

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



AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROTEÍNA PENTRAXINA 3 EM CÉLULAS TUMORAIS MURINAS

ALUNA: PRISCILA FABIANA RODRIGUES

ORIENTADORA: ADRIANA ABALEN MARTINS DIAS

BELO HORIZONTE
2014

PRISCILA FABIANA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PROTEÍNA PENTRAXINA 3 EM CÉLULAS
TUMORAIS MURINAS**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-graduação em Genética, do Departamento de Biologia Geral, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como exigência parcial à obtenção do Título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: DRA. ADRIANA ABALEN
MARTINS DIAS

BELO HORIZONTE
ABRIL 2014

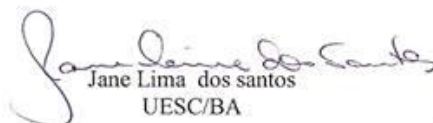
"Avaliação do efeito da proteína Pentraxina 3 em células tumorais murinas."

Priscila Fabiana Rodrigues

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Adriana Abalen Martins Dias - Orientadora
UFMG/ICB


Anderson Miyoshi
UFMG


Jane Lima dos Santos
UESC/BA

Belo Horizonte, 14 de abril de 2014.

À minha família, fonte de forças para as minhas batalhas.

AGRADECIMENTOS

Ao me aproximar do fim e olhar para trás percebo que só tenho a agradecer as pessoas especiais que já faziam parte da minha vida e as que entraram por todo o carinho. Resumiria estes dois anos em uma palavra: agradecimento. À quem contribuiu para o meu crescimento científico e humano: MUITO OBRIGADA!

Aos meus pais, José Geraldo e Helena, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e pelos ensinamentos e valores passados que me fazem ser uma pessoa capaz de lutar. Obrigada por, apesar de todas as dificuldades, entenderem o meu mau humor provocado por frustrações experimentais com toda paciência, me apoiarem e por estarem sempre prontos para me aparar.

Aos meus irmãos, Camila e Mateus. À Camila, por ser além de minha irmã, ser minha amiga. Ser a minha válvula de escape, me fazendo rir e, mesmo com um mar de distância entre nós, me socorrer nas formatações e leituras de revisão. O seu apoio e as suas palavras: “Relaxa, vai dar certo!” foram fundamentais. Ao Mateus que em nenhum momento esteve presente fisicamente, mas esteve sempre no meu coração, olhando por mim lá cima e me dando forças.

À minha família que soube compreender minhas ausências. Em especial, a minha vó, por todo o carinho e estar sempre do meu lado. E a minha tia Enedina, minha grande incentivadora, antes mesmo da graduação, obrigada por todo o seu carinho e torcida, importantíssimos em todos os meus passos.

Aos velhos amigos e aos novos, pessoas especiais que entraram na minha vida durante esse período e que, através de uma mensagem ou pessoalmente, conseguiram melhorar o meu dia.

À Dra. Adriana Abalen, não só pela orientação, mas por ter me acolhido e confiado no meu trabalho, mesmo sem me conhecer. Obrigada por ter sido uma verdadeira “mãe científica”, com carinho, paciência e puxões de orelha, me incentivando a sempre dar o melhor e mostrando os caminhos da ciência. Espero que saiba a sua enorme culpa positiva na minha formação. Um exemplo de profissional, capacidade intelectual e bom humor.

Aos colegas de laboratório Flavinha, João, Joyce e Léo que, além de toda a ajuda, me proporcionaram momentos de descontração e risos, tornando tudo mais leve. Em especial, o meu muito obrigada a Flávia por todas as contribuições e “quebradas de galho”, foi uma honra tê-la como aluna de iniciação científica. E ao João, meu “irmão de batalha”.

Ao LGEx, o qual eu vi nascer e acompanharei o seu sucesso, mesmo que de longe.

Este trabalho não seria possível sem a ajuda e colaboração de muitos professores e laboratórios. E por isso, o meu muito obrigada a todos!

À Dra. Cecília Garlanda do Instituto Clínico Humanitas na Itália, por gentilmente ter nos doado a proteína Ptx3.

Aos professores Jonatas Abrahão, Erna Geessien, Cláudio Bonjardim, Giliane Trindade e Paulo César Ferreira do Laboratório de Vírus pela confiança em nós depositada que nos permitiu livre acesso ao laboratório para realizarmos a cultura de células, base desse trabalho. Aos alunos que dividiram conosco o espaço com paciência. Em especial, à Paula Marinho, Flávia Viana, Ana Paula Pessoa, Jonas Dutra e Alice Abreu pela ajuda e auxílio em alguns fins de semana com a maior boa vontade.

À professora Maria Bernadete Lovato do Laboratório de Genética de Populações por nos permitir utilizar os equipamentos do seu laboratório, em especial as suas alunas Renata, Bárbara, Luciana, Paula por dividir conosco o uso dos equipamentos e pela solicitude em nos ajudar.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Genética Celular e Molecular, Laboratório de Diversidade Genética Humana, Laboratório de Genética de Microorganismos, Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas, Laboratório de Genética Humana e Médica, Núcleo de Estudos de Inflamação, Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular e Laboratório de Citogenômica Evolutiva pela disponibilidade e auxílio, seja na utilização de um equipamento ou na doação de um reagente, o que viabilizou esse trabalho. Em especial, as alunas Natayme Tartaglia e Karina Santana, por todo o bom humor durante a utilização do fotodocumentador, à Marlene Miranda e Raphael Steinberg pela ajuda inicial e à Bruna Araújo por toda sua disponibilidade em me ajudar.

Ao Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas pelo uso do leitor de placa nos experimentos de MTT. Em especial, ao Anderson que sempre foi muito solícito em nos ajudar.

À professora Diana Bahia pela ajuda e incentivo nos experimentos de imunofluorescência.

Ao professor Renato Mortara da UNIFESP por ter nos aberto as portas do seu laboratório nos experimentos de imunofluorescência. E ao seu aluno de doutorado Alexis Bonfim por todo o auxílio, dicas, paciência e boa vontade em nos ajudar durante a obtenção de imagens.

À todos os mestres que passaram pela minha vida estudantil e contribuíram enormemente para o meu crescimento e conhecimento.

Aos professores Anderson Miyoshi, Jane Lima e Diana Bahia por gentilmente terem aceito avaliar e contribuir com esse trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética pela oportunidade.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Genética, Eduardo Tarazona, Ana Lúcia Brunialti e Anderson Miyoshi pela coordenação.

Às secretárias da pós-graduação, Mary das Graças e Enaile pelos serviços prestados e disponibilidade em ajudar.

À todos os funcionários do ICB e da UFMG que com um simples sorriso melhoraram o meu dia.

Às agências de fomento, FAPEMIG, PRPq e ao Programa de Pós-graduação em Genética pelo auxílio financeiro que viabilizou esse projeto. Em especial, a CAPES, financiadora da minha bolsa.

A todos serei sempre grata!

RESUMO

Pentraxina 3 (PTX3) é uma importante proteína inflamatória, componente essencial da resposta imune inata, com função também na deposição de matriz e fertilidade feminina. Além disso, ela também é capaz de se ligar ao fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) e inibir as atividades biológicas de indução da proliferação celular e angiogênese promovidas por esse fator. PTX3 se liga a FGF2 no sítio de interação com o seu receptor (FGFR) e impede que a ligação FGF2/FGFR ocorra e, conseqüentemente, vias de sinalização que ativam genes ligados à proliferação celular, migração, diferenciação, sobrevivência e angiogênese não são ativadas. As neoplasias figuram entre as principais causas de morte mundiais e as estimativas apontam para um aumento de sua incidência no mundo todo. A via de sinalização de FGF é importante na biologia dos tumores por regular a proliferação celular e a angiogênese, processos essenciais para o crescimento e desenvolvimento tumoral. A identificação de inibidores desta via é importante para o entendimento da biologia do câncer e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas visando controlar o crescimento e a progressão tumoral. PTX3 é um antagonista natural de FGF2 que, além de inibir a proliferação celular e a angiogênese induzidas por esse fator, também é capaz de diminuir o crescimento e volume tumoral *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito biológico de Ptx3 em linhagens de células tumorais murinas derivadas de melanoma melanocítico (B16F10 e B16F1), melanoma amelanocítico (K1735 e K1735 M2) e fibrosarcoma (MC-TGS17-51 e Sal/N). A morfologia das células foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase e a estrutura do citoesqueleto de actina por imunofluorescência. A proliferação celular foi analisada pelo método MTT e o padrão de expressão de genes por RT-PCR. Nas condições dos nossos ensaios, o tratamento com Ptx3 não promoveu mudanças morfológicas nas células ou no padrão de organização da actina nas linhagens K1735 M2 e B16F1. Um maior número de células viáveis em comparação com o controle foi observado nas células tratadas com Ptx3. Foi verificado que todas as linhagens expressam os receptores Fgfr1, 3 e 4. Já a expressão do receptor Fgfr2 foi observada apenas na linhagem de fibrosarcoma Sal/N. Somente a linhagem de melanoma K1735 não apresentou expressão basal de Ptx3 e a linhagem B16F1 a expressão de Fgf2. Nossos dados corroboram os achados de ausência de expressão de Fgfr2 nos tumores, especialmente nos melanomas, e mostram de forma inédita a expressão de Ptx3 em linhagens murinas de fibrosarcomas e melanomas. Os resultados aqui apresentados contribuem para a caracterização funcional de PTX3, e apontam a necessidade de estudos buscando avaliar o seu papel no microambiente tumoral e a possibilidade do seu uso como biomarcador no diagnóstico diferencial e prognóstico de tumores.

Palavras chave: *Pentraxina 3; Fator de crescimento de fibroblasto 2; Melanoma; Fibrosarcoma.*

ABSTRACT

Pentraxin 3 (PTX3) is an inflammatory protein that plays important role in innate immunity, matrix deposition and female fertility. Moreover, it is a natural antagonist of fibroblast growth factor 2 (FGF2) that inhibit the cellular proliferation and angiogenesis promoted by this factor. PTX3 binds to FGF2 in the site of interaction with its receptor (FGFR) preventing the activation of FGF2/FGFR signaling pathway and, as a consequence, inhibiting the expression of genes related to cell proliferation, migration, differentiation, survival and angiogenesis. Neoplasms are among the leading causes of death worldwide and the estimatives point to an increase in incidence of this type of disease. The FGF signaling pathway is crucial in tumor biology by regulating essential processes in tumorigenesis, as cell proliferation and angiogenesis. The identification of inhibitors of this pathway is important for the understanding of the biology of cancer and for the development of therapeutic approaches aimed at controlling growth and tumor progression. The objective of this study was to evaluate the biological effect of PTX3 in murine tumor cell lines derived from melanocytic melanoma (B16F10 and B16F1), amelanocytic melanoma (K1735 and K1735 M2) and fibrosarcoma (MC-TGS17-51 and Sal/N). The morphology of the cells was assessed by optical phase contrast microscopy and the structure of the actin cytoskeleton by immunofluorescence. Cell proliferation was evaluated by MTT assay and gene expression profile was measured by RT-PCR. Under our experimental conditions, PTX3 did not promote morphological changes or in the pattern of organization of actin in the cells K1735 M2 and B16F1. A higher number of viable cells compared to control was observed in response to the treatment with PTX3 in all types of cells. The expression of the FGF receptors (FGFR) 1, 3 and 4 was verified in all cells but the expression of FGFR2 was detected only in the lineage of fibrosarcoma Sal/N. Ptx3 was expressed by almost all cell lines but not by K1735 melanoma. No FGF2 basal expression was observed in B16F1 melanoma. Our data corroborate the findings of lack of expression of FGFR2 in tumors, particularly melanomas. We show here, for the first time, the expression of PTX3 in murine fibrosarcomas and melanomas. The results presented here contribute to the functional characterization of PTX3 and point out the need for studies aiming the evaluation of its role in the tumor microenvironment and the potential usage of PTX3 as a biomarker for the diagnosis and prognosis of tumors.

Keywords: Pentraxin 3; Fibroblast growth factor 2; Melanoma; Fibrosarcoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre PTX3 e as pentraxinas curtas CRP e SAP	17
Figura 2 - Estrutura molecular do gene de PTX3 humano e murino	18
Figura 3 - Modelo proposto da proteína PTX3	19
Figura 4 - PTX3 na imunidade, inflamação, deposição da matrix extracelular e fertilidade...	21
Figura 5 - Via de sinalização de FGF	26
Figura 6 - Efeito de PTX3 sobre a via de sinalização de FGF.....	29
Figura 7 - Desenho Experimental.....	33
Figura 8 - Linhagens celulares MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1	35
Figura 9 - Curva de crescimento por confluência das linhagens MC-TGS17-51, Sal/N e K1735	43
Figura 10 - Curva de crescimento por confluência das linhagens K1735 M2, B16F10 e B16F1	45
Figura 11 - Morfologia celular da linhagem de melanoma murino K1735 M2	47
Figura 12 - Morfologia celular da linhagem de melanoma murino B16F1	48
Figura 13 - Fotomicrografia de fluorescência da linhagem K1735 M2	50
Figura 14 - Fotomicrografia de fluorescência da linhagem B16F1	51
Figura 15 - Análise da proliferação celular	53
Figura 16 - Análise da integridade do RNA total extraído das células tumorais	55
Figura 17 - Controle de qualidade da transcrição reversa a partir do RNA total extraído das linhagens	56
Figura 18 - Controle de contaminação do RNA total extraído por DNA genômico	57
Figura 19 - Análise da expressão basal dos genes Ptx3, Fgf2, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3 e Fgfr4 nas linhagens MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735M2, B16F10 e B16F1	58
Figura 20 - Análise da integridade do RNA total extraído da linhagem B16F10 tratada com Ptx3	61
Figura 21 - Controle da qualidade do cDNA sintetizado da linhagem de melanoma murino B16F10 tratada com Ptx3	61
Figura 22 - Análise da expressão dos genes Ptx3, Fgf2, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3 e Fgfr4 após tratamento com Ptx3 na linhagem de melanoma murino B16F10	63
Figura 23 – Estrutura dos éxons do gene <i>Gapdh</i> murino	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Iniciadores desenhados e utilizados nas reações de RT-PCR para a análise da expressão gênica.....	41
Tabela 2 – Análise quantitativa do RNA total extraído.....	55
Tabela 3 – Expressão gênica de Ptx3, Fgf2, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3 e Fgfr4 nas linhagens MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1.....	59
Tabela 4 – Análise quantitativa do RNA total extraído após tratamento com Ptx3.....	60
Tabela 5 – Iniciadores desenhados para expressão gênica por RTq-PCR.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BrdU	Bromo deoxiuridina
cDNA	DNA complementar
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CO₂	Dióxido de carbono
CRP	Proteína C-reativa
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal
DAPI	4'6'-Diamidina- 2' fenilindol-dihidrochlorido
DC	Células dendríticas
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecos's modified Eagle médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
ECM	Matriz extracelular
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFBP	Fator de crescimento de fibroblasto de ligação a proteína
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FGFR	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
H	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HSPG	Proteoglicanos heparan sulfatados

IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
Ig	Imunoglobulina
IL1B	Interleucina 1 beta
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate assay</i>
LGEx	Laboratório de Genética Experimental
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MTT	Brometo de 3-[4,-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
N-terminal	Extremidade amino-terminal de uma proteína
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
Pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PGN	PBS contendo 0,25% gelatina e 0,1% de azida sódica
PPD	p-fenilenodiamina
PRMs	Receptores de reconhecimento de padrões
PTX3	Pentraxina 3
q.s.p	Quantidade suficiente para
rmPtx3	Proteína Ptx3 recombinante murina
RNA	Ácido rinonucleico

RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT	Transcrição reversa
RTK	Receptor tirosina quinase
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RTq-PCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
SAP	Proteína soro-amilóide
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>SDS - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TRICT	Tetrametilrodamina B isotiocianato
TSG-14	<i>TNF stimulated gene-14</i>
TLR	Receptor do tipo Toll
TNFA	Fator de necrose tumoral alfa
UNIFESP	Universidade Estadual de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
WHO	Organização Mundial da Saúde

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 FAMÍLIA DA PENTRAXINAS	17
1.2 PENTRAXINA 3	18
1.2.1 Estrutura do Gene e da Proteína	18
1.2.2 Fontes Celulares e Estímulos Indutores.....	20
1.2.3 Ligantes e Funções.....	21
1.3 FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS	23
1.3.1 Família dos Fatores de Crescimento de Fibroblastos	23
1.3.2 Receptores de FGF	24
1.3.3 Via de Sinalização de FGF	24
1.3.4 Fator de Crescimento de Fibroblasto 2	27
1.4 INTERAÇÃO ENTRE PTX3 E OS FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO	27
1.5 FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO E CÂNCER.....	28
1.6 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL	33
3.2 CULTURA DE CÉLULAS	34
3.3 PROTEÍNA Ptx3 RECOMBINANTE MURINA.....	34
3.3.1 Fonte de Ptx3	34
3.4 CURVA DE CRESCIMENTO.....	36
3.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	36
3.5.1 Morfologia por Microscopia Óptica	36
3.5.2 Análise do Citoesqueleto de Actina.....	37

3.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	38
3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	38
3.7.1 Cultura de Células e Tratamento com Ptx3.....	38
3.7.2 Extração de RNA	39
3.7.3 Transcrição Reversa	39
3.7.4 Desenho dos Iniciadores Específicos.....	40
3.7.5 Condições da PCR Utilizando Iniciadores Específicos.....	40
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	41
4. RESULTADOS	42
4.1 CURVAS DE CRESCIMENTO	42
4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS.....	45
4.2.1 Morfologia por Microscopia Óptica.....	46
4.2.2 Análise do Citoesqueleto de Actina.....	49
4.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR	52
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	54
4.4.1 Expressão Gênica Basal.....	54
4.4.1.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA	54
4.4.1.2 Análise da Expressão Gênica de Ptx3, Fgf2, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3 e Fgfr4.....	57
4.4.2 Análise da Expressão Gênica após o Tratamento com Ptx3.....	59
4.4.2.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA	60
4.4.2.2 Análise da Expressão Gênica de Ptx3, Fgf2, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3 e Fgfr4 após Tratamento com Ptx3.....	62
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES.....	75
7. PERSPECTIVAS	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
Anexo I	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA DA PENTRAXINAS

As pentraxinas constituem uma superfamília de proteínas filogeneticamente conservadas desde aracnídeos até os mamíferos. Elas são receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRMs) solúveis. Os PRMs reconhecem motivos microbianos altamente conservados, chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e, por isso, são consideradas componentes essenciais do sistema imune inato (Bottazzi, Garlanda, *et al.*, 2006). Todos os membros da família compartilham uma porção carboxi-terminal (C-terminal) semelhante, o chamado domínio pentraxina. Nesse domínio há uma sequência conservada de 8 aminoácidos (HxCxS/TWxS, onde x é um aminoácido qualquer), que é a assinatura das pentraxinas (Garlanda *et al.*, 2005; Bottazzi, Bastone, *et al.*, 2006) (Figura 1).

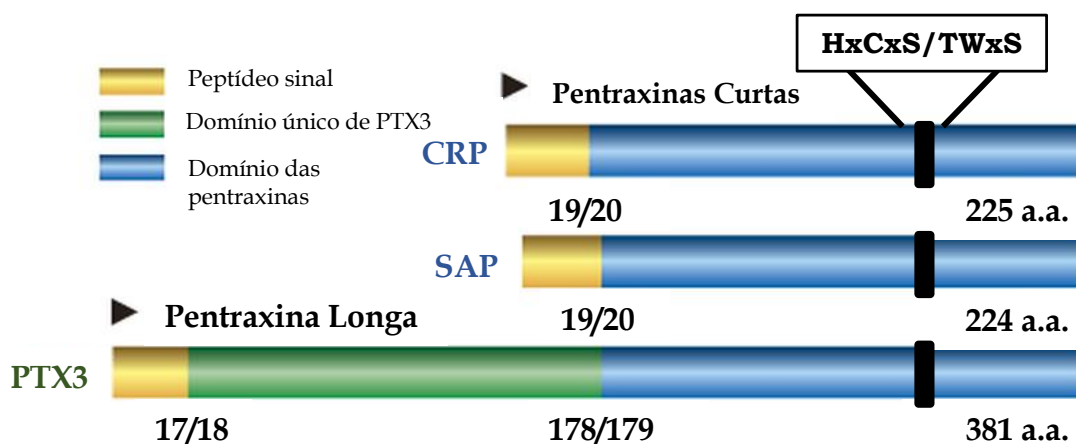


Figura 1 - Comparação entre PTX3 e as pentraxinas curtas CRP e SAP.

De acordo com o seu tamanho as pentraxinas são divididas em dois grupos: as pentraxinas curtas e as longas. As proteínas CRP e SAP são as principais representantes das proteínas curtas e PTX3 das longas. Em azul, o domínio pentraxina com a assinatura das pentraxinas; Em verde, o domínio N-terminal único de PTX3; Em amarelo, a sequência do peptídeo sinal.

Fonte: modificado de Garlanda *et al.*, 2002.

Baseado na estrutura primária das subunidades, os membros da família são divididos em dois grupos: pentraxinas curtas (25 kDa) e pentraxinas longas (40-50 kDa) (Goodman *et al.*, 1996) (Figura 1). A proteína C-reativa (CRP) e a proteína soro-amiloide (SAP) são representantes das pentraxinas curtas sendo as principais proteínas de fase aguda (proteínas que aumentam ou diminuem sua concentração sérica em resposta à inflamação) em humanos e camundongos, respectivamente. As pentraxinas curtas são produzidas no fígado, principalmente, em resposta a Interleucina-6 (Pepys e Hirschfield, 2003; Mantovani *et al.*, 2008; Deban *et al.*, 2011). O protótipo das pentraxinas longas é a proteína Pentraxina 3 (PTX3).

1.2 PENTRAXINA 3

1.2.1 Estrutura do Gene e da Proteína

A proteína PTX3, inicialmente nomeada de TSG-14 (*TNF stimulated gene-14*), foi a primeira pentraxina longa a ser identificada e caracterizada no início dos anos 1990s, (Lee *et al.*, 1990; Breviario *et al.*, 1992; Lee, Lee e Vilcek, 1993). Ela é uma glicoproteína de 381 aminoácidos, incluindo um seguimento de 17 aminoácidos correspondente ao peptídeo sinal (Breviario *et al.*, 1992). A sequência primária de PTX3 é altamente conservada filogeneticamente, o que sugere uma alta pressão evolucionária para manter sua estrutura/função (Mantovani *et al.*, 2013). Por exemplo, a homologia entre os resíduos de aminoácidos da proteína humana e murina é de 92% e a identidade de 82% (Garlanda *et al.*, 2006). Com relação à organização gênica, tanto o gene humano, quanto o gene murino estão localizados em regiões sintênicas do cromossomo 3 e ambos são organizados em três éxons separados por dois íntrons. Os dois primeiros éxons codificam o peptídeo sinal e a porção amino-terminal (N-terminal), enquanto o terceiro codifica o domínio C-terminal (figura 2) (Bottazzi *et al.*, 2010). A significativa homologia entre o gene *PTX3* humano e o murino sugere que os resultados de estudos em camundongos podem ser extrapolados para humanos (Balhara *et al.*, 2013).

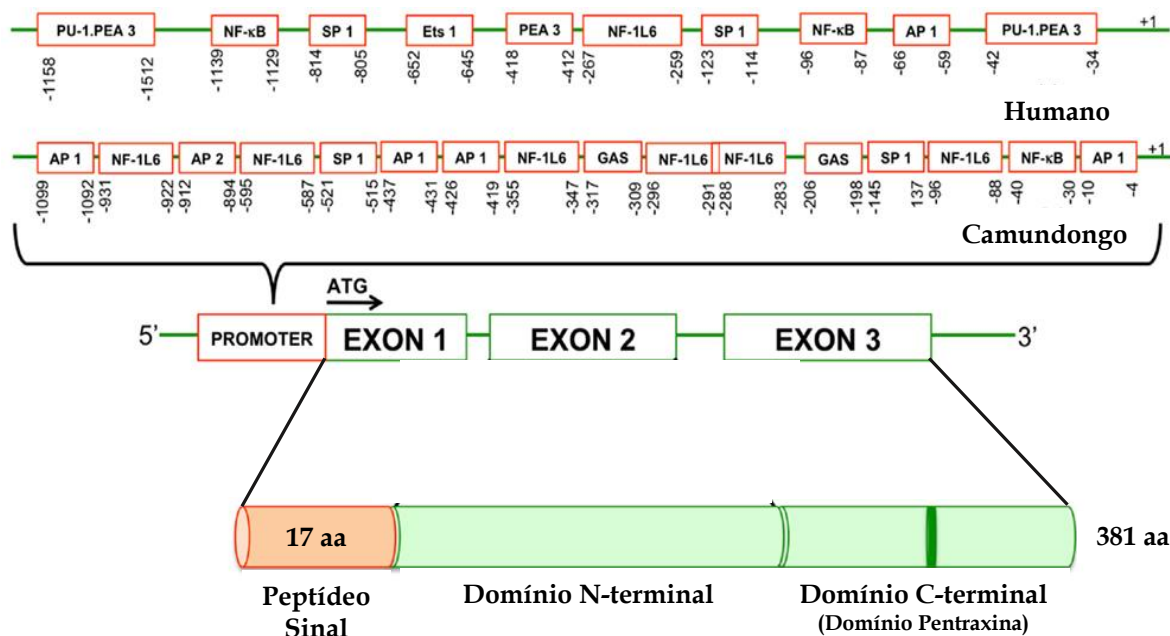


Figura 2 - Estrutura molecular do gene de PTX3 humano e murino.

O gene *PTX3* é organizado em uma região promotora e três éxons: o primeiro codifica o peptídeo sinal (17 aminoácidos), enquanto o segundo e o terceiro codificam os domínios N- e C-terminal da proteína (381 aminoácidos), respectivamente. A região promotora contém múltiplos sítios para fatores de transcrição.

Fonte: Modificado de Balhara *et al.*, 2013.

O domínio C-terminal de PTX3, de 203 aminoácidos, apresenta homologia com as pentraxinas curtas CRP e SAP (57 % de similaridade), enquanto o domínio N-terminal, de 178 aminoácidos, é inédito e não apresenta homologia com nenhuma outra proteína conhecida (Breviario et al., 1992; Garlanda et al., 2005). A estrutura da proteína é determinada pela cauda N-terminal (Inforzato et al., 2010). De acordo com predições da estrutura secundária de PTX3, a porção N-terminal forma quatro α -hélices, três das quais estão provavelmente envolvidas na formação de uma estrutura de “bobina enrolada” (Presta et al., 2007; Inforzato et al., 2010). Já o domínio C-terminal apresenta-se em forma de barril, com folhas β antiparalelas (Inforzato et al., 2010). Em contraste com a estrutura pentamérica das pentraxinas clássicas, recentemente, Inforzato e colaboradores (2010) propuseram que PTX3 é um octâmero assimétrico, composto por dois tetrâmeros ligados por pontes intercadeias (Figura 3) (Inforzato *et al.*, 2006).

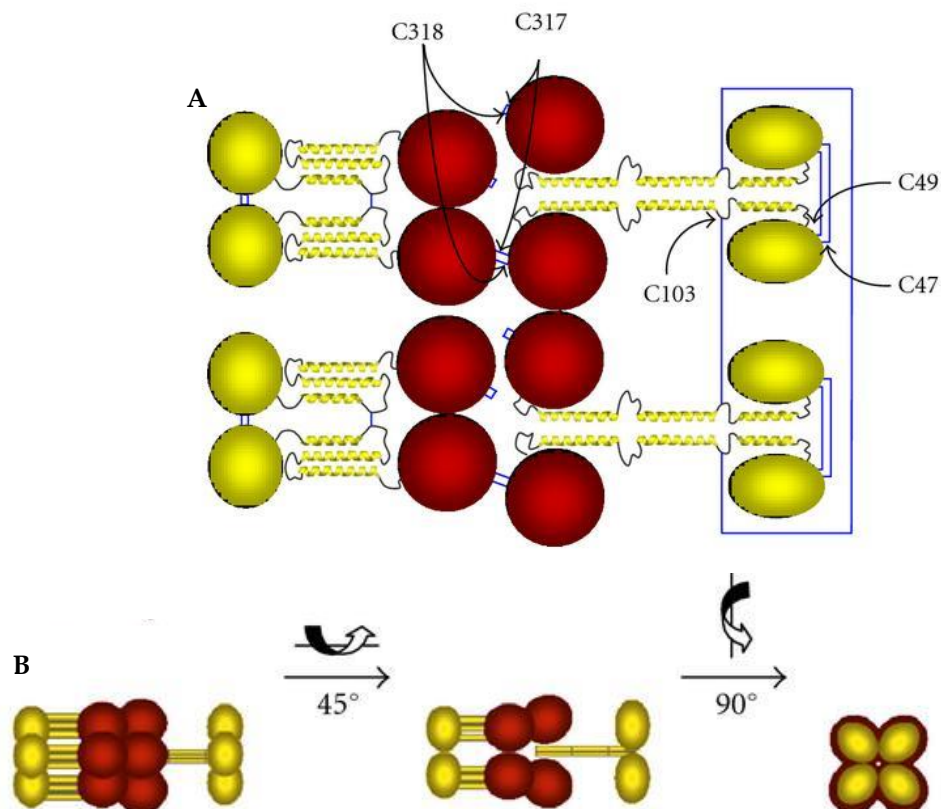


Figura 3 - Modelo proposto da proteína PTX3.

