ao valor do índice de correlação.

2.5. Outras técnicas de análise de ácidos nucleicos

2.5.1. Amplificação do cDNA por PCR

Para amplificar o cDNA obtido pela ação da enzima transcriptase reversa utilizou-se reação de PCR com um par específico de primers. Reações de volume final igual a 20 μ l foram montados da seguinte forma: 2 μ l de tampão PCR 10x (200mM de Tris-HCl pH 8,4; 500mM de KCl); 0,4 μ l de dNTPs (10mM); 1 μ l de primer sense (10 μ M); 1 μ l de primer antisense (10 μ M); 0,6 μ l de MgCl₂ (50mM); 1 μ l do produto da transcrição reversa, água destilada até completar 19,5 μ l e 0,5 μ l (2,5U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O ciclo de amplificação por PCR utilizado foi: 94°C por 1min, T_M por 1minuto e 72°C por 2min, sendo que a temperatura de melting (T_M) variou de acordo com os primers utilizados. Os ciclos foram repetidos 35 vezes, sendo a seguir as reações mantidas por 10 minutos a 72°C e então resfriadas a 4°C. O resultado da reação foi analisado em gel de agarose 1%.

2.5.2. Northern Blot

(Sambrook, 1989)

2.5.3. Remoção das sondas radioativas da membrana

As membranas foram lavadas por 30 minutos a 70°C com solução de lavagem (0,1X SSC, 0,1% SDS).

2.5.4. Marcação de sondas

Em um tubo foram adicionados 25ng a 100ng de cDNA e 10 μ L de pd(N)₆ primer (500 μ M). Estes reagentes foram fervidos por 5 minutos e colocados no gelo. Adicionou-se 2 μ L de dATP; dTTP; dGTP; 5 μ L de *Filling in buffer*; H₂O para volume final de 50 μ L; 0,5 μ L de Klenow; 50 μ Ci dCTP*. A reação foi feita a 37°C por 3 horas, sendo posteriormente purificada em coluna de Sephadex G50 (Sambrook, 1989).

2.5.5. PCR relativo/semi-quantitativo

A partir de 1 μ g de RNA total é feito o tratamento com RNase I e a reação de RT com superscript III (protocolos do fabricante). O produto da RT é diluído 25X e são usados 5 μ L em cada reação. Em cada tubo são adicionados 10 μ L de SybrGreen PCR Master Mix

(Applied Biosystems) e 2,5 µL de cada primer (concentração final 600nM). A reação é submetida a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos para ativar a enzima, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto no equipamento ABI5700.

Todos os primers usados foram desenhados no software Primer Express, usando o padrão do programa, limitando apenas as considerações quanto ao tamanho do amplicon gerado para no mínimo 95 e no máximo 105 pares de bases.

A estimativa de variação de expressão gênica é feita de acordo com Pfaffl, 2001, usando como gene de expressão constitutiva *etfdh* (electron transferring flavoprotein dehydrogenase), um gene escolhido a partir dos ensaios de microarray, que parece variar pouco entre todas as condições testadas. Para o gene de interesse foram feitas triplicatas para condição a ser analisada, enquanto para o gene-controle foram feitas duplicatas de cada condição.

Oligonucleotídeos

c-fos (TM=62°C)

sense: GAA GGG AAC GGA ATA AGA TGG

antisense: GCC GGA AAC AAG AAG TCA TC

r-acth (TM=62°C)

sense: TCG TGA TTT CTG TAA GTC

antisense: TTT ACA ACA CTC AAA GCA

gapdh (TM=61°C)

sense: GCACCACCAACTGCTTAGC

antisense: TTCTCCACCACTTCGTCC

M13 (TM=60°C)

sense: CCCAGTCACGACGTTGTAACG

antisense: AGCGGATAACAATTCACACAGG

Oligonucleotídeos usados em PCR em tempo real

ahcy

sense: CGCCAGCATGTCTGATAAACTG

antisense: CCTGGCATCTCATTCTCAGCTA

carb2

sense: GCTCAGGGAGCCCATTACTG

antisense: TGTCACCATCGCTTCTCAG

cav1

sense: GACGCGCACACCAAGGA

antisense: CTGGTTCTGCAATCACATCTCA

cdc25

sense: AGGAACCATTGAGAACATTTGG

antisense: CCTGATGCTCCCAGAGACG

col3a1

sense: CAGCAAATCACTTACACAGTTCTAGAG

antisense: GTCTCATTGCCTTGCGTGTT

cyr61

sense: CAGCTCACTGAAGAGGCTTCCT

antisense: CCAAGACGTGGTCTGAACGA

dusp6

sense: AGAAACTCAAAGACGAGGGCTG

antisense: GCCGTCTAGATTGGTCTCGC

egr1

sense: AACCCATGAGCACCTGACCA

antisense: CAACCGAGTCGTTGGCTG

etfdh

sense: GTTGGTGCGACTAACCAAGCT

antisense: TGAAGAACATCTTGGAGCACACA

fgfr2

sense: GTTGCCAGAGGATCCAAAGTG

antisense: CATGACTACTTGCCCGAAGCA

h2afz

sense: TTGCAGCTTGCTATACGTGGA

antisense: CCGATCAGCGATTTGTGGAT

kras2

sense: TGGATGAGTACGACCCTACGATAG

antisense: CTTGACCTGCTGTGTCGAGAAT

man2b1

sense: AATGGCTTCTCTCCCGTTG

antisense: CACCATTGACAACTCCAGGC

nr4a1

sense: GGCCACAGGGAGTGGGA

antisense: CGTTGCTGGTGTCCATATTGA

3. Resultados

3.1. Bibliotecas de SSH

3.1.1. Geração de biblioteca de SSH para genes estimulados por FGF2

Uma biblioteca SSH-FGF2 foi gerada segundo os procedimentos descritos em materiais e métodos. Os cDNAs obtidos pela reação de RT mostram-se em gel de agarose 0,8% como um "smear" que vai de aproximadamente 100pb até cerca de 5Kb. As amostras de cDNA que sofreram digestão pela enzima de restrição RsaI atingiram até 3Kb, com a maior parte abaixo de 2Kb.

Um teste, feito por PCR, teve o objetivo de mostrar a eficiência da reação de transcrição reversa, bem como a ausência de contaminação por DNA genômico na preparação para gerar a biblioteca. Para tanto, foram usados primers que anelam em exons diferentes para amplificar o receptor de ACTH (*acth-r*), cuja expressão é constitutiva em células Y1. Como é possível observar na **figura 14** abaixo, a banda referente ao *acth-r* foi amplificada a partir de ambas as populações de cDNA, tratadas ou não com FGF2, e não há amplificação quando a reação é feita a partir de mRNA (controles negativos). Assim, há evidência de que o transcrito, na forma de cDNA, está preservado, e ainda de que não há traços de contaminação por DNA genômico no mRNA de partida.

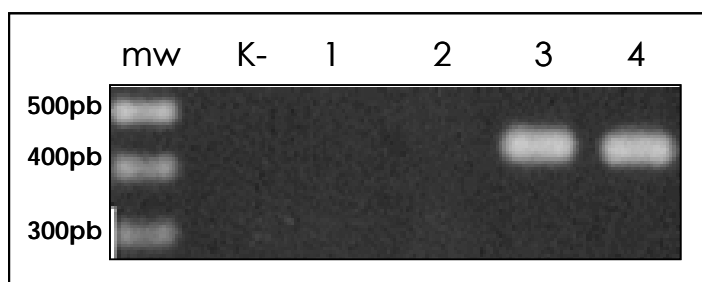


Figura 14: Teste de qualidade do material usado por PCR visando detectar *acth-r*. K-) controle negativo da reação; 1)mRNA de células controle; 2)mRNA de células tratadas com FGF2; 3) cDNA de células controle; 4) cDNA de células tratadas com FGF2.

Tendo obtido resultados que demonstram qualidade do material, o passo seguinte da técnica de SSH consiste em ligar adaptadores ao final 5' dos fragmentos. Estes

adaptadores, fornecidos no kit, são os responsáveis pela amplificação diferencial do cDNA durante as reações de PCR. Para que cada tratamento receba os dois adaptadores, cada amostra é dividida em dois tubos, sendo que metade será ligada ao adaptador 1 e a outra metade, ao adaptador 2R.

Deve ser lembrado que embora apenas os genes estimulados por FGF2 sejam de interesse, todo o procedimento de SSH é feito para cDNA de células estimuladas, subtraindo-se o controle (FGF2 – K → genes estimulados por FGF2), e vice-versa (K- FGF2→ genes inibidos por FGF2). Este procedimento é feito com o intuito de usar, na parte final da técnica de SSH, ambos como sonda radioativa em ensaios de varredura, restringindo os genes de interesse àqueles que hibridizam preferencialmente com a sonda formada por genes estimulados pelo fator de crescimento.

Como forma de analisar a eficiência de ligação dos adaptadores é feita uma reação de PCR em que é amplificado o fragmento de cDNA referente à enzima constitutiva gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) com primers fornecidos pelo kit. Neste experimento os primers da porção 3' não variam, no entanto, os primers a 5', região em que são ligados os adaptadores, são diferentes. Quando o interesse está em detectar o grau de eficiência da ligação aos adaptadores, os primers devem formar híbridos com parte do adaptador, seja o adaptador 1 ou o 2R, levando portanto à formação *amplicons* maiores. A diferença de tamanho entre os *amplicons* que não receberam os adaptadores e aqueles que receberam deve ser em torno de 500pb. Um bom resultado deve apresentar “bandas pesadas” que tenham intensidade de cerca de 1/4 em relação às “bandas leves” (figura 15).

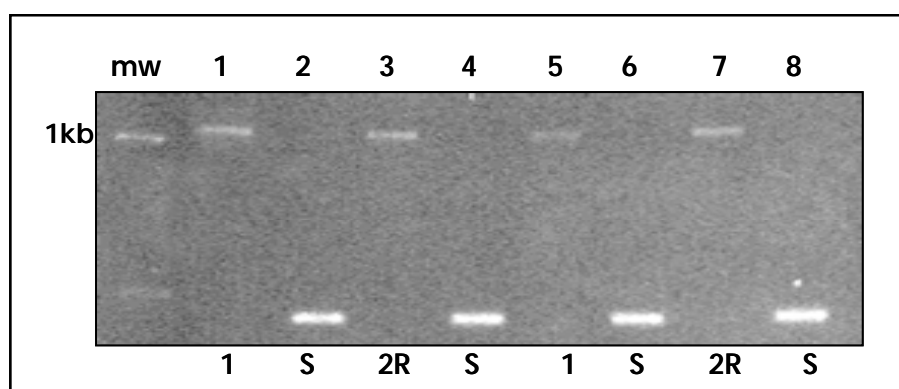


Figura 15: Gel 2% agarose, mostrando eficiência de ligação dos adaptadores 1 e 2R.
1 a 4 → cDNA de células não estimuladas (K)
5 a 8 → cDNA de células estimuladas por FGF2 (F)
2,4,6 e 8 → fragmentos sem adaptador (S)
1 e 5 → fragmentos que receberam adaptador 1 (1)
3 e 7 → fragmentos que receberam adaptador 2R (2R)

O próximo objetivo consiste em fazer duas hibridizações consecutivas com os fragmentos obtidos, gerando cDNA com características distintas. Por este motivo, durante a amplificação por PCR, haverá a supressão ou amplificação de determinados fragmentos, enriquecendo a amostra com os genes diferencialmente expressos.

Na **figura 16** temos o resultado da reação de PCR para os fragmentos que passaram por diferentes tipos de tratamentos. Os fragmentos que não sofreram dupla hibridização, apenas amplificação, são representados pelos controles 1C (para células não estimuladas) e 2C (para células que foram estimuladas por FGF2). Aqueles que foram amplificados sendo previamente submetidos às hibridizações são representados por K (sem estímulo) e F (estimulados por FGF2). É possível observar diferenças claras entre as diferentes amostras. Enquanto as primeiras mostram-se como um "smear" (figura 16, raias 4,6,10 e 12), as subtraídas apresentam-se como um padrão de bandas definidas. Além disso, observa-se que o padrão destas bandas é diferente ao comparar genes estimulados e genes inibidos por FGF2 (raias 11 e 9, respectivamente).

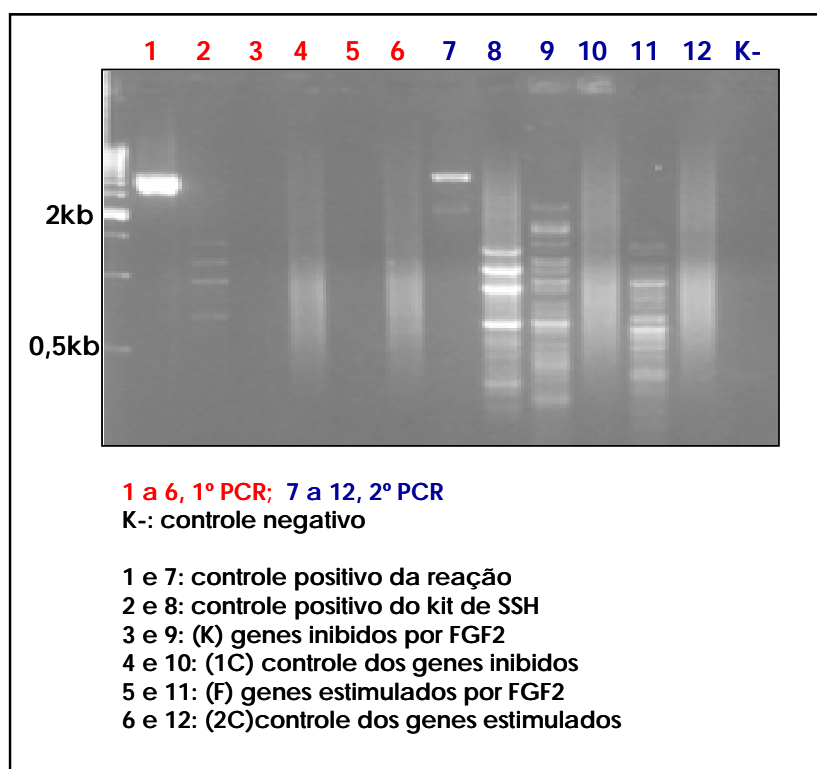


Figura 16: Gel de agarose 2% mostrando o padrão observado após as duas etapas de PCR, comparando amostras subtraídas a amostras-controle (não subtraídas). As amostras que foram submetidas a subtração apresentam um padrão de bandas bem definidas, diferente entre as condições de tratamento. As amostras-controle apresentam um "smear".

Para analisar o grau de eficiência obtido após todo o método de SSH, foi feito um teste de PCR semi-quantitativo que visava amplificar um gene de expressão constitutiva (*gapdh*) e outro que conhecidamente é estimulado por FGF2 no modelo celular estudado (*c-fos*). Neste experimento são retiradas alíquotas do mesmo tubo em que se está procedendo a reação, em diferentes ciclos do PCR, variando desta forma a intensidade da banda observada em gel de agarose.

Na **figura 17** é possível observar o resultado dos testes para os genes *gapdh* e *c-fos*. As condições 1C e 2C representam os “dados brutos” de expressão gênica. Nesta verifica-se que a expressão em “1C” (raias 4-5-6) e “2C” (raias 10-11-12) são equivalentes, e que, após a normalização há redução significativa de *gapdh* na amostra total, principalmente na condição “F” (estimulados por FGF2).

Quanto ao gene *c-fos*, verifica-se que não há expressão em células que não foram estimuladas (grupo 1C, poços 4 a 6), mas a expressão é alta após o estímulo por FGF2 (tubo 2C, raias 10 a 12). Desta forma, ao subtrair desta amostra os cDNAs que receberam o estímulo não há bandas, já que neste caso não é possível obter uma resposta negativa (raias 1 a 3, amostra K). Ao observar o padrão obtido após a normalização para o gene *c-fos*, verificou-se que houve redução de representatividade do gene na amostra total (tubo F, raias 7-8-9).

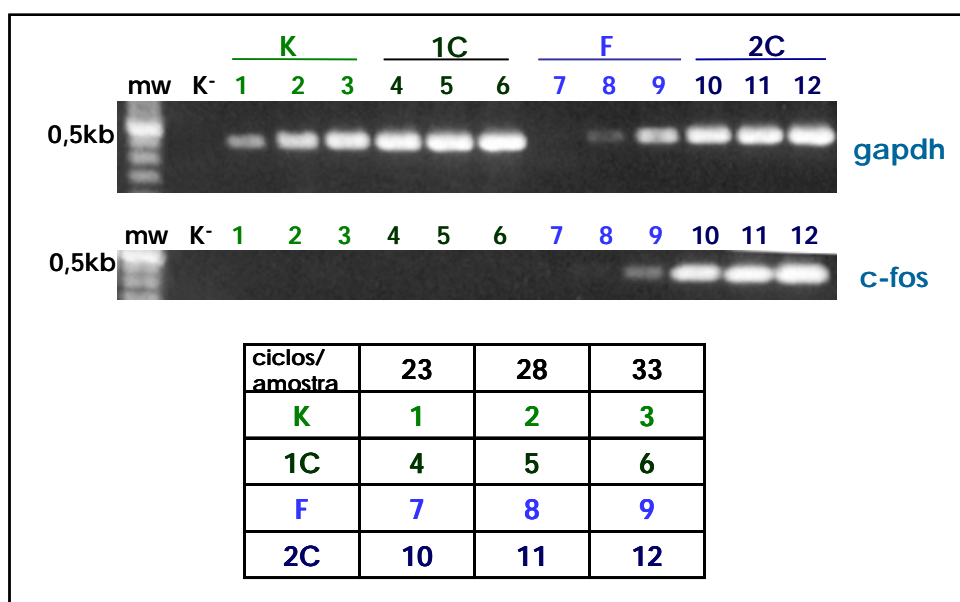


Figura 17: Gel de agarose 0.8%. Teste de eficiência final do método. Figura superior, PCR de amplificação para o gene *gapdh*, na figura inferior, PCR para o gene *c-fos*. Cada condição teve as amostras verificadas em 23, 28 e 33 ciclos. Mw: marcador de peso molecular; K- : controle negativo; K : genes inibidos; 1C: controle de “K”; F: genes estimulados por FGF2; 2C: controle de “F”.

Este resultado foi confirmado por um ensaio de Southern Blot fazendo uso de uma sonda de c-fos. Neste ensaio foram comparados cDNAs provenientes de células carenciadas ou tratadas com FGF2, juntamente com as fases posteriores de SSH, após a primeira amplificação por PCR. Como no ensaio de PCR, há marcação apenas nos cDNAs provenientes de células tratadas com FGF2 e, após as etapas de PCR em SSH, a marcação aparece fraca na condição tratada com FGF2 que foi normalizada e bastante intensa na condição controle, que recebeu estímulo de FGF2 mas não foi normalizada (**figura 18**).

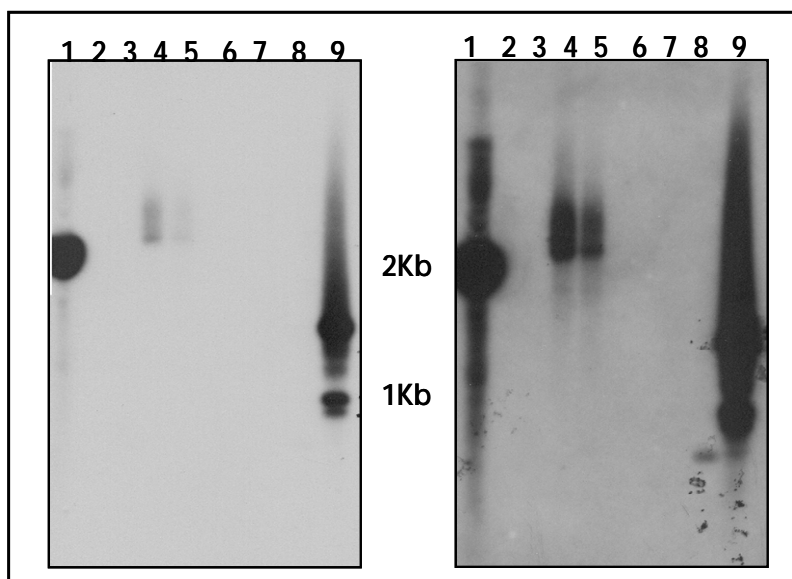


Figura 18: Experimento de Southern Blot usando-se como sonda fragmento de c-fos. As duas fotos representam filmes expostos à mesma membrana por períodos diferentes: *overnight* e por 3 dias, respectivamente. 1) Marcador de peso molecular; 2) cDNA de células controle, não tratadas com DNase; 3) cDNA de células controle, tratadas com DNase; 4) cDNA de células estimuladas com FGF2, não tratadas com DNase; 5) cDNA de células estimuladas com FGF2, tratadas com DNase; 6) após SSH, primeiro PCR, genes inibidos (K); 7) após SSH, primeiro PCR, controle de genes inibidos (1C); 8) após SSH, primeiro PCR, genes estimulados (F); 9) após SSH, primeiro PCR, controle de genes estimulados (2C).

3.1.2. Geração de clones SSH-FGF2 em plasmídeos pUC18

Após alguns testes em vetores, foi escolhido o plasmídeo pUC18, encontrado comercialmente já tratado com enzima de restrição de corte cego e desfosforilado (SmaI/BAP).

Após os procedimentos de clonagem foram isolados 480 clones (5 placas de 96 poços). Os clones foram submetidos a PCR de colônia e um terço da reação de amplificação foi aplicada em gel de agarose para que fosse estimado o tamanho dos insertos, bem como a eficiência da clonagem. O resultado, apresentado na **figura 19**, mostra que praticamente todos apresentam algum inserto.

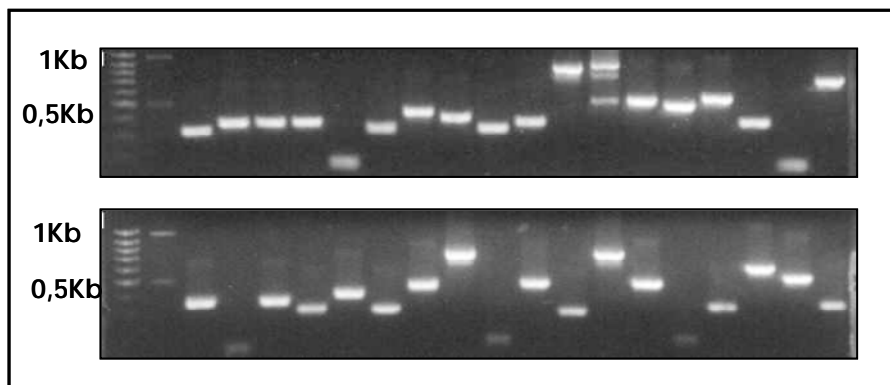


Figura 19: Reação de PCR de colônias feita com alguns dos clones gerados em pUC18.

3.1.3. Arranjo dos clones em contigs e anotação das seqüências

Os clones gerados foram seqüenciados e submetidos a ferramentas de bioinformática. O agrupamento foi feito usando os programas Phred/Phrap/Consed – Linux connectiva 7.0. Foram seqüenciados 480 clones, os quais deram origem a 59 “contigs” e 153 “singlets”. Contigs são grupos que possuem seqüências iguais ou contíguas, devendo agrupar um mínimo de 2 fragmentos. Singlets são fragmentos cujas seqüências não encontraram homologia com nenhuma outra, sendo, portanto, únicas na biblioteca. O padrão de distribuição dentro dos contigs é apresentado na **figura 20**.

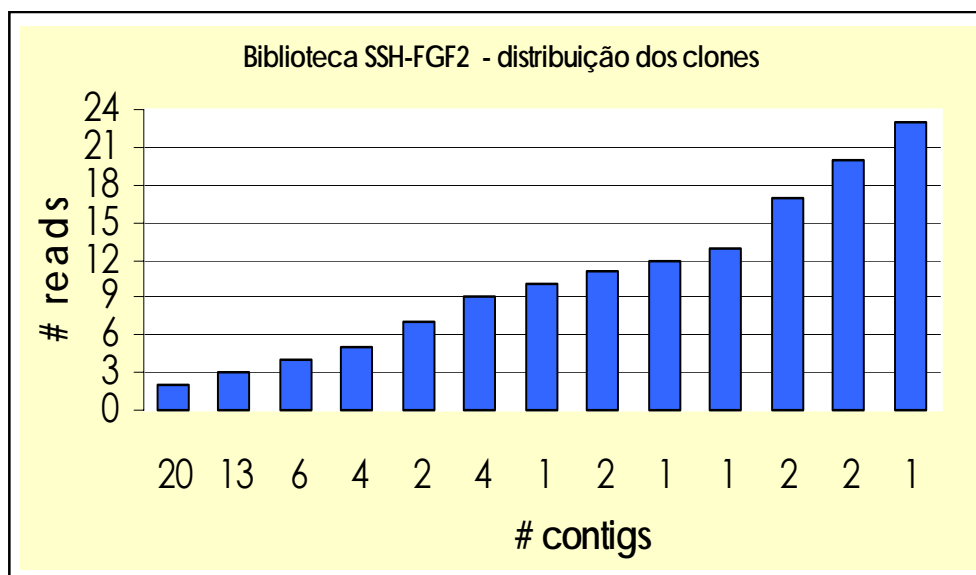


Figura 20: Gráfico mostrando o número de fragmentos seqüenciados presentes nos contigs gerados.

