

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PENTRAXINA 3 EM
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

ORIENTADO: João Paulo Silva Nunes

ORIENTADORA: Prof. Dra. Adriana Abalen Martins Dias

BELO HORIZONTE

Fevereiro 2014

JOÃO PAULO SILVA NUNES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PENTRAXINA 3 EM
LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS**

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

ORIENTADORA: Prof. Dra. Adriana Abalen Martins Dias

BELO HORIZONTE

Fevereiro 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que sempre me apoiam – incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Há, de fato, muitos a quem agradecer. Inicialmente agradeço aos meus familiares, principalmente ao meu pai Jeferson da Costa Nunes e a minha mãe Neusa Araújo Silva Nunes por todo o apoio, pela crença e pela confiança. Não há sustentação sem o apoio deles.

Em seguida agradeço imensamente a minha orientadora Adriana Abalen. E que orientadora. Atenciosa, paciente, prestativa, intelectualíssima... uma verdadeira orientadora. Aprendi muito, meu mestrado não seria o mesmo sem você. Muito obrigado.

A senhorita Joyce Esposito de Souza ♥ - valeu, mana. Por se fazer presente, me fazer aprender, me fazer acreditar no desconhecido. E por, claro... ter me ajudado na revisão da versão final!

Aos companheiros de laboratório Priscila Fabiana, Flávia Santiago e Leonardo Dourado, pelos momentos de descontração e discussão, de trollagens e de apoio (nisso a Joyce se inclui... em ambos).

Aos amigos Guilherme Dias e Leonardo Lima por terem sido os primeiros alunos de pós-graduação com quem convivi aqui em Minas.

Às pesquisadoras Cecilia Garlanda e Barbara Bottazzi, da Fondazione Humanitas per la Ricerca, por nos terem cedido a proteína PTX3 recombinante e pela colaboração que viabilizou a realização do trabalho.

Aos professores Diana Bahia e Renato Mortara (UNIFESP) e ao Alexis Bonfim, pela colaboração nos experimentos de imunofluorescência e pela oportunidade que me deram de conhecer a UNIFESP.

Aos professores Erna Geessien, Paulo César Ferreira, Cláudio Bonjardim, Giliane Trindade e Jonatas Abrahão, em especial às alunas Ana, Flávia, Andrea e Paula que nos cederam a infraestrutura do laboratório de Vírus.

À Professora Maria Bernadete e Eduardo Tarazona do LDGH e professor Vasco Azevedo e Anderson Miyoshi do LGCM, em especial às alunas Renata Buzatti, Karina Santana e Natayme Tartaglia pelo auxílio no uso dos equipamentos.

Aos professores Eduardo Tarazona e Ana Lúcia pela coordenação da pós-graduação em genética.

À Mary das Graças e à Enaile pelos serviços prestados na secretaria da pós.

Aos professores Álvaro Nunes, Diana Bahia e Anderson Miyoshi por gentilmente aceitarem compor minha banca de defesa desta dissertação.

À FAPEMIG e à PRPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Lista de abreviaturas | i |
| Lista de figuras | iv |
| Lista de tabelas | vi |
| Resumo | vii |
| Abstract | viii |
| 1 Introdução | 9 |
| 1.1 Pentraxinas..... | 11 |
| 1.2 A Pentraxina 3 (PTX3) | 13 |
| 1.3 PTX3: ligantes e funções | 17 |
| 1.4 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) | 18 |
| 1.5 PTX3 e interação com FGF2 e FGF8..... | 23 |
| 2 Justificativa | 25 |
| 3 Objetivos | 27 |
| 3.1 Objetivo geral | 27 |
| 3.2 Objetivos específicos | 27 |
| 4 Material e métodos..... | 28 |
| 4.1 Proteína PTX3 recombinante humana | 28 |
| 4.2 Linhagens celulares..... | 28 |
| 4.3 Expansão e criopreservação das linhagens tumorais humanas | 30 |
| 4.4 Curva de crescimento das linhagens tumorais..... | 31 |
| 4.5 Proliferação celular..... | 31 |
| 4.5.1 Ensaio MTT | 32 |
| 4.5.2 Ensaio Azul de Tripán..... | 34 |
| 4.6 Morfologia celular..... | 35 |
| 4.6.1 Microscopia ótica | 35 |
| 4.6.2 Imunofluorescência..... | 35 |
| 4.7 Extração de RNA e transcrição reversa | 37 |
| 4.7.1 Extração do RNA total | 37 |
| 4.7.2 Transcrição reversa..... | 38 |
| 4.7.3 Construção de iniciadores..... | 39 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.8 | Análise da expressão gênica basal..... | 41 |
| 4.9 | Análise estatística..... | 43 |
| 5 | Resultados | 44 |
| 5.1 | Características morfológicas das linhagens celulares..... | 44 |
| 5.2 | Curva de crescimento das células..... | 48 |
| 5.3 | Avaliação das alterações na taxa de proliferação celular das linhagens em resposta ao tratamento com rhPTX3 | 51 |
| 5.4 | Avaliação das alterações no citoesqueleto das linhagens HT 1080, HCT 116, SK-MEL 37 promovidas pelo tratamento das mesmas com rhPTX3..... | 54 |
| 5.5 | Análise do perfil de expressão basal dos genes | 59 |
| 5.5.1 | Desenho dos iniciadores..... | 59 |
| 5.5.2 | Extração, quantificação e análise da qualidade do RNA total..... | 62 |
| 5.5.3 | Avaliação da qualidade da transcrição reversa | 65 |
| 5.5.4 | Análise da expressão gênica basal | 67 |
| 6 | Discussão..... | 72 |
| 7 | Conclusões..... | 83 |
| 8 | Referências | 84 |
| | ANEXO I | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| Sigla | Definição Inglês | Definição Português |
|-----------------------|---|---|
| % | <i>Percent</i> | Porcentagem |
| °C | <i>Degree Celsius</i> | Graus Celsius |
| AKT1 | <i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i> | - |
| AP1 | <i>Activator protein 1</i> | Proteína ativadora 1 |
| AP2 | <i>Activator protein 2</i> | Proteína ativadora 2 |
| ATCC | <i>American Type Culture Colection</i> | Coleção Americana de Culturas |
| BAD | <i>BCL-2 antagonist of cell death</i> | - |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> | Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico |
| bp | <i>Base pair</i> | Par de bases |
| BrEt | <i>Ethidium Bromide</i> | Brometo de etídio |
| C- | <i>carboxyl-terminus</i> | Extremidade carboxi terminal |
| cDNA | <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> | Ácido desoxirribonucleico Complementar |
| CHO | <i>Chinese hamster ovary</i> | Ovário de hamter chinês |
| CO₂ | <i>Carbon dioxide</i> | Dióxido de carbono |
| CRP | <i>C-reactive Protein</i> | Proteína C reativa |
| DAPI | <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> | Cloridrato de 4',6-diamindino-2-fenilindol |
| DEPC | <i>Diethylpyrocarbonate</i> | Dietil pirocarbonato |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> | Meio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | <i>Dimethyl sulfoxide</i> | Dimetil sulfóxido |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> | Acido desoxirribonucleico |
| dNTP | <i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i> | Desoxirribonucleotídeos fosfatados |
| EDTA | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| FBS | <i>Fetal Bovine Serum</i> | Soro fetal bovino |
| FGF | <i>Fibroblast Growth Factor</i> | Fator de crescimento de fibroblasto |
| FGF2 | <i>Fibroblast growth factor 2</i> | Fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 |
| FGFBP | <i>Fibroblast growth factor binding protein</i> | Proteína de ligação a fator de crescimento de fibroblasto |
| FGFR | <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> | Receptor de fator de crescimento de fibroblasto |
| FOS | <i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i> | - |
| FRS2A | <i>Fibroblast growth factor receptor substrate 2</i> | - |
| GAB1 | <i>GRB2-associated binding protein 1</i> | - |
| GAPDH | <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |

| | | |
|-------------------------|---|---|
| GAS | <i>Interferon-Gamma Activated Sequence</i> | - |
| GRB2 | <i>Growth factor receptor-bound 2</i> | - |
| HCl | <i>Hydrochloric acid</i> | Ácido clorídrico |
| HCT | <i>Human Colon Tumor</i> | Tumor de cólon humano |
| HPRT1 | <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i> | Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase |
| HSPG | <i>Heparan Sulfate Proteoglycan</i> | Proteoglicanos de Heparano Sulfatos |
| HT | <i>Human Tumor</i> | Tumor Humano |
| IFNG | <i>Interferon gama</i> | Interferon gama |
| IgG | <i>Immunoglobulin G</i> | Imunoglobulina G |
| IL1B | <i>Interleukin-1 beta</i> | Interleucina 1, beta |
| kDa | <i>Kilodalton</i> | Quilo Dalton |
| LAL | <i>Limulus ameobocyte lysate assay</i> | - |
| LGEX | - | Laboratório de Genética Experimental |
| LPS | <i>Lipopolysaccharide</i> | Lipopolissacarídeo |
| M | <i>Molar</i> | Molar |
| MAPK | <i>Mitogen activated protein kinase</i> | - |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinase</i> | Proteína quinase ativada por mitógenos |
| MgCl₂ | <i>Magnesium chloride</i> | Cloreto de Magnésio |
| ml | <i>Milliliter</i> | Millilitro |
| mM | <i>Milimolar</i> | Milimolar |
| MTT | <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> | Metil-tiazol Tetrazólio |
| N- | <i>amino-terminus</i> | Extremidade amino terminal |
| NaN₃ | <i>Sodium azide</i> | Azida sódica |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> | Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia |
| NFAT | <i>nuclear factor of activated T cells</i> | |
| NFkB | <i>Nuclear Factor kappa B</i> | Fator nuclear kappa B |
| ng | <i>Nanogram</i> | Nanograma |
| nm | <i>Nanometer</i> | Nanômetro |
| NP1 | <i>Neuronal pentraxin 1</i> | Pentraxina neural 1 |
| NP2 | <i>Neuronal pentraxin 2</i> | Pentraxina neural 2 |
| NPR | <i>Neuronal pentraxin receptor</i> | |
| OmpA | <i>Outer membrane protein A</i> | Proteína A da membrana externa |
| PAMP | <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> | Moléculas padrões associadas a patógenos |
| PBS | <i>Phosphate buffered saline</i> | Solução salina tamponada com fosfato |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> | Reação em cadeia de polimerase |
| PFA | <i>Paraformaldehyde</i> | Paraformaldeído |
| PGN | <i>PBS containing 0.2% gelatina and 0.1% NaN₃</i> | PBS contendo 0,25% gelatina e 0,1% NaN ₃ |
| pH | <i>Potential of hydrogen</i> | Potencial hidrogeniônico |
| PLCY1 | <i>Phospholipase Cy1</i> | fosfolipase Cy1 |