A) Organização das pontes 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. B) Os segmentos de α -hélice do domínio N-terminal são mostrados como hastes amarelas; E os domínios C-terminais estão representados em vermelho.

Fonte: Modificado de Inforzato *et al.*, 2010.

1.2.2 Fontes Celulares e Estímulos Indutores

Diferentemente de CRP e SAP, que são produzidas no fígado, PTX3 pode ser rapidamente e localmente produzida por diferentes tipos celulares, como monócitos, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais do sistema vascular e linfático, células epiteliais, células do músculo liso, fibroblastos e células dendríticas (DC), que são as principais fontes produtoras da proteína. Sua produção é estimulada pelas citocinas pro-inflamatórias primárias interleucina 1-beta (IL1B) e fator de necrose tumoral alfa (TNFA), microorganismos ou agonistas dos receptores do tipo Toll (TLR), como lipopolissacarídeos (LPS) (Figura 4), principais componentes da parede celular das bactérias gram-positivas, ou outra lipoproteína de membrana bacteriana, tal como a lipoarabinomanana, principal glicoproteolípido associado à parede celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Garlanda *et al.*, 2005; Inforzato *et al.*, 2011; Mantovani *et al.*, 2013). Além disso, hormônios glicocorticoides podem induzir e aumentar a expressão dessa proteína em fibroblastos em condições inflamatórias, mas não em células mielóides (Doni *et al.*, 2009), enquanto as lipoproteínas de alta densidade podem induzir a sua produção nas células endoteliais (Norata *et al.*, 2008). Em monócitos e DCs, IL1B é o principal indutor da produção de PTX3 e pode estimular a sua produção induzida por LPS (Doni *et al.*, 2003; Perrier *et al.*, 2004).

Apesar da produção de PTX3 em resposta a estímulos inflamatórios, há também uma forma constitutiva e já pronta da proteína, estocada em grânulos específicos dos neutrófilos (Jaillon *et al.*, 2007). Após a ativação por estímulos pro-inflamatórios, cerca de 25% da PTX3 estocada pelos neutrófilos é liberada, em sua forma monomérica, para o espaço extracelular. Assim, os neutrófilos representam um reservatório de PTX3 pronto para uso, que garante a sua liberação e atividade de forma rápida no início da inflamação aguda (Jaillon *et al.*, 2007).. Parte da proteína liberada permanece associada à célula-mãe por meio de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). A PTX3 que é liberada é funcionalmente competente bem antes da síntese de novas proteínas por outras células. Mesmo após a síntese de novas moléculas de PTX3 por outros tipos celulares, a proteína liberada pelos neutrófilos fornece quantidades suplementares dessa proteína. Além disso, a retenção de PTX3 nas NETs contribui para a geração de um microambiente antimicrobiano que aumenta a capacidade local para prender e matar micróbios (Brinkmann *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, PTX3 proveniente de neutrófilos é ainda responsável por um mecanismo de feedback negativo que restringe o excesso de transmigração de neutrófilos ativados em tecidos do hospedeiro, impedindo assim, a disseminação indesejada de reações inflamatórias (Jaillon *et al.*, 2009; Deban *et al.*, 2010; Kunes *et al.*, 2012)

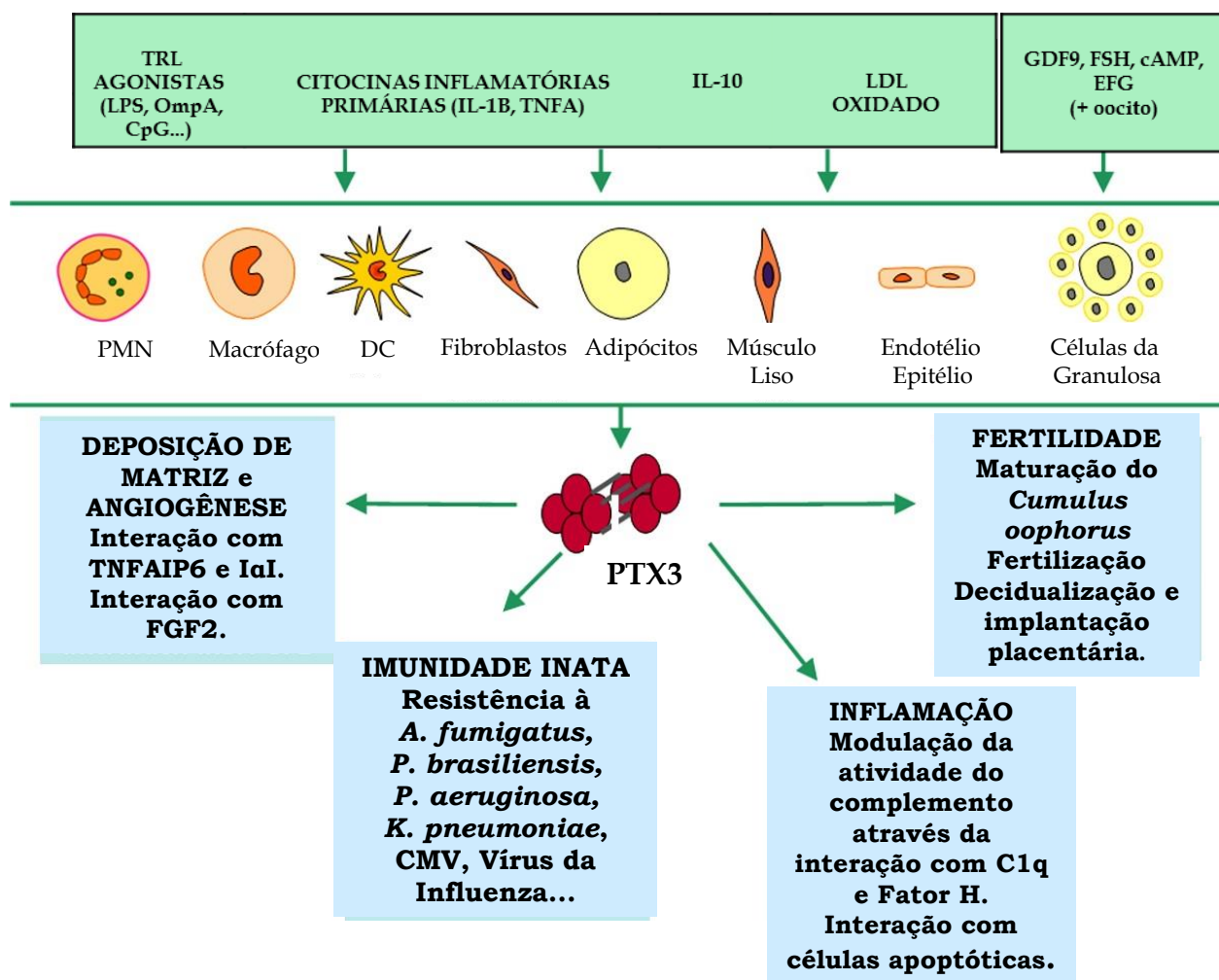


Figura 4 - PTX3 na imunidade, inflamação, deposição da matrix extracelular e fertilidade.

PTX3 é uma pentraxina longa multifuncional produzida por diferentes fontes celulares em resposta a estímulo inflamatório ou hormonal. TLR, receptores do tipo Toll; LPS, lipopolissacarídeos; OMP-A, proteína de membrana externa; IL-, interleucina; TNF, fator de necrose tumoral; GDF, fator de diferenciação de crescimento; FSH, hormônio foliculoestimulante; EGF, fator de crescimento epidérmico; PMN, neutrófilo polimorfonuclear; DC, células dendríticas; TNFAIP6, gene 6 estimulado por TNF; IαI inibidor de inter-alfa-tripsina; FGF, fator de crescimento de fibroblasto.

Fonte: Modificado de Garlanda *et al.*, 2009.

1.2.3 Ligantes e Funções

PTX3 é uma proteína multifuncional, cujas diversas funções biológicas estão associadas ao reconhecimento e ligação a diferentes ligantes. Ela, assim como as demais pentraxinas, tem papel chave no braço humoral da imunidade inata e desempenha um papel não redundante como PRM solúvel na detecção de patógenos, como fungos, bactérias gram-positivas e gram-negativas e a alguns tipos de vírus (Garlanda *et al.*, 2002).

A ligação específica entre PTX3 e o fungo *Aspergillus fumigatus* observada por Garlanda e colaboradores em 2002 parece facilitar o reconhecimento dos seus conídios pelos macrófagos. PTX3 também age como uma opsonina e leva a um aumento da fagocitose do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* e Zymosan, um componente da parede do fungo leveduriforme *Saccharomyces cerevisiae*, pelos macrófagos (Diniz *et al.*, 2004).

Também foi verificado que PTX3, além de ter papel relevante na infecção pelas bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, desempenha um duplo papel na infecção pulmonar por *Klebsiella pneumoniae*. PTX3 reconhece e se liga a um componente da membrana externa dessa bactéria, o KOmpA, e em presença de altas quantidades do agente infectante, Ptx3 esteve associada a uma maior letalidade de camundongos, aumento de óxido nítrico no soro, incapacidade dos neutrófilos em migrarem para o tecido pulmonar e maior disseminação da bactéria no sangue. Entretanto, em resposta a um menor número de partículas infectantes, a expressão aumentada de *Ptx3* demonstrou exercer um papel protetor, com aumento da produção de TNF, maior influxo de neutrófilos no pulmão e maior fagocitose dos patógenos pelos neutrófilos (Soares *et al.*, 2006). Além disso, também foi demonstrada a capacidade de PTX3 em reconhecer e se ligar ao citomegalovírus humano e murino e ao vírus da influenza tipo A reduzindo a carga viral e o potencial infeccioso desse vírus em células em cultura (Bozza *et al.*, 2006; Reading *et al.*, 2008).

Além do importante papel de PTX3 na imunidade inata, essa proteína desempenha um papel essencial na inflamação, onde se comporta como uma proteína de fase aguda. Os níveis plasmáticos de PTX3 são baixos em condições normais (aproximadamente 25 ng/ml em camundongos e menos que 2 ng/ml no homem) e aumentam rapidamente (pico em 6-8 horas) e dramaticamente (200-800 ng/ml em camundongos e no homem) durante o choque endotóxico, a sepse e em condições inflamatórias e infecciosas (Mantovani *et al.*, 2008; Deban *et al.*, 2011).

A fim de investigar a função fisiológica de PTX3, nosso grupo desenvolveu camundongos transgênicos que carregam cópias extras do gene *Ptx3* e demonstrou pela primeira vez a importância dessa proteína na regulação da resposta inflamatória *in vivo*. Foi demonstrado também que pelo menos em parte, essa regulação ocorre pela modulação da expressão de TNF e IL1B produzidos tanto no local da inflamação, quanto sistemicamente, amplificando a resposta inflamatória (Dias *et al.*, 2001). Os animais transgênicos apresentaram maior sobrevivência, em relação a camundongos do tipo selvagem, em resposta ao choque endotóxico provocado pela administração sistêmica de LPS, bem como à infecção polimicrobiana desencadeada pela ligadura e perfuração do ceco (Dias *et al.*, 2001). PTX3 também parece

ter um efeito negativo durante a isquemia e reperfusão intestinal aumentando a lesão nos pulmões e intestinos e levando ao aumento da mortalidade (Souza *et al.*, 2009).

Além disso, PTX3 desempenha um papel relevante na biologia de várias doenças, entre elas as doenças cardíacas (Bonacina *et al.*, 2013), a aterosclerose (Garlanda *et al.*, 2011), em enfermidades agudas e crônicas dos rins (Speeckaert *et al.*, 2013), pulmonares (He, Han e Liu, 2007) e na fertilidade feminina (Bottazzi, Bastone, *et al.*, 2006). Ela também pode acelerar o desenvolvimento da lesão pulmonar induzida pela ventilação mecânica (Real *et al.*, 2012).

PRMs e componentes do complemento contribuem para opsonização de células apoptóticas e seu reconhecimento por fagócitos. Assim como as pentraxinas curtas, foi observado que PTX3 pode se ligar a células apoptóticas facilitando a sua remoção (Doni *et al.*, 2009; Jaillon *et al.*, 2009). Entretanto, PTX3 pode atuar de duas formas: quando associada à membrana, PTX3 promove a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, em contraste, quando na forma solúvel, o processo é inibido. Também foi demonstrado que PTX3 pode se ligar a fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e diminuir 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).

1.3 FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS

1.3.1 Família dos Fatores de Crescimento de Fibroblastos

A família dos FGF consiste de 18 membros identificados em mamíferos que desempenham funções no desenvolvimento, homeostase tecidual e metabolismo. Essas atividades são exercidas através da ligação dos FGFs a receptores específicos (FGFR) na superfície celular. Inicialmente, a família compreendia 23 membros, entretanto, quatro membros (FGF11-14) não apresentam ligação funcional aos receptores e exercem seus efeitos de modo puramente intácrinos, e, por esse motivo, foram retirados da lista original e são agora denominados fatores homólogos a FGF (FHF1-4) (Goldfarb *et al.*, 2007). Além disso, FGF15 não foi identificado em humanos e FGF19 não foi identificado em camundongos e ratos, levantando a hipótese de que eles são os produtos de genes ortólogos.

A maioria dos FGFs são proteínas secretadas com sequências de sinal de secreção na porção N-terminal. Entretanto, embora FGF1 e FGF2 não tenham estas sequências N-terminais, eles podem ser liberados a partir de células danificadas ou por meio de vias exocitóticas independentes da via do retículo endoplasmático-complexo de Golgi, contudo, os

mecanismos de sua secreção ainda não foram totalmente esclarecidos (Nickel, 2010; Paradiso, Zucchini e Simonato, 2013).

Com base em sua homologia e filogenia, os 18 membros ligantes da família de FGFs de mamíferos foram agrupados em seis subfamílias (Ornitz e Itoh, 2001; Popovici *et al.*, 2008; Itoh e Ornitz, 2011). Cinco dessas subfamílias atuam de maneira parácrina: a subfamília FGF1 (FGF1 e 2), a FGF4 (FGF4, 5 e 6), a FGF7 (FGF3, 7, 10 e 22), a FGF8 (FGF8, 17 e 18) e a subfamília FGF9 (FGF9, 16 e 20). Em contraste, a subfamília FGF19 (FGF19, 21 e 23) sinaliza de uma maneira endócrina (Paradiso, Zucchini e Simonato, 2013). Interessantemente, alguns FGFs tem sido identificados como tendo uma função nuclear (Bryant e Stow, 2005; Beenken e Mohammadi, 2009).

1.3.2 Receptores de FGF

Os FGFRs incluem quatro receptores transmembranares do tipo tirosina quinase (RTK) pertencentes a superfamília das imunoglobulinas (Ig) e altamente conservados, nomeados de FGFR1-4. Além dos quatro receptores, existe um quinto receptor, o FGFR5 (FGFRL-1). Todavia, embora os FGFs sejam capazes de se ligarem ao FGFR5, esse receptor não apresenta atividade quinase e, em decorrência da ausência dessa atividade, não há ativação das vias de sinalização intracelulares e dos efeitos biológicos induzidos por elas. Dessa forma, acredita-se que FGFR5 possa sequestrar os FGFs do meio e atuar como um agente regulador negativo das atividades de FGF (Johnson e Williams, 1993).

Cada monômero de FGFR consiste em um domínio extracelular, que contém o sítio de ligação de FGF, composto por duas ou três alças Ig, um domínio transmembranar e uma porção tirosina quinase extracelular. O primeiro domínio Ig apresenta um papel na auto-inibição do receptor (Olsen *et al.*, 2004), enquanto o segundo e terceiro mediam a ligação do FGF (Ornitz *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2006). Em FGFR1-3 pode ocorrer *splicing* alternativo do terceiro domínio Ig que influencia a geração de uma segunda divisão na terceira Ig, as isoformas IIIb e IIIc (Chellaiah *et al.*, 1994). A isoforma IIIc é usualmente expressa em tecidos mesenquimais, enquanto que a IIIb é geralmente expressa em células epiteliais, principalmente durante o desenvolvimento. Interessantemente, os ligantes de receptores epiteliais são frequentemente expressos em tecidos mesenquimais e vice-versa, o que demonstra a sinalização parácrina (Grose *et al.*, 2007).

1.3.3 Via de Sinalização de FGF

A via de sinalização de FGF desempenha um papel crítico em muitos processos fisiológicos durante o desenvolvimento embrionário e a manutenção dos organismos adultos (Beenken e

Mohammadi, 2009). A ligação de FGF aos receptores desencadeia cascatas de sinalização intracelulares que controlam diversos processos celulares vitais.

As moléculas de FGFs são secretadas e sequestradas para a matriz extracelular (ECM), onde se ligam com baixa afinidade a proteoglicanos heparan sulfatados (HSPG) (Harmer *et al.*, 2004; Mohammadi, Olsen e Ibrahimi, 2005; Ori, Wilkinson e Fernig, 2008). Eles são liberados da ECM, juntamente com o HSPG, por heparanases, proteases ou proteínas de ligação a FGF (FGFBP) e uma vez livres, eles podem interagir com o receptor, formando um complexo composto por 2 ligantes, 2 receptores e 1 HSPG (Naski e Ornitz, 1998). Além da molécula de HSPG proteger os FGFs da degradação, ela estabiliza a interação de alta afinidade que ocorre entre FGF e FGFR. A interação com o ligante promove a ativação do receptor e induz uma mudança conformacional, que resulta na sua dimerização. Essa dimerização permite a transfosforilação da tirosina dos domínios quinase intracelulares e gera a ancoragem e a fosforilação de proteínas adaptadoras de início de vias de sinalização. As proteínas adaptadoras recrutam outras proteínas, ativando importantes vias de transdução de sinais, que culminam na indução de genes específicos nos processos de diferenciação, proliferação, migração, e sobrevivência celular, por exemplo. Quatro vias de sinalização principais são ativadas pela interação FGF/FGFR, as vias RAS-RAF-MAPK, PI3K-AKT, STAT e PLC γ (Beenken e Mohammadi, 2009; Turner e Grose, 2010; Paradiso, Zucchini e Simonato, 2013) (Figura 5).

A via de sinalização de FGF desempenha um papel essencial no desenvolvimento e metabolismo dos metazoários. Vários autores tem apontado a necessidade de sinalização de FGF em múltiplos processos durante a embriogênese, morfogênese e organogênese, e também durante processos metabólicos e homeostase (Belov e Mohammadi, 2013). Além disso, dada a sua importância biológica, alterações na via de sinalização de FGF contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de várias doenças, incluindo algumas síndromes, tais como a craniosinostose congênita e a síndrome de nanismo (Naski *et al.*, 1996; Wilkie *et al.*, 2002; Wilkie, 2005) e para a progressão de distúrbios metabólicos adquiridos, como a obesidade (Inagaki *et al.*, 2007; Moyers *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2011) e distúrbios crônicos do rim (Fliser *et al.*, 2007). Também há evidências do importante papel da sinalização de FGF no aparecimento e desenvolvimento de muitos tumores (Rand *et al.*, 2005; Pollock *et al.*, 2007; Gartside *et al.*, 2009; Di Martino, Tomlinson e Knowles, 2012). Diante da importância fisiopatológica da sinalização de FGF, ela se torna alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Beenken e Mohammadi, 2009).

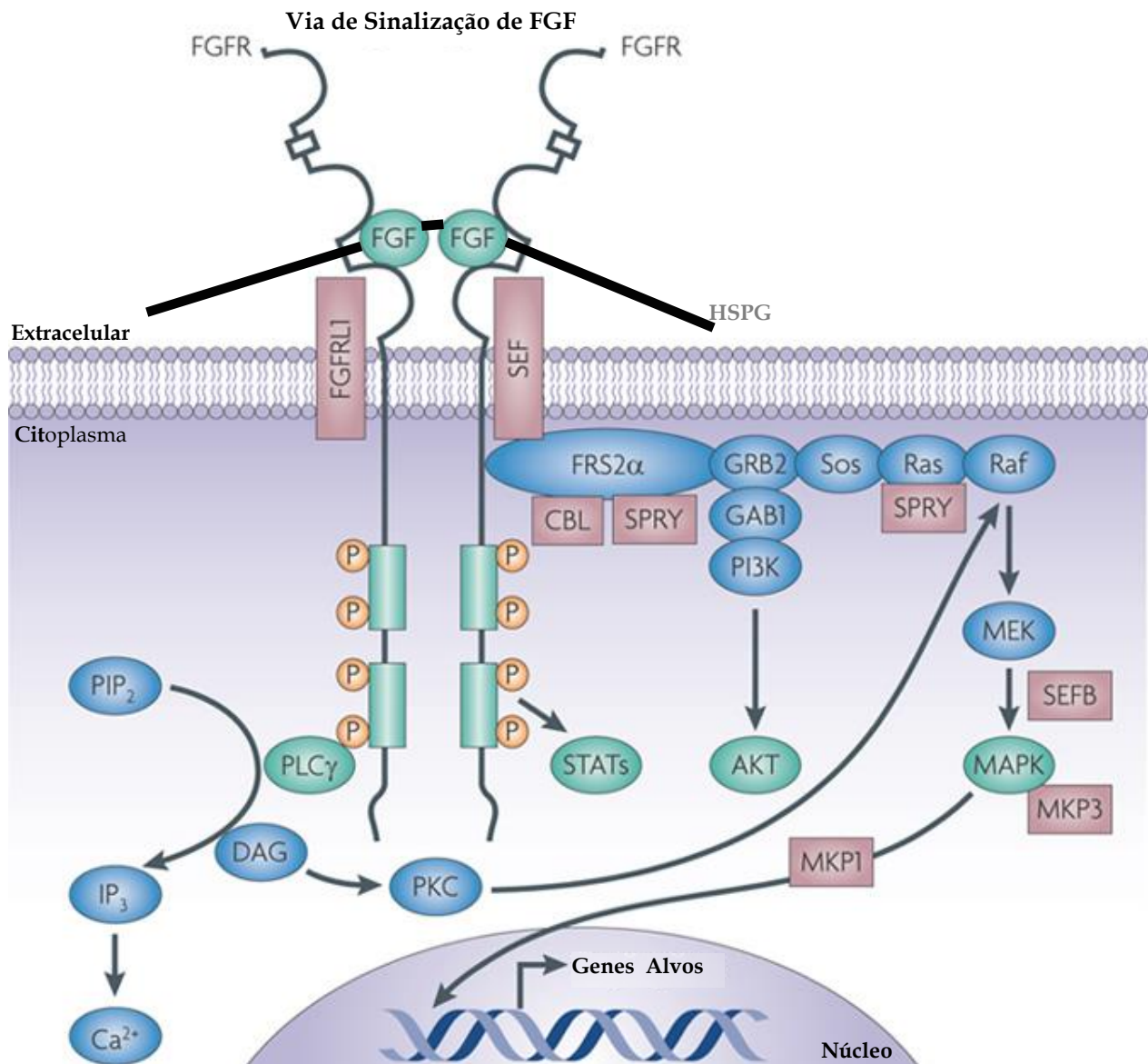


Figura 5 – Via de sinalização de FGF.

A via de transdução de sinais de FGF é composta por dois receptores (FGFR), duas moléculas (FGF) e um proteoglicano heparan sulfatado (HSPG). Após ligação dos ligantes, ocorre a ativação e dimerização dos receptores, que transfosforilam seus domínios quinase, levando à ancoragem de proteínas adaptadoras e ativação de quatro vias de sinalização principais: a via RAS-RAF-MAPK, a de PI3K - AKT, a do transdutor e ativador de sinal de transcrição (STAT) e fosfolipase Cy (PLC γ) (verde). A cascata de sinalização pode ser regulada negativamente em vários níveis pela internalização do receptor ou pela indução de reguladores negativos, incluindo *FGFR-like 1* (FGFRL1), SEF, *Sprouty* (SPRY), CBL, MAPK fosfatase 1 (MKP1) e *mcp3* (roxo). DAG, diacilglicerol; FRS2 α , FGFR substrato 2 α ; GRB2, fator de crescimento ligado ao receptor 2; IP3 inositol trifosfato; P, fosforilação; PIP2, fosfatidilinositol-4,5-bifosfato; PKC, proteína-quinase C; Sos, filho de Sevenless.

Fonte: Modificado de Turner e Grose, 2010.

1.3.4 Fator de Crescimento de Fibroblasto 2

Os primeiros membros da família de FGFs a serem descobertos foram FGF1 e FGF2. Esse último foi descrito por (Armelin, 1973) em 1973 e confirmado por Gospodarowicz em 1975, que o caracterizou como um fator mitogênico. Eles observaram que o extrato hipofisário bovino possuía um fator de crescimento de caráter básico e natureza proteica que induzia o crescimento de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 (Gospodarowicz, Greene e Moran, 1975; Gospodarowicz e Moran, 1975; Gospodarowicz, Weseman e Moran, 1975). Devido ao seu caráter básico, inicialmente, FGF2 foi denominado de FGFb.

Hoje, entretanto, o papel biológico atribuído a FGF2 é extenso e vai além da sua atividade mitogênica. Ele tem papel em muitos outros processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário (cérebro, membros, pulmão, coração, músculo, osso, sangue, pele e olhos), a cicatrização de feridas, a sobrevivência celular, o bloqueio da apoptose em células neuronais. Ele também está envolvido na progressão e metástase de tumores por ser um potente fator angiogênico (Basilico e Moscatelli, 1992; Nugent e Iozzo, 2000). FGF2 é o principal membro da família FGF indutor da angiogênese e, não somente induz a angiogênese, como também aumenta a expressão de outros fatores pro-angiogênicos, como, por exemplo, a angiopoetina-2 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Pepper *et al.*, 1992; Fujii e Kuwano, 2010; Turner e Grose, 2010). FGF2 tem sua expressão aumentada em sítios de inflamação crônica, após a injúria tecidual e em diferentes tipos de cânceres (Presta *et al.*, 2007).

1.4 INTERAÇÃO ENTRE PTX3 E OS FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO

Em 2004, Runasti e colaboradores investigaram a possibilidade de interação de PTX3 com uma série de polipeptídeos de sinalização extracelular a fim de melhor entender os mecanismos responsáveis pela complexa função dessa proteína. Dentre as moléculas analisadas, eles demonstraram pela primeira vez a interação específica e de alta afinidade entre PTX3 e o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2). A fim de avaliar o efeito dessa interação nas atividades biológicas de proliferação celular e indução de angiogênese estimuladas por FGF2, eles realizaram ensaios de proliferação celular *in vitro* e de neovascularização da membrana corioalantóide de embriões de galinha. Eles observaram que a atividade mitogênica de células endoteliais em culturas tratadas com a proteína recombinante PTX3 foi inibida, bem como a neovascularização na presença de PTX3. Também foi demonstrado que o volume tumoral decorrente de enxertos de células tumorigênicas transfectadas com o gene de *PTX3* em camundongos era menor que o de enxertos sem o gene. Esses resultados foram observados devido à ligação de PTX3 a FGF2 e consequente diminuição das atividades biológicas estimuladas por esse fator de

crescimento. De maneira semelhante, outros autores também observaram que a interação PTX3/FGF2 pode diminuir as atividades biológicas de FGF2 (Camozzi *et al.*, 2006; Presta *et al.*, 2007; Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2010).