O passo seguinte foi submeter os contigs e singlets a bancos de dados de seqüências gênicas (Blast) para que pudessem ser determinados os genes que os originaram. Os contigs anotados tiveram um "e-value" significativo, sendo que o contig 3 foi aquele em que foi encontrado o valor de pior qualidade: $2e-39$, score de 168 bits e identidade de 107/113 (94%).

A anotação dos contigs pode ser vista na **tabela 3** abaixo.

Tabela 3: Anotação dos contigs gerados na biblioteca de fragmentos de genes estimulados por FGF2.

| Contig | Anotação | # clones |
|--------|--|----------|
| 1 | <i>Mus musculus</i> , ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit, isoform 1 (atp5a1) | 1 |
| | <i>Mus musculus</i> , expressed in non-metastatic cells 2, protein (nme2) | 1 |
| 2 | <i>Mus musculus</i> , FCH and double SH3 domains 2 (fchsd2) | 2 |
| 3 | <i>Mus musculus</i> , cytotoxic granule-associated RNA binding protein 1 (tia1) | 2 |
| 4 | <i>Mus musculus</i> , glyoxalase-I (glo1) | 2 |
| 5 | <i>Mus musculus</i> , pyruvate dehydrogenase E1 α subunit (pdha) | 2 |
| 6 | Indeterminado, não há seqüência descrita | 2 |
| 7 | <i>Mus musculus</i> , NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 8 | 2 |

| | | |
|----|--|---|
| | (ndufb8) | |
| 8 | <i>Mus musculus</i> , fibroblast growth factor receptor 2 (fgfr2) | 2 |
| 9 | <i>Mus musculus</i> , ribosomal protein L14 (rpl14) | 2 |
| 10 | <i>Mus musculus</i> , thioredoxin domain containing 10 (txndc10) | 2 |
| 11 | <i>Mus musculus</i> , melanoma antigen (mela) | 2 |
| 12 | <i>Mus musculus</i> , acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3a (asml3a- pending) | 2 |
| 13 | <i>Mus musculus</i> , ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2 (enpp2) | 2 |
| 14 | <i>Mus musculus</i> , antizyme inhibitor 1 (azin1) | 2 |
| 15 | <i>Mus musculus</i> , spermidine/spermine N1-acetyl transferase (sat) | 2 |
| 16 | <i>Mus musculus</i> , gene regulated by estrogen in breast cancer protein (greb1) | 2 |
| 17 | <i>Mus musculus</i> , conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase (chuk) | 2 |
| 18 | <i>Mus musculus</i> , H2A histone family, member Z (h2afz) | 2 |
| 19 | <i>Mus musculus</i> mitochondrion genome | 2 |
| 20 | Homo sapiens, thioredoxin domain containing 10 (txndc10) | 2 |
| 21 | <i>Mus musculus</i> , eukaryotic translation initiation factor 2 beta subunit (eif-2-Beta) | 3 |
| 22 | <i>Mus musculus</i> , nucleoporin 35kDa (nup35) | 3 |
| 23 | <i>Mus musculus</i> , non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein1 (nck1) | 3 |
| 24 | <i>Mus musculus</i> , chaperonin subunit 8 (theta) (cct8) | 3 |
| 25 | <i>Mus musculus</i> , vacuolar adenosine triphosphatase subunit C (atp6c1) | 3 |
| 26 | <i>Mus musculus</i> , charged amino acid rich leucine zipper 1 (crlz1) | 3 |
| 27 | <i>Mus musculus</i> , Sjogren syndrome antigen B (ssb) | 3 |
| 28 | <i>Mus musculus</i> , early growth response 2 (egr2) | 3 |
| 29 | <i>Mus musculus</i> , cDNA sequence BC027231 (hypothetic protein) | 3 |
| 30 | <i>Mus musculus</i> , tripartite motif protein 25 (trim25) | 3 |
| 31 | <i>Mus musculus</i> , thioredoxin domain containing 1 (txndc1) | 3 |
| 32 | <i>Mus musculus</i> Bcl2-associated athanogene 3 (bag3) | 3 |
| 33 | <i>Mus musculus</i> , Seqüência conservada indeterminada (2310075C12Rik) | 3 |
| 34 | <i>Mus musculus</i> , DBC2 protein (dbc2) | 4 |
| 35 | <i>Mus musculus</i> , early growth response 1 (egr1) | 4 |
| 36 | <i>Mus musculus</i> , polymerase (RNA)II (DNA directed) polypeptide K (polr2k) | 4 |
| 37 | <i>Mus musculus</i> , Sarcospan (sspn) | 4 |
| 38 | <i>Mus musculus</i> , eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 (eif3s2) | 4 |
| 39 | <i>Mus musculus</i> , cullin 3 (cul3) | 4 |
| 40 | <i>Mus musculus</i> , tyrosyl-tRNA synthetase (yars) | 5 |
| 41 | <i>Mus musculus</i> , H3 histone, family 3B (h3f3b) | 5 |
| 42 | <i>Mus musculus</i> , chaperonin subunit 4 (delta) (cct4) | 5 |

| | | |
|----|---|----|
| 43 | Indeterminado, não há seqüência descrita | 5 |
| 44 | <i>Mus musculus</i> , DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C (dnajc5) | 7 |
| 45 | <i>Mus musculus</i> , pleckstrin homology domain containing, family A (plekha1) | 7 |
| 46 | <i>Mus musculus</i> , son cell proliferation protein (son) | 9 |
| 47 | Indeterminado (clone RP23-105M23 on chromosome 2) | 9 |
| 48 | <i>Mus musculus</i> heat shock protein, 74 kda, A (hspa9a) | 9 |
| 49 | <i>Mus musculus</i> , seqüência conservada indeterminada (0610008C08Rik) | 9 |
| 50 | Indeterminado, não há seqüência descrita | 10 |
| 51 | <i>Mus musculus</i> , ribonucleic acid binding protein S1 (rnps1) | 11 |
| 52 | <i>Mus musculus</i> , early growth response 1 (egr1) | 11 |
| 53 | <i>Mus musculus</i> , Interferon-Related Developmental Regulator 1 (ifrd1) | 12 |
| 54 | <i>Mus musculus</i> , sequencia conservada indeterminada (2700059D21Rik) | 13 |
| 55 | <i>Mus musculus</i> , actin gamma cytoplasmic 1 (actg1) | 17 |
| 56 | <i>Mus musculus</i> , cold shock domain protein A (csda) | 17 |
| 57 | <i>Mus musculus</i> , splicing factor, arginine/serine-rich 6 (sfrs6) | 20 |
| 58 | <i>Mus musculus</i> , sterol-C4-methyl oxidase-like (sc4mol) | 20 |
| 59 | <i>Mus musculus</i> , ribosomal protein L13 (rpl13) | 23 |

Dentre os singlets, percebe-se que muitos clones não tiveram sucesso. Em um total de 153 singlets isolados, 98 são seqüências muito curtas para serem determinadas com segurança, outras se mostraram como o plasmídeo vazio, ou mesmo o seqüenciamento não foi eficiente. Os 55 restantes foram anotados e o resultado é descrito abaixo na [tabela 2](#). O valor de corte adotado para o “e-value” na anotação dos singlets foi de “1e-15”. Desta forma, a anotação baseada em valor menos significativo foi a do clone C-G12, que teve como “e-value” 1e-17 e identidade de 58/61 (95%).

Tabela 4: Anotação dos singlets gerados na biblioteca de fragmentos de genes estimulados por FGF2.

| Anotações dos Singlets | clone |
|--|--------------|
| <i>Mus musculus</i> , Prolyl Endopeptidase (prep) | B-C03 |
| <i>Mus musculus</i> , dual specificity phosphatase 6 (dusp6) | B-C08 |
| <i>Mus musculus</i> , early growth response 1 (egr-1) | B-C09 |
| <i>Mus musculus</i> , sulfatase 1 (sulf1) | B-E08 |
| <i>Mus musculus</i> , FGFR1 oncogene partner 2 (fgfr1op2) | B-F07 |
| <i>Mus musculus</i> , melanoma antigen, 80 kda (mela) | B-G10 |
| <i>Mus musculus</i> , transcription factor sp3 (sp3) | C-A06 |

| | |
|---|-------|
| <i>Mus musculus</i> , stromal cell derived factor 4 (sdf4) | C-A07 |
| <i>Mus musculus</i> , riken0610010i20 | C-A12 |
| <i>Mus musculus</i> , wilms' tumour 1-associating protein (wtap) | C-B03 |
| <i>Mus musculus</i> , ubiquitin specific protease 7 (usp7) | C-C10 |
| <i>Mus musculus</i> , eukaryotic translation elongation factor 1 gamma (eef1g) | C-D08 |
| Indeterminado | C-E01 |
| <i>Mus musculus</i> , importin 11 (ipo11) | C-F10 |
| <i>Mus musculus</i> , cathepsin h (ctsh) | C-G12 |
| <i>Mus musculus</i> , ribosomal protein l4 (rpl4) | D-A07 |
| <i>Mus musculus</i> , ribosomal protein s29 (rps29) | D-B03 |
| <i>Mus musculus</i> , seqüência conservada indeterminada, riken1810044o22 | D-B08 |
| <i>Mus musculus</i> arginine vasopressin receptor 1a (avpr1a) | D-C05 |
| <i>Mus musculus</i> , striatin calmodulin binding protein 3 (strn3) | D-D04 |
| <i>Mus musculus</i> , tumor protein p53-binding protein(tp53bp1) | D-E05 |
| <i>Mus musculus</i> , ribosomal protein l28 (rpl28) | D-F08 |
| <i>Mus musculus</i> , myeloid cell leukemia sequence 1 (mcl1) | D-G02 |
| <i>Mus musculus</i> , integrin beta 5 (itgb5) | D-G03 |
| <i>Mus musculus</i> , development and differentiation enhancing (ddef1) | D-G09 |
| <i>Mus musculus</i> , transferrin receptor (tfrc) | G-A05 |
| <i>Mus musculus</i> , seqüência conservada indeterminada, 0910001A06Rik | G-B10 |
| <i>Mus musculus</i> , neutral sphingomyelinase activation associated factor (nsmaf) | G-C06 |
| <i>Mus musculus</i> , mitochondrion genome | G-C09 |
| <i>Mus musculus</i> , isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha (ldh3a) | G-D08 |
| <i>Mus musculus</i> , radixin (rdx) | G-E07 |
| <i>Mus musculus</i> , ras homolog gene family, member B (rhob) | G-E09 |
| <i>Mus musculus</i> , unc-13 (unc13c) | G-E11 |
| Indeterminado, seqüência não descrita | G-G08 |
| <i>Mus musculus</i> , ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1 (arf-gep1) | G-H04 |
| <i>Mus musculus</i> , cysteine rich protein 61 (cyr61) | G-H12 |
| <i>Mus musculus</i> , proteasome 26S subunit, non-ATPase, 1 (Psmc1) | H-A02 |
| <i>Mus musculus</i> , v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (kras) | H-A06 |
| <i>Mus musculus</i> , calponin3, acidic (Cnn3) | H-A07 |
| <i>Mus musculus</i> ribosome biogenesis regulator homolog(RRS1) | H-B05 |
| <i>Mus musculus</i> , seqüência conservada indeterminada, 2310044D20Rik | H-B08 |
| <i>Mus musculus</i> radixin (rdx) | H-B10 |
| <i>Mus musculus</i> , seqüência conservada indeterminada, 2610016F04Rik | H-C03 |
| <i>Mus musculus</i> , ribosomal L1 domain containing 1 (rsl1d1) | H-C06 |

| | |
|--|-------|
| <i>Mus musculus</i> , synaptojanin 2 binding protein (synj2bp) | H-C08 |
| <i>Mus musculus</i> , pre-b-cell colony-enhancing factor (pbef-pending) | H-D06 |
| <i>Mus musculus</i> , nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1 (Nfkb1) | H-D10 |
| <i>Mus musculus</i> , Nedd4 family interacting protein 1 (Ndfip1) | H-E03 |
| <i>Mus musculus</i> , seqüência conservada indeterminada, BC005662 | H-E10 |
| <i>Mus musculus</i> , non-pou-domain-containing, octamer-binding protein(nono) | H-F08 |
| <i>Mus musculus</i> , s-adenosylhomocysteine hydrolase (ahcy) | H-G02 |
| Indeterminado, não há seqüência descrita | H-G09 |
| <i>Mus musculus</i> ubiquitin-conjugating enzyme e2i (ube2i) | H-G11 |
| <i>Mus musculus</i> , mammary tumor virus receptor 2 (mtvr2) | H-H04 |
| <i>Mus musculus</i> , rab6 member ras oncogene family (rab6) | H-H11 |

3.1.4. Geração de biblioteca de SSH para genes estimulados por ACTH

A biblioteca de genes estimulados por ACTH foi feita da mesma maneira que a de genes estimulados por FGF2, com exceção do mRNA, que foi obtido a partir de RNA total extraído por gradiente de Cloreto de Césio e posteriormente submetido a Oligotex mRNA mini kit (Qiagen). Todas as etapas dos procedimentos estão documentadas nas **figuras 21 a 25**.

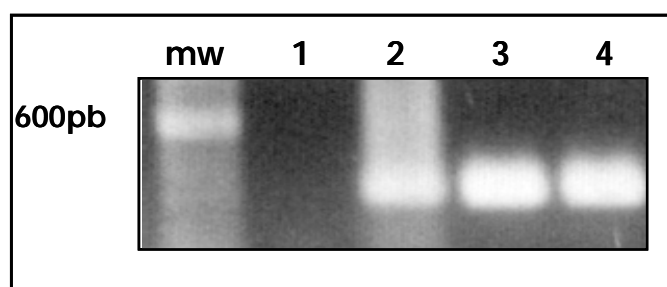


Figura 21: Gel de agarose 1%, PCR para o gene GAPDH. PCR foi feito para garantir a qualidade do RNA a ser usado. 1) controle negativo; 2) controle positivo; 3) cDNA não estimulado (K); 4) cDNA tratado com ACTH (A).

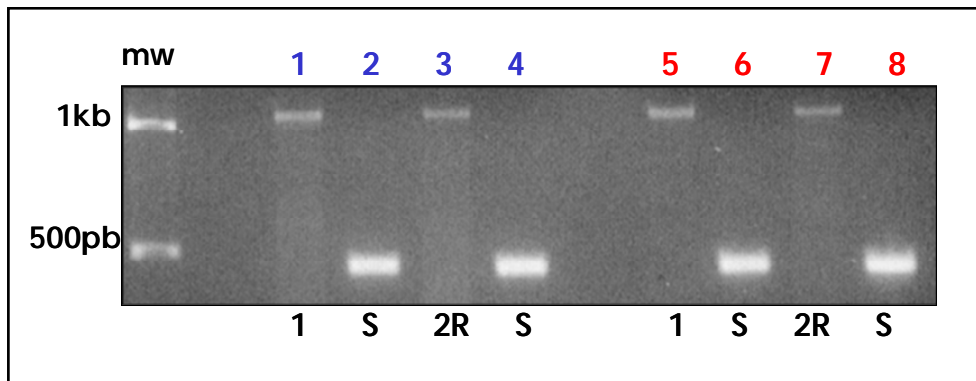


Figura 22: Gel 2% agarose, mostrando eficiência de ligação dos adaptadores 1 e 2R.
 1 a 4 → cDNA de células não estimuladas
 5 a 8 → cDNA de células estimuladas por ACTH
 2,4,6 e 8 → fragmentos sem adaptador (S)
 1 e 5 → fragmentos que receberam adaptador 1 (1)
 3 e 7 → fragmentos que receberam adaptador 2R (2R)

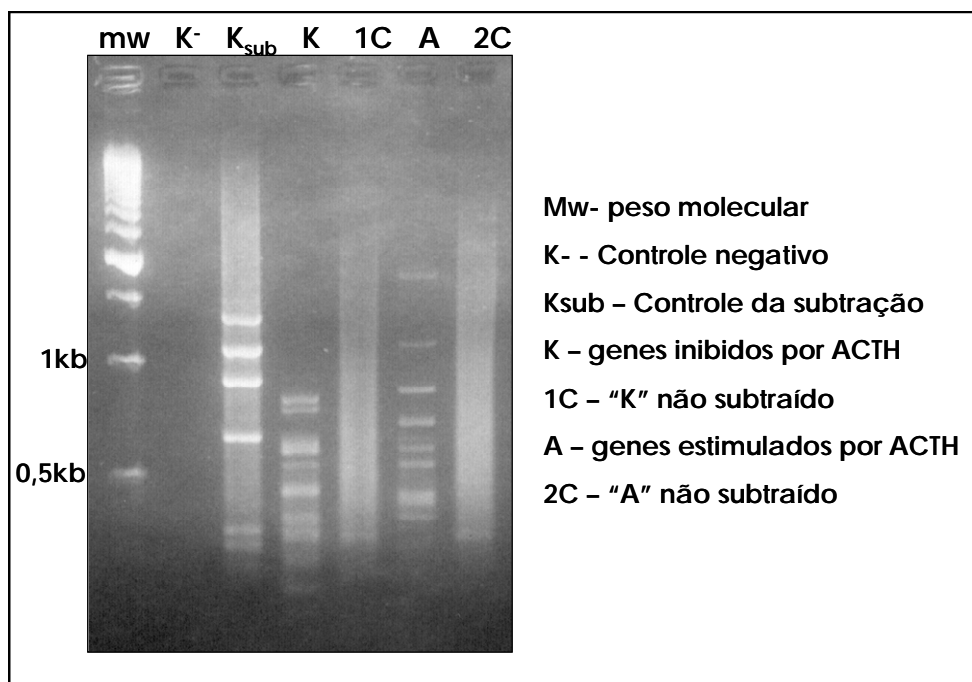


Figura 23: Padrão observado em gel de agarose 2% após o PCR secundário.

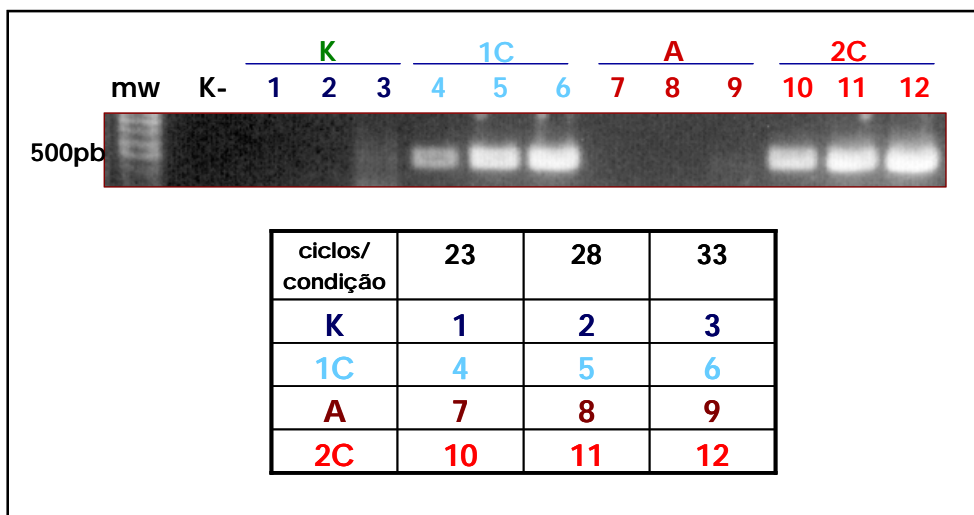


Figura 24: Gel de agarose 0.8%. Teste de eficiência do método. PCR de amplificação para o gene gapdh. Cada condição teve amostras verificadas em 23, 28 e 33 ciclos. Mw: marcador de peso molecular; K- : controle negativo; K : genes inibidos; 1C: controle de "K"; A: genes estimulados por ACTH; 2C: controle de "A".

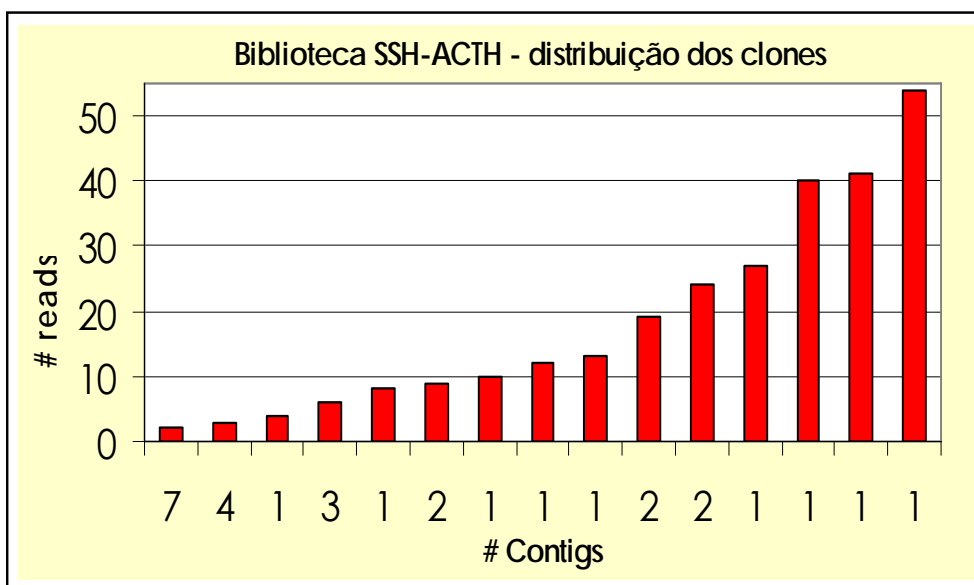


Figura 25: Gráfico mostrando o padrão de distribuição de fragmentos entre os contigs gerados.

As seqüências agrupadas em contigs estão apresentadas na **tabela 5** abaixo, enquanto as seqüências que permaneceram isoladas são apresentadas na **tabela 6**, contendo os singlets.

Os contigs são apresentados de forma ordenada, porém não contínua. Alguns contigs, durante a confirmação manual, foram realocados em contigs já existentes ou mesmo singlets. Para não gerar problemas com o novo arranjo, as denominações foram

mantidas. Desta forma, os contigs 18, 20, 22, 23, 29, 30, 31, 33 e 34 não existem. Na tabela abaixo são mostrados os singlets que encontraram similaridade com alguma seqüência após o Blast.