| | | |
|-----------------|--|--|
| PPD | <i>p-Phenylenediamine</i> | p-fenilenodiamina |
| PRM | <i>Pattern recognition molecules</i> | Moléculas de reconhecimento de padrões |
| PTX3 | <i>Pentraxin 3</i> | Pentraxina 3 |
| PTX4 | <i>Pentraxin 4</i> | Pentraxina 4 |
| qPCR | <i>Quantitative Polymerase chain reaction</i> | Reação em cadeia de polimerase quantitativa |
| rhPTX3 | <i>Recombinant Human Pentraxin 3</i> | Pentraxina 3 recombinante humana |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> | Ácido ribonucleico |
| rpm | <i>Revolutions per minute</i> | Rotações por minuto |
| RT | <i>Reverse transcription</i> | Transcriptase reversa |
| RTK | <i>Receptor tyrosine kinase</i> | Receptor tirosina quinase |
| SAP | <i>Serum Amyloid P component,</i> | Componente soro amilóide P |
| SDS | <i>Sodium dodecyl sulfate</i> | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | <i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> | - |
| SK-MEL | <i>Sloan-Kettering's Melanoma</i> | Melanoma do centro de câncer Sloan-Kettering |
| SP1 | <i>specificity protein 1</i> | Proteína de especificidade 1 |
| TAE | <i>Tris Acetate EDTA</i> | Tris acetato EDTA |
| TNFA | <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> | Fator de necrose tumoral alfa |
| Tris | <i>Trisaminomethane</i> | Tris(hidroximetil)aminometano |
| TRITC | <i>Tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate</i> | Tetrametilrodamina B isotiocianato |
| TSG14 | <i>TNF-inducible gene 14</i> | Gene 14 induzido por TNF |
| UFMG | - | Universidade Federal de Minas Gerais |
| V | <i>Volt</i> | Volt |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> | Fator de crescimento endotelial vascular |
| VEGFR | <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i> | Receptor de fator de crescimento endotelial vascular |
| µg | <i>Microgram</i> | Micrograma |
| µl | <i>Microliter</i> | Microlitro |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Braço Humoral e celular da imunidade inata | 10 |
| Figura 2. Estrutura proteica das pentraxinas | 12 |
| Figura 3. Estrutura do gene PTX3 em humanos e camundongos. | 14 |
| Figura 4. Detalhes da estrutura proteica de PTX3. | 15 |
| Figura 5. Modelo proposto para a disposição das subunidades dos protômeros de PTX3. | 16 |
| Figura 6. Estrutura do FGFR e especificidade do ligante. | 21 |
| Figura 7. Sinalização mediada pelo sistema FGF-FGFR..... | 22 |
| Figura 8. Efeito de PTX3 na formação do complexo ternário HSPG/FGF2/FGFR..... | 24 |
| Figura 9. Aspecto da cultura de células HT 1080 tratadas com MTT..... | 33 |
| Figura 10. Esquema da placa montada para realização dos ensaios de proliferação celular. | 34 |
| Figura 11.1 Aspectos morfológicos das células tumorais cultivadas <i>in vitro</i> | 46 |
| Figura 12. Curva de crescimento das linhagens tumorais humanas HT 1080, SAOS 2, SW 480 e HCT 116 na presença de 0,5% e 10% de FBS..... | 49 |
| Figura 13. Curva de crescimento das linhagens tumorais humanas CACO 2, SK-MEL 188 e SK-MEL 37 na presença de 0,5% e 10% de FBS. | 50 |
| Figura 14. Aspectos da linhagem HT 1080 durante o ensaio de proliferação celular em presença de PTX3 em meio 0,5% FBS. | 52 |
| Figura 15. Análise da proliferação celular por MTT e Azul de Tripán..... | 53 |
| Figura 16.1 Fotomicrografias de fluorescência das linhagens HT 1080, SK-MEL 188 e HCT 116. | 56 |
| Figura 17. Representação da região da sequência do transcrito de PTX3 usada na construção dos iniciadores para RT- PCR. | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Exemplos de estruturas secundárias (<i>hairpins</i>) possíveis de serem formadas nos iniciadores para PTX3. | 60 |
| Figura 19. Curvas da absorvância do RNA total extraído. | 63 |
| Figura 20. Análise da integridade do RNA total extraído das culturas celulares. | 64 |
| Figura 21. Avaliação da qualidade da transcrição reversa utilizando iniciadores para NOTCH (310 bp). | 65 |
| Figura 22. Análise da qualidade da transcrição reversa usando iniciador para o gene GAPDH (437 bp)..... | 66 |
| Figura 23. Análise do perfil de expressão dos genes FGF2, FGF8, FGFR1, FGFR2, nas linhagens de células tumorais humanas. | 68 |
| Figura 24. Análise do perfil de expressão dos genes FGFR3, FGFR4, PTX3, GAPDH nas linhagens de células tumorais humanas. | 69 |
| Figura 25. Análise geral do perfil de expressão dos genes FGF2, FGF8, PTX3 FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PTGS2, CXCL5, nas linhagens de células tumorais humanas. | 70 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Características das linhagens de células tumorais humanas utilizadas. | 29 |
| Tabela 2. Critérios utilizados para a construção dos iniciadores. | 40 |
| Tabela 3. Lista dos iniciadores construídos para RT- PCR. | 61 |
| Tabela 4. Aspectos quantitativos e qualitativos do RNA total extraído das culturas celulares. | 62 |
| Tabela 5. Perfil da expressão basal dos genes FGF2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PTX3, PTGS2 e CXCL5 nas linhagens tumorais humanas. | 71 |
| Tabela 6. Lista dos iniciadores desenhados para RT-PCR em tempo real linhagens humanas utilizando os critérios como quantidade de isoformas, tamanho do amplicon e conteúdo GC. | 93 |

RESUMO

NUNES, JPS. **Avaliação do efeito biológico da pentraxina 3 em linhagens de células tumorais humanas.** Belo Horizonte; 2014 [Dissertação de mestrado].

A pentraxina 3 é uma glicoproteína de fase aguda expressa em uma grande variedade de células e que desempenha uma miríade de funções em processos biológicos associados a fertilidade feminina, imunidade inata e angiogênese. PTX3 interage seletivamente e especificamente aos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) impedindo a interação desses fatores com seus receptores específicos do tipo tirosina quinase (FGFR) presentes na membrana das células. O sistema FGF/FGFR desempenha papéis importantes em inúmeros processos tais como migração, diferenciação, sobrevivência e proliferação celulares, sendo um relevante agente pro-angiogênico que contribui para o desenvolvimento e progressão de uma variedade de condições fisiológicas e patológicas. No que se refere ao câncer, a angiogênese favorece a proliferação das células tumorais, invasão local e metástase hematogênica. A possibilidade de modular a angiogênese alterando o equilíbrio entre o balanço pró e anti-angiogênico tem, portanto, grande potencial terapêutico. Neste sentido, são relevantes as pesquisas buscando a identificação e caracterização funcional de moléculas, como PTX3, que é um antagonista natural do sistema FGF/FGFR. O objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão de PTX3 em linhagens humanas derivadas de sarcoma (HT 1080, SAOS 2), cólon (HCT 116, CACO 2 e SW 480) e melanoma (SK-MEL 37 e SK-MEL 188) bem como avaliar o seu efeito sobre a proliferação celular e perfil de expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e angiogênese nestas células. A expressão gênica foi avaliada por RT-PCR e a proliferação celular analisada pelo método MTT e por contagem de células coradas pelo Azul de Tripán. Os aspectos relacionados à morfologia foram investigados por microscopia de contraste de fase e por imunofluorescência utilizando faloidina-rodamina conjugada com TRITC para identificação da estrutura de actina-F nas células. As linhagens tumorais HT 1080, HCT 116, SK-MEL 37 e SK-MEL 188 apresentaram expressão basal tanto de FGF 2 quanto de todos os receptores para FGF (FGFR 1-4) investigados. Nenhuma das linhagens apresentou expressão basal de FGF8. Níveis basais de PTX3 foram detectados nas células HT 1080, HCT 116, SW 480 e SK-MEL 188. Resultados preliminares indicaram que PTX3 parece interferir negativamente na proliferação da linhagem de fibrosarcoma humano HT 1080. Os resultados obtidos através da análise, por imunofluorescência, sugerem que PTX3 promove alterações no citoesqueleto das células HT 1080 e HCT 116. Nas primeiras, uma aparente diminuição da abundância de filopódios foi detectada, e nas últimas, parece haver uma diminuição no número de filamentos transcelulares. Esses resultados preliminares suscitam a necessidade de aprofundamento dos estudos buscando a elucidação do papel de PTX3 nos mecanismos relacionados à migração e à proliferação celular dependentes de FGF em células tumorais humanas bem como a avaliação do potencial terapêutico de PTX3 como agente anti-angiogênico.

ABSTRACT

NUNES, JPS. **Evaluation of the biological activity of pentraxin 3 in human tumoral cell lines.** Belo Horizonte; 2014 [Master dissertation].