Rusnati e colaboradores (2004) também sugeriram que a proteína PTX3 possui uma atividade antagonista restrita com os membros da família FGF, visto que não foram demonstradas sua interação com outros membros da família, como FGF1, FGF4 e FGF8. Entretanto, em 2011, Leali e colaboradores, contrariamente aos resultados obtidos por Rusnati em 2004, identificaram pela primeira vez que PTX3 pode interagir também com a isoforma b de FGF8 com alta afinidade e inibir suas atividades biológicas, incluindo o crescimento tumoral depende de hormônios esteroides. O estudo de Ronca e colaboradores (2013) envolvendo células e tumores de próstata corroboram com os resultados de Leali em 2011. Mais estudos tem sido desenvolvidos a fim de caracterizar a interação entre PTX3 e outros membros da família FGF, estudos recentes mostram que, além de FGF2 e FGF8b, PTX3 também pode se ligar eficientemente a FGF17 (um membro da família de FGF8) e em menor extensão a FGF10 e FGF6 (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013).

PTX3 interage com FGF2 ou FGF8b pela sua porção N-terminal inédita (Rusnati *et al.*, 2004; Camozzi *et al.*, 2006; Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2011) e se liga no sítio de interação entre FGF e o seu receptor. Com isso, quando PTX3 esta presente, a ligação física responsável pela promoção das atividades biológicas de FGF fica impedida e, conseqüentemente, as atividades biológicas atribuídas a esse fator (Figura 6). Em 2010, Inforzato e colaboradores mostraram que PTX3 possui dois sítios de ligação para FGF2, ou seja, até duas moléculas de FGF2 podem se ligar a uma de PTX3.

Além da proteína PTX3 inteira, estudos tem demonstrado que peptídeos sintéticos com sequências correspondentes à cauda N-terminal também são capazes de interagir com FGF2 ou FGF8 e interferir na via de sinalização de FGF (Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2010; Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013). O menor peptídeo identificado que pode produzir esse efeito é o pentapeptídeo acetilado Ac-ARPCA-NH₂ (ARPCA), correspondente a sequência N-terminal (100-104) (Leali *et al.*, 2010).

1.5 FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTO E CÂNCER

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization*, WHO), câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Essa doença geralmente se desenvolve através de um processo de várias etapas que pode estender-se ao longo de décadas. Durante o desenvolvimento do câncer, as células normais vão progressivamente se transformando em células altamente

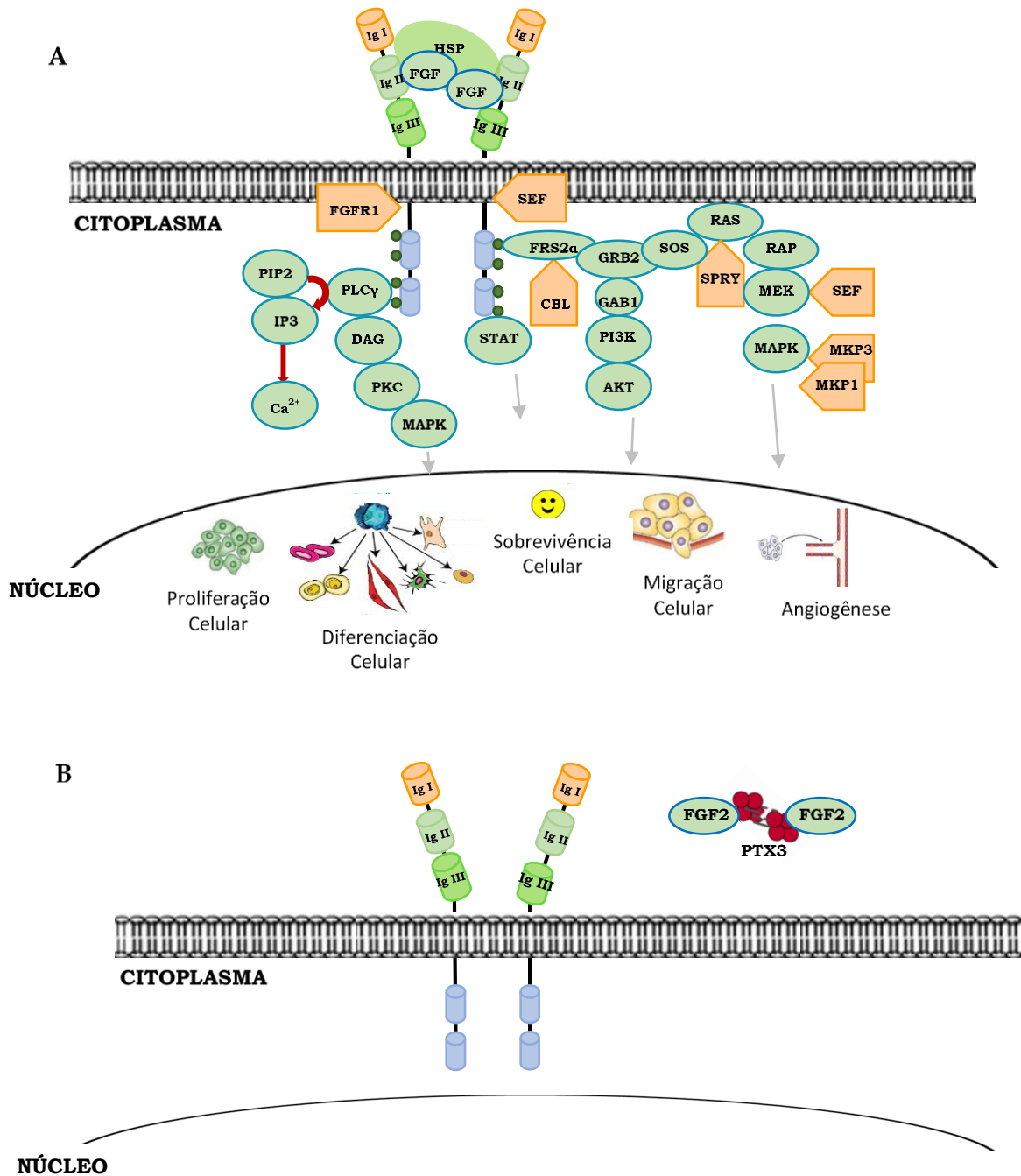


Figura 6 - Efeito de PTX3 sobre a via de sinalização de FGF.

A) O complexo composto por duas moléculas de FGF e uma de HSPG se liga ao FGFR, promovendo a ativação dos receptores e sua transfosforilação que desencadeia a ativação de vias de sinalização que culminam na ligação de genes que induzem a proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência celular e, também a angiogênese. B) Quando PTX3 esta presente no meio, ela se liga a duas moléculas de FGF nos sítios de interação com o receptor, dessa forma, a ligação de FGF ao seu receptor fica impedida, bem como a ativação das vias de sinalização. Assim, os efeitos biológicos induzidos por FGF2, são inibidos na presença de PTX3.

malignas, pelo acúmulo de uma série de mudanças genéticas e aquisição de um conjunto de propriedades específicas que foram resumidas por Hanahan e Weinberg (2011) como as marcas do câncer. Quatro dessas marcas, a auto-suficiência na produção de sinais de crescimento, a insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, evasão de apoptose e potencial replicativo ilimitado, contribuem para a proliferação descontrolada de células cancerosas. Além dessas marcas, as células neoplásicas também adquirem a capacidade de invadir o tecido normal adjacente e promover metástases para órgãos distantes. A angiogênese, a sexta marca do câncer, além de auxiliar o processo de metástase hematogênica, promove o desenvolvimento neoplásico, por levar suprimento de nutrientes e oxigênio que viabilizam o crescimento do tumor (Hanahan e Weinberg, 2011).

Estudos tem sugerido que a desregulação da sinalização dos RTK esta ligada ao desenvolvimento de várias doenças humanas, incluindo os cânceres (Lemmon e Schlessinger, 2010; Witsch, Sela e Yarden, 2010; Wesche, Haglund e Haugsten, 2011; Daniele *et al.*, 2012). Uma grande quantidade de evidências sugerem que alterações na via de sinalização de FGF, que modificam a função de FGF ou levam a desregulação em algum ponto, podem interferir, tanto na carcinogênese, quanto na progressão do tumor em vários tipos diferentes de cânceres (Turner e Grose, 2010; Ahmad, Iwata e Leung, 2012). As desregulações na via podem ocorrer tanto nos ligantes, quanto nos receptores, tais como por amplificação, mutação ou translocação gênica.

FGF2, particularmente, pode contribuir para a progressão tumoral, tanto por induzir a neovascularização, quanto por atuar diretamente sobre a proliferação celular (Yamayoshi *et al.*, 2004). Esforços tem sido feitos a fim de inibir os efeitos de FGF2 sobre a progressão neoplásica, tais como, a inibição da produção/liberação, inibição da expressão dos receptores em células endoteliais, sequestro de FGF2 do ambiente extracelular, interrupção da via de transdução de sinais e uso de antagonistas de FGF2 (Presta *et al.*, 2007). Assim, a inibição da atividade mitogênica e angiogênica de FGF2 pode contribuir para diminuição da progressão do tumor.

1.6 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Nas últimas décadas, os cânceres se converteram em um evidente problema de saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), essa doença figura entre as principais causas de morte no mundo, e, em 2012, foi responsável por 8,2 milhões de mortes. Estimativas da mesma organização, apontam que no ano de 2030, deva ocorrer uma incidência de aproximadamente 27 milhões de casos e 13,1 milhões de mortes, sendo que o maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que também pode ser

estendida para o ano de 2015, aponta para uma ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer (Ministério Da Saúde, 2014).

A aquisição de algumas capacidades biológicas pelas células, tais como resistência à morte celular programada, atividade invasiva e metastática, evasão de sinais supressores de crescimento e da destruição pelo sistema imune, capacidade replicativa ilimitada, capacidade de induzir angiogênese e desregulação energética pode levar ao aparecimento e desenvolvimento das neoplasias. O conhecimento das características marcantes das células tumorais ajudam a entender melhor o processo neoplásico e contribuem para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento e contenção do desenvolvimento das neoplasias (Hanahan e Weinberg, 2011).

FGF2 é o principal membro da família dos FGFs capaz de induzir o processo angiogênico, além de também ser um potente agente mitogênico. Antagonistas de FGF2 foram reportados como capazes de inibir a vascularização e a proliferação celular promovidas por este fator, inclusive em células tumorais (Wang e Goldfarb, 1997; Rofstad e Halsør, 2000). Essas observações demonstram o potencial terapêutico de abordagens anti-FGF2 e apontam para a necessidade de estudos visando identificar e caracterizar moléculas antagonistas de FGF.

PTX3 é um antagonista natural de FGF2 (Rusnati *et al.*, 2004) e já foi detectada em microambientes tumorais de alguns tipos de sarcoma (Lee *et al.*, 1990; Klouche *et al.*, 2002; Willeke *et al.*, 2006), de carcinoma de próstata (Ravenna *et al.*, 2009) e de carcinoma mamário (Tafari *et al.*, 2010). Apesar de estar presente nesses ambientes tumorais, o papel desempenhado por essa proteína na formação e crescimento das neoplasias ainda não foi elucidado.

Diante da relevância da angiogênese e da proliferação celular para o desenvolvimento tumoral e do impacto negativo que PTX3 parece exercer sobre elas, em consequência da sua interação com FGF2, hipotetiza-se que essa proteína tenha um papel negativo no desenvolvimento tumoral. Assim, é importante caracterizar o papel desempenhado por PTX3 no processo tumoral e são relevantes mais estudos que busquem investigar o impacto da interação PTX3/FGF2 sobre as características morfo-fisiológicas de células tumorais.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito biológico da proteína Ptx3 em linhagens tumorais murinas de fibrosarcoma e melanoma.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar alterações promovidas por Ptx3 na morfologia celular de linhagens tumorais murinas de melanoma;

2.2.2 Verificar as alterações no citoesqueleto de actina de linhagens tumorais murinas provocadas por Ptx3;

2.2.3 Analisar o efeito de Ptx3 sobre a proliferação das células tumorais *in vitro*;

2.2.4 Caracterizar o padrão de expressão basal dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens tumorais murinas MC-TGS17-51 e Sal/N, provenientes de fibrosarcoma, e K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1, derivadas de melanoma;

2.2.5 Analisar alterações na expressão dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* induzidas pela proteína Ptx3 recombinante murina;

2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

As linhagens tumorais foram cultivadas e analisadas quanto ao perfil de expressão gênica basal de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4*. Paralelamente, as culturas de células foram tratadas com rmPtx3 e as alterações na expressão dos mesmos genes foram avaliadas, bem como as mudanças na morfologia celular, no padrão da proteína do citoesqueleto actina e a taxa de proliferação celular (figura 7).

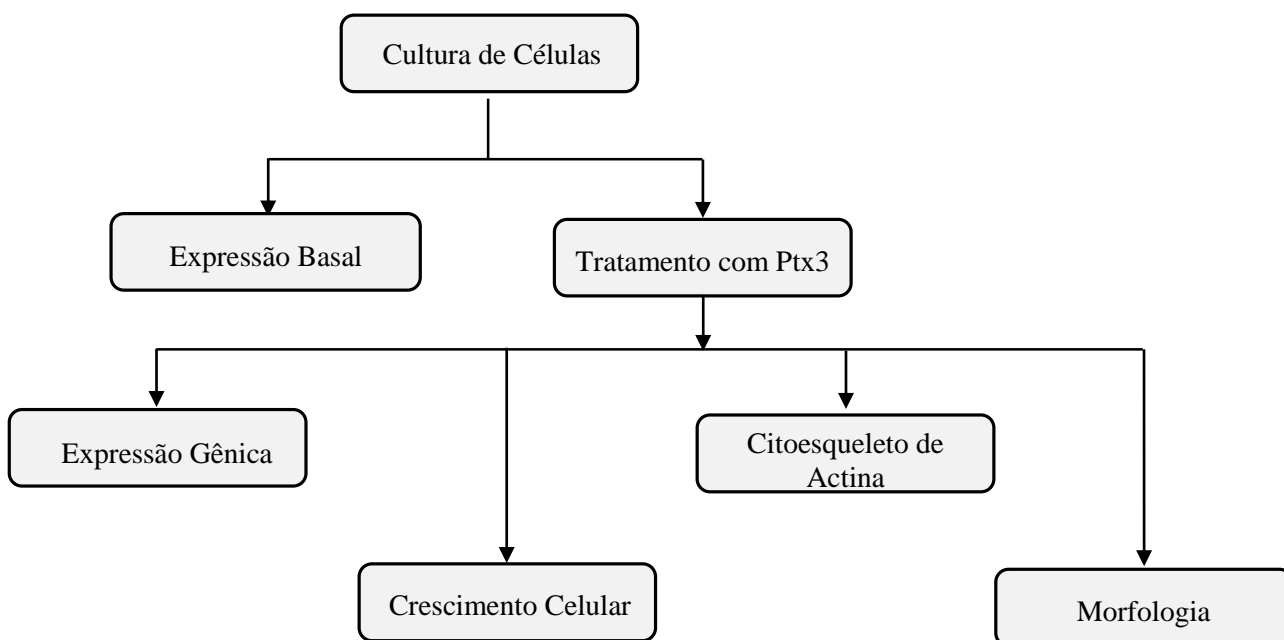


Figura 7 - Desenho Experimental.

As células foram cultivadas e o perfil de expressão gênica basal de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* foi avaliado por RT-PCR. Paralelamente, as culturas foram tratadas com rmPtx3 e as alterações promovidas no perfil de expressão desses genes, bem como o crescimento celular, a morfologia e padrão do citoesqueleto de actina foram analisados por RT-PCR, microscopia óptica de contraste de fase e imunofluorescência, respectivamente.

3.2 CULTURA DE CÉLULAS

As linhagens tumorais murinas utilizadas neste trabalho foram MC-TGS17-51 e Sal/N, derivadas de sarcoma, e K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1, de melanoma (Figura 8). As linhagens são provenientes do banco de células do recém-criado Laboratório de Genética Experimental (LGEx). As linhagens MC-TGS17-51 e Sal/N foram adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC). Já as linhagens K1735 e K1735 M2 foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jan Vilcek da *New York University* e B16F10 e B16F1 pelo professor Dr. Luiz Rodolpho Raja Gabaglia Travassos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

As linhagens celulares foram crescidas e repicadas de acordo com os protocolos da ATCC. Brevemente, as linhagens MC-TGS17-51, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1 foram crescidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco) e a linhagem Sal/N crescida em meio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) (Gibco). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma) e 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina (Sigma) e crescidas em estufa a 37 °C e com condições atmosféricas de 5% de dióxido de carbono (CO₂).

A fim de tentar minimizar alterações genéticas durante os experimentos, as células foram expandidas e foi feito um estoque de alíquotas criopreservadas para possibilitar que todos os experimentos fossem realizados com as células na mesma passagem. Para tal, após duas ou três passagens para expansão do número de células, culturas com confluência entre 70 e 90% foram congeladas em meio de congelamento contendo o meio de crescimento acrescido de 40% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade das células criopreservadas variou entre $1,0 \times 10^6$ e $2,0 \times 10^6$ por criotubo, que foram armazenados em nitrogênio líquido.

3.3 PROTEÍNA Ptx3 RECOMBINANTE MURINA

3.3.1 Fonte de Ptx3

A proteína Ptx3 recombinante murina (rmPtx3) foi gentilmente cedida pela Dra. Cecilia Garlanda do Instituto Clínico Humanitas (Milão, Itália). A proteína foi produzida conforme descrito por Garlanda et al., 2002. Brevemente, a Ptx3 foi expressa em células CHO (*chinese hamster ovary*) e purificada em condições livres de endotoxinas por imunoafinidade. A pureza da proteína foi checada por SDS-PAGE e a contaminação por LPS foi avaliada pelo ensaio LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) (<124 pg LPS/mg de proteína) e testada pela ausência de estimulação de IL6 em monócitos.

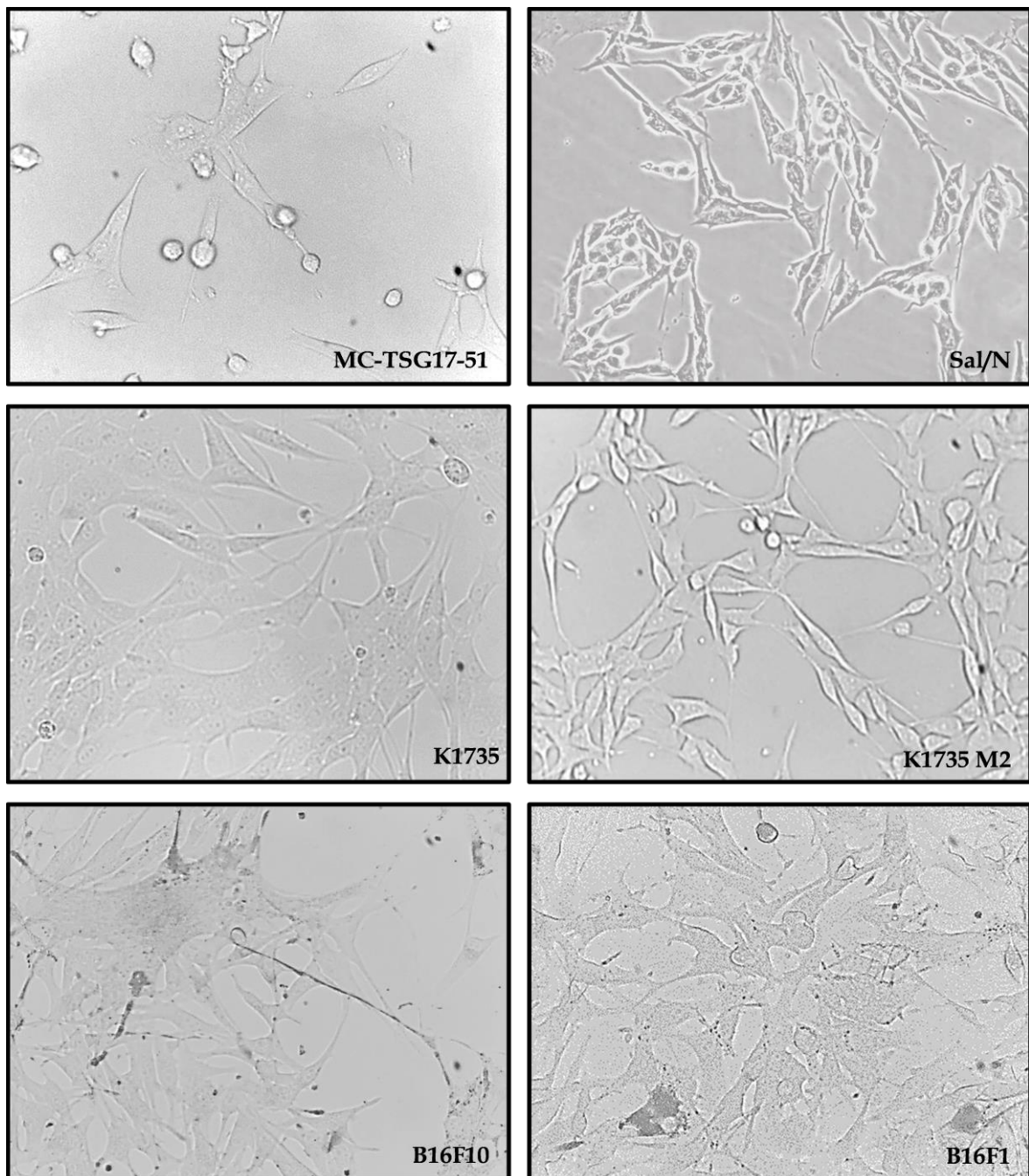


Figura 8 - Linhagens celulares MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1.
Imagem das linhagens MC-TGS17-51 e Sal/N, derivadas de sarcoma, e K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1, de melanoma obtidas por microscopia óptica de contraste de fase em campo claro. Aumento de 100 x.

Quando indicado, as culturas com a confluência desejada foram tratadas com rmPtx3 a uma concentração de 10 µg/ml (Marques, 2008). O tempo de tratamento dependeu do ensaio realizado.

3.4 CURVA DE CRESCIMENTO

As linhagens MC-TGS17-51 e Sal/N (fibrosarcoma) e K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1 (melanoma) foram descongeladas no meio de crescimento apropriado suplementado com SFB 10%, 2mM de L-glutamina e 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina e incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de aproximadamente 70%. As células foram desprendidas por tripsinização e semeadas em placas de 24 poços (área de crescimento de 1,9 cm²) nas quantidades de 1 x 10⁴, 5 x 10⁴, 1 x 10⁵ ou 5 x 10⁵ células viáveis por poço. A viabilidade das células foi avaliada pela contagem com Azul de Tripán, um corante que marca células mortas. Para isso, foi feita uma diluição na proporção de 1:4 de corante e solução de células, respectivamente. Após a espera de aproximadamente 5 minutos, foram feitas contagens em câmara de Neubauer, onde as células mortas eram diferenciadas das vivas por apresentarem uma coloração azul.

Após incubação em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ para aderência das células, o meio do poço foi aspirado e substituído por novo meio contendo SFB 0,5% e as culturas novamente incubadas em estufa por 20 h. A privação de SFB ocorreu com o objetivo de sincronizar o ciclo celular e avaliar o comportamento das células na ausência do mesmo. Após o tempo de privação, o meio foi novamente aspirado e substituído por novo meio suplementado com SFB 10% ou SFB 0,5%. A partir desse momento, foram iniciadas análises da confluência da monocamada celular nos poços através de uma relação visual subjetiva da área ocupada pela monocamada e o espaço livre no poço. As análises foram realizadas por microscopia óptica de contraste de fase no tempo de 0, 24 e 48 h. Os dados gerados foram plotados em um gráfico de linhas com ajuda do editor de planilhas Excel do pacote Office 2013.

3.5 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

3.5.1 Morfologia por Microscopia Óptica

Análises morfológicas das linhagens tumorais murinas realizadas por microscopia óptica de contraste de fase em campo claro em uma confluência de aproximadamente 60-90%. As linhagens foram descongeladas e crescidas em estufa a 37 °C e atmosfera saturada com 5% de CO₂ no meio de crescimento apropriado suplementado com SFB 10%, 2 mM de L-glutamina e 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina até uma confluência de aproximadamente

70%. Em seguida, elas foram desprendidas por tripsinização e 1×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços em meio SFB 10% e incubadas em estufa até aderirem ao fundo da placa. Logo depois, o meio foi aspirado e substituído por novo meio totalmente privado de SFB (0%) e as culturas novamente incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera saturada com 5% de CO₂ por 24 h. Decorrido o tempo de privação de SFB, as culturas foram tratadas ou não com rmPtx3 a uma concentração de 10 µg/ml em meio suplementado com SFB 2% ou totalmente privado de SFB. As culturas foram incubadas em estufa a 37 °C e atmosfera saturada com 5% de CO₂ por 24 h. Após o tempo de tratamento com rmPtx3, foram obtidas imagens por microscopia óptica de contraste de fase. Foram realizadas comparações entre o grupo controle e o grupo tratado. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.5.2 Análise do Citoesqueleto de Actina

Análises de alterações do padrão de organização do citoesqueleto de actina foram realizadas por ensaios de imunofluorescência (Melo, 2010). As células foram incubadas em estufa com atmosfera de CO₂ de 5% e temperatura de 37 °C no meio de crescimento adequado suplementado com SFB 10%, 2 mM de L-glutamina e 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina até atingirem uma confluência entre 70 e 80%, aproximadamente. Em seguida, elas foram semeadas sobre lamínulas numa quantidade de 2×10^4 células por poço em placas de 24 poços (área de crescimento de 1,9 cm²). Após a adesão das células, o meio foi aspirado e substituído por novo meio livre de SFB. As células foram privadas de soro por 24 h durante incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Decorrido o tempo de privação, o meio foi substituído por novo meio SFB 0% contendo rmPtx3 na concentração de 10 µg/ml (tratado) ou somente meio (controle). As placas foram incubadas em estufa com atmosfera de CO₂ de 5% e 37 °C por 3 h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células fixadas pela adição de uma solução de paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato salino (PBS) durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Para marcação da actina, as lamínulas foram removidas, lavadas com PBS e incubadas sobre 20 µl de faloidina-rodamina (Sigma) diluída em uma solução bloqueadora de PGN-saponina (0,25% de gelatina, Sigma, 0,1% azida sódica, Sigma, e 0,1% saponina, Amersham, em PBS 1X) em câmara úmida e à temperatura ambiente. Para a marcação nuclear, foi acrescido a faloidina-rodamina 1:1000 do corante nuclear DAPI cloridrato de 4',6'-diamidino-2-fenilindol, Molecular Probes). Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X, montadas sobre em lâminas com glicerol-PPD (p-fenilenodiamina, Sigma) e analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus Bx51, Nikon). As imagens foram capturadas utilizando o software Imaris 7.0 (Bitplane) utilizando filtros para rodamina-TRITC (excitação/emissão: 557/576 nm) e DAPI (350/470 nm) no departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP. O ensaio foi realizado em duplicata.

3.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Alterações na proliferação celular após o tratamento com rmPtx3 foram analisadas pelo ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Mosmann, 1983). Para realização desse ensaio, as linhagens foram cultivadas no meio correspondente contendo SFB 10% até atingirem cerca de 70-90% de confluência e, em seguida, foram distribuídas 1×10^5 células em placa de 24 poços em meio SFB 10%. As culturas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura de 37 °C até aderirem ao fundo do poço. Após aderirem, o meio foi aspirado e substituído por novo meio privado totalmente de SFB e elas foram novamente incubadas em estufa por 24 h. Decorrido o tempo de privação de soro, o meio foi aspirado e substituído por novo meio SFB 0% contendo rmPtx3 na concentração de 10 µg/ml (tratado) ou somente meio (controle). As placas foram incubadas e os experimentos realizados nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h.

Para o ensaio com o MTT, o meio foi aspirado e substituído por 250 µl de meio SFB 0% contendo MTT numa concentração de 0,5 mg/ml em PBS 1X. As placas foram incubadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e a 37 °C por 3 h. Após a incubação o MTT foi aspirado e foram acrescentados 600 µl de solução solubilizante [duodecil-sulfato de sódio (SDS) 10%-HCl 0,01 M] e as placas incubadas por aproximadamente 16 h a temperatura ambiente e sob agitação. Decorrido o tempo de solubilização, o conteúdo de cada poço foi homogeneizado e transferido em triplicata para placa de 96 poços de fundo chato para leitura. A solução solubilizante de SDS-HCl foi utilizada como branco. A leitura foi realizada sob o comprimento de onda de 540 nm no leitor de placas *Varioskan Flash* (Thermo Scientific). O experimento foi realizado em triplicata.