Tabela 5: Anotação dos contigs gerados na biblioteca SSH-ACTH

| Contig | Anotação | # Clones |
|--------|--|----------|
| 1 | Indeterminado | 2 |
| 2 | <i>Mus musculus</i> , proteína conservada indeterminada, 1110007A06Rik | 2 |
| 3 | <i>Mus musculus</i> , guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating (GNAS) | 2 |
| 4 | Indeterminado | 2 |
| 5 | Indeterminado | 2 |
| 6 | <i>Mus musculus</i> , cytochrome b (cytb) | 2 |
| 7 | <i>Mus musculus</i> , member RAS oncogene family (RAN) | 3 |
| 8 | <i>Mus musculus</i> , H2A histone family member Z (H2afz) | 2 |
| 9 | <i>Mus musculus</i> , GA repeat binding protein, beta 1 (Gabpb1) | 3 |
| 10 | <i>Mus musculus</i> , T-box 3 (Tbx3) | 3 |
| 11 | <i>Mus musculus</i> , xeroderma pigmentosum, complementation group C (Xpc) | 3 |
| 12 | <i>Mus musculus</i> , ribosomal protein L4, (Rpl4) | 4 |
| 13 | <i>Mus musculus</i> , caveolin caveolae protein 1 (Cav1) | 6 |
| 14 | <i>Mus musculus</i> , REST corepressor 1 (Rcor1) | 6 |
| 15 | <i>Mus musculus</i> , THAP domain containing 7 (Thap7) | 9 |
| 16 | <i>Mus musculus</i> , DNA segment Chr 8 ERATO Doi 233, expressed (D8ErtD233e) | 9 |
| 17 | <i>Mus musculus</i> , transmembrane protein 4 (Tmem4) | 10 |
| 19 | <i>Mus musculus</i> , NADH dehydrogenase 3 (Nd3) | 12 |
| 21 | <i>Mus musculus</i> , discs, large homolog 5 (Dlg5) | 13 |
| 24 | <i>Mus musculus</i> , rab7 member RAS oncogene family (RAB7) | 19 |
| 25 | <i>Mus musculus</i> , phosphatidylethanolamine binding protein- lipid binding activity (Pbp) | 24 |
| 26 | <i>Mus musculus</i> , THAP domain containing 7 (Thap7) | 24 |
| 27 | <i>Mus musculus</i> , X-ray repair complementing defective repair in | 27 |

| | | |
|----|---|----|
| | Chinese hamster cells 5 (Xrcc5) | |
| 28 | <i>Mus musculus</i> , cortactin (Cttn) | 54 |
| 32 | <i>Mus musculus</i> , 28S ribosomal RNA | 42 |
| 35 | <i>Mus musculus</i> , chimerin 2 (Chn2) | 8 |
| 36 | <i>Mus musculus</i> , 28S ribosomal RNA | 6 |
| 37 | Indeterminado, não há seqüência descrita | 39 |
| 38 | <i>Mus musculus</i> , eukaryotic translation elongation factor 2 (Eef2) | 17 |

Tabela 6: Anotação dos singlets da Biblioteca de genes estimulados por ACTH.

| Anotação dos singlets | Clone |
|---|--------------------------------|
| <i>Mus musculus</i> , Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha (Arhgdia) | ACTH17-18-B12 |
| <i>Mus musculus</i> , sphingomyelin phosphodiesterase 1 (smpd1) | ACTH17-18-E06 |
| <i>Mus musculus</i> , DNA segment Chr 11 ERATO Doi 333, expressed (D11Ert333e) | ACTH17-18-F11 |
| Seqüência conservada indeterminada, GenelD: 440989 | ACTH17-18-H05 |
| <i>Mus musculus</i> , malic enzyme, supernatant (mod1) | ACTH17-18-H07 |
| <i>Mus musculus</i> , swap complex protein (swap70) | ACTH19-21-A06 |
| <i>Mus musculus</i> , proteasome 26s subunit non-atpase,2 (psmd2) | ACTH19-21-G11 |
| <i>Mus musculus</i> , BTB (POZ) domain containing 3 (Btbd3) | ACTH 1_ -B07 |
| <i>Mus musculus</i> , heat shock protein, 74 kda, a (hspa9a) | ACTH 1_ -D11 |
| <i>Mus musculus</i> , amyloid beta (a4) precursor protein-binding, family b, member 2 (APBB2) | ACTH 1_ -E01 |
| <i>Mus musculus</i> , adenosine deaminas(adar) | MIX1-B10 |
| <i>Mus musculus</i> , genetic suppressor element 1 (Gse1) | Contig 30 singlet(19/21)C03 |
| <i>Mus musculus</i> , nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1(Nr4a1) | Contig 33 Singlet(17-18)E07 |
| <i>Mus musculus</i> , lysosomal-associated protein transmembrane 4B (Laptm4b) | Contig 34 singlet(mix1)E08 |

3.1.5. Seleção de clones das bibliotecas SSH-FGF2 e SSH-ACTH por ensaios de Dot Blot e Reverse Northern Blot

Para que os genes encontrados fossem confirmados como regulados pelo tratamento de interesse era necessário fazer uma seleção prévia para discernir entre os falso-positivos e os de real valor. Inicialmente foram feitos ensaios de dot blot, o que consiste em gerar duas membranas iguais nas quais são aplicadas frações das reações de PCR de colônia dos clones, diluídas em solução desnaturante. Cada uma destas membranas é então hibridizada com uma sonda marcada radioativamente. Em uma das membranas é usada como sonda a biblioteca dos genes inibidos, na outra, a biblioteca dos genes estimulados. Da mesma forma é possível fazer reverse northern blot, no qual o par de membranas é hibridizado com o cDNA marcado radioativamente, proveniente do RNA das células de interesse, seja o tratamento controle ou estimuladas com FGF2 (**figura 26**). Foram feitos diversos ensaios com esta metodologia, no entanto os resultados não foram animadores, e diversos genes apontados nestes ensaios não foram confirmados por northern blot convencional.

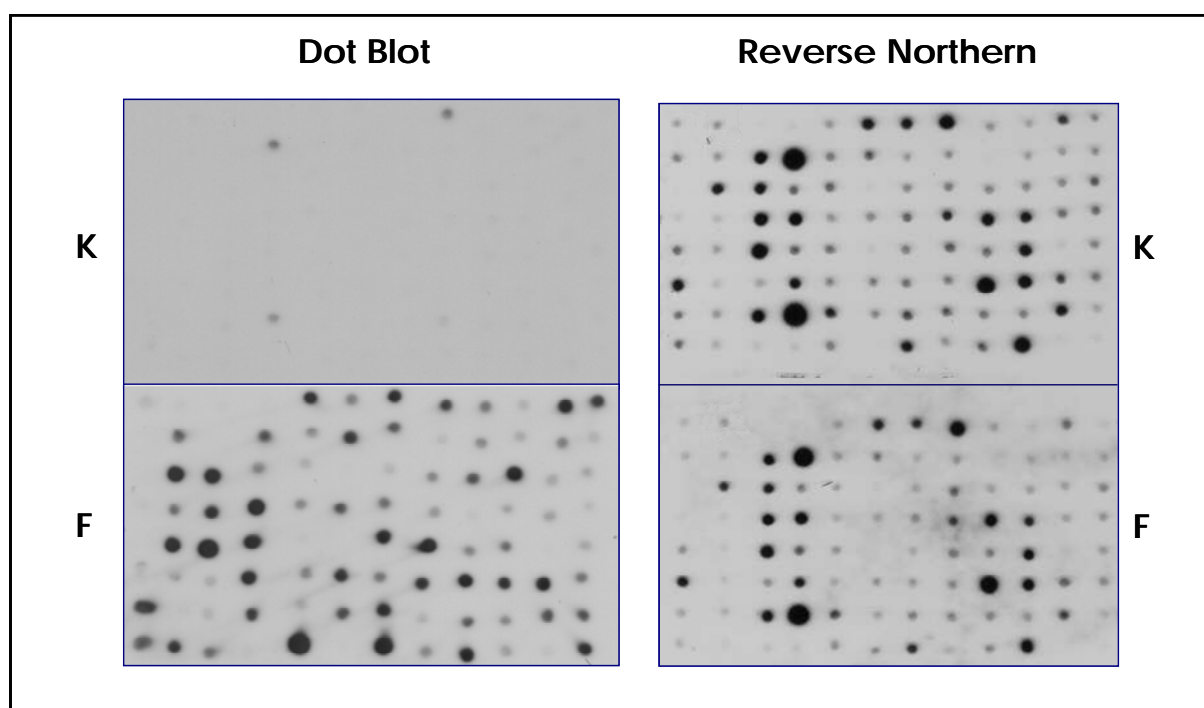


Figura 26: Ensaio de Dot Blot e Reverse Northern Blot para a placa D da biblioteca SSH-FGF2.

3.2. Microarrays

3.2.1. Tratamentos de FGF2

A primeira condição testada foi “genes estimulados em tratamentos de FGF2 de trinta minutos a duas horas”, resultando nos sessenta e cinco genes descritos na **tabela 7**. O nome do gene, sua função e processo celular no qual está envolvido foram determinados a partir de buscas manuais no “Entrez Gene”.

Tabela 7: Genes estimulados por FGF2.

| id | Nome | Função | Processo |
|--------------|--|---|--|
| 14-3-3_eta | tyrosine 3-monoO/tryptophan 5-monoO activ. Eta | ligante de actina/inibidor de PKC | transdução de sinal/anti apoptose/citoesqueleto |
| 14-3-3_gamma | tyrosine 3-monoO/tryptophan 5-monoO activ.gamma | ligante de proteínas | transdução de sinal/ ciclo celular/anti apoptose |
| aaa11d | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| aaa2d | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| aaa9d | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| ac097713.3 | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| arf4 | ADP-ribosylation factor 4 | ligante de GTP | transdução sinal via GTP/transporte intracelular proteínas |
| arf6 | ADP-ribosylation factor 6 | ligante de GTP | transdução sinal via GTP/transporte intracelular proteínas |
| bag3 | BCL2-associated athanogene 3 | ligante de proteínas desnaturadas | regulação de apoptose |
| c-jun | Jun | fator de transcrição | diferenciação/progressão no ciclo celular |
| calm2 | calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta) | ligante de cálcio | ciclo celular/sinalização via receptor acoplado a protG |
| cappa1 | capping protein (actin filament) muscle Z-line 1 | ligante de actina | motilidade celular |
| catnb | catenin (cadherin associated protein), beta 1 | fator de transcrição | sinalização por wnt/transcrição |
| caveolin | caveolin 1 | atividade estrutural/ligação de proteínas | endocitose/transdução de sinal/proliferação |
| cct3 | chaperonin containing TCP1, subunit 3 | ligante de nucleotídeo | estrutura terciária de proteínas |
| cdc20 | CDC20 cell division cycle 20 homolog | ligante de proteína | controle de ciclo celular |
| cdkn2d_-_p19 | cyclin-dependent kinase | inibidor de CDK | controle de ciclo celular |

| | | | |
|------------------|--|---|--|
| | inhibitor 2D | | |
| chaf1b | chromatin assembly factor 1, subunit B | transdução de sinal | reparo de DNA/ ciclo celular/ |
| col11a1 | procollagen, type XI, alpha 1 | constituente de ECM | adesão celular/metabolismo de proteoglicanos |
| col3a1 | collagen, type III, alpha 1 | constituente de ECM | transporte de fosfato |
| cox6c | cytochrome c oxidase, subunit VIc | atividade de oxidoreductase | transporte de elétrons |
| cullin-3 | cullin 3 | Desconhecido | ciclo celular |
| cyr61 | cysteine-rich, angiogenic inducer 61 | ligante de heparina | adesão/proliferação/crescimento celular |
| desmin | desmin | proteína estrutural | Citoesqueleto |
| dnatpoa2 | topoisomerase (DNA) II alpha | ligante de nucleotídeo | reparo de DNA/ replicação |
| dupp6 | dual specificity phosphatase 6 | MAPK fosfatase | Inativação de MAPK/controle de ciclo celular |
| egr-1 | early growth response 1 | Atividade de fator de transcrição | Transcrição |
| eif4a1 | eukaryotic translation initiation factor 4A1 | ligante de ácido nucléico | biossíntese de proteínas |
| filamin_a | filamin A, alpha (actin binding protein 280) | transdução de sinal/ligante de actina | organização de citoesqueleto |
| h2afz | H2A histone family, member Z | ligante de DNA | formação de nucleossomo |
| h3f3b | H3 histone, family 3B | ligante de DNA | formação de nucleossomo |
| hnrpd | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D | ligação a ácidos nucléicos | transcrição/manutenção do telômero |
| hspa5 | heat shock 70kD protein 5 | ligante nucleotídeo, proteína e ribossomo | estrutura terciária de proteínas |
| ifrd1 | interferon-related developmental regulator 1 | ligação | diferenciação e desenvolvimento |
| itga6 | integrin alpha 6 | atividade de receptor | adesão/sinalização mediada por integrina |
| jun-b | Jun-B oncogene | Atividade de fator de transcrição | transcrição/progressão no ciclo celular |
| man2b1 | mannosidase, alpha, class 2B, member 1 | hidrolase | metabolismo de carboidratos/modificação de proteínas |
| mcl1 | myeloid cell leukemia sequence 1 | ligante de proteínas | apoptose/ diferenciação |
| mek3 | mitogen activated protein kinase kinase 3 | atividade de MAPK | transdução de sinal |
| mor2 | malate dehydrogenase 1 | malato desidrogenase | ciclo de Krebs |
| mrg15 | mortality factor 4 like 1 | ligante de cromatina | proliferação e controle de ciclo celular |
| mrpl3 | mitochondrial ribosomal protein L3 | estrutura de ribossomo | biossíntese de proteínas |
| mtvr2 | Mouse Mammary Tumor Virus Receptor homolog 2 | receptor | Desconhecido |
| nedd8 | neural precursor developmentally down- | ligante de proteína | proteólise/ciclo de ubiquitina |

| | | | |
|----------------------|---|--|---|
| | regulated 8 | | |
| oazi | antizyme inhibitor 1 | metabolismo | biossíntese de poliamina |
| pcna | proliferating cell nuclear antigen | fator de processividade da DNA pol | reparo de DNA/ replicação |
| pdgfa | platelet derived growth factor, alpha | fator de crescimento | proliferação e controle de ciclo celular |
| psmd1 | proteasome 26S subunit, non-ATPase 1 | ligante | regulação de ciclo celular |
| rac1 | ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 | ligante de GTP | sinalização por smal GTPase |
| rap2b | RAP2B, member of RAS oncogene family | ligante de GTP | sinalização por smal GTPase |
| rasgrp2 | RAS, guanyl releasing protein 2 | ligante de Calcio/ quinase | sinalização por smal GTPase |
| rnp1 | RNA binding protein S1, serine-rich domain | ligante de RNA | splicing de RNA |
| rpd3 | histone deacetylase 2 | desacetilase de histona | modificação de cromatina |
| rps6ka1 | ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1 | ligante de ATP/proteína kinase | transdução de sinal |
| rrm1 | ribonucleotide reductase M1 polypeptide | ligante de nucleotídeo | replicação de DNA |
| sdc2 | syndecan 2 | heparan sulfato proteoglicana | sinalização, proliferação, migração celular |
| sdcbp | syndecan binding protein (syntenin) | ligante de proteínas, de syndecan | metabolismo/transdução de sinal via Rās |
| tc10 | ras homolog gene family, member Q | atividade GTPase | sinalização via Small-GTP |
| tfe3 | transcription factor binding to IGHM enhancer 3 | fator de transcrição | Transcrição |
| thioredoxin_1 | thioredoxin 1 | atividade de transporte de elétrons | transporte de elétrons |
| tim23 | translocase inner mitoc. membr23 homolog | translocase | endereçamento de proteínas |
| uba52 | ubiquitin A-52 | estrutura de ribossomo | síntese e modificação de proteínas |
| ube2b | ubiquitin-conjugating enzyme E2B | Ligase de ubiquitina | ciclo de ubiquitina/ modificação de proteínas |
| ube2l3 | ubiquitin-conjugating enzyme E2L3 | Ligase de ubiquitina | catabolismo de proteínas dependente de ubiquitina |
| vimentin | Vimentin | ligante protéico/ constituinte citoesqueleto | Desconhecido |

Os genes descritos na tabela acima foram submetidos, de acordo com sua identificação numérica (gene ID) ao KEGG (http://www.kegg.com/kegg/tool/color_pathway.html) para que fossem elucidadas as vias que estão sendo alteradas em estímulo de FGF2, sendo possível a cada gene estar envolvido em mais de uma via. Nem todos os genes foram classificados, uma vez que alguns não estão catalogados no KEGG,

no entanto quatro vias chamam a atenção por abrangerem um número mínimo de quatro genes: via de MAPK; ciclo celular, interação entre matriz extracelular (ECM)-receptores e via de adesão focal.

Na via de MAPK estão agrupados oito genes: *hspa5; jun; pdgfa; flna; rac1; rasgrp2; map2k3 e dusp6*. Na grupo "ciclo celular" estão contidos cinco genes: *cdc20; cdkn2d; pcna; ywhag e loc433759*. Dentro do grupo "via de interação ECM-receptores" estão os genes *coll11a1; col3a1, sdc2 e itga6*. Contidos em "adesão focal" está o maior número de genes relacionados, nove, os genes *catnb; cav1; col11a1; col3a1; itga6; jun; pdgfa; flna e rac1*.

Da mesma forma como foi feita a busca por genes estimulados, foi feita a busca por genes inibidos por tratamentos de trinta minutos a duas horas na presença de FGF2. O resultado desta pesquisa está apresentada na **tabela 8**, contendo quarenta e um genes.

Tabela 8: Genes inibidos por FGF2

| id | Nome | Função | Processo |
|---------------|--|--|-----------------------------------|
| 28s_ribosomal | ribosomal protein S28 | estrutural, constituinte de ribossomo | biossíntese de proteínas |
| 3010027g13rik | desconhecido | desconhecido | Transporte |
| 9030221m09rik | phosphatidylserine decarboxylase | atividade caboxi-liase | metabolismo de fosfolipídios |
| aaa10g | desconhecido | desconhecido | Desconhecido |
| aaa3g | desconhecido | desconhecido | Desconhecido |
| adcy6 | adenylate cyclase 6 | atividade de adenilato ciclase | casca de sinalização intracelular |
| adh5 | alcohol dehydrogenase 5 | atividade de álcool desidrogenase | metabolismo |
| adprt1 | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1 | ligante de DNA e proteínas | reparo e metabolismo de DNA |
| alas1 | aminolevulinic acid synthase 1 | transaminase | biossíntese de heme |
| archvillin | supervillin | ligação em filamentos de actina | ancoramento de citoesqueleto |
| arhgef3 | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 | regulador de atividade de small-GTPase | transdução de sinal |
| atf4 | activating transcription factor 4 | atividade de ativador de transcrição | gliconeogênese/ transcrição |
| caldesmon_1 | caldesmon 1 | ligante de calmodulina e de actina | Citoesqueleto |
| caspase6 | caspase 6, apoptosis-related | caspase | indução de apoptose, via de |

| | | | |
|----------------------------|--|---|---|
| | cysteine protease | | MAPK |
| cct6a | chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1) | ligante de ATP | definição de estrutura terciária de proteínas |
| cdh11 | cadherin 11 | ligante de cálcio/ligante de proteína | adesão celular |
| cyclin_d3 | cyclin D3 | regulador de CDK | divisão celular |
| dcmp_deaminase | dCMP_deaminase | desaminase | biossíntese de nucleotídeo |
| ddx32helicase | DEAH box polypeptide 32 | ligante de ATP e de cálcio | Helicase |
| dusp12 | dual specificity phosphatase 12 | fosfatase | desfosforilação de proteínas |
| dusp7 | dual specificity phosphatase 7 | fosfatase | desfosforilação de proteínas |
| dusp8 | dual specificity phosphatase 8 | fosfatase | desfosforilação de proteínas |
| gpi1 | glucose phosphate isomerase 1 | isomerase | glicólise /gliconeogênese |
| greb | similar to ribosomal protein L21 | desconhecido | Desconhecido |
| h-ras | Harvey rat sarcoma virus oncogene 1 | ligante GTP/atividade GTPásica | transdução de sinal/endocitose/ciclo celular |
| hig1 | likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1 | desconhecido | Desconhecido |
| hist1h2bc | histone 1, H2bc | ligante de DNA | formação de nucleossomo |
| hsp60 | heat shock 60kDa protein 1 | ligante de proteínas desnaturadas | definição de estrutura terciária de proteínas |
| itgae | integrin, alpha E, epithelial-associated | ligante de cálcio e Magnésio | adesão em matriz extra celular/sinalização |
| mod1 | malic enzyme | atividade de oxidoreductase | metabolismo de malato |
| nme2 | expressed in non-metastatic cells 2 | ligante de nucleotídeo | metabolismo de nucleotídeos/ciclo celular |
| pfkl | phosphofructokinase, liver | kinase/ligante atp | Glicólise |
| pfkp | phosphofructokinase, platelet | kinase/ligante atp | Glicólise |
| pgam1 | phosphoglycerate mutase 1 | isomerase | Glicólise |
| pgm1 | phosphoglucomutase 1 | atividade de fosfoglicomutase | Glicólise |
| pkm2 | pyruvate kinase, muscle | kinase | Glicólise |
| polr2e | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E | ligante de DNA | Transcrição |
| rab5exchange_factor | RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1 | ligante de DNA | endocitose/transporte protéico |
| syk | spleen tyrosine kinase | ligante de ATP | ativação de MAPK |
| taf1b | Tbp-associated factor, RNA polymerase I B | regulador de transcrição/ligante de proteínas | Transcrição |
| tnr | tenascin R | constituente de ECM | adesão celular |

Ao analisar as vias a que pertencem os genes inibidos por FGF2 é evidente o grande número de vias relacionadas a metabolismo. Dentro da via de glicólise/gliconeogênese estão seis genes: *adh5*; *gpi1*; *pfk1*; *pgam1*, *pkm2* e *pfkp*. Há também redução nos níveis

de expressão de genes relacionados com metabolismo de purina e pirimidina: *adcy6*; *nme2*; *pkm2*; *polr2e*. Mais uma vez a via de MAPK é ressaltada, no entanto são genes diferentes dos descritos anteriormente: *atf4*; *casp6*; *hras1*; *dusp8* e *dusp7*.

3.2.2. Tratamentos de ACTH

A próxima pergunta feita dentro da base de dados de microarray foi a respeito dos genes estimulados por ACTH em tratamentos de 30 minutos até 2 horas. O resultado pode ser visto na **tabela 9**, constituída por cinquenta e cinco genes.

Tabela 9: Genes estimulados por ACTH

| id | Nome | Função | Processo |
|---------------|---|--|--|
| 14-3-3_eta | tyrosine 3-monoO/tryptophan 5-monoO Eta | ligante de actina/inibidor de PKC | Transdução de sinal/apoptose/citoesqueleto |
| 1500031j01rik | FGFR1 oncogene partner 2 | Desconhecido | Desconhecido |
| ac097713.3 | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| acaa1 | acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1 | acyltransferase | metabolismo de ácidos graxos |
| adprt1 | poly (ADP-ribose) polymerase family, 1 | ligante de DNA e proteínas | reparo de DNA |
| adprt2 | poly (ADP-ribose) polymerase family, 2 | ligante de DNA e proteínas | reparo de DNA/ proteólise |
| ahcy | S-adenosylhomocysteine hydrolase | atividade de hidrolase | metabolismo de compostos de 1C |
| arhgdia | Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha | ativador de GTPase | transdução de sinal mediado por Rho |
| bad | BCL2-antagonist of cell death | ligante de proteína | Apoptose |
| bag3 | BCL2-associated athanogene 3 | ligante de proteínas desnaturadas | Apoptose |
| bclw | Bcl2-like 2 | ligante de proteína | Apoptose |
| camk1 | calcium/calmodulin-dependent protein kinase I | ligante de calmodulina | diferenciação/transdução de sinal |
| camk2g | calcium/calmodulin-dependent protein kinase | ligante de calmodulina | transição G1/S- transporte de cálcio |
| cct4 | chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta) | ligante de ATP e de proteínas desnaturadas | ciclo celular/estrutura terciária de proteínas |
| cdc25a | cell division cycle 25A | atividade de Y fosfatase | mitose/ regulação de CDK |
| cdk9 | cyclin-dependent kinase 9 | ligante de proteína | ciclo celular |
| cox8a | cytochrome c oxidase | atividade de oxidoreductase | transporte de elétrons |
| dnatopoa2 | topoisomerase (DNA) II alpha | ligante de nucleotídeo | reparo de DNA/ replicação |

| | | | |
|---------------------|--|--|--|
| elk1 | ELK1, member of ETS oncogene family | fator de transcrição | regulação de transcrição |
| epac2 | Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4 | ligante de proteína | transdução de sinal por proteína G |
| fgfr2 | fibroblast growth factor receptor 2 | receptor/ligante de heparina | transdução de sinal |
| fra2 | FOS-like antigen 2 | Atividade de fator de transcrição | regulação de transcrição e morte celular |
| gtpbp2 | GTP binding protein 2 | ligante de GTP | transdução de sinal |
| h3f3b | H3 histone, family 3B | ligante de DNA | formação de nucleossomo |
| hnrdp | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D | ligação a ácidos nucléicos | processamento de RNA |
| hsp40b9 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9 | chaperonina | estrutura terciária de proteínas |
| k-ras | v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene | ligante GTP/atividade GTPásica | transdução de sinal/ciclo celular |
| mad2 | mitotic arrest deficient-like | desconhecido | ciclo celular |
| man2b1 | mannosidase, alpha, class 2B, member 1 | hidrolase | Metabolismo de carboidrato/modificação de proteína |
| mapk9_(sapk) | mitogen-activated protein kinase 9 | Atividade de MAPK, JUNK | cascata de JUNK/ resposta a estresse |
| mek3 | mitogen activated protein kinase kinase 3 | atividade de MAPK | cascata de MAPK |
| mek4 | mitogen activated protein kinase kinase 4 | serina/treonina kinase | transdução de sinal |
| mekk3 | mitogen activated protein kinase kinase kinase 3 | transdutor de sinal | cascata de MAPK |
| mycbp | c-myc binding protein | coativador de transcrição | Transcrição |
| myosin_va | myosin VA -heavy polypeptide 12, myosin | ligante de calmodulina | organização de citoesqueleto |
| oazi | antizyme inhibitor 1 | metabolismo | biosíntese de poliamina |
| pax8 | paired box gene 8 | fator de transcrição | Transcrição |
| pdgfrb | platelet-derived growth factor receptor, beta | receptor | transdução de sinal |
| phka1 | phosphoglycerate mutase 1 | isomerase | Glicólise |
| pink1 | PTEN induced putative kinase 1 | ligante nucleotídeo/ proteína ST quinase | cascata de proteína quinase |
| polr2k | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K | polimerase | Transcrição |
| ppat | phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase | amidotransferase | Metabolismo |
| prkaca(pka) | protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha | proteína quinase | transdução de sinal |
| rab4a | RAB4A, member RAS oncogene family | atividade de GTPase | transdução de sinal/transporte protéico |
| rab6ip1 | Rab6 interacting protein 1 | ligante de proteína | Desconhecido |
| rad26l | RAD26L hypothetical protein | helicase | Desconhecido |

| | | | |
|----------------------|--|-------------------------------|--------------------------------------|
| ribosomal_13 | ribosomal protein L13 | constituente de ribossomo | biossíntese de proteínas |
| rpd3 | histone deacetylase 2 | desacetilase de histona | modificação de cromatina/transcrição |
| snrpb | small nuclear ribonucleoprotein polypep.B and B1 | ligante de RNA | processamento de RNA |
| stat3b | signal transducer and activator of transcription 3 | ligante de DNA e de proteínas | transdução de sinal |
| tgfb2 | transforming growth factor, beta 2 | fator de crescimento | ciclo celular/ crescimento |
| thioredoxin_1 | thioredoxin 1 | transportador de elétrons | transporte de elétrons |
| tim13a | translocase of inner mitochondrial membrane 13a | transportador de proteínas | transporte de proteínas |
| ugdh | UDP-glucose dehydrogenase | atividade de oxidoreductase | biossíntese de glicosaminoglicanas |
| umps | uridine monophosphate synthetase | atividade catalítica | metabolismo de nucleosídeos |

Dentre as vias destacadas no KEGG para os genes estimulados por ACTH, a via de MAPK é a que contém maior número de componentes. Esta abrange onze genes: *elk1*; *fgfr2*; *kras*; *pdgfrb*; *prkaca*; *tgfb2*; *mek3*; *mek4*; *mekk3*; *mapk9* e *epac2*, enquanto a via de sinalização por cálcio ressalta apenas quatro representantes: *camk2g*; *cdc25a*; *pdgfrb*; *prkaca*. São citados os grupos de ciclo celular com os genes *cdc25a* (*cdk9*); *cdc25c*; *tgfb2*, *Loc433759*(*rpd3*) e *mad2l1* (*mad2*) e de adesão focal, representada por cinco genes, alguns dos quais estão também presentes na via de MAPK: *bad*; *elk1*; *kras*; *pdgfrb* e *mapk9*.

Um gene que não aparece na tabela de estimulados por ACTH é o gene *nr4a1*, um receptor nuclear caracterizado pelo KEGG como pertencente à via de MAPK. Este gene está presente na biblioteca SSH-ACTH e é representado na lâmina por dois clones diferentes. Como os clones receberam o mesmo nome é possível perceber claramente que um dos clones apresenta sinal de indução mais forte que o outro, de forma a espalhar os pontos. Por este motivo o gene não está na tabela, porém, ensaios específicos de northern blot (**figura 31**) e PCR em tempo real confirmam sua indução.

A análise dos genes inibidos por tratamentos de ACTH de 30 minutos até duas horas é apresentada na **tabela 10**, composta por cinquenta e um genes.

Tabela 10: Genes inibidos por ACTH

| id | Nome | Função | Processo |
|---------------|---|-----------------------------------|---|
| 14-3-3_theta | Y 3-monoO/tryptophan 5-monoO activ.Theta | inibidor de PKC | transdução de sinal/ciclo celular |
| 2210021a15rik | mediator of RNA pol II transcription8-med8 | atividade de receptor | Transcrição |
| 2310075c12rik | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| aaa10f | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| aaa12d | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| aaa4b | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| aaa8c | Desconhecido | Desconhecido | Desconhecido |
| arhgap7 | deleted in liver cancer 1 | ativador de Rho GTPase | transdução de sinal |
| avpr1a | arginine vasopressin receptor 1A | receptor de vasopressina | transdução de sinal/ ativador de PLC |
| baf60 | Smarcd1-SWI/SNFrelated matrix associated | coativador de transcrição | modificação de cromatina |
| bax | BCL2-associated X protein | ligante de proteínas | apoptose/ciclo celular |
| car2 | carbonic anhydrase 2 | inibidor de PKC | metabolismo de compostos de 1C |
| caspase12 | caspase12 | atividade de peptidase | Apoptose |
| cdh11 | cadherin 11 | ligante de cálcio e de proteínas | adesão celular |
| cdk5 | cyclin-dependent kinase 5 | proteína quinase | ciclo celular |
| cdk8 | cyclin-dependent kinase 8 | proteína quinase | ciclo celular |
| col3a1 | collagen, type III, alpha 1 | constituente de ECM | transporte de fosfato |
| copa | coatomer protein complex alpha | proteína de transporte | transporte intracelular de proteínas |
| cox4 | cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1 | atividade oxidoreductase | transporte de elétrons |
| eef1g | eukaryotic translation elongation factor 1G | fator de tradução | biossíntese de proteínas |
| EIF3S2 | eukaryotic translation initiation factor 3, s 2 | fator de início de tradução | biosíntese de proteínas |
| ephrin_a1 | ephrin-A1 | ligante de receptor de efrina | ativação de MAPK |
| hadha | hydroxyacyl-Co A dehydrogenase alpha | atividade oxidoreductase | metabolismo de lipídeos |
| hadhb | hydroxyacyl-Co A dehydrogenase beta | atividade transferase | metabolismo de lipídeos |
| hist1h2bc | histone 1, H2bc | ligante de DNA | formação de nucleosomo |
| hsp27 | heat shock 27kDa protein 1 | ligante de proteína | definição de estrutura terciária de proteínas |
| hsp60 | heat shock 60kDa protein 1 | ligante de proteínas desnaturadas | definição de estrutura terciária de proteínas |
| lama5 | laminin, alpha 5 | constituente de ECM | adesão celular |
| map3k10 | mitogen-activated protein k k 10 | ligante de ATP/ quinase | transdução de sinal/ indução de apoptose |
| mek2 | mitogen-activated protein | proteína ST quinase/ Y quinase | casca de proteína quinase |

| | | | |
|-------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| | kinase kinase 2 | | |
| mpi | mannose phosphate isomerase | isomerase | metabolismo de carboidrato |
| mybbp1a | MYB binding protein (P160) 1a | ligante de proteínas | regulação negativa de transcrição |
| pck2 | phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 | carboxilase | Gliconeogênese |
| peroxiredoxin_3 | peroxiredoxin 3 | atividade de oxidoreductase | Antioxidante |
| pgm3 | phosphoglucomutase 3 | isomerase | metabolismo de carboidrato |
| pi3k_cd | phosphatidylinositol 3-kinase catalytic delta | quinase | transdução de sinal |
| polr2i | pol (RNA) II (DNA directed) polypeptide I | polimerase | Transcrição |
| rabac1 | Rab acceptor 1 | ligante de proteína | transporte mediado por vesículas |
| rac1 | ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 | ligante de GTP | sinalização por smal GTPase |
| rp23-173h17 | similar to Shb-like adapter protein | Desconhecido | Desconhecido |
| ryr3 | ryanodine receptor 3 | receptor/ligante de cálcio | transporte de cálcio |
| sap18 | Sin3-associated polypeptide 18 | Desconhecido | Transcrição |
| seladin1 | 24-dehydrocholesterol reductase | oxidoreductase/MAPK fosfatase | biosíntese de colesterol/inativação de MAPK |
| smoc1 | SPARC related modular calcium binding 1 | ligante de cálcio | Desconhecido |
| stat2 | signal transducer activator of transcription 2 | ligante de cálcio/ transdutor sinal | cascata jak-stat |
| superoxide_dismutase_1 | superoxide dismutase 1 | atividade oxidoreductase/ligante ion | metabolismo de superóxido |
| tebp-pending_(p23) | prostaglandin E synthase 3 | telomerase | manutenção dos telômeros |
| tiaf1 | TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1 | ligante de proteína | Apoptose |
| tmem4 | transmembrane protein 4 | Desconhecido | Desconhecido |
| unc13h3 | unc-13 homolog C | ligante de DAG | excitose/cascata de sinalização |
| wtap | Wilms tumor 1 associated protein | Desconhecido | Desconhecido |

Os genes inibidos por ACTH mostram representantes na via de MAPK (*rac1; mek2; map3k10 e hspb*) e na via de adesão focal (*col3a1; lama5; pik3cd e rac1*). Os demais genes descritos pelo KEGG não formaram grupos contendo um mínimo de quatro componentes.

3.2.3. Confirmação dos resultados: genes regulados por FGF2

A etapa que se seguiu tinha por objetivo validar os dados gerados por microarray com as técnicas de northern blot e PCR em tempo real.

Os ensaios de northern blot para *egr1* e *egr2* foram feitos na presença ou ausência de cicloheximida (chx). A presença deste antibiótico é justificada por sua participação durante o preparo das bibliotecas de SSH em tratamentos de 2 horas e por garantir uma visão “de acúmulo” do RNA sintetizado pela célula até aquele momento, uma vez que ao impedir ação da peptidil transferase, chx inibe não apenas a síntese de proteínas, mas também a degradação do mRNA sintetizado. Desta forma, mRNA de expressão muito baixa ou que tenham pico de expressão anterior ao momento da lise celular são preservados. Como pode ser visto nas (figuras 27 e 28), referentes ao northern blot para *egr1* e *egr2*, em duas horas o sinal quando visível, já está muito fraco, no entanto é possível notar o sinal acumulado quando é feito o tratamento prévio com chx. De fato, é possível perceber que nos dois casos o pico de expressão ocorre entre trinta minutos e uma hora.

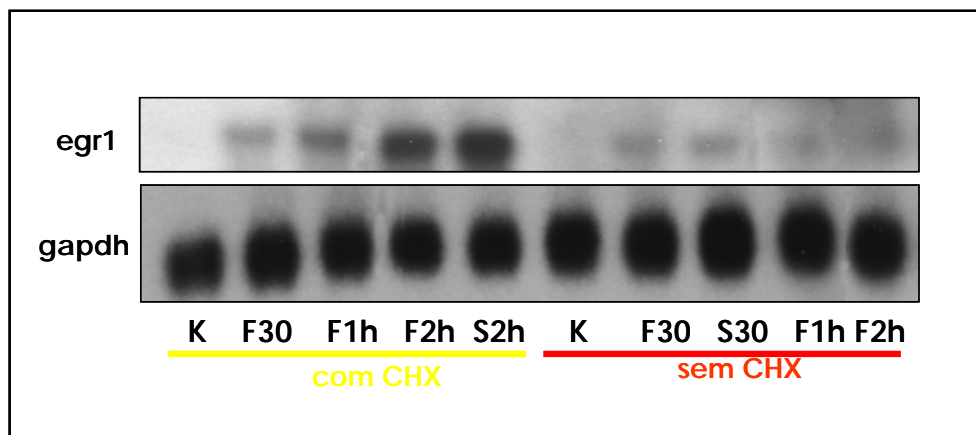


Figura 27: Northern blot para *egr1*. K: controle não tratado; F: FGF2; S: soro; CHX: cicloheximida. 30: 30 minutos; 1h: 1 hora; 2h: 2 horas. Na parte inferior, normalização por *gapdh*.

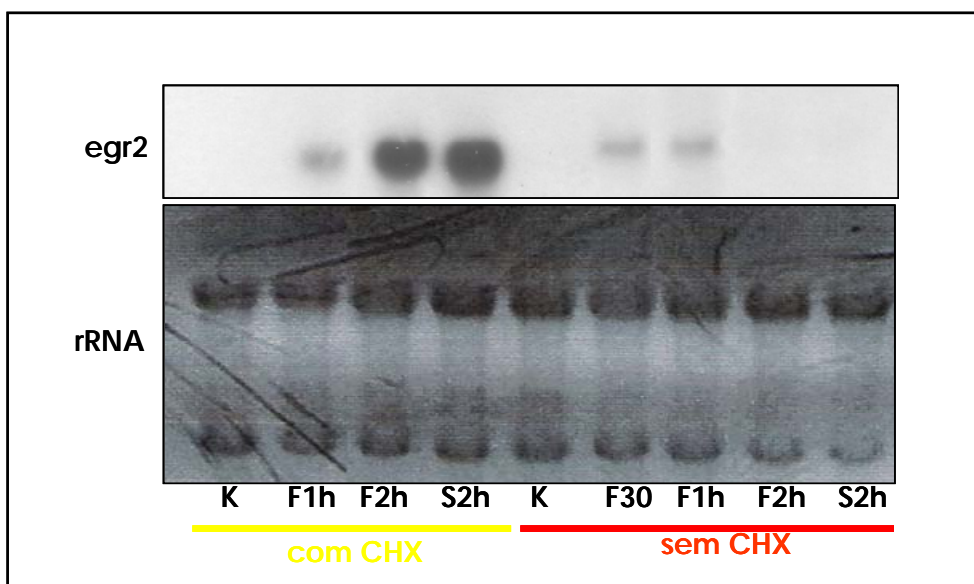


Figura 28: Northern blot para *egr2*. K: controle não tratado; F: FGF2; S- soro; CHX: cicloheximida. 30: 30 minutos; 1h: 1 hora; 2h: 2 horas. Na parte inferior, normalização por rRNA.

Outros genes que tiveram aumento de expressão confirmados por Northern blot foram *dusp6* e *ifrd1*, ambos presentes tanto na biblioteca SSH-FGF2 quanto na lista obtida por microarray. O gene *dusp6* apresenta pico de expressão em duas horas (**figura 29**), com indução bastante intensa. O gene *ifrd1* apresenta indução fraca e pico de expressão em 30 minutos, sendo quase ausente em duas horas (**figura 30**).

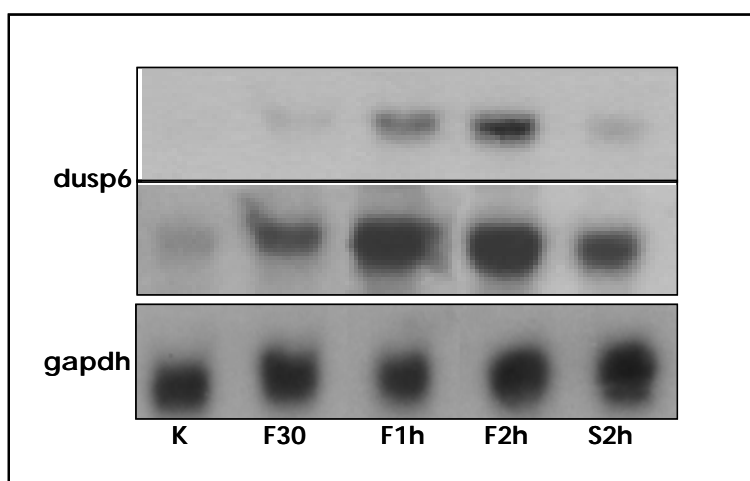


Figura 29: Northern blot para *dusp6*. A figura superior e intermediária são o mesmo experimento em diferentes tempos de exposição. K: controle não tratado; F: FGF2; S: soro. Os números indicam o tempo de tratamento: 30 minutos, 1 hora ou 2 horas. Na parte inferior, normalização por *gapdh*.

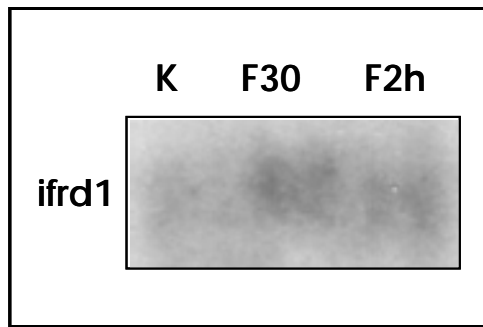


Figura 30: Northern blot para o gene *ifrd1*. K-controle não tratado; F30: tratamento de FGF por 30 minutos; F2h: tratamento de FGF por 2 horas.

Alguns genes foram testados por PCR em tempo real. Abaixo são apresentados os dados para alguns genes pertencentes à lista dos “genes estimulados por FGF2”. A coluna “arrayProb” contém o valor de probabilidade do gene testado ser diferencialmente expresso, podendo variar de zero (inibição) a um (estímulo). A coluna “M médio” indica o M médio, ou seja, a média da razão de expressão entre os dois canais do ensaio de microarray para todos os pontos, em log de base 2. A coluna seguinte, “2^{M médio}” (2 elevado a M médio) indica quantas vezes o gene é mais ou menos expresso em relação ao controle, segundo os ensaios de microarray. Por último, a coluna qPCR indica a variação de expressão obtida por PCR semi-quantitativo ou em tempo real. Dois dos genes testados por northern blot, *egr1* e *dusp6*, foram mais uma vez testados por PCR em tempo real. Estão destacados em azul os resultados que, mesmo em intensidades diferentes são concordantes, em amarelo estão aqueles cujos resultados discordam entre as duas técnicas.

| <i>caveolin</i> | arrayProb | M médio | 2 ^{M médio} | qPCR |
|-----------------|-----------|---------|----------------------|------|
| K | | | | 1 |
| F30 | 1,00 | 0,59 | 1,50 | 1,22 |
| F2h | 1,00 | 1,80 | 3,49 | 2,76 |

| <i>Cyr61</i> | arrayProb | M médio | 2 ^{M médio} | qPCR |
|--------------|-----------|---------|----------------------|-------|
| K | | | | 1 |
| F30 | 1,00 | 7,22 | 149,17 | 33,44 |
| F2h | 0,99 | 2,35 | 5,08 | 3,77 |

| <i>Col3a1</i> | arrayProb | M médio | 2 ^{M médio} | qPCR |
|---------------|-----------|---------|----------------------|------|
| K | | | | 1 |
| F30 | 1,00 | 1,63 | 3,10 | 1,03 |
| F2h | 1,00 | 1,09 | 2,13 | 1,34 |

| <i>dusp6</i> | arrayProb | M médio | 2 ^{M médio} | qPCR |
|--------------|-----------|---------|----------------------|-------|
| K | | | | 1 |
| F30 | 0,99 | 3,00 | 8,00 | 3,22 |
| F2h | 1,00 | 6,44 | 86,99 | 21,33 |

| Egr1 | arrayProb | Mmédio | 2^ Mmd | qPCR |
|------|-----------|--------|--------|-------|
| K | | | | 1 |
| F30 | 1,00 | 7,81 | 223,99 | 78,43 |
| F2h | 1,00 | 6,50 | 90,50 | 32,79 |

| h2afz | arrayProb | Mmédio | 2^ Mmd | qPCR |
|-------|-----------|--------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| F30 | 1,00 | 0,49 | 1,40 | 1,39 |
| F2h | 0,77 | 0,12 | 1,09 | 1,80 |

| man2b1 | arrayProb | Mmédio | 2^ Mmd | qPCR |
|--------|-----------|--------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| F30 | 0,98 | 0,65 | 1,57 | 0,84 |
| F2h | 0,90 | 0,26 | 1,20 | 1,25 |

3.2.4. Confirmação dos resultados: genes regulados por ACTH

Os genes regulados por ACTH quase em sua totalidade apresentam indução ou inibição fraca. Por este motivo a validação destes genes foi bastante trabalhosa. Um dos genes que apresentou um bom resultado foi o receptor nuclear nr4a1. Este gene mostrou-se induzido não apenas por ACTH mas, de forma menos intensa, também por FGF2 também (figura 31).

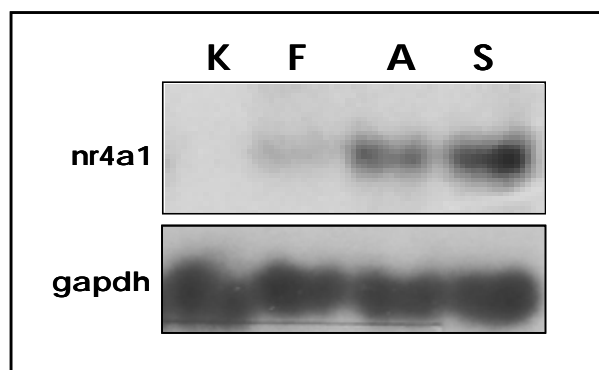


Figura 31: Northern blot para nr4a1. K: controle não tratado; F: FGF2; A-ACTH; S: soro. Todos os tratamentos foram feitos por duas horas. Na parte inferior normalização por gapdh.

Os genes *ahcy*, *cdc25*, *carb2*, *fgfr2*, *kras* *man2b1* e *nr4a1* tiveram seu nível de expressão analisado por PCR semi-quantitativo ou em tempo-real. Abaixo estão tabelas

que incluem o valor de probabilidade de expressão diferencial por microarray (arrayProb); a intensidade da indução por microarray em log2 (Mmédio); o valor de indução por microarray em vezes (2^Mmd) e o valor obtido em PCR de tempo real (qPCR). Estão pintados em azul os resultados que, mesmo em intensidades diferentes são concordantes, em amarelo estão aqueles cujos resultados discordam entre as duas técnicas.

| ahcy | arrayProb | Mmédio2 | 2^ Mmd | qPCR |
|-------------|-----------|---------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| A30 | 1,00 | 2,78 | 6,87 | 1,16 |
| A2h | 0,96 | 1,89 | 3,71 | 1,52 |

| cdc25a | arrayProb | Mmédio2 | 2^ Mmd | qPCR |
|---------------|-----------|---------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| A30 | 1,00 | 0,81 | 1,75 | 1,18 |
| A2h | 0,93 | 0,42 | 1,34 | 1,09 |

| kras | arrayProb | Mmédio2 | 2^ Mmd | qPCR |
|-------------|-----------|---------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| A30 | 1,00 | 0,99 | 1,99 | 1,13 |
| A2h | 0,97 | 1,04 | 2,05 | 1,86 |

| carb2 | arrayProb | Mmédio2 | 2^ Mmd | qPCR |
|--------------|-----------|---------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| A30 | 0,00 | -2,13 | 0,23 | 1,15 |
| A2h | 0,07 | -1,59 | 0,33 | 1,29 |

| man2b1 | arrayProb | Mmédio | 2^ Mmd | qPCR |
|---------------|-----------|--------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| A30 | 1,00 | 1,20 | 2,30 | 1,01 |
| A2h | 0,95 | 0,76 | 1,69 | 1,17 |

| fgfr2 | arrayProb | Mmédio2 | 2^ Mmd | qPCR |
|--------------|-----------|---------|--------|------|
| K | | | | 1 |
| A30 | 1,00 | 1,19 | 2,28 | 1,16 |
| A2h | 0,94 | 0,97 | 1,95 | 1,41 |

| nr4a1 | arrayProb | Mmédio2 | 2^ Mmd | qPCR |
|--------------|-----------|---------|--------|--------|
| K | | | | 1 |
| A30 | 0,87 | 4,47 | 22,12 | 121,94 |
| A2h | 0,59 | 0,757 | 1,69 | 112,60 |

A comparação entre genes regulados por ACTH e soro encontra poucos genes em comum. Se comparados genes induzidos por estes dois tratamentos de trinta minutos a duas horas de estímulo, são descritos doze genes (*ahcy; bag3; dnatopoA2; elk1; h3f3b; hnrpd; kras; mek4; myosin Va; pink1, ppat e tgfb2*) dos quais quatro são pertencentes à via de MAPK (*elk1; kras; mek4; e tgfb2*). Em condições de inibição são encontrados onze genes comuns (*carb2; cdh11; eif3s2; hist1h2bc; hsp27; lama5; munc13-3; pgm3; polr2i; rabac1e RP23-173H17*), no entanto o KEGG não é capaz de agrupar nem mesmo dois genes em uma mesma categoria.

3.2.5. Estímulo mitogênico e morte celular disparados por FGF2

Com o intuito de comparar a resposta das linhagens Y1 e FR3 a tratamentos de soro e FGF2 foram desenhados diagramas de Venn destacando o número de mensageiros regulados em condições de indução ou repressão. Este tipo de representação é capaz de indicar os genes regulados que são comuns às duas condições, bem como aqueles exclusivos. Na **figura 32** são comparadas respostas a tratamentos de soro em pulsos de trinta minutos e de duas horas. Na **figura 33** são apontados os mensageiros regulados em tratamentos de FGF2 nestes mesmos intervalos.

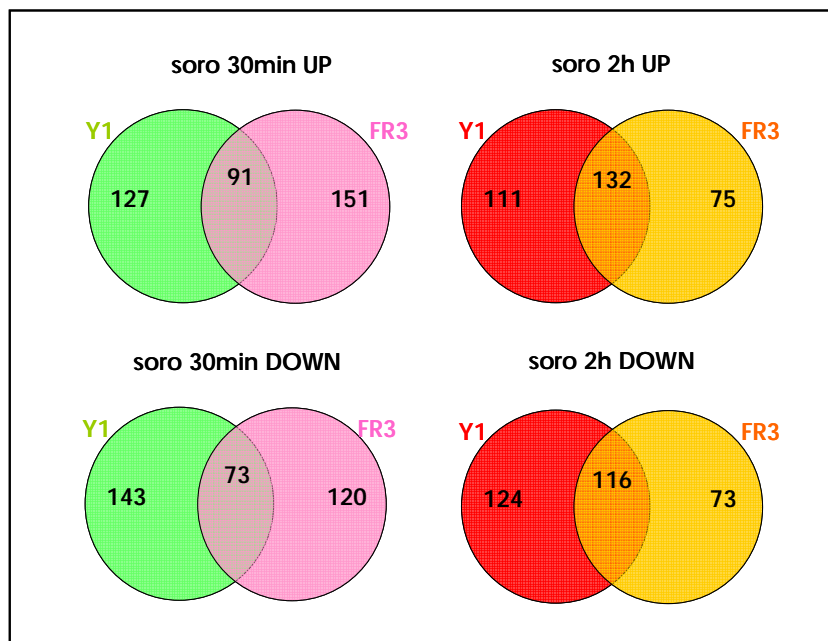


Figura 32: Diagramas de Venn comparando a resposta das linhagens Y1 e FR3 a tratamentos de soro por trinta minutos e duas horas. Na parte superior da figura “UP” representam os genes estimulados; na parte inferior da figura “DOWN” representam os genes inibidos. À esquerda são apresentadas as condições de 30 minutos (30min) de tratamento; à direita, duas horas de tratamento(2h).

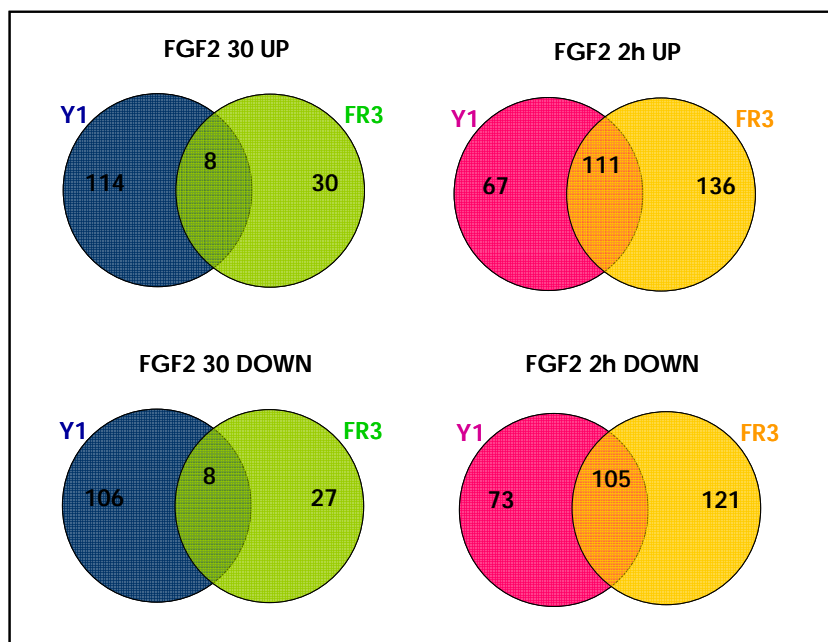


Figura 33: Diagramas de Venn comparando a resposta das linhagens Y1 e FR3 a tratamentos de FGF por trinta minutos e duas horas. Na parte superior da figura “UP” representam os genes estimulados; na parte inferior da figura “DOWN” representam os genes inibidos. À esquerda são apresentadas as condições de 30 minutos (30min) de tratamento; à direita, duas horas de tratamento(2h).

De maneira semelhante foram desenhados diagramas de Venn para as condições de “estímulo mitogênico” (E) e “morte celular programada” (M) (**figura 34**). Estas duas condições agrupam um número grande de tratamentos, como descrito em materiais e métodos. Foram feitos ensaios independentes de microarray para cada condição e os resultados foram analisados em conjunto, de forma a encontrar genes que acompanhem e esclareçam o processo no qual a célula está envolvida.

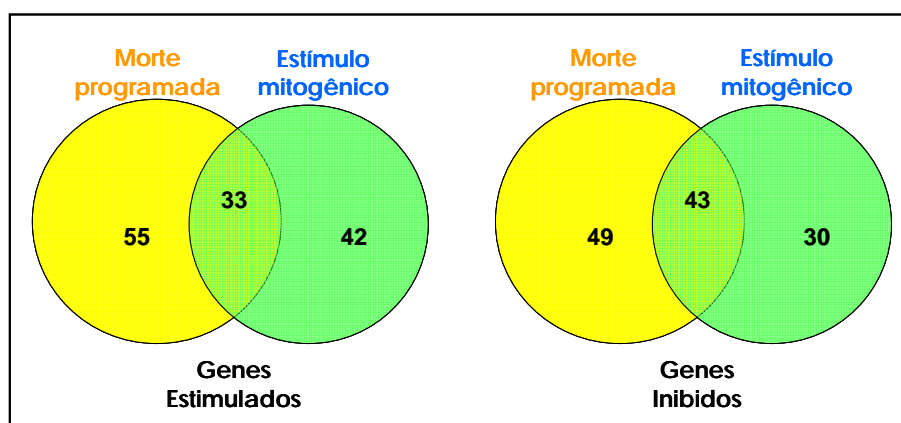


Figura 34: Diagramas de Venn representando o número de genes induzidos e reprimidos em condições de “estímulo mitogênico” e de “morte celular programada”.

Para as condições de estímulo mitogênico e morte celular programada foram feitas análises mais detalhadas, denominando os genes que pertencem a cada grupo exclusivamente. Os genes com expressão elevada em condição de estímulo mitogênico, excluídos aqueles que também são estimulados em condições de morte programada, são apresentados na **tabela 11**, enquanto os genes inibidos em condição de estímulo mitogênico são apresentados na **tabela 12**. De forma semelhante, os genes estimulados em condição de morte celular programada são apresentados na **tabela 13** enquanto os genes inibidos nesta condição são apresentados na **tabela 14**.

Tabela 11: Genes com aumento de expressão em condição de “estímulo mitogênico”.

| id | Nome | Função | Processo |
|-------------------|--|-----------------------------------|--|
| 14-3-3_eta | tyrosine 3-monoO/tryptophan 5-monoO activ. Eta | ligante de actina/inibidor de PKC | transdução de sinal/apoptose/citoesqueleto |
| aaa10f | Desconhecido | desconhecido | Desconhecido |
| atrx | alpha thalassemia X-linked homolog | ligante de DNA | reparo de DNA |
| bmp1 | bone morphogenetic protein 1 | peptidase/ ligante de calico | diferenciação/proteólise |
| calponin_3_(cnn3) | calponin3 | ligante de calmodulina | organização estrutural de actomiosin |
| dusp1 | dual specificity phosphatase 1 | fosfatase | desfosforilação de proteínas/via de MAPK |
| elk1 | ELK1, member of ETS oncogene family | fator de transcrição | regulação de transcrição |
| fbxw1b | F-box and WD-40 domain protein 11 | ligase de ubiquitina | ubiquitinação/sinalização por Wnt |
| fgf1 | fibroblast growth factor 1 | fator de crescimento | diferenciação/proliferação/sinalização |
| fibp | fibroblast growth factor (acidic) intracellular bp | ligante de FGF | sinalização de FGF |
| frag1 | FGF receptor activating protein 1 | desconhecido | Desconhecido |
| h2ay | H2A histone family, member Y | ligante de DNA | formação e nucleossomo |
| hadh2 | hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase 2 | atividade de oxidoreductase | metabolismo de lipídeos |
| hadhb | hydroxyacyl-Co A dehydrogenase (tri-funcional) | atividade aciltrasnferase | metab. Ác. Graxos |
| igfr1 | insulin-like growth factor 1 receptor | receptor | transdução de sinal |
| mnat1 | menage a trois 1 | ligante de íon metálico | controle de ciclo celular |
| myosin_va | myosin VA -heavy polypeptide 12, myoxin | ligante de calmodulina | organização de citoesqueleto |
| ngfrap1 | nerve growth factor receptor | proteína associada a receptor | Apoptose |

| | | | |
|-----------------|--|---|------------------------------------|
| pak1 | p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 | proteína quinase | Fosforilação |
| pbp | phosphatidylethanolamine binding protein | ligante de fosfatidiletanolamina | transdução de sinal |
| peroxiredoxin_3 | peroxiredoxin_3 | atividade de oxidoreductase | Antioxidante |
| pole4 | polymerase (DNA-directed), epsilon 4 | ligante de DNA | replicação/transcrição |
| rab6 | RAB6, member RAS oncogene family | ligante de nucleotídeo | transdução de sinal |
| rac2 | RAS-related C3 botulinum substrate 2 | ligante de nucleotídeo | transdução de sinal |
| rap1a | RAS-related protein-1a | ligante de nucleotídeo | ciclo celular/transdução de sinal |
| rasal1 | RAS protein activator like 1 (GAP1 like) | ativador de GTPase de RAS | sinalização intracelular |
| ribos-uba80 | ribosomal protein S27a | desconhecido | degradação de proteínas |
| rpd3 | histone deacetylase 1 | desacelase de histona | modificação de cromatina |
| ryr3 | ryanodine receptor 3 | receptor/ligante de cálcio | transporte de cálcio |
| sfrs6 | splicing factor, arginine/serine-rich 6 | ligante de RNA | splicing de RNA |
| sin3b | transcriptional regulator, | ligante de proteína | Transcrição |
| slc9a1 | solute carrier family 9, member 1 | atividade antiporte Na ⁺ /H ⁺ | canal iônico |
| smarcb1 | SWI/SNF related, matrix associated | ligante de proteína | modificação de cromatina |
| smoc1 | SPARC related modular calcium binding 1 | ligante de cálcio | Desconhecido |
| sp3 | trans-acting transcription factor 3 | ligante de DNA | Diferenciação |
| sod3 | superoxide dismutase 3 | antioxidante | metabolismo de superóxido |
| tc10 | ras homolog gene family, member Q | atividade GTPase | sinalização via Small-GTP |
| top1 | topoisomerase (DNA) I | topoisomerase | alteração na topologia do DNA |
| trp53bp2 | transformation related protein 53 bp 2 | desconhecido | Apoptose |
| uba52 | ubiquitin A-52 | estrutura de ribossomo | síntese e modificação de proteínas |
| ube1c | ubiquitin-activating enzyme E1C | ativadora de ubiquitina | ciclo celular/apoptose |
| xm_124597.1 | gapdh pseudogene | desconhecido | Desconhecido |

Tabela 12: Genes inibidos em condição de “estímulo mitogênico”.

| id | Nome | Função | Processo |
|----------------------|---|-------------------------------|--|
| 1810004b07rik | THAP domain containing 7 | ligante de DNA | Transcrição |
| 1810020g14rik | RIKEN cDNA 1810020G14 gene | desconhecido | desconhecido |
| aaa3f | desconhecido | desconhecido | desconhecido |
| ak013948.1 | Sodium channel modifier 1 | canal iônico | splicing de RNA |
| bc005662 | acyltransferase like 2 | ligante de cálcio | desconhecido |
| carbonic_anhydrase_2 | carbonic_anhydrase_2 | ligante iônico | metabolismos de compostos de 1C |
| caspase2 | caspase 2 | ligante de proteínas | regulador de apoptose |
| cdkn1a-p21 | cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) | atividade de quinase | ciclo celular |
| comt | catechol-O-methyltransferase | atividade de metiltransferase | metabolismo de catecolaminas |
| copa | coatamer protein complex alpha | proteína de transporte | transporte intracelular de proteínas |
| cortactin | cortactin | ligante de proteínas | desconhecido |
| cyclin_d3 | cyclin D3 | regulador de CDK | divisão celular |
| dlg5 | discs, large homolog 5 | ligante de citoesqueleto | desconhecido |
| dnapoldcs | polymerase DNA delta1 catalytic subunit | ligante de DNA | Replicação |
| eef1g | eukaryotic translation elongation factor 1G | fator de alongação | biossíntese de proteínas |
| grasp | GRP1-associated scaffold protein | ligante de proteínas | transdução de sinal |
| hsp90 | heat shock protein 1, alpha | ligante de proteínas | resposta a proteínas desnaturadas |
| ldh1 | lactate dehydrogenase 1, A | oxido redutase | Glicólise |
| mad1 | mitotic arrest deficient 1-like 1 | desconhecido | ciclo celular |
| men1 | integrin, alpha E, epithelial-associated | ligante de cálcio e Magnésio | adesão em matriz extra celular/sinalização |
| pdha1 | pyruvate dehydrogenase E1 alpha1 | atividade de oxidoreductase | Glicólise |
| polr2i | pol (RNA) II (DNA directed) polypeptide I | polimerase | Transcrição |
| ppp1r13b | protein phosphatase 1 regulatory 13B | fator de transcrição | Apoptose |
| rab11b | rab11b, member RAS oncogene family | ligante de GTP | transdução de sinal |
| rad17 | RAD17 homolog | ligante de nucleotídeo | reparo/ciclo celular |
| rad9 | RAD9 homolog | ligante de nucleotídeo | reparo/ciclo celular |
| rbg1 | roundabout homolog 3 | receptor/ligante de proteínas | diferenciação e desenvolvimento |
| taf12 | TAF12 RNA polymerase II TBP-associated factor | ligante de DNA | início de transcrição |
| tgfbr2 | transforming growth factor, | atividade de quinase | sinalização/controlado de |

| | | | |
|---------------|------------------|----------------|----------------------------------|
| | beta receptor II | | ciclo celular |
| thioredoxin_2 | thioredoxin 2 | transportador | transporte de elétrons |
| unc13h3 | unc-13 homolog C | ligante de DAG | exocitose/cascata de sinalização |

Tabela 13: Genes estimulados em condição de “morte celular programada”.

| id | Nome | Função | Processo |
|---------------|--|---|--|
| 0910001a06rik | desconhecido | desconhecido | Desconhecido |
| 1110005a23rik | 1110005A23Rik | ligante de DNA | regulação de transcrição e tradução |
| 14-3-3_beta | Y. 3-monoO/tryptophan 5-mono) activt.beta | ligante de proteínas | transdução de sinal/ ciclo celular/anti apoptose |
| 14-3-3_gamma | Y. 3-monoO/tryptophan 5-mono) activt.gamma | ligante de proteínas | transdução de sinal/ ciclo celular/anti apoptose |
| aaa9d | desconhecido | desconhecido | Desconhecido |
| actin_alpha | actin alpha | ligante de proteína | organização de citoesqueleto |
| bub3 | budding uninhibited by benzimidazoles 3 | | ciclo celular |
| calcyclin | S100 calcium binding protein A6 | ligante de cálcio/ fator de crescimento | sinalização/ciclo celular |
| calm2 | calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta) | ligante de cálcio | ciclo celular/sinalização via receptor-protG |
| catnb | catenin (cadherin associated protein), beta 1 | fator de transcrição | sinalização por wnt/transcrição |
| cdc20 | CDC20 cell division cycle 20 homolog | ligante de proteína | controle de ciclo celular |
| cdk7 | cyclin-dependent kinase 7 | quinase | ciclo celular |
| cdkn2d_-_p19 | cyclin-dependent kinase inhibitor 2D | inibidor de CDK | controle de ciclo celular |
| c-jun | jun | fator de transcrição | diferenciação/progressão no ciclo celular |
| clathrin_hc | clathrin, heavy polypeptide | ligação | vesículas de clatrina |
| col11a1 | procollagen, type XI, alpha 1 | constituente de ECM | adesão celular/metabolismo de proteoglicanos |
| cox6c | cytochrome c oxidase, subunit VIc | atividade deoxidoreductase | transporte de elétrons |
| cse1l | chromosome segregation 1-like | proteína transportadora | apoptose/proliferação celular |
| cyb5m-pending | RIKEN cDNA 1810044O22 gene | ligante de íon metálico | transporte de elétrons |
| egr1 | early growth response 1 | fator de transcrição | Transcrição |
| eif4a1 | eukaryotic translation initiation factor 4A1 | ligante de ácido nucleico | biossíntese de proteínas |
| enpp2 | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 | fosfatase/ligante de ác. Nucléico | metabolismo de nucleotídeos |
| etv1 | ets variant gene 1 | fator de transcrição | Transcrição |

| | | | |
|-----------------------|---|---|--|
| fgfr3 | fibroblast growth factor receptor 3 | receptor | transdução de sinal/ proliferação celular |
| fn1 | fibronectin 1 | ligante de proteína | adesão celular |
| gpx3 | glutathione peroxidase 3 | atividade de oxidoreductase | resposta a estresse oxidativo |
| h2afz | H2A histone family, member Z | ligante de DNA | formação de nucleossomo |
| h3f3b | H3 histone, family 3B | ligante de DNA | formação de nucleossomo |
| hsd17b7 | hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7 | atividade de oxidoreductase | biossíntese de esteroides/ metabolismo |
| ifrd1 | interferon-related developmental regulator 1 | ligação | diferenciação e desenvolvimento |
| igf1 | insulin-like growth factor 1 | fator de crescimento | transdução de sinal |
| itga6 | integrin alpha 6 | atividade de receptor | adesão/sinalização mediada por integrina |
| k-ras | v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog | ligante GTP/atividade GTPásica | transdução de sinal/ciclo celular |
| mapk14_(p38_alpha) | mitogen activated protein kinase 14 | atividade de MAPK | transdução de sinal |
| mek3 | mitogen activated protein kinase kinase 3 | atividade de MAPK | transdução de sinal |
| mrg15 | mortality factor 4 like 1 | ligante de cromatina | proliferação e controle de ciclo celular |
| nedd8 | neural precursor developmentally down- regulated 8 | ligante de proteína | proteólise/ciclo de ubiquitina |
| nr2e1 | nuclear receptor subfamily 2, group E 1 | receptor de esteróide/ fator de transcrição | Transcrição |
| nr4a1 | nuclear receptor subfamily 4, group A 1 | receptor de esteróide/ fator de transcrição | transcrição/apoptose/via de MAPK |
| pcna | proliferating cell nuclear antigen | fator de processividade da DNA pol | reparo de DNA/ replicação |
| pdgfa | platelet derived growth factor, alpha | fator de crescimento | proliferação e controle de ciclo celular |
| pi3k_cb | phosphatidylinositol 3-kinase catalytic beta | quinase | transdução de sinal |
| ppat_amidotransferase | phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase | transferase | Metabolismo |
| rac1 | ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 | ligante de GTP | sinalização por small GTPase |
| ran | member RAS oncogene family | ligante de proteína | transporte de proteínas |
| rps6ka1 | ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1 | ligante de ATP/proteína kinase | transdução de sinal |
| rrm1 | ribonucleotide reductase M1 polypeptide | ligante de nucleotídeo | replicação de DNA |
| sdcbp | syndecan binding protein | ligante de proteína | transdução de sinal por Ras |
| snrpb2 | syndecan binding protein (syntenin) 2 | desconhecido | sinalização/ transporte |
| tgfb2 | transforming growth factor, beta 2 | fator de crescimento | ciclo celular/ crescimento |

| | | | |
|--------|--|-----------------------------|---|
| timm23 | translocase inner mitoc. membr23 homolog | translocase | metabolismo de nucleotídeos |
| tubb5 | tubulin, beta 5 | estrutural | Microtúbulo |
| ube2b | ubiquitin-conjugating enzyme E2B | ligase de ubiquitina | ciclo de ubiquitina/modificação de proteínas |
| ube2l3 | ubiquitin-conjugating enzyme E2L3 | ligase de ubiquitina | catabolismo protéico dependente de ubiquitina |
| ugdh | UDP-glucose dehydrogenase | atividade de oxidoreductase | transporte de elétrons |
| usp18 | ubiquitin specific protease 18 | peptidase | ciclo de ubiquitina/catabolismo de proteínas |

Tabela 14: Genes inibidos em condição de “morte celular programada”.

| id | Nome | Função | Processo |
|---------------|---|--------------------------------------|---|
| 9030221m09rik | phosphatidylserine decarboxylase | atividade caboxi-liase | metabolismo de fosfolípidios |
| aaa10g | desconhecido | desconhecido | Desconhecido |
| adcyl6 | adenylate cyclase 6 | atividade de adenilato ciclase | cascata de sinalização intracelular |
| adcyl9 | adenylate cyclase 9 | atividade de adenilato ciclase | cascata de sinalização intracelular |
| adh5 | alcohol dehydrogenase 5 | atividade de álcool desidrogenase | metabolismo de retinóides |
| apod | apolipoprotein D | ligante de lípidos | Transporte |
| a-raf | v-raf murine sarcoma viral oncogene hmlg | Tirosina quinase | ciclo celular/sinalização |
| cdc25a | cell division cycle 25A | atividade de tirosina fosfatase | mitose/ regulação de CDK |
| cdh11 | cadherin 11 | ligante de cálcio e de proteínas | adesão celular |
| chimerin2 | chimerin2 | ativador de GTPase/ligante DAG | transdução de sinal |
| col14a1 | procollagen, type XIV, alpha 1 | constituente de matriz extra celular | adesão celular/transporte de fosfato |
| cullin-4a | cullin 4A | ligante de proteína | ciclo celular/apoptose |
| dffa | DNA fragmentation factor | ligante de proteína | apoptose/ cascata de sinalização intracelular |
| dnase2a | deoxyribonuclease II alpha | nuclease | apoptose/metabolismo de DNA |
| dusp19 | dual specificity phosphatase 19 | fosfatase | desfosforilação de proteínas |
| dusp8 | dual specificity phosphatase 8 | fosfatase | desfosforilação de proteínas/via de MAPK |
| eef1b2 | eukaryotic translation elongation factor1b2 | fator de tradução | biossíntese de proteínas |

| | | | |
|---------------|--|---|---|
| eif2b2 | eukaryotic translation initiation factor 2B | fator de início de tradução | biossíntese de proteínas |
| eif4a2 | eukaryotic translation initiation factor 4A2 | ligante de ácido nucléico | biossíntese de proteínas |
| fbxo3 | F-box only protein 3 | ubiquitina ligase | ciclo de ubiquitina |
| glycerol3pdh | glyceraldehyde-3-P dehydrogenase | ligante de NAD+/fosforilação e oxidação | Glicólise |
| gnat2 | guanine nucleotide binding protein alpha 2 | ligante de GTP | transdução de sinal |
| gpi1 | glucose phosphate isomerase 1 | isomerase | glicólise /gliconeogênese |
| greb | similar to ribosomal protein L21 | desconhecido | Desconhecido |
| grm1 | glutamate receptor | receptor | transdução de sinal |
| hdac10 | histone deacetylase 10 | histona desacetilase | modificação de cromatina/transcrição |
| hdac6 | histone deacetylase 6 | histona desacetilase | modificação de cromatina/transcrição |
| hdac7 | histone deacetylase 7 | histona desacetilase | modificação de cromatina/transcrição |
| hsp60 | heat shock 60kDa protein 1 | ligante de proteínas desnaturadas | definição de estrutura terciária de proteínas |
| ipo8 | importin 8 | ligante de proteínas | transporte de proteínas |
| mad4 | Max dimerization protein 4 | fator de transcrição | Transcrição |
| mapk9_(sapk) | mitogen-activated protein kinase 9 | Atividade de MAPK, JUNK | cascata de JUNK/ resposta a estresse |
| mod1 | malic enzyme | atividade de oxidoreductase | metabolismo de malato |
| mx1 | Max interacting protein 1 | regulador de transcrição | Transcrição |
| nme2 | expressed in non-metastatic cells 2 | ligante de nucleotídeo | metabolismo de nucleotídeos/ciclo celular |
| nr1h2 | nuclear receptor subfamily 1, group H 2 | receptor esteróide/fator de transcrição | Transcrição |
| pex12 | peroxisomal biogenesis factor 12 | proteína-ubiquitona ligase | Ubiquitinação |
| polr2k | polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K | polimerase | Transcrição |
| rap2a | RAP2A, member of RAS oncogene family | Atividade de GTPase | transdução de sinal |
| rho_b | ras homolog gene family, member B | ligante de GTP | transdução de sinal/ciclo celular |
| ribosomal_l14 | ribosomal protein L14 | constituente de ribossomo | biossíntese de proteínas |
| slc1a1 | solute carrier family 1 | carreador | Transporte |
| smarcd3 | SWI/SNF related, matrix associated d 3 | ATPase/ helicase | modificação de cromatina/transcrição |
| srcasm | target of myb1-like 1 | ligante de proteínas | transporte de proteínas |
| sulfatase_1 | sulfatase_1 | hidrolase | apoptose/metabolismo heparan sulfato |
| syk | spleen tyrosine kinase | ligante de ATP | ativação de MAPK |

| | | | |
|--------|---------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| tcfl1 | transcription factor-like 1 | fator de transcrição | regulação de transcrição |
| tnr | tenascin R | constituente de ECM | adesão celular |
| txndc1 | thioredoxin domain containing 1 | transporte de elétrons | transdução de sinal/apoptose |
| ube3a | ubiquitin protein ligase E3A | proteína-ubiquitina ligase | ciclo de ubiquitina |

Os genes apresentados nas tabelas acima foram submetidos ao KEGG em dois grupos: "genes envolvidos no disparo de sinal mitogênico" e "genes envolvidos no disparo do sinal de morte celular programada", sem distinção entre os genes induzidos ou reprimidos. Foi feito desta forma com o intuito de agrupar um maior número de genes regulados para que se tornasse mais evidente quais as vias alteradas em cada caso.

Dentre os genes relacionados ao disparo do sinal mitogênico submetidos ao KEGG, trinta e sete genes dos sessenta e nove submetidos não foram agrupados (53%). Três genes apresentados nas tabelas acima não puderam ser submetidos por não terem número de identidade (gene ID) descrito ou por não terem identidade conhecida.

As vias que agruparam no mínimos cinco genes nessa condição foram a via de MAPK, com oito genes (*rap1a; casp2; elk1; fgf1; pak1; dusp1; rac2; tgfb2*); de adesão focal, com seis genes (*rap1a; ccnd3; elk1, igf1r; pak1 e rac2*) e ciclo celular, com cinco genes (*ccnd3; cdkn1a; mad11; ywhah e LOC433759*). Outros genes foram incluídos em vias metabólicas (glicólise, gliconeogênese, metabolismo de ácidos graxos; metabolismo de purinas e pirimidinas; biossíntese e degradação de diversos aminoácidos), ou foram agrupados como pertencente à família das polimerases, genes ribossomais, vias alternativas de sinalização (via de notch, via de hedgehog, via jak-stat, vias de sinal iniciado por receptores de células T e de células B, via de sinalização por cálcio etc). Todos estes grupos descritos, no entanto, não foram capazes de incluir mais do que dois genes.

Dentre os genes que não foram encontrados no KEGG há genes da família de ras (*rab6; rab11b; rasal1*), genes relacionados a modificações no DNA, transcrição e fatores de tradução (*top1; polr2i; sin3b; ppp1r13b; thap7; mnat1; eef1g*), genes relacionados a controle de ciclo celular e apoptose (*trp53bp2, rad9, rad17; ngfrap1, ube1c*), entre outros.

Para a condição de morte celular programada, dos cento e quatro genes submetidos ao KEGG, cinquenta e três (51%) não foram agrupados. Dentre os genes classificados pelo KEGG, muitos estão relacionados a metabolismo. Como exemplo é possível citar "metabolismo de purinas e pirimidinas" com seis genes (*adcy6, adcy9, polr2k, nme2,*

enpp2; rrm1); glicólise e gliconeogênese (*adh5, gpi1; gapdh*). Outras vias metabólicas, como via das pentoses fosfato, metabolismo de ácidos graxos, fosforilação oxidativa, metabolismo de diversos aminoácidos e mesmo genes ribossomais ou polimerases também são citados, porém não continham mais de dois membros. A via de apoptose apresentou apenas dois membros (*dffa* e *pik3cb*). A proteína PI3K (*Pik3cb*) faz parte da via de transdução de sinal de PI3K/AKT, uma via anti-apoptótica. O fator Dffa (DNA fragmentation factor, polipeptídeo alfa), é substrato da caspase 3 e tem como papel a fragmentação do DNA em processos apoptóticos. Este gene é inibido na condição de morte induzida por FGF2.

Dentre as vias de sinalização capazes de agrupar um número maior de genes temos a via de MAPK com onze genes (*mapk14, fgfr3, nr4a1, jun, kras, dusp8, pdgfa, rac1, tgfb2, mapk2k3* e *mapk9*), enquanto as vias de wnt (*mapk9, catnb, jun, rac1*) e dependente de cálcio (*adcy6, adcy9, calm2, cdc25c, grm1*) agruparam quatro e cinco membros respectivamente. Genes de controle de ciclo celular foram agrupados com nove membros (*cdc20, bub3, cdc25c, cdk7, cdkn2d, pcna, tgfb2, ywhag, ywhab*).

Dezessete genes foram relacionados a processos de adesão focal, interação ECM-receptor, diferentes tipos de junções celulares e modificação de citoesqueleto. Como estes grupos parecem ser bastante interligados, com diversos membros em comum, os genes encontrados nestas condições são apresentados na **tabela 15**. Alguns dos genes não classificados pelo KEGG como *cdh11* (cadherin 11), *col14a1* (procolágeno 14 alfa1), *sdcbp* (syndecan binding protein) e *sulf1* (sulfatase1) poderiam ser incluídos na tabela.

Tabela 15: Genes regulados na condição de morte celular programada envolvidos em comunicação célula-célula e reorganização de citoesqueleto.

| Nome do Gene | Adesão focal | Interação ECM-receptor | Junções aderentes | Tight junctions | GAP junctions | Regulação esqueleto de actina |
|--------------------------------------|--------------|------------------------|-------------------|-----------------|---------------|-------------------------------|
| catenin beta | Catnb | | Catnb | Catnb | | |
| procollagen | Col11a1 | Col11a1 | | | | |
| fibronectin 1 | Fn1 | Fn1 | | | | Fn1 |
| insulin-like growth factor 1 | Igf1 | | | | | |
| integrin alpha 6 | Itga6 | Itga6 | | | | Itga6 |
| jun oncogene | Jun | | | | | |
| v-Ki-ras2 | Kras | | | Kras | Kras | Kras |
| platelet derived growth factor alpha | Pdgfa | | | | Pdgfa | Pdgfa |
| RAS-related C3 botulinum substrate 1 | Rac1 | | Rac1 | | | Rac1 |
| tenascin R | Tnr | Tnr | | | | |
| mitogen activated protein kinase 9 | Mapk9 | | | | | |
| Phosphatidylinositol 3-kinase | Pik3cb | | | | | Pik3cb |
| tubulin, beta 5 | | | | | tubb5 | |
| adenylate cyclase 6 | | | | | Adcy6 | |
| adenylate cyclase 9 | | | | | Adcy9 | |
| glutamate receptor | | | | | Grm1 | |
| fgf receptor 3 | | | | | | fgfr3 |

Dentre os genes não classificados nesta condição encontram-se histonas (*h2afz*, *h3f3b*, *hdac10*), genes relacionados a apoptose (*cse1l*, *dnase2a*, *mcl1*) e fatores de transcrição (*etv1*, *nr1h2*, *nr2e1*, *tcf11*).

3.2.6. Análise de correlação dos genes envolvidos no processo de morte celular programada

A análise por correlação de Pearson pretende definir padrões entre os diversos genes descritos como regulados em condições de morte celular programada, de maneira a excluir as coordenações que também estão presentes nas condições em que a célula vive.

Nas **figura 35** e **36** são apresentados dois clusters delimitados em processos de morte celular programada. Cada *cluster* representa um grupo coordenado de expressão. As cores dos genes representam as vias a qual pertencem: branco → via de MAPK; amarelo → controle de ciclo celular; verde escuro → adesão focal; verde claro → apoptose; azul → ciclo de Krebs; rosa → genes ribossomais.

Os clusters “60” e “61” são os clusters que agrupam um maior número de genes, cinquenta e vinte e oito, respectivamente. Os outros dez clusters gerados são pequenos, evidenciando coordenações entre apenas dois ou três genes.

Foi observado um grande número de genes coordenados envolvidos no controle do ciclo celular, via de MAPK e processos de adesão focal, como pode ser observado nos dois clusters.

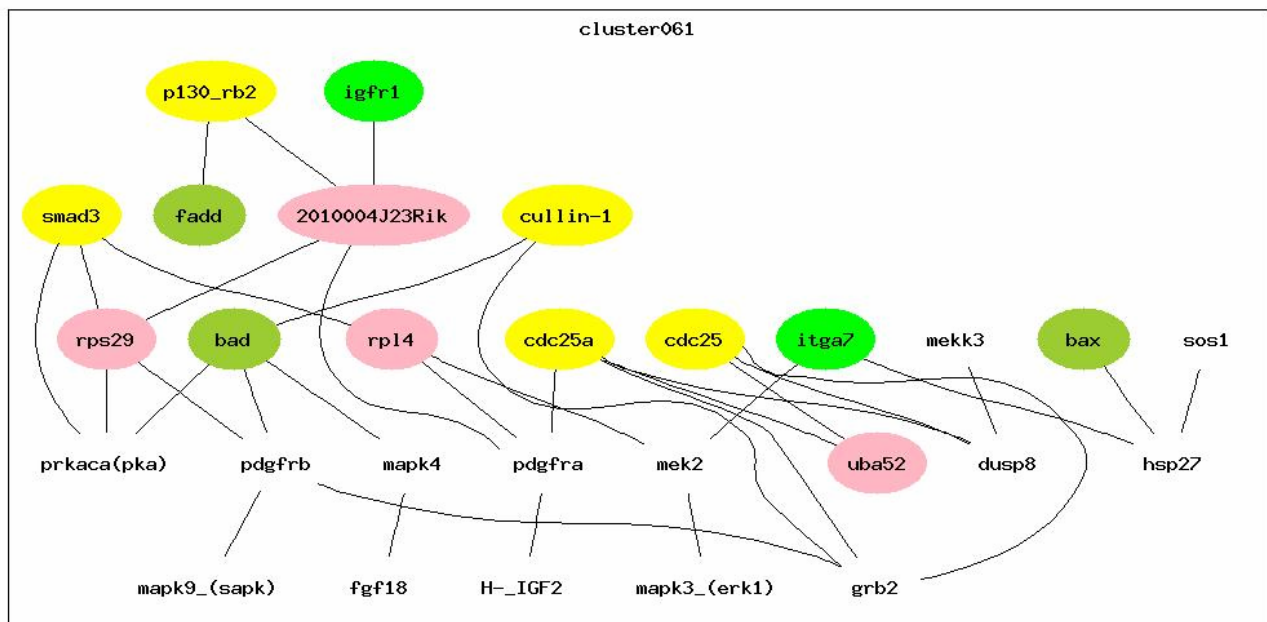


Figura 35: Cluster 61, grupo de genes coordenados em processos de “morte celular programada”.

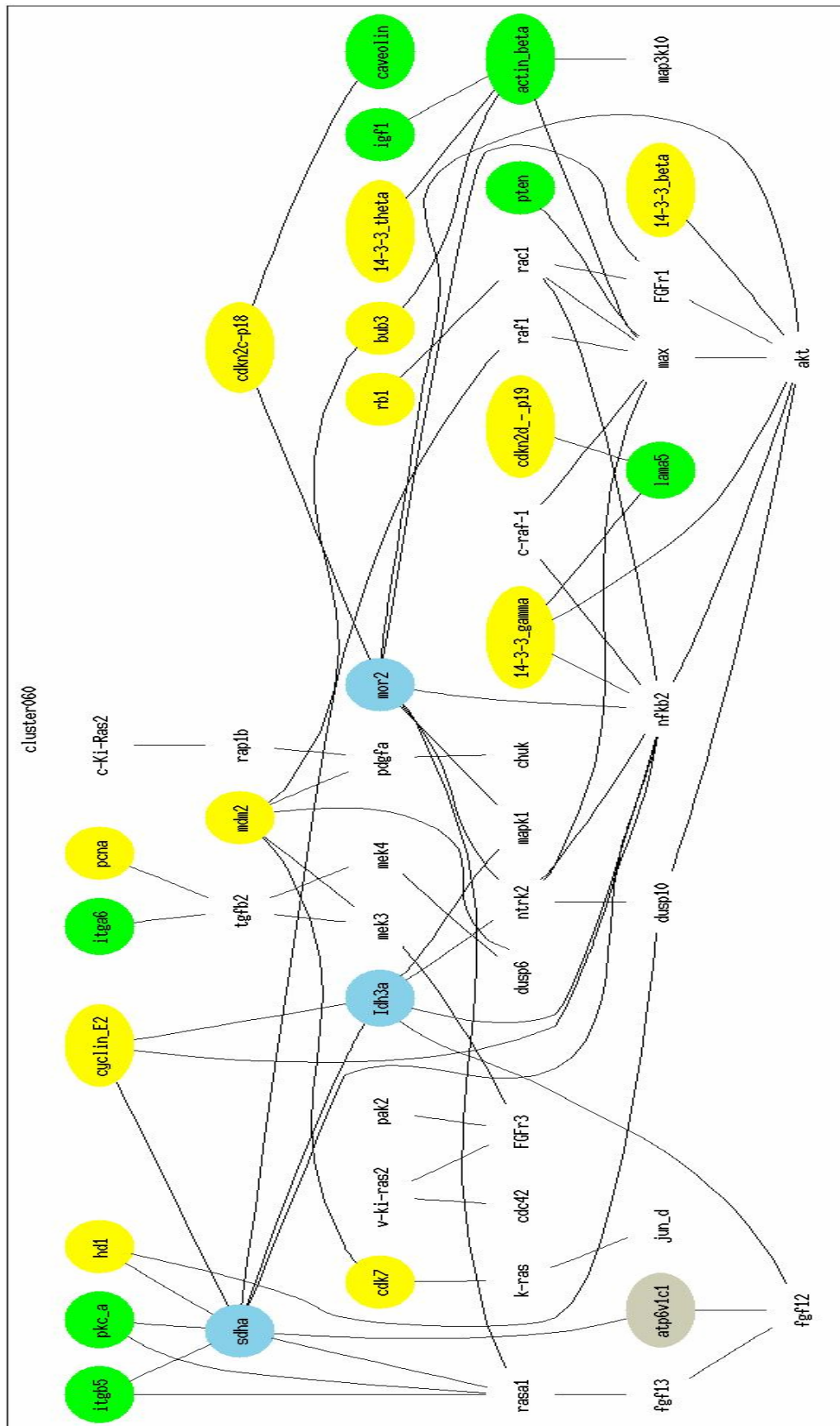


Figura 36: Cluster 60, grupo de genes coordenados em processos de "morte celular programada".

4. Discussão

4.1. As bibliotecas SSH de genes estimulados por FGF2 e por ACTH

A redundância de bibliotecas geradas pela técnica SSH depende de alguns fatores. Primeiramente, deve ser considerado que este é um método longo no qual cada etapa depende de todas aquelas que a precederam. Desta forma, a obtenção de mRNA bem como cDNA de qualidade são passos decisivos. Praticamente todos os passos do procedimento são acompanhados com ensaios em paralelo que indiquem a eficiência e a qualidade do que se tem em mãos.

Se os experimentos funcionassem de forma ideal, mRNA livres de degradação tratados com uma transcriptase reversa de altíssimo rendimento gerariam cDNAs que representariam toda a extensão do mRNA original. Esta molécula longa teria o número máximo de sítios de digestão possíveis para a enzima de restrição usada no passo seguinte, conseqüentemente gerando o maior número possível de fragmentos "blunt".

Após a digestão, as moléculas têm sua representatividade na amostra alterada, sendo maior quanto maior for a expressão e extensão inicial. Se considerarmos dois tipos de moléculas, ambas de mesmo tamanho, com o mesmo número de sítios de restrição (três, por exemplo), uma delas representada por 200 fragmentos iniciais (alta expressão) e a outra por apenas 2 fragmentos (baixa expressão), após a digestão a primeira será representada por 800 fragmentos enquanto a segunda terá apenas 8. Isto é decisivo para os passos seguintes.

A normalização da biblioteca, passo simultâneo à subtração, tem características de uma cinética de segunda ordem, na qual moléculas complementares devem se encontrar. Nesta fase será favorecida a amplificação daqueles fragmentos pouco representados, com menor probabilidade de hibridização durante a primeira fase da técnica, quando as moléculas de cada tubo têm o mesmo adaptador. Moléculas abundantes e conseqüentemente com maior probabilidade de hibridização terão menor chance de ser amplificadas durante o PCR, uma vez que terão os sítios de ligação para o primer inacessíveis devido à formação de estruturas "pan-like".

O número de singlets em relação ao número de contigs pode ser um indicativo da eficiência dos passos iniciais, que precedem as hibridizações. Como são gerados fragmentos "blunt", espera-se que não haja seqüências com sobreposição parcial. No entanto, quando estas estão presentes, mostram que houve degradação do mRNA inicial ou síntese incompleta do cDNA. Além disso, por haver normalização, espera-se que haja

representatividade equivalente entre todos os genes, ou seja, um grande número de singlets e contigs com poucos "reads".

Ao final do procedimento de SSH, a análise da representatividade em cada uma das bibliotecas foi bastante satisfatória. A estimativa é que, se são necessários cinco ciclos para igualar a intensidade das bandas obtidas por PCR, é possível avaliar o enriquecimento em aproximadamente 20 vezes para o fragmento em questão. Neste teste, espera-se que o gene de expressão constitutiva tenha sua concentração reduzida dentro da amostra, enquanto o gene induzido seja enriquecido.

Como pode ser visto na **figura 17**, *gapdh* teve sua representatividade reduzida tanto na subtração dos genes inibidos ("K", condição controle menos condição estimulada por FGF2) como na amostra estimulada por FGF2 em que foi subtraído o controle ("F", condição estimulada por FGF2 menos controle não tratado), sendo mais eficiente nesta última.

O observado para o gene *c-fos* na biblioteca SSH-FGF2 foi um pouco curioso. Este gene não é expresso em células carenciadas, mas apenas naquela que receberam o estímulo, como já era de conhecimento do laboratório. No caso, a reação de PCR confirma a ausência de *c-fos* em células carenciadas e a presença deste gene nas células estimuladas, porém, após os procedimentos de normalização, a representatividade de *c-fos* é reduzida na amostra final. A causa provável para a redução é que, por ser um gene de expressão muito alta, sua representatividade é reduzida após o procedimento de SSH, de forma que a concentração relativa final seja equiparada aos demais mRNAs, com expressão não tão acentuada.

Para a biblioteca gênica tratada com ACTH é possível observar que a subtração foi excepcionalmente eficiente. Na **figura 24**, comparando-se as raias 1 a 3 (subtraído) com as raias 4 a 6 (controle não subtraído) é possível observar que a subtração deste gene foi quase que total na biblioteca de genes inibidos por ACTH ("K", condição controle, tendo subtraída a condição tratada por ACTH). Da mesma forma, na biblioteca de genes estimulados por ACTH ("A", condição tratada com ACTH, sendo subtraída a condição controle) comparando as raias 7 a 9 (subtraído) com as raias 10 a 12 (controle estimulado não subtraído), observa-se que o gene foi eliminado com altíssima eficiência, sendo possível visualizar apenas uma banda de intensidade fraca após 33 ciclos de amplificação (raia 9). Este resultado nos leva a acreditar que a eficiência foi maior que 8000 vezes (20x20x20), já que a intensidade das bandas subtraídas mesmo após 33 ciclos não se iguala àquela apresentada em 23 ciclos nas condições não subtraídas.

É interessante notar o padrão de bandas apresentado em cada caso. Para cada tratamento, seja com FGF2 ou ACTH, seja para genes estimulados ou subtraídos, o padrão

encontrado foi único, o que leva a acreditar que genes específicos, com tamanho determinado foram amplificados em cada situação (**figuras 16 e 23**). Mais interessante ainda foi perceber que quando foi necessário repetir as etapas de PCR quando algum passo posterior não se mostrava eficaz e era necessário refazer o material, o padrão de bandas era repetido para a condição de interesse.

4.1.1. Clonagem em plasmídeos pUC18

A clonagem em plasmídeos pUC18, comercialmente já linearizado e desfosforilado foi a escolha final para uma etapa na qual foram encontradas dificuldades. Por fim, a clonagem neste vetor resultou em alta eficiência com poucos clones falso-positivos.

A análise do tamanho dos fragmentos por PCR de colônias mostra que, como esperado, a ligação de fragmentos pequenos é bastante eficiente. De fato, apesar de inicialmente ser verificado em gel de agarose que fragmentos de até cerca de 2kb haviam sido selecionados para as duas bibliotecas durante o processo de SSH, foram raros os casos de clones acima de 1kb, sendo que a maioria dos fragmentos clonados não ultrapassava 500pb. Foi feita uma tentativa de clonar apenas seqüências maiores de 500pb, no entanto o número de colônias falso-positivas era bastante elevado, em torno de 60%, e esta abordagem foi suspensa em favor de novos objetivos.

4.1.2. Arranjo dos clones em contigs e anotação das seqüências

Os contigs variaram bastante quanto ao número de fragmentos que agrupam. No caso da biblioteca SSH-FGF2, 327 clones foram distribuídos irregularmente em 59 contigs, onde 20 contigs agrupam apenas 2 fragmentos e 1 contig agrupa 23 fragmentos, como pode ser visto na **figura 20**. Se for tomado como base os 480 seqüenciamentos com um resultado de 212 seqüências diferentes obtidas (59 contigs e 153 singlets), tem-se uma razão de eficiência de 44% (212/480). Se forem levados em consideração apenas os singlets com boa leitura (55), esta razão cai para 24%.

Esta razão pode mostrar-se ainda menor se considerarmos únicas as seqüências repetitivas. O gene *egr1*, por exemplo, aparece em mais de um contig (35 e 52) e ainda como singlet, não sendo este gene um caso isolado. A causa para haver seqüências

representando um mesmo gene que não se alinham pode ser explicada pela digestão com a enzima de restrição RsaI logo no início do procedimento. Assim, algumas seqüências não são capazes de se alinhar e formar um único contig, sendo representada por mais de um tipo de clone.

Para a biblioteca SSH-ACTH, dos 480 clones seqüenciados, 355 foram agrupados em contigs. Neste caso é observado que há maior redundância em relação à outra biblioteca. Nesta, há um contig agrupando 54, outro agrupando 42 "reads". Dentre os clones que formaram os singlets muitos não foram incluídos nos contigs devido à baixa qualidade da reação de seqüenciamento. De fato, apenas 14 clones tiveram similaridade com alguma seqüência depositada no banco de dados internacional (Blast), seja pela baixa qualidade do seqüenciamento ou devido ao tamanho do inserto, muito pequeno para fornecer um resultado de confiança.

Se considerarmos singlets válidos e contigs ($29+14=43$) no número total do seqüenciamento (480) terá uma razão de eficiência de 9%. Se considerarmos únicas as seqüências repetitivas este valor pode cair para algo próximo a 7-8%.

4.1.3. Seleção de clones das bibliotecas SSH-FGF2 e SSH-ACTH por ensaios de Dot Blot e Reverse Northern Blot

A técnica de SSH apesar de ser uma boa forma de identificar genes regulados, como qualquer técnica, não é perfeita e está sujeita a erros e distorções. O resultado da técnica depende da qualidade do mRNA, da eficiência de cada etapa e mesmo do tipo celular e do tratamento. Quando o número de mRNA diferencialmente expressos é reduzido, seja em variedade ou em proporção, o "background" costuma ser mais intenso. Desta forma, é necessário selecionar os clones de maior interesse para que sejam validados.

Em ensaios de reverse northern blot são selecionados como clones positivos aqueles que são marcados apenas na condição-tratamento ("membrana 1") e não na condição-controle ("membrana 2"). Apesar de ser um ensaio bastante comum, este pode resultar na perda dos clones representando genes de baixa expressão, o que é um produto esperado ao final da técnica de SSH.

Uma forma de superar este problema é marcar as membranas com sondas preparadas por SSH: uma membrana é marcada com o produto de genes estimulados submetidos ao SSH(F-K) ("membrana 3"), a outra com o produto de genes inibidos

submetidos a SSH (K-F) ("membrana 4"). Neste caso, é necessário um passo adicional no preparo das sondas, que devem ser submetidas a digestão com enzima de restrição para remover os adaptadores e evitar a marcação inespecífica. Como desvantagem, há maior incidência de falso-positivos (Diatchenko, 1999).

Se as duas metodologias forem usadas, clones regulados que apresentem alto grau de expressão devem ser encontrados marcados nas membranas 1 e 3; enquanto genes estimulados de baixa expressão deveriam ser marcados apenas na membrana 3. Genes que são marcados também nas membranas 2 e 4 representam "background". Um caso de interpretação mais difícil, e que ocorreu com frequência neste trabalho, são aqueles em que os clones são marcados de maneira intensa na membrana 3 e não apresentam marcação na membrana 4, no entanto têm marcação equivalente nas membranas 1 e 2. Segundo os autores da técnica estes casos podem ser formas diferentes de splicing alternativo ou genes pertencentes a famílias gênicas, nestes dois casos havendo compartilhamento de seqüência de nucleotídeos, ou mesmo artefatos do método.

4.2. Microarrays

4.2.1. Microarrays e SSH

O uso combinado de bibliotecas SSH e microarrays tem sido descrito como metodologias complementares de resultados bastante interessantes (Yang, 1999; Villaret, 2000; Seta, 2004).

Cao *et al* (2004) descrevem um estudo em que foi comparado o uso de SSH e de Genechips (Affymetrix). Apesar deste tipo de lâminas ser notável pelo grande número de genes representado, cerca de 25% dos genes encontrados por SSH não estavam representados no chip e, mesmo dentre os representados, muitos não foram capazes de produzir sinal detectável, principalmente no que se refere a mRNAs de baixa expressão.

Possíveis desvantagens que podem ocorrer ao combinar estas metodologias são a má hibridização decorrentes de cDNA muito curtos, menores que 150pb, e cDNA representando porções distantes do mRNA 3', tipos comuns em bibliotecas de SSH, principalmente quando o cDNA marcado é feito com oligo dT, como é o caso neste trabalho.

4.2.2. Desenho experimental

Neste trabalho existe o interesse em distinguir e apontar módulos de controle, bem como selecionar candidatos nestes módulos envolvidos em basicamente três processos biológicos em células tumorais Y1 descritos ao longo dos últimos anos em nosso laboratório. São eles:

- a) Efeito mitogênico de ACTH (Lotfi *et al.*, 1997, 2001);
- b) Disparo mitogênico inicial de FGF2, induzindo saída de G0, progressão em G1 e entrada em S (Lotfi *et al.*, 2000 e 2001, Lotfi e Armelin, 1999, Schwindt *et al.*, 2002);
- c) Disparo de morte celular induzida por FGF2 (bloqueio da progressão na fase S), relacionada com tumores expressando altos níveis de Ki-Ras-GTP (Costa *et al.*, 2004, Costa e Armelin, manuscrito em preparação).

O planejamento dos experimentos de microarray não é uma tarefa simples, principalmente quando envolve mais de um tratamento, ou vários tempos de tratamento que se deseja estudar (Churchill, 2002; Yang & Speed, 2002). Para que seja escolhida a melhor forma de montar os ensaios devem ser consideradas questões como número de lâminas disponíveis; quantidade de material; possibilidade de testar réplicas biológicas; número de condições que se deseja analisar etc.

Neste trabalho havia interesse em analisar uma ampla diversidade de condições. A disponibilidade de lâminas de microarray, bem como a quantidade de células a serem tratadas era praticamente irrestrita, não sendo estes fatores limitantes. Por este motivo optou-se por parear todos os tratamentos à uma mesma referência, no caso, células Y1 carenciadas para soro por 48 horas. Esta é uma forma de facilitar comparações posteriores entre os diferentes tratamentos, já que quaisquer tipos de comparações são obtidos por no máximo dois passos: condição A → controle (K) → condição B. Acredita-se que pontos fundamentais que devem ser considerados quando é feita a opção por uma amostra-referência são a disponibilidade de um modelo estável, homogêneo e em quantidade suficiente para que sejam feitos os experimentos (Churchill, 2002). Como as células Y1 são mantidas em cultura, trata-se de uma fonte praticamente ilimitada de matéria-prima para o trabalho. O uso de amostras de referência é uma prática comum em ensaios de microarray. Geralmente a condição de referência é marcada com um mesmo fluoróforo e todas as condições que se deseja comparar são marcadas com o outro corante. Neste trabalho foi feito uso de "dye-swap" garantindo a possibilidade de separar efeitos técnicos dos efeitos biológicos (Churchill, 2002).

Para evitar que os resultados dos ensaios representassem variações biológicas, independentes da pergunta de interesse foram feitas réplicas biológicas para todos os experimentos. Desta forma, para cada condição testada foram feitas 2 marcações em swap, um total de 4 lâminas de microarray, com amostras biológicas obtidas em extrações diferentes, nas quais as culturas de células encontravam-se em diferentes passagens.

Outra forma de garantir precisão nos resultados encontrados por microarray é a replicação de spots que representam o mesmo clone. Para que sejam obtidos melhores resultados com este tipo de replicata estes spots devem estar separados, de forma que erros sistemáticos decorrentes da "spottagem", hibridização, leitura do scanner, sejam contornados. Foi feita a opção por reduzir o número de clones (reduzir a variedade) dentro do chip aumentando o número de réplicas. Na lâmina desenhada há obrigatoriamente seis representantes para cada clone e, em alguns casos, há mais de uma seqüência representando o mesmo gene, de forma que cada clone apresenta seis spots.

Na **tabela 1** apresentada em Materiais e Métodos observa-se que a condição Y1-K, condição de referência, tem três experimentos, enquanto os demais têm apenas dois experimentos. Isto ocorre porque nesta condição estaríamos analisando a amostra-referência versus ela mesma ou a amostra-referência versus uma amostra equivalente, submetida às mesmas condições de tratamento, obtida em outra extração de RNA. Estes experimentos têm como objetivo analisar a variabilidade intrínseca do sistema, seja em relação à técnica (marcação da mesma amostra nos dois canais) ou ao sistema biológico (marcação de amostras equivalentes).

Na **figura 37** são apresentados os três ensaios "amarelos", ou seja, que foram feitos em condições nas quais todos os spots, em teoria, devem ter marcação equivalente dos cDNAs marcados com Cy3(verde) e Cy5 (vermelho) ficando, portanto, amarelos. Estes ensaios mostram o grau de variação dentro da técnica, que é maior quando são analisadas réplicas biológicas (**figura 37**, esquerda), e não apenas a variação intrínseca do método (**figura 37**, direita).

Com estes ensaios é possível perceber que a variabilidade geral é em torno de 4 vezes (o gráfico está apresentado em log₂), sendo um pouco reduzida quando a variação biológica não é incluída. Embora seja possível encontrar genes "bem-comportados" cuja regulação é bastante firme, outros variam bastante. Neste caso, os resultados encontrados nos experimentos devem ser analisados caso a caso.

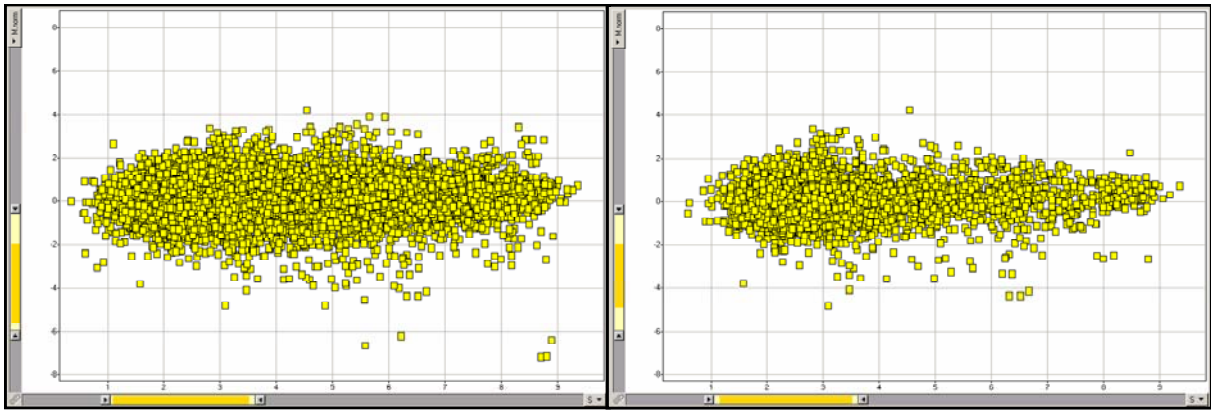


Figura 37: Apresentação de todos os spots do chip quando este é submetido a hibridizações entre amostras referência. Esquerda: três ensaios dos quais 2 são feitos com réplicas biológicas e um com a mesma amostra. Direita: apenas uma hibridização na qual a mesma amostra foi marcada para ser lida nos dois canais.

4.2.3. Determinação dos processos celulares

Ao verificar os genes selecionados e os processos celulares aos quais estes estão vinculados espera-se ter uma projeção do programa que está sendo usado pela célula, responsável por definir seu padrão de comportamento.

Neste trabalho foi usado o KEGG (Kyoto Encyclopedia of genes and genomes) como uma fonte de informação a respeito do processo celular em que o gene está envolvido. Embora este banco de dados represente uma ferramenta interessante, há o inconveniente de não ser capaz de agrupar todos os genes submetidos. Isso ocorre devido à falta de cadastro de boa parte dos genes, ou à falta de conhecimento a respeito do gene; ou ainda à falta de atualização do banco ou a generalizações de famílias de genes.

De acordo com as buscas feitas no KEGG, cerca de 50% dos genes submetidos não foram capazes de entrar na análise dos dados. Um aumento no número de genes pertencentes às vias alteradas ajudaria a compor o quadro e daria maior consistência à descrição. Para condições de estímulo por FGF2 não foram catalogados trinta e cinco genes (54%), enquanto para a condição de inibição não foram considerados dezessete genes (41%).

Observa-se que alguns genes são alocados em mais de um grupo delimitado pelo KEGG. Este fato já era esperado, uma vez que redes de sinalização celular não ocorrem de forma linear e única, mas como uma rede com diversos nós; e também pela

possibilidade de genes de vias de sinalização estarem também presentes em grupos descritivos de processos celulares.

4.2.4. Genes regulados por FGF2

É interessante notar que apesar da biblioteca de SSH estar representada na lâmina de microarray, poucos genes provenientes da biblioteca se mostraram estimulados em ensaios de microarray. Em alguns casos, quando havia além do representante da biblioteca SSH-FGF2 outro representante da biblioteca de ESTs, o sinal era mais forte para o representante da biblioteca do prof. Marcelo Bento Soares, como no caso do gene *egr1*. Este fato pode ser explicado pela forma que cada biblioteca foi construída e a maneira como foi feito o cDNA marcado para ser usado em microarray.

A biblioteca SSH-FGF2 é construída a partir de ESTs submetidos a transcrição reversa e digestão com enzima de restrição RsaI que, por reconhecer apenas quatro pares de bases, é capaz de cortar um único gene em diversas regiões. Desta forma, o fragmento encontrado na biblioteca pode representar tanto a porção 3', próxima à cauda de poly A, como pode representar regiões mais distantes, que teriam maior dificuldade em ser representados por cDNAs marcados a partir de oligo dT. A biblioteca fornecida pelo Prof. Soares, no entanto, foi construída a partir da região da cauda de poly A, favorecendo a representatividade na lâmina uma vez que o cDNA a ser hibridizado também é sintetizado a partir desta região.

De fato, da lista de genes estimulados por FGF2 gerada por SSH e por microarray, apenas nove genes são coincidentes: *egr1*; *bag3*; *cyr61*; *dusp6*; *h2afz*; *h3f3b*; *ifrd1*; *mtvr2*; *psmd1*. O gene *egr2* embora tenha ficado de fora da lista feita com os dados de microarray, tem alteração substancial detectada pelo método (M médio 6,64 para a condição F30 e 3,05 para a condição F2h), no entanto não foi selecionado por não apresentar o mínimo de nove pontos válidos nas duas condições testadas (apenas quatro pontos no estímulo de trinta minutos e sete pontos em estímulos de duas horas). O critério de seleção por número de pontos válidos é uma forma de garantia para aqueles genes de pequena indução/repressão, mas pode acabar gerando falso-negativos. No caso de genes de regulação exacerbada, como é o caso de *egr2*, este tipo de erro é facilmente detectável e possível de corrigir.

Dois genes, *nme2* e *greb1*, apresentam resultados contraditórios, uma vez que são encontrados na biblioteca SSH-FGF2 (que inclui apenas os genes estimulados), e estão

representados na lista de genes inibidos por FGF2, feita a partir dos dados de microarray. Nestes dois casos os dados de microarray indicam um $M_{\text{médio}}$ variando de -0,95 a -1,42 para *greb1* e de -0,21 a -0,47 para *nme2*.

Em tratamentos de FGF2 as principais vias destacadas são, para os genes estimulados, a via de MAPK; a via de ciclo celular; interação entre matriz extracelular (ECM)-receptores e a via de adesão focal. Os genes inibidos estão relacionados a vias de metabolismo (glicólise/gliconeogênese; metabolismo de purina e pirimidina) e a via de transdução de sinal por MAPK.

Como a via de MAPK é a principal via de sinalização descrita para FGF2 já era esperado que houvesse regulação de genes relacionados. É interessante notar que os genes pertencentes a esta via que aparecem em condições de estímulo e inibição são diferentes, sendo capazes de estabelecer condições específicas. Muitos são produtos finais desta via, como os genes da família *jun*, que vão atuar regulando a próxima onda de genes expressos, desta vez, dependentes da síntese protéica. Outros são genes que codificam proteínas de sinalização (*map2k3*, *rac1*) ou mesmo proteínas responsáveis pelo “feedback” negativo da via (*dusp 6*). Os genes *egr1* e *egr2*, embora não tenham sido classificados pelo KEGG em nenhuma via, poderiam ser cadastrados como pertencentes à via de MAPK. Estes genes são induzidos pela via de MAPK (Kaufmann, 2001; deMestre, 2003) e codificam proteínas do tipo “zinc-finger” atuando como fatores de transcrição envolvidos em diversos processos celulares.

Genes relacionados ao controle do ciclo celular indicam que a célula, até então carenciada e, portanto, em G0, começa a se preparar para progredir no ciclo celular. Esta informação é compatível com o que já está descrito pelo laboratório (Armelin, 1999). No entanto, é surpreendente que genes relacionados a vias metabólicas, como glicólise e vias de síntese de nucleotídeos, estejam inibidos. Isso leva a pensar que a célula está reduzindo seu metabolismo, o que seria incompatível com a necessidade de aumento de tamanho, produção de proteínas e ácidos nucléicos, necessários para dar continuidade ao ciclo celular. No entanto, este quadro é compatível com o fenômeno observado recentemente no laboratório de que FGF2 embora estimule a passagem G0→G1→S, paralelamente age bloqueando a conclusão do ciclo nas células Y1.

A via de interação entre matriz extracelular (ECM) e receptores é algo até então inesperado. Embora apenas quatro genes estejam contidos nesta condição, pelo menos um dos genes não classificados pelo KEGG, *cyr61*, poderia ser adicionado a este grupo.

O grupo de adesão focal pode ser relacionado às vias de MAPK e de interação entre ECM-receptores. Alguns genes são comuns às vias de adesão focal e de MAPK (*jun*, *rac1*, *flna*, *pdgfa*), indicando que esta via de sinalização está envolvida no processo

celular. Da mesma forma, os genes *col11a*; *col3a1*, *itga6* estão presentes tanto na via de ECM-receptores quanto na via de adesão focal. Este dado concorda com o padrão morfológico observado em células Y1 tratadas com FGF2. Na **figura 38** é possível observar que após o tratamento de FGF2 as células tornam-se refringentes, como se perdessem a adesão à placa de cultura.

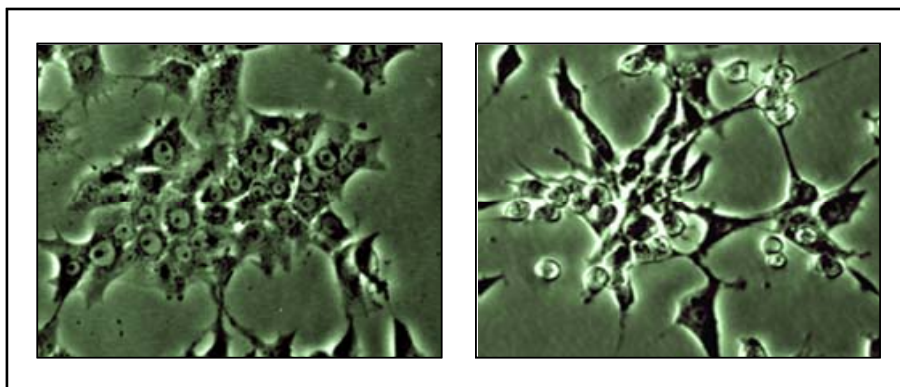


Figura 38: Células Y1 em cultura. Figura à esquerda - controle normal; à direita - células após tratamento de 14 horas de FGF2+soro. Fotos cedidas por Érico T. Costa.

O gene *cyr61*(cystein rich protein 61) é um caso interessante. Este gene aparece tanto na lista de genes estimulados por FGF2 gerada por microarray como na biblioteca SSH-FGF2. Posteriormente este gene foi confirmado por PCR em tempo real, mostrando que se trata de um gene de alta indução.

Este gene de resposta primária pertence a uma família de reguladores de crescimentos (família CCN), codificando uma proteína rica em cisteína, capaz de ligar-se a heparina, uma indicação de que pode associar-se ao heparan-sulfato da matriz extracelular. Embora não tenha sido detectada atividade mitogênica direta, CYR61 parece aumentar a resposta a FGF2 e a PDGF na taxa de síntese de DNA, tanto em fibroblastos como em células endoteliais vasculares (Kireeva, 1996). De fato, o que ocorre é que esta proteína age liberando o FGF2 aderido à matriz celular, aumentando sua disponibilidade à célula (Kolesnikova, 1998). Camundongos "knock-out" para este gene sofrem morte embrionária por má-formação vascular (Mo, 2002), mostrando ser um gene de grande importância durante o desenvolvimento. CYR61 apresenta um sítio de ligação específico para a integrina $\alpha6\beta1$ (*itga6*), interação que parece ser dependente da presença de proteoglicanos do tipo heparan-sulfato (Leu, 2003), como por exemplo, *syndecan 2*. CYR61 está envolvido em diversas funções, tais como migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência e indução ativa de apoptose. Estas funções são iniciadas

com a ligação da proteína a tipos distintos de integrinas, de maneira a desencadear respostas dependentes do tipo celular e do contexto em que se encontra (Todorovic, 2005). Por exemplo, CYR61 é capaz de desencadear apoptose em cultura de fibroblastos, mas não em células endoteliais humanas. Este tipo de resposta é mediado pela adesão específica a integrinas $\alpha\beta1$ e da ligação simultânea com o proteoglicano de heparan-sulfato Syndecan4, disparando a via intrínseca de apoptose, com liberação de citocromo c mitocondrial e ativação das caspase-9 e caspase-3 (Todorovic, 2005).

Desta maneira é formada uma pequena rede entre alguns dos genes expressos em condições de tratamento de FGF2, envolvendo, além dos genes da via de MAPK, principal via de transdução de sinal, os genes *cyr61*, *itga6*, *sdc2*, todos envolvidos em modificações da ECM. É possível ainda incorporar a esta pequena rede o fator de transcrição *egr1* não por apenas por pertencer à via de MAPK, mas por ser necessário para a expressão do gene da heparanase, enzima que cliva heparan-sulfato, facilita a degradação da matriz extracelular e libera os fatores de crescimento ligados a heparan-sulfato (deMestre, 2003; Ogishima, 2005).

4.2.5. Genes regulados por ACTH

Da mesma forma como foi observado para a biblioteca de SSH-FGF2 em relação aos ensaios de microarray, foram poucos os genes selecionados pela técnica de SSH como estimulados por ACTH também encontrados nos ensaios de microarray. De fato, apenas o gene *arhgdia* (Rho GDP dissociation inhibitor) aparece nas duas condições como um gene estimulado.

Ao fazer o agrupamento pelo KEGG vinte e cinco genes da condição de "estimulados por ACTH" (45%) e vinte e seis da condição "inibidos por ACTH" (51%) não foram agrupados.

A via de MAPK mostra-se atuante, com onze genes citados na condição de indução e quatro genes na condição de inibição. Foram encontrados mais genes regulados na via de MAPK do que na via de sinalização por cálcio, o que, de acordo com o mapa fornecido pelo KEGG, seria a via principal de atuação de ACTH. Dentre os genes regulados pertencentes à via de cálcio destacam-se quatro genes induzidos (*camk2*; *cdc25c*; *pdgfrb* e *prkaca*) e dois genes reprimidos (*ryr3* e *avpr1a*).

As informações a respeito de genes envolvidos em vias de transdução não são capazes de determinar as proteínas que levaram o sinal até o ponto de transcrição

gênica, mas estabelecem a alteração nas condições basais de sinalização apresentadas pela célula.

Evidências experimentais de nosso laboratório sugerem que a expressão de fos e jun em células Y1 tratadas com ACTH (western e northern Blot) ocorre por outras vias além das clássicas cAMP/PKA. Um possível mediador destes efeitos seria a ativação das proteínas Mek e ERK1/2 (Le et al., 2001, Lotfi et al., 2000). Nossos dados corroboram esta hipótese quanto à transcrição gênica e sugerem outros membros da via de MAPK mediando os sinais de ACTH.

Mais uma vez são descritos genes de adesão focal atuando em estímulos de ACTH. Esta constatação é corroborada pela observação de que uma hora de tratamento com este hormônio é capaz de induzir alterações morfológicas, tornando as células arredondadas. Este tempo seria suficiente para, após o estímulo, haver transcrição do gene e tradução da proteína, de forma a gerar a resposta celular. Não foram encontrados genes relacionados a síntese de corticóides, uma vez que a regulação da corticogênese ocorre diretamente nas proteínas envolvidas, sendo os genes relacionados transcritos apenas tardiamente (Stocco, 2000).

4.2.5.1. Comparação entre genes regulados por ACTH, FGF e soro

Foram encontrados dez genes que aparecem tanto na tabela de genes induzidos por FGF2 quanto na tabela de estimulados por ACTH: *14-3-3 eta*; *AC097713.3*, *bag3*; *dnatopoA2*; *h3f3b*; *hnrpd*; *man2b1*; *mek3*; *rpd3*; *thioredoxin_1*. Se analisados os genes inibidos que aparecem nos dois casos, são encontrados apenas três: *cdh11*; *hist1h2bc* e *hsp60*. Quanto aos genes que são estimulados por FGF e inibidos por ACTH, são encontrados apenas *col3a1* e *rac1* e, de modo inverso, o único gene que aparece estimulado por ACTH e inibido por FGF é o gene *adprt1*.

Embora este seja um número razoável de genes para iniciar uma comparação, não é possível estabelecer relação direta entre os dois tratamentos uma vez que os processos em que os genes estão envolvidos são muito variáveis, como transdução de sinal, formação de nucleossomo, reparo de DNA, metabolismo de carboidratos, transporte de elétrons etc. Estes genes com regulação semelhante entre ACTH e FGF2 não são capazes de determinar as vias mitogênicas ativadas por ACTH sugeridas por Lotfi e colaboradores (2000) uma vez que o número de genes por processo celular é muito baixo.

A comparação entre o perfil de expressão gênica em tratamentos de ACTH e de soro não foi capaz de desenhar um paralelo claro. O número de genes com padrão de expressão semelhante nos dois tratamentos é pequeno, inviabilizando buscas de processos celulares no KEGG. De fato, estes dados parecem indicar que o perfil de expressão desencadeado por ACTH não se sobrepõe ao perfil de agentes mitogênicos, seja soro ou FGF2.

A título de comparação, o mesmo tipo de busca feita entre tratamentos de soro e FGF2, ambos mitógenos clássicos, encontram 43 genes estimulados em comum, entre eles *fos*, *c-jun*, *junb*; *pdgf*; *egr1*, *dusp6* etc; e 29 genes inibidos, como *dusp8* e *casp6*.

4.2.6. Estímulos antagônicos disparados por tratamentos de FGF2.

Um dos objetivos deste trabalho é sugerir candidatos envolvidos no disparo simultâneo do sinal mitogênico inicial (progressão G0/G1→S) e no bloqueio S→G2 acionados por FGF2 em células tumorais Y1 (Costa *et al.*, 2004). Uma das hipóteses é que estes dois sinais antagônicos são acionados nos FGFRs, mas percorrem caminhos paralelos e disparam processos opostos, havendo prevalência de um dos sinais de acordo com a linhagem observada.

FGF2 ativa vias de sinalização características, como a via de ERK e a via de PI3K/AKT, culminando com a expressão do programa de transcrição responsável pela resposta mitogênica. Estímulos de duas horas são suficientes para levar a maior parte da população celular a entrar em S (Lotfi & Armelin, 2001) e, paralelamente, este tempo de estímulo é capaz de desencadear de forma irreversível a resposta de morte celular programada (Costa e Armelin, dados não publicados). Por esta razão, as análises concentraram-se em estímulos de até duas horas, sendo feito um ponto anterior de coleta, em trinta minutos, para que fosse possível destacar genes que apresentam resposta transcricional rápida, com pico de expressão/inibição anterior a este momento.

De acordo com dados obtidos por Érico T. Costa em seu projeto de doutoramento, a decisão por sobreviver e progredir no ciclo ou por tornar-se inviável é tomada logo no início do tratamento, em até duas horas de estímulo, de forma que estímulos posteriores de soro são incapazes de resgatar uma célula fadada à inviabilidade. A resposta final a FGF2 está intimamente ligada à superexpressão da proteína c-Ki-Ras na sua forma ativa nas células Y1 (c-Ki-Ras-GTP). Na linhagem Ras3.1-N17, clone de Y1 em que é possível

induzir o dominante negativo de Ras (Ha-RasN17), o fenótipo de morte induzida por FGF2 não é observado quando o dominante negativo é ativado.

Quando falamos em tratamentos de morte programada neste trabalho necessariamente estamos falando de tratamentos de FGF2 em células Y1, seja na presença ou ausência de soro.

4.2.6.1. Comparação entre a linhagem parental Y1 e a sub-linhagem Y1-FR3

Em células tumorais Y1 o efeito de indução de morte por FGF2 é observado tanto *in vivo* como em cultura. Este padrão não é observado em clones selecionados a partir de Y1 como resistentes ao efeito de morte induzida por FGF2 como, por exemplo, o clone FR3. Esta sub-linhagem apresenta uma capacidade tumorigênica 50% menor em relação às células parentais e outros fenótipos mais próximos ao de uma linhagem não transformada, discutido a seguir (Costa e Armelin, manuscrito em preparação).

Ao apresentar os dados a respeito de genes induzidos ou reprimidos por FGF2 e por soro nas linhagens Y1 e na sub-linhagem FR3 na forma de diagramas de Venn torna-se evidente o número de genes que são expressos coordenadamente.

É interessante notar que o número absoluto de genes regulados por soro em trinta minutos é bastante semelhante entre as duas linhagens, no entanto se for comparado o número de genes compartilhados, é baixo. Em tratamentos de duas horas o número de genes em comum aumenta 51%, apesar do número total de genes regulados em cada condição sofrer pequena alteração em relação ao tratamento curto: aumento de 11% no número total de genes regulados em Y1 e decréscimo de 9% para a sub-linhagem FR3.

Tratamentos de FGF2 tornam o padrão descrito acima ainda mais evidente. Em tratamentos de FGF2 por trinta minutos o número de genes regulados por FR3 é pequeno, cerca de três vezes menos que o número de genes regulados por Y1. O número de genes pertencentes à intersecção dos conjuntos é de apenas 16, o que representa 6% do total de Y1 e 22% de FR3. Já em duas horas de tratamento esta relação se inverte: o número de genes regulados na sub-linhagem FR3 aumenta 6,5 vezes, enquanto aumenta apenas 1,5 vez para a linhagem Y1. O número de genes compartilhados entre as duas linhagens apresenta um acréscimo consistente de 13,5 vezes, o que indica um quadro de maior semelhança no programa de transcrição ativado naquele momento.

Estas observações remetem aos traços fenotípicos referentes à taxa basal de síntese de DNA e período de G1, característicos de cada linhagem. Como já exposto anteriormente, na sublinhagem FR3 a taxa basal de síntese de DNA, quando carenciadas,

é baixa, em torno de 5%, diferente da linhagem parental, entre 15 -20% (Costa, e Armelin, manuscrito em preparação, e Costa ET, 2005, tese de doutorado). À estas observações soma-se o fato de que o período G1 do ciclo celular da linhagem FR3 dura cerca de 11 horas, semelhante a uma célula normal, enquanto Y1 apresenta apenas 8-9 horas.

O conjunto destas observações é uma indicação de que a linhagem FR3 apresenta um ganho fenotípico no que diz respeito ao controle do ciclo celular. O aumento no número de genes compartilhados em tratamentos por soro ou FGF2 em duas horas indica que esta célula está "atrasada" em relação à linhagem parental. Sob outro prisma, a resposta imediata da linhagem Y1 a estímulos externos poderia ser explicada pela via de transdução de sinal de c-Ki-Ras constitutivamente ativa, que levaria à síntese basal de proteínas necessárias à transcrição. A sub-linhagem FR3, apesar de apresentar níveis semelhantes de c-Ki-Ras ativado (c-Ki-Ras-GTP) deve possuir alterações a jusante desta proteína.

4.2.6.2. Genes relacionados a estímulo mitogênico e morte celular programada

Nesta etapa do trabalho foram usadas duas abordagens para a análise dos genes relacionados ao controle de proliferação e morte celular. A primeira abordagem, mais simples, consistia em verificar os genes de expressão regulada presentes na condição de morte celular programada, ausentes na condição de estímulo mitogênico. Esta análise foi feita por meio de comparações entre os valores calculados das probabilidades de expressão de cada gene, utilizando, para isso, o banco de dados Access. A segunda abordagem, mais elaborada, foi a análise de correlação de Pearson, na qual são delimitados grupos de genes cujos padrões de expressão são bastante semelhantes nas diversas amostras. Estas duas metodologias de análise têm como base as probabilidades de expressão calculadas previamente e usam os dados fornecidos pelo banco de dados de vias metabólicas e processos celulares KEGG como um auxiliar na interpretação dos resultados da análise.

De acordo com a primeira abordagem, ao verificar os genes com padrão de expressão alterados em condição de morte percebe-se que há regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular, um indicativo que células até então carenciadas e, portanto, em G0/G1, estão se preparando para iniciar o ciclo.

Foi possível observar que o disparo do sinal de morte programada, iniciado nos receptores de FGF2 em células Y1, desencadeia a expressão gênica de uma série de

reguladores de adesão celular, além de outros genes responsáveis pela estrutura da célula. Todo este processo parece depender da via de sinalização de MAPK, havendo indícios de ativação de vias alternativas, como a via reguladora de desenvolvimento e proliferação de Wnt, com quatro genes destacados durante a primeira análise: *b-catenina*, *jun*, *rac1* e *mapk9*. Esta via torna-se ativa após a ligação do fator de crescimento (Wnt) a receptores extracelulares, desencadeando uma cascata que termina por aumentar os níveis intracelulares de b-catenina no citoplasma. Esta proteína não apenas é responsável por ligar caderinas a actinas nas junções aderentes, mas também por formar um complexo de transcrição com o fator LEF1 na via de sinalização de wnt, sendo um exemplo de proteína estrutural agindo na sinalização celular.

Uma informação obtida no cluster "61" que não havia sido observada até então é o envolvimento de genes de apoptose (*bad*, *dax*, *fadd*). Estes três genes estão envolvidos em processos apoptóticos extrínsecos, no qual um fator externo é capaz de ligar-se a receptores específicos e ativar uma cascata de sinalização que culmina por ativar as caspases 9 e 3 e, por fim, desencadear apoptose. Esta via, no entanto, é inibida pela proteína AKT em seu estado ativado (fosforilada, AKT-P) que, além de exibir níveis basais em células Y1 é aumentada por tratamentos de FGF2 e soro. Esta observação parece um reflexo do equilíbrio homeostático, resultado da intrincada rede de sinalização responsável por determinar a resposta final da célula.

O grande número de genes envolvidos em adesão focal, regulação de citoesqueleto, interação ECM-receptor e junções intercelulares são indicativos de que a resposta de morte celular induzida por FGF2 pode ser um processo dependente de proteínas presentes na ECM, provavelmente regulado por integrinas.

Células normais necessitam de um substrato sólido para crescer, enquanto células tumorais, a exemplo de Y1, são capazes de crescer em suspensão. Atualmente são conhecidos pontos de checagem capazes de verificar o estado de adesão celular, permitindo ou bloqueando a progressão no ciclo celular. Tanto receptores de tirosina quinase quanto integrinas agem por vias específicas, regulando a via de MAPK, de PI3K e RhoGTPases (**figura 39**).

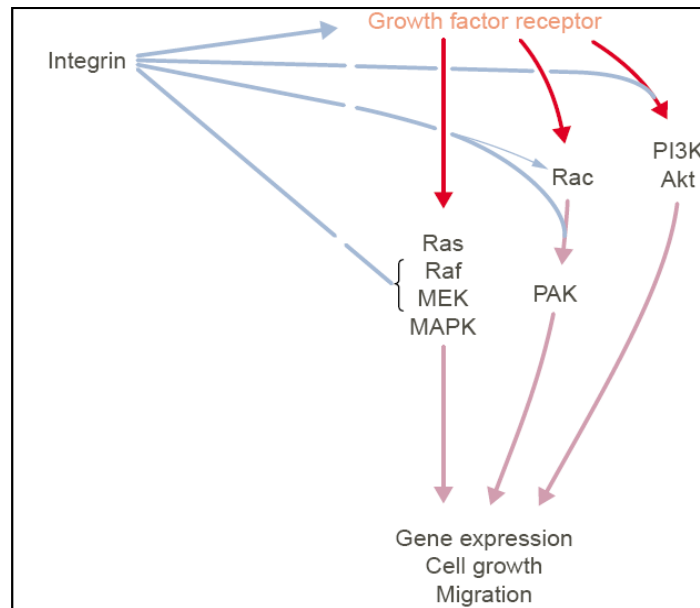


Figura 39: Interações entre vias de transdução de sinal que são reguladas por integrinas e por receptores de fatores de crescimento (Assoian, 2001).

O conjunto de observações neste trabalho sugere que o tratamento de FGF2 além de disparar o clássico processo mitogênico pelo qual este fator é conhecido, é capaz de interceder a jusante de RAS, por uma via distinta, recuperando o controle do ciclo celular na linhagem Y1, o que termina por inviabilizá-la. Esta função parece ser desempenhada ao restabelecer o complexo de adesão focal, bem como componentes de matriz extracelular e citoesqueleto. A linhagem FR3, revertente de Y1 quanto ao fenótipo de morte induzida por FGF2, parece ter um ganho de função neste sentido, de forma que tratamentos de FGF2 deixam de induzir a morte, mas continuam a induzir divisão celular.

O processo pelo qual FGF2 induz a linhagem Y1 à morte ainda é uma incógnita. As vias apoptóticas estão bloqueadas devido à super-expressão de Ras-GTP e, conseqüente, ativação basal da proteína antiapoptótica AKT. Embora alguns genes relacionados a esta via sejam destacados nas análises estatísticas, isto parece mais um indício de equilíbrio da complexa rede que determina a resposta final da célula.

5. Conclusões

1) O padrão de expressão gênica da linhagem celular Y1 em condições de tratamento por ACTH não se assemelha ao padrão encontrado quando esta mesma linhagem é tratada com mitógenos clássicos como FGF2 ou soro.

2) O tratamento de FGF2 regula genes envolvidos na via de MAPK (dusp6, mek3, h-ras), fatores de transcrição e controle do ciclo celular (cjun, junb, egr1, egr2) e genes relacionados a processos de adesão, comunicação intercelular e remodelagem de citoesqueleto (cyr61, vimentina, desmina, integrina alfa6, tenascinR).

3) O comportamento de morte induzida por FGF2 está relacionado a alterações na estrutura da célula, envolvendo mecanismos de adesão e remodelagem de citoesqueleto, envolvendo genes como integrinas alfa 6 e beta5, caveolina, rac1 e cdc42.

6. Referências Bibliográficas

6.1. Livros

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3rd Edition New York. Garland Publishing Inc.

Cooper GM. 2000. *The Cell - A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.

Lewin B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W.H. Freeman & Co.

Nussey SS and Whitehead SA. 2001. *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford, UK.: BIOS Scientific Publishers, Ltd.

Guyton AC and Hall JE. 1996. *Textbook of Medical Physiology*. W.B. Saunders Company. 9th Edition .

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

6.2. Artigos

Almendral JM, Sommer D, Macdonald-Bravo H, Burckhardt J, Perera J, Bravo R. 1988. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 8(5):2140-8.

Arias-Salgado EG, Lizano S, Shattil SJ, Ginsberg MH. 2005. Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 280(33):29699-707.

Armelin, HA 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70(9):2702-6

Armelin HA, Lotfi, CF. 1999. Control of the adrenocortical cell cycle: interaction between FGF2 and ACTH. *Braz J Med Biol Res*. 32(7):841-3.

Assoian RK, Schwartz MA. 2001. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev*. 11(1):48-53.

Bicknell AB, Lomthaisong K, Woods RJ, Hutchinson EG, Bennett HP, Gladwell RT, Lowry PJ. 2001. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell*. 105(7):903-12.

Bicknell AB. 2002. Identification of the adrenal protease that cleaves pro-gamma-MSH: the dawning of a new era in adrenal physiology?. *J Endocrinol*. 172(3):405-10.

Bossard C, Laurell H, Van den Berghe L, Meunier S, Zanibellato C, Prats H. 2003. Translokín is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nat Cell Biol*. (5):433-9.

Bransome ED Jr. 1968. Regulation of adrenal growth. Differences in the effects of ACTH in normal and dexamethasone-suppressed guinea pigs. *Endocrinology*. 83(5):956-64.

Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K. 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol*. (6):630-4.

Brenner S, Williams SR, Vermaas EH, Storck T, Moon K, McCollum C, Mao J, Luo S, Kirchner JJ, Eletr S, DuBridge RB, Burcham T, Albrecht G. 2000. In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(4):1665-70.

Bustin, SA 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 25(2):169-93.

Cao W, Epstein C, Liu H, DeLoughery C, Ge N, Lin J, Diao R, Cao H, Long F, Zhang X, Chen Y, Wright PS, Busch S, Wenck M, Wong K, Saltzman AG, Tang Z, Liu L, Zilberstein A. 2004. Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics*. 5(1):26.

Churchill GA. 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet*. 32 Suppl:490-5.

Cleveland WS, 1979. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. *J. Amer. Stat. Assoc*. 74, 829–836

Costa ET, Forti FL, Rocha KM, Moraes MS, Armelin HA. 2004. Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. *Endocr Res*. 2004 (4):503-9.

Costa ET. 2005. Ações antagônicas de FGF2 em células tumorais de camundongo: disparo de mitogênese e de morte celular. Tese de doutorado, Instituto de Química-USP.

Dailey L, Ambrosetti D, Mansukhani A, Basilico C. 2005. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):233-47

Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukianov S, Lukianov K, Gurskaya NG, Sverdlov ED, Siebert PD. 1996. Suppression subtractive

hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (93) 6025-30.

Diatchenko L, Lukianov S, Lau YFC, Siebert PD. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* (303) 349-80.

Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* (1 Suppl):10-4.

Estivariz FE, Iturriza F, McLean C, Hope J, Lowry PJ. 1982. Stimulation of adrenal mitogenesis by N-terminal proopiomelanocortin peptides. *Nature.* 297(5865):419-22.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell.* 33(2):389-96

Ewing B, Hillier L, Wendl M, Green P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8:175-185.

Ewing B, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8(3):186-94.

Fernig DG, and Gallagher JT. 1994. Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair. *Prog. Growth Factor Res.* 5:353-377.

Forti FL, Armelin HA. 2000. ACTH inhibits A Ras-dependent anti-apoptotic and mitogenic pathway in mouse Y1 adrenocortical cells. *Endocr Res.* 26(4):911-4.

Forti FL, Schwindt TT, Moraes MS, Eichler CB, Armelin HA. 2002. ACTH promotion of p27(Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation. *Biochemistry.* 41(31):10133-40.

Gordon D, Abajian C, Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8(3):195-202.

Guadagno TM, Assoian RK. 1991. G1/S control of anchorage-independent growth in the fibroblast cell cycle. *J Cell Biol.* 115(5):1419-25.

Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, Siebert PD, Khaspekov GL, Lukianov KA, Vagner LL, Ermolaeva OD, Lukianov AS, Sverdlov ED. 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Analytical Biochemistry* (240) 90-97.

Herschman HR. 1991. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem.* 60:281-319.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10(4):413-7

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11(9):1026-30

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(16):7276-80.

Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*. 28(1):27-30.

Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*. 432(7015):316-23.

Kaufmann K, Bach K, Thiel G. 2001. The extracellular signal-regulated protein kinases Erk1/Erk2 stimulate expression and biological activity of the transcriptional regulator Egr-1. *Biol Chem*. 382(7):1077-81.

Keresztes M, Boonstra J. 1999. Import(ance) of growth factors in(to) the nucleus. *J Cell Biol*. 145(3):421-4.

Kimura E, Sonobe MH, Armelin MC, Armelin HA. 1993. Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester but not by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives. *Mol Endocrinol*. (11):1463-71.

Kireeva ML, MO FE, Yang GP, Lau LF. 1996. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol*. 16(4):1326-34.

Koide T, Salem-Isacc SM, Gomes SL, Vêncio RZN. 2005. SpotWhatR: an user-friendly microarray data analysis system. *Genetics and Molecular Research*. *no prelo*.

Kolesnikova TV, Lau LF. 1998. Human CYR61-mediated enhancement of bFGF-induced DNA synthesis in human umbilical vein endothelial cells. *Oncogene*. 16(6):747-54.

Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*. 5(10):773-85.

Le T & Schimmer BP. 2001. The regulation of MAPKs in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Endocrinology*. 142(10):4282-7.

Lepique AP, Forti FL, Moraes MS, Armelin HA. 2000. Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocr Res*. 26(4):825-32.

Lepique AP, Moraes MS, Rocha KM, Eichler CB, Hajj GN, Schwindt TT, Armelin HA.. 2004. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol*. 33(3):623-38.

Leu SJ, Liu Y, Chen N, Chen CC, Lam SC, Lau LF. .2003. Identification of a novel integrin alpha 6 beta 1 binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61). *J Biol Chem.* 278(36):33801-8.

Liang P, Pardee AB. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 257(5072):967-71.

Lin TH, Chen Q, Howe A, Juliano RL. 1997. Cell anchorage permits efficient signal transduction between ras and its downstream kinases. *J Biol Chem* 271 (36):22280.

Lotfi CF, Armelin HA. 2001. cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Endocrinol.*168(3):381-9.

Lotfi CF, Lepique AP, Forti FL, Schwindt TT, Eichler CB, Santos MO, Rebutini IT, Hajj GNM, Juliano L, Armelin HA. 2000. Proliferative signalling initiated in the ACTH receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* (33) 1133-1140.

Lotfi CF, Todorovic Z, Armelin HA, Schimmer BP. 1997. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem.* 272(47):29886-91.

Maher P, 1996. Nuclear Translocation of Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptors in Response to FGF-2. *J Cell Biol.* 134(2):529-36.

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

de Mestre AM, Khachigian LM, Santiago FS, Staykova MA, Hulett MD. 2003. Regulation of inducible heparanase gene transcription in activated T cells by early growth response 1. *J Biol Chem.* 278(50):50377-85.

Miranti CK, Brugge JS. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol.* (4):E83-90.

Miranti CK, Ohno S, Brugge JS. 1999. Protein Kinase C Regulates Integrin-induced Activation of the Extracellular Regulated Kinase Pathway Upstream of Shc. *J Biol Chem.* 274(15):10571-81.

Mikulits W, Dolznig H, Hofbauer R, Mullner EW. 1999. Reverse strand priming: a versatile cDNA radiolabeling method for differential hybridization on nucleic acid arrays. *Biotechniques.* (5):846-7, 850.

Mo FE, Muntean AG, Chen CC, Stolz DB, Watkins SC, Lau LF. 2002. CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity. *Mol Cell Biol.* 22(24):8709-20.

Mohammadi M, Olsen S, Ibrahimi O. 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev.*16(2):107-37.

O'Connell MJ, Cimprich KA. 2005. G2 damage checkpoints: what is the turn-on? *J Cell Sci.* 118(Pt 1):1-6.

Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, Li LC, Kawakami T, Urakami S, Ribeiro-Filho LA, Terashima M, Fujime M, Igawa M, Dahiya R. 2005. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 11(3):1028-36.

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 271 (25):15292-7.

Pardee AB. 1974. A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71(4):1286-90.

Pardee AB. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science.* 246(4930):603-8.

Pavletich NP. 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk2s, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* 287(5):821-8

Prats H, Kaghad M, Prats AC, Klagsbrun M, Lelias JM, Liauzun P, Chalon P, Tauber JP, Amalric F, Smith JA, et al 1989. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86(6):1836-40.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.

Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* 32 Suppl:496-501.

Rao AJ, Long JA, Ramachandran J. 1978. Effects of antiserum to adrenocorticotropin on adrenal growth and function. *Endocrinology.* 102(2):371-8.

Rocha KM, Forti FL, Lepique AP, Armelin HA. 2003. Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: roles of ACTH. *Microsc Res Tech.* 61(3):268-74.

Rocks O, Peyker A, Kahms M, Verveer PJ, Koerner C, Lumbierres M, Kuhlmann J, Waldmann H, Wittinghofer A, Bastiaens PI. 2005. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science.* 307(5716):1746-52.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 270(5235):467-70.

Schlessinger, J. 2003. Autoinhibition Control . *Science.* (300)750-752.

Seta KA, Millhorn DE.. 2004. Functional genomics approach to hypoxia signaling. *J Appl Physiol.* 96(2):765-73.

Sherlock G. 2001. Analysis of large-scale gene expression data. *Brief Bioinform.*(4):350-62.

- Sherr CJ, Roberts JM. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*13(12):1501-12.
- Sherr CJ, Roberts JM. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*18(22):2699-711
- Stocco DM. 2000. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim Biophys Acta.* 1486(1):184-97.
- Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. 2004. Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 228(1-2):23-38
- Sorkin A, von Zastrow M. 2002. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology.* (3):600-614.
- Todorovicc V, Chen CC, Hay N, Lau LF. 2005. The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol.* 171(3):559-68.
- Vagner S, Touriol C, Galy B, Audigier S, Gensac MC, Amalric F, Bayard F, Prats H, Prats AC. 1996 . Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J Cell Biol.*135(5):1391-402
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science.* 270(5235):484-7.
- Verma R, Feldman RM, Deshaies RJ. 1997. SIC1 is ubiquitinated in vitro by a pathway that requires CDC4, CDC34, and cyclin/CDK activities. *Mol Biol Cell.* 8(8):1427-37.
- Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, Reed SG. 2000. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope.*110:374-81
- Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO, Weigel RJ. 1999 . Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res.* 27(6):1517-23.
- Yang YH, Speed T. 2002. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet.* 8:579-88.
- Yasumura Y, Buonassissi Y, Sato G. 1966. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Research* 26:529-535.

6.3. Endereços de consulta na Internet

www.phrap.org

www.ncbi.nlm.nih.gov/blast

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene

Pfam.wustl.edu

www.ebi.ac.uk/clustalw/

www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/orderonline_handbo

oks (microarray handbook)

dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html

www.kegg.com/kegg/tool/color_pathway.html

sekhon.polisci.berkeley.edu/stats/html/lowess.html

CURRICULUM VITAE

Dados pessoais

Nome: Paula Fontes Asprino

Nascimento: 13 de novembro de 1978, São Paulo

Estado civil: solteira

Formação

- Ensino Médio na área de Biológicas - Colégio Bandeirantes (1993-1995)
- Graduação em Ciências Biológicas – USP (1996-1999)
- Iniciação científica, Instituto de Química - USP (1998-2000)

Título do projeto: Efeitos de ACTH em células AR1 transfectadas com o receptor de ACTH: crescimento celular, estimulação da adenilato ciclase e da proteína c-FOS. Orientador: Prof. Dr. Hugo A. Armelin, co-orientador: Dr.Fábio L. Forti - Bolsa FAPESP

- Licenciatura em Biologia - USP (1999-2005)
- Doutorado, Instituto de Química - USP (2000–2006)

Título do projeto: Análise de expressão gênica por microarrays de cDNA em linhagens de células adrenais tumorigênicas tratadas com FGF2 e ACTH. Orientador: Prof. Hugo Aguirre Armelin - Bolsa FAPESP.

Ocupação

Analista no laboratório de análises clínicas Fleury

Comunicações em congressos

- Sociedade Brasileira de Bioquímica e biologia molecular, SBBq, 2003. XXXII Encontro Anual “Cloning and Characterization of genes induced by FGF2 and ACTH in mouse adrenocortical Y1 cell line.”
- Comunicação Livre no XXXII Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e biologia molecular, SBBq, 2003. “Cloning and Characterization of genes induced by FGF2 and ACTH in mouse adrenocortical Y1 cell line.”
- VI Congresso do Departamento de Bioquímica Instituto de Química – Universidade de São Paulo - 2003. “Clonagem e caracterização de genes induzidos por FGF2 (fibroblast growth factor 2) e ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) em células Y1 de camundongo”.
- Sociedade Brasileira de Bioquímica e biologia molecular, SBBq, 2002. XXXI Encontro Anual “Cloning and Characterization of genes induced by FGF2 and ACTH in mouse adrenocortical Y1 cells.”
- Sociedade Brasileira de Bioquímica e biologia molecular, SBBq, 2000. XXIX Encontro Anual “Expression of ACTH receptor into AR1 cells”.

Experiência didática

- Preparo e aplicação do curso “Bioquímica da Beleza” para alunos da graduação da USP (14 a 18 fevereiro/05)
- Participação no programa P.A.E. – monitoria em bioquímica para alunos de Ciências Biológicas-USP (2000)