The pentraxin 3 is an acute phase glycoprotein expressed in a wide variety of cells and plays a myriad of roles in biological processes including female fertility, innate immunity and angiogenesis. PTX3 interacts selectively and specifically to fibroblast growth factors (FGFs) preventing the engagement of these factors with their specific tyrosine kinase receptors (FGFRs). The FGF/FGFR system plays important roles in many processes such as migration, differentiation, survival and cell proliferation, and in angiogenesis. Angiogenesis contributes to the development and progression of a variety of physiological and pathological conditions. In cancer, the formation of new vascular channels favors the proliferation of tumor cells, local invasion and metastasis. The possibility of modulating angiogenesis by altering the balance between pro- and anti-angiogenic factors therefore has great therapeutic potential. In this sense, studies aiming the identification and functional characterization of molecules such as PTX3, which is a natural antagonist of FGF/FGFR system, are very important. The objectives of this study were to characterize the expression of PTX3 in human cells derived from sarcoma (HT 1080, SAOS 2), colon (HCT 116, CACO 2 and SW 480) and melanoma (SK-MEL 37 and SK-MEL 188) and to evaluate its effect on cell proliferation and expression of genes related to inflammatory response and angiogenesis. Gene expression profile was investigated by RT-PCR and cell proliferation assessed by MTT assay and by counting cells stained with Trypan Blue dye. Morphology was observed by contrast phase optical microscopy and immunofluorescence using rhodamine-phalloidin conjugated to TRITC to assess F-actin filaments. We found that tumor cell lines HT 1080, HCT 116, SK-MEL 37 and SK-MEL 188 express FGF 2 and all the FGF receptors investigated (FGFR 1-4). None of the cells expressed FGF8. PTX3 basal expression was observed in HT 1080, HCT 116, SK-MEL 188 e CACO 2 lines. Preliminary results indicate that PTX3 impair the proliferation of human fibrosarcoma HT 1080 cells. By immunofluorescence, we found that PTX3 seems to interfere with the structure of actin filaments, and reduces the number of filopodia in HT 1080 cells and human colorectal adenocarcinoma HCT 116 cells. These results indicate the need for further investigation of the role of PTX3 in FGF -dependent human tumor cells migration and proliferation as well as for the evaluation of the therapeutic potential of PTX3 as an anti - angiogenic tool.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune é composto por um complexo ordenamento de estruturas e processos biológicos que protegem um organismo contra as doenças. Dentro dele, o sistema imune inato evoluiu para identificar e erradicar microrganismos potencialmente danosos. Constitui a primeira linha de defesa dos organismos eucariotos e desempenha papel chave na ativação e orientação da imunidade adaptativa e na manutenção da integridade tecidual. (Gulati, 2009).

As moléculas de reconhecimento de padrões (PRMs) são componentes importantes da resposta imune inata por reconhecerem motivos moleculares conservados presentes na superfície de microrganismos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*). Os lipopolissacarídeos (LPS), endotoxinas presentes na parede celular de bactérias gram-negativas são consideradas os protótipos das PAMPs (Gulati, 2009; Iwasaki e Medzhitov, 2010). Outros exemplos são os peptidoglicanos das bactérias gram-positivas, lipoproteínas, glucanos de fungos e ácidos nucleicos virais (DNA e RNA) (Gulati, 2009). Esse reconhecimento se dá por múltiplos e distintos PRMs amplamente categorizados em classes de proteínas citosólicas, transmembranas e de fase fluida. Nestas últimas, estão incluídas as colectinas, ficolinas e pentraxinas, que se ligam na superfície celular microbiana, ativando a via clássica do sistema complemento. Além disso, essas proteínas também desempenham papel como opsoninas, revestindo os patógenos para facilitar a fagocitose mediada por macrófagos e neutrófilos (Iwasaki e Medzhitov, 2010). A figura 1 esquematiza os principais PRMs e suas funções.

As PRMs de fase fluida são moléculas efetoras essenciais e moduladoras da resistência inata em mamíferos e invertebrados, sendo reconhecidas por receptores celulares expressos nas células da imunidade inata (Gulati, 2009). Através da interação direta com esses receptores, as PRMs de fase fluida também facilitam o reconhecimento e a função efetora de células fagocíticas (Mantovani *et al.*, 2013).