3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.7.1 Cultura de Células e Tratamento com Ptx3

A caracterização do padrão de expressão basal ou após o tratamento com rmPtx3 dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens tumorais murinas foi realizada por *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) (Marques, 2008; Real, 2010). Para a expressão basal, as linhagens foram crescidas em placas próprias para cultura celular com área de crescimento de 55 cm² em estufa com atmosfera de CO₂ de 5% e a 37 °C no meio correspondente suplementado com SFB 10%, 2 mM de L-glutamina e 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina até atingirem uma confluência entre 70 e 90%. Em seguida, o ácido ribonucleico (RNA) foi extraído.

Para a análise da expressão gênica após o tratamento com rmPtx3, as células foram semeadas em placas próprias para cultura celular com área de crescimento de 9,2 cm² em meio suplementado com SFB 10%, 10 µg/ml de penicilina/estreptomicina e 2 mM de L-glutamina e incubadas em estufa com atmosfera de CO₂ de 5% e a 37 °C até a monocamada celular atingir uma confluência de aproximadamente 65%. Atingida a confluência desejada, o meio foi aspirado e substituído por novo meio totalmente privado de SFB e as placas incubadas novamente em estufa por 24 h. Após o tempo de privação, o meio foi aspirado e substituído por novo meio SFB 0% contendo rmPtx3 (10 µg/ml) ou não, ou ainda, novo meio contendo SFB 10%. As placas foram incubadas em estufa por 3h, seguida pela extração do RNA total. O experimento foi realizado em duplicata.

3.7.2 Extração de RNA

O RNA total das culturas de células foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as recomendações e especificações do fabricante. Nas placas de 55 cm² foram utilizados 3 ml TRIzol e nas de 9,2 cm², 2 ml do reagente. A quantificação do RNA total extraído foi realizada através de espectrofotometria no aparelho de NanoDrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) na absorvância de 260 nm. A estimativa de pureza do RNA, foi feita no mesmo aparelho pela análise da razão entre as absorvâncias de 260 por 280 nm, que determina a contaminação da amostra por proteína, e 260 e 230 nm, que mede a contaminação por sal. Para serem considerados de boa qualidade, os RNAs deveriam apresentar a razão 260/280 próxima de 2 e a razão 260/230 variando entre 1,8 e 2,0, sendo aceitável um valor até 1,6. A integridade do RNA total foi verificada através de 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 apresentaram as bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S e 18S, e cuja intensidade da primeira banda era igual ou maior à banda equivalente ao RNA 18s (banda inferior).

3.7.3 Transcrição Reversa

O RNA total das linhagens celulares foi submetido a uma reação de transcrição reversa para obtenção do ácido desoxirribonucleico (DNA) complementar (cDNA). Alíquotas de 2 microgramas de RNA total, 1 µl de iniciadores oligodT (500 µg/ml) e água DEPC 1% (dietil-pirocarbonato) q.s.p. 5 µl foram misturados em microtubo de 0,2 ml e incubados a 70 °C em aparelho termociclador (Eppendorf). Em seguida, foram adicionados à reação 4,3 µl de água DEPC 1%; 4,0 µl de tampão Impron 5X; 3,2 µl de MgCl₂ (25 mM); 2,0 µl mix de dNTP (desoxirribonucleotídeos, 10 mM); 0,5 µl do inibidor de RNase RNasin (40 U/µl); e 1,0 µl da

enzima ImProm-II™ *reverse transcriptase* (Promega). A reação foi incubada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos também no termociclador.

A qualidade do cDNA sintetizado foi averiguada por amplificação do gene constitutivo da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Gapdh) em reações de PCR. Para a realização das reações, foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 2,5 µl de PCR Buffer 10X (concentração final 1X); 1,5 µl de MgCl₂ (25 mM); 0,25 µl de dNTP mix (25 mM); 0,125 µl da enzima Taq polimerase (Invitrogen 5U/µl); 1 µl de cada iniciador (10 pmol/µl) (*Forward*: TTGTGGAAGGGCTCATGACCA, *Reverse*: CGTTATTCATTGTCATACGGA); 1 µl do cDNA molde; água Milli-Q autoclavada q.s.p. 25 µl. Os parâmetros estabelecidos para a reação 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. O produto da reação foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

3.7.4 Desenho dos Iniciadores Específicos

Os iniciadores específicos para cada gene alvo do estudo foram desenhados com o auxílio da ferramenta *Primer Blast* (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) e do programa *Oligoanalyzer* (*Integrated DNA Technologies*, IDT). Primeiramente, a fim de evitar a possibilidade de amplificação simultânea de DNA genômico, pelo menos um dos iniciadores foi desenhado em região de junção de éxons. Os parâmetros considerados na escolha dos iniciadores foram: tamanho dos fragmentos amplificados que deveriam ter entre 115 e 450 pb; o tamanho do iniciador entre 17 e 25 pb; a porcentagem de CG entre 40-60%; e temperatura de anelamento entre 57 e 63 °C. Dos iniciadores gerados pela ferramenta, foram selecionados os que apresentavam menor capacidade de anelarem entre si e de formar estruturas secundárias estáveis e, também, o que abrangiam o maior número de isoformas, quando elas existiam. A sequência dos iniciadores desenhados e o tamanho do produto amplificado são mostrados na tabela 1.

3.7.5 Condições da PCR Utilizando Iniciadores Específicos

Para avaliar a expressão dos genes alvos, foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores específicos (tabela 1). Para a realização das reações, foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 2,5 µl de PCR Buffer 10X (concentração final 1X); concentração de MgCl₂ de 1 mM ou 1,5 mM (25 mM); 0,25 µl de dNTP mix (25 mM); 0,125 µl da enzima Taq polimerase (Invitrogen 5U/µl); 1 µl de cada iniciador *Forward* e *Reverse* (10 pmol/µl); 1 µl do cDNA molde; água Milli-Q autoclavada q.s.p. 25 µl. O produto da reação foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

Alvo	Sequência do Primer	Tamanho do Produto (pb)	Éxon
Ptx3	Fw: CCTGCTTTGTGCTCTCTGGT	176	1
	Rv: TCTCCAGCATGATGAACAGC		2
Fgf2	Fw: TCAAACACTACAACCTCCAAGCAGAA	115	2
	Rv: GTAACACACTTAGAAGCCAGCA		Entre 2 e 3
Fgfr1	Fw: GGAGGCTACAAGGTTTCGCTAT	313	Entre 5 e 6
	Rv: CATACGGCAAGTTGTCTGGC		7
Fgfr2	Fw: TCCATGAACTCCAACACCCC	374	11
	Rv: TAGAGAGGTCCATCCTGCGT		Entre 13 e 14
Fgfr3	Fw: CACAAGGTCTCTCGCTTCC	312	10
	Rv: AGTCGCATCATCTTTTCAGCAT		Entre 12 e 13
Fgfr4	Fw: GGGGTGTATCATCGGCAAGT	372	9
	Rv: GTCGGAGGCATTGTCTTTTCAG		Entre 11 e 12
Gapdh	Fw: TTGTGGAAGGGCTCATGACCA	447	Entre 4 e 5
	Rv: CGTATTCATTGTCATACCAGG		Entre 6 e 7

Tabela 1 - Iniciadores desenhados e utilizados nas reações de RT-PCR para a análise da expressão gênica

A tabela mostra a sequência dos iniciadores específicos para o gene alvo, onde Fw representa o iniciador *forward* e Rv o *reverse*, e o tamanho do produto gerado em pares de bases e em qual éxons eles se anelam.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise estatística da proliferação celular pelo método MTT foi realizada pelo teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) entre as amostras e por teste t de Student entre o grupo tratado e controle de cada concentração de SFB utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.0. Foram considerados resultados estatisticamente significantes aqueles com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

4.1 CURVAS DE CRESCIMENTO

Curvas de crescimento das linhagens murinas MC-TGS17-51 e Sal/N, de fibrosarcoma, e K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1, de melanoma, foram construídas por análise da confluência por microscopia óptica, como descrito no item 3.4. Brevemente, diferentes quantidades de células viáveis (1×10^4 , 5×10^4 , 1×10^5 ou 5×10^5) foram semeadas em placas de 24 poços. Após as células aderirem ao fundo do poço, as culturas foram privadas de SFB (0,5%) por 20 h. Decorrido o tempo de privação, o SFB foi restabelecido o meio (10%) ou as células foram mantidas em privação (0,5%) e a confluência avaliada por 48 h. As figuras 9 e 10 mostram a evolução da confluência da monocamada celular durante o ensaio.

Na linhagem tumoral murina de fibrosarcoma MC-TGS17-51, é possível observar que quando a quantidade plaqueada de células foi de 5×10^5 , tanto na privação, quanto na presença de SFB, houve um decréscimo da confluência em 24 horas. Isso sugere que a linhagem pode ter alcançado uma alta confluência, sofrido inibição do crescimento por contato e entrado em senescência. Portanto, para os ensaios futuros essa quantidade de células inicial é demasiada. Foi possível perceber um dobramento na confluência da monocamada celular somente na quantidade de 1×10^4 e na presença de soro em 24 horas. Não foi possível estimar o tempo de dobramento nas demais curvas, pois o tempo experimental deveria ter sido estendido (figura 9A).

A curva de crescimento da linhagem tumoral murina de fibrosarcoma Sal/N é mostrada na Figura 9B. Esta linhagem demonstrou ser mais sensível a ausência de SFB, visto que há uma diminuição da confluência nos poços sem esse suplemento (linhas tracejadas). Na maior quantidade de células, 5×10^5 , tanto na presença ou privação de SFB, as células atingiram 100% de confluência. Baseando-se nas quantidades de 1×10^4 e 5×10^4 , pode-se estimar o tempo de dobramento dessa linhagem como sendo 24 h.

Para a linhagem de melanoma murino K1735 (figura 9C) não foi observada grande sensibilidade à carência de SFB. Em 24 h, essa linhagem também atingiu 100% da confluência da monocamada celular nas quantidades de 5×10^5 na presença e ausência de SFB. Ela também apresentou um tempo de dobramento estimado em 24 h.

Não foi observado crescimento das células da linhagem de melanoma murino K1735 M2 que foram plaqueadas na quantidade inicial 5×10^5 de 1×10^4 células. A baixa densidade de células parece ter maior influência na taxa de crescimento do que a presença ou privação de SFB (figura 10A). A partir da observação das curvas correspondentes ao plaqueamento de

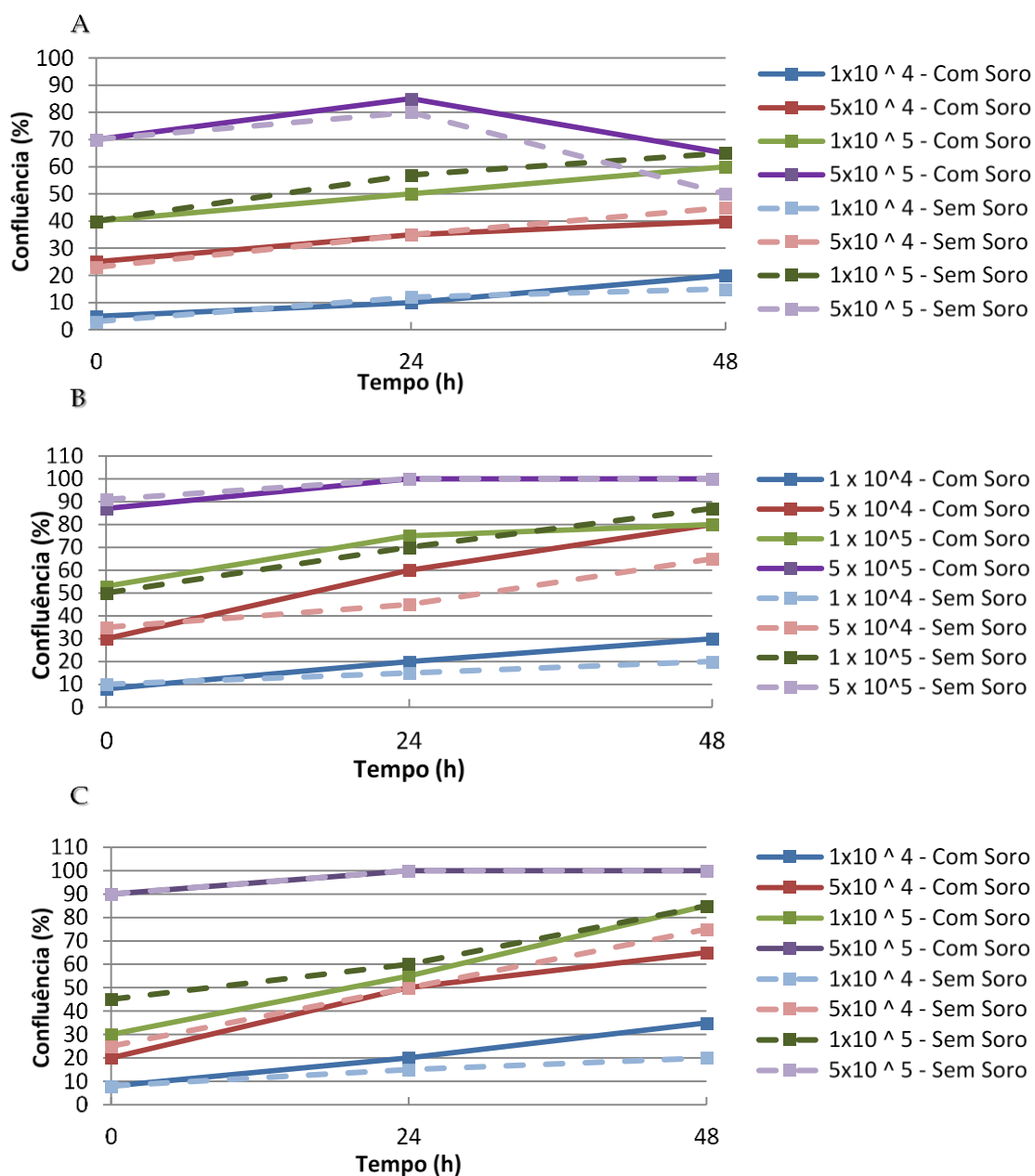


Figura 9 - Curva de crescimento por confluência das linhagens MC-TGS17-51, Sal/N e K1735.

As linhagens foram plaqueadas em placas de 24 poços ($1,9 \text{ cm}^2$) nas quantidades de 1×10^4 (linha azul), 5×10^4 (linha vermelha), 1×10^5 (linha verde) ou 5×10^5 (linha roxa). Após incubação para aderirem ao fundo do poço, as culturas foram privadas de SFB (0,5%) por 20 h. Decorrido o tempo, o meio foi trocado (tempo 0) e o SFB 10% foi restabelecido ao meio (linha contínua) ou a cultura continuou na privação de SFB (linha tracejada). A confluência da monocamada celular foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase a cada 24 h até o tempo de 48 h. A confluência foi estabelecida por uma razão de proporção entre a área ocupada pela monocamada celular e a área livre no poço. Gráficos A) MC-TGS17-51; B) Sal/N e C) K1735.

5×10^4 e 1×10^5 células é possível estimar o tempo de dobramento como sendo aproximadamente 24 h. Nessa linhagem, também foi possível observar 100% de confluência nos poços com 5×10^5 células a partir de 48 h.

Nas curvas de crescimento da linhagem de melanoma B16F10 com quantidades de células igual a 5×10^5 , privadas ou não de SFB, também foi observada uma confluência de 100% da monocamada celular (figura 10B). O plaqueamento de 1×10^4 também demonstrou um baixo crescimento. As células dessa linhagem também mostraram-se pouco sensíveis à privação de SFB e o tempo estimado de dobramento dessa linhagem, com base nas curvas de crescimento das células plaqueadas nas densidades de 5×10^4 e 1×10^5 parece ser de 24 a 30 horas.

Na linhagem de melanoma murino B16F1 (figura 10C), foi observado, assim como nas linhagens B16F10 e K1735 M2, também de melanoma, um crescimento mínimo nos poços com quantidade inicial 1×10^4 de células. Aparentemente, essa linhagem foi pouco sensível à privação do SFB, já que há uma sobreposição das curvas com e sem SFB na quantidade de 5×10^4 e também nas primeiras 24 h há um crescimento maior sem SFB na quantidade de 1×10^5 . O tempo de dobramento estimado dessa linhagem foi de aproximadamente 24 h.

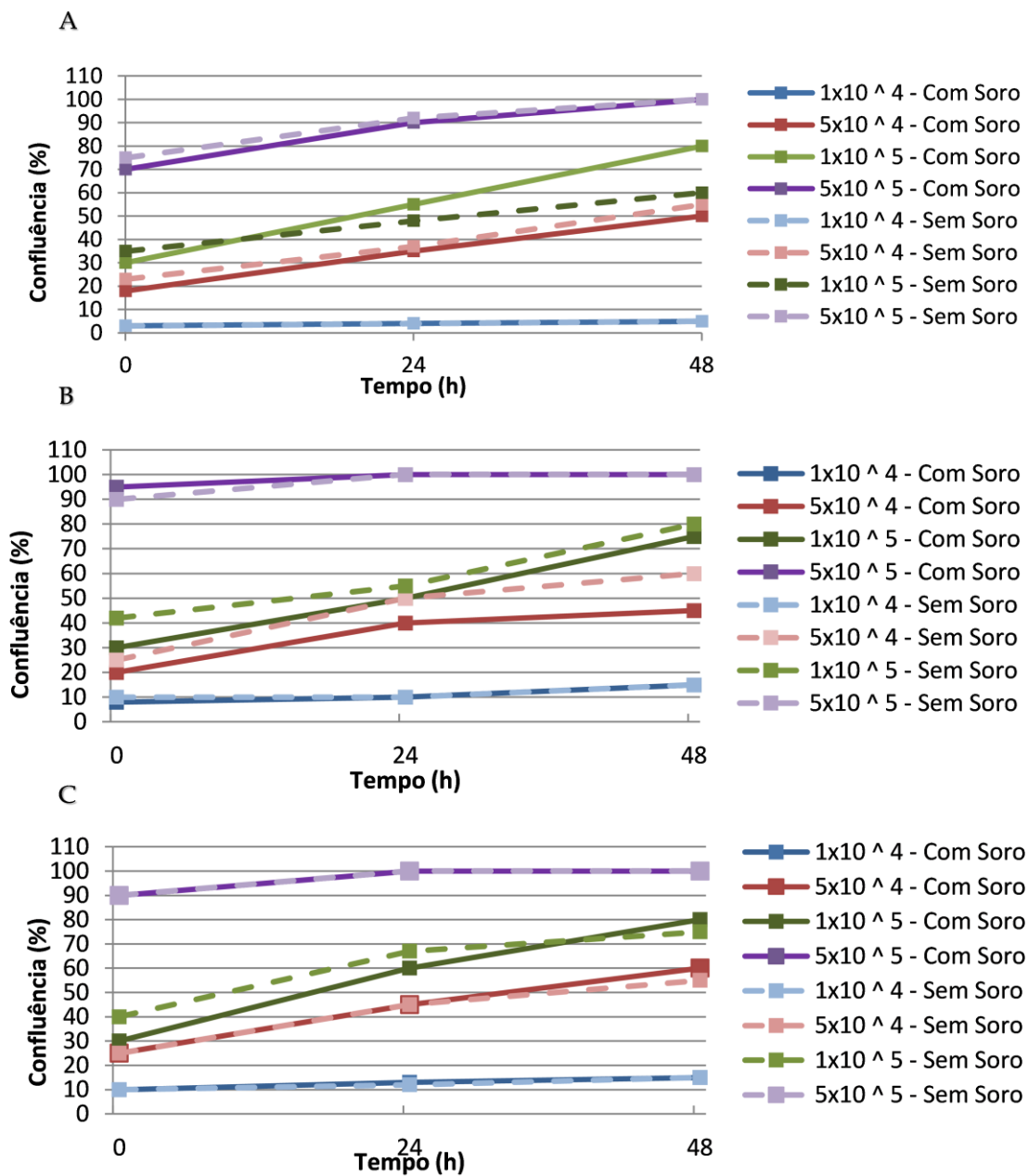


Figura 10- Curva de crescimento por confluência das linhagens K1735 M2, B16F10 e B16F1.

As linhagens foram plaqueadas em placas de 24 poços (1,9 cm²) nas quantidades de 1×10^4 (linha azul), 5×10^4 (linha vermelha), 1×10^5 (linha verde) ou 5×10^5 (linha roxa). Após o período de incubação para aderirem ao fundo do poço, as culturas foram privadas de SFB (0,5%) por 20 h. Decorrido o tempo, o meio foi trocado (tempo 0) e o SFB 10% foi restabelecido ao meio (linha contínua) ou a cultura continuou na privação de SFB (linha tracejada). A confluência da monocamada celular foi avaliada por microscopia óptica de contraste de fase a cada 24 h até o tempo de 48 h. A confluência foi estabelecida por uma razão de proporção entre a área ocupada pela monocamada celular e a área livre no poço. Gráficos: A) K1735 M2; B) B16F10; C) B16F1.

4.2 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

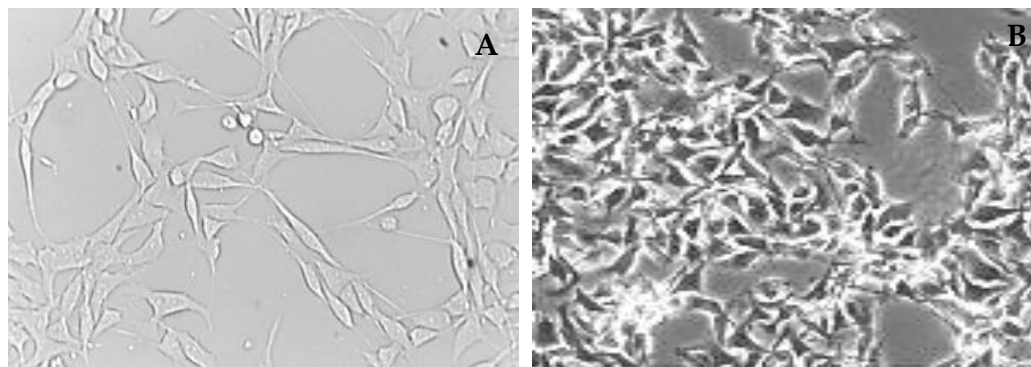
4.2.1 Morfologia por Microscopia Óptica

Alterações morfológicas estimuladas por Ptx3 nas linhagens tumorais murinas de melanoma K1735 M2 e B16F1 foram avaliadas por microscopia óptica de contraste de fase em triplicata, como descrito no item 3.5.1. Brevemente, 1×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços até aderirem ao fundo da placa, seguida pela privação total de SFB por 24 h. Após o tempo de privação, foi feito o tratamento ou não com rmPtx3 a uma concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ em meio suplementado com SFB 2% ou totalmente privado de SFB (0%) e a morfologia analisada por microscopia óptica de contraste de fase.

A linhagem K1735 M2 foi obtida em 1979 por (Kripke, 1979) e colaboradores. Ela é derivada de uma metástase espontânea de pulmão da linhagem parental K1735 injetada subcutaneamente em camundongos singênicos da linhagem C3H/HeN. As células da linhagem são amelanocíticas, ou seja, não produzem melanina e crescem aderidas ao substrato. Elas apresentam morfologia semelhante a um fibroblasto, com células fusiformes e alongadas e núcleo ovoide. Como pode ser observado na figura 11 - painel 1A, nossas culturas apresentavam esse padrão, células não produtoras de melanina que crescem fortemente aderidas e com células fusiformes e alongadas, semelhantes ao descrito e mostrado na literatura (figura 11 - painel 1B). As células tratadas com rmPtx3 por 24 h, tanto na ausência, quanto na presença de SFB, continuaram apresentando o mesmo padrão morfológico (figura 11 – painel 2).

A linhagem de melanoma murino B16F1 foi isolada e selecionada por (Fidler, 1975) e colaboradores em 1975, após a injeção de células tumorais da linhagem B16 de diferentes passagens em camundongos singênicos da linhagem C57BL/6. O critério de seleção foi a capacidade comprovada de formar nódulos tumorais pulmonares. As células dessa linhagem crescem aderidas ao substrato com morfologia que é um misto de células fusiformes e epiteliais (figura 12 – painel 1A). B16F1 é uma linhagem melanocítica, ou seja, produtora do pigmento melanina, que pode ser observado a olho nu pelo escurecimento do meio de crescimento e por microscopia óptica como pontos escuros dentro das células, geralmente próximos ao núcleo, mostrado pelas setas na figura 12. Nossas culturas apresentaram morfologia semelhante à descrita e mostrada na literatura e no instituto de pesquisas japonês *Riken Base* (figura 12 – painel 1B). Após o tratamento com rmPtx3, a morfologia das células, bem como a produção de melanina não sofreram alterações, independentemente da presença ou carência de SFB (figura 12 – painel 2).

1



2

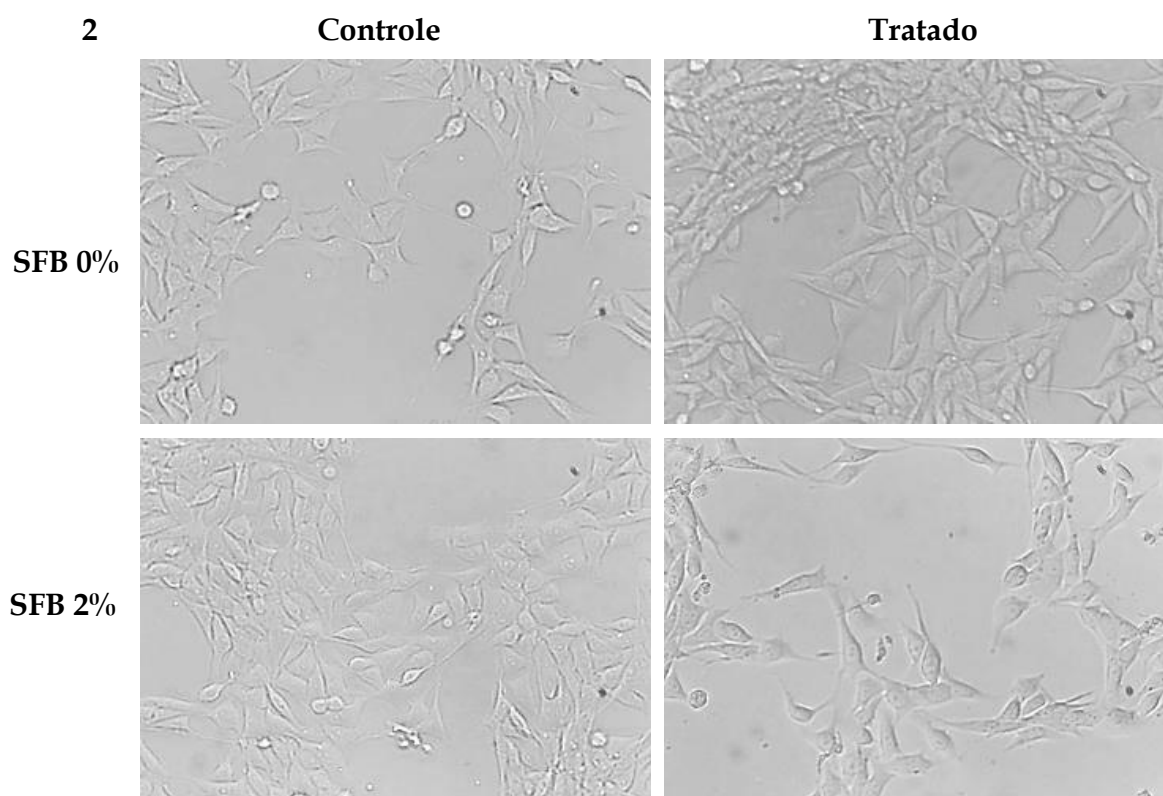
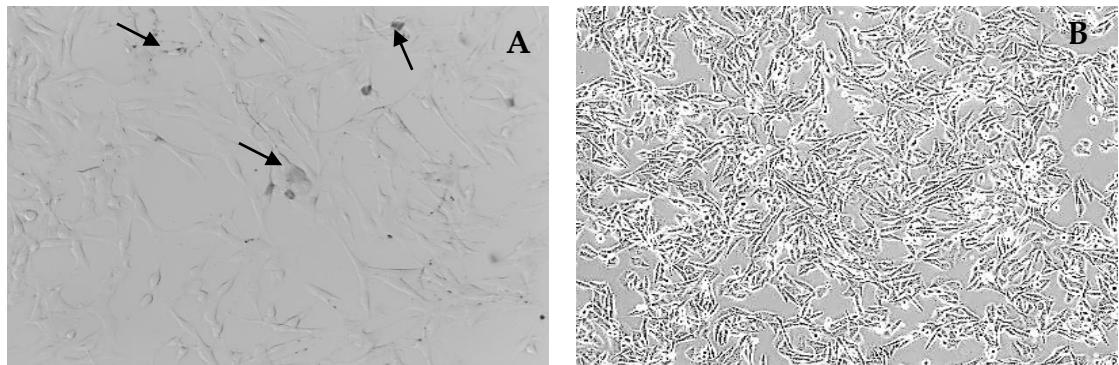


Figura 11 - Morfologia celular da linhagem de melanoma murino K1735 M2.

Em triplicata, 1×10^5 células foram semeadas em placa de 24 poços ($1,9 \text{ cm}^2$) em meio DMEM + SFB 10% até aderirem ao fundo da placa e, então, incubadas em meio DMEM sem SFB por 24 h. Decorrido o tempo de privação, as células foram tratadas com rmPtx3 ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) ou não (controle) na presença de SFB 2% ou na ausência de SFB. Paineis 1- Morfologia de K1735: A) No tempo 0h; B) Descrita na literatura. Paineis 2 - Morfologia da linhagem após 24 h de incubação com Ptx3 na ausência de SFB (0%) e na presença (2%). Aumento 1: 40X; 2: 100X.

Fonte 1-b: (Serafim *et al.*, 2008).

1



2

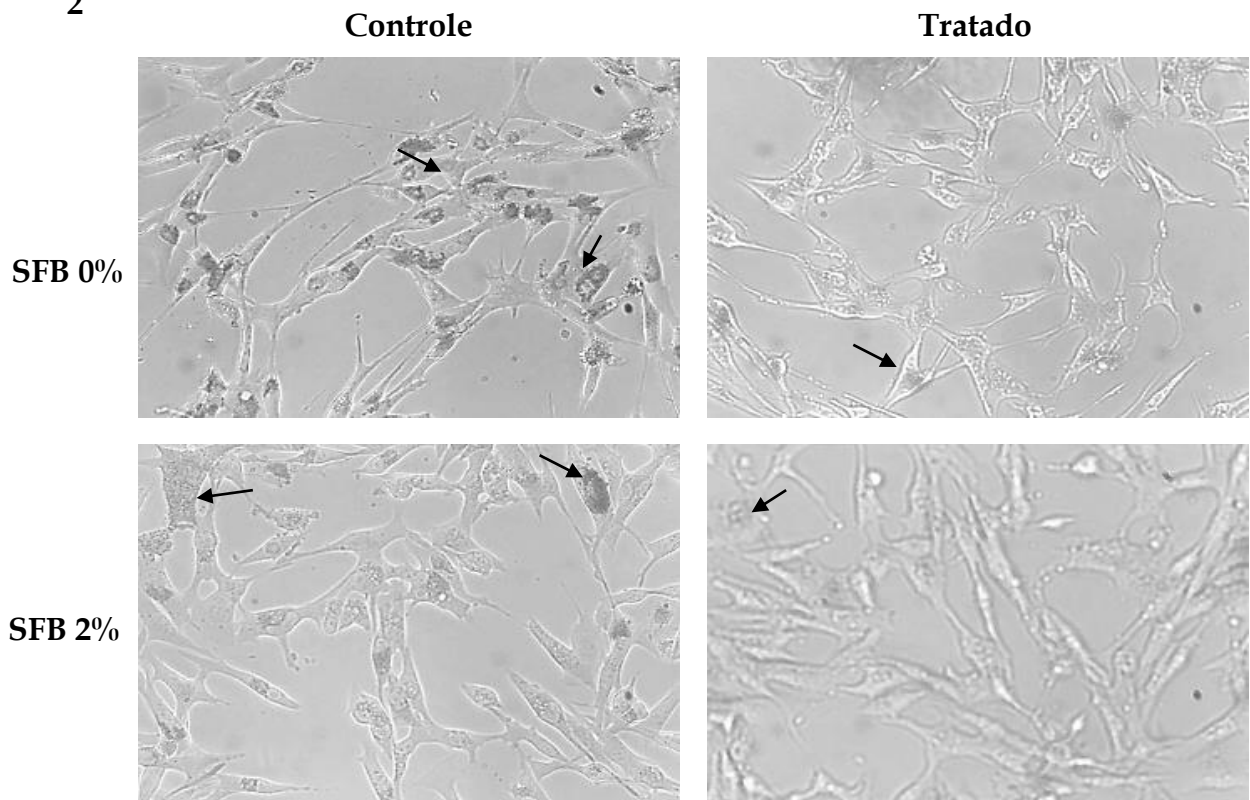


Figura 12 - Morfologia celular da linhagem de melanoma murino B16F1.

Em triplicata, 1×10^5 células foram semeadas em placa de 24 poços ($1,9 \text{ cm}^2$) em meio DMEM + SFB 10% até aderirem ao fundo da placa e, então, incubadas em meio DMEM sem SFB por 24 h. Decorrido o tempo de privação, as células foram tratadas com rmPt3 ($10 \mu\text{g/ml}$) ou não (controle) na presença de SFB 2% ou na ausência de SFB. Painel 1- Morfologia de K1735: A) No tempo 0h; B) Descrita na literatura. Painel 2 - Morfologia da linhagem após 24 h de incubação com Pt3 na ausência de SFB (0%) e na presença (2%). As setas indicam a produção de melanina. Aumento: 100x

Fonte 1b: Riken base, 2014.

4.2.2 Análise do Citoesqueleto de Actina

Possíveis alterações promovidas pela proteína Ptx3 no padrão de distribuição dos filamentos de actina no citoplasma das linhagens tumorais murinas MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1, foram avaliadas por ensaios de imunofluorescência, com marcação para a proteína do citoesqueleto actina, conforme o tópico 3.5.2. Brevemente, 2×10^4 células foram semeadas em lamínulas tratadas para cultura celular e dispostas sobre os poços de placas de 24 poços. As culturas foram incubadas por 24 h em presença de meio com 10% SFB. Após este tempo, o meio foi substituído por outro sem SFB (0%) e as placas incubadas por mais 24 h. Após o tempo de incubação, os poços foram tratados ou não com rmPtx3 (10 $\mu\text{g/ml}$), na ausência de SFB por 3 h e as células fixadas nas lamínulas com PFA 4%. As células fixadas foram incubadas por 1 hora sobre o marcador de actina faloidina-TRICT, juntamente com o marcador nuclear DAPI, e posteriormente montadas sobre lâminas, as quais foram analisadas por microscopia de fluorescência.

Os filamentos de actina, também chamados de microfilamentos, se distribuem por todo o citoplasma. Apesar disso, em geral, eles estão mais concentrados no córtex das células, logo abaixo da membrana plasmática. Na Figura 13, é possível observar um maior acúmulo de actina na região de córtex celular na linhagem K1735 M2 (setas). Esse perfil é observado tanto no controle, quanto no tratado com Ptx3. Em B16F1, entretanto, é notada uma distribuição uniforme sobre o citoplasma celular, não apresentando um acúmulo no córtex celular. Isso pode ser observado tanto no controle, quanto no tratado (Figura 14). Diante dessas observações, nas condições de tempo e concentração de Ptx3 utilizadas nos ensaios, não foi possível verificar alterações no padrão de actina promovidas pelo tratamento com essa proteína.

Embora os resultados apresentados sejam sugestivos de que Ptx3 não promove alterações na estrutura do citoesqueleto, para que nossos dados sejam mais precisos será necessária uma otimização do protocolo, pois várias dificuldades técnicas inviabilizaram a obtenção de dados informativos sobre as demais linhagens analisadas (MC-TGS17-51, Sal/N, K1735 e B16F10), tais como a baixa confluência das culturas e o método de fixação das lamínulas. Além disso, são necessárias análises do efeito do tratamento em tempos diferentes e a adoção de um método para quantificação dos resultados.

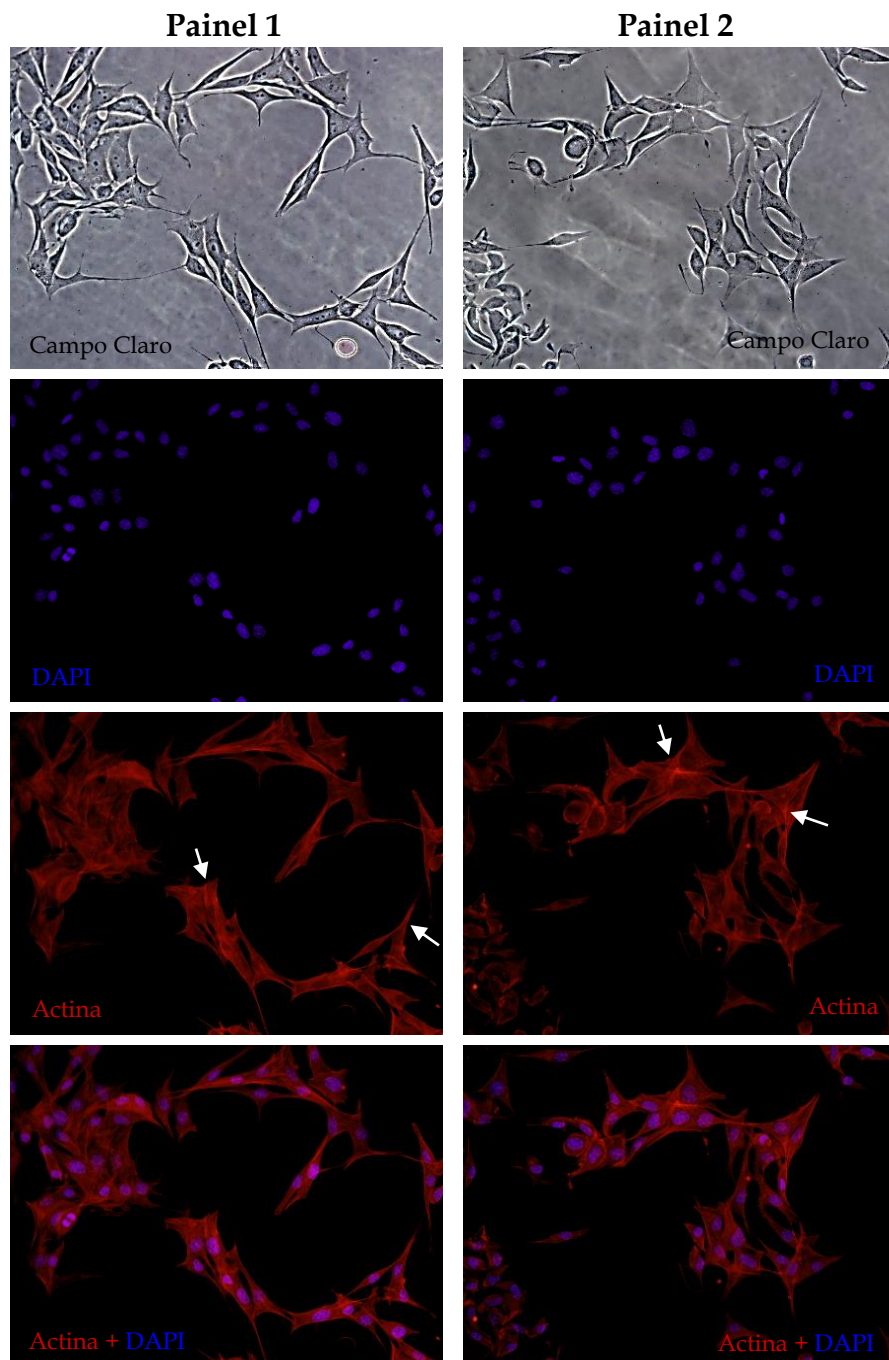


Figura 13 - Fotomicrografia de fluorescência da linhagem K1735 M2.

Em duplicata, 1×10^4 células foram semeadas em poços de 1,9 cm em meio DMEM suplementado com SFB 10% até aderirem ao fundo da placa e depois privadas de SFB por 24 h. Decorrido o tempo de privação, as células foram tratadas com rmPtx3 (10 μ g/ml) ou não (controle) por 3 h em meio sem SFB. Após a incubação, as células foram fixadas em PFA 4%, seguida por incubação com faloidina-TRICT + DAPI por 1h e as imagens obtidas por microscopia de imunofluorescência. Setas: acúmulo de actina no córtex celular. Aumento de 40x.

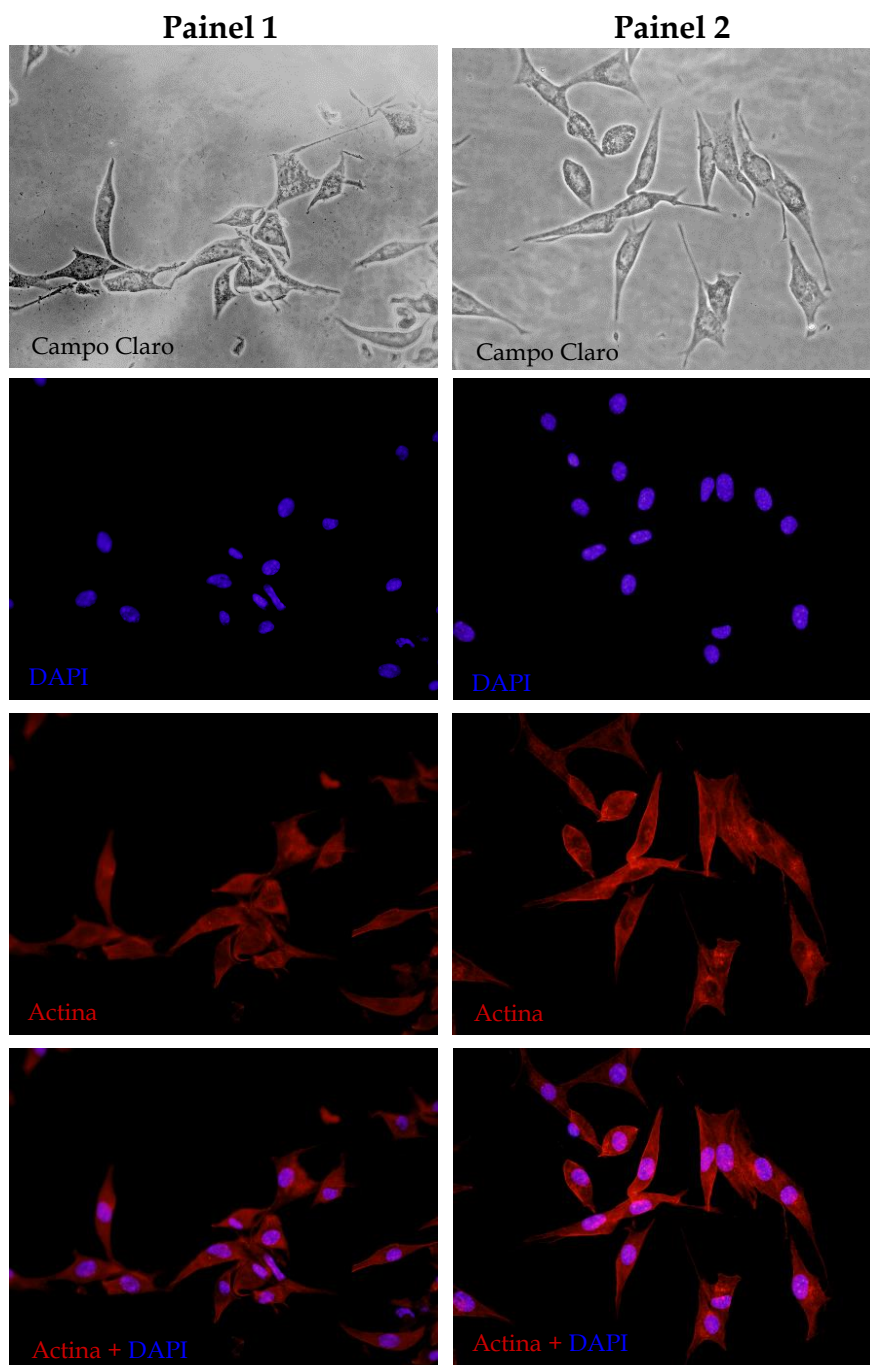


Figura 14 - Fotomicrografia de fluorescência da linhagem B16F1.

Em duplicata, 1×10^4 células foram semeadas em poços de 1,9 cm em meio DMEM suplementado com SFB 10% até aderirem ao fundo da placa e depois privadas de SFB por 24 h (meio DMEM mais SFB 0%). Decorrido o tempo de privação, as células foram tratadas com Ptx3 (10 μ g/ml) ou não (controle) por 3 h em meio sem SFB. Após a incubação, as células foram fixadas em PFA 4%, seguida por incubação com faloidina-TRICT + DAPI por 1h e as imagens obtidas por microscopia de imunofluorescência. Aumento de 40x.

4.3 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Alterações na taxa de proliferação celular das linhagens K1735 e B16F1, foram avaliadas pelo método MTT segundo descrito no tópico 3.6. Brevemente, 1×10^5 células foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio SFB 10% até a aderência ao fundo do poço. Após a aderência, as culturas foram totalmente privadas de SFB por 24h, seguida por um tratamento com rmPtx3 (10 $\mu\text{g/ml}$) na presença ou ausência de SFB. A proliferação celular nos poços foi medida nos tempos 0, 24, 48 e 72 h pelo ensaio colorimétrico com MTT. Esse método é baseado na habilidade de uma desidrogenase mitocondrial em clivar os anéis tetrazolium do corante MTT, resultando na formação de cristais formazan de coloração púrpura. Estes cristais são impermeáveis à membrana plasmática e, desta forma, se acumulam no interior de células viáveis. Utiliza-se uma solução solubilizante para dissolver os cristais formazan formando uma solução corada, cuja absorbância pode ser mensurada por espectrofotômetro. Quando maior o número de células viáveis, maior a coloração produzida e, conseqüentemente a densidade óptica medida.

As figuras 15 A e B mostram a proliferação celular em resposta ao tratamento com Ptx3 nas linhagens K1735 e B16F1, respectivamente. Nas duas linhagens foi possível verificar um perfil de resposta à Ptx3 semelhante. A presença de SFB não parece ter interferido na proliferação celular, como pode ser observado pela proximidade das curvas de Ptx3 SFB 0% (linha verde) e a dos controles SFB 0% (linha roxa) e 2% (linha vermelha). Já nos poços com Ptx3 e SFB 2% foi observada uma maior viabilidade celular em 24 h (linha azul). Neste caso, Ptx3 pode ter tido um efeito pró-proliferativo ou inibitório em relação ao controle. Na presença de SFB, os poços controle podem ter apresentado uma alta taxa de crescimento e iniciado a morte celular por senescência nos poços.

A partir de 48 h observou-se um decréscimo da densidade óptica em todos os poços, devido a uma alta confluência da monocamada celular e início da morte por senescência. Isso também inviabilizou obter mais clareza sobre o efeito de Ptx3 em presença de SFB, se pró-proliferativo ou inibitório. Entretanto, embora tenha sido observada a tendência acima descrita, nenhuma das diferenças na taxa de proliferação entre o controle e o tratado na presença ou ausência de SFB foi estatisticamente significativa.

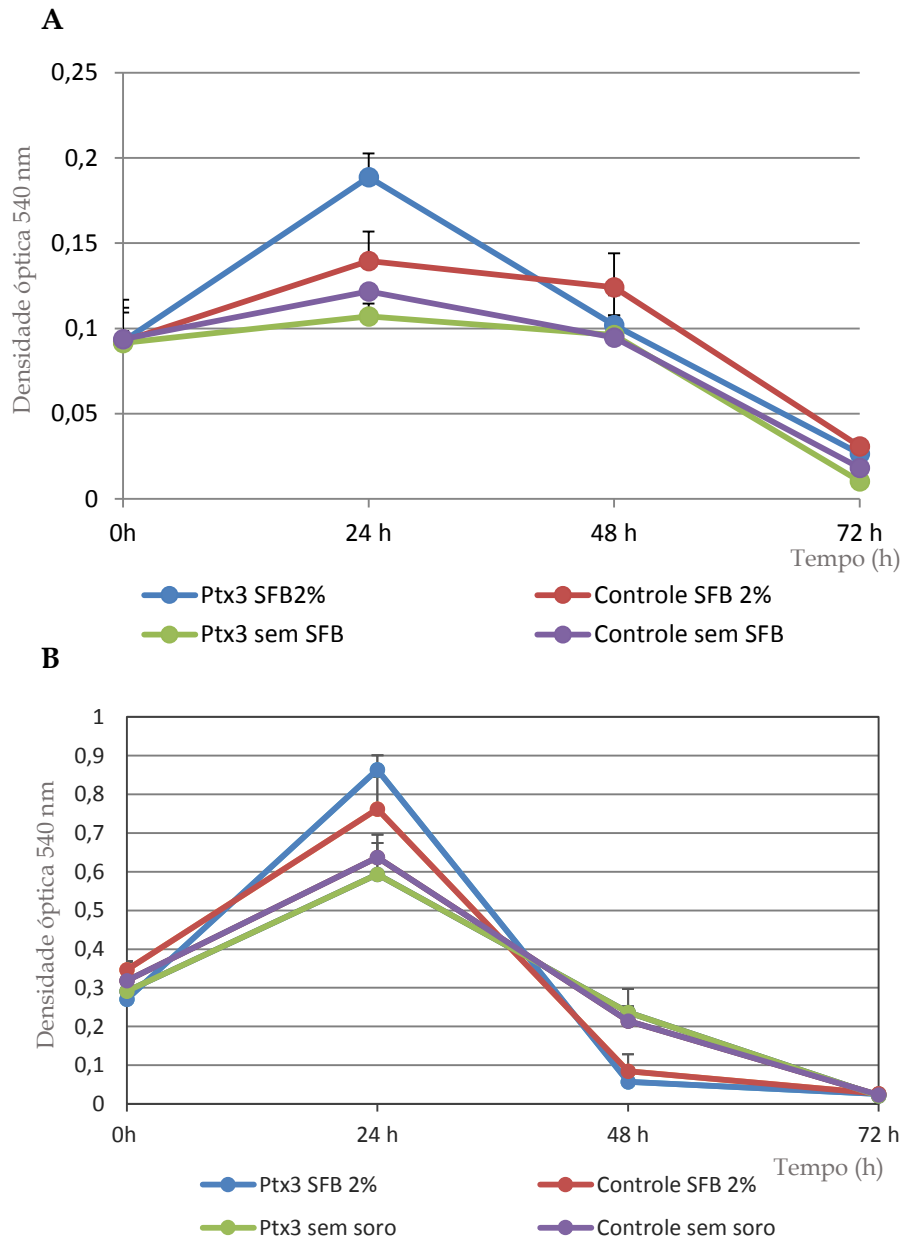


Figura 15 - Análise da proliferação celular.

As células (1×10^5) de K1735 e B16F1 foram plaqueadas em triplicata em poços de $1,9 \text{ cm}^2$ e cultivadas em estufa em meio SFB 10% até aderirem ao fundo do poço. Em seguida, elas foram privadas de SFB por 24 h. seguida por um tratamento ou não com $10 \mu\text{g/ml}$ de rmPtx3 na presença (2%) ou ausência de SFB (0%). Foram realizados ensaios de proliferação com o reagente MTT nos tempos 0, 24, 48 e 72 h. Foram realizadas leituras na absorvância de 540 nm dos cristais formazan solubilizados. Em azul: Ptx3 SFB 2%; Vermelho: controle SFB 2%; Verde: Ptx3 SFB 0%; Roxo: Controle SFB 0%. Foi realizado um teste-T entre o tratado e controle, entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa. A) K1735 e B) B16F1.

4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.4.1 Expressão Gênica Basal

4.4.1.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA

A expressão gênica basal de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens tumorais murinas de fibrosarcoma MC-TGS17-51 e Sal/N e K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1 de melanoma foi analisada por RT-PCR. Para tal, as linhagens foram crescidas em placas para cultura celular com área de crescimento de 55 cm² até a atingirem a confluência de aproximadamente 80%. Quando as culturas atingiam a confluência desejada, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método TRIzol.

O RNA foi quantificado por espectrofotometria na absorvância de 260 nm (tabela 2). Por espectrofotometria também foi feita uma estimativa da contaminação das amostras de RNA por proteínas e sais utilizando as razões entre a absorvância de 260/280 e 260/230 nm. Os RNAs totais extraídos foram considerados de boa qualidade quando a razão 260/280 nm era aproximadamente 2.0, visto que um valor mais baixo pode indicar a predominância de proteínas, fenol ou outro contaminante que absorve perto do comprimento de onda de 280 nm na amostra. A razão 260/230 nm foi utilizada como um segundo parâmetro para mensurar a pureza do RNA, sendo considerados de ótima qualidade as amostras de RNA que apresentaram essa razão entre 2.0 e 2.2 e de boa qualidade as que apresentavam essa razão variando entre 2.0 e 1.6 (Doshi, Day e Tirelli, 2009). A tabela 2 mostra a análise da pureza do RNA total extraído. De acordo com os valores das razões 260/280 nm e 260/230 nm, todos os RNAs foram considerados de boa ou ótima qualidade.

Atestada a qualidade do RNA total, foi avaliada a sua integridade por fracionamento eletroforético de uma alíquota de 400 ng em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 16). A integridade dos RNAs foi aferida pela intensidade das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28 e 18S, sendo considerados íntegras as amostras cuja banda do 28S apresentasse intensidade igual ou maior que a do 18S. Todos os RNAs extraídos apresentaram integridade aceitável para construção do cDNA.

Amostra	A260	A280	Razão 260/280	Razão 260/230	Concentração de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Quantidade Total de RNA (μg)
MC-TGS17-51	2,929	1,413	2,07	2,02	4,684	131,152
Sal/N	33,476	16,912	1,98	2,15	53,564	1499,792
K1735	14,671	7,145	2,05	2,05	5,868	158,436
K1735M2	3,307	1,590	2,04	2,08	5,44	152,32
B16F10	1,9171	0,959	2,06	2,03	3,156	88,368
B16F1	0,264	0,122	2,16	1,69	0,0424	12,296

Tabela 2 - Análise quantitativa do RNA total extraído.

As linhagens murinas de fibrosarcoma e melanoma foram crescidas em meio específico suplementado com SFB 10% em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 80%. Em seguida, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método TRIzol e quantificado e analisado quanto a sua pureza por espectrofotometria. A tabela mostra a quantificação do RNA extraído, bem como as suas razões de pureza.

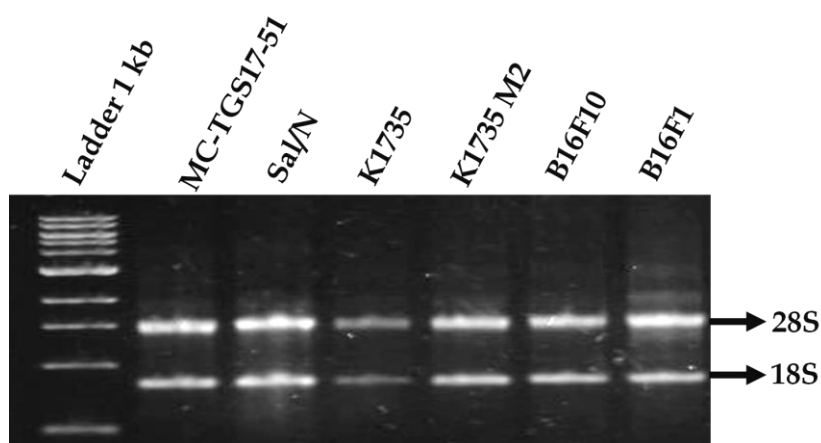


Figura 16 - Análise da integridade do RNA total extraído das células tumorais.

As linhagens tumorais murinas de fibrosarcoma e melanoma foram crescidas em meio específico suplementado com SFB 10% em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até a monocamada atingir a confluência de 80%. Em seguida, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método TRIzol e analisado quanto a sua integridade por um fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de peso molecular 1 kb; Canaletas 2-7: 400 ng do RNA total de MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1, respectivamente. Banda superior correspondente ao RNA ribossomal 28S e a inferior ao 18S.

Verificada a qualidade, a pureza e integridade do RNA total extraído, foi realizada a reação de transcrição reversa utilizando 2 µg do RNA total de cada linhagem e iniciadores oligodTs, conforme descrito no tópico 3.7.3. A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por uma reação de PCR utilizando iniciadores específicos para o gene constitutivo *Gapdh*. O produto amplificado foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Visto que *Gapdh* é um gene constitutivo, a intensidade semelhante das bandas nos permite concluir que a reação de RT foi eficiente e o cDNA construído apresenta boa qualidade e, também, que não há inibidores da reação (figura 17).

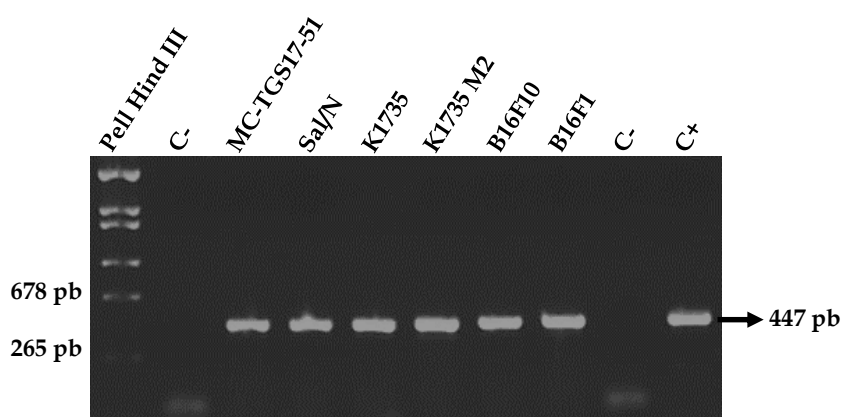


Figura 17 – Controle de qualidade da transcrição reversa a partir do RNA total extraído das linhagens.

As linhagens murinas de fibrosarcoma e melanoma foram crescidas em meio específico suplementado com SFB 10% em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 80%. Em seguida, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método TRIzol e analisado quanto a sua pureza e integridade por espectrofotometria e fracionamento eletroforético, respectivamente. Atestada a sua qualidade, 2 µg de RNA total foi utilizado como molde em reações de transcrição reversa utilizando oligoDTs como iniciadores. A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por uma reação de PCR utilizando iniciadores específicos para *Gapdh*, seguida por um fracionamento eletroforético do seu produto em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Marcador de peso molecular Pell Hind III; Canaleta 2 e 9: controle negativo; Canaleta 10: controle positivo; Canaletas 3-8: cDNA de MC-TGS17-51, Sal/N, K1735; K1735 M2, B16F10 e B16F1, respectivamente. Tamanho do produto da PCR: 447 pb.

Para avaliar a contaminação do RNA total por DNA genômico e garantir que a intensidade da banda observada era proveniente do uso do cDNA como molde, foi realizada uma reação de PCR utilizando como molde 100 ng de RNA total, que foi a mesma quantidade utilizada como molde na reação de transcrição reversa de 1 µl de cDNA. A reação de PCR foi realizada utilizando o mesmo par de iniciadores e as mesmas condições da reação de PCR utilizando como molde o cDNA. O produto da PCR foi analisado por um fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 18).

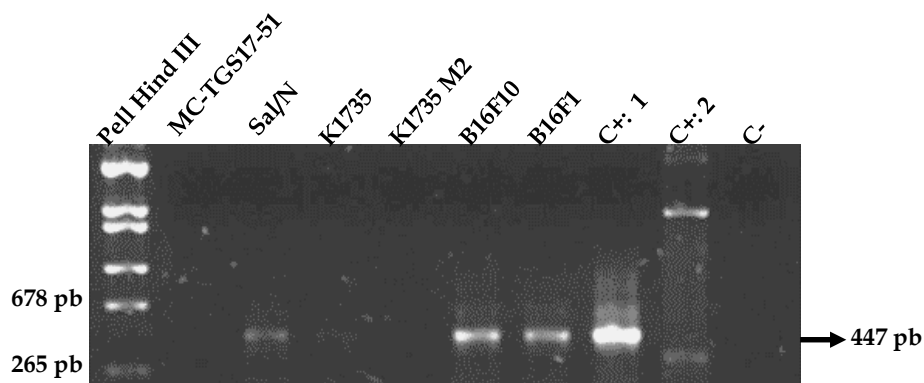


Figura 18 - Controle de contaminação do RNA total extraído por DNA genômico.

As linhagens murinas de fibrosarcoma e melanoma foram crescidas em meio específico suplementado com SFB 10% em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 80%. Em seguida, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método TRIzol e 100 ng utilizado como molde em reações de PCR utilizando iniciadores específicos para *Gapdh*. O produto da PCR foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio. Canaleta 1: Marcador de peso molecular Pell Hind III; Canaleta 2-7: 100 ng de RNA de MC-TGS17-51, Sal/N, K1735; K1735 M2, B16F10 e B16F1, respectivamente; Canaleta 8 e 9: controle positivo; Canaleta 10: controle negativo. Tamanho do produto da PCR: 447 pb.

A amplificação com os iniciadores para *Gapdh* usados amplificam a partir do DNA genômico bandas de peso molecular iguais a 531, 1704 ou 447 pb, sendo o peso desta última banda igual à banda observada quando o cDNA é utilizado como molde. Como pode ser observado na figura 18, houve amplificação a partir do RNA total nas linhagens Sal/N, B16F10 e B16F1 no tamanho da banda esperada quando utilizado o cDNA como molde. Esse resultado indica haver contaminação por DNA genômico no RNA total extraído dessas linhagens e que parte da amplificação observada anteriormente é devido à amplificação do DNA genômico. Por esta razão, em todos os demais ensaios foi também utilizado o RNA total sem transcrição reversa em paralelo às reações utilizando o cDNA como molde para detecção de possíveis ampliações provenientes do DNA genômico.

4.4.1.2 Análise da Expressão Gênica de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4*

Comprovada a integridade do cDNA sintetizado, foram realizadas reações de PCR para avaliar a expressão dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens tumorais murinas MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735M2, B16F10 e B16F1 utilizando iniciadores específicos e como molde 1 µl do cDNA. A sequência dos iniciadores específicos é mostrada na tabela 1 do tópico 3.7.4. A visualização do produto de PCR foi realizada por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 19, painel 1).

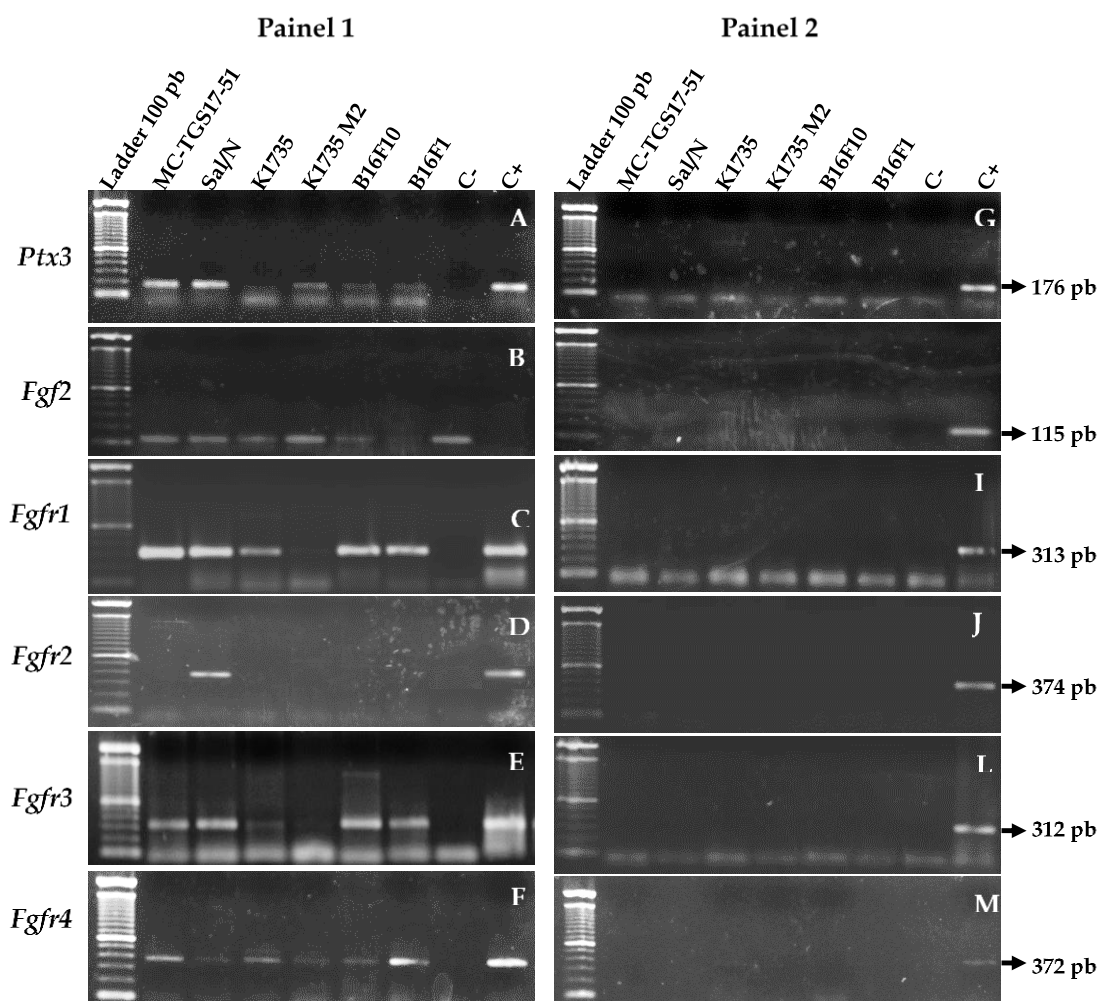


Figura 19 - Análise da expressão basal dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735M2, B16F10 e B16F1.

As linhagens murinas de fibrosarcoma e melanoma foram crescidas em meio específico suplementado com SFB 10% em estuda a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 80%. Em seguida, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método TRIzol e utilizados como molde em reações de RT ou como molde em reações de PCR (painel 2). O cDNA sintetizado foi utilizado como molde em reações de PCR utilizando iniciadores específicos (Painel 1). Os iniciadores específicos amplificavam *Ptx3* (A e G), *Fgf2* (B e H), *Fgfr1* (C e I), *Fgfr2* (D e J), *Fgfr3* (E e L) e *Fgfr4* (F e M). O produto da reação de PCR foi fracionamento eletroforético em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. Em ambos os painéis: canaleta 1: marcador de peso molecular 100 pb; Canaleta 2-7: MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735M2, B16F10 e B16F1, respectivamente; Canaleta 8: controle negativo; Canaleta 9: controle positivo. Tamanho do produto de PCR de *Ptx3*: 176 pb; *Fgf2*: 115 pb; *Fgfr1*: 313 pb; *Fgfr2*: 374 pb; *Fgfr3*: 312 pb; e *Fgfr4*: 372 pb.

Nas condições experimentais avaliadas, foi possível observar expressão de *Ptx3* em todas as linhagens, exceto K1735. Já *Fgf2* só não é expresso por B16F1. Os receptores *Fgfr1*, *Fgfr3* e *Fgfr4* apresentam expressão em todas as linhagens, entretanto, a expressão de *Fgfr1* e *Fgfr3* na linhagem K1735 M2 é fraca; *Fgfr2* é expresso somente na linhagem Sal/N; Uma síntese da expressão basal dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens tumorais murinas MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1 é mostrado na tabela 3, onde o sinal positivo (+) indica que houve expressão e um sinal negativo (-) que não houve.

A amplificação dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* utilizando como molde o RNA é mostrada na figura 19 - painel 2. Como indicado na figura, não foram observadas amplificações a partir do RNA total, o que indica que a estratégia adotada de desenho de pelo menos um iniciador em junção de éxons foi eficiente na prevenção de amplificação a partir do DNA genômico.

Linhagem	<i>Ptx3</i>	<i>Fgf2</i>	<i>Fgfr1</i>	<i>Fgfr2</i>	<i>Fgfr3</i>	<i>Fgfr4</i>
MC-TGS17-51	+	+	+	-	+	+
Sal/N	+	+	+	+	+	+
K1735	-	+	+	-	+	+
K1735M2	+	+	+	-	+	+
B16F10	+	+	+	-	+	+
B16F1	+	-	+	-	+	+

Tabela 3 - Expressão gênica de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1.

Em resumo, a expressão gênica basal dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* nas linhagens MC-TGS17-51, Sal/N, K1735, K1735M2, B16F10 e B16F1 detectada pelos experimentos de PCR. O sinal gráfico positivo (+) indica expressão positiva do gene na linhagem, enquanto o sinal negativo (-) indica a ausência de expressão.

4.2.2 Análise da Expressão Gênica após o Tratamento com Ptx3

A linhagem B16F10 foi escolhida para avaliar a ação da proteína Ptx3 sobre a expressão gênica de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4*, pois apresentava expressão de *Fgf2* e uma baixa expressão de *Ptx3*. Para o ensaio, a linhagem B16F10 foi plaqueada em placas com área de crescimento de 9,2 cm² e crescidas em estufa a 37 °C e atmosfera de CO₂ de 5% até a confluência de aproximadamente 65%. O meio foi aspirado e substituído por novo meio contendo SFB 0,5% e incubadas por 24 horas em estufa. Decorrida o tempo de privação de SFB, as culturas foram tratadas ou não com rmPtx3 na ausência de SFB ou com SFB por 3h. Após o tempo de tratamento, o RNA das linhagens foi extraído pelo método TRIzol® de acordo com o tópico 3.7.2. O experimento foi realizado em duplicata.

O RNA total extraído foi quantificado e analisado com relação a pureza por espectrofotometria (tabela 4). A quantidade de RNA total extraído para uma placa com área de crescimento 9,2 cm² variou entre 35 e 45 µg. Como pode ser observado na tabela 4, as razões 260/230 e 260/280 nm demonstram que os RNAs totais extraídos apresentavam uma ótima ou boa qualidade.

Amostra	A260	A280	Razão 260/280	Razão 260/230	Concentração de RNA (µg/µl)	Quantidade Total de RNA (µg)
Controle - 1	2,744	1,303	2,11	2,15	2,196	41,724
Controle - 2	2,877	1,36	2,11	2,09	2,302	43,738
SFB 10% - 1	2,621	1,259	2,08	2,15	2,098	39,862
SFB 10% - 2	2,683	1,335	2,10	1,78	2,146	40,774
Ptx3 - 1	2,971	1,428	2,08	2,16	2,378	45,182
Ptx3 - 2	2,343	1,114	2,10	2,20	1,874	35,606

Tabela 4 - Análise quantitativa do RNA total extraído após tratamento com Ptx3.

A linhagem de melanoma murino B16F1 foi crescida em meio DMEM suplementado com SFB 10% em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 65%. Após atingida a confluência desejada, as culturas foram privadas de SFB por 24 h, seguida por um tratamento ou não com rmPtx3 ou SFB 10% em duplicata por 3h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O RNA total das culturas foi extraído pelo método TRIzol® e quantificado e analisado quanto a sua pureza por espectrofotometria. A tabela mostra a quantificação do RNA extraído, bem como as suas razões de pureza.

4.2.2.1 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Para complementar a avaliação do RNA total, foi averiguada a sua integridade por fracionamento eletroforético de uma alíquota de 400 ng do RNA total de B16F10 de cada tratamento em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 20). A qualidade do RNA total extraído é atestada pela presença e intensidade das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28 e 18S.

Atestada a viabilidade do RNA total extraído da linhagem B16F10, ele foi usado como molde em reações de RT. Como descrito no tópico 3.7.3, 2 µg do RNA e iniciadores oligodTs foram utilizados na reação. A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por uma reação de PCR para o gene constitutivo *Gapdh*, seguida por um fracionamento eletroforético do produto amplificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 21).

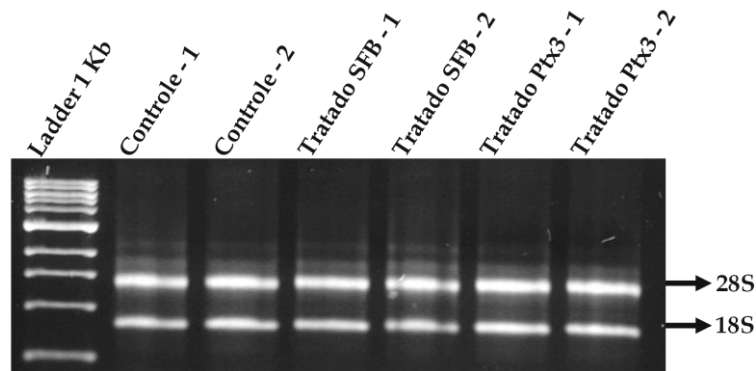


Figura 20 - Análise da integridade do RNA total extraído da linhagem B16F10 tratada com Ptx3.

A linhagem de melanoma murino B16F10 foi crescida em meio DMEM + SFB 10% em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 65%. Em seguida, as culturas foram privadas de SFB por 24 h, seguida por um tratamento ou não com rmPtx3 ou SFB em duplicata por 3h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O RNA total das culturas foi extraído pelo método TRIzol® e sua integridade analisada por fracionamento eletroforético de 400 ng em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de peso molecular 1 kb; Canaleta 2-7: RNA de controle 1, controle 2, tratado SFB 1, tratado SFB 2, tratado Ptx3 1 e tratado Ptx3 2. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28 e 18S são perceptíveis. Banda superior correspondente ao RNA ribossomal 28S e a inferior ao 18S.

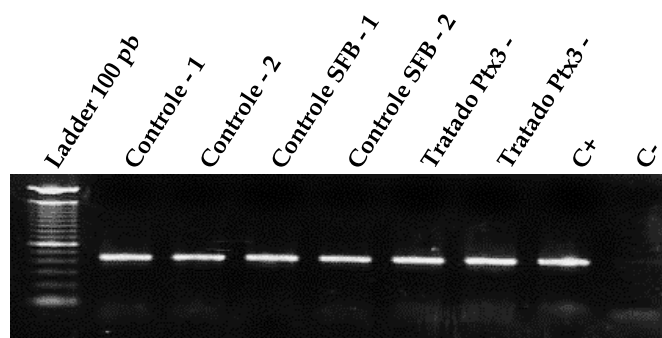


Figura 21 - Controle da qualidade do cDNA sintetizado da linhagem de melanoma murino B16F10 tratada com Ptx3.

A linhagem de melanoma murino B16F10 foi crescida em meio DMEM + SFB 10% em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 65%. Em seguida, as culturas foram privadas de SFB por 24 h, seguida por um tratamento ou não com rmPtx3 ou SFB 10% por 3h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O RNA total das culturas foi extraído pelo método TRIzol e analisado quanto a sua pureza e integridade por espectrofotometria e fracionamento eletroforético, respectivamente. Atestada a sua qualidade, 2 µg de RNA total foi utilizado como molde em reações de transcrição reversa utilizando oligoDTs como iniciadores. A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por uma reação de PCR utilizando iniciadores específicos para *Gapdh*, seguida por um fracionamento eletroforético do seu produto em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1: marcador de peso molecular 100 pb; canaleta 2-7: controle - 1, controle - 2, tratado SFB - 1, tratado SFB - 2, tratado Ptx3 - 1 e tratado Ptx3 - 2, respectivamente; canaleta 8: controle positivo; canaleta 9: controle negativo. Tamanho do produto da PCR: 447 pares de bases.

4.2.2.2 Análise da Expressão Gênica de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* após Tratamento com *Ptx3*

Comprovada a integridade do cDNA sintetizado, foram realizadas reações de PCR para avaliar a expressão gênica *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* após o tratamento com *Ptx3* na linhagem tumoral murina de melanoma B16F10 utilizando iniciadores específicos e como molde o cDNA sintetizado. A sequência dos iniciadores específicos é mostrada na tabela 1 do tópico 3.7.4. A visualização do produto de PCR foi realizada por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (figura 22 - painel 1).

Como é possível observar no painel 2 da figura 22, houve amplificação a partir do RNA total de *Gapdh* em todas as amostras (Figura 22-O), o que indica uma contaminação por DNA genômico. Também foi possível notar amplificação de *Ptx3* (figura 22H) e *Fgfr3* (figura 22M) a partir do RNA total. Todavia, as bandas formadas apresentam maior peso molecular que o esperado para a amplificação a partir do cDNA, indicando que o resultado observado na expressão desses genes não sofre influência da contaminação por DNA genômico.

Embora anteriormente houvesse sido detectada expressão basal de *Ptx3* na linhagem B16F10, nesse novo ensaio, não foi notada expressão (figura 22A), mas foi observada amplificações a partir do DNA genômico; Não foi detectada diferença de expressão de *Fgfr1*, *Fgfr3* e *Fgfr4* entre o controle, tratado ou nos poços que receberam SFB. Anteriormente, não foi encontrada expressão de *Fgfr2* na linhagem B16F1, esse perfil se manteve. Já a expressão de *Fgf2*, é observada aumentada nos poços tratados com SFB 10%, contudo, não foi observada diferença entre os poços privados de SFB e tratados ou não com *Ptx3*.

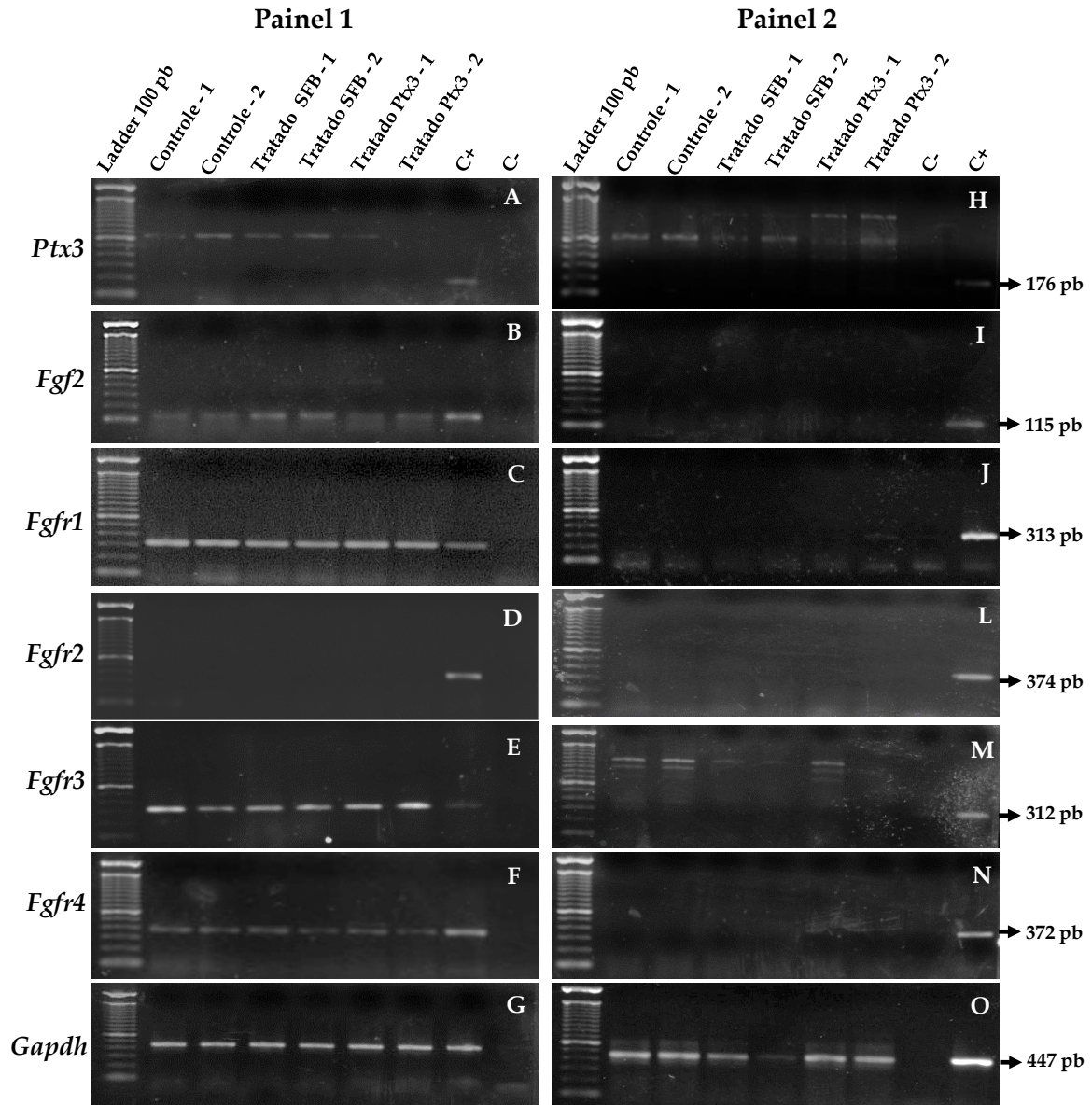


Figura 22 - Análise da expressão dos genes *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* após tratamento com *Ptx3* na linhagem de melanoma murino B16F10.

A linhagem de melanoma murino B16F10 foi crescida em meio DMEM + SFB 10% em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ até a confluência de 65%. Em seguida, as culturas foram privadas de SFB por 24 h, seguida por um tratamento ou não com rm*Ptx3* ou SFB 10% por 3h em estufa a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O RNA total das culturas foi extraído pelo método TRIzol e analisado quanto a sua pureza e integridade por espectrofotometria e fracionamento eletroforético, respectivamente. Em seguida, o RNA total de cada linhagem foi extraído pelo método TRIzol e utilizados em reações de RT ou como molde em reações de PCR (paine 2). O cDNA sintetizado foi utilizado como molde em reações de PCR utilizando iniciadores específicos (Paine 1). Os iniciadores específicos amplificavam *Ptx3* (A e H), *Fgf2* (B e I), *Fgfr1* (C e J), *Fgfr2* (D e L), *Fgfr3* (E e M), *Fgfr4* (F e N) e *Gapdh* (G e O). O produto da reação de PCR foi fracionamento eletroforético em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio. Em ambos os painéis: canaleta 1: marcador de peso molecular 100 pb; Canaleta 2-7: controle - 1, controle - 2, tratado SFB - 1, tratado SFB - 2, tratado *Ptx3* - 1 e tratado *Ptx3* - 2, respectivamente; canaleta 8: controle positivo (paine 1) e controle negativo (paine 2); canaleta 9: controle negativo (paine 1) e controle positivo (paine 2). Tamanho do produto de PCR de *Ptx3*: 176 pb; *Fgf2*: 115 pb; *Fgfr1*: 313 pb; *Fgfr2*: 374 pb; *Fgfr3*: 312 pb; *Fgfr4*: 372 pb; e *Gapdh*: 447 pb.

4. DISCUSSÃO

PTX3 é uma importante proteína inflamatória com função no sistema imune inato, deposição de matriz e fertilidade feminina (Garlanda *et al.*, 2005). Além disso, foi reportado o seu papel na inibição da proliferação de células endoteliais e angiogênese induzidas por FGF2 (Rusnati *et al.*, 2004). Posteriormente a essa descoberta, vários estudos tem contribuído para melhor caracterizar o papel de PTX3 no processo de inibição das atividades biológicas de FGF2, tanto *in vitro*, quanto em modelos *in vivo* (Jeannin *et al.*, 2005; Presta *et al.*, 2005; Camozzi *et al.*, 2006; Presta *et al.*, 2007; Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2010; Leali *et al.*, 2011; Leali *et al.*, 2012; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013).

A proteína PTX3 se liga ao FGF2 e impede o engajamento deste fator ao seu receptor na membrana plasmática. Com isso, a ativação do receptor e, conseqüentemente, a ativação de importantes vias de sinalização que culminam na modulação de genes relacionados à diferenciação, migração, proliferação celular e angiogênese ficam alteradas (Rusnati *et al.*, 2004). A sinalização via FGF é reconhecida como chave na tumorigênese e angiogênese tumoral (Ahmad, Iwata e Leung, 2012). Muitos esforços tem sido despendidos a fim de descobrir agentes que possam, de alguma forma, interferir nesta via e serem usados na terapia de doenças onde a via encontra-se alterada. As neoplasias fazem parte do quadro de doenças dependentes de angiogênese e nas quais a via de FGF encontra-se desregulada (Daniele *et al.*, 2012).

Foi mostrado que PTX3 é um antagonista natural das funções biológicas de FGF2, inibindo a sua atividade mitogênica, angiogênica e o crescimento tumoral em modelos *in vivo* de câncer de próstata e melanoma (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Esses achados apontam para um potencial uso de PTX3 em terapias visando inibir angiogênese e crescimento neoplásico. Entretanto, muitos aspectos da interação PTX3/FGF2 e seus efeitos biológicos necessitam ser elucidados e caracterizados. Com o objetivo de contribuir nesse entendimento, nós avaliamos o efeito de Ptx3 sobre a morfologia, o padrão das fibras de actina do citoesqueleto, a proliferação celular e a expressão gênica de células derivadas de melanoma e sarcoma.

Durante a construção das curvas de crescimento, em todos os poços onde foram plaqueadas 5×10^5 células, a confluência da monocamada atingiu 100% em 24-48h, exceto na linhagem de fibrosarcoma MC-TGS17-51. Observamos que esta linhagem tem como característica não ocupar completamente toda a superfície do substrato, de forma que, quando a monocamada celular da cultura atinge aproximadamente 80-85% de confluência, inicia-se o processo de

desprendimento e morte das células de forma rápida. Esse comportamento pode ser observado pela curva de crescimento dessa linhagem mostrada na figura 9A.

Quando as células foram plaqueadas na menor quantidade, 1×10^4 , foi observado um aumento muito baixo (B16F10 e B16F1) ou até mesmo nulo (K1735 M2, figura 10A) da confluência da monocamada. O contato entre as células em cultura permite a comunicação entre as junções do tipo Gap. Essas junções são canais intramembranares que se comunicam com o citoplasma de células adjacentes, permitindo a troca de pequenos íons, metabólitos e mensageiros secundários (Junqueira e Carneiro, 2013). Este tipo de comunicação intercelular é conhecido por ser essencial em vários processos fisiológicos e patofisiológicos, tais como o crescimento, a proliferação e diferenciação celular, a homeostase de tecidos, a tumorigênese e a cicatrização de feridas. Ao que tudo indica, no nosso ensaio quando as células foram semeadas em baixa quantidade (1×10^4), o espaçamento das células foi tão grande, que comprometeu a comunicação entre as células e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento celular.

Com as condições e tempos experimentais utilizados, foi possível estimar o tempo de dobramento das linhagens Sal/N, K1735, K1735 M2 e B16F1 como sendo de aproximadamente 24 h. O tempo de dobramento das linhagens MC-TGS17-51 e B16F10 também parece ser em torno de 24 h, mas nossos dados não são muito acurados. Para mais precisão na estimativa desses tempos, seriam necessários experimentos adicionais aumentando o tempo de cultivo e utilizando metodologias mais precisas e menos subjetivas como, por exemplo, a contagem direta do número de células. Apesar disso, esses resultados serviram de base para estimar a quantidade de células a serem plaqueadas nos experimentos seguintes. Portanto, como o plaqueamento de 5×10^5 células leva a uma alta confluência em pouco tempo e o plaqueamento de 1×10^4 células compromete a proliferação devido à baixa densidade, as quantidades intermediárias de células (5×10^4 e 1×10^5) foram selecionadas, dependendo de cada caso, para serem semeadas nos experimentos posteriores.

Em nossos ensaios, a ausência de SFB parece não ter influenciado o crescimento das linhagens, uma vez que a maioria cresceu normalmente sem suplementação de SFB no meio. A privação de SFB tinha como objetivo, além de sincronizar o ciclo celular, avaliar a viabilidade das linhagens nestas condições, visto que os ensaios posteriores seriam realizados sem o mesmo. O SFB é um suplemento para meios de cultura celular que contém grandes quantidades de ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas com a finalidade de promover o crescimento das células. Logo, dado o seu efeito pró-proliferativo, a sua presença poderia mascarar um possível efeito também pró-proliferativo apresentado por Ptx3.

Quando realizamos os ensaios de proliferação celular em resposta à Ptx3 pelo método MTT na presença e ausência de SFB nas linhagens de melanoma K1735 e B16F1, observamos que na ausência de SFB, Ptx3, praticamente, não alterou o número de células viáveis em 24 h de tratamento. Entretanto, na presença de SFB notamos em 24 h, nos poços tratados com Ptx3, há uma tendência, embora não estatisticamente significativa, de maior número de células viáveis (figura 14). Este achado pode indicar tanto um possível efeito positivo de Ptx3 sobre a proliferação celular, quanto uma ação oposta, uma vez que a inibição da taxa de proliferação levaria a diminuição da morte por senescência e aumento do número de células viáveis, enquanto que nos poços controle, uma maior proliferação poderia levar a morte celular. Para elucidar tal questão, pretendemos utilizar abordagens alternativas, tais como a contagem direta de células, por ensaio de incorporação de bromo deoxiuridina (BrdU), citometria de fluxo ou ensaio com cristal violeta.

Um efeito inibitório de Ptx3 sobre a proliferação de células endoteliais (Rusnati *et al.*, 2004; Camozzi *et al.*, 2006; Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2011), células de adenocarcinoma de próstata (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013) e de melanoma (Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013) cultivadas em privação de SFB (0,4%) foi reportado. Apesar disso, nenhum trabalho na literatura relata a ação de Ptx3 na proliferação de células cultivadas na presença de SFB, tampouco um efeito pró-proliferativo desta proteína. Nos nossos ensaios ocorreu uma queda da viabilidade celular em 48h, indicando morte nas culturas e inviabilizando a análise por tempo mais prolongado o que poderia permitir uma avaliação mais precisa do efeito de Ptx3. Desta forma, como as diferenças encontradas nos nossos experimentos não foram estatisticamente significativas, nossos achados preliminares precisam ser confirmados pelo uso de outras abordagens experimentais e aumentando o número de replicatas biológicas (fazer os ensaios com as demais linhagens de melanoma e as de sarcoma e um maior número de poços tratados e controle, por experimento). Além disso, seria recomendável acompanhar o efeito de Ptx3 sobre a taxa de proliferação por um tempo maior que o analisado.

Observamos também que o protocolo de MTT utilizado por nós precisa ser otimizado: o número de células plaquetas ainda foi alto para permitir análise por tempo mais prolongado; o volume de solvente utilizado foi muito o que levou à diluição excessiva dos cristais de formazan e a obtenção de valores de densidade óptica baixos. Segundo a Lei de Beer-Lambert, existe uma relação exponencial entre a transmissão de luz através de uma substância e a concentração da mesma. Entretanto, quando uma amostra encontra-se muito concentrada ou diluída, esta correlação é perdida e a precisão também.

O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna que se origina dos melanócitos (células produtoras de melanina, pigmento responsável pela coloração de pele, olhos e cabelos, por

exemplo). O melanoma corresponde a 4% dos cânceres dermatológicos, contudo é responsável por aproximadamente 80% das mortes por neoplasias de pele, sendo que somente 14% dos pacientes com melanoma metastático conseguem sobreviver por 5 anos (Miller e Mihm, 2006). A linhagem K1735 M2 é amelanocítica, ou seja, não são capazes de produzir melanina, enquanto B16F1 produz melanina e é, portanto classificadas como uma célula melanocítica. O melanoma amelanocítico é raro e representa 2-8% de todos os tipos de melanomas. Nesse tipo de tumor, a pouca quantidade de pigmento se deve a deficiência da enzima tirosina ou a perda funcional na capacidade de produção e armazenamento de melanina ocasionada pela rápida diferenciação celular (Grupo Brasileiro de Melanoma, 2009).

A morfologia da linhagem K1735 M2 é semelhante a de um fibroblasto, com células fusiformes e alongadas e núcleo ovoide. Já as células da linhagem B16F1 apresentam uma morfologia que é um misto de células fusiformes e epiteliais. Além disso, esta linhagem produz o pigmento melanina que pode ser observado como pontos escuros no interior da célula, principalmente próximos ao núcleo. Nas condições experimentais utilizadas, de concentração de Ptx3 e tempo de tratamento não foram detectadas mudanças na morfologia das células, como pode ser observado nas figuras 11 e 12. Dessa forma, esses resultados, sugerem que Ptx3 não é capaz de provocar mudanças morfológicas nas células. Em estudos nos quais as células em cultura foram tratadas com Ptx3 ou transfectadas com o gene *PTX3*, de forma a apresentar uma produção aumentada dessa proteína, não foram relatadas mudanças morfológicas (Rusnati *et al.*, 2004; Camozzi *et al.*, 2006; Leali *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2010; Leali *et al.*, 2011; Leali *et al.*, 2012; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013).

As características do citoesqueleto das células cancerosas têm um papel importante nas atividades de migração, habilidades de invasão e, assim, determinam o potencial metastático da célula cancerosa (Olson e Sahai, 2009). A metástase é apontada pela WHO como a principal razão da mortalidade de pacientes com câncer. Muitos dados atentam para a importância das propriedades mecânicas das células na tumorigênese e progressão do câncer (Makale, 2007; Kumar e Weaver, 2009; Katira, Zaman e Bonnacaze, 2012), sendo essas propriedades mecânicas definidas principalmente pela estrutura do citoesqueleto de actina (Radmacher, 2002; Fletcher e Mullins, 2010). O citoesqueleto de actina é uma rede de microfilamentos responsáveis pela forma da célula, pela formação de saliências e pela motilidade e migração. Dada a importância do citoesqueleto de actina para o processo de migração e metástase, nós investigamos se Ptx3 poderia induzir alterações no padrão dos filamentos de actina que poderiam estar envolvidas no processo de migração.

Em comparação com as células normais, as células cancerosas mostram alterações na morfologia e estrutura do citoesqueleto de actina. Elas geralmente têm um número reduzido

de fibras polimerizadas de actina, desordem dos conjuntos de microfilamentos residuais e deturpação do tempo de maturação de adesões (Vasiliev, 2004; Li *et al.*, 2008).

Efremov e colaboradores (2014) avaliaram o comportamento do citoesqueleto de actina em células normais de fibroblasto e células da mesma linhagem transformadas em cancerosas. Os fibroblastos tem um modo de migração típica de células mesenquimais, caracterizado pela forma alongada da célula, atividade protrusiva, fibras de estresse de actina bem definidas e formação de lamelipódios (Park *et al.*, 2005), que são projeções de actina para fora da superfície celular que atuam na migração. Eles observaram que as células transformadas em tumorais apresentavam uma diminuição significativa nas fibras de actina polimerizadas e um aumento dos lamelipódios.

A presença de lamelipódios não foi observada B16F1, e fracamente em K1735 M2. Entretanto, não foi observada alterações nessas estruturas em resposta a Ptx3. Já as fibras de actina polimerizada foram notadas fracamente no córtex celular de K1735 M2 (setas figuras 13), o que corrobora com os estudos que relatam que essas fibras estão diminuídas nos tumores (Efremov *et al.*, 2014). Embora nossas análises tenham sido qualitativas e não nos permitam afirmar com precisão, de forma geral, aparentemente não observamos em nenhuma das linhagens alterações promovidas por Ptx3 no padrão dos filamentos de actina.

Diferentemente dos nossos achados, Ronca e colaboradores, em dezembro de 2013, demonstraram que a linhagem B16F10 transfectada com um plasmídeo contendo o gene *PTX3* humano, apresentou alterações morfológicas e no padrão do citoesqueleto de actina, quando comparado ao controle que foi transfectado com o plasmídeo vazio. As células transfectadas com o gene de *PTX3* adquiriram uma morfologia mais regular, como células epiteliais devido a uma desorganização da actina, enquanto o controle apresentava um fenótipo fusiforme, com um citoesqueleto de actina bem orientado, típico de células mesenquimais. Nesse ensaio, como as células foram transfectadas com o gene *PTX3*, a produção da proteína era endógena. Já no nosso ensaio, acrescentamos Ptx3 ao meio de crescimento das células.

Além da fonte da proteína, outra diferença entre os ensaios foi o tempo experimental. Ronca e colaboradores incubaram as células por 7 h para que Ptx3 pudesse ser produzida, nós, entretanto, tratamos a cultura por 3 h. Podemos levantar a hipótese de que o nosso tempo de incubação não foi suficiente para que Ptx3 pudesse estimular mudanças no citoesqueleto de actina e também que a fonte de produção pode interferir na resposta à Ptx3, visto que pouco se sabe sobre como é a ação de Ptx3 exógena. Considerando-se também que não foi possível analisar as imagens das linhagens MC-TGS17-51, Sal/, K1735 e B16F10 por dificuldades

experimentais, pretendemos realizar novos ensaios aumentando o tempo de incubação, e também com uma maior confluência da monocamada celular nos poços, de forma que seja possível investigar um maior número campos e um maior número de células por campo. Além disso, para resultados mais robustos, pretendemos realizar uma quantificação das fibras de actina, a fim de avaliar quantitativamente o efeito de Ptx3 sobre o número e organização dessas fibras.

Em 2013, Ronca e colaboradores publicaram dois trabalhos demonstrando o impacto da interação PTX3/FGF2 em células tumorais *in vitro* e tumores de próstata e melanoma *in vivo* (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013; Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Eles observaram uma diminuição da proliferação *in vitro* e da angiogênese em modelo da membrana corioalantoide de embrião de galinha promovidas por PTX3. Além disso, houve uma diminuição do tamanho e volume tumoral quando células transfectadas com PTX3 eram injetadas em modelo murino. Em seus estudos envolvendo PTX3 e melanoma, Ronca e colaboradores utilizaram a linhagem B16F10, uma das estudadas por nós. Embora nosso trabalho tenha objetivos semelhantes e utilize a mesma linhagem, a publicação desses autores não pode ser tomada como um fator desestimulante. Pelo contrário, os trabalhos de Ronca e colaboradores atestam a competitividade existente nesta área e a relevância dos nossos estudos. Além disso, nossos dados trazem informações inéditas sobre a expressão de Ptx3 em outras linhagens de melanoma e sarcomas.

A expressão gênica foi avaliada por RT-PCR. Na construção do cDNA foram utilizados como iniciadores oligodTs, que possuem uma cauda de poli-T capaz de reconhecer e se hidrolisar a cauda de poli-A dos RNAs mensageiros, por um pareamento de bases. Dessa forma, o cDNA começa a ser construído na extremidade 3' em direção a extremidade 5' e quanto mais longe da extremidade 3' o cDNA é capaz de amplificar um gene, melhor é considerada sua qualidade. O RNAm murino de *Gapdh* é grande, composto por 1444 pb e 7 éxons. Como é possível notar na figura 23, os iniciadores *forward* e *reverse* para *Gapdh* se anelam entre os éxons 4-5 e 6-7, respectivamente, chegando até aproximadamente metade do gene. Dessa forma, a amplificação do gene *Gapdh* a partir de um determinado cDNA utilizado como molde numa reação de PCR, pode indicar a ausência de inibidores e a eficiência da reação de transcrição reversa.

O gene *Gapdh* codifica a enzima desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (*Gapdh*) que catalisa o sexto passo da glicólise de carboidratos (Nelson e Cox, 2011), sendo, portanto, um gene de expressão constitutiva. Genes constitutivos são essenciais ao metabolismo celular e, portanto, são expressos em níveis constantes, independentemente da condição celular (Eisenberg e Levanon, 2003). A característica de apresentar expressão constante torna esses genes bons

normalizadores de amostras. Quando avaliamos a qualidade do cDNA pela amplificação de *Gapdh*, tanto para a expressão gênica, quanto após o tratamento com Ptx3, observamos bandas de intensidade qualitativamente semelhantes. Isso atesta a qualidade do cDNA sintetizado para ser usado nas análises de expressão gênica.

Mus musculus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*), transcript variant 2, mRNA

NCBI Reference Sequence: NM_008084.3

[GenBank](#) [FASTA](#)

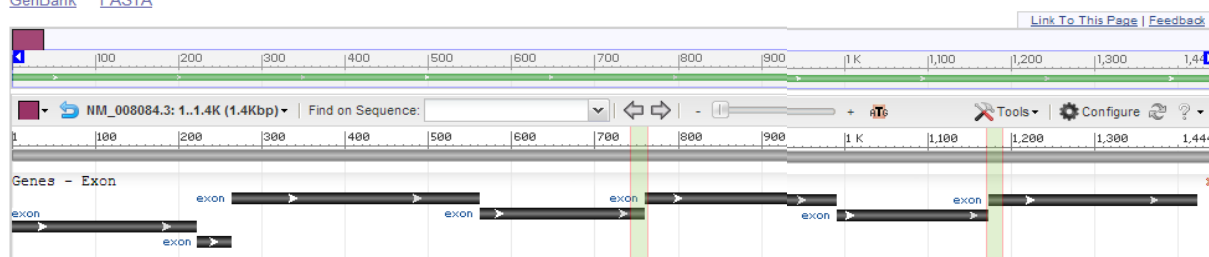


Figura 23 – Estrutura dos éxons do gene *Gapdh* murino.

Estrutura do gene *Gapdh* murino mostrando o tamanho do RNAm, o número de éxons e o local de pareamento dos iniciadores utilizados (linhas verticais).

Fonte: NCBI

Nós observamos a amplificação de *Gapdh* nas linhagens Sal/N, B16F10 e B16F1 (figura 17), indicando a contaminação por DNA genômico. Apesar disso, não foram observadas amplificação inespecífica com o uso dos iniciadores para *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* (figura 18). Isso demonstra a eficiência da estratégia usada para construção dos iniciadores (em junção de éxons) e garante que a intensidade das bandas geradas na expressão basal é decorrente somente do cDNA, sem contribuição de ampliações inespecíficas por contaminação com DNA genômico. Essa estratégia de verificação de contaminação foi utilizada como uma alternativa ao uso de DNase, visto que isso poderia ocasionar perda de amostra por hidrólise inespecíficas de RNA.

Nas condições analisadas para expressão basal, *Ptx3* foi expresso em todas as linhagens, exceto na linhagem K1735. As linhagens MC-TGS17-51 e Sal/N de fibrosarcoma apresentaram uma expressão de *Ptx3* semelhante e maior que a encontrada nas linhagens de melanoma K1735 M2, B16F10 e B16F1. A diferença de expressão entre o tipo tumoral pode ser explicada pelas células produtoras de *Ptx3*. Os fibrosarcomas são tumores derivados de fibroblastos, que já foram apontados como células produtoras de *Ptx3* (Lee *et al.*, 1994), entretanto, nada foi relatado sobre a produção de *Ptx3* em melanócitos, as células que geram o tumor de melanoma.

A expressão de *Ptx3* no microambiente tumoral de alguns liposarcomas foi reportada (Willeke *et al.*, 2006; Germano *et al.*, 2010; Uboldi *et al.*, 2012). Porém, pela primeira vez, nós

descrevemos a expressão de Ptx3 em outro tipo de sarcoma, os fibrosarcomas. Além disso, como nenhum outro dado na literatura relata a expressão basal de Ptx3 em melanomas, nós mostramos de forma inédita a expressão de Ptx3 em melanomas murinos.

Fgf2 apresentou expressão nas linhagens MC-TGS17-51 e Sal/N de fibrosarcoma e K1735, K1735 M2, B16F10, de melanoma, não sendo aparentemente observada expressão em B16F1. Considerando as funções biológicas de FGF2 de proliferação celular, era de se esperar que essa molécula fosse encontrada em ambientes tumorais, onde há uma intensa atividade mitogênica. Dados na literatura apontam para uma expressão aumentada de FGF2 em tumores, sendo sua expressão relacionada com o grau de malignidade do tumor e o prognóstico. Apesar de não verificamos a expressão de *Fgf2* na linhagem de melanoma B16F1, a expressão de FGF2 tem sido identificada e apontada como uma característica importante das células de melanoma (Halaban *et al.*, 1988) e tem sido associada à progressão desse tipo de tumor (Jeffers, Larochelle e Lichenstein, 2002).

A expressão dos receptores *Fgfr1*, 3 e 4 foi observada em todas as linhagens, embora na linhagem de melanoma K1735 M2 a expressão de *Fgfr1* e *Fgfr3* tenha sido observada de forma fraca. A expressão aumentada e mutações nesses receptores tem sido observadas em numerosos tipos de cânceres, incluindo câncer de próstata, mama, pulmão, cérebro, gástrico, sarcoma cabeça e pescoço, mielomas múltiplos e melanomas (Jacquemier *et al.*, 1994; Chesi *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 2001; Van Rhijn *et al.*, 2002; Nakazawa, Yashiro e Hirakawa, 2003; Kwabi-Addo, Ozen e Ittmann, 2004; Freier *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2008; Marek *et al.*, 2009) (Jaakkola *et al.*, 1993; Leung, Gullick e Lemoine, 1994; Penault-Llorca *et al.*, 1995; Ezzat *et al.*, 2002; Gowardhan *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; Sahadevan *et al.*, 2007). Todavia, nossos dados, por não serem quantitativos e nem pareados com tecidos normais, não nos permitem fazer uma comparação de aumento ou diminuição da expressão. Apesar disso, nossos achados para a linhagem B16F10 corroboram os de Ronca e colaboradores (2013) que também verificaram a expressão dos receptores *Fgfr1*, 3 e 4 nesta linhagem.

Embora a via de sinalização de FGF seja apontada por conduzir a tumorigênese, propriedades de genes supressores de tumores, isto é, genes que reduzem a probabilidade de uma célula se tornar tumoral e que quando mutados ou deletados, aumentam a chance de ocorrência neoplásica, tem sido sugeridas em FGFRs, em particular em FGFR2 (Ahmad, Iwata e Leung, 2012). Uma expressão reduzida de FGFR2 tem sido reportada em vários tipos de cânceres, incluindo mama, fígado, glândulas salivares, próstata e melanoma (Yamaguchi *et al.*, 1994; Diez De Medina *et al.*, 1997; Naimi *et al.*, 2002; Grose *et al.*, 2007; Gartside *et al.*, 2009). A reintrodução de FGFR2 resultou na diminuição do crescimento *in vitro* e redução da tumorigenicidade *in vivo* de células de carcinoma da bexiga (Ricol *et al.*, 1999), de tumor da

próstata (Feng *et al.*, 1997; Matsubara *et al.*, 1998; Yasumoto *et al.*, 2004) e de adenocarcinoma salivar (Zhang *et al.*, 2001).

Em melanomas, mutações que ocasionam perda de função de FGFR2 tem sido identificadas (Grose *et al.*, 2007; Gartside *et al.*, 2009). Grose e colaboradores em 2007, demonstraram que camundongos que perdem especificamente a isoforma IIIb de *Fgfr2* nos queratinócitos são mais sensíveis a estímulos carcinogênicos na pele e desenvolvem um aumentado número de papilomas e carcinomas quando comparados com os animais do tipo selvagem. Apesar da identificação de mutações em *FGFR2* que podem conduzir ao fenótipo de melanomas, os mecanismos pelos quais essas mutações levam ao fenótipo tumoral ainda não foram elucidados.

Nas seis linhagens tumorais analisadas, a expressão basal de *Fgfr2* só foi detectada na linhagem de fibrosarcoma Sal/N. Com isso, nossos dados reforçam a ideia de que pode ocorrer uma perda de função de FGFR2 nos tumores (Ahmad, Iwata e Leung, 2012) e que ela é mais frequentemente nos melanomas (Grose *et al.*, 2007; Gartside *et al.*, 2009). Nossos resultados também nos permite extrapolar a diminuição da expressão de *Fgfr2* relatada por Grose e colaboradores (2007), acrescentando que parece haver uma perda total da expressão desse receptor nos tumores, especialmente nos melanomas.

Após o tratamento da linhagem B16F10 de melanoma murino com rmPtx3 foi avaliada a expressão gênica de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4*. No ensaio de RT-PCR para avaliar a expressão basal dos mesmos genes, a linhagem B16F10 apresentou expressão de todos genes analisados, exceto *Fgfr2* (figura 21). Observamos uma amplificação inespecífica com aproximadamente 600 pb na análise da expressão de *Ptx3*. Os iniciadores para *Ptx3* podem amplificar o DNA genômico produzindo um produto de 623 pb. A observação dessa amplificação inespecífica sugere que nossas amostras estão contaminadas por DNA genômico. Essa hipótese pode ser comprovada pela amplificação a partir do RNA total de *Ptx3* (figura 21H), de *Fgfr3* (figura 21M) e *Gapdh* (figura 21O). Embora tenham sido observadas amplificações a partir do DNA genômico em *Ptx3* e *Fgfr3*, como elas apresentam tamanho diferente do esperado, podemos concluir que a banda observada na expressão basal são exclusivamente do cDNA como molde. Mesmo assim, embora não tenhamos feito, é necessário tratar nossas amostras com DNase, a fim de evitar essas amplificações inespecíficas.

Na análise de expressão gênica após o tratamento com Ptx3 não foi observada expressão de *Ptx3* em nenhum dos tratamentos (controle, tratado SFB e tratado Ptx3), diferentemente do resultado encontrado para expressão basal. Os resultados foram diferentes, entretanto, as

condições experimentais também foram. Para avaliar expressão basal, as células foram crescidas em SFB 10%, enquanto que para avaliar a expressão em resposta ao tratamento com Ptx3, as culturas foram privadas por 24 h de SFB. Isso nos fez levantar a hipótese de que na composição do SFB há algum componente que estimule a produção de Ptx3. Para responder essa hipótese propomos repetir os experimentos avaliando a expressão basal de Ptx3 e o efeito do tratamento ao mesmo tempo e utilizando as mesmas condições de cultivo e os mesmos reagentes. Caso encontremos que algum componente do SFB, esteja estimulando a produção de Ptx3, seria relevante saber se essa é uma indução direta ou indireta. Para tanto, poderíamos realizar experimentos de inibição da síntese proteica, seguidos pela avaliação da expressão por RT-PCR, nos quais, caso houvesse a necessidade da produção de uma proteína intermediária para produção de Ptx3, não observaríamos expressão.

Ao analisar a expressão gênica de *Fgf2* após o tratamento com Ptx3, percebemos que houve uma maior intensidade das bandas onde as células receberam SFB 10%. A produção de FGF2 pode ser estimulada em resposta a estímulos inflamatórios, como TNFA e interferon-gama (Samaniego *et al.*, 1998), porém, uma vez que observamos um aumento da expressão de *Fgf2* onde havia a presença de SFB, nossos resultados sugerem que há na composição do SFB algum fator que estimule a produção de *Fgf2*. Mais estudos seriam necessários a fim de identificar qual é esse componente. Com relação a expressão de *Fgf2* nos poços tratados ou não com Ptx3 na ausência de SFB, não foram observadas alterações.

Já a expressão de *Fgfr1*, *Fgfr3* e *Fgfr4* parece não ter sofrido influência da presença exógena de Ptx3 ou do SFB, assim como a expressão de *Fgfr2*, que era inexistente anteriormente. Todavia, nosso método de análise foi apenas qualitativo, para inferências mais precisas, com relação a ação de Ptx3 sobre a expressão gênica, são necessárias análises quantitativas através de reações de RTq-PCR.

Embora ainda preliminares, nossos dados contribuem para a caracterização do perfil de expressão gênica basal de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3*, *Fgfr4* nas linhagens tumorais murinas MC-TGS17-51 e Sal/N, de fibrosarcoma, e K1735, K1735 M2, B16F10 e B16F1 de melanoma. Eles ainda colaboram com informações qualitativas a cerca do efeito biológico de Ptx3 sobre a expressão desses genes na linhagem de melanoma murino B16F10. Para conclusões mais apuradas são necessários mais estudos e análises quantitativas. Uma vez que saber o quanto Ptx3 pode induzir ou inibir a ativação desses genes é importante para aumentar o entendimento do papel biológico de Ptx3 no processo neoplásico.

De forma geral, os achados deste trabalho, ainda que preliminares, salientam a importância de se entender a relação PTX3/FGF2 e o papel biológico desempenhado por PTX3 no câncer e contribuem para a caracterização desse papel. Além disso, novos horizontes e perspectivas de trabalho foram abertos.

5. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais dos ensaios, Ptx3 não promoveu alterações morfológicas ou no padrão de organização da proteína actina do citoesqueleto, contudo, não foi possível avaliar o seu papel na proliferação celular. Aqui, nós descrevemos de forma inédita a expressão de Ptx3 em linhagens murinas de fibrosarcomas e melanomas e também pela primeira vez, ausência de expressão do receptor de Fgfr2 em linhagens de melanoma murino. A linhagem de melanoma murino, B16F10 parece não expressar Ptx3 constitutivamente e o tratamento desta linhagem com a pentraxina recombinante não altera o perfil de expressão dos genes avaliados.

6. PERSPECTIVAS

Embora não tenhamos observado efeito direto de Ptx3 sobre a taxa de proliferação ou morfologia das células *in vitro*, nossos achados não excluem a possibilidade de que Ptx3 possa vir a ter um efeito sobre a taxa de proliferação e morfologia dos tumores causados por estas células. A massa tumoral é composta por diferentes tipos celulares, os quais compõem o estroma do tumor, dentre eles células endoteliais e inflamatórias, as quais também produzem e respondem à Ptx3 e a outros fatores que atuam no microambiente tumoral. Desta forma, são relevantes estudos *in vivo* a fim de avaliar a ação de Ptx3 sobre o desenvolvimento dos tumores. Neste sentido, nossos dados *in vitro* são importantes contribuições no entendimento das vias e dos alvos da ação de Ptx3 no estroma do tumor.

Os resultados aqui obtidos abrem novas perspectivas de pesquisas para melhor estudar a interação PTX3/FGF2 e a função de PTX3. Pretendemos avaliar a ação direta de PTX3 nos tumores induzidos experimentalmente pela inoculação das células de melanoma e sarcoma aqui estudadas transfectadas ou não com o gene *PTX3* em camundongos do tipo selvagem, *Ptx3*^{-/-} ou transgênicos carregando cópias extras do gene, sendo que caso seja inoculado as células não transfectadas, os tumores serão posteriormente tratados com rmPtx3. Também será avaliado o tratamento com um peptídeo sintético contendo a sequência N-terminal de Ptx3 correspondente ao sítio de interação com o FGF2 e 8. Os tumores serão posteriormente extraídos para análise. Nessas perspectivas de estudo, esperamos fundamentar ou não o emprego de Ptx3 como possível agente farmacológico antitumoral para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antitumorais.

A descoberta da expressão basal de Ptx3 nas linhagens tumorais murinas de fibrosarcoma e melanoma abre a perspectiva de uso de PTX3 como um potencial marcador molecular para diagnóstico e prognóstico de tumores. Pretendemos, em colaboração com o grupo de patologia investigativa do Hospital AC Camargo, em São Paulo, avaliar este uso em sarcomas.

Os sarcomas são um grupo heterogêneo de tumores mesenquimais e o seu diagnóstico representa um desafio para a medicina. Além do uso no diagnóstico diferencial, marcadores moleculares também podem contribuir para a compreensão de eventos de sinalização intracelular específico do subtipo de sarcomas e constituem potenciais fatores preditivos de resposta à quimioterapia e/ou novos alvos de terapia. Através de ensaios de *Tissue Microarray* com aproximadamente 200 amostras de diferentes tipos de sarcoma humanos e em diferentes estágios de desenvolvimento, pretendemos analisar a presença de PTX3 e fundamentar ou não o seu uso como marcador molecular para esse tipo tumoral.

Visando avaliar quantitativamente a expressão gênica em resposta a Ptx3, pretendemos realizar ensaios de reações de RT-PCR quantitativa (RTq-PCR). Para isso, iniciadores específicos já foram desenhados e sintetizados (anexo 1). Nesse caso, o objetivo é, além de avaliar os mesmos genes alvo desse estudo, investigar alterações na expressão dos genes inflamatórios *Tnfa*, *Il1b* e *Il8*, do gene indutor do processo angiogênico *Vegf* e seus receptores (*Vegfr1* e *Vegfr2*), bem como de *Fgf-binding protein*, uma proteína capaz de liberar os Fgfs da matriz extracelular e torná-los disponíveis no meio para se ligarem aos receptores. Assim, esperamos melhor caracterizar as alterações na expressão gênica provocadas por Ptx3 e contribuir de forma mais robusta para a caracterização das ações biológicas dessa proteína.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; IWATA, T.; LEUNG, H. Y. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1823, n. 4, p. 850-60, Apr 2012. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22273505> >.

ARMELIN, H. A. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 70, n. 9, p. 2702-6, Sep 1973. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4354860> >.

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> >.

BASILICO, C.; MOSCATELLI, D. The FGF family of growth factors and oncogenes. **Adv Cancer Res**, v. 59, p. 115-65, 1992. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1381547> >.

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> >.

BELOV, A. A.; MOHAMMADI, M. Molecular mechanisms of fibroblast growth factor signaling in physiology and pathology. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 6, Jun 2013. ISSN 1943-0264. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732477> >.

BONACINA, F. et al. Long pentraxin 3: experimental and clinical relevance in cardiovascular diseases. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 725102, 2013. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23690668> >.

BOTTAZZI, B. et al. The long pentraxin PTX3 as a link among innate immunity, inflammation, and female fertility. **J Leukoc Biol**, v. 79, n. 5, p. 909-12, May 2006. ISSN 0741-5400. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16478917> >.

BOTTAZZI, B. 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> >.

BOTTAZZI, B. Pentraxins as a key component of innate immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 1, p. 10-5, Feb 2006. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16343883> >.

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> >.

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> >.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532-5, Mar 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782> >.

BRYANT, D. M.; STOW, J. L. Nuclear translocation of cell-surface receptors: lessons from fibroblast growth factor. **Traffic**, v. 6, n. 10, p. 947-54, Oct 2005. ISSN 1398-9219. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138907> >.

CAMOZZI, M. et al. Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. **J Biol Chem**, v. 281, n. 32, p. 22605-13, Aug 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16769728> >.

CHELLAIAH, A. T. et al. Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. **J Biol Chem**, v. 269, n. 15, p. 11620-7, Apr 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512569> >.

CHESE, M. et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. **Nat Genet**, v. 16, n. 3, p. 260-4, Jul 1997. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9207791> >.

CLARK, J. C. et al. FGF-10 disrupts lung morphogenesis and causes pulmonary adenomas in vivo. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 280, n. 4, p. L705-15, Apr 2001. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238011> >.

DANIELE, G. et al. FGF receptor inhibitors: role in cancer therapy. **Curr Oncol Rep**, v. 14, n. 2, p. 111-9, Apr 2012. ISSN 1534-6269. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22311684> >.

DEBAN, L. et al. Pentraxins in innate immunity: lessons from PTX3. **Cell Tissue Res**, v. 343, n. 1, p. 237-49, Jan 2011. ISSN 1432-0878. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683616> >.

DEBAN, L. 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> >.

DI MARTINO, E.; TOMLINSON, D. C.; KNOWLES, M. A. A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. **Adv Urol**, v. 2012, p. 429213, 2012. ISSN 1687-6377. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22899908> >.

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> >.

DIEZ DE MEDINA, S. G. et al. Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional cell bladder carcinomas. **Oncogene**, v. 14, n. 3, p. 323-30, Jan 1997. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018118> >.

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> >.

DONI, A. et al. The long pentraxin 3 is a soluble and cell-associated component of the human semen. **Int J Androl**, v. 32, n. 3, p. 255-64, Jun 2009. ISSN 1365-2605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18179560> >.

DONI, A. Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 10, p. 2886-93, Oct 2003. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14515272> >.

DOSHI, R.; DAY, P. J.; TIRELLI, N. Dissolved oxygen alteration of the spectrophotometric analysis and quantification of nucleic acid solutions. **Biochem Soc Trans**, v. 37, n. Pt 2, p. 466-70, Apr 2009. ISSN 1470-8752. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19290883> >.

EFREMOV, Y. M. et al. Mechanical properties of fibroblasts depend on level of cancer transformation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1843, n. 5, p. 1013-9, May 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530505> >.

EISENBERG, E.; LEVANON, E. Y. Preferential attachment in the protein network evolution. **Phys Rev Lett**, v. 91, n. 13, p. 138701, Sep 2003. ISSN 0031-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14525344> >.

EZZAT, S. et al. Targeted expression of a human pituitary tumor-derived isoform of FGF receptor-4 recapitulates pituitary tumorigenesis. **J Clin Invest**, v. 109, n. 1, p. 69-78, Jan 2002. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11781352> >.

FENG, S. et al. Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. **Cancer Res**, v. 57, n. 23, p. 5369-78, Dec 1997. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393762> >.

FIDLER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer Res**, v. 35, n. 1, p. 218-24, Jan 1975. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1109790> >.

FLETCHER, D. A.; MULLINS, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 485-92, Jan 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20110992> >.

FLISER, D. et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 9, p. 2600-8, Sep 2007. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17656479> >.

FREIER, K. et al. Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Oral Oncol**, v. 43, n. 1, p. 60-6, Jan 2007. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807070> >.

FUCHS, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol**, v. 176, n. 2, p. 231-41, Jan 2007. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17210947> >.

FUJII, T.; KUWANO, H. Regulation of the expression balance of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 by Shh and FGF-2. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 46, n. 6, p. 487-91, Jun 2010. ISSN 1543-706X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112075> >.

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> >.

GARLANDA, C. Pentraxins and atherosclerosis: the role of PTX3. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 1, p. 38-46, 2011. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21226667> >.

GARLANDA, C. 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> >.

GARLANDA, C. 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> >.

GARTSIDE, M. G. et al. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. **Mol Cancer Res**, v. 7, n. 1, p. 41-54, Jan 2009. ISSN 1541-7786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19147536> >.

GERMANO, G. et al. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. **Cancer Res**, v. 70, n. 6, p. 2235-44, Mar 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20215499> >.

GOLDFARB, M. et al. Fibroblast growth factor homologous factors control neuronal excitability through modulation of voltage-gated sodium channels. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 449-63, Aug 2007. ISSN 0896-6273. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17678857> >.

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> >.

GOSPODAROWICZ, D.; GREENE, G.; MORAN, J. Fibroblast growth factor can substitute for platelet factor to sustain the growth of Balb/3T3 cells in the presence of plasma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 65, n. 2, p. 779-87, Jul 1975. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1170869> >.

GOSPODAROWICZ, D.; MORAN, J. S. Mitogenic effect of fibroblast growth factor on early passage cultures of human and murine fibroblasts. **J Cell Biol**, v. 66, n. 2, p. 451-7, Aug 1975. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1170180> >.

GOSPODAROWICZ, D.; WESEMAN, J.; MORAN, J. Presence in brain of a mitogenic agent promoting proliferation of myoblasts in low density culture. **Nature**, v. 256, n. 5514, p. 216-9, Jul 1975. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239350> >.

GOWARDHAN, B. et al. Evaluation of the fibroblast growth factor system as a potential target for therapy in human prostate cancer. **Br J Cancer**, v. 92, n. 2, p. 320-7, Jan 2005. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15655558> >.

GROSE, R. et al. The role of fibroblast growth factor receptor 2b in skin homeostasis and cancer development. **EMBO J**, v. 26, n. 5, p. 1268-78, Mar 2007. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304214> >.

HALABAN, R. et al. bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. **Oncogene Res**, v. 3, n. 2, p. 177-86, Sep 1988. ISSN 0890-6467. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3226725> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

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 2004. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15165853> >.

HE, X.; HAN, B.; LIU, M. Long pentraxin 3 in pulmonary infection and acute lung injury. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 292, n. 5, p. L1039-49, May 2007. ISSN 1040-0605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277044> >.

HUANG, Z. et al. A better anti-diabetic recombinant human fibroblast growth factor 21 (rhFGF21) modified with polyethylene glycol. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20669, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673953> >.

INAGAKI, T. et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. **Cell Metab**, v. 5, n. 6, p. 415-25, Jun 2007. ISSN 1932-7420. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550777> >.

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> >.

INFORZATO, A. The long pentraxin PTX3 at the crossroads between innate immunity and tissue remodelling. **Tissue Antigens**, v. 77, n. 4, p. 271-82, Apr 2011. ISSN 1399-0039. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21388349> >.

INFORZATO, A. 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> >.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **J Biochem**, v. 149, n. 2, p. 121-30, Feb 2011. ISSN 1756-2651. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940169> >.

JAAKKOLA, S. et al. Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. **Int J Cancer**, v. 54, n. 3, p. 378-82, May 1993. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099571> >.

JACQUEMIER, J. et al. Expression of the FGFR1 gene in human breast-carcinoma cells. **Int J Cancer**, v. 59, n. 3, p. 373-8, Nov 1994. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927944> >.

JAILLON, S. et al. Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 3, p. 465-74, Mar 2009. ISSN 1476-5403. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079137> >.

JAILLON, S. 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> >.

JEANNIN, P. et al. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. **Immunity**, v. 22, n. 5, p. 551-60, May 2005. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894273> >.

JEFFERS, M.; LAROCHELLE, W. J.; LICHENSTEIN, H. S. Fibroblast growth factors in cancer: therapeutic possibilities. **Expert Opin Ther Targets**, v. 6, n. 4, p. 469-82, Aug 2002. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12223061> >.

JOHNSON, D. E.; WILLIAMS, L. T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. **Adv Cancer Res**, v. 60, p. 1-41, 1993. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8417497> >.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **HISTOLOGIA BÁSICA**. 12. 2013.

KATIRA, P.; ZAMAN, M. H.; BONNECAZE, R. T. How changes in cell mechanical properties induce cancerous behavior. **Phys Rev Lett**, v. 108, n. 2, p. 028103, Jan 2012. ISSN 1079-7114. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22324713> >.

KLOUCHE, M. et al. Human herpesvirus 8-derived viral IL-6 induces PTX3 expression in Kaposi's sarcoma cells. **AIDS**, v. 16, n. 8, p. F9-18, May 2002. ISSN 0269-9370. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12004288> >.

KRIPKE, M. L. Speculations on the role of ultraviolet radiation in the development of malignant melanoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 63, n. 3, p. 541-8, Sep 1979. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/112311> >.

KUMAR, S.; WEAVER, V. M. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. **Cancer Metastasis Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 113-27, Jun 2009. ISSN 1573-7233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153673> >.

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> >.

KWABI-ADDO, B.; OZEN, M.; ITTMANN, M. The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 11, n. 4, p. 709-24, Dec 2004. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613447> >.

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> >.

LEALI, D. 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> >.

LEALI, D. 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> >.

LEALI, D. 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. 696-703, Mar 2012. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267482> >.

LEE, G. W. et al. Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. **J Immunol**, v. 153, n. 8, p. 3700-7, Oct 1994. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523502> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2183014> >.

LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v. 141, n. 7, p. 1117-34, Jun 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20602996> >.

LEUNG, H. Y.; GULLICK, W. J.; LEMOINE, N. R. Expression and functional activity of fibroblast growth factors and their receptors in human pancreatic cancer. **Int J Cancer**, v. 59, n. 5, p. 667-75, Dec 1994. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7960240> >.

LI, Q. S. et al. AFM indentation study of breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 374, n. 4, p. 609-13, Oct 2008. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18656442> >.

LIN, E. Y. et al. Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. **Mol Oncol**, v. 1, n. 3, p. 288-302, Dec 2007. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509509> >.

MAKALE, M. Cellular mechanobiology and cancer metastasis. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 81, n. 4, p. 329-43, Dec 2007. ISSN 1542-9768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228263> >.

MANTOVANI, A. et al. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. **J Clin Immunol**, v. 28, n. 1, p. 1-13, Jan 2008. ISSN 0271-9142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828584> >.

MANTOVANI, A. 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> >.

MAREK, L. et al. Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non-small-cell lung cancer cells. **Mol Pharmacol**, v. 75, n. 1, p. 196-207, Jan 2009. ISSN 1521-0111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18849352> >.

MARQUES, M. M. **Modulação da expressão de genes pela pentraxina 3**. 2008.

MATSUBARA, A. et al. Inhibition of growth of malignant rat prostate tumor cells by restoration of fibroblast growth factor receptor 2. **Cancer Res**, v. 58, n. 7, p. 1509-14, Apr 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9537256> >.

MELO, A. D. S. R. D. B. D. **Papel da proteína quinase D e cortactina na invasão celular por amastigotas extracelulares de Trypanosoma cruzi** 2010.

MEYER, K. B. et al. Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. **PLoS Biol**, v. 6, n. 5, p. e108, May 2008. ISSN 1545-7885. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18462018> >.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, Jul 2006. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822996> >.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, I. N. C. A. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil** 2014.

MOHAMMADI, M.; OLSEN, S. K.; IBRAHIMI, O. A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 107-37, Apr 2005. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863029> >.

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 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682> >.

MOYERS, J. S. et al. Molecular determinants of FGF-21 activity-synergy and cross-talk with PPARgamma signaling. **J Cell Physiol**, v. 210, n. 1, p. 1-6, Jan 2007. ISSN 0021-9541. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063460> >.

NAIMI, B. et al. Down-regulation of (IIIb) and (IIIc) isoforms of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) is associated with malignant progression in human prostate. **Prostate**, v. 52, n. 3, p. 245-52, Aug 2002. ISSN 0270-4137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12111699> >.

NAKAZAWA, K.; YASHIRO, M.; HIRAKAWA, K. Keratinocyte growth factor produced by gastric fibroblasts specifically stimulates proliferation of cancer cells from scirrhous gastric carcinoma. **Cancer Res**, v. 63, n. 24, p. 8848-52, Dec 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695201> >.

NASKI, M. C.; ORNITZ, D. M. FGF signaling in skeletal development. **Front Biosci**, v. 3, p. d781-94, 1998. ISSN 1093-9946. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9683641> >.

NASKI, M. C. et al. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. **Nat Genet**, v. 13, n. 2, p. 233-7, Jun 1996. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8640234> >.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. 2011.

NICKEL, W. Pathways of unconventional protein secretion. **Curr Opin Biotechnol**, v. 21, n. 5, p. 621-6, Oct 2010. ISSN 1879-0429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637599> >.

NORATA, G. D. et al. Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, n. 5, p. 925-31, May 2008. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18218986> >.

NUGENT, M. A.; IOZZO, R. V. Fibroblast growth factor-2. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 32, n. 2, p. 115-20, Feb 2000. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10687947> >.

OLSEN, S. K. et al. Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding promiscuity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 4, p. 935-40, Jan 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732692> >.

OLSON, M. F.; SAHAI, E. The actin cytoskeleton in cancer cell motility. **Clin Exp Metastasis**, v. 26, n. 4, p. 273-87, 2009. ISSN 1573-7276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18498004> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508513> >.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. **Genome Biol**, v. 2, n. 3, p. REVIEWS3005, 2001. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276432> >.

ORNITZ, D. M. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. **J Biol Chem**, v. 271, n. 25, p. 15292-7, Jun 1996. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663044> >.

PARADISO, B.; ZUCCHINI, S.; SIMONATO, M. Implication of fibroblast growth factors in epileptogenesis-associated circuit rearrangements. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 152, 2013. ISSN 1662-5102. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062643> >.

PARK, S. et al. Cell motility and local viscoelasticity of fibroblasts. **Biophys J**, v. 89, n. 6, p. 4330-42, Dec 2005. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199496> >.

PENAULT-LLORCA, F. et al. Expression of FGF and FGF receptor genes in human breast cancer. **Int J Cancer**, v. 61, n. 2, p. 170-6, Apr 1995. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705943> >.

PEPPER, M. S. et al. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 189, n. 2, p. 824-31, Dec 1992. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281999> >.

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. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12813013> >.

PERRIER, P. et al. Distinct transcriptional programs activated by interleukin-10 with or without lipopolysaccharide in dendritic cells: induction of the B cell-activating chemokine, CXC chemokine ligand 13. **J Immunol**, v. 172, n. 11, p. 7031-42, Jun 2004. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153525> >.

POLLOCK, P. M. et al. Frequent activating FGFR2 mutations in endometrial carcinomas parallel germline mutations associated with craniosynostosis and skeletal dysplasia syndromes. **Oncogene**, v. 26, n. 50, p. 7158-62, Nov 2007. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525745> >.

POPOVICI, R. M. et al. The long pentraxin PTX3 in human endometrium: regulation by steroids and trophoblast products. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1136-43, Mar 2008. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18048494> >.

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> >.

PRESTA, M. 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> >.

RADMACHER, M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope. **Methods Cell Biol**, v. 68, p. 67-90, 2002. ISSN 0091-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12053741> >.

RAND, V. et al. Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 40, p. 14344-9, Oct 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16186508> >.

RAVENNA, L. et al. Up-regulation of the inflammatory-reparative phenotype in human prostate carcinoma. **Prostate**, v. 69, n. 11, p. 1245-55, Aug 2009. ISSN 1097-0045. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19444819> >.

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. **Avaliação do papel da Proteína PTX3 na Lesão Pulmonar Induzida pela Ventilação Mecânica** 2010.

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> >.

RICOL, D. et al. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 51, p. 7234-43, Dec 1999. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602477> >.

ROFSTAD, E. K.; HALSØR, E. F. Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. **Cancer Res**, v. 60, n. 17, p. 4932-8, Sep 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10987309> >.

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> >.

RONCA, R. Long pentraxin-3 inhibits epithelial-mesenchymal transition in melanoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, n. 12, p. 2760-71, Dec 2013. ISSN 1538-8514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130051> >.

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> >.

SAHADEVAN, K. et al. Selective over-expression of fibroblast growth factor receptors 1 and 4 in clinical prostate cancer. **J Pathol**, v. 213, n. 1, p. 82-90, Sep 2007. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17607666> >.

SAMANIEGO, F. et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. **Am J Pathol**, v. 152, n. 6, p. 1433-43, Jun 1998. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9626048> >.

SERAFIM, T. L. et al. Sanguinarine cytotoxicity on mouse melanoma K1735-M2 cells--nuclear vs. mitochondrial effects. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 11, p. 1459-75, Dec 2008. ISSN 1873-2968. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18692024> >.

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> >.

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> >.

SPEECKAERT, M. M. et al. Biology of human pentraxin 3 (PTX3) in acute and chronic kidney disease. **J Clin Immunol**, v. 33, n. 5, p. 881-90, Jul 2013. ISSN 1573-2592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443958> >.

TAFANI, M. et al. Up-regulation of pro-inflammatory genes as adaptation to hypoxia in MCF-7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment. **Cancer Sci**, v. 101, n. 4, p. 1014-23, Apr 2010. ISSN 1349-7006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20151982> >.

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 1474-1768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20094046> >.

UBOLDI, S. et al. Characterization of a new trabectedin-resistant myxoid liposarcoma cell line that shows collateral sensitivity to methylating agents. **Int J Cancer**, v. 131, n. 1, p. 59-69, Jul 2012. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21805478> >.

VAN RHIJN, B. W. et al. Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders. **Eur J Hum Genet**, v. 10, n. 12, p. 819-24, Dec 2002. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12461689> >.

VASILIEV, J. M. Cytoskeletal mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells. **Int J Dev Biol**, v. 48, n. 5-6, p. 425-39, 2004. ISSN 0214-6282. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15349817> >.

WANG, J. K.; GOLDFARB, M. Amino acid residues which distinguish the mitogenic potentials of two FGF receptors. **Oncogene**, v. 14, n. 15, p. 1767-78, Apr 1997. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150382> >.

WESCHE, J.; HAGLUND, K.; HAUGSTEN, E. M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. **Biochem J**, v. 437, n. 2, p. 199-213, Jul 2011. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21711248> >.

WILKIE, A. O. Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 16, n. 2, p. 187-203, Apr 2005. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863034> >.

WILKIE, A. O. et al. FGFs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations. **Am J Med Genet**, v. 112, n. 3, p. 266-78, Oct 2002. ISSN 0148-7299. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12357470> >.

WILLEKE, F. et al. Overexpression of a member of the pentraxin family (PTX3) in human soft tissue liposarcoma. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 15, p. 2639-46, Oct 2006. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959485> >.

WITSCH, E.; SELA, M.; YARDEN, Y. Roles for growth factors in cancer progression. **Physiology (Bethesda)**, v. 25, n. 2, p. 85-101, Apr 2010. ISSN 1548-9221. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430953> >.

YAMAGUCHI, F. et al. Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 2, p. 484-8, Jan 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8290551> >.

YAMAYOSHI, T. et al. Expression of keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7 and its receptor in human lung cancer: correlation with tumour proliferative activity and patient prognosis. **J Pathol**, v. 204, n. 1, p. 110-8, Sep 2004. ISSN 0022-3417. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307144> >.

YASUMOTO, H. et al. Restoration of fibroblast growth factor receptor2 suppresses growth and tumorigenicity of malignant human prostate carcinoma PC-3 cells. **Prostate**, v. 61, n. 3, p. 236-42, Nov 2004. ISSN 0270-4137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15368475> >.

ZHANG, X. et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. **J Biol Chem**, v. 281, n. 23, p. 15694-700, Jun 2006. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597617> >.

ZHANG, Y. et al. Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 20, p. 11336-40, Sep 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11562460> >.

Anexo I

Nesse trabalho, foram avaliadas alterações qualitativas na expressão gênica de *Ptx3*, *Fgf2*, *Fgfr1*, *Fgfr2*, *Fgfr3* e *Fgfr4* induzidas pela proteína Ptx3. Entretanto, para respostas mais esclarecedoras, pretendemos fazer análises quantitativas da expressão desses genes por RTq-PCR. Além desses genes, será avaliada também a expressão de *Fgf8*, que também tem suas atividades biológicas inibidas por Ptx3, dos genes inflamatórios *Il1b* e *Tnfa*, de *Fgfbp*, uma proteína de ligação a Fgf que o libera da matriz extracelular e o torna disponível para se ligar ao receptor, e também do fator angiogênico *Vegf* e seus receptores após o tratamento com Ptx3. Os iniciadores específicos para amplificação desses genes já foram desenhados e sintetizados (tabela 5). O desenho desses iniciadores seguiu os mesmos critérios utilizados para o desenho dos iniciadores para as reações de RT-PCR: o desenho em regiões de junção de éxons, o tamanho do iniciador entre 17 e 25 pb; a porcentagem de CG entre 40-60%; e temperatura de anelamento entre 57 e 63 °C, a abrangência do máximo de isoformas. Entretanto, diferentemente dos iniciadores de RT-PCR, o tamanho do produto gerado deveria apresentar entre 70 e 150 pb.

Amostra	Sequência do Iniciador	Tamanho do Produto (pb)	Éxon
Ptx3	Fw: TGCCCGCAGGTTGTGAAAC	132	Entre 2 e 3
	Rv: ATACATCTGTGGCTTTGACCCAA		3
Fgf2	Fw: CGACCCACACGTCAAACACTACA	72	Entre 2 e 3
	Rv: TTGGCACACACTCCCTTGAT		3
Fgf8	Fw: TGGAAGCAGAGTCCGAGTTC	93	5
	Rv: CCTTTGCCGTTGCTCTTGG		Entre 5 e 6
Fgfr1	Fw: CTACAAGGTTGCTATGCCA	91	Entre 5 e 6
	Rv: CTCATTCTCCACGATGCAGGT		6
Fgfr2	Fw: GGAGACAGGTAACAGTTTCGG	75	10
	Rv: GCGTTGTTATCCTCACCAGC		Entre 10 e 11
Fgfr3	Fw: TGCTGAAAGATGATGCGACT	93	Entre 12 e 13
	Rv: AATGATGTTCTTGTGCTTGCCA		13
Fgfr4	Fw: CTGCTTTGGGCAAGTGGTTC	107	11
	Rv: TGTCGGAGGCATTGICTTICA		Entre 11 e 12
Fgfbp	Fw: CACACTCACAGAAAGGTGTCC	127	Entre 1 e 2
	Rv: GGTGCGTTCCTTGGCTCTCTT		2
Tnfa	Fw: CGTCGTAGCAAACCACCAAG	145	Entre 3 e 4
	Rv: GAGAACCTGGGAGTAGACAAGG		4
Il1b	Fw: AATGCCACCTTTTGACAGTGA	74	Entre 2 e 3
	Rv: AGCAGCCCTTCATCTTTTGGG		Entre 3 e 4
Vegfa	Fw: AGACAGAACAAAGCCAGAAAATCAC	82	Entre 5 e 7
	Rv: CACGTCTGCGGATCTTGGAC		7
Vegfr1	Fw: TGAGCCTGGAAAGAATCAAAACC	73	28
	Rv: AGCTGATAGTCCTCAAACATGGAG		Entre 28 e 29
Vegfr2	Fw: CACTACCCAGAAATGTACCAGA	95	Entre 25 e 26
	Rv: TTCCCAAATGCTCCACCAAC		26
Gapdh	Fw: AGGTCGGTGTGAACGGATTT	150	Entre 2 e 3
	Rv: TGCCGTGAGTGGAGTCATAC		3
Hppt	Fw: CAGTCCCAGCGTCGTGATTA	94	Entre 1 e 2
	Rv: CACTTTTTCCAAATCCTCGGCA		2

Tabela 5- Iniciadores desenhados para expressão gênica por RTq-PCR.

A tabela mostra a sequência dos iniciadores específicos para expressão gênica por RTq-PCR, onde Fw representa o iniciador *forward* e Rv o *reverse*, o tamanho do produto gerado em pares de bases e o éxon em que eles se anelam.