

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**EFEITO BIOLÓGICO DA PROTEÍNA PENTRAXINA 3 SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

Aluno: Octávio Mangabeira Sobrinho

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Abalen Martins Dias

BELO HORIZONTE

Agosto 2016

OCTÁVIO MANGABEIRA SOBRINHO

**EFEITO BIOLÓGICO DA PROTEÍNA PENTRAXINA 3 SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E FISIOLÓGICAS DE
CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Adriana Abalen Martins Dias

BELO HORIZONTE

Agosto 2016

DEDICATÓRIA

A minha querida avó Maria Antonieta Corrêa que sempre me apoiou nos estudos e foi um grande exemplo de mulher guerreira e vitoriosa.

AGRADECIMENTOS

Nessa longa e difícil caminhada de dois anos tenho muitas pessoas a agradecer, mas primeiramente gostaria de agradecer ao meu DEUS que me fortaleceu em todos os momentos difíceis dessa jornada e que me trouxe a vitória no final.

Ao meu SENHOR JESUS CRISTO, por ter pagado na cruz o preço dos meus pecados e por ter morrido em meu lugar.

A minha querida avó, Maria Antonieta Corrêa, que sempre me mostrou a importância do estudo na vida de uma pessoa e que foi um grande exemplo de mulher vitoriosa e guerreira que lutou até o fim de sua vida.

A minha esposa, Roslaine Barbosa Mangabeira, que soube compreender minhas ausências e falta de tempo e que sempre esteve ao meu lado me acalmando nos momentos difíceis e me dando forças e motivando sempre em que não via mais esperança.

A Dra. Adriana Abalen Martins Dias, por ter me acolhido e confiado no meu trabalho, mesmo sem me conhecer. Obrigado por todos os conselhos, orientações e puxões de orelha e pela enorme paciência e compreensão nessa reta final. Um grande exemplo de profissional, pesquisadora, capacidade intelectual e bom humor.

Aos companheiros de laboratório Priscila Fabiana, Flávia Santiago, Bárbara Kunzmann e João Paulo Nunes por toda a ajuda nesse trabalho e pelos momentos de descontração. Em especial, o meu muito obrigado ao aluno de doutorado João Paulo Nunes que me orientou em todas as etapas dos meus experimentos, desde o seu planejamento até a sua realização.

A Dra. Cecília Garlanda do Instituto Humanitas na Itália, por gentilmente ter nos doado a proteína PTX3 recombinante humana, o que viabilizou o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Jonatas Abrahão, Erna Geessien, Cláudio Bonjardim, Giliane Trindade e Paulo César Ferreira do Laboratório de Vírus pela confiança em nós depositada através da permissão do livre acesso e uso do laboratório de vírus para realizarmos a cultura de células, base desse trabalho.

À professora Maria Bernadete Lovato do Laboratório de Genética de Populações e ao professor Eduardo Martin Tarazona Santos do Laboratório de Diversidade Genética Humana pela permissão do uso dos equipamentos do seu laboratório.

À professora Diana Bahia, pela doação dos reagentes para os ensaios de imunofluorescência.

À professora Maria Raquel Santos Carvalho por ceder gentilmente a infraestrutura do Laboratório de Genética Humana e Médica. A aluna de doutorado Aline Aparecida Silva Martins pela ajuda no fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida.

Ao professor Vasco Azevedo pelo uso da plataforma ABI 7900 HT Real Time PCR.

Ao professor Álvaro Cantini Nunes e a professora Elaine Maria Souza Fagundes pela infraestrutura de seus laboratórios e por ter aceitarem gentilmente compor a minha banca de defesa, contribuindo com este trabalho.

Aos alunos Jonas Pereira Ramos e Pedro Dias, pela contribuição e discussão nos experimentos de citometria de fluxo.

A técnica responsável pelo centro de Citometria, Daniela Reis, pela ajuda no uso do citômetro BD FACScanTM e pelas valiosas discussões sobre ensaios de citometria de fluxo.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Genética, Ana Lúcia Brunialti Godard e Evanguedes Kalapothakis pela coordenação.

As secretárias da pós-graduação, Mary das Graças e Enaile pelos serviços prestados.

A todos os funcionários do ICB e UFMG.

As agências de fomento, FAPEMIG, PRPq, CNPQ e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pelo auxílio financeiro que permitiu o desenvolvimento deste trabalho. Em especial a CAPES, financiadora da minha bolsa.

Muito obrigado a todos!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	i
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1 Introdução.....	10
1.1 Família das Pentraxinas.....	10
1.2 Pentraxina 3 (PTX3).....	12
1.3 Ligantes e funções de PTX3.....	16
1.4 Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGFs).....	18
1.4.1 Família dos Fatores de Crescimento de Fibroblastos.....	18
1.5 Interação entre PTX3 e os FGFs.....	19
1.6 Pentraxinas e seus efeitos sobre o ciclo celular e a apoptose.....	20
1.7 O Ciclo Celular.....	21
1.7.1 TP53.....	22
1.7.2 CDKN1A ou p21.....	23
1.7.3 MYC.....	23
1.8 Apoptose.....	24
1.8.1 Vias de Sinalização da Apoptose.....	25
1.8.2 Via extrínseca.....	25
1.8.3 Via intrínseca.....	26
1.8.4 Proteínas reguladoras da apoptose.....	27
1.8.4.1 BAX.....	27
1.8.4.2 BCL2.....	28
2 Relevância e Justificativa.....	29
3 Objetivos.....	30
3.1 Objetivo Geral.....	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 Material e Métodos.....	31
4.1 Proteína PTX3 recombinante humana.....	31
4.2 Cultura de células.....	31
4.3 Análises Morfológicas.....	32

4.4 Ciclo Celular.....	33
4.4.1 Avaliação da parada no ciclo celular por citometria de fluxo.....	33
4.5 Análise da Expressão Gênica.....	34
4.5.1 Extração de RNA.....	34
4.5.2 Transcrição Reversa.....	35
4.5.3 Construção e análise dos iniciadores específicos.....	36
4.5.4 Análise da Expressão Gênica Basal por RT-PCR.....	36
4.5.5 Avaliação da alteração do perfil de expressão gênica por RT-qPCR.....	37
4.6 Análises estatísticas.....	38
5 Resultados.....	39
5.1 Construção e análise dos iniciadores.....	39
5.2 Análise da expressão gênica basal por RT-PCR.....	39
5.3 Extração, quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA total.....	44
5.4 Síntese de cDNA e avaliação da transcrição reversa.....	45
5.5 Análise do perfil de expressão gênica por RT-qPCR.....	46
5.6 Avaliação da parada no ciclo celular por citometria de fluxo.....	49
5.7 Análises Morfológicas.....	54
6 Discussão.....	58
7 Síntese dos Resultados.....	63
8 Conclusão.....	64
9 Perspectivas.....	64
10 Referências Bibliográficas.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	Actina beta
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Pares de bases
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CDK	Quinase dependente de ciclina
CKI	Inibidor de quinase dependente de ciclina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CHO	Óvulo de hamster chinês
CO₂	Dióxido de carbono
CRP	Proteína C reativa
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal
DAPI	Cloridrato de 4',6-diamindino-2-fenilindol
DC	Células dendríticas
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecos's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FGF8	Fator de crescimento de fibroblasto 8
FGFR	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HCL	Ácido Clorídrico
HPRT1	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
HSPG	Proteoglicanos heparan sulfatados
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IP	Iodeto de Propídio
kDa	Quilo Dalton
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate assay</i>
LGEX	Laboratório de Genética Experimental
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaN₃	Azida Sódica
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
N-terminal	Extremidade amino-terminal
NFkB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NP2	Pentraxina neural 2
NPR	Receptor de pentraxina neural
OmpA	Domínio protéico conservado encontrado na região C-terminal da outer membana de muitas bactérias Gram negativas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PGN	PBS contendo 0,25% gelatina e 0,1% NaN ₃
PPD	p-fenilenodiamina
PTX3	Pentraxina 3
PTX4	Pentraxina 4
qPCR	PCR quantitativa
q.s.p	Quantidade suficiente para
rhPTX3	Pentraxina 3 recombinante humana
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa

SAP	Proteína soro-amilóide
SFB	Soro Fetal Bovino
TAE	Tris-acetato-EDTA
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa
TRICT	Tetrametilrodamina B isotiocianato
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSG-14	<i>TNF stimulated gene 14</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
µg	Micrograma
µl	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais representantes da família das pentraxinas curtas e longas	10
Figura 2	Estrutura do gene de PTX3 em humanos e camundongos	13
Figura 3	Estímulos para a produção e principais funções biológicas de PTX3	14
Figura 4	Modelo proposto da proteína PTX3	15
Figura 5	Esquema representativo do ciclo celular em células somáticas	22
Figura 6	Alterações morfológicas durante a apoptose	25
Figura 7	Processos desregulados da apoptose que contribuem para a carcinogênese	26
Figura 8	Vias de sinalização da apoptose	28
Figura 9	Análise da expressão gênica basal de BAX, BCL2, MYC, TP53, CCND1 e CDKN1A nas linhagens tumorais HCT-116, SK-MEL-37 e SK-MEL-188	40
Figura 10	Reações de PCR para o gene CDKN1A mediante ao tratamento com LPS (100 µg/ml) por 4 horas na linhagem tumoral HCT-116	41
Figura 11	Otimização das reações de PCR para amplificação do gene CDKN1A variando as temperaturas de anelamento	42
Figura 12	Otimização das reações de PCR utilizando DMSO 1%.	42
Figura 13	Reações de PCR com DMSO 1% e variadas concentrações de MgCl ₂	43
Figura 14	Reações de PCR com os novos iniciadores específicos para CDKN1A	44
Figura 15	Análise da integridade do RNA total extraído das linhagens SK-MEL-37 e HCT-116	45
Figura 16	Controle da qualidade do cDNA sintetizado das linhagens SK-MEL-37 e HCT-116 tratadas ou não com rhPTX3	46
Figura 17	Curvas de dissociação dos iniciadores para otimização das reações de RT-qPCR.	47
Figura 18	Análise do efeito de rhPTX3 na expressão dos genes normalizadores GAPDH, HPRT1 e ACTB na linhagens HCT-116 e SK-MEL-37	48
Figura 19	Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-MEL-37	48
Figura 20	Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de HCT-116	49
Figura 21	Análise do efeito da privação com 0,5% SFB por 18 horas sobre a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular a linhagem HCT-116	50

Figura 22	Efeito da privação com 0,5% SFB por 24 horas sobre a porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular da linhagem SK-MEL-37	51
Figura 23	Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 por 24 e 48 horas sobre a porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular da linhagem HCT-116	52
Figura 24	Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 por 24 e 48 horas sobre a porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular da linhagem SK-MEL-37.	53
Figura 25	Fotomicrografias de fluorescência da linhagem HCT-116	55
Figura 26	Fotomicrografias de fluorescência dos grupos controle e tratado rhPTX3 da linhagem HCT-116	56
Figura 27	Análise do efeito de rhPTX3 no número de lamelipódios na linhagem HCT-116	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros utilizados para a construção dos iniciadores	36
Tabela 2	Lista dos iniciadores construídos e utilizados nas reações de RT-PCR e RT-qPCR para análise da expressão gênica	39
Tabela 3	Expressão gênica basal de BAX, BCL2, MYC, CDKN1A, TP53 e CCND1 nas linhagens tumorais HCT-116, SK-MEL-37 e SK-MEL-188	41
Tabela 4	Iniciadores construídos e utilizados na reação de RT-qPCR para a análise da expressão gênica de CDKN1A	43
Tabela 5	Parâmetros quantitativos e qualitativos do RNA total extraído da linhagem SK-MEL-37 tratado ou não com rhPTX3	44
Tabela 6	Parâmetros quantitativos e qualitativos do RNA total extraído da linhagem HCT-116 tratado ou não com rhPTX3	45
Tabela 7	Parâmetros otimizados para cada par de iniciadores para RT-qPCR dos genes listados	47
Tabela 8	Quantificação das alterações das estruturas do citoesqueleto de actina da linhagem HCT-116 tratadas com rhPTX3 nos tempos de 12, 24 e 48 horas	57
Tabela 9	Quantificação das alterações das estruturas do citoesqueleto de actina da linhagem SK-MEL-37 tratadas com rhPTX3 nos tempos de 12, 24 e 48 horas.	57

RESUMO

A pentraxina 3 é uma glicoproteína de fase aguda que exerce funções essenciais na imunidade inata, controle da inflamação, deposição de matriz e na fertilidade feminina. PTX3 liga-se, com grande afinidade e especificidade, aos Fatores de Crescimento de Fibroblasto do tipo 2 e 8, inibindo a proliferação celular e angiogênese promovida por esses e, consequentemente, o crescimento de tumores de próstata e mama murinos. Foi demonstrado que outros membros da família da pentraxinas, como a proteína C Reativa e a Pentraxina Neuronal 2, induzem a apoptose e parada no ciclo celular em monócitos e células de câncer pancreático humanos, respectivamente. A hipótese deste trabalho é a de que a ação inibitória da Pentraxina 3 sobre a progressão de tumores não é apenas decorrente do seu papel como antagonista natural dos FGFs, mas também de sua capacidade de promover parada no ciclo celular e o aumento da apoptose. O nosso objetivo foi avaliar o efeito biológico da proteína PTX3 sobre a morfologia e fisiologia das células de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e melanoma humano (SK-MEL-37). A morfologia foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase e imunofluorescência. O perfil de expressão de genes pró-apoptóticos (BAX), anti-apoptótico (BCL2), reguladores do ciclo celular (MYC, CDKN1A/p21 e TP53) foi analisado por qRT-PCR e a parada no ciclo celular por citometria de fluxo. Nossos resultados mostraram que o tratamento com a proteína PTX3 exógena promoveu uma redução discreta no número de células na fase G0/G1 no tempo de 24 horas na linhagem SK-MEL-37 e de 48 horas na linhagem HCT-116. PTX3 não induziu a apoptose na concentração de 2,64 µg/ml nos tempos de 12, 24 e 48 horas em nenhuma das linhagens testadas. Não foi observada modulação da expressão de BCL-2, MYC e TP53 nas linhagens SK-MEL-37 e HCT-116 após 3 horas de tratamento com rhPTX3. Foi observada uma diminuição do acúmulo de transcritos de CDKN1A no grupo HCT-116 tratado quando comparado ao controle. Esses dados reforçam os nossos achados do ensaio do ciclo celular, uma vez que PTX3 pode estar promovendo a redução do número de células na fase G0/G1 da linhagem HCT-116 através da diminuição da quantidade de transcritos de CDKN1A, regulação esta independente de TP53, uma vez que a quantidade de transcritos desse gene não sofreu alteração. Nossos dados são indicativos de que PTX3 não promove aumento da apoptose nas linhagens SK-MEL-37 e HCT-116, podendo inclusive, nesta última, agir como um promotor da proliferação celular por diminuir os níveis de CDKN1A nestas células.

Palavras chave: Pentraxina 3; Citoesqueleto; Ciclo celular; Apoptose.

ABSTRACT

The pentraxin 3 is an acute phase glycoprotein which plays essential roles in innate immunity, inflammation, matrix deposition and female fertility. PTX3 binds with great affinity and specificity to Fibroblast Growth Factors type 2 and 8, inhibiting cell proliferation and angiogenesis promoted by these factors, and consequently growth of murine prostate and breast tumors. It has been shown that other members of the pentraxin family such as C-reactive protein and Neuronal pentraxin 2, induce apoptosis and cell cycle arrest in human monocytes and human pancreatic cancer cells, respectively. Our hypothesis is that the inhibitory action of pentraxin 3 on tumor progression is not only due to its role as a natural antagonist of the FGFs but also relies on its ability to promote cell cycle arrest and increased apoptosis. The objective of this study was to evaluate the biological effect of PTX3 protein on the morphology and physiology of colon adenocarcinoma (HCT-116) and human melanoma (SK-MEL-37) cells. Morphology was evaluated by using light phase-contrast microscopy and immunofluorescence. The gene expression profile of pro-apoptotic (BAX), anti-apoptotic (BCL2), cell cycle regulators (MYC, CDKN1A/p21 e TP53) genes was analyzed by qRT-PCR. Cell cycle arrest was assessed by flow cytometry. Our study showed that exogenous PTX3 protein promoted a slight reduction in the number of cells in the G0 / G1 phase 24 hours in the SK-MEL-37 line and 48 hours for the HCT-116 strain after the treatment. No membrane bubbles nor condensed nucleus, indicative of apoptosis, were found in the treated groups in both strains being possible to infer that PTX3, at a concentration of 2.64 mg / mL at times of 12, 24 and 48 hours protein did not induce apoptosis. Gene expression analysis by RT-qPCR showed that any of target genes were modulated by PTX3 in SK-MEL-37 cell line. Similarly, rhPTX3 promoted no difference in gene expression of BCL-2, MYC and P53 on HCT-116 line. However, CDKN1A gene expression were impaired in the treated cells in comparison with the control untreated group. These data reinforce our cell cycle assay findings, since PTX3 may be promoting the reduction in the number of cells in the G0 / G1 phase of HCT-116 cells by decreasing the amount of CDKN1A transcripts. According to our data, regulation of the transcription of CDKN1A gene promoted by PTX3 was independent of TP53. Our data indicate that PTX3 does not promote cell cycle arrest nor increases apoptosis in melanoma and colorectal adenocarcinomas. In the latter PTX3 seems to promote cell proliferation by decreasing the levels of CDKN1A transcripts in the cell.

Keywords: Pentraxin 3; Cytoskeleton; Cell Cycle; Apoptosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA DAS PENTRAXINAS

As pentraxinas são componentes essenciais da resposta imune humoral e constituem uma superfamília de proteínas multiméricas conservadas filogeneticamente de aracnídeos até os mamíferos (Garlanda et al., 2005). Todos os membros desta família apresentam uma região carboxi-terminal (C-terminal) característica de 200 aminoácidos, denominada de domínio pentraxina, a qual contém uma sequência conservada de 8 aminoácidos (HxCxS/TWxS, onde x é qualquer aminoácido), descrito como assinatura das pentraxinas (Deban et al., 2011) (Figura 1).

Com base na estrutura primária dos protômeros, as pentraxinas são divididas em dois grupos: as pentraxinas curtas e longas (Bottazzi et al., 2010). As principais representantes das pentraxinas curtas são a proteína C-reativa (CRP) e a proteína soro amiloide P (SAP) que têm aproximadamente 25 kDa e compartilham uma estrutura organizacional comum que compreende cinco ou dez subunidades idênticas organizadas em uma simetria pentamérica radial.

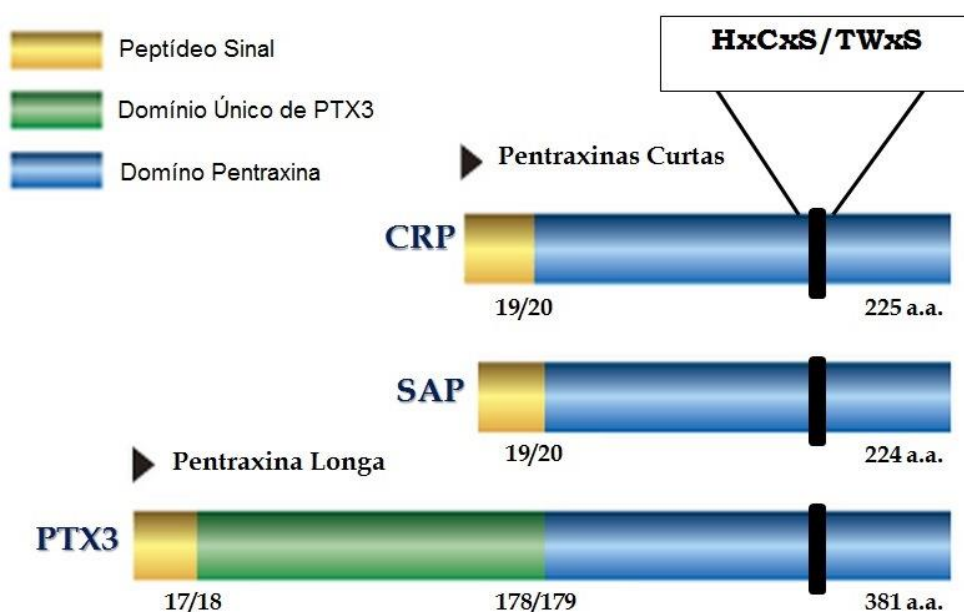


Figura 1: Principais representantes da família das pentraxinas curtas e longas.

Baseado na estrutura primária dos protômeros, as pentraxinas são divididas em curtas e longas. As pentraxinas curtas e longas compartilham o peptídeo sinal (amarelo) e o domínio pentraxina (azul), no qual há uma sequência conservada de 8 aminoácidos (HxCxS/TWxS, onde x é qualquer aminoácido) descrito como assinatura das pentraxinas (preto). PTX3 apresenta um domínio N-terminal inédito (verde).

Fonte: Modificado de Garlanda et al., 2002.

Identificada em 1930 no sangue de um paciente com grave pneumonia, CRP foi nomeada por sua interação de maneira cálcio-dependente com o polissacarídeo-C, o componente principal da parede celular de *Streptococcus pneumoniae* (Tillett and Francis, 1930). Posteriormente, a SAP humana foi identificada como uma proteína intimamente relacionada a CRP com base na identidade da sequência de aminoácidos (51%) e aparência semelhante em microscopia eletrônica (Emsley et al., 1994).

CRP e SAP, são as principais proteínas de fase aguda em humanos e camundongos, respectivamente, sendo produzidas no fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina 6 (IL6) (Bottazzi et al., 2006).

As pentraxinas são capazes de ligação e interação com diferentes ligantes apresentando diversas ações biológicas. Ligantes autólogos incluem membranas celulares danificadas (Volanakis and Wirtz, 1979), lipoproteínas plasmáticas modificadas (Rowe et al., 1984), células apoptóticas (Gershov et al., 2000), fosfolipídios, componentes nucleares (Pepys et al., 1994), enquanto ligantes extrínsecos compreendem microrganismos constituídos de glicanos e fosfolipídios (Vilahur and Badimon, 2015)

Através da interação com fosfocolina, principal constituinte da cápsula polissacarídica tipo C, e fosfoetanolamina, um componente da membrana celular de *S. entérica*, CRP protege camundongos contra infecção bacteriana por várias espécies, como *S. pneumoniae* (de Beaufort et al., 1997), *Haemophilus influenza* (Weiser et al., 1998) e *Salmonella enterica* (Szalai et al., 2000). Da mesma forma, SAP pode se ligar a estruturas encontradas em superfícies microbianas como lipopolissacarídeo (LPS), fosfocolina, manose terminal ou resíduos de galactose e assim interagir com uma variedade de patógenos bacterianos Gram-negativos e Gram-positivos e com o vírus Influenza A humano (de Haas et al., 2000; Horváth et al., 2001).

Dentre as pentraxinas longas, a proteína Pentraxina 3 (PTX3) foi a primeira a ser identificada e é considerada o protótipo dessa subfamília.

1.2 PENTRAXINA 3 (PTX3)

Inicialmente nomeada de TSG-14 (TNF *stimulated gene*-14), PTX3 foi identificada no início dos anos 1990s como um gene estimulado pelo Fator de Necrose Tumoral alpha (TNFA) em fibroblastos humanos e pela Interleucina 1 beta (IL1B) em células endoteliais (Breviario et al., 1992; Lee et al., 1993; Lee et al., 1990). Posteriormente, outros membros da subfamília das pentraxinas longas foram identificados como: apexina, pentraxina neuronal 1 (NPTX1) (Omeis et al., 1996; Schlimgen et al., 1995) e 2 (NPTX2 ou *Narp*) (Hsu and Perin, 1995; Tsui et al., 1996), o receptor de pentraxina neuronal (NPTXR) e, mais recentemente, a pentraxina 4 (PTX4) (Martinez de la Torre et al., 2010).

O gene PTX3 humano está localizado na banda q25 do cromossomo 3 e é organizado em três éxons separados por dois íntrons. Os dois primeiros éxons codificam para o peptídeo sinal (aminoácidos 1-17) e o domínio amino (N-) terminal (aminoácidos 18-178) respectivamente, enquanto que o terceiro éxon codifica para o domínio carboxi (C-) terminal (aminoácidos 179-381) da molécula (Breviario et al., 1992) (Figura 2).

O gene de PTX3 possui alta conservação evolutiva em sequência, organização e regulação gênica entre diferentes espécies de animais vertebrados e invertebrados, o que sugere uma forte pressão evolutiva para manter a estrutura/função da proteína (Mantovani, 2013). A proteína de PTX3 humano e murina apresentam 92% dos resíduos de aminoácidos conservados e 82% idênticos (Garlanda et al., 2005; Introna et al., 1996). Essa homologia significativa entre PTX3 humano e murino sugere que os estudos realizados em murinos podem ser extrapolados para questões humanas (Balhara et al., 2013).

O promotor proximal do gene de PTX3 humano contém diferentes elementos de ligação de *enhancer* (intensificador) como a proteína ativadora 1 (AP1), proteína de especificidade (SP1), fator nuclear kappa B (NFkB), fator nuclear interleucina 6 (NF-IL-6), sítio de ativação de interferon gama (GAS) e Pu1 (Altmeyer et al., 1995; Basile et al., 1997; Garlanda et al., 2005) (Figura 2). O sítio de ligação de NFkB é eficaz na resposta a citocinas inflamatórias TNFA e IL1B, enquanto que AP1 aumenta a transcrição basal de PTX3 (Kunes et al., 2012). Embora a proteína PTX3 humana e murina sejam homólogas, o promotor do gene humano contém menos elementos transcrpcionais do que o gene murino (Balhara et al., 2013).

PTX3 é produzida em resposta a estímulos pro-inflamatórios por uma variedade de tipos celulares como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais do sistema vascular e linfático, células epiteliais de rim, células do músculo liso, fibroblastos, condrócitos, adipócitos, células sinoviais, células do epitélio alveolar, células da granulosa e

células da glia. As células dendríticas mielóides (DC), entretanto, são a principal fonte desta proteína (revisado por Garland et al., 2005; Bottazzi et al., 2010).

Cardiomiócitos humanos (Peri et al., 2000) e células endoteliais linfáticas tanto humanas quanto murinas expressam PTX3 constitutivamente (Wick et al., 2007; revisado por Moalli, Jaillon, et al., 2011).

A expressão de PTX3 é rapidamente induzida após a exposição a sinais pró-inflamatórios primários como agonistas de receptores do tipo Toll (TLR), Interleucina 1beta (IL1B), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNFA), microrganismos intactos ou componentes microbianos como lipopolissacarídeo (LPS), proteína de membrana externa (OmpA) e lipoarabinomanana (LAM) (Inforzato et al., 2012; Mantovani et al., 2008) (Figura 3).

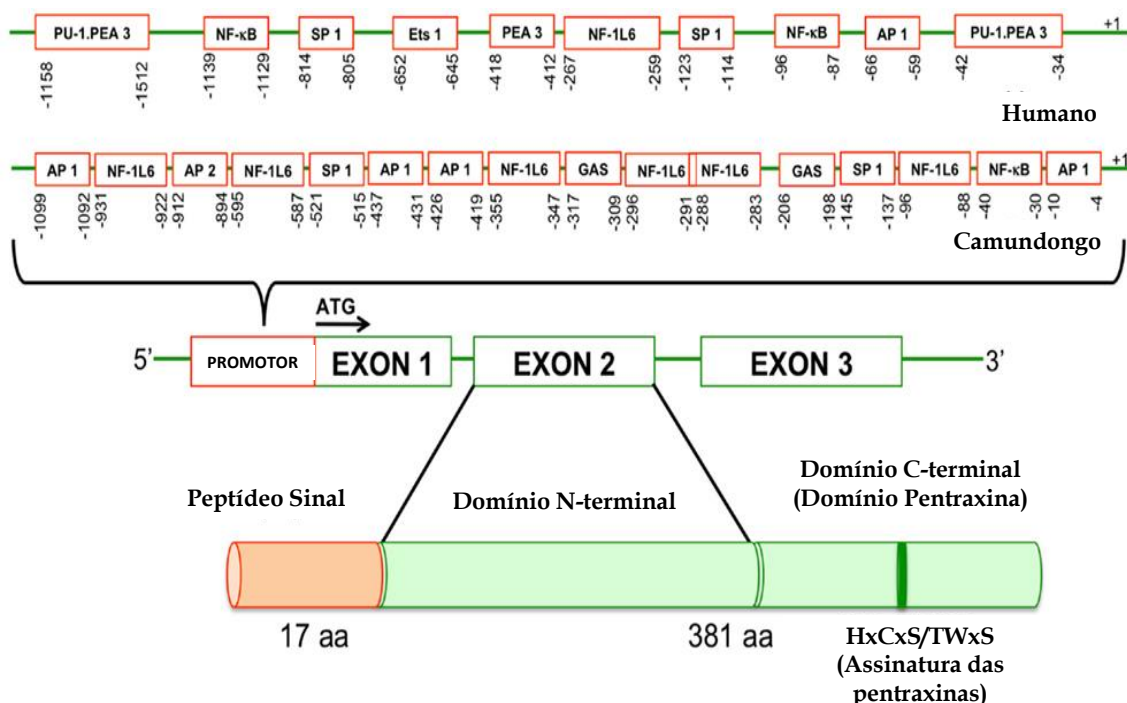


Figura 2: Estrutura do gene de PTX3 em humanos e camundongos.

O gene de PTX3 é constituído de uma região promotora que contém diversos sítios de ligação para fatores de transcrição e três éxons. Os dois primeiros éxons codificam para o peptídeo sinal (aminoácidos 1-17) e o domínio amino (N-) terminal (aminoácidos 18-178) respectivamente, enquanto que o terceiro éxon codifica para o domínio entraxina carboxi (C-) terminal (aminoácidos 179-381).

Fonte: Modificado de Balhara et al, 2013.

Além desses sinais, a produção de PTX3 também é estimulada por hormônios glicocorticoides, (Doni et al, 2009) lipoproteínas de alta densidade (HDL) e baixa densidade oxidadas e modificadas enzimaticamente (ox-LDL) e pela citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL10) (Norata et al., 2008) (Figura 3).

Nos neutrófilos (PMN), PTX3 é armazenada em grânulos de lactoferrina e lactoferrina/gelatinase positivos, sendo liberada de forma rápida no espaço extracelular em

resposta a estímulos pró-inflamatórios. Quando estimulados, os neutrófilos liberam cerca de 25% do seu conteúdo de PTX3. No entanto, parte da proteína liberada ainda permanece associada à célula parental por meio de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). A localização de PTX3 nas NETs contribui para a geração de um microambiente antimicrobiano que aumenta a capacidade fagocítica e microbicida (Brinkmann et al., 2004; Jaillon et al., 2007).

A proteína PTX3 possui 381 aminoácidos, e o peso molecular de cada protômero é de aproximadamente 40kDa. A proteína possui um único sítio de glicosilação ligado ao N presente no resíduo Asn 220, o qual aumenta o peso molecular dos protômeros para 45 kDa (Garlanda, et al, 2005). Esse motivo glicosídico amplia a interação entre PTX3 e outros ligantes, como P-selectina e o vírus Influenza.

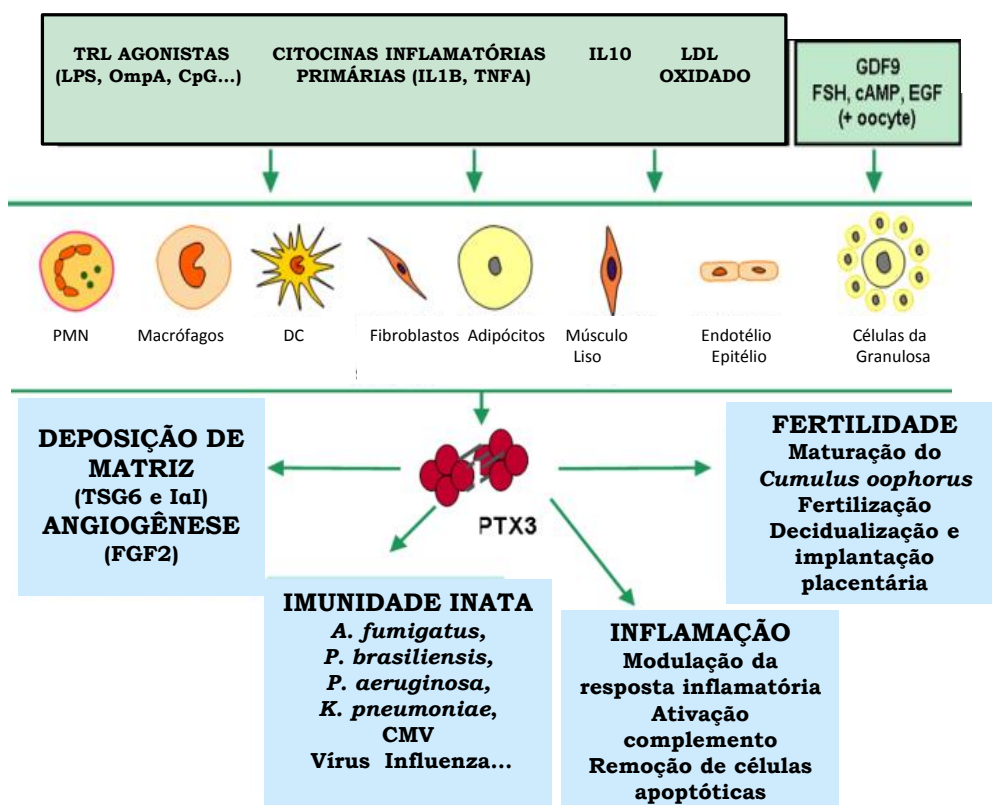


Figura 3: Estímulos para a produção e principais funções biológicas de PTX3

PTX3 desempenha diversas funções biológicas e pode ser produzida por uma variedade de tipos celulares em resposta a estímulos pró-inflamatórios primários como agonistas de receptores do tipo Toll (TLR), Interleucina 1-beta (IL1B), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNFA), hormônios glicocorticoides, lipoproteínas de (HDL) e baixa densidade (LDL), IL10, microrganismos intactos ou componentes microbianos como lipopolissacarídeo (LPS), proteína de membrana externa (OmpA) e lipoarabinomanana (LAM).

Fonte: Modificado de Garlanda et al., 2009.

Evidências sugerem que mudanças no status de glicosilação podem representar uma estratégia para regulação da atividade biológica desta proteína (Garlanda *et al.*, 2005; Inforzato *et al.*, 2006).

Como em outros membros da família das pentraxinas longas, PTX3 é composto de uma região N-terminal inédita. Predições da estrutura secundária sugerem que esta região da proteína tende a formar quatro hélices α , três das quais estão provavelmente envolvidas na formação de estruturas *coiled-coils* (bobinas enroladas) (Presta *et al.*, 2007; Inforzato *et al.*, 2010). Com similaridade de até 57%, o domínio C-terminal de PTX3 é homólogo ao das pentraxinas curtas e adota uma topologia em forma de barril com folhas β antiparalelas (*jellyroll* β) (Inforzato *et al.*, 2006) (Figura 4).

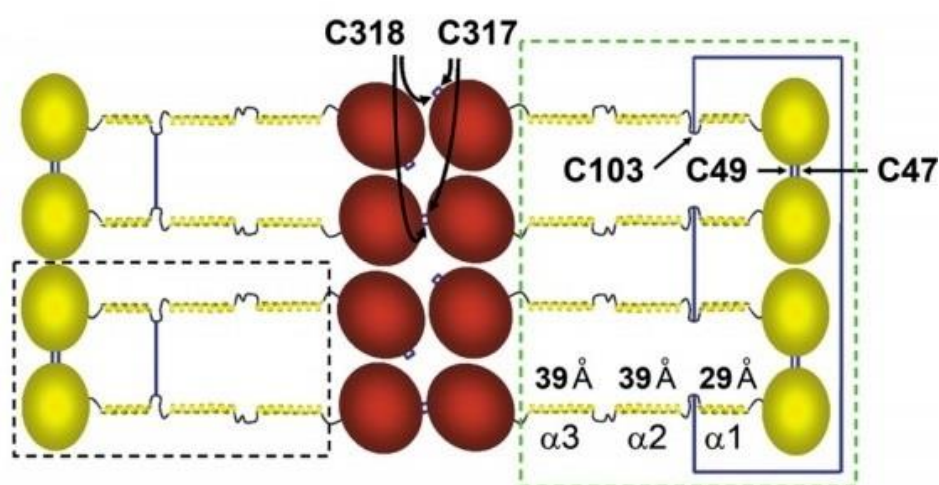


Figura 4: Modelo proposto da proteína PTX3

Organização das ligações dissulfeto no octâmero de PTX3, onde a Cys103 estabiliza os protômeros em tetrâmeros (direita) ou em dímeros (esquerda), formando uma mistura de tetrâmeros (quadro verde) e dímeros (quadro preto), onde estes últimos se associam em tetrâmeros de forma não covalente. O domínio N-terminal é composto de um segmento que é provavelmente globular seguido de três hélices α , cujos tamanhos em comprimento são estimados em 29, 39 e 39 Å.

Fonte: Inforzato *et al.*, 2010

1.3 Ligantes e funções de PTX3

Como reportado para CRP e SAP, PTX3 liga-se a um amplo espectro de alvos celulares e moleculares que inclui motivos microbianos, componentes do sistema complemento e proteínas da matriz extracelular (MEC).

O primeiro ligante descrito e melhor caracterizado de PTX3 foi o componente C1q da cascata do complemento (Bottazzi et al. 1997). A interação de PTX3 com C1q ocorre de maneira cálcio-independente. Nos experimentos em que PTX3 foi imobilizada em superfície plástica, condição experimental que mimetiza a ligação da pentraxina à superfície de microrganismos, há ativação da cascata do complemento pela via clássica com deposição de C3 e C4 (Inforzato et al. 2012). No entanto, quando PTX3 está solúvel na fase fluida foi observada uma inibição da ativação do complemento dependente de C1q pela inibição da ligação de C1q com as imunoglobulinas. Esses achados apontam que PTX3 pode tanto inibir quanto ativar a via do complemento, dependendo da forma em que se apresenta. A ativação do complemento por PTX3 é importante para a remoção de microrganismos patogênicos e de debris celulares e, por outro lado, a inibição do complemento pode ter uma ação protetora contra dano tecidual causado por ativação indesejada desta via. (Nauta et al. 2003).

PTX3 liga-se especificamente a um variado número de patógenos diferentes, incluindo fungos como *Aspergillus fumigatus* (Garlanda et al., 2002; Gaziano et al., 2004) *Saccharomyces cerevisiae* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Diniz et al., 2004), bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* (Moalli, Paroni, et al., 2011), *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* (Jeanin, 2005) e *Streptococcus pneumoniae* (Huttunen et al., 2011), além de vírus, tais como o citomegalovírus humano e murino (HCMV e MCMV) e o vírus influenza H3N2 (Bozza et al., 2006; Reading et al., 2008)

PTX3 foi originalmente descrita como uma molécula de reconhecimento de padrões moleculares (PRM) que possui papel não redundante na resistência contra *Aspergillus fumigatus* ao facilitar o reconhecimento dos seus conídios por macrófagos (Garlanda et al., 2002). Também, foi demonstrado por Diniz e colaboradores em 2004 que PTX3 age como uma opsonina ao se ligar a partículas de Zymosan, componente da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e células da levedura *Paracoccidioides brasiliensis* aumentando o índice de fagocitose destas pelos macrófagos (Diniz et al., 2004).

Em um modelo de infecção pulmonar crônica causado por *Pseudomonas aeruginosa*, PTX3 demonstrou um potencial efeito terapêutico reduzindo a colonização pulmonar, os níveis de citocinas pró-inflamatórias (CXCL1, CXCL2, CCL2 e IL1- β) e aumentando o recrutamento de leucócitos nas vias aéreas (Moalli, 2011). No entanto, em outro modelo de infecção pulmonar causada pela bactéria gram-negativa *Klebsiella*

pneumoniae, PTX3 demonstrou desempenhar um duplo papel, promovendo tanto letalidade quanto sobrevivência, a depender do inóculo bacteriano. Quando em presença de altas quantidades de KOmpA, componente da membrana externa dessa bactéria, PTX3 esteve associada ao aumento de óxido nítrico no soro, incapacidade dos neutrófilos migrarem para o tecido pulmonar e maior disseminação da bactéria no sangue após 20 horas de infecção. Contudo, quando em presença de uma menor quantidade de partículas infectantes a expressão aumentada de PTX3 apresentou papel protetor devido ao aumento da produção de TNFA, maior influxo de neutrófilos no pulmão e maior fagocitose dos patógenos pelos neutrófilos que migraram (Soares et. al, 2006).

PTX3 também atua em infecções causadas por vírus ao promover a redução da entrada viral e a infectividade *in vitro* do citomegalovírus humano e murino e ao neutralizar a infectividade do vírus influenza H3N2 reduzindo a mortalidade e a carga viral em camundongos através da inibição da hemaglutinação e da atividade da neuraminidase viral (Bozza et al., 2006; Reading et al., 2008).

Diante da rápida produção de PTX3 durante a inflamação, essa proteína tem sido um candidato a marcador para patologias cardiovasculares, infecciosas e inflamatórias devido ao seu comportamento como uma proteína de fase aguda em que os níveis plasmáticos se mantêm baixos em condições normais (aproximadamente 25 ng/ml em camundongos e menos que 2 ng/ml em humanos) e aumentam rapidamente (pico em 6-8 horas) e dramaticamente (200-800 ng/ml em camundongos e humanos) durante o choque endotóxico, a sepse e em condições inflamatórias e infecciosas (Mantovani et al., 2008; Deban et al., 2011).

Foi demonstrado pelo nosso grupo, em um estudo realizado com camundongos transgênicos que carregam cópias extras do gene Ptx3, a importância dessa proteína na regulação da resposta inflamatória *in vivo*. Os animais transgênicos apresentaram uma maior sobrevivência, em relação a camundongos do tipo selvagem, em resposta ao choque endotóxico provocado pela administração sistêmica de LPS, bem como em resposta à infecção polimicrobiana desencadeada pela ligadura e perfuração do ceco (Dias et al. 2001).

Assim como as pentraxinas curtas, CRP e SAP, PTX3 está envolvida na remoção de células apoptóticas podendo atuar de duas formas: seja associada na membrana promovendo a fagocitose de neutrófilos apoptóticos ou na forma solúvel inibindo esse processo (Doni et al., 2009; Jaillon et al., 2009). Além disso, foi descrito o papel de PTX3 na biologia de várias doenças como cardiopatias (Bonacina et al. 2013), enfermidades agudas e crônicas dos rins (Speeckaert et al., 2013) e pulmonares (He, Han e Liu, 2007), fertilidade feminina (Bottazzi, Bastone, et al., 2006), aterosclerose (Garlanda et al., 2011) e na angiogênese ao se ligar aos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) inibindo as suas

atividades biológicas (Rusnati *et al.*, 2004; Camozzi *et al.*, 2006; Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013).

1.4 FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS

1.4.1 Família dos Fatores de Crescimento de Fibroblastos

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) constituem uma família de proteínas que estão presentes em todos os animais desde o nematódeo *Caenorhabditis elegans* até os mamíferos. Nestes últimos, foram descritos 18 FGFs, que estão agrupados filogeneticamente em seis subfamílias, baseando-se em diferenças nas seqüências homólogas. Esses fatores atuam de forma parácrina/autócrina através da interação com quatro receptores específicos altamente conservados do tipo tirosina quinase (FGFR1-4) e promovem a regulação no desenvolvimento embrionário e em múltiplas vias essenciais como na angiogênese, cicatrização de feridas, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Beenken e Mohammadi, 2009)).

Dentre os membros da família de crescimento de fibroblastos, o tipo 2 (FGF2) é um potente fator pro-angiogênico, mitogênico e de sobrevivência. Este fator é composto por 155 aminoácidos e o gene que codifica para a proteína está localizado no cromossomo 4 de humanos, entre as bandas q26 e q27, sendo suas funções relacionadas a migração e diferenciação de células endoteliais, assim como uma ampla variedade de processos essenciais (Okada-Ban, Thiery e Jouanneau, 2000), como a hematopoiese (Allouche e Bikfalvi, 1995), a inflamação (Beenken e Mohammadi, 2009), e a diferenciação e/ou função do sistema nervoso (Logan, Frautschy e Baird, 1991), olho (Mcavoy *et al.*, 1991) e esqueleto (Riley *et al.*, 1993; Bikfalvi *et al.*, 1997).

Estudos evidenciaram a expressão alterada de FGF2 em diferentes tipos de cânceres como próstata (Doll *et al.*, 2001; Polnaszek *et al.*, 2003), mama (Yiangou *et al.*, 1997), pâncreas (Yamanaka *et al.*, 1993), pulmão (Berger *et al.*, 1999), bexiga (Gazzaniga *et al.*, 1999), pele (Halaban, 1996), cabeça e pescoço (Dellacono *et al.*, 1997).

O fator de crescimento de fibroblasto 8 (FGF8) foi clonado a partir de uma linhagem celular de carcinoma mamário de camundongo dependente de andrógeno. Hoje sabe-se que este fator é expresso durante a embriogênese, na fase da gastrulação, e atua na organogênese do cérebro, crânio, face, faringe, coração, rins, órgãos urogenitais masculinos e membros (Mattila e Härkönen, 2007). Na idade adulta, a expressão desse fator está restrita a um número limitado de tecidos, sendo encontrada principalmente em tecidos alvos de hormônios esteróides do trato reprodutivo e geniturinário.

A proteína humana FGF8 é constituída por 233 aminoácidos e o gene que codifica para este fator está localizado no cromossomo 10q24 e compreende três éxons (Mattila e Härkönen, 2007). Por *splicing* alternativo a partir do gene *Fgf8* são codificadas oito isoformas de proteínas (a-h) no camundongo e quatro nos humanos (a, b, e, f) que diferem na porção aminoterminal (Mattila *et al.*, 2001). A isoforma FGF8b é a que possui o maior potencial angiogênico e tumorigênico, sendo altamente expresso em cânceres de mama, próstata e ovário (Leali *et al.*, 2011).

A identificação de moléculas capazes de inibir a via de sinalização mediada por estes fatores e, portanto, suas ações biológicas, é fundamental no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para doenças dependentes de angiogênese tais como artrite reumatoide (Wang *et al.*, 2012), retinopatia diabética (Yoshida *et al.*, 1999), psoríase (Yamamoto, 2013), inflamação crônica, aterosclerose (Kobayashi e Lin, 2009) e câncer (Carmeliet e Jain, 2000). Neste sentido, PTX3, que tem se mostrado um antagonista natural dos FGFs, pode ser um bom candidato. (Rusnati *et al.*, 2004; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013; Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013).

1.5 Interação entre PTX3 e os FGFs

Em 2004, Rusnati e colaboradores observaram pela primeira vez a ligação de alta afinidade e especificidade de PTX3 ao FGF2 através de ensaios de proliferação celular *in vitro* e de neovascularização da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha. Nesse estudo, foi observado que PTX3 inibiu a proliferação de células endoteliais *in vitro* e a angiogênese *in vivo*, além de reduzir o volume de tumores induzidos por enxertos de células tumorigênicas transfectadas com o gene de PTX3 (Rusnati *et al.* 2004). Da mesma forma, também foi relatado o papel de PTX3 como um forte inibidor da estimulação autócrina e parácrina sobre a proliferação de células do músculo promovida por FGF2 (Camozzi *et al.*, 2005). A interação PTX3/FGF2 ocorre através da presença de dois sítios de ligação para FGF2 no domínio N-terminal de PTX3 (Inforzato *et al.*, 2010).

Como observado com FGF2, PTX3 também interage com a isoforma b de FGF8 inibindo a neovascularização e proliferação dependentes de FGF8b em tumores regulados por hormônios esteroides. Leali e colaboradores (Leali *et al.*, 2011) mostraram que células de tumor de mama murinho (S115) transfectadas com o cDNA de PTX3 apresentavam menor taxa de proliferação *in vitro* e diminuíam a atividade angiogênica estimulada por FGF8 em membrana corioalantóide de ovo de galinha embrionado. Ronca e colaboradores obtiveram resultados semelhantes com células derivadas de tumores de próstata humano (LNCaP), e adenocarcinoma de próstata murino (TRAMP-C2) (Ronca *et al.*, 2013).

Recentemente, estudos mostraram que peptídeos sintéticos com sequências correspondentes ao domínio N-terminal da proteína PTX3, são suficientes para a inibição das atividades biológicas de FGF2 e FGF8 entre eles o pentapeptídeo acetilado Ac-ARPCA-NH₂ (100-104), os quais exercem o mesmo papel que a proteína inteira (Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2010; Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013).

1.6 Pentraxinas e seus efeitos sobre o ciclo celular e a apoptose

Além de exercerem diferentes funções biológicas no sistema imune inato, inflamação, angiogênese e fertilidade feminina, as pentraxinas têm sido relacionadas aos processos de apoptose e regulação do ciclo celular.

Em 2008, Nabata e colaboradores demonstraram a capacidade de CRP em induzir a apoptose em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) através da interação com o receptor Fc gamma RIIB que medeia o aumento da atividade da caspase-3 presumivelmente através da atenuação da ativação da proteína quinase Akt (Nabata *et al.*, 2008).

Além disso, foi demonstrado que células de câncer pancreático transfectadas com o gene da Pentraxina Neuronal II (NPTX2), uma pentraxina longa, apresentaram uma maior taxa de apoptose e aumento do número de células retidas na fase G1, enquanto que na fase S o número de células foi reduzido. A expressão de genes relacionados ao processo de apoptose e ciclo celular também foram avaliados, sendo que nas células transfectadas com NPTX2 o gene da ciclina D1 foi regulado negativamente e o gene BAX teve sua expressão aumentada enquanto que a expressão do gene BCL2 não mostrou alteração significativa entre o controle e o tratado (Zhang *et al.*, 2011).

Recentemente, foi relatado que o tratamento de monócitos humanos com CRP resultou no aumento da apoptose e da expressão do mRNA e proteína do gene BTG2 (*B-cell translocation gene 2*) através da cascata CD32/Nox2/ROS/p53/BTG2 promovendo a parada no ciclo celular na fase G2/M (Kim *et al.*, 2014).

1.7 O Ciclo Celular

O ciclo celular é um fenômeno fundamental para a homeostase, essencial em processos fisiológicos como a proliferação celular, reparação tissular ou celular, embriogênese, senescência e morte. Esse processo é composto de duas etapas principais: a interfase que é subdividida em quatro fases sequenciais (G1, S, G2 e M) e o período de divisão celular, denominada de fase M (Figura 5).

Na fase G1 (G para *gap*, que significa intervalo) do ciclo celular, a célula se prepara para a síntese do material genético, aumentando o seu tamanho e sintetizando mRNA e proteínas. Na fase S (S para síntese) ocorre a duplicação de cada cromossomo, na fase G2 a célula prepara-se para entrar em mitose e na fase M ocorre a divisão celular (Williams e Stoeber, 2012).

A progressão e transição entre as fases do ciclo celular são reguladas pelo sistema de pontos de verificação (*checkpoints*) que estão localizados antes e após a fase S e na fase M. Nestes pontos são detectados possíveis defeitos durante a síntese de DNA e segregação cromossômica, os quais levam à parada do ciclo celular e o reparo através da modulação da atividade das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (Malumbres e Barbacid, 2009).

As CDKs são proteínas que exercem a sua atividade no controle do ciclo celular ou na modulação da transcrição através da associação com subunidades ativadoras denominadas ciclinas. Atualmente, há mais de 20 membros da família CDK descritos, porém nem todas estão relacionadas ao ciclo celular (Malumbres *et al.*, 2009). Apenas um subconjunto específico de complexos CDK-ciclina, que inclui CDK2, CDK4, CDK6, CDK1 e dez ciclinas que pertencem a quatro classes diferentes (ciclinas do tipo A-, B-, D- e E) está diretamente envolvido na condução do ciclo celular (Malumbres e Barbacid, 2009).

As ciclinas constituem uma família de proteínas serina/treonina quinases, cuja concentração varia ciclicamente ao longo do ciclo através de sua síntese e degradação (Vermeulen, Van Bockstaele e Berneman, 2003).

Além da regulação promovida pelo complexo ciclina-CDK, outras proteínas (TP53, CDKN1A e MYC) têm demonstrado exercer um papel na progressão ou parada do ciclo celular.

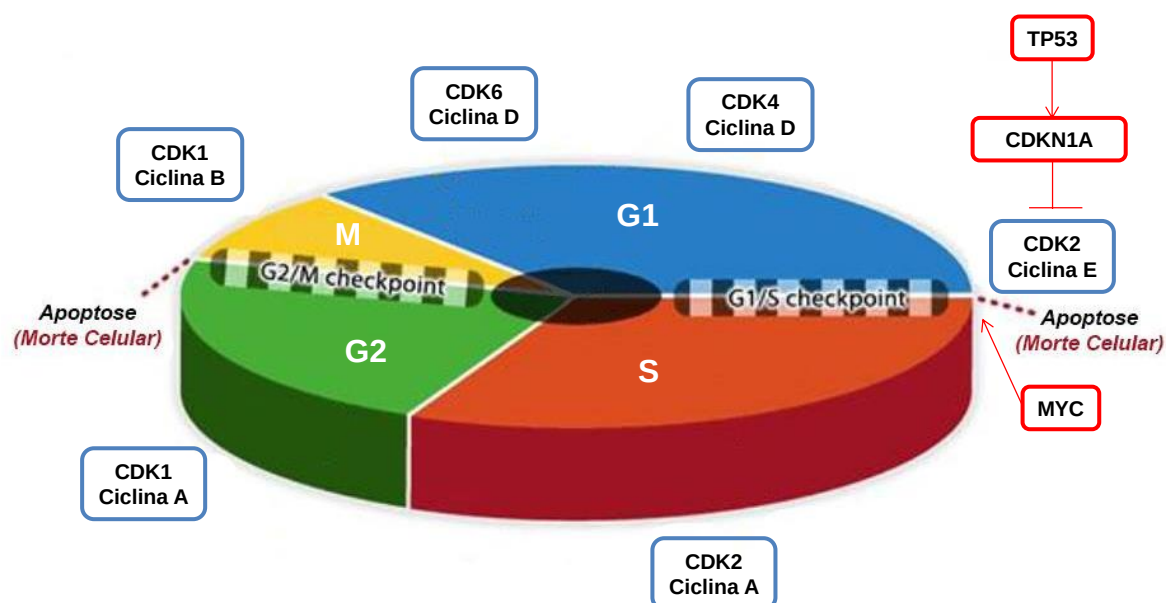


Figura 5: Esquema representativo do ciclo celular em células somáticas.

O ciclo celular é composto de quatro fases sucessivas denominadas G1, S, G2 e M. A transição entre essas fases é regulada pelos pontos de verificação (*checkpoints*) localizados antes da fase S e após a fase G2. Os complexos quinases dependentes de ciclina (CDK)/ciclina e MYC promovem a progressão celular, no entanto TP53 e CDKN1A atuam de forma contrastante promovendo a parada do ciclo celular.

Fonte: Modificado de <https://pharmaceuticalintelligence.com/tag/cell-cycle/>

1.7.1 TP53

O gene supressor tumoral TP53 (*tumor protein 53*) está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), possui 19.198 nucleotídeos, onze éxons, sendo o primeiro não transcrito, e codifica a fosfoproteína nuclear p53 (GASCO, 2002).

O gene TP53 apresenta uma frequência de mutações superior a 50%, sendo o gene mais frequentemente encontrado mutado em todos os tipos de tumores humanos (Soussi, 2007).

Denominado em 1992, como “o guardião do genoma”, a proteína p53 tem importante papel na carcinogênese ao promover a parada no ciclo celular, senescência e apoptose em resposta a uma variedade de estresses celulares (hipóxia, dano ao DNA, quebra de fuso mitótico, encurtamento telomérico e ativação de oncogenes) que irão ativar o gene, levando ao aumento da proteína no núcleo (Lane, 1992).

A proteína p53 exerce suas funções através do controle transcricional a partir da transativação ou repressão de genes específicos.

Dentre as respostas resultantes do controle transcricional, p53 pode promover a apoptose através da transativação dos genes BAX, PUMA, NOXA, PIG3, CD95 (Fas) e outros que levam a morte celular. Além disso, p53 pode induzir a permeabilização da

membrana mitocondrial promovendo a liberação do citocromo C para o citosol através da interação com proteínas da família BCL2 (Schuler et al, 2000).

No ciclo celular, p53 pode promover a parada na fase G1 através da ativação transcricional do gene CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), que tem como função inibir a ação dos complexos CDKs 1 e 2 (Gompel et al, 2001).

1.7.2 CDKN1A ou p21

O gene CDKN1A (p21) está localizado no cromossomo 6 (6p21.2) em humanos e o promotor desse gene possui dois sítios conservados de ligação de p53, sendo pelo menos um desses necessários para a resposta a p53 após danos no DNA (El-deiry, 1995).

Além de atuar na inibição do ciclo celular ao se ligar e inibir a atividade dos CDKs, promovendo a parada no ciclo celular na fase G1, a proteína p21 também pode atuar na fase S ao inibir a replicação do DNA através de sua ligação com o antígeno PCNA (*proliferating-cell nuclear antigen*), bloqueando a capacidade do PCNA, proteína auxiliadora da DNA-polimerase-delta, em ativar a enzima DNA polimerase, na ausência do complexo ciclina/CDK (Waga et al.,1994).

A transcrição desse gene é induzida por mecanismos dependentes e independentes de p53. Quando dependente de p53, vários fatores (Zta, NDF, c-Rel ou inibidores de ribonucleotídeos) podem induzir a expressão de p21 por diferentes formas de ativação ou estabilização do RNA ou proteína de p53. Já em relação aos mecanismos independentes, uma variedade de fatores transcricionais (Sp1, Sp3, Ap2, STATs, C/EBP α , C/EBP β , NGF, BRCA1) se ligam a diversos sítios de ligação Sp1 (Sp1-1 a Sp1-6) presente no promotor do gene CDKN1A e promovem a ativação de p21 (Gartel, 1999).

1.7.3 MYC

O gene MYC (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) constitui uma família de proto-oncogenes e está localizado na região cromossômica 8q24.1, sendo constituído de três éxons que apresentam similaridade de nucleotídeos entre humanos e camundongos (cerca de 90% para os éxons 2 e 3) (Hamlyn & Rabbits, 1983; Bernard et al; 1983, Kelly et al., 1983).

O MYC codifica um fator de transcrição que funciona na dimerização e ligação do DNA e tem um papel fundamental na proliferação, regulação, diferenciação e apoptose (Feller; Mahalingam, 2013).

No ciclo celular, MYC atua promovendo a progressão da fase G1 para a fase S em células quiescentes através da regulação positiva de E2F (família de genes que tem papel

importante na transição G1/S do ciclo celular) (Matsumura et al., 2003), das ciclinas D2 (Coller et al., 2000; Einsenman, 2001), E e A (Facchini & Penn, 1998), CDK4 (Hermeking et al., 2000) e Cdc25, uma fosfatase que ativa CDKs. Além disso, inibe ou sequestra CKIs, como p15, p27 e p21 que atuam bloqueando o ciclo celular (Coller et al., 2000).

A desregulação ou elevação da expressão de MYC tem sido relacionada à angiogênese, assim como a um amplo espectro de cânceres humanos: de mama, cólon, colo uterino, de pequenas células do pulmão, carcinomas, osteosarcomas, glioblastomas, melanomas e leucemias mielóides (Dang, 1999; Henriksson, 1996).

No início dos anos 90 foi descrito que a extensão da resposta apoptótica está correlacionada ao nível de expressão de MYC. Além disso, nesse mesmo estudo foi observado que muitos genes envolvidos na apoptose (TP53, P21 e BAX) contêm em seus promotores regiões responsivas a MYC (Evan et al, 1992).

1.8 Apoptose

O termo apoptose foi proposto por Kerr e colaboradores em 1972 para descrever um padrão morfológico específico de morte celular observado durante o desenvolvimento embrionário, a reposição de células em um tecido adulto saudável e a atrofia após a retirada de hormônio (Kerr, Wyllie e Currie, 1972). Esse processo pode ser desencadeado por estímulos fisiológicos (renovação de células epiteliais, hipotrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou de hormônios ou involução de alguns tecidos) e patológicos (infecções, danos ao DNA e regressão de tumores)

Alterações morfológicas precoces incluem perda de contato das células com as células vizinhas, encolhimento e arredondamento da célula, retração dos pseudópodes, condensação da cromatina (picnose) na periferia do núcleo, translocação da fosfatidilserina (PS) da superfície interna da membrana para a superfície externa, fragmentação do DNA em nucleossomos gerando fragmentos de 200 pares de bases ou múltiplos deles e fragmentação nuclear (cariorréxis) (Wlodkowic et al., 2010).

Em fases tardias ocorrem modificações no citoesqueleto com formação de bolhas de membrana (“*blebbings*”) e a formação de corpos apoptóticos que serão reconhecidos e fagocitados por células vizinhas, incluindo macrófagos e células parenquimatosas (Kroemer et al., 2005) (Figura 6).

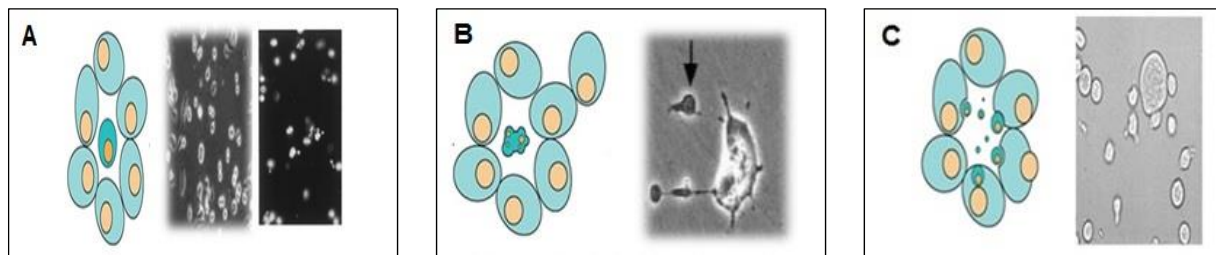


Figura 6: Alterações morfológicas durante a apoptose.

As células quando entram em estado de apoptose através de estímulos fisiológicos e patológicos apresentam alterações em sua morfologia como encolhimento e arredondamento celular (A), condensação da cromatina (A), fragmentação do DNA, translocação da fosfatidilserina da membrana, formação de bolhas de membrana (B) e corpo apoptóticos (C).

Fonte: Modificado de <https://www.promega.com.br/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/apoptosis/>

Em cânceres, a apoptose mostra-se desregulada através de mecanismos como o desbalanço entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, expressão reduzida das caspases, defeitos e mutações em TP53, expressão aumentada de proteínas inibidoras de apoptose (PIAs) e a sinalização prejudicada das vias de sinalização da apoptose como a via do receptor de morte (Wong, 2011) (Figura 7).

1.8.1 Vias de Sinalização da Apoptose

Para que ocorra a indução da apoptose, são necessários uma variedade de estímulos como a privação de fatores de crescimentos, união de ligantes com seus respectivos receptores, uso de glicocorticóides, tratamento com agentes quimioterápicos, danos no DNA e exposição a radiação ionizante (Huppertz et al., 1999; Grivicich et al., 2007).

O processo de apoptose pode ocorrer através de duas vias de sinalização que são divididas didaticamente em via extrínseca e via intrínseca (Figura 8).

1.8.2 Via extrínseca

A via extrínseca, também denominada de “via do receptor da morte” é iniciada através da ativação dos receptores da morte que são membros da superfamília do receptor de fator de necrose tumoral (TNFR). Todos os membros dessa família possuem um domínio extracelular rico em cisteína e um domínio citoplasmático de cerca de 80 aminoácidos denominado “domínio da morte” (DD) (Lavrik et al., 2005) (Figura 8).

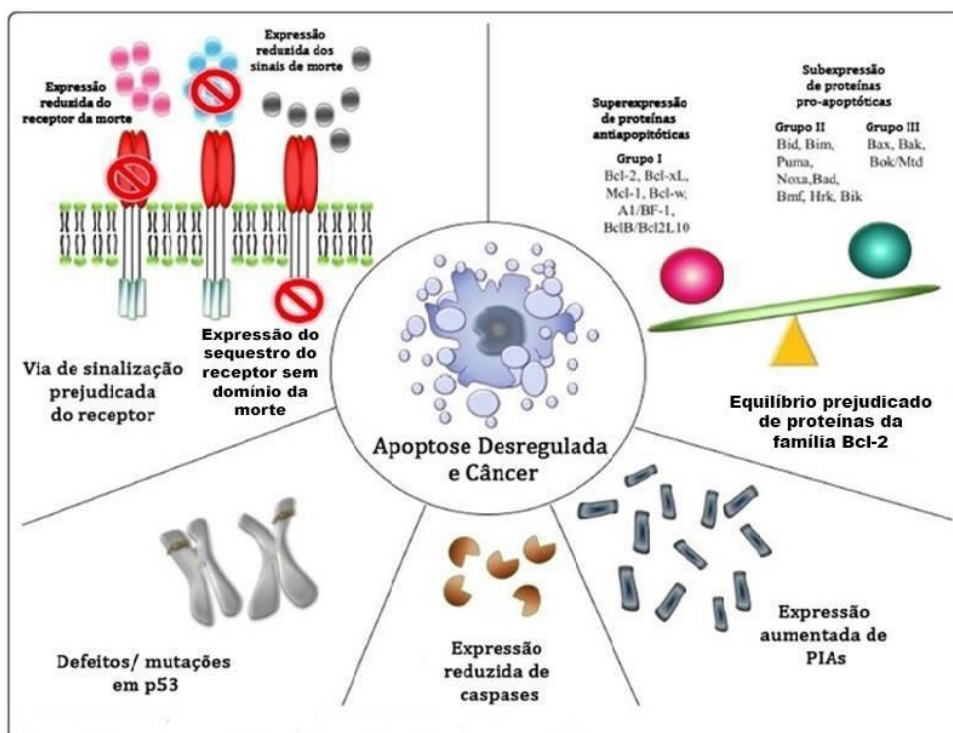


Figura 7: Processos desregulados da apoptose que contribuem para a carcinogênese.

Em cânceres, o processo de apoptose pode estar desregulado através de diversos mecanismos como o desequilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, defeitos e mutações em TP53, sinalização prejudicada da via do receptor da morte e expressão reduzida de caspases e aumentada de proteínas inibidoras da apoptose.

Fonte: Modificado de Wong, 2011.

A sinalização ocorre através da ligação dos sinalizadores da morte (FasL, TNFA, TRAIL, Apo3L e Apo2L) aos seus respectivos receptores (FasR, TNFR1, TNFR2, TRAIL R1, TRAIL R2, DR3, DR4 e DR5), também denominados de “receptores da morte”. Quando ativados, à porção citoplasmática desses receptores se ligam “proteínas do domínio da morte” denominadas de TRADD (*TNF receptor apoptotic death domain*) para o TNFA ou FADD (*Fas-associated death domain*) para o FasL. Em seguida, TRADD ou FADD se associa à pró-caspase 8 formando o complexo DISC (*death-inducing signaling complex*) que ativa as caspases iniciadoras (8 e 10) que estavam inativas. Estas enzimas ativam as caspases executoras (3, 6 e 7) que destroem estruturas celulares resultando na morte celular (Chang e Yang, 2000).

1.8.3 Via intrínseca

A via intrínseca, também denominada de via mitocondrial, pode ser desencadeada por vários estímulos como a falta de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia, estresse no retículo endoplasmático, dentre outros. Após a célula sofrer uma injúria, a mitocôndria recebe sinais de morte que aumentam a permeabilidade de suas membranas, o

que promove a liberação do citocromo C para o citoplasma o qual irá se ligar a molécula adaptadora Apaf-1 (*apoptotic protease-activating factor-1*) formando o complexo apoptossomo que irá ativar a pró-caspase 9 e 3 (Wu et al., 2013; Grivicich et al., 2007).

A família de proteínas BCL2 (*B-cell lymphoma protein 2*) compreende 25 membros pró e anti-apoptóticos que compartilham em sua estrutura um domínio específico, o BH (BH1-BH4). De acordo com a quantidade de domínio BH, os membros da família pró-apoptótica estão classificados em dois subgrupos, sendo BAX, BAK e BOK as proteínas que possuem múltiplos domínios BH e BID, BIM, PUMA, NOXA, BIK, BAD, HRK e BMF que apresentam apenas o domínio BH3, sendo chamadas BH3-only (Vangestel et al., 2009; Burz et al., 2009).

Em resposta ao estímulo apoptótico, as proteínas BAX/BAK são ativadas na mitocôndria provocando a liberação do citocromo C e de outros fatores mitocondriais no citosol como o fator de indução da apoptose (AIF), a proteína Diablo (Smac/DIABLO) e a protease Omi/HtrA2. Quando liberado, o AIF migra da mitocôndria para o núcleo e inicia um processo de apoptose independente das caspases, no qual interage com o DNA promovendo a condensação e fragmentação deste a partir da ativação das endonucleases (Broughton e Sobey, 2009, Burz et al., 2009; Wang e Youle, 2009). Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 interagem e antagonizam com as proteínas inibidoras de apoptose promovendo a ativação das caspases (Goldar et al, 2015) (Figura 8).

1.8.4 Proteínas reguladoras da apoptose

1.8.4.1 BAX

A proteína BAX (*BCL2 associated protein X*) pertence a família de proteínas BCL2 e é codificado pelo gene de mesmo nome localizado na região cromossômica 19q13.3-q13.4. Quando em presença de sinais apoptóticos, BAX sofre uma translocação do citoplasma para a mitocôndria, onde sofre ativação e modificação conformacional, aderindo a membrana mitocondrial externa e promovendo a liberação de citocromo C (Kotsafti et al., 2010).

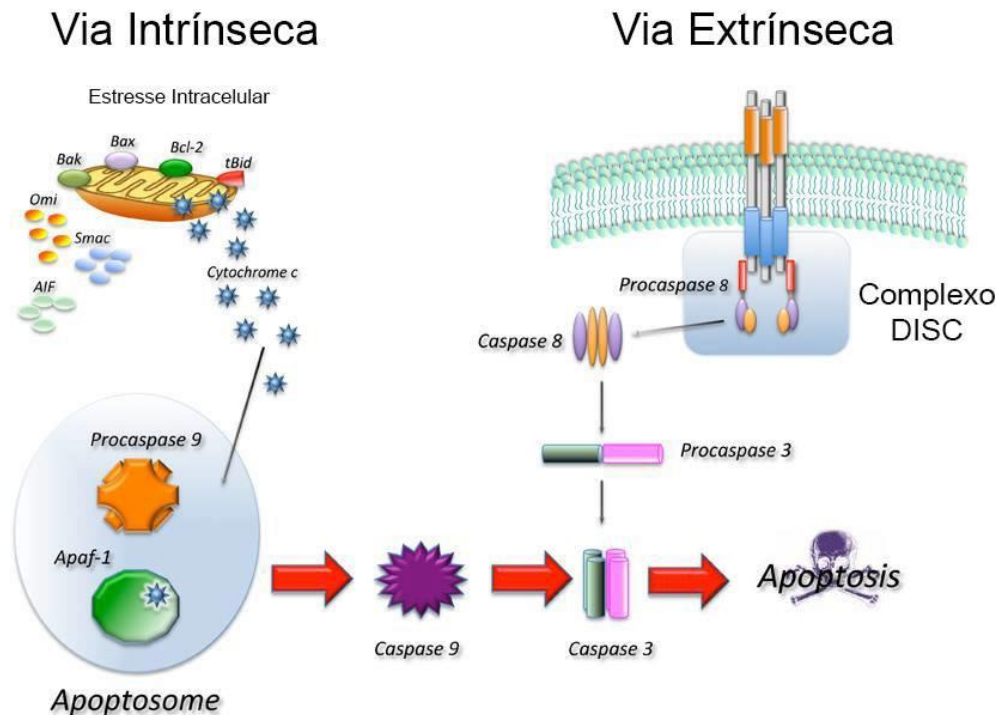


Figura 8: Vias de sinalização da apoptose.

A apoptose pode ocorrer através das vias de sinalização extrínseca e intrínseca. A via extrínseca ocorre através da ligação dos sinalizadores da morte (FasL, TNFA, TRAIL, Apo3L e Apo2L) aos receptores da morte (FasR, TNFR1, TNFR2, TRAIL R1, TRAIL R2, DR3, DR4 e DR5). Quando ativados, os receptores irão se ligar as “proteínas do domínio da morte” (TRADD ou FADD) e em seguida essas proteínas irão se associar a pró-caspase 8 formando o complexo DISC que irá ativar as caspases 8 e 10 que por sua vez irá ativar as caspases 3, 6 e 7. A via intrínseca é ativada por estresse intracelular que promove a liberação do citocromo C que irá se ligar a Apaf-1 formando o complexo apoptossomo que irá ativar pró-caspase 9 e 3 desencadeando na morte celular programada.

Fonte: Modificado de Favaloro *et al*, 2012.

1.8.4.2 BCL2

Inicialmente descrita em um linfoma não-Hodgkin de células B, a proteína BCL2 é um proto-oncogene pertencente a família de proteínas BCL2, cujo gene codificante está localizado no cromossomo 18q21 (Hockenbery *et al.*, 1990). A proteína está localizada no envelope nuclear, retículo endoplasmático e membrana mitocondrial externa e tem como função inibir a apoptose através do bloqueio da ação das caspases (Petit *et al.*, 1997; Mignotte e Vayssiere, 1998; Grivicich *et al.*, 2007) e impedindo a ativação e liberação de citocromo C (Adam & Corys, 2007).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Atuando na regulação da angiogênese tumoral, PTX3 tem exercido o papel como um forte antagonista natural desse processo ao se ligar a fatores pró-angiogênicos (FGF2 e FGF8b) e inibir a atividade mitogênica e angiogênica promovida por esses em células tumorais (Rusnati et al. 2004; Leali et al, 2011 e Ronca et al, 2013).

Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que PTX3 inibiu a proliferação celular das linhagens humanas de adenocarcinoma colorretal (HCT-116) e melanomas (SK-MEL-37 e SK-MEL-188) (Nunes, comunicação pessoal, 2016).

Diante dos achados de que PTX3 inibe a proliferação celular de tumores através de sua interação aos FGFs e de que as pentraxinas, CRP e NPTX2, induzem a apoptose e a parada no ciclo celular em monócitos, células de câncer pancreático humano e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), surge a hipótese deste trabalho de que PTX3 inibe a proliferação celular através do aumento da apoptose e parada no ciclo celular.

Logo se torna relevante investigar o papel de PTX3 na modulação de vários aspectos importantes relacionados à morfologia e fisiologia destas células, tais como a condensação do núcleo, presença de bolhas de membrana, estrutura do citoesqueleto de actina, a apoptose e o ciclo celular. Os dados destes estudos serão importantes para contribuir na caracterização funcional dos efeitos biológicos de PTX3 nos processos fisiológicos e na morfologia das células tumorais humanas e identificar uma possível ação citotóxica de PTX3 contra células tumorais.

3. OBJETIVOS

3.1-Objetivo Geral

Investigar o efeito biológico da proteína Pentraxina 3 sobre as características morfológicas e funcionais de células tumorais humanas.

3.2- Objetivos Específicos

3.2.1-Avaliar as alterações morfológicas nas linhagens celulares tumorais humanas derivadas de adenocarcinoma de cólon (HCT 116) e de melanoma (SK-MEL-37), em resposta ao tratamento com a proteína Pentraxina 3 recombinante humana (rhPTX3) por microscopia ótica de contraste de fase e imunofluorescência;

3.2.2- Avaliar os níveis de apoptose e progressão das fases do ciclo celular nas linhagens celulares tumorais humanas derivadas de adenocarcinoma de cólon (HCT 116) e de melanoma (SK-MEL-37), promovidas pelo tratamento com a proteína Pentraxina 3 recombinante humana (rhPTX3) por citometria de fluxo;

3.2.3- Analisar, por *Real Time* RT-PCR, as alterações do perfil de expressão dos genes pró-apoptóticos (BAX - *BCL2-associated X protein*), anti-apoptótico (BCL2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*), reguladores do ciclo celular MYC, CDKN1A (p21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), TP53 (tumor protein p53) promovidas pelo tratamento das linhagens celulares tumorais humanas derivadas de adenocarcinoma de cólon (HCT 116) e de melanoma (SK-MEL-37) com PTX3.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Proteína PTX3 recombinante humana

A proteína Pentraxina 3 recombinante humana (rhPTX3) foi gentilmente cedida pelo laboratório de Imunopatologia Experimental do Instituto Humanitas (Itália), coordenado pela pesquisadora Cecília Garlanda. A proteína foi produzida em células CHO (*chinese hamster ovary*) e foi purificada por imunoafinidade em condições livres de endotoxinas, sendo certificada por SDS-PAGE. A contaminação por lipopolissacarídeo (LPS) foi avaliada pelo ensaio LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) e testada pela ausência de estimulação de interleucina 6 (IL6) em monócitos (Garlanda *et al.*, 2002).

4.2 - Cultura de células

As linhagens tumorais humanas empregadas neste estudo foram a HCT-116 e a SK-MEL-37.

A linhagem de adenocarcinoma de cólon HCT-116 foi adquirida da ATCC (*American Type of Culture Collection*) e apresenta a morfologia do tipo epitelial, sendo que suas células são poligonais, aderentes, tumorigênicas e crescem de forma agrupada. A linhagem de melanoma SK-MEL-37 é uma linhagem também tumorigênica, proveniente do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* cujas células são aderentes, fusiformes e achatadas.

As células foram crescidas e expandidas de acordo com os protocolos da ATCC, sendo a linhagem HCT-116 cultivada em meio *McCoy's 5A Modified Medium* (Gibco), e a linhagem SK-MEL-37 crescida no meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram cultivadas em estufa a 37° C e atmosfera saturada com 5% de dióxido de carbono (CO₂). A autenticidade das linhagens foi realizada pela comparação do perfil de STR (*short tandem repeats*, INMETRO) com o banco de dados do ATCC.

Com o objetivo de garantir que todos os experimentos fossem realizados com as células na mesma passagem e minimizar alterações genéticas provenientes de repiques sucessivos, as células foram expandidas até atingir uma confluência entre 70 a 90% e, após duas ou três passagens, foram alíquotados em 10 criotubos contendo 2×10^6 milhões de células por criotubo e criopreservados em meio específico suplementado com 50% de SFB e 10% de dimetilsufóxido (DMSO), sendo os criotubos incubados em freezer -80 °C por 24 a 72 horas para em seguida serem armazenados em nitrogênio líquido.

4.3 - Análises Morfológicas

As análises morfológicas foram realizadas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG através de capturas com o software Zen Lite (ZEISS) utilizando filtros para rodamina-TRITC (excitação/emissão: 557/576 nm) e DAPI (350/470 nm) no microscópio de fluorescência Apotome.2 (ZEISS). Para as análises, foram capturados 10 campos aleatórios não sobrepostos ou 100 células por lamínula na magnitude de 400X e os seguintes parâmetros foram quantificados: ausência ou presença de núcleo condensado, bolhas de membrana, fibras de estresse, actina cortical e número de fibras transmembranares, lamelipódios e *ruffles* de membrana.

As linhagens foram plaqueadas em triplicatas sobre lamínulas nas quantidades de 2×10^4 (SK-MEL-37) e 4×10^4 (HCT-116) células por poço em placas de 24 poços (área de crescimento de $1,9 \text{ cm}^2$) com 500 μl de meio específico suplementado com 10% de SFB, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de L-glutamina por 24 horas para estabilização e adesão celular. Após esse tempo, o meio foi removido para adição de 400 μl de meio específico contendo ou não 2,64 $\mu\text{g/ml}$ de rhPTX3 e as células foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera saturada com 5% de CO_2 nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Em seguida, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X a 37°C para remoção de células mortas e resíduos de soro. Para a fixação das células foram adicionados 500 μl de paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma) em salina tamponada com fosfato (PBS) 1x por poço. Após 15 minutos de incubação na temperatura ambiente, o PFA foi removido e os poços foram totalmente preenchidos com PBS 1X, sendo as placas mantidas a 4-8 °C por 24 horas.

As lamínulas foram retiradas dos poços com o auxílio de pinças, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas por 1 hora em câmara úmida na presença de 20 μl de faloidina (10 ng/ml) conjugada com TRITC (*Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate*) (Sigma) diluída 1:5.000 em solução bloqueadora PGN/saponina (0,25% de gelatina, Sigma, 0,1% de azida sódica (Sigma) e 0,1% de saponina (Amersham) em PBS 1X). Para a marcação nuclear, foi adicionado a esta solução o corante nuclear DAPI (cloridrato de 4',6-diamindino-2-fenilindol; 10 μM , Molecular Probes) na diluição 1:1000.

Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas duas vezes com PBS 1X e montadas sobre lâminas de vidro com 20 μl de glicerol-PPD (1,4-*phenylenediamine*, Sigma) para preservação da fluorescência.

4.4 - Ciclo Celular

4.4.1 Avaliação da parada no ciclo celular por citometria de fluxo

Inicialmente foi realizado um experimento para verificar o tempo necessário de privação de soro para sincronização do ciclo celular das células em cultura.

As células foram plaqueadas em triplicatas na quantidade de 1×10^5 células por poço em uma placa com 24 poços contendo 500 µl de meio específico suplementado com 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de L-glutamina e foram incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera saturada de 5% de CO₂ por 24 horas (*overnight*) para a estabilização e adesão celular. Após esse período, o meio foi removido, e os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X estéril a 37°C para remoção de células mortas e do SFB. Em seguida, 500 µl de meio específico contendo 0,5% SFB foram adicionados. Após 18 horas de incubação, as células foram lavadas em PBS 1X a 37°C e desprendidas por tripsinização, transferidas para tubos de 1,0 ml e a suspensão centrifugada a 7.200 X g durante 5 minutos em uma micro -centrífuga (Denver Instrument Company, USA).

O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado de células foram adicionados 300 µl de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 mg/ml de iodeto de propídio - IP (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) e 0,1% de triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) em citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri USA). As amostras foram incubadas por 4h a 8 °C e, em seguida, as análises foram realizadas no Centro de Citometria do ICB através do *software* BD FACSCellquest no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson – BD Biosciences). Os resultados foram analisados através do *software* FlowJo VX (FlowJo, LLC and Illumina, Inc).

Para o tratamento com rhPTX3, as células foram plaqueadas em triplicatas nas quantidades de $1,2 \times 10^5$ (SK-MEL-37) e 8×10^4 (HCT-116) células para o tempo de 24 horas de tratamento e nas quantidades de 6×10^4 (SK-MEL-37) e 4×10^4 (HCT-116) células para o tempo de 48 horas. As células foram semeadas em uma placa de 24 poços com 500 µl de meio específico contendo 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de L-glutamina. Em seguida, as células foram privadas de soro nas mesmas condições do experimento anterior (0,5% de SFB por 18 e 24h). Após o tempo de privação, as células foram tratadas por 24 e 48 horas com 400 µl de meio específico contendo ou não 2,64 µg/ml de rhPTX3. Após o período de tratamento, o mesmo processo de tripsinização e marcação com a solução HFS foi realizado. As amostras foram incubadas por 4h a 8 °C e, em seguida, as análises foram feitas através do *software* BD FACSCellquest no citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson – BD Biosciences). Os resultados foram analisados através do *software* FlowJoVX (FlowJo, LLC and Illumina, Inc).

4.5 - Análise da Expressão Gênica

4.5.1 Extração de RNA

O RNA total das células foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) seguindo as recomendações e especificações da fabricante.

As células foram plaqueadas em triplicatas nas quantidades de 3×10^5 (HCT-116) e 2×10^5 (SK-MEL-37) células por poço em uma placa de 06 poços com 1000 µl de meio específico contendo 10% de SBF, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de L-glutamina. Em seguida, foram incubadas a 37 °C em atmosfera saturada de 5% de CO₂ por 24 horas (*overnight*) para estabilização e adesão celular. Quando atingida uma confluência de 70 a 80% de densidade, o meio foi aspirado e substituído com 900 µl de meio específico contendo ou não 2,64 µg/ml de rhPTX3 e as células foram tratadas por 3h para a análise da modulação de genes precoces.

Após as 3 horas de tratamento, o meio foi retirado e a monocamada de células foi lavada três vezes com PBS 1X a 37°C. O PBS 1X foi completamente removido para a adição de 1 ml de reagente TRIzol por poço (área de crescimento de 9,6 cm²) sobre a monocamada celular, sendo homogeneizado várias vezes com o auxílio de um micropipetador até a perda da viscosidade e transferido para microtubos de 1,5 ml, livre de nucleases para posterior homogeneização por 15 segundos por inversão.

Para permitir a completa dissociação do complexo de nucleoproteína, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (Merck) por microtubo, sendo as amostras homogeneizadas durante 15 segundos por inversão dos tubos e incubadas por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente. Para a separação da fase fenol-clorofórmio, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e em seguida foi coletada a fase aquosa superior. Para a precipitação do RNA total, 0,5 ml de isopropanol 100% (Merck) foi adicionado a cada 1 ml de TRIzol usado. O conteúdo dos microtubos foi homogeneizado por inversão repetida dos tubos, os mesmos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 1 ml de etanol 75% (Sigma), sendo centrifugado a 7.400 x g por 5 minutos a 4°C. O precipitado foi seco ao ar por 5 a 10 minutos e o RNA total foi homogeneizado em 10 µl de água Milli-Q autoclavada tratada com DEPC 0,1% (Sigma) para armazenamento a -20°C.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria no aparelho Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 260 nm. A estimativa de pureza do RNA foi feita pela análise da razão entre as absorbâncias 260/280 nm, que determina a

contaminação das amostras por proteína, e 260/230 nm, que estima a contaminação das amostras por sais. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm e 260/230 nm estivessem entre 1,8 e 2,0. A integridade do RNA extraído foi avaliada por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em tampão tris-acetato-EDTA 1X (TAE) corado com brometo de etídio. Foram considerados RNAs de boa qualidade os que não tiveram padrão de arraste de degradação (*smear*) no perfil e que apresentaram bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S cuja intensidade da primeira banda fosse igual ou maior à banda equivalente ao RNA 18S.

4.5.2 Transcrição Reversa

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), uma reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit ImProm-IITM (Promega). Alíquotas de 2 µg do RNA total foram adicionadas a 1 µl de iniciadores específicos oligo(dT)₁₅ (0,5 µg/µl) e água Milli-Q DEPC 0,1% (Sigma) em quantidade suficiente para (q.s.p.) 5 µl, sendo incubadas a 70°C por 10 minutos no termociclador (Corbett, Uniscience). Posteriormente, as amostras foram mantidas no gelo por 5 minutos para, em seguida, serem adicionados os seguintes reagentes à reação: 4,3 µl de água DEPC 0,1%; 4,0 µl de tampão ImProm 5X (Promega); 3,2 µl de MgCl₂ (25 mM) (Promega); 2,0 de dNTP mix (10 mM) (Eppendorf); 0,5 µl de RNasin (40 U/µl) (Promega) e 1,0 µl da enzima ImProm RT (20 U/µl) (Promega). A reação foi incubada a 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min no termociclador (Corbett, Uniscience).

A qualidade da reação de transcrição reversa foi avaliada através da amplificação dos genes constitutivos GAPDH (*forward* 5' - CTC TCT GCT CCT CCT GTT C – 3'; *reverse* 5' – GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC – 3') e NOTCH2 (*forward* 5' – TGT GGC CAA CCA GTT CTC CT 3'; *reverse* 5' – GGC AGT CATCAA TAT TCC TC – 3') em reações de PCR. As seguintes concentrações de reagentes foram utilizadas para as reações: 5,0 µl de PCR Buffer 5X; 1,5 µl de MgCl₂; 0,25 µl de dNTP mix 25 mM (Eppendorf); 1 µl de cada iniciador (10 pmol/µl)(IDT); 1 µl do cDNA molde e água Milli-Q autoclavada q.s.p. 25 µl. Como controle negativo da reação, todos os reagentes foram usados, exceto o cDNA molde que foi substituído por 1 µl de água Milli-Q.

Os parâmetros utilizados para as reações de PCR foram: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram fracionado por eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV (UVP Benchtop transiluminador). As amostras que apresentaram banda correspondente aos genes alvos sem sinais de inibição foram consideradas de boa qualidade.

4.5.3 Construção e análise dos iniciadores específicos

Inicialmente, foi realizada uma busca no NCBI (*National Center for Biotechnology*) pela sequência nucleotídica do transcrito. A sequência encontrada foi submetida a uma análise de similaridade por alinhamento através do algoritmo BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*) para identificar as diferentes isoformas, assim como o grau de similaridade entre as sequências. Os iniciadores foram construídos abrangendo regiões de anelamento presente em todas as isoformas e em regiões de junção de éxons com o intuito de se evitar amplificação de DNA genômico. Em seguida, os iniciadores selecionados foram submetidos à análise empregando o programa *Oligoanalyzer* (*Integrated DNA Technologies, IDT*), de forma a escolher aqueles que atendessem os parâmetros apresentados na Tabela 1:

Tamanho dos iniciadores	18 a 25 bp
Conteúdo CG	40 a 60%
Temperatura de melting	55 a 60°C
ΔG Hairpin, Dímero e Heterodímero	> - 9.0 kcal/mole
Tamanho do produto	70 a 120 bp

ΔG energia livre de Gibbs

Tabela 1: Parâmetros utilizados para a construção dos iniciadores.

Posteriormente, foi realizada uma PCR *in silico* usando o programa *Amplify* 1.2 (Bill Angels ©1992, *University of Wisconsin*) para simular a PCR e avaliar os resultados dessa reação, otimizando o desenho dos iniciadores específicos.

4.5.4 Análise da Expressão Gênica Basal por RT-PCR

A análise da expressão gênica basal foi realizada com o objetivo de selecionar, dentre as linhagens celulares usadas no estudo, aquelas que apresentavam expressão constitutiva dos genes de interesse para que pudessem ser utilizadas nas etapas de padronização da RT-PCR em tempo real (qPCR).

As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições: 5,0 µl de PCR Buffer 5X; 1,5 µl de MgCl₂; 0,25 µl de dNTP mix 25 mM (Eppendorf); 1 µl de cada iniciador (10 pmol/µl); 1 µl do cDNA molde e água Milli-Q autoclavada q.s.p. 25 µl. Como controle negativo da reação, todos os reagentes foram usados, exceto o cDNA molde que foi substituído por 1 µl de água Milli-Q.

As reações foram incubadas no termociclador (*Materncycle*, Eppendorf) nas seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto; 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação (*amplicon*) foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 2% em TAE 1X corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV (transiluminador UVP Benchtop). Para a análise do resultado, as bandas obtidas dos genes de interesse foram comparadas quanto ao tamanho esperado do produto em relação ao marcador de peso molecular 50 bp DNA *Ladder* (ThermoFisher Scientific).

4.5.5 Avaliação da alteração do perfil de expressão gênica por RT-qPCR

O perfil de expressão gênica das linhagens tumorais tratadas ou não com rhPTX3 (2,64 µg/ml) foi avaliado por RT-qPCR em placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Life Technologies), utilizando o sistema de fluorescência SYBR Green Master Mix (Applied Technologies) na plataforma ABI 7900 HT Real Time PCR (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

Para a padronização das reações foram realizadas curvas de diluição seriada do cDNA (1:10, 1:100 e 1:1000) de células que sabidamente expressavam os genes de interesse, conforme descrito no item 3.5.4, utilizando concentrações variadas de iniciadores específicos (5 a 10 pmol/µl). As reações foram avaliadas através do perfil da curva de dissociação e da eficiência de amplificação (E) que é calculada pela inclinação (*slope*) da curva de diluição do cDNA sobre o valor C_t (ciclo de quantificação) através da equação 1 sugerida Hellemans (Hellemans et al., 2007):

Equação 1: Para cálculo da eficiência de amplificação

$$E(\%) = [(10)^{-1/slope} - 1] \times 100$$

A especificidade da reação foi avaliada pela curva de dissociação. Para cada um dos genes amplificados, foram padronizadas as condições que apresentaram eficiência entre 90-110% e com um pico único nas curvas de dissociação. Em todas as reações de amplificação foi usado um programa de ciclagem universal: 1 ciclo de 50°C 2' / 95°C 10'; 40 ciclos de 95°C por 15' / 60°C por 1'. A curva de dissociação foi obtida pelas seguintes condições: 95°C 15', 60°C 15' e 95°C 15'.

Após a padronização da reação, a expressão gênica de células tratadas ou não com rhPTX3 foi realizada com iniciadores específicos na concentração de 10 pmol/µl e cDNA na diluição de 1:10 para todos os genes. Os dados foram obtidos pelo *software* SDS 2.4 (Life Technologies) e analisados através do método de quantificação relativa normalizada para três genes de expressão constitutiva: GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), HPRT1 (hipoxantina fosforibosil-transferase 1) e ACTB (actina, beta) usando a fórmula

proposta por Hellemans (Hellemans et al., 2007) (Equação 2), onde NRQ é expressão relativa normalizada, $E^{\Delta Ct}$ é eficiência de amplificação dos iniciadores dos genes, goi: gene de interesse e ref₀: genes de referência (calibradores); Π é media geométrica de f: total de genes de referência.

Equação 2: Para cálculo da expressão relativa normalizada utilizando três genes calibradores

$$NRQ = \frac{E_{goi}^{\Delta Ct, goi}}{\sqrt[n]{\Pi_0^n E_{ref0}^{\Delta, ref}}}$$

4.6 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism 6.0 e foram considerados valores estatisticamente significantes aqueles com $p < 0,05$.

Para a análise dos dados de citometria de fluxo foi realizado o teste *two way anova* com pós-teste de Bonferroni, enquanto que para a análise da expressão gênica e das modificações do citoesqueleto de actina foi utilizado o teste t de *Student* e o teste *Mann-Whitney*.

5 RESULTADOS

5.1 Construção e análise dos iniciadores

Todos os iniciadores foram construídos em regiões de junção de éxons e de alta similaridade entre as diferentes isoformas, assim como atendendo todos os critérios definidos conforme tabela 1. O resumo geral dos iniciadores está descrito na tabela 3.

Gene		Sequência 5' - 3'	Tamanho (bp)	GC %	T _M	Hairpin ΔG	Dímero ΔG	Hetero-dímero ΔG	Éxon	Amplicon (pb)
BAX	Fw	CCG AGA GGT CTT TTT CCG AG	20	55	55.2	-0.99	-3.61	-4.67	2	108
	Rv	GC CTT GAG CAC CAG TTT	17	52.9	53	-0,75	-3.14		2 e 3 *	
BCL2	Fw	AGG ATA ACG GAG GCT GGG AT	20	55	57.9	0.38	-3,61	-6,21	2 e 3 *	106
	Rv	CAG GGC CAA ACT GAG CAG AG	20	60	58.4	-0,84	-9,28		3	
CCND1	Fw	TCA AAT GTG TGC AGA AGG AGG	21	47.6	55.3	1.27	-7.05	-6.24	1	80
	Rv	TCT GTT CCT CGC AGA CCT	18	55.6	55.6	-1,13	-5.13		1 e 2 *	
MYC	Fw	GTA GTG GAA AAC CAG CAG CC	20	55	56.3	0.97	-5.02	-3.14	1 e 2 *	109
	Rv	TCG TCG CAG TAG AAA TAC GG	20	50	54.3	0.03	-4.95		2	
CDKN1A	Fw	GAC CTC TAA AGA CCC CAG AAA T	22	45.5	54	1.09	-3.17	-5,49	1 e 2 *	69
	Rv	ACA CAG GAC TTT TGC CTC CT	20	50	56.5	0.2	-6.24		2	
TP53	Fw	TGA GGT TGG CTC TGA CTG TA	20	50	55.4	-1.59	-3.17	-4.89	2 e 3 *	103
	Rv	CCA GTG TGA TGA TGG TGA GG	20	55	55.4	0.8	-5.02		3	

*Iniciadores desenhados em região de junção dos dois éxons

Tabela 2: Lista dos iniciadores construídos e utilizados nas reações de RT-PCR e RT-qPCR para análise da expressão gênica.

5.2 Análise da expressão gênica basal por RT-PCR

Na análise das reações de PCR realizadas, foi possível observar a expressão de BAX em todas as linhagens, exceto na SK-MEL-188. Os genes BCL2, MYC, TP53 e CCND1 apresentaram bandas do tamanho esperado de seus respectivos pesos moleculares (106, 109, 103 e 80 pb). No entanto, não foi constatada a expressão de CDKN1A em nenhuma linhagem tumoral.

Uma síntese da expressão basal dos genes BAX, BCL2, MYC, CDKN1A, TP53 e CCND1 nas linhagens tumorais HCT-116, SK-MEL-37 e SK-MEL-188 pode ser visualizada na tabela 3, onde o sinal positivo (+) indica que houve expressão e um sinal negativo (-) que a expressão não foi detectada.

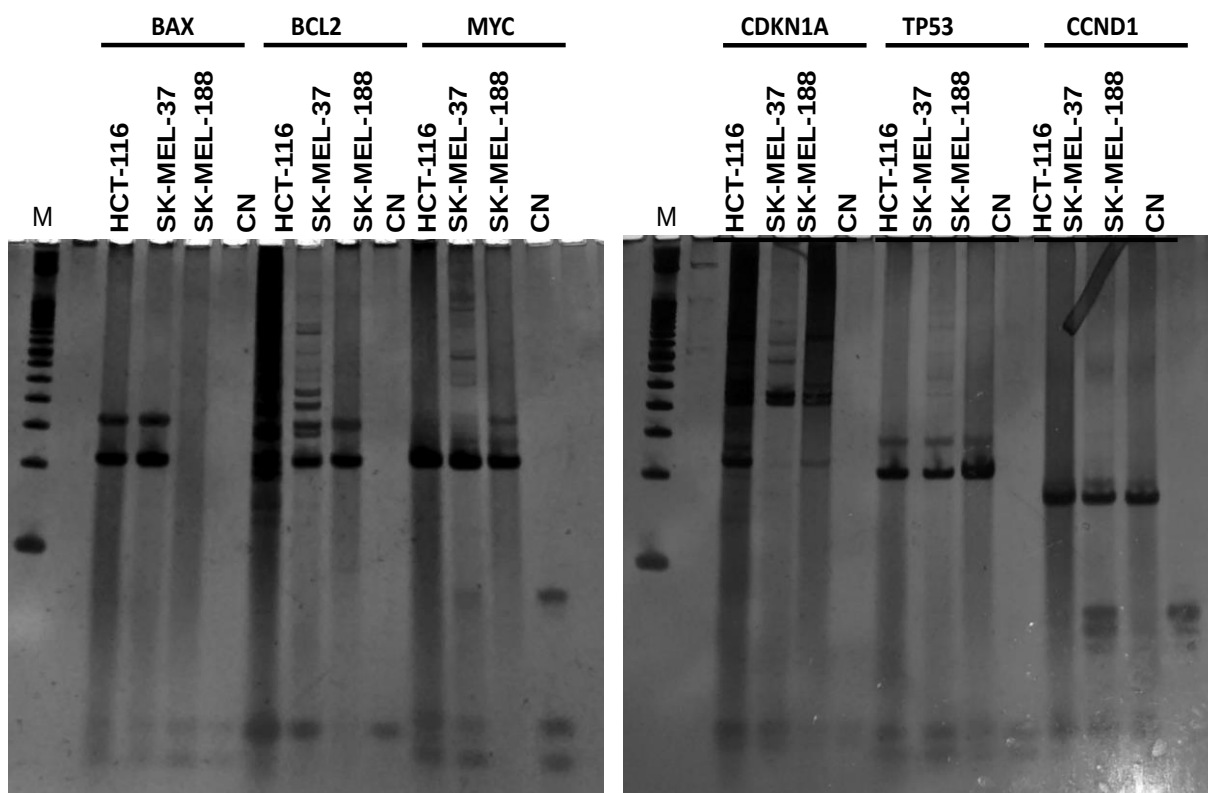


Figura 9: Análise da expressão gênica basal de BAX, BCL2, MYC, TP53, CCND1 e CDKN1A nas linhagens tumorais HCT-116, SK-MEL-37 e SK-MEL-188.

As linhagens tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e melanomas (SK-MEL-37 e SK-MEL-188) foram crescidas em meio específico contendo 10% de SFB e incubadas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até atingir uma confluência de aproximadamente 70-90%. Em seguida, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método de TRIzol e utilizados como molde em reações de RT. O cDNA sintetizado foi utilizado como molde nas reações de PCR para os genes alvo. O produto da reação de PCR foi fracionado eletroforéticamente em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. Em ambas as imagens: canaleta: marcador de peso molecular 50 bp; Canaleta 3-5, 7-9 e 11-13: HCT-116, SK-MEL-37 e SK-MEL-188; Canaleta 2,6, 10 e 14: controle negativo (CN). Tamanho do produto de PCR de BAX: 108 pb; BCL2: 106 pb; MYC: 109 pb; CDKN1A: 69 pb; TP53: 103 pb; e CCND1: 80 pb.

Em seguida, para verificar a expressão induzida de CDKN1A foi realizado o tratamento com LPS (100 µg/ml) por 4 horas na linhagem HCT-116 de acordo com resultados obtidos por Juknat e colaboradores que mostraram o aumento da expressão gênica de CDKN1A mediante a esse tratamento. Para a visualização do produto de PCR foi realizado o fracionamento eletroforético em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Como controle positivo da reação foi avaliada a expressão de GAPDH, gene constitutivo, na linhagem tratada. Não foi possível observar a expressão de CDKN1A no cDNA da célula tratada (figura 10).

Com o objetivo de otimizar a reação de PCR para o gene CDKN1A, foram realizadas alterações na temperatura de anelamento, assim como foi acrescentado 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) sozinho e em conjunto com concentrações variadas de MgCl₂ (1.5

a 3 mM) nas reações de PCR usando os cDNAs obtidos das linhagens HCT-116, DLD-1, HUVEC, SW480 e HT1080.

Linhagem	Genes					
	BAX	BCL2	MYC	CDKN1A	TP53	CCND1
HCT-116	+	+	+	-	+	+
SK-MEL-37	+	+	+	-	+	+
SK-MEL-188	-	+	+	-	+	+

Tabela 3: Expressão gênica basal de BAX, BCL2, MYC, CDKN1A, TP53 e CCND1 nas linhagens tumorais HCT-116, SK-MEL-37 e SK-MEL-188.

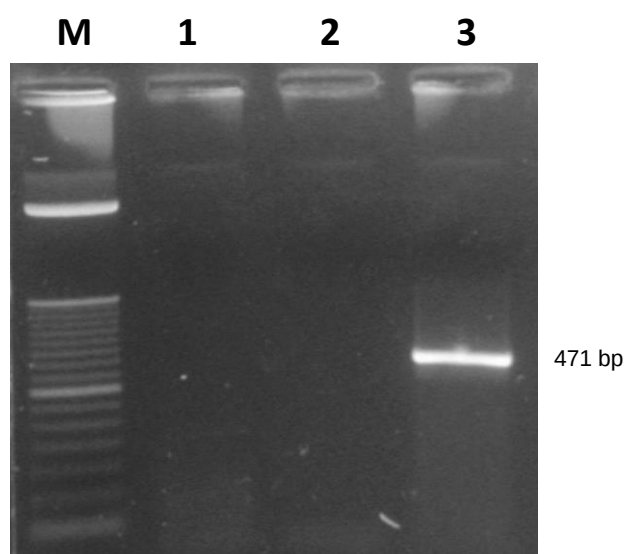


Figura 10: Amplificação por PCR do gene CDKN1A a partir do cDNA de células HCT-116 tratadas com LPS. As células HCT-116 foram tratadas por 4h com LPS (100ug/ml) e o RNA extraído usando TRIZOL. Após a transcrição reversa, o cDNA foi utilizado como molde em reações de PCR empregando iniciadores específicos para o gene CDKN1A. O produto amplificado foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 2% em TAE, corado com brometo de etídeo. Canaleta M: marcador de tamanho molecular 50bp; canaleta 1: produto amplificado utilizando como molde o cDNA das células HCT116 tratadas com LPS e utilizando iniciadores específicos para CDKN1A; canaleta 2: controle negativo (no DNA); canaleta 3: controle positivo: produto amplificado a partir do cDNA das células HCT116 tratadas com LPS utilizando iniciadores específicos para GAPDH.

O DMSO atua como um agente intensificador da PCR, facilitando a desnaturação total das fitas do DNA principalmente em regiões ricas em nucleotídeos G e C (Vieira, 2002). As bandas do produto obtidas não apresentaram o tamanho esperado, sendo assim em nenhuma das reações foi possível verificar a amplificação do gene CDKN1A (figuras 11,12 e 13).

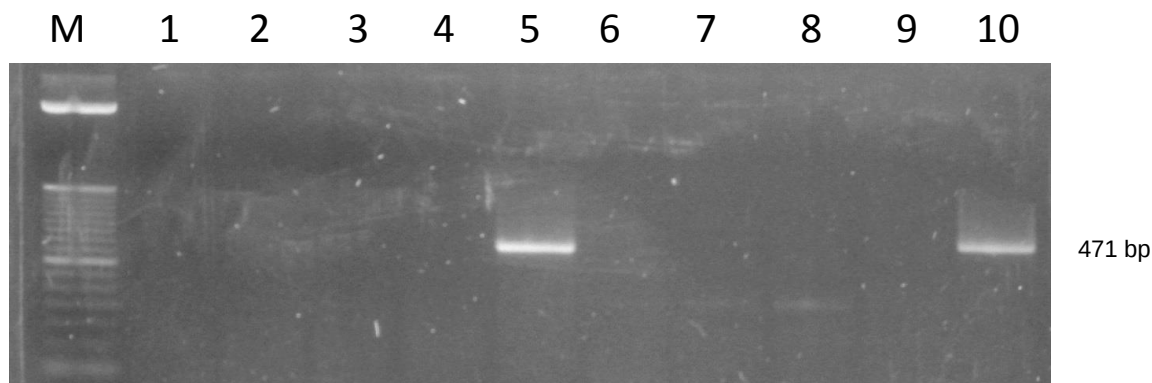


Figura 11: Otimização das reações de PCR para amplificação do gene CDKN1A variando as temperaturas de anelamento.

Células HCT-116 ou DLD1 tratadas com LPS. O RNA foi extraído pelo método de TRIZOL e após a transcrição reversa, o cDNA foi utilizado como molde em reações de PCR empregando iniciadores específicos para o gene CDKN1A e GAPDH. O produto amplificado foi fracionado eletroforicamente em gel de agarose 2% em TAE, corado com brometo de etídeo. Canaleta M: marcador de tamanho molecular 50bp; Canaletas de 1 a 4: produto amplificado utilizando como molde o cDNA das células HCT116 e utilizando iniciadores específicos para CDKN1A. As temperaturas de anelamento utilizadas foram 53°C (canaleta 1), 51°C (canaleta 2), 49 °C (canaleta 3) e 47 °C (canaleta 4); Canaleta 5: produto amplificado utilizando como molde o cDNA das células HCT116 e utilizando iniciadores específicos para GAPDH com temperatura de anelamento de 55°C; Canaletas de 6 a 9: produto amplificado utilizando como molde o cDNA das células DLD1 e utilizando iniciadores específicos para CDKN1A nas seguintes temperaturas de anelamento: 53°C (canaleta 6), 51°C (canaleta 7), 49°C (canaleta 8), 47°C (canaleta 9); Canaleta 10: produto amplificado utilizando como molde o cDNA das células DLD1 e utilizando iniciadores específicos para GAPDH com temperatura de anelamento de 55°C

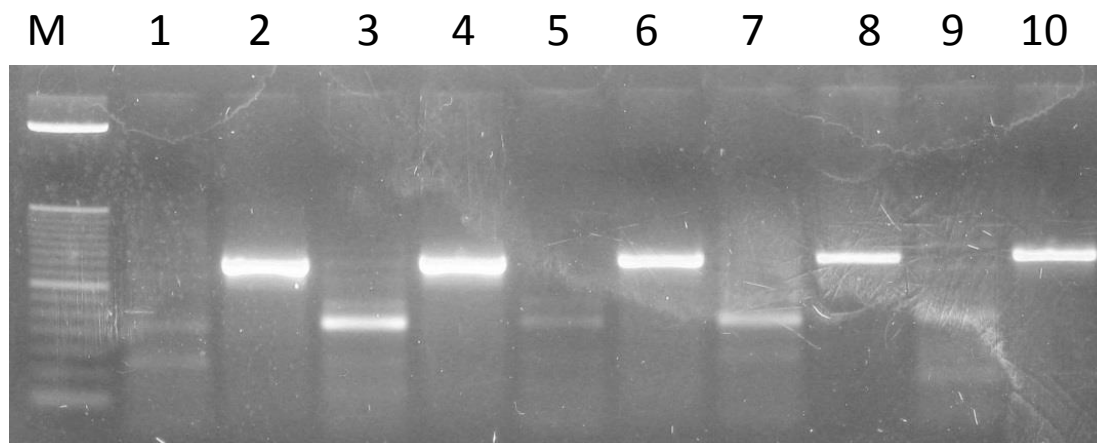


Figura 12: Otimização das reações de PCR utilizando DMSO 1%.

O RNA total de células HCT-116, DLD1, HUVEC, SW480 e HT1080 foi extraído, reversamente transcrito e o cDNA utilizado como molde em reações de PCR empregando iniciadores específicos para os genes CDKN1A e GAPDH em presença de 1% de DMSO. O produto amplificado foi fracionado em gel de agarose 2% em TAE, corado com brometo de etídeo. Canaleta M: marcador de tamanho molecular 50bp; Canaleta 1: amplificação CDKN1A do cDNA de HCT-116; Canaleta. 2: amplificação GAPDH do cDNA de HCT-116; Canaleta 3: amplificação CDKN1A do cDNA de DLD1; Canaleta 4: amplificação GAPDH do cDNA de DLD1; Canaleta 5: amplificação CDKN1A do cDNA de HUVEC; Canaleta 6: amplificação GAPDH do cDNA de HUVEC; Canaleta. 7: amplificação CDKN1A do cDNA de SW480; Canaleta 8: amplificação GAPDH do cDNA de SW480; Canaleta.9: amplificação CDKN1A do cDNA de HT1080; Canaleta 10: amplificação GAPDH do cDNA de HT1080.

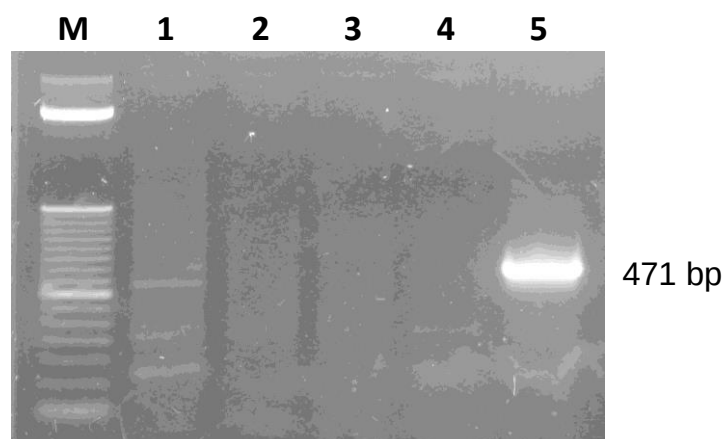


Figura 13: Reações de PCR com DMSO 1% e variadas concentrações de $MgCl_2$.

O RNA total de células HCT-116 tratadas com LPS foi extraído, reversamente transcrito e o cDNA utilizado como molde em reações de PCR empregando iniciadores específicos para os genes CDKN1A e GAPDH em presença de 1% de DMSO e diferentes concentrações de $MgCl_2$. O produto amplificado foi fracionado em gel de agarose 2% em TAE, corado com brometo de etídeo. Canaleta M: marcador de tamanho molecular 50bp; Canaleta 1: 1,5 mM de $MgCl_2$; Canaleta 2: 2,0 mM de $MgCl_2$; Canaleta 3: 2,5 mM de $MgCl_2$; Canaleta 4: 3,0 mM de $MgCl_2$; Canaleta 5: controle positivo (amplificação do gene GAPDH).

Diante das tentativas fracassadas de amplificação do gene CDKN1A, com o par de iniciadores utilizados, desenhamos novos pares dos iniciadores específicos seguindo os mesmos critérios descritos no tópico 3.6.3. A sequência dos iniciadores é mostrada na Tabela 4.

Gene		Sequência 5' - 3'	Tamanho (bp)	GC %	T_M	Hairpin ΔG	Dimero ΔG	Hetero-dimero ΔG	Éxon	Tamanho do produto (pb)
CDKN1A	Fw	CAG ACC AGC ATG ACA GAT TTC TAC	24	45,8%	55,4	-0,2	-5,38	-4,74	Junção 2 e 3	69
	RV	CGG ATT AGG GCT TCC TCT TG	20	55%	55,1	-0,95	-4,67		3	

Tabela 4: Novo par de Iniciadores construídos e utilizados na reação de RT-qPCR para a amplificação do gene CDKN1A.

Os iniciadores foram usados em reações de PCR nas quais várias temperaturas de anelamento foram testadas (55, 53 e 51°C) e foram usados como molde os cDNAs das linhagens HCT-116 tratada com LPS, SK-MEL-37 e SK-MEL-188. Para a visualização das bandas, foi realizado um fracionamento eletroforético em gel de agarose 2%. Em todas as reações foi constatada a presença do produto amplificado de tamanho correspondente ao esperado para CDKN1A (figura 14).

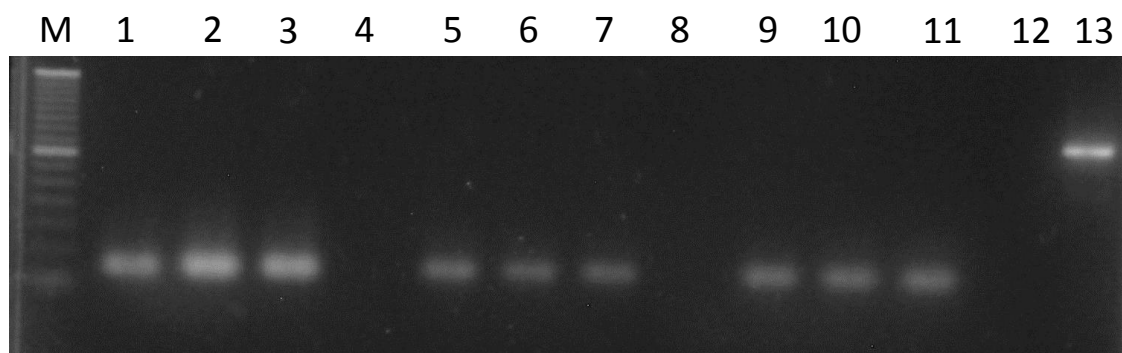


Figura 14: Reações de PCR com os novos iniciadores específicos para CDKN1A.

O RNA total de células HCT-116 tratada com LPS, SK-MEL-37 e SK-MEL-188 foi extraído, reversamente transcrito e o cDNA utilizado como molde em reações de PCR empregando os novos iniciadores específicos desenhados para a amplificação do gene CDKN1A em presença de diferentes temperaturas de anelamento. O produto amplificado foi fracionado em gel de agarose 2% em TAE, corado com brometo de etídeo. Canaleta M: marcador de tamanho molecular 50bp; Canaletas 4, 8 e 12: controle negativo (no DNA); Canaletas 1 a 3: cDNA de HCT-116 e amplificação de CDKN1A à temperatura de 55°C (canaleta 1), 53°C (canaleta 2) e 51°C (canaleta 3); Canaletas 5 a 7: cDNA de SK-MEL-37 e amplificação de CDKN1A à temperatura de 55°C (canal. 5), 53°C (canaleta 6) e 51°C (canaleta 7); Canaletas 9 a 11: cDNA de SK-MEL-188 e amplificação de CDKN1A à temperatura de 55°C (canaleta 9), 53°C (canaleta 10) e 51°C (canaleta 11);

5.3 Extração, quantificação e análise da qualidade e integridade do RNA total

As linhagens HCT-116 e SK-MEL-37 foram plaqueadas em triplicatas e após atingida uma confluência de 70 a 90% foi realizada a extração de RNA pelo método de TRIzol. A quantificação e a análise da qualidade dos RNAs extraídos foi feita no equipamento Nanodrop e conforme mostrado nas tabelas 5 e 6, todas as amostras apresentaram boa quantidade e qualidade, uma vez que os valores encontrados das razões 260/280 e 260/230 estavam próximos de 2,0. , (Tabelas 5 e 6).

Para verificarmos a integridade do RNA extraído, foi feito um fracionamento eletroforético de 400 ng de cada amostra em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Como mostrado na figura 15, todos os RNAs apresentaram boa qualidade demonstrada pela presença das bandas correspondentes aos rRNAs 28S com o dobro da intensidade do rRNA 18S com pouco ou quase nenhum arraste.

Amostra	Concentração (ng/μl)	A260/280	A260/230	RNA Total (μg/μl)
SK-MEL-37 Controle 1	153,7	2,1	2,22	15,37
SK-MEL-37 Controle 2	200	2,03	2,16	20
SK-MEL-37 Controle 3	256,5	2,03	2,2	25,65
SK-MEL-37 Tratado 1	302,6	2,02	2,27	30,26
SK-MEL-37 Tratado 2	270,1	2,03	2,28	27,01
SK-MEL-37 Tratado 3	316,8	2,01	2,29	31,68

Tabela 5: Parâmetros quantitativos e qualitativos do RNA total extraído da linhagem SK-MEL-37 tratado ou não com rhPTX3.

Amostra	Concentração (ng/μl)	A260/280	A260/230	RNA Total (μg/μl)
HCT-116 Controle 1	503,9	2,04	2,09	50,39
HCT-116 Controle 2	486	2	2,33	48,6
HCT-116 Controle 3	322,6	2,07	2,25	32,26
HCT-116 Tratado 1	296,6	2	2,16	29,66
HCT-116 Tratado 2	428,1	2,01	2,08	42,81
HCT-116 Tratado 3	393,3	2,04	2,02	39,33

Tabela 6: Parâmetros quantitativos e qualitativos do RNA total extraído da linhagem HCT-116 tratado ou não com rhPTX3.

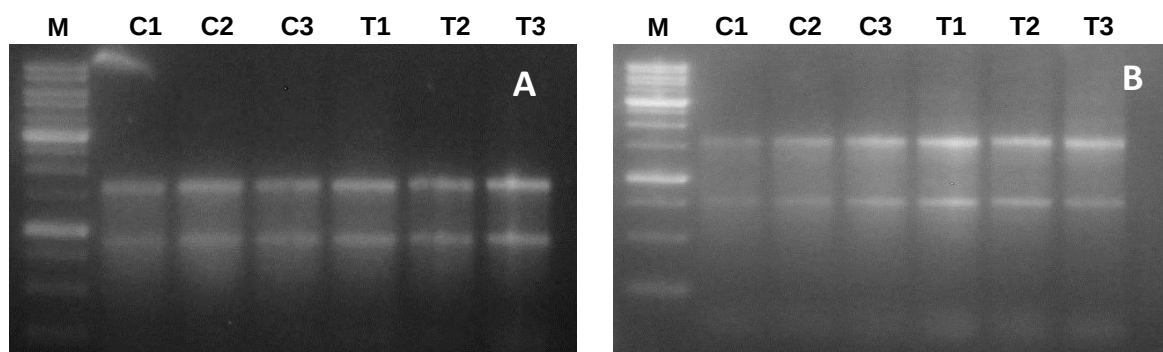


Figura 15: Análise da integridade do RNA total extraído das linhagens SK-MEL-37 e HCT-116. O RNA total de células SK-MEL-37 (A) e HCT-116 (B) foi extraído pelo método TRIZOL e fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1,5% em TAE e corado com brometo de etídeo.

5.4 Síntese de cDNA e avaliação da qualidade da transcrição reversa

Os RNAs totais extraídos foram submetidos a reação de transcrição reversa utilizando 2 μg do RNA total de cada amostra e iniciadores oligodTs como descrito no tópico 3.6.2. A qualidade da transcrição reversa foi avaliada através da amplificação do gene constitutivo NOTCH2 por reação de PCR empregando iniciadores específicos. Os produtos amplificados foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo. Todas as amostras apresentaram a banda de tamanho esperado (310 bp) do gene alvo indicando a eficiência da transcrição e a ausência de inibidores nas amostras de cDNA (Figura 16).

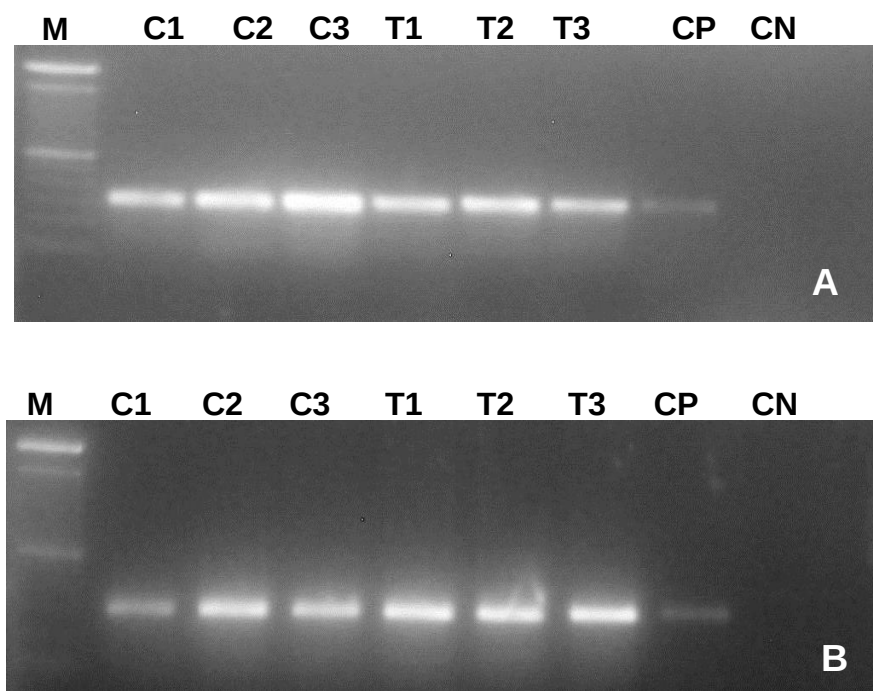


Figura 16: Controle da qualidade do cDNA sintetizado das linhagens SK-MEL-37 e HCT-116 tratadas ou não com rhPTX3.

As células da linhagem SK-MEL-37 (A) e HCT-116 foram cultivadas na ausência (C1, C2 e C3) ou presença (T1, T2 e T3) da proteína PTX3 recombinante humana (2,64 ug/ml por 3 horas) e, em seguida o RNA total foi extraído pelo método do TRIZOL. Após a transcrição reversa utilizando iniciadores Oligo dT, o cDNA foi utilizado como molde em reações de PCR utilizando iniciadores específicos para o gene NOTCH2. O produto amplificado foi fracionado em gel de agarose 2% em TAE, corado com brometo de etídeo.

5.5 Análise do perfil de expressão gênica por RT-qPCR

Primeiramente, foi avaliada a eficiência de amplificação dos iniciadores para os transcritos dos genes BAX, BCL2, MYC, TP53, CDKN1A e CCND1 com base na inclinação da curva (*slope*) e empregando como molde diferentes diluições do cDNAs molde (1:10; 1:100 e 1:1000) da linhagem SK-MEL37, a qual, conforme mostrado na figura 9 expressa todos os genes alvo do estudo. Foram utilizadas concentrações variadas dos iniciadores (5, 10 e 15 pmol/ μ l), cujos valores de inclinação variavam de -3,1 a -3,6 (110-90% de eficiência, respectivamente). As reações foram avaliadas através da eficiência de amplificação calculada pela equação 1 e pelo perfil da curva de dissociação, em que foi observado a existência de um único pico de amplificação para todos os genes (Figura 17 A a E) , exceto para CCND1 que apresentou dois picos na curva de dissociação, indicativo da presença de produtos inespecíficos ou dímeros dos iniciadores (Figura 17F).

Para todos os genes, as condições foram otimizadas na diluição 1:10 de cDNA e na concentração 10 pmol/ μ l dos iniciadores específicos, conforme a tabela 7 abaixo. Os

normalizadores GAPDH, ACTB e HPRT1 foram otimizados na diluição 1:10 de cDNA e nas concentrações de 10 pmol/μl e 5 pmol/μl, respectivamente (Nunes, comunicação pessoal).

Gene	Slope	Eficiência	Threshold	Diluição cDNA	Iniciadores [pmol/μl]
BAX	-3,33	100%	0,2	01:10	10
BCL2	-3,31	100%	0,2	01:10	10
MYC	-3,36	99%	0,2	01:10	10
TP53	-3,34	99%	0,2	01:10	10
CDKN1A	-3,39	97%	0,53	01:10	10
GAPDH	-3,5	93%	0,26	01:10	10
ACTB	-3,23	104%	0,4	01:10	10
HPRT1	-3,55	91%	0,24	01:10	5

Tabela 7: Parâmetros otimizados para cada par de iniciadores para RT-qPCR dos genes listados.

Após a padronização, as reações foram realizadas em triplicatas técnicas tanto para o grupo controle como para o tratado para cada cDNA diluído 1:10. Os genes constitutivos GAPDH, HPRT1 e ACTB foram utilizados como normalizadores dos índices de fluorescência dos genes alvos e os valores de expressão gênica relativa não apresentaram diferença estatística significativa (teste t de *Student*) entre os grupos controle e tratado (figura 18).

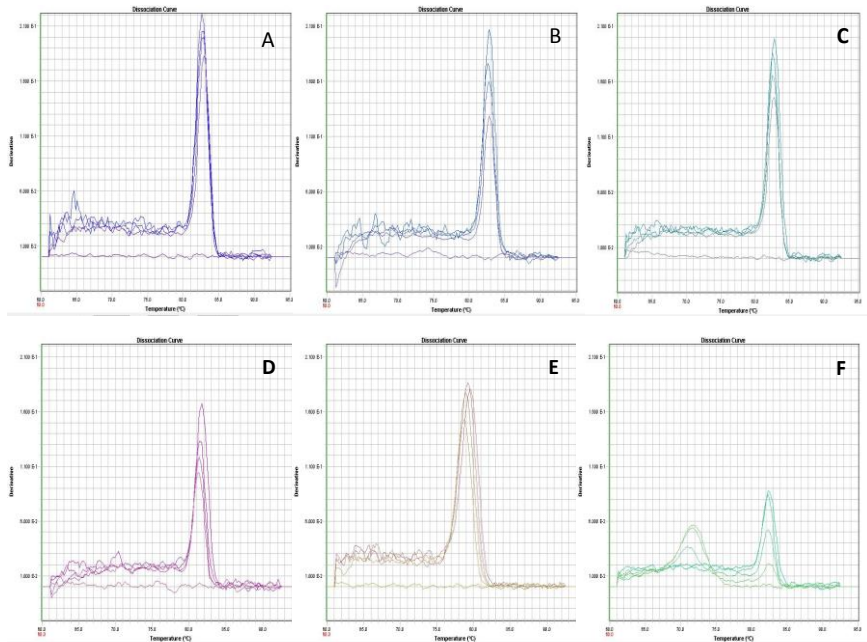


Figura 17: Curvas de dissociação dos iniciadores para otimização das reações de RT-qPCR. A linhagem SK-MEL-37 foi plaqueada em meio DMEM contendo 10% de SFB e incubada a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até atingir uma confluência de aproximadamente 70-90%. Em seguida, o RNA total foi extraído pelo método de Trizol e utilizado como molde em reações de RT.O cDNA sintetizado foi utilizado como molde nas reações de qPCR em variadas diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) empregando os iniciadores específicos (5, 10 e 15 pmol/μl) para a amplificação dos genes alvos: **(A)** BAX; **(B)** BCL2; **(C)** MYC; **(D)** TP53; **(E)** CDKN1A e **(F)** CCND1.

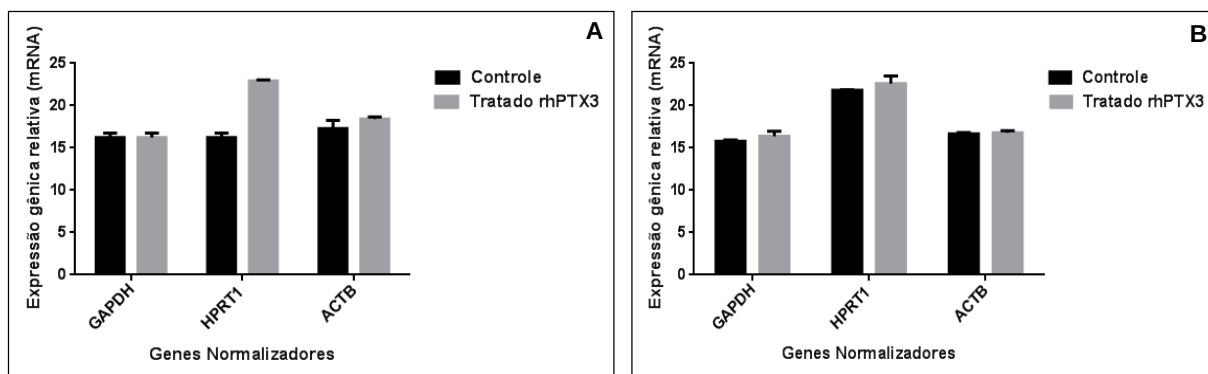


Figura 18: Análise do efeito de rhPTX3 na expressão dos genes normalizadores GAPDH, HPRT1 e ACTB na linhagens HCT-116 e SK-MEL-37.

Os níveis de expressão gênica dos genes normalizadores GAPDH, HPRT1 e ACTB foram avaliados nas linhagens HCT-116 (A) e SK-MEL-37 (B) por RT-qPCR em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 pelo método SYBR *Green*. A quantificação relativa foi calculada pela equação proposta por Hellemans (Hellemans *et al.*, 2007). As células foram plaqueadas em triplicatas técnicas contendo DMEM 10% SFB. Após 24 horas, no grupo tratado o meio foi removido e foi adicionado novo meio contendo 2,64 µg/ml de rhPTX3. Após 3 horas de incubação, o RNA total foi extraído pelo método TRIzol e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando o oligo(dT)₂₀ ancorados. Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x.

Na linhagem de melanoma humano SK-MEL-37, o tratamento com rhPTX3 por três horas não modulou a expressão de nenhum dos genes alvos do estudo (Figura 19).

Diferentemente da linhagem SK-MEL-37, o tratamento com rhPTX3 por três horas na linhagem HCT-116 modulou a expressão do gene CDKN1A reduzindo a quantidade de transcritos no grupo tratado ($0,97 \pm 0,0057$; $p < 0,05$) em comparação ao grupo controle ($1,0 \pm 0,0054$) (figura 20).

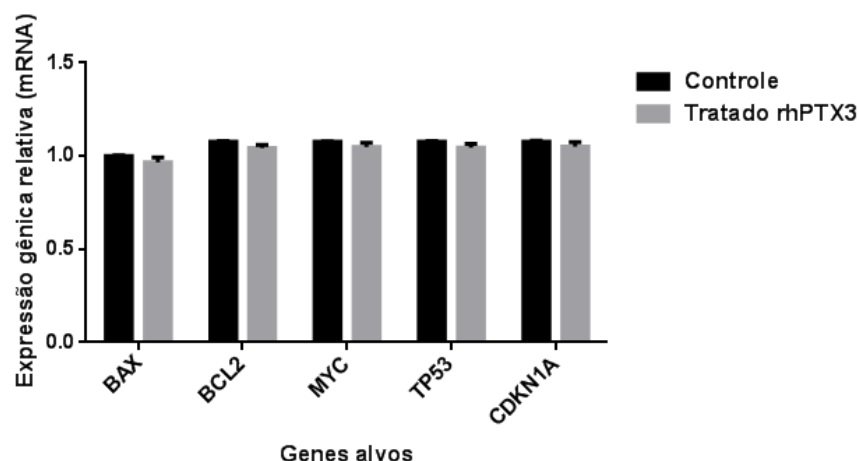


Figura 19: Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de SK-MEL-37.

Os níveis de expressão gênica de genes pró (BAX) e anti-apoptóticos (BCL2) e reguladores do ciclo celular (MYC, TP53 e CDKN1A) foram avaliados por RT-qPCR em triplicata técnica de um cDNA diluído em 1:10 pelo método SYBR *Green*. A quantificação relativa foi calculada pela equação proposta por Hellemans (Hellemans *et al.*, 2007). As células foram plaqueadas em triplicatas técnicas contendo DMEM 10% SFB. Após 24 horas, no grupo tratado o meio foi removido e foi adicionado novo meio contendo 2,64 µg/ml de rhPTX3. Após 3 horas de incubação, o RNA total foi extraído pelo método TRIzol e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando o oligo(dT)₂₀ ancorados. Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x.

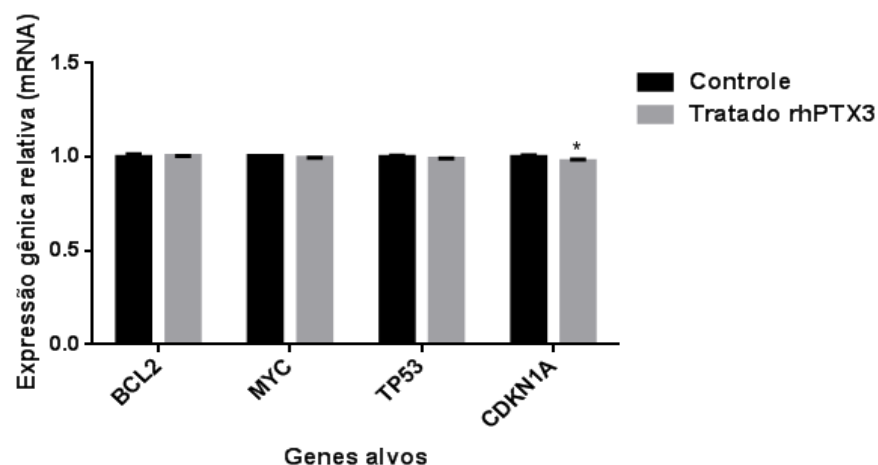


Figura 20: Análise do efeito de rhPTX3 na expressão gênica de HCT-116.

Os níveis de expressão dos genes BAX, BCL2, MYC, TP53 e CDKN1A foram avaliados por RT-qPCR, em triplicata técnica, usando como molde o cDNA da linhagem HCT-116 diluído 1:10. A quantificação relativa foi feita pela equação proposta por Hellemans (Hellemans *et al.*, 2007). As células foram plaqueadas em McCoy's 5A 10% SFB. Após 24 horas, foram tratadas ou não com 2,64 µg/ml de rhPTX3 por 3 horas. O RNA total foi extraído pelo método TRIzol e o cDNA foi sintetizado pelo kit ImPromII usando o oligo(dT)₂₀ ancorados. Os resultados estão expressos em relação ao grupo controle que foi definido como tendo nível de expressão 1x.

5.6 Avaliação da parada no ciclo celular por citometria de fluxo

Inicialmente, visando padronizar o tempo e a concentração mínima de SFB necessários para promover a parada no ciclo e sincronização das culturas, as células foram privadas por 18 e 24 horas com meio específico para cada célula suplementado com 0,5% SFB.

Na linhagem HCT-116, foi verificado que após a incubação das células com 0,5% de SFB por 18 horas, houve o aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células na fase G0-G1 ($75,36 \pm 0,32$) em comparação ao grupo controle com 10% SFB ($62,76 \pm 2,03$). Além disso, ocorreu uma redução significativa na porcentagem de células na fase S ($6,16 \pm 1,12$) quando comparado às culturas controle incubadas por 18h na presença de 10% de SFB ($18,43 \pm 1,13$) (figura 21B). Desta forma, podemos concluir que a privação do soro (0,5%) por 18h foi suficiente para provocar a parada no ciclo celular na fase G0-G1.

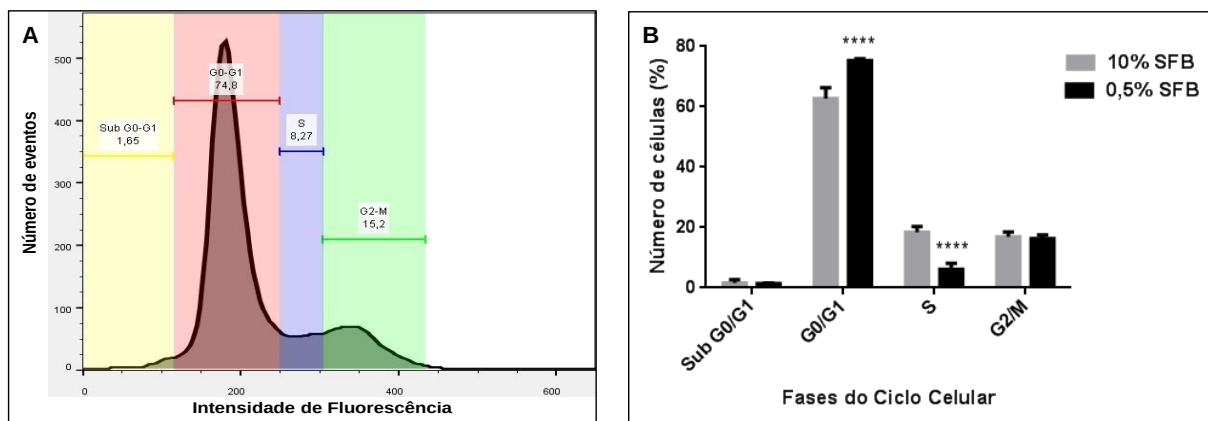


Figura 21: Análise do efeito da privação com 0,5% SFB por 18 horas sobre a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular a linhagem HCT-116.

As células foram semeadas nas quantidades de 1×10^5 em uma placa de 24 poços contendo 10% SFB. Decorrido 24 horas, as células foram privadas de SFB (0,5%) por 18 horas. Após a privação as células foram tripsinizadas e marcadas com a solução HFS para a quantificação do conteúdo de ácido nucléico de cada fase do ciclo celular. **A)** Histograma representativo das fases do ciclo celular: Sub G0/G1 (amarelo), G0/G1 (vermelho), S (azul) e G2/M (amarelo). **B)** Porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular em condições de alta e baixa concentração de soro fetal bovino por 18h. Foi realizado um experimento independente em triplicata técnica.

Na linhagem SK-MEL-37 a privação de soro por 24 horas promoveu o aumento no número de células na fase G0-G1 (controle $41,53 \pm 1,68$; privado $70,7 \pm 0,95$) e a redução na fase S (controle $20,97 \pm 1,13$; privado $8,75 \pm 1,13$) e G2-M (controle $36 \pm 1,27$; privado $18,3 \pm 1,95$) indicando que a escassez de nutrientes reduziu o número de células em divisão celular e provocou a parada do ciclo celular na fase G0-G1 (figura 22B).

O nosso objetivo com a privação era o de após a parada, ao acrescentarmos de volta o SFB (10%) obtermos o maior número de células com o ciclo celular sincronizado de forma a evidenciarmos os prováveis efeitos de PTX3 sobre o ciclo celular.

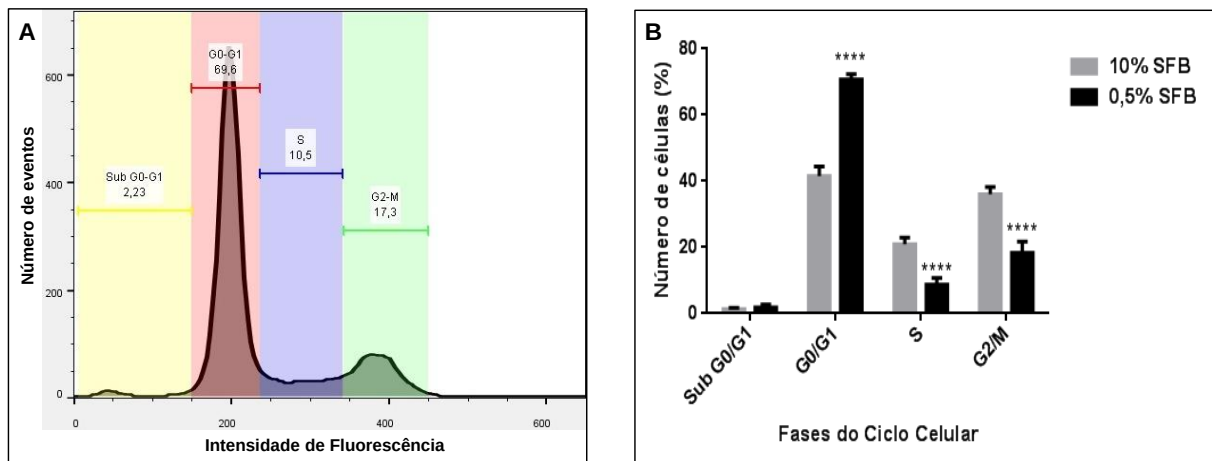


Figura 22: Efeito da privação com 0,5% SFB por 24 horas sobre a porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular da linhagem SK-MEL-37.

A linhagem SK-MEL-37 foi plaqueada nas quantidades de 1×10^5 em uma placa de 24 poços contendo 10% SFB. Decorrido 24 horas, as células foram privadas de SFB (0,5%) por 24 horas. Após a privação, as células foram tripsinizadas e marcadas com a solução HFS para a quantificação de conteúdo de ácido nucléico de cada fase do ciclo celular. **A)** Histograma representativo das fases do ciclo celular: Sub G0/G1 (amarelo), G0/G1 (vermelho), S (azul) e G2/M (amarelo). **B)** Porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular em condições de alta e baixa concentração de soro fetal bovino por 18h. Foi realizado um experimento independente em triplicata técnica.

Determinado o tempo necessário para a sincronização do ciclo celular mediante a privação de soro, as linhagens HCT-116 e SK-MEL-37 foram privadas de soro por 18 e 24 horas para em seguida ser realizado o tratamento por 24 e 48 horas com meio específico 10% SFB contendo ou não 2,64 µg/ml de rhPTX3.

Na linhagem HCT-116, não foi observado nenhuma alteração significativa do perfil do ciclo celular após o tratamento com rhPTX3 por 24 horas (figura 23D). Entretanto, após o tratamento com rhPTX3 por 48h foi observado que as células tratadas apresentaram uma redução na quantidade de células na fase G0-G1 (controle $57,06 \pm 0,92$; tratado $50,3 \pm 1,70$) em comparação ao controle (figura 23E). As demais fases não apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle e tratado.

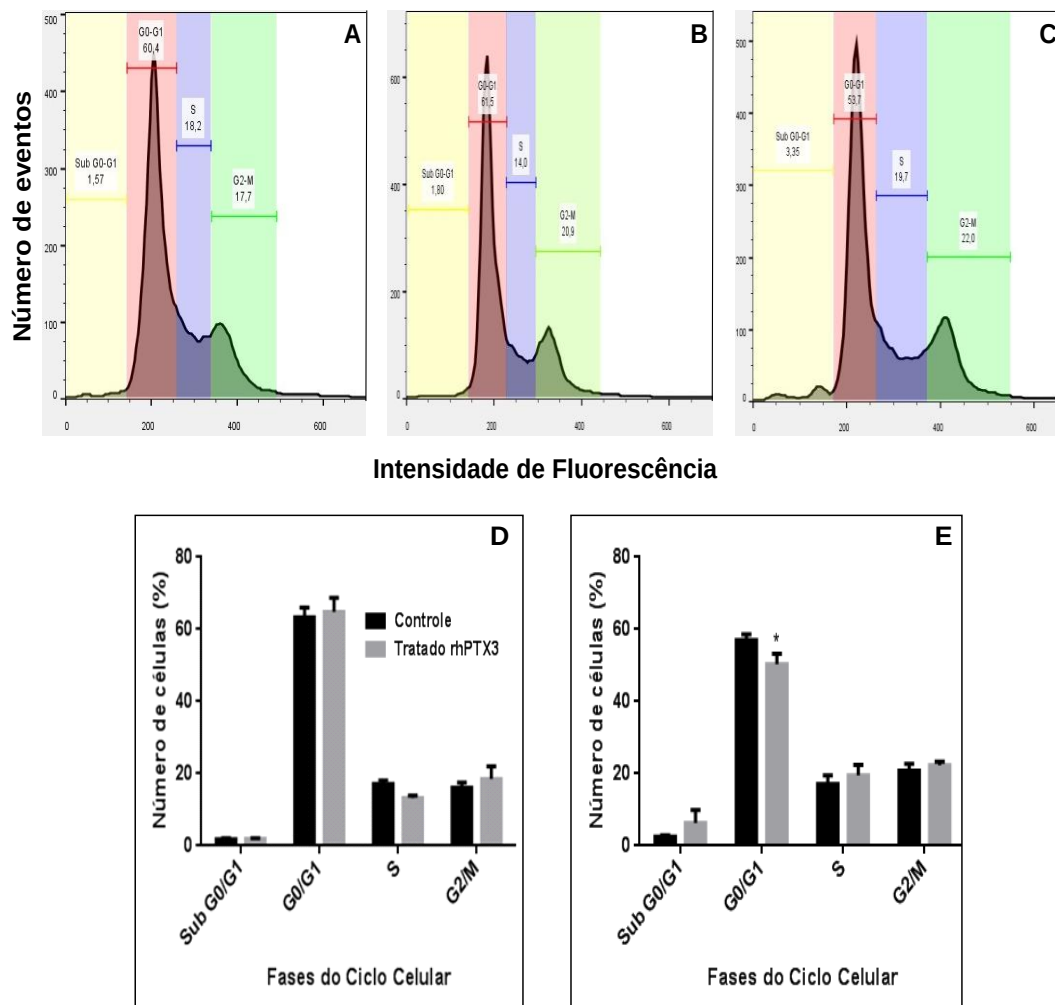


Figura 23: Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 por 24 e 48 horas sobre a porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular da linhagem HCT-116.

A linhagem HCT-116 foi plaqueada nas quantidades de 8×10^4 e 4×10^4 em uma placa de 24 poços contendo 10% SFB. Decorrido o tempo de 24 horas, as células foram privadas de SFB (0,5%) por 18 horas. Após o período de privação as células foram tratadas com rhPTX3 na presença de 10% SFB por 24 e 48 horas e em seguida foram tripsinizadas e marcadas com a solução HFS para a quantificação de conteúdo de ácido nucléico de cada fase do ciclo celular. Histogramas representativos dos grupos: **A)** controle com 10% SFB; **B)** tratado rhPTX3 24h; **C)** tratado rhPTX3 48h evidenciando as fases do ciclo celular: Sub G0/G1 (amarelo), G0/G1 (vermelho), S (azul) e G2/M (verde). Porcentagem de células de cada fase do ciclo celular dos grupos: **D)** tratado rhPTX3 24h; **E)** tratado rhPTX3 48h. Foi realizado um experimento independente em triplicata técnica.

A linhagem SK-MEL-37, quando tratada com rhPTX3 por 24 horas apresentou uma redução significativa no número de células presente na fase G0/G1 (controle $47,3 \pm 0,55$; tratado $44,8 \pm 0,40$) em comparação ao controle (figura 24D). Não foi observado diferenças significativas nas demais fases do ciclo celular. Ao contrário do tratamento de 24h, não foi observado nenhuma alteração significativa no tempo de 48h entre o grupo tratado e controle em relação ao número de células presente em cada fase do ciclo celular (figura 24E).

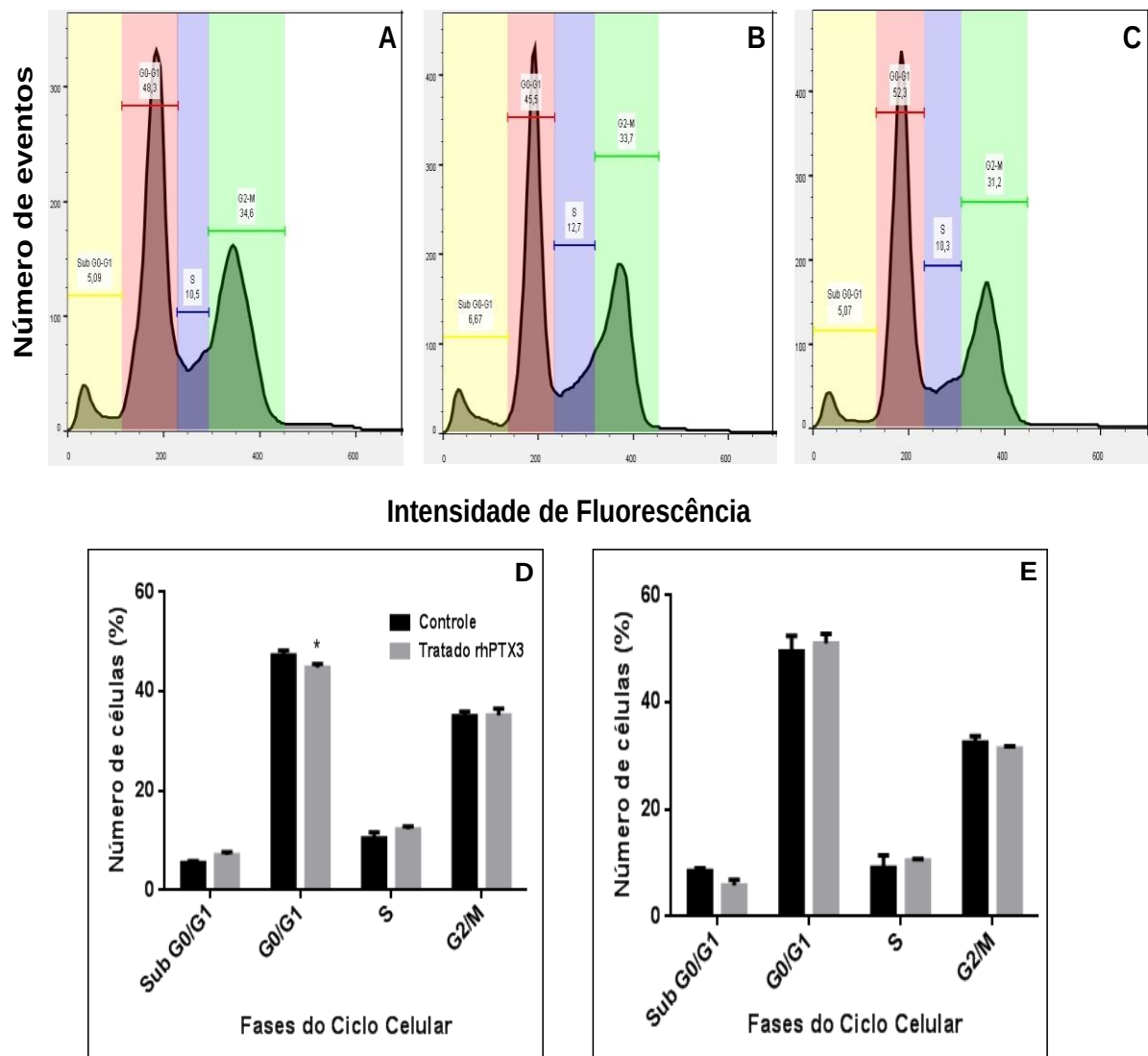


Figura 24: Análise do efeito do tratamento com a proteína rhPTX3 por 24 e 48 horas sobre a porcentagem de células presente em cada fase do ciclo celular da linhagem SK-MEL-37.

A linhagem SK-MEL-37 foi plaqueada nas quantidades de $1,2 \times 10^5$ e 6×10^4 em uma placa de 24 poços contendo 10% SFB. Decorrido o tempo de 24 horas, as células foram privadas de SFB (0,5%) por 24 horas. Após o período de privação as células foram tratadas com rhPTX3 na presença de 10% SFB por 24 e 48 horas e em seguida foram tripsinizadas e marcadas com a solução HFS para a quantificação de conteúdo de ácido nucléico de cada fase do ciclo celular. Histogramas representativos dos grupos: **A)** controle com 10% SFB; **B)** tratado rhPTX3 24h; **C)** tratado rhPTX3 48h evidenciando as fases do ciclo celular: Sub G0/G1 (amarelo), G0/G1 (vermelho), S (azul) e G2/M (verde). Porcentagem de células de cada fase do ciclo celular dos grupos: **D)** tratado rhPTX3 24h; **E)** tratado rhPTX3 48h. Foi realizado um experimento independente em triplicata técnica.

5.7 – Análises Morfológicas

Nas análises morfológicas foram capturados 10 campos aleatórios não sobrepostos por lamínula na magnitude de 400X e os seguintes parâmetros foram quantificados: ausência ou presença de núcleo condensado, bolhas de membrana, fibras de estresse, actina cortical e número de fibras transmembranares, lamelipódios e *ruffles* de membrana (figura 25).

Por microscopia óptica de contraste de fase, foi avaliada a presença ou ausência de bolhas de membrana nos tempos de 12, 24 e 48 horas após o tratamento com rhPTX3. Não foram observadas bolhas de membrana em nenhuma célula em todos os campos analisados para nenhuma das linhagens.

A presença de núcleo condensado, outra característica das células apoptóticas, foi analisada através da marcação com o corante nuclear DAPI na diluição 1:1000. Nenhuma célula apresentando núcleo condensado foi encontrada nos campos analisados das linhagens HCT-116 e SK-MEL-37.

As alterações do citoesqueleto de actina foram avaliadas através da marcação com faloidina-TRICT e as seguintes condições foram avaliadas: número de fibras transmembranares, lamelipódios, *ruffles* de membrana, fibras de estresse e actina cortical. Essas estruturas estão associadas ao processo migratório das células.

Em ambas as linhagens do estudo, foi observada a presença de actina cortical pelo menos em uma das células em cada um dos campos analisados. Apenas para a linhagem SK-MEL-37, foram encontrados 2 campos nas lamínulas do grupo controle, que não mostravam células apresentando actina cortical.

Não foram observadas fibras de estresse na linhagem HCT-116. Na linhagem SK-MEL-37 as fibras de estresse só não foram observadas no grupo controle 12h. Nos demais tempos as fibras foram encontradas em células tanto do grupo controle quanto nos tratados.

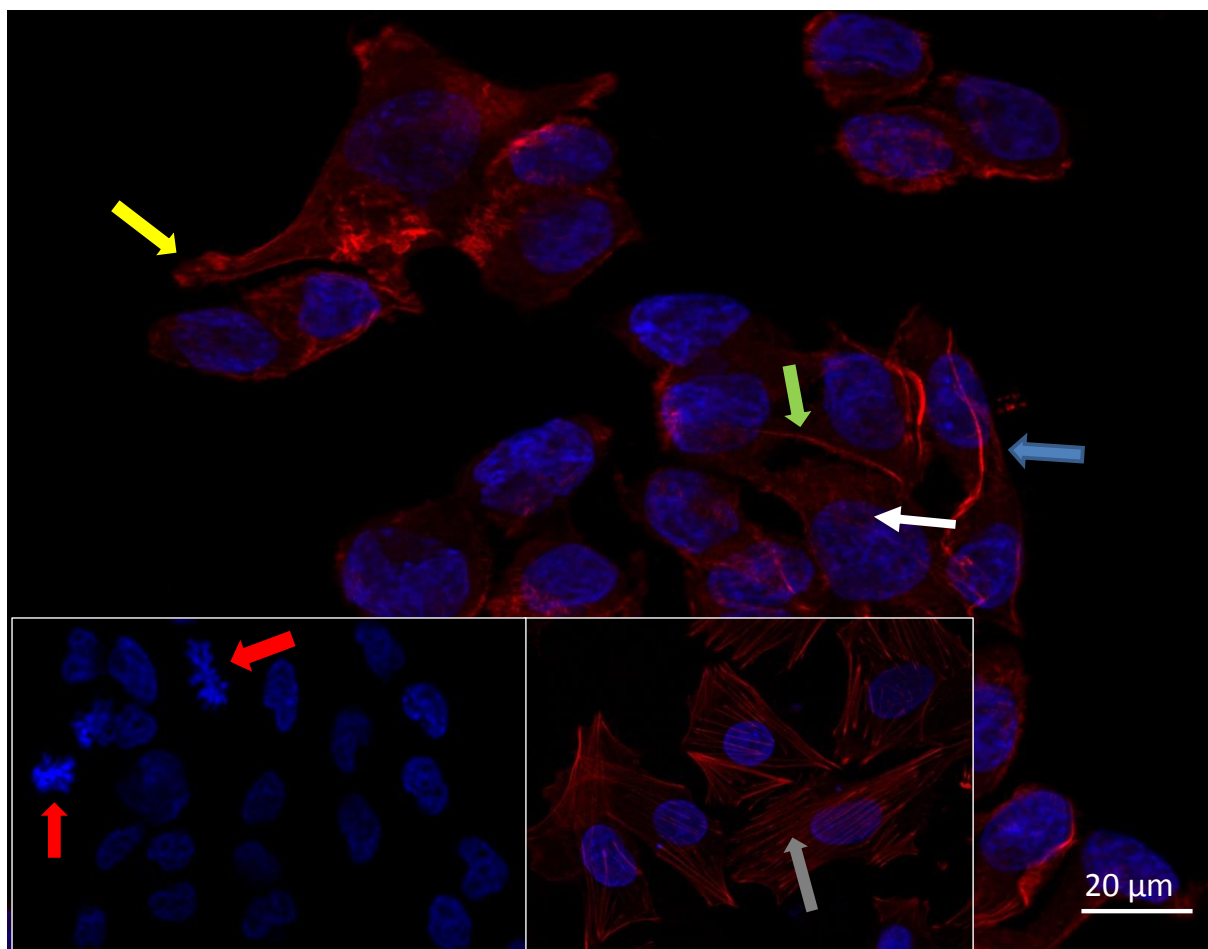


Figura 25: Fotomicrografias de fluorescência da linhagem HCT-116.

A linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 foi semeada na quantidade de 4×10^4 células por poço em uma placa de 24 poços contendo 10% SFB por 24 horas. Após esse tempo, as células foram tratadas com rhPTX3 (2,64 $\mu\text{g/ml}$) nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Em seguida, o meio foi removido e a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS 1X a 37°C e as células foram fixadas com PFA 4% sendo posteriormente incubadas com faloidina-TRICT e DAPI por 1 hora. As fotomicrografias foram obtidas através do microscópio de fluorescência Apotome.2 (ZEISS). Para a análise, foram capturadas 10 campos aleatórios não sobrepostos na magnitude 400X. A seta em branco indica fibras transmembranares. A seta em azul aponta *ruffles* de membrana. A seta verde indica actina cortical. A seta em amarelo aponta os lamelipódios. As setas em vermelho indica figuras de mitose. A seta em cinza aponta fibras de estresse. Foi realizado um experimento independente em triplicata técnica.

Fibras transmembranares foram observadas em células de HCT-116 tratadas com PTX3 por 12 e 24h. Já na linhagem SK-MEL-37, fibras transmembranares foram observadas somente no grupo controle 12h e em células tratadas por 24 e 48 h.

Os *Ruffles* de membrana foram observados em todos os campos com células HCT-116 sem haver diferença entre as células tratadas ou não. Já na linhagem SK-MEL-37, os *ruffles* foram detectados apenas em um dos grupos tratados por 12h, em um grupo controle 24h e um tratado 48h.

Lamelipódios foram encontrados em todos os campos analisados de ambas as linhagens tumorais estudadas. Na linhagem SK-MEL-37 nenhuma diferença no número de

lamelipódios foi encontrada entre as células controle e tratadas. Já para a linhagem HCT116, o tratamento com a Pentraxina 3 promoveu uma diminuição no número de lamelipódios nos tempos de 12 e 24h (figura 27).

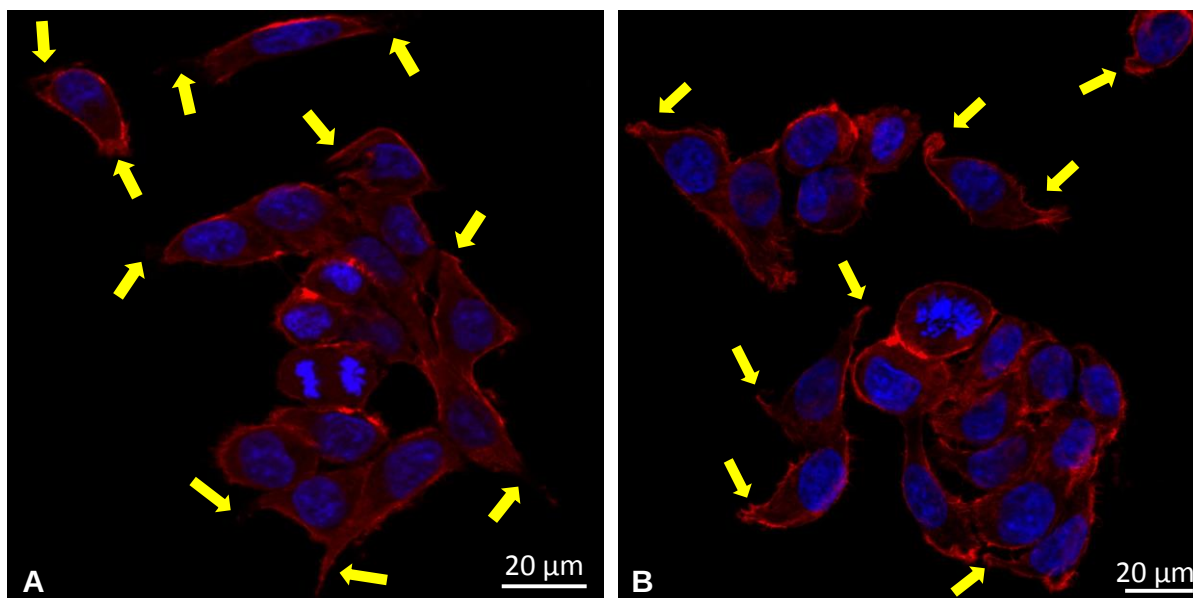


Figura 26: Fotomicrografias de fluorescência dos grupos controle e tratado rhPTX3 da linhagem HCT-116.

A linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT-116 foi semeada na quantidade de 4×10^4 células por poço em uma placa de 24 poços contendo 10% SFB. Após 24h, as células foram tratadas com rhPTX3 (2,64 µg/ml) nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Em seguida, o meio foi removido e a monocamada celular foi lavada duas vezes com PBS 1X a 37°C e as células foram fixadas com PFA 4% sendo posteriormente incubadas com faloidina-TRICT e DAPI por 1 hora. As fotomicrografias foram obtidas através do microscópio de fluorescência Apotome.2 (ZEISS), sendo capturados 10 campos aleatórios não sobrepostos na magnitude 400X. Para a análise, foram quantificados e comparados as estruturas morfológicas dos grupos controle (A) e tratado rhPTX3 (B). As setas em amarelo apontam os lamelipódios. Foi realizado um experimento independente em triplicata técnica.

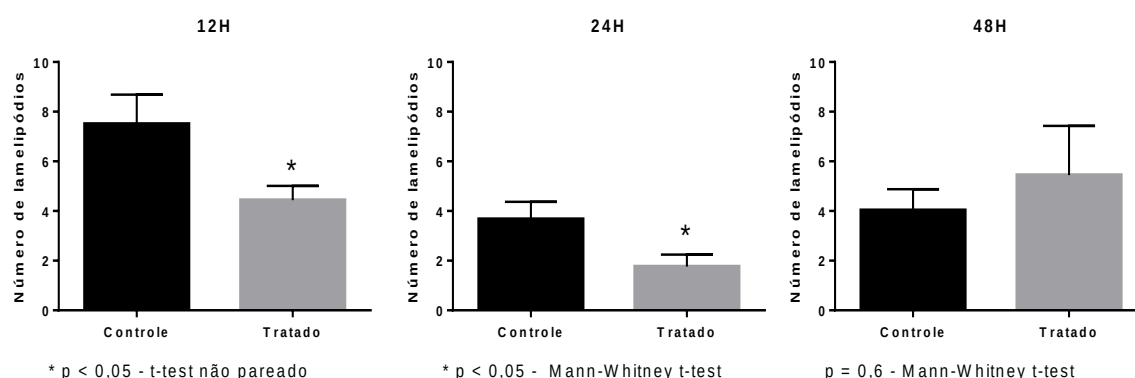


Figura 27: Análise do efeito de rhPTX3 no número de lamelipódios na linhagem HCT-116.

O número de lamelipódios foram contados nos grupos controle e tratados através da marcação com faloidina-TRICT. Nos tempos de 12 (A) e 24h (B) de tratamento com rhPTX3 foi observado uma redução no número de lamelipódios na linhagem HCT-116. No entanto, o mesmo efeito não foi observado no tratamento de 48h. Foi realizado um experimento independente em triplicatas técnicas.

A

HCT-116																
	12h					24h						48h				
	C1	C2	T1	T2	T3	C1	C2	C3	T1	T2	T3	C1	C2	C3	T1	T2
Número de células	322	49	254	231	586	448	229	293	144	445	365	780	540	715	643	338
Fibras transmembranares	0	0	6	20	16	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0
Lamelipódios	113	37	78	19	36	22	12	76	10	4	39	79	25	17	12	97
Ruffles de membranas	5	0	15	3	0	3	1	6	2	2	2	3	18	2	14	8
Figuras de Mitose	0	0	4	3	27	9	4	7	1	12	12	35	16	48	21	0
Número total de células	371			1071			970			954			2025			981

	HCT-116					
	Controle 12h	Tratado 12h	Controle 24h	Tratado 24h	Controle 48h	Tratado 48h
Fibras transmembranares	0%	4%	0%	1%	0%	0%
Lamelipódios	40%	13%	11%	6%	6%	11%
Ruffles de membranas	1%	2%	1%	1%	1%	2%
Figuras de Mitose	0%	3%	2%	3%	5%	2%

Tabela 8: Quantificação das alterações das estruturas do citoesqueleto de actina da linhagem HCT-116 tratadas com rhPTX3 nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Número absoluto (A) e porcentagem de células (B) que apresentaram alterações morfológicas nos parâmetros avaliados.

A

SK-MEL-37																	
	12h					24h					48h						
	C1	C2	T1	T2	T3	C1	C2	C3	T1	T2	C1	C2	C3	T1	T2	T3	
Número de células	104	143	190	97	108	170	177	159	408	149	226	506	190	224	275	242	
Fibras transmembranares	16	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	125	
Lamelipódios	192	119	215	139	179	202	152	235	170	244	140	92	88	86	121	175	
Ruffles de membranas	0	0	0	1	1	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	
Figuras de Mitose	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	19	5	0	0	0	
Número total de Células	247		395			506			557		922			741			

	SK-MEL-37					
	Controle 12h	Tratado 12h	Controle 24h	Tratado 24h	Controle 48h	Tratado 48h
Fibras transmembranares	6%	0%	0%	2%	0%	17%
Lamelipódios	125%	135%	116%	74%	35%	52%
Ruffles de membranas	0%	1%	1%	0%	0%	0%
Figuras de Mitose	0%	0%	0%	0%	3%	0%

Tabela 9: Quantificação das alterações das estruturas do citoesqueleto de actina da linhagem SK-MEL-37 tratadas com rhPTX3 nos tempos de 12, 24 e 48 horas. Número absoluto (A) e porcentagem de células (B) que apresentaram alterações morfológicas nos parâmetros avaliados.

6. DISCUSSÃO

Inicialmente, caracterizada como um gene (TSG-14) estimulado pelo Fator de Necrose Tumoral alfa (TNFA) e pela Interleucina 1 beta (IL1B) (Breviario et al., 1992; Lee et al., 1993; Lee et al., 1990), a pentraxina 3 tem sido descrita atualmente em diversos processos biológicos como na inflamação, imunidade inata, fertilidade, deposição da matriz e na angiogênese (Garlanda *et al.*, 2009).

Estudos recentes tem evidenciado o papel de PTX3 como antagonista natural da angiogênese devido a sua ligação com os membros da família de fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs). Os FGFs são fatores pleiotrópicos que promovem a regulação no desenvolvimento embrionário e em múltiplas vias essenciais como na cicatrização de feridas, diferenciação e sobrevivência celular, proliferação e angiogênese (Lieu *et al.*, 2011).

A angiogênese é um processo natural regulado pela interação de diversas moléculas pró angiogênicas e de seus inibidores naturais (Hanahan & Folkman, 1996). Quando desregulado, esse processo pode favorecer o aparecimento de várias doenças como aterosclerose, psoríase, artrite, obesidade, asma e cânceres (Carmeliet, 2003; 2005)

Atualmente, terapias antiangiogênicas têm sido desenvolvidas com foco na inibição da ligação dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFs) aos seus receptores (VEGFRs), no entanto muitos pacientes demonstraram ser resistentes a essa abordagem devido ao efeito compensatório promovido pelos FGFs.

O achado de que PTX3 apresenta uma ligação de alta especificidade e afinidade com os fatores de crescimento do tipo 2 (FGF2) e 8 (FGF8b) surge como uma abordagem promissora no tratamento de tumores, uma vez em que foi demonstrado que essa interação promove a inibição da proliferação e angiogênese de tumores de mama murino, próstata humano e murino (Leali et al, 2011; Ronca et al, 2013). Além disso, estudos recentes mostram que tanto as pentraxinas curtas (CRP) como as longas (NPTX2) induzem a apoptose e a parada no ciclo celular em monócitos, células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) e células de câncer pancreático (Nabata *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014).

Diante desses achados, surge a proposta do nosso trabalho que foi avaliar o efeito biológico de PTX3 sobre a morfologia, o citoesqueleto de actina, a progressão no ciclo celular e a expressão gênica de linhagens de melanoma (SK-MEL-37) e adenocarcinoma de cólon (HCT-116). Nosso pressuposto era o de que a ação anti-tumoral de PTX3 poderia estar associada não apenas ao seu papel como antagonista dos FGFs mas também como um agente anti-proliferativo e indutor da apoptose.

Para a avaliação de um possível papel da proteína PTX3 no ciclo celular, foi realizado inicialmente um ensaio no qual foi verificado o tempo necessário de privação de soro para sincronização da cultura de células.

A sincronização celular é o processo que permite a parada das células em fases específicas do ciclo celular possibilitando o estudo das fases individuais do ciclo celular, dos mecanismos regulatórios que determinam a regulação do ciclo celular no nível de expressão gênica e das modificações proteicas pós-transcricionais, além de contribuir para a descoberta de novas drogas (Peng *et al*, 2014).

Há diversos critérios definidos para a sincronização que devem ser respeitos como: (a) ambas as células normal e tumoral devem ser paradas na mesma fase específica do ciclo celular, (b) a sincronização deve ser não tóxica e reversível, (c) o bloqueio metabólico deve ser alvo de uma reação específica e deve ser reversível, (d) grandes quantidades de populações de células sincronizadas deve ser obtido, (e) a sincronização deve ser independente do meio, (f) a sincronização deve ser mantida por mais de um ciclo para o estudo dos processos bioquímicos que ocorrem nas células que estão ciclando, (g) as células sincronizadas devem exibir tamanho uniforme e (h) o conteúdo de DNA da cultura de célula inicial e durante o crescimento deve ser o mesmo (Banfalvi, 2011).

Apesar de muitos métodos de sincronização terem sido desenvolvidos, nenhum deles parece ser perfeito por vários motivos como: (a) a proporção de células sincronizadas não é suficientemente alta, (b) as manipulações durante a sincronização perturbam a fisiologia celular para um nível inaceitável, (c) a maioria dos métodos de sincronização são tóxicos e não aplicáveis *in vivo* (Banfalvi, 2011).

Um método amplamente utilizado para sincronização celular é a privação de soro, que promove a parada das células na fase G0/G1 com alta eficiência e sem nenhum efeito tóxico (Tong *et al*, 2016). Os resultados obtidos corroboram esse fato uma vez que as linhagens de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) e melanoma (SK-MEL-37) apresentaram uma baixa quantidade de células mortas e um aumento significativo na porcentagem de células na fase G0/G1 seguido de um decréscimo na fase S e G2/M quando privadas com 0,5% de SFB por 18 e 24 horas (figuras 21B e 22B). Assim, esses dados nos permitem obter um maior número de células sincronizadas a fim de que quando submetidas a estímulos (10% SFB) seja possível uma melhor visualização dos possíveis efeitos de PTX3 sobre o ciclo celular.

Diferentemente dos estudos relatados na literatura, em que as pentraxinas tanto curtas (CRP) quanto longas (NPTX2) induzem a parada do ciclo celular, nosso estudo demonstrou que o tratamento com a proteína PTX3 exógena promoveu uma redução discreta no número de células na fase G0/G1 no tempo de 24 horas para a linhagem SK-MEL-37 (figura 24D) e de 48 horas para a linhagem HCT-116 (figura 23E). Diante desses

dados, nas condições do nosso estudo, não foi possível atribuir a PTX3 uma atividade citotóxica relevante contra as linhagens testadas e nem identificar um papel no aumento da taxa de apoptose destas células. Entretanto, para a elucidação da ação de PTX3 sobre estas células outras abordagens devem ser empregadas em conjunto como o ensaio de MTT ou contagem de células viáveis com azul de tripan. Além disso, mais replicatas técnicas (aumentar o número de grupos controles e tratados) e biológicas (fazer os ensaios com outras linhagens de melanoma e adenocarcinoma de cólon) seriam necessárias, assim como tempos maiores de tratamento ou o uso de uma concentração maior da proteína uma vez que os estudos que relatam a indução da parada do ciclo por CRP, uma pentraxina curta, usam uma concentração bem maior da proteína (50 µg/ml e 25 µg/ml) em células não tumorais (Nabata *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2014).

Diante da presença de uma baixa porcentagem de células mortas e da ausência de bolhas de membrana e núcleo condensado, parâmetros indicativos de apoptose, nos grupos tratados de ambas as linhagens é possível afirmar que a proteína PTX3 não induziu a apoptose na concentração de 2,64 µg/ml nos tempos de 12, 24 e 48 horas.

Para análise da expressão gênica foi realizada uma avaliação qualitativa por RT-PCR da expressão gênica de BAX, BCL-2, MYC, TP53, CCND1 e CDKN1A nas linhagens HCT-116, SK-MEL-37 e SK-MEL-188. Esse ensaio teve como objetivo verificar a expressão dos genes alvos a níveis basais nas linhagens do estudo para assim se obter controles positivos que fossem usados no cálculo da eficiência dos iniciadores e na padronização das reações de RT-qPCR.

De acordo com os dados obtidos, foi verificado a presença de expressão gênica de todos os genes alvos nas linhagens do estudo, no entanto na linhagem SK-MEL-188 não foi visualizado a banda de tamanho esperado para o gene BAX (108 bp) (figura 9). Apesar de não verificarmos a expressão de BAX na linhagem de melanoma SK-MEL-118, a expressão proteica desse gene tem sido identificada em outras linhagens de melanomas (WM164 e 451Lu) (Zhang and Rosdahl, 2004). A ausência ou redução da expressão desse gene está associada ao desequilíbrio na razão do número de moléculas de BAX por BCL2 o que leva a um aumento no número de proteínas anti-apoptóticas BCL-2 resultando em uma proteção do organismo contra a apoptose.

Na análise da qualidade da transcrição reversa utilizando iniciadores específicos para NOTCH2, foi observado que as bandas apresentaram intensidade qualitativamente semelhante a partir das amostras de cDNA (figura 16). O uso de genes constitutivos como GAPDH e NOTCH2 são ferramentas fundamentais na avaliação da expressão gênica, uma vez que os níveis de expressão desses genes são sempre constantes independente da condição em que a célula se encontra, seja em situações fisiopatológicas ou normais (Eisenberg e Levanon, 2003). A presença de bandas qualitativamente semelhantes do

produto de NOTCH2 indica que todas as amostras apresentaram uma boa integridade do RNA total extraído e boa eficiência da transcrição reversa.

Na análise da expressão gênica por RT-qPCR das linhagens tratadas com rhPTX3 por 3 horas não foi observado modulação dos genes alvos na linhagem SK-MEL-37 (figura 19). De maneira similar, rhPTX3 não promoveu alteração na expressão gênica de BCL-2, MYC e TP53 da linhagem HCT-116, porém o mesmo efeito não foi observado para CDKN1A aonde foi observado uma menor quantidade de transcritos no grupo tratado quando comparado ao controle (figura 20) .

Esses dados reforçam os nossos achados do ensaio do ciclo celular, uma vez que PTX3 pode estar promovendo a redução do número de células na fase G0/G1 da linhagem HCT-116 através da diminuição da quantidade de transcritos de CDKN1A.

Em um estudo recente realizado por Tung e colaboradores em 2016, foi demonstrado que o “*knockdown*” de PTX3 em glioma humano (GBM8401) promoveu a inibição da proliferação celular, o aumento nos níveis proteicos de CDKN1A (Tung et al, 2016) e a redução de ciclina D1, resultando na parada do ciclo celular na fase G0/G1. De maneira similar, o mesmo efeito foi observado pelo “*knockdown*” de PTX3 em linhagens celulares de câncer cervical que apresentaram uma redução na viabilidade celular e parada no ciclo celular na fase G2/M através da modulação negativa da expressão da ciclina B1, cdc2, e cdc25c e da modulação positiva da expressão de p-cdc2, p-cdc25, p27 e p21. Logo, esses dados reforçam o fato de que PTX3 possa estar modulando os níveis de transcritos de CDKN1A. Para comprovar tal fato, seria necessário o emprego de mais replicatas técnicas e biológicas, assim como tempos maiores de tratamento ou uso de células transfectadas com cDNA de PTX3, pois diferentemente dos nossos resultados, Zhang e colaboradores em 2009 mostraram que células de câncer pancreático transfectadas com o gene de NPTX2, uma pentraxina longa, induziram a expressão positiva de BAX, sendo a expressão do gene BCL2 não modulada.

De acordo com nossos dados, a regulação da transcrição de CDKN1A promovida por PTX3 mostrou-se independente de TP53, uma vez que a quantidade de transcritos desse gene não sofreu alteração decorrente do tratamento com a proteína. Diante disso, surge a necessidade de investigar se PTX3 atua na modulação dos fatores transcricionais (SP1, SP3, AP2, BETA2, GAX, HOXA10, STATs, MYOD1, C/EBP α , C/EBP β , NGF, BRCA1) que controlam a transcrição de CDKN1A. Para isso, iniciadores específicos terão que ser construídos e os níveis de transcritos desses genes terão que ser avaliados quantitativamente por RT-PCR.

Com o objetivo de avaliars se PTX3 produz alterações morfológicas foram quantificados estruturas do citoesqueleto de actina nos tempos de 12, 24 e 48h.

A migração celular é um processo fundamental na maioria dos processos biológicos que incluem a morfogênese embrionária, vigilância imunológica, angiogênese e regeneração de tecidos (Lee, 2010). A dinâmica do citoesqueleto de actina desempenha um papel crucial na maioria desses processos, mediando a formação de estruturas celulares como lamelipódios, filopódios, fibras de estresse e adesões locais (Bailly and Condeelis, 2002).

Em células tumorais, as características do citoesqueleto tem um papel importante nas atividades de migração, habilidades de invasão e, assim determinam o potencial metastático das células (Olson e Sahai, 2009). Li e colaboradores em 2008 demonstraram que as células tumorais apresentam alterações em sua morfologia e estrutura do citoesqueleto de actina quando comparadas as células normais. Nesse estudo foi descrito que as células tumorais geralmente apresentam um número reduzido de fibras polimerizadas de actina, desordem dos conjuntos de microfilamentos residuais e deturpação do tempo de maturação de adesões (Li et al, 2008). Além disso, Efremov e colaboradores em 2014 observaram que fibroblastos transformados em células tumorais apresentavam um aumento no número de lamelipódios e uma redução significativa nas fibras de actina polimerizada (Efremov et al, 2014).

Ronca e colaboradores em 2013 mostraram que células transfectadas com PTX3 apresentaram alterações em seu citoesqueleto de actina, apresentando uma morfologia mais regular devido a uma desorganização da actina (Ronca et al, 2013). Diferentemente de Ronca, nossos dados mostram que PTX3 não promoveu alterações no número de fibras transmembranares, *ruffles* de membrana e figuras de mitose para ambas as linhagens do estudo. No entanto, foi observado uma alteração no número de lamelipódios, sendo que a linhagem HCT-116 apresentou uma menor quantidade quando tratada por 12 e 24h com PTX3 (figura 27). Os lamelipódios são projeções da membrana plasmática formado pela polimerização de filamentos de actina na região frontal da célula (*leading edge*). Essas estruturas atuam no processo de migração da célula ao aderir o substrato de matriz extracelular gerando uma força contrátil que permite o movimento do corpo celular para uma determinada direção (Yamaguchi & Condeelis, 2007). Nossos achados indicam que PTX3 possa ter um efeito inibitório na migração de células tumorais

Entretanto, devido a uma enorme variabilidade na quantidade de células presente entre os grupos controle e tratado, outros ensaios são necessários para a garantia de uma maior reprodutibilidade entre as amostras e maior fidelidade dos dados.

De forma geral, os achados deste trabalho contribuem na caracterização do papel biológico da PTX3 em células tumorais humanas e salientam a importância em se entender os mecanismos pelo qual a proteína atua na inibição da proliferação de células tumorais humanas .

7. SÍNTESE DOS RESULTADOS:

- As linhagens HCT-116 e SK-MEL-37 apresentam expressão basal de BAX, BCL2, MYC, TP53, CCND1 e CDKN1A;
- A linhagem de melanoma SK-MEL-188 apresenta expressão basal dos genes BCL2, MYC, TP53, CCND1 e CDKN1A;
- PTX3 não modula a expressão de BCL2, MYC, TP53 e CDKN1A na linhagem de melanoma SK-MEL-37;
- PTX3 não altera a expressão de BAX, BCL2, MYC e TP53 na linhagem de adenocarcinoma de cólon HCT-116;
- PTX3 modula negativamente a expressão de CDKN1A na linhagem HCT-116;
- A privação de soro por 18 horas na linhagem HCT-116 promove a parada do ciclo celular na fase G0/G1;
- A privação de soro por 24 horas na linhagem SK-MEL-37 promove a parada do ciclo celular na fase G0/G1;
- O tratamento com PTX3 por 24 horas não promove alterações no perfil do ciclo celular da linhagem HCT-116;
- O tratamento com PTX3 por 48 horas reduziu o número de células na fase G0/G1 da linhagem HCT-116;
- A linhagem SK-MEL-37 quando tratada com PTX3 por 24 horas apresentou diminuição da quantidade de células na fase G0/G1;
- A linhagem SK-MEL-37 quando tratada com PTX3 por 48 horas não apresentou alterações no perfil do ciclo celular;
- PTX3 não induziu a condensação de núcleo e formação de bolhas de membrana em ambas as linhagens estudadas;
- PTX3 não alterou a actina cortical e fibras de estresse nas linhagens HCT-116 e SK-MEL-37;
- PTX3 não modificou o número de fibras transmembranares e *ruffles* de membrana nas linhagens HCT-116 e SK-MEL-37;
- PTX3 promoveu uma diminuição no número de lamelipódios na linhagem HCT-116 nos tempos de 12 e 24h.

8. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do estudo, o tratamento com a proteína PTX3 recombinante humana não promoveu a apoptose nas linhagens HCT-116 e SK-MEL-37. Além disso, PTX3 reduziu o número de lamelipódios na linhagem HCT-116 nos tempos de 12 e 24 horas.

9. PERSPECTIVAS

Os dados preliminares obtidos neste estudo, apontam que PTX3 não apresenta potencial citotóxico nas linhagens tumorais e não promove aumento da taxa de apoptose nas condições estudadas. Entretanto, foi observada na linhagem de adenocarcinoma coloretal, HCT-116, uma redução nos níveis de transcritos do gene CDKN1A o qual promove a parada do ciclo celular na fase G1. Diante deste fato, surge a possibilidade de que PTX3 esteja promovendo a proliferação celular nesta linhagem tumoral, porém para elucidar essa questão é necessário a realização de mais ensaios *in vitro* tais como: contagem de células viáveis com Azul de Tripán, ensaio de MTT, avaliação dos níveis de expressão de genes envolvidos com proliferação celular por RT-qPCR e quantificação de DNA por citometria de fluxo. Além disso, outras abordagens úteis seriam estudos *in vivo* inoculando células tumorais humanas transfectadas ou não com o gene de PTX3 em modelos de *Zebrafish*, por exemplo, para avaliar o papel da proteína na modulação da angiogênese e progressão dos tumores experimentalmente induzidos.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Science, 2007. ISBN 0815341059. Disponível em: < <http://www.amazon.ca/exec/obidos/redirect?tag=citeulike09-20> >.

ALESSI, P. et al. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. **Eur Cytokine Netw**, v. 20, n. 4, p. 225-34, Dec 2009. ISSN 1952-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20167562> >.

ALTSCHUL, S. et al. **Basic Local Alignment Search Tool**. National Library of Medicine., 2014. Disponível em: < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >.

BALHARA, J. et al. Pentraxin 3: an immuno-regulator in the lungs. **Front Immunol**, v. 4, p. 127, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23755050> >.

BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 3, p. 235-53, Mar 2009. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19247306> >.

BHUSHAN, M. et al. Levels of endothelial cell stimulating angiogenesis factor and vascular endothelial growth factor are elevated in psoriasis. **British Journal of Dermatology**, v. 141, n. 6, p. 1054-1060, 1999. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.1999.03205.x> >.

BOTTAZZI, B. et al. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annu Rev Immunol**, v. 28, p. 157-83, 2010. ISSN 1545-3278. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19968561> >.

_____. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 272, n. 52, p. 32817-23, Dec 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407058> >

>.

BOZZA, S. et al. Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. **Blood**, v. 108, n. 10, p. 3387-96, Nov 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16840729> >.

BRATTAIN, M. G. et al. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. **Cancer Res**, v. 41, n. 5, p. 1751-6, May 1981. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

BREVIARIO, F. et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. **J Biol Chem**, v. 267, n. 31, p. 22190-7, Nov 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1429570> >.

BUOLAMWINI, J. K. Novel anticancer drug discovery. **Curr Opin Chem Biol**, v. 3, n. 4, p. 500-9, Aug 1999. ISSN 1367-5931 (Print) 1367-5931.

85

BURKE, D. et al. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. **Trends Biochem Sci**, v. 23, n. 2, p. 59-62, Feb 1998. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004.
CAMOZZI, M. et al. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 9, p. 1837-42, Sep 2005. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020751> >

>.

CAREY, T. E. et al. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n. 9, p. 3278-82, Sep 1976. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

COLVILLE-NASH, P. R.; SCOTT, D. L. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications. **Ann Rheum Dis**, v. 51, n. 7, p. 919-25, Jul 1992. ISSN 0003-4967 (Print) 0003-4967.

DEBAN, L. et al. Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3. **Nat Immunol**, v. 11, n. 4, p. 328-34, Apr 2010. ISSN 1529-2916. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208538>>.

DEWITT, N. Angiogenesis. **Nature**, v. 438, n. 7070, p. 931-931, 12/15/print 2005. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/438931a>>.

DIAS, A. A. et al. TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 6, p. 928-36, Jun 2001. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404378>>.

DINIZ, S. N. et al. PTX3 function as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 4, p. 649-56, Apr 2004. ISSN 0741-5400. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14726497>>.

FOGH, J. **Human tumor cells in vitro**. New York: Plenum Press 1975.

FOGH, J.; FOGH, J. M.; ORFEO, T. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. **J Natl Cancer Inst**, v. 59, n. 1, p. 221-6, Jul 1977. ISSN 0027-8874 (Print) 0027-8874

FOLKMAN, J.; KLAGSBRUN, M. Angiogenic factors. **Science**, v. 235, n. 4787, p. 442-7, Jan 23 1987. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

FRANCIS, T.; TILLET, W. S. CUTANEOUS REACTIONS IN PNEUMONIA. THE DEVELOPMENT OF ANTIBODIES FOLLOWING THE INTRADERMAL INJECTION OF TYPE-SPECIFIC POLYSACCHARIDE. **J Exp Med**, v. 52, n. 4, p. 573-85, Sep 30 1930. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007.

GARLANDA, C. et al. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. **Annu Rev Immunol**, v. 23, p. 337-66, 2005. ISSN 0732-0582. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15771574>>.

_____. Pentraxins in innate immunity and inflammation. **Novartis Found Symp**, v. 279, p. 80-6; discussion 86-91, 216-9, 2006. ISSN 1528-2511. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17278387>>.

_____. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 182-6, Nov 2002. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432394>>.

GAZIANO, R. et al. Anti-Aspergillus fumigatus efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 11, p. 4414-21, Nov 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15504871>>.

GEWURZ, H.; ZHANG, X. H.; LINT, T. F. Structure and function of the pentraxins. In: (Ed.). **Curr Opin Immunol**. England, v.7, 1995. p.54-64. ISBN 0952-7915 (Print) 0952-7915 (Linking).

GIFONI, M. A. C. **Envolvimento da pentraxina 3 (PTX3) na patogênese da cistite hemorrágica induzida por ifosfamida em camundongos**. 2008. 130 (Doutorado). Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina.

GOETZ, R.; MOHAMMADI, M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 3, p. 166-80, Mar 2013. ISSN 1471-0072.

GOODMAN, A. R. et al. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 2, p. 191-202, Aug 1996. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8899296>.>

GULATI, P. Janeway's Immunobiology, 7th Edition by Kenneth Murphy, Paul Travers, and Mark Walport. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 37, n. 2, p. 134-134, 2009. ISSN 1539-3429. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/bmb.20272> >.

HAN, B. et al. Protective effects of long pentraxin PTX3 on lung injury in a severe acute respiratory syndrome model in mice. **Lab Invest**, v. 92, n. 9, p. 1285-96, Sep 2012. ISSN 1530-0307. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22732935> >.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 1/7/ 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400816839> >.

HARMER, N. J. et al. Towards a resolution of the stoichiometry of the fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor-heparin complex. **J Mol Biol**, v. 339, n. 4, p. 821-34, Jun 11 2004. ISSN 0022-2836 (Print) 0022-2836.

HUTTUNEN, R. et al. High plasma level of long pentraxin 3 (PTX3) is associated with fatal disease in bacteremic patients: a prospective cohort study. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17653, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21423699> >.

INFORZATO, A. et al. The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. **J Biol Chem**, v. 285, n. 23, p. 17681-92, Jun 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363749> >.

_____. Pentraxins in humoral innate immunity. **Adv Exp Med Biol**, v. 946, p. 1-20, 2012. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21948359> >.

_____. PTX3 as a paradigm for the interaction of pentraxins with the complement system. **Semin Immunol**, v. 25, n. 1, p. 79-85, Feb 2013. ISSN 1096-3618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747040> >.

_____. Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation. **Biochemistry**, v. 45, n. 38, p. 11540-51, Sep 2006. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16981714> >.

_____. The "sweet" side of a long pentraxin: how glycosylation affects PTX3 functions in innate immunity and inflammation. **Front Immunol**, v. 3, p. 407, 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316195> >.

INTRONA, M. et al. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. **Blood**, v. 87, n. 5, p. 1862-72, Mar 1996. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8634434> >.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 291-295, Jan 2010. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000273629700031 >.

JAILLON, S. et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. **J Exp Med**, v. 204, n. 4, p. 793-804, Apr 2007. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389238> >.

KASHPUR, O. et al. FGF2-induced effects on transcriptome associated with regeneration competence in adult human fibroblasts. **BMC Genomics**, v. 14, p. 656, 2013. ISSN 1471-2164. KUNES, P. et al. Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 920517, 2012. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577258> >.

LEALI, D. et al. Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 9, p. 1600-10, Sep 2011. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764903> >.

_____. Fibroblast growth factor-2 antagonist and antiangiogenic activity of long-pentraxin 3-derived synthetic peptides. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 30, p. 3577-89, 2009. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860702> >.

_____. Fibroblast growth factor 2-antagonist activity of a long-pentraxin 3-derived anti-angiogenic pentapeptide. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 8, p. 2109-21, Aug 2010. ISSN 1582-4934. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19627396> >.

_____. Long pentraxin 3/tumor necrosis factor-stimulated gene-6 interaction: a biological rheostat for fibroblast growth factor 2-mediated angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 3, p. 88696-703, Mar 2012. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267482> >.

LEE, G. W.; LEE, T. H.; VILCEK, J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. **J Immunol**, v. 150, n. 5, p. 1804-12, Mar 1993. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679696> >.

LEE, T. H. et al. Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts. **Mol Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 1982-8, May 1990. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).

LEIBOVITZ, A. et al. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. **Cancer Res**, v. 36, n. 12, p. 4562-9, Dec 1976. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472. LUCHETTI, M. M. et al. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol**, v. 119, n. 1, p. 196-202, Jan 2000. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606983> >.

MAHER, P. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. **J Biol Chem**, v. 274, n. 25, p. 17491-8, Jun 18 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

MANTHEY, J. A. **mFold, Delta G, and Melting Temperature: What Does it Mean?** Integrated DNA Technologies 2005.

MANTOVANI, A.; GARLANDA, C.; BOTTAZZI, B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. **Vaccine**, v. 21 Suppl 2, p. S43-7, Jun 2003. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763682> >.

MANTOVANI, A. et al. The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1285, p. 1-14, May 2013. ISSN 1749-6632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527487> >.

MATTILA, M. M.; HARKONEN, P. L. Role of fibroblast growth factor 8 in growth and progression of hormonal cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 18, n. 3-4, p. 257-66, Jun-Aug 2007. ISSN 1359-6101 (Print) 1359-6101.

MATTILA, P. K.; LAPPALAINEN, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 6, p. 446-54, Jun 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18464790> >.

MIHLAN, M. et al. Monomeric CRP contributes to complement control in fluid phase and on cellular surfaces and increases phagocytosis by recruiting factor H. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 12, p. 1630-40, Dec 2009. ISSN 1350-9047.

MOALLI, F. et al. Pathogen recognition by the long pentraxin PTX3. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 830421, 2011. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21716666> >.89

_____. The therapeutic potential of the humoral pattern recognition molecule PTX3 in chronic lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Immunol**, v. 186, n. 9, p. 5425-34, May 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441447> >.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759.

MUFF, R. et al. Altered morphology, nuclear stability and adhesion of highly metastatic derivatives of osteoblast-like SAOS-2 osteosarcoma cells. **Anticancer Res**, v. 27, n. 6b, p. 3973-9, Nov-Dec 2007. ISSN 0250-7005 (Print) 0250-7005.

NAUTA, A. J. et al. Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 2, p. 465-73, Feb 2003. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12645945> >.

NG, P. M. et al. C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. **Embo j**, v. 26, n. 14, p. 3431-40, Jul 25 2007. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189. NIELSEN, H. J. et al. Elevated plasma levels of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 decrease during improvement of psoriasis. **Inflammation Research**, v. 51, n. 11, p. 563-567, 2002/11/01 2002. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/PL00012428> >.

NISSEN, L. J. et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. **J Clin Invest**, v. 117, n. 10, p. 2766-77, Oct 2007. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738.

NOMA, H. et al. PENTRAXIN 3 AND OTHER INFLAMMATORY FACTORS IN CENTRAL RETINAL VEIN OCCLUSION AND MACULAR EDEMA. **Retina**, Jul 2013. ISSN 1539-2864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23842103> >.

OKEMEFUNA, A. I. et al. Complement factor H binds at two independent sites to C-reactive protein in acute phase concentrations. **J Biol Chem**, v. 285, n. 2, p. 1053-65, Jan 8 2010. ISSN 0021-9258.

ORI, A.; WILKINSON, M. C.; FERNIG, D. G. The heparanome and regulation of cell function: structures, functions and challenges. **Front Biosci**, v. 13, p. 4309-38, 2008. ISSN 1093-9946 (Print) 1093-4715.

ORTEGA-HERNANDEZ, O. D. et al. The long pentraxin 3 and its role in autoimmunity. **Semin Arthritis Rheum**, v. 39, n. 1, p. 38-54, Aug 2009. ISSN 1532-866X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18614204> >.

PAPER, D. H. Natural products as angiogenesis inhibitors. **Planta Med**, v. 64, n. 8, p. 686-95, Dec 1998. ISSN 0032-0943 (Print) 0032-0943.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **J Clin Invest**, v. 111, n. 12, p. 1805-12, Jun 2003. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738. 90

PERI, G. et al. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. **Circulation**, v. 102, n. 6, p. 636-41, Aug 8 2000. ISSN 0009-7322. PRESTA, M. et al. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 4, p. 723-38, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760835> >.

_____. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 159-78, Apr 2005. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863032> >.

RAJPUT, A. et al. Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. **The Journal of surgical research**, v. 147, n. 2, p. 276-281, 2008. ISSN 0022-4804. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480407002788?showall=true> >.

RASHEED, S. et al. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). **Cancer**, v. 33, n. 4, p. 1027-1033, 1974. ISSN 1097-0142. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(197404\)33:4<1027::AID-CNCR2820330419>3.0.CO](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(197404)33:4<1027::AID-CNCR2820330419>3.0.CO) >.

RAUCCI, A. et al. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. **J Biol Chem**, v. 279, n. 3, p. 1747-56, Jan 16 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

READING, P. C. et al. Antiviral activity of the long chain pentraxin PTX3 against influenza viruses. **J Immunol**, v. 180, n. 5, p. 3391-8, Mar 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18292565> >.

REAL, J. M. et al. Pentraxin 3 accelerates lung injury in high tidal volume ventilation in mice. **Mol Immunol**, v. 51, n. 1, p. 82-90, May 2012. ISSN 1872-9142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22425349> >.

RIBATTI, D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 11, n. 1, p. 3-10, 2008/03/01 2008. ISSN 0969-6970. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-008-9092-6> >.

RODAN, S. B. et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic

properties. **Cancer Res**, v. 47, n. 18, p. 4961-6, Sep 15 1987. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472. ROLPH, M. S. et al. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 5, p. e10-4, May 2002. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006411> >.

RONCA, R. et al. Long pentraxin-3 as an epithelial-stromal fibroblast growth factor-targeting inhibitor in prostate cancer. **J Pathol**, v. 230, n. 2, p. 228-38, Jun 2013. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23424081> >.

_____. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2760-71, Dec 2013. ISSN 1535-7163. 91

ROUMENINA, L. T. et al. Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains. **Biochemistry**, v. 45, n. 13, p. 4093-104, Apr 2006. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16566583> >.

RUSNATI, M. et al. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. **Blood**, v. 104, n. 1, p. 92-9, Jul 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031207> >.

SALIO, M. et al. Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. **Circulation**, v. 117, n. 8, p. 1055-64, Feb 2008. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268142> >.

SAMBUY, Y. et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. **Cell Biology and Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 1-26, 2005/01/01 2005. ISSN 0742-2091. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6> >.

SHAIN, S. A. et al. Endogenous fibroblast growth factor-1 or fibroblast growth factor-2 modulate prostate cancer cell proliferation. **Cell Growth Differ**, v. 7, n. 5, p. 573-86, May 1996. ISSN 1044-9523 (Print) 1044-9523.

SOARES, A. C. et al. Dual function of the long pentraxin PTX3 in resistance against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in transgenic mice. **Microbes Infect**, v. 8, n. 5, p. 1321-9, Apr 2006. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697676> >.

SONG, Z. et al. The effect of fibroblast growth factor 8, isoform b, on the biology of prostate carcinoma cells and their interaction with stromal cells. **Cancer Res**, v. 60, n. 23, p. 6730-6, Dec 1 2000. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

SOUZA, D. G. et al. The long pentraxin PTX3 is crucial for tissue inflammation after intestinal ischemia and reperfusion in mice. **Am J Pathol**, v. 174, n. 4, p. 1309-18, Apr 2009. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286566> >.

SPIELHOLZ, C. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. **Blood**, v. 85, n. 4, p. 973-80, Feb 15 1995. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

TADA, H. et al. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods**, v. 93, n. 2, p. 157-65, Nov 6 1986. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759.

TANAKA, A. et al. Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 19, p. 8928-32, Oct 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424. TANIO, M.; WAKAMATSU, K.; KOHNO, T. Binding site of C-reactive protein on M-ficolin. **Mol Immunol**, v. 47, n. 2-3, p. 215-21, Dec 2009. ISSN 0161-5890.

TASSI, E.; WELLSTEIN, A. Tumor angiogenesis: initiation and targeting - therapeutic targeting of an FGF-binding protein, an angiogenic switch molecule, and indicator of early stages of gastrointestinal 92 adenocarcinomas -. **Cancer Res Treat**, v. 38, n. 4, p. 189-97, Dec 2006. ISSN 1598-2998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19771241> >.

TURNER, N.; GROSE, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 2, p. 116-29, Feb 2010. ISSN 1474-175x.

VAN HINSBERGH, V. W.; COLLEN, A.; KOOLWIJK, P. Angiogenesis and anti-angiogenesis: perspectives for the treatment of solid tumors. **Ann Oncol**, v. 10 Suppl 4, p. 60-3, 1999. ISSN 0923-7534 (Print) 0923-7534.

WANG, J. G. et al. Disorders in angiogenesis and redox pathways are main factors contributing to the progression of rheumatoid arthritis: a comparative proteomics study. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 4, p. 993-1004, Apr 2012. ISSN 1529-0131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006448> >.

WARE, J. A.; SIMONS, M. Angiogenesis in ischemic heart disease. **Nat Med**, v. 3, n. 2, p. 158-164, 02//print 1997. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nm0297-158> >.

WICK, N. et al. Transcriptomal comparison of human dermal lymphatic endothelial cells ex vivo and in vitro. **Physiol Genomics**, v. 28, n. 2, p. 179-92, Jan 17 2007. ISSN 1094-8341.

WIEDEMANN, M.; TRUEB, B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. **Genomics**, v. 69, n. 2, p. 275-9, Oct 15 2000. ISSN 0888-7543 (Print) 0888-7543.

YAMASHITA, A. et al. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. **J Immunol**, v. 168, n. 1, p. 450-7, Jan 2002. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751992> >.

YOSHIDA, A. et al. Intraocular neovascularization. **Histol Histopathol**, v. 14, n. 4, p. 1287-94, Oct 1999. ISSN 0213-3911. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506944> >.

ZICHE, M.; DONNINI, S.; MORBIDELLI, L. Development of new drugs in angiogenesis. **Curr Drug Targets**, v. 5, n. 5, p. 485-93, Jul 2004. ISSN 1389-4501 (Print) 1389-4501.