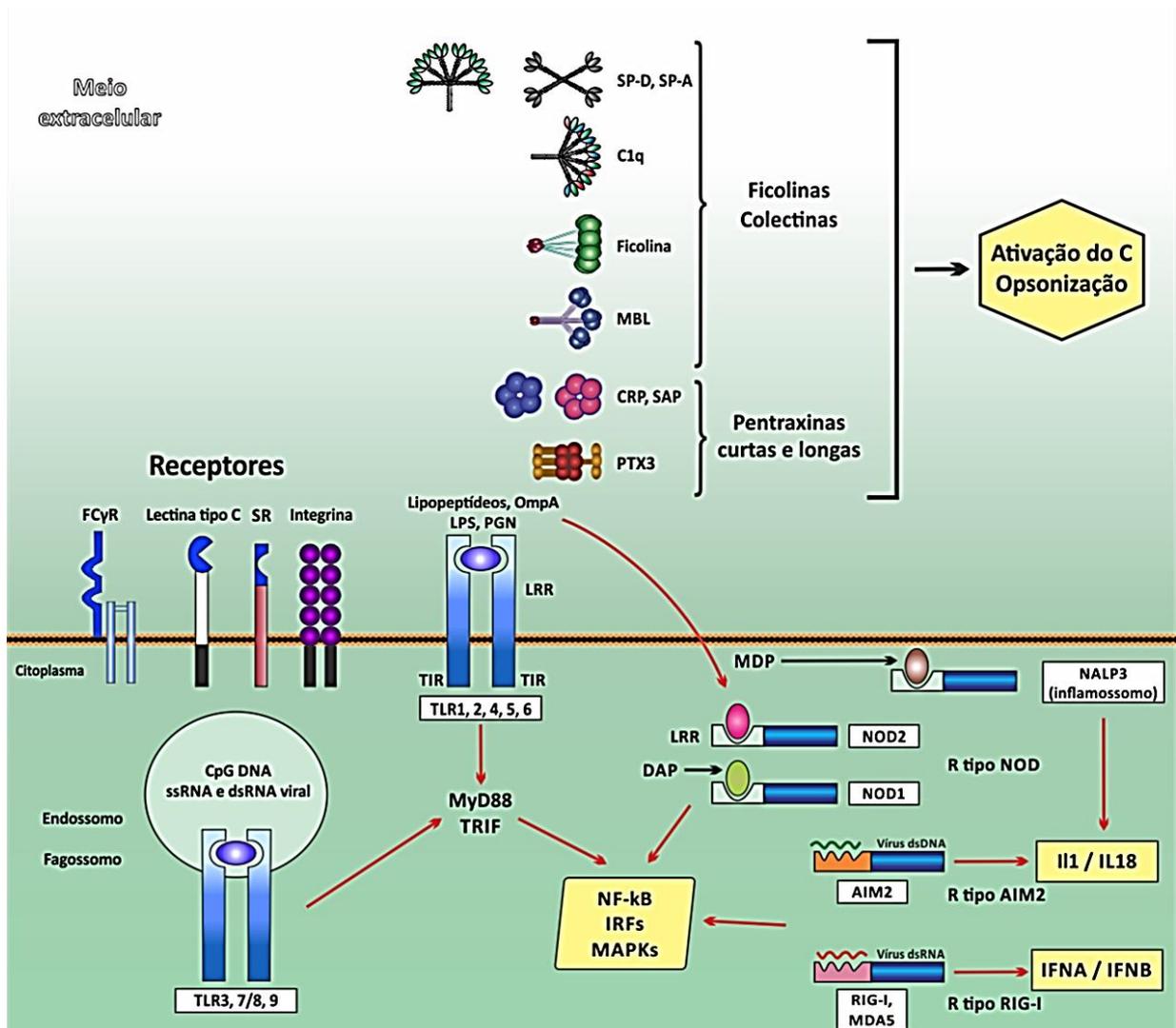


Figura 1. Braço Humoral e celular da imunidade inata

PRMs de fase fluida pertencem a diferentes famílias moleculares, incluindo colectinas (MBL, SP-A, SP-D), ficolinas, C1q e as pentraxinas (CRP, SAP, PTX3) e ativam o complemento ou facilitam a opsonização de micróbios. PRMs associadas às células estão localizadas em diferentes compartimentos (membrana plasmática, endossomos, citoplasma) e pertencem a diferentes classes moleculares (TLRs, SR, NOD). Os receptores do tipo RIG-I, NOD- e TLRs são receptores de sinalização que guiam a ativação de NFκB, IRFs e MAPKS. TLRs reconhecem fragmentos microbianos. RIG-I reconhecem RNA de dupla fita viral e induzem a produção de IFN tipo 1. Receptores do tipo AIM2 reconhecem DNA viral e ativam o inflamossomo, mediando a produção de IL1B e IL18. Modificado de Mantovani, 2013.

1.1 Pentraxinas

As pentraxinas formam uma família de proteínas multifuncionais. São componentes essenciais do braço humoral da resposta imune inata (Garlanda *et al.*, 2006) e seus membros estão conservados filogeneticamente de aracnídeos até os mamíferos. Todos os membros desta família apresentam um domínio característico de 200 aminoácidos no qual se encontra um motivo altamente conservado de 8 aminoácidos, descrito como a assinatura das pentraxinas (HxCxS/TWxS, onde x é qualquer aminoácido) (Kunes *et al.*, 2012). As pentraxinas interagem com uma variedade de patógenos de forma espécie-específica e têm propriedades biológicas de proteínas de fase aguda (Gifoni, 2008).

Com base na estrutura primária do protômero proteico, as pentraxinas estão divididas em dois grupos: pentraxinas curtas e longas (Bottazzi *et al.*, 2010).

As pentraxinas curtas têm aproximadamente 25 kDa e compartilham uma organização estrutural comum de cinco a dez subunidades arranjadas numa simetria pentamérica radial. Isolada em 1930, a proteína C reativa (CRP), primeira PRM purificada e protótipo das pentraxinas curtas, é conhecida por se ligar de maneira cálcio-dependente ao polissacarídeo-C de *Streptococcus pneumoniae* (Francis e Tillett, 1930). Posteriormente, a proteína soro amiloide P (SAP) humana foi identificada como uma proteína relacionada a CRP. Ambas são as principais proteínas de fase aguda em humanos e camundongos, respectivamente, sendo produzidas no fígado em resposta a citocinas inflamatórias como as interleucinas 6 (IL6) e 1 (IL1B) (Pepys e Hirschfield, 2003; Inforzato, Reading, *et al.*, 2012).

As pentraxinas curtas são componentes importantes na imunidade inata humoral, onde atuam no reconhecimento de diversos ligantes, na maior parte das vezes de maneira cálcio-dependente, ativando e regulando as três vias do complemento (i.e. clássica, lectina, e alternativa) através da interação com C1q (Roumenina *et al.*, 2006), ficolinas (Ng *et al.*, 2007; Tanio, Wakamatsu e Kohno, 2009) e o fator H (Mihlan *et al.*, 2009; Okemefuna *et al.*, 2010). Essa ativação mediada pelas pentraxinas curtas favorece também a remoção de resíduos apoptóticos com

potenciais implicações na prevenção de doenças autoimunes (Inforzato, Reading, *et al.*, 2012).

A Pentraxina 3 (PTX3) é o protótipo das pentraxinas longas e foi identificada na década de 90 como uma molécula cuja síntese é estimulada por TNFA (fator de necrose tumoral alfa) (Lee *et al.*, 1990; Lee, Lee e Vilcek, 1993) e IL1B (Breviario *et al.*, 1992). Posteriormente à PTX3, outras moléculas com características semelhantes (uma porção carboxi-terminal relacionada à CRP e SAP e uma porção N- terminal inédita) foram identificadas e passaram a fazer parte do grupo das pentraxinas longas: apexina, PTX4, as pentraxinas neurais Pentraxina 1 (NP1 ou NPTX1) e 2 (NP2 ou NPTX2) e o NPR (*neuronal pentraxin receptor*) (Gewurz, Zhang e Lint, 1995; Garlanda *et al.*, 2005) (Figura 2).

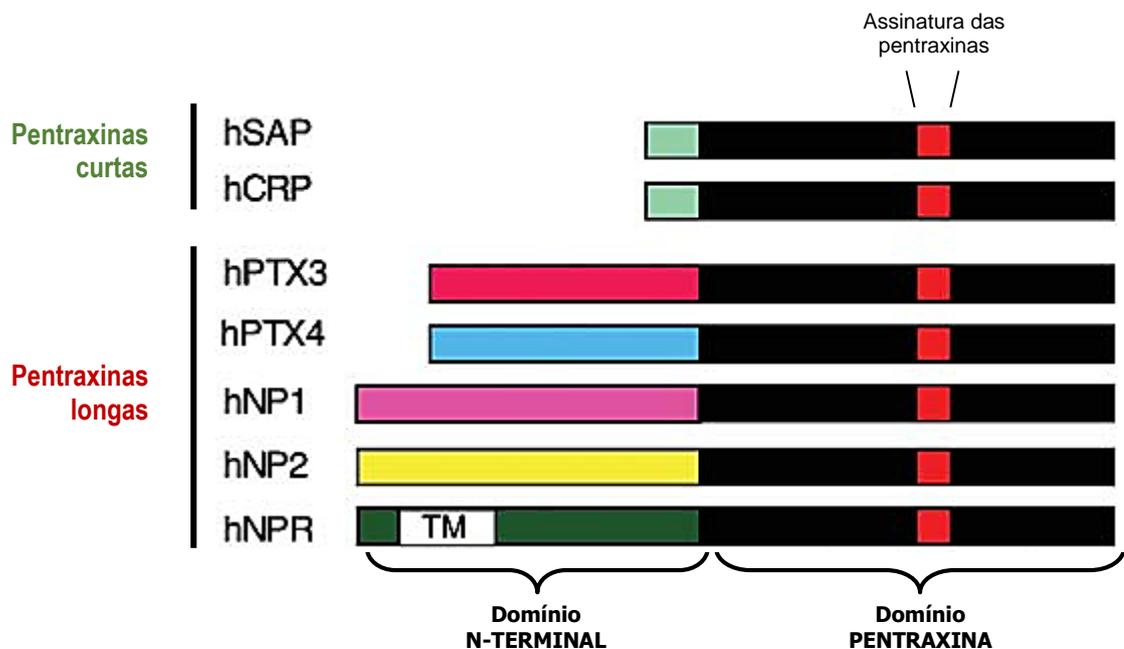


Figura 2. Estrutura proteica das pentraxinas

As pentraxinas curtas CRP e SAP foram as primeiras a serem descritas e apresentam 224 e 126 aminoácidos, respectivamente. As pentraxinas longas compartilham um domínio carboxi-terminal comum (domínio pentraxina) no qual uma sequência de 8 aa conservados (HxCxS/TWxS, onde x é qualquer aa) denominado "assinatura das pentraxinas" está presente e uma porção N-terminal inédita. TM – transmembrana. (Modificado de Garlanda *et al.*, 2005).

1.2 A Pentraxina 3 (PTX3)

O gene PTX3 humano está localizado na banda q22-28 do cromossomo 3 (Breviario *et al.*, 1992). Está organizado em três éxons, onde os dois primeiros codificam, respectivamente, o peptídeo sinal e o domínio amino (N-) terminal (amino ácidos 18-179) (Bottazzi *et al.*, 1997). O terceiro éxon, que corresponde ao segundo éxon das pentraxinas curtas, codifica para a porção carboxi (C-) terminal da molécula (Figura 3).

A região promotora do gene de PTX3 é responsiva a TNFA e IL1B, mas diferentemente das pentraxinas curtas, não a IL6 (Presta *et al.*, 2007). Contém diversos elementos de ligação de *enhancer* (intensificador), que regulam finamente o a produção de PTX3 nas células. Os ativadores mais relevantes da região promotora de PTX3 são AP1 (proteína ativadora 1), AP2, SP1 (proteína de especificidade), NFkB (fator nuclear kappa B) e GAS (sítio de ativação de interferon gama) (figura 3) (Balhara *et al.*, 2013). O sítio de ligação de NFkB é essencial para a resposta transcricional a citocinas pro-inflamatórias (i.e TNFA e IL1B), enquanto que AP1 controla a transcrição basal de PTX3 (Garlanda *et al.*, 2005; Inforzato, Bottazzi, *et al.*, 2012).

O gene PTX3 é estimulado rapidamente em uma série de tipos celulares por uma variedade de estímulos, além das citocinas IL1B e TNFA, agonistas de receptores do tipo Toll (TLR), motivos microbianos (LPS, OmpA, lipoarabinomananas) ou mesmo microrganismos intactos (Bottazzi *et al.*, 2010) ativam a transcrição do gene.

Em resposta ao estímulo, PTX3 é secretada principalmente por células dendríticas, que são a maior fonte da proteína. PTX3 também é expressa por monócitos, macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, células do músculo liso, rim, células epiteliais, células sinoviais, condrócitos, adipócitos, células do epitélio alveolar, células granulosas e células da glia (revisado por Garlanda *et al.*, 2005; Bottazzi *et al.*, 2010). A proteína, entretanto, é expressa constitutivamente no coração por cardiomiócitos humanos (Peri *et al.*, 2000) e por células endoteliais linfáticas tanto em humanos quanto em murinos (Wick *et al.*, 2007; revisado por Moalli, Jaillon, *et al.*, 2011). Em neutrófilos maduros, PTX3 é armazenada em grânulos não azurofílicos, lactoferrina e lactoferrina/gelatinase positivos os quais servem de reservatório para a

rápida liberação de PTX3 em resposta a estímulos pro-inflamatórios (Jaillon *et al.*, 2007; Inforzato, Bottazzi, *et al.*, 2012).

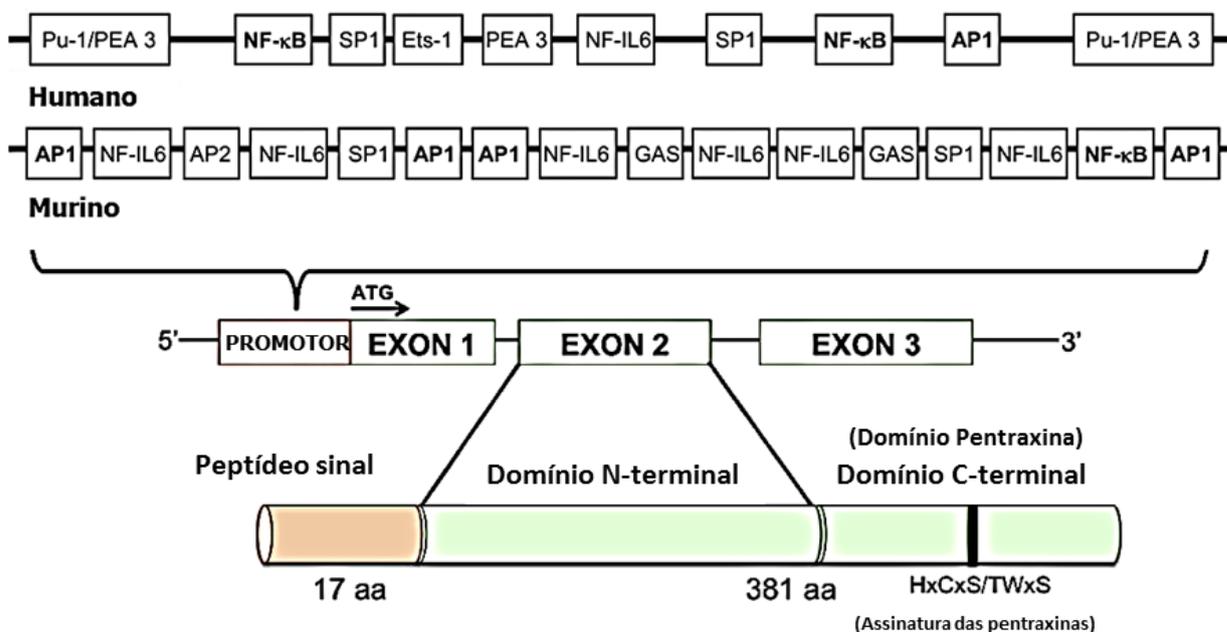


Figura 3. Estrutura do gene PTX3 em humanos e camundongos.

O gene PTX3 é composto por uma região promotora e por três éxons: o primeiro éxon codifica o peptídeo sinal (17 aa), enquanto o segundo e o terceiro éxons codificam os domínios N- e C- terminal da proteína (381 aa), respectivamente. A região promotora contém múltiplos sítios de ligação a fatores de transcrição (modificado de Balhara *et al.*, 2013).

A sequência primária de PTX3 é altamente conservada filogeneticamente entre diferentes espécies de animais vertebrados e invertebrados. Entre humanos e murinos, 92% dos resíduos de aminoácidos são conservados, sendo 82% destes idênticos (Introna *et al.*, 1996; Garlanda *et al.*, 2005) o que sugere haver forte pressão evolutiva para a manutenção da relação estrutura/função da molécula (Mantovani *et al.*, 2013).

Essa homologia proteica permite extrapolar dados obtidos com estudos da sequência murina em humanos. Entretanto, cabe ressaltar que a sequência do promotor do gene humano contém menos elementos transcripcionais que a contraparte murina (Balhara *et al.*, 2013).

Com relação aos aspectos evolutivos da estrutura proteica, as porções N- e C-terminal evoluíram independentemente, justificando o porquê do domínio C-terminal ser amplamente conservado, enquanto o domínio N-terminal não é (Balhara *et al.*, 2013).

A proteína PTX3 madura tem aproximadamente 40 kDa, apresentando um único sítio de glicosilação ligado ao N presente no resíduo Asn220 (figura 4), o qual aumenta o peso molecular para 45 kDa (Garlanda *et al.*, 2005) e é equivalente a 10% do peso molecular total. Esse padrão único de glicosilação está associado a diferentes tipos de células inflamatórias e/ou estímulos inflamatórios que induzem a produção de PTX3 (Inforzato *et al.*, 2006). Essa glicosilação permite que PTX3 amplie sua interação com outras moléculas, como o vírus Influenza, selectina P e componentes do complemento.

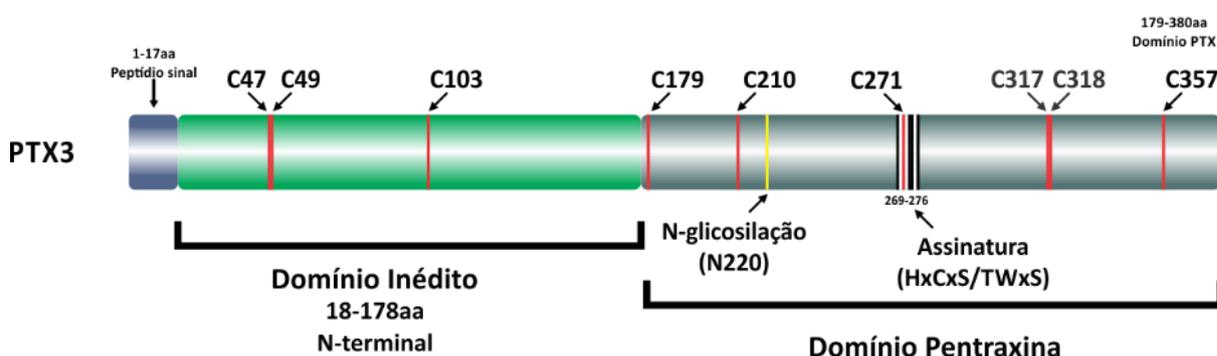


Figura 4. Detalhes da estrutura proteica de PTX3.

A PTX3 foi a primeira pentraxina longa descrita e é considerada o protótipo desta subfamília. Em destaque, os resíduos de cisteína que participam na oligomerização proteica de PTX3 e no domínio pentraxina (aa 179-380), a assinatura da família nos resíduos 269-276 e o sítio de glicosilação ligado ao N (Asn220).

O nome pentraxina é baseado na estrutura pentagonal das proteínas da família, que consistem de cinco subunidades. Devido à similaridade da porção carboxi da estrutura de PTX3 com CRP e SAP, foi inicialmente atribuído a PTX3 uma estrutura quaternária similar a observada nas pentraxinas curtas, consistindo de cinco subunidades idênticas de 23 kDa unidas por interações não-covalentes. Posteriormente foi verificado que os resíduos de aminoácido na estrutura do protômero que são necessários para a formação estrutural pentamérica em CRP, não estão presentes na PTX3 (Introna *et al.*, 1996). Predições da estrutura secundária da porção N-terminal

de PTX3 indicam que a proteína tende a formar quatro hélices- α , três das quais estão provavelmente envolvidas na formação de estruturas coiled-coils (bobinas enroladas) (Presta *et al.*, 2007) enquanto o domínio pentraxina localizado na porção C- da molécula adota uma topologia em forma de barril com folhas β antiparalelas (*jelly roll* β) (Inforzato *et al.*, 2006) (figura 5). Desta forma, foi proposto por Inforzato e colaboradores que a estrutura de PTX3 é um octômero assimétrico como ilustrado na figura 5.

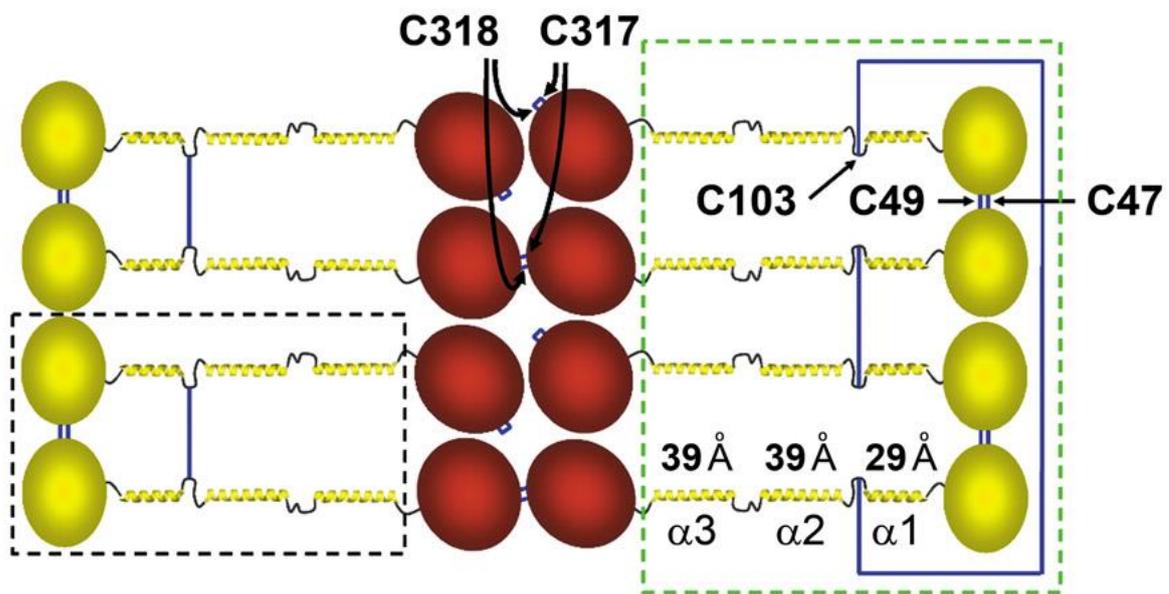


Figura 5. Modelo proposto para a disposição das subunidades dos protômeros de PTX3.

Organização das ligações dissulfeto no octômero 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. Inforzato, 2010.

A porção N-terminal de PTX3 é a principal estrutura determinante para a multimerização proteica em um octômero ligado por ligações dissulfeto de forma que esse domínio medeia a associação dos protômeros de PTX3 em um tetrâmero covalente e um não-covalente (dímero de dímeros). Esse estado oligomerizado e o formato assimétrico de PTX3 a caracteriza única entre as pentraxinas (Inforzato *et al.*, 2010) com funções atreladas, especificamente, a este domínio N-terminal inédito, o

qual está envolvido, por exemplo, na ligação da proteína a uma diversa gama de moléculas, dentre elas os fatores de crescimento de fibroblastos (Rusnati *et al.*, 2004; Inforzato *et al.*, 2010; Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013). Além disso, PTX3 não apresenta na sua estrutura, resíduos de aminoácidos de ligação a cálcio presentes em CRP e SAP, o que explica algumas propriedades de ligação dessa proteína (por exemplo, PTX3 se liga a C1q de modo cálcio independente, diferentemente das pentraxinas curtas) (Goodman *et al.*, 1996).

1.3 PTX3: ligantes e funções

Pentraxina 3 é uma PRM com funções não-redundantes em várias condições fisiopatológicas (Mantovani, Garlanda e Bottazzi, 2003). Como descrito acima, PTX3 compartilha com as pentraxinas curtas o domínio das pentraxinas na porção C-terminal e possui uma porção N-terminal inédita. Essas características estruturais sugerem que PTX3 possa tanto possuir propriedades de reconhecimento de ligantes semelhantes aos de CRP e SAP, quanto possuir outras atividades biológicas, distintas das pentraxinas curtas (Presta *et al.*, 2007).

O primeiro ligante identificado e melhor caracterizado para PTX3 é o componente do complemento C1q (Bottazzi *et al.*, 1997). Essa ligação resulta na ativação da cascata da via clássica medida, em condições experimentais onde PTX3 está ancorada ao substrato, pela deposição de C3 e C4. Por outro lado, PTX3 solúvel causa uma inibição de maneira dose-dependente da atividade hemolítica de C1q (Nauta *et al.*, 2003), indicando que PTX3 pode exercer dupla função e efeitos contrastantes na ativação do complemento: 1) facilita a depuração de materiais que se ligam a PTX3 (como os microrganismos) e 2) protege contra ativação do complemento não desejada na fase fluida. (Inforzato, Bottazzi, *et al.*, 2012).

Além dos papéis desempenhados na ativação do complemento, os níveis plasmáticos de PTX3 aumentam rapidamente em diferentes contextos fisiopatológicos (Inforzato, Reading, *et al.*, 2012). Expressão aumentada de PTX3 confere a camundongos transgênicos maior resistência à toxicidade do LPS e à infecção causada pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco em comparação aos camundongos

do tipo selvagem (Dias *et al.*, 2001). Deficiência de PTX3 está associada a maior dano tecidual decorrente da isquemia e reperfusão cardíaca (Salio *et al.*, 2008) e em modelo de pleurisia experimental, a maiores danos nos rins e pulmões dos camundongos nocaute para Ptx3 do que nos do tipo selvagem (Deban *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2012). Por outro lado, Ptx3 mostrou-se deletéria em modelos de isquemia e reperfusão da artéria mesentérica superior, aumentando mortalidade e danos teciduais (Souza *et al.*, 2009) além de acelerar injúria pulmonar em modelo experimental murino de ventilação mecânica (Real *et al.*, 2012). Estes dados indicam que PTX3 tem impacto crítico como regulador fino da inflamação, com efeitos danosos e benéficos, dependendo da natureza e intensidade da injúria (Soares *et al.*, 2006; Inforzato, Reading, *et al.*, 2012).

PTX3 especificamente se liga a alguns microrganismos, incluindo os fungos *Paracoccidioides brasiliensis* (Diniz *et al.*, 2004) e *Aspergillus fumigatus* (Garlanda *et al.*, 2002; Gaziano *et al.*, 2004). Interage também com as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Moalli, Paroni, *et al.*, 2011) e *Streptococcus pneumoniae* (Huttunen *et al.*, 2011), além de vírus como o citomegalovírus humano e murino (HCMV e MCMV) (Bozza *et al.*, 2006) e o vírus influenza H3N2 (Reading *et al.*, 2008) de forma a ampliar a resposta inflamatória a estas infecções (revisado por Inforzato, Bottazzi, *et al.*, 2012).

No contexto da biologia vascular, PTX3 interage seletivamente com os fatores de crescimento de fibroblasto tipo 2 (Rusnati *et al.*, 2004) e tipo 8 (Leali *et al.*, 2011) inibindo as ações biológicas mediadas por esses fatores.

1.4 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs)

Os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) constituem uma família de proteínas ligadas a heparina presentes em todos os animais, de *Caenorhabditis elegans* aos mamíferos. Nestes últimos, existem 23 membros estruturalmente relacionados, sendo estes 18 ligantes (FGF1-FGF10 e FGF16-FGF23) agrupados em seis subfamílias baseados em diferenças na homologia e filogenia de suas sequências (Harmer *et al.*, 2004; Beenken e Mohammadi, 2009).

Os FGFs são fatores parácrinos que, após a liberação pelas células induzem sinais em células vizinhas ou distantes de forma a modular uma vasta gama de efeitos biológicos (Harmer *et al.*, 2004). Vários trabalhos mostram o papel do sistema FGF-FGFR na sobrevivência (Presta *et al.*, 2005), proliferação (Turner e Grose, 2010) e diferenciação celulares (Beenken e Mohammadi, 2009), bem como na migração e alteração da captação de metabólitos (Harmer *et al.*, 2004). Os FGFs têm papel na modelação tecidual, interações célula-célula e na organogênese que ocorre durante a embriogênese.

A sinalização mediada por esses fatores evoluiu para se tornar um sistema altamente complexo, refletindo a amplitude de funções fisiológicas relacionadas aos FGFs (Turner e Grose, 2010).

Os FGFs são glicoproteínas que, após serem secretadas, ficam presas na matriz extracelular da qual são liberadas pela ação de heparinases, proteases ou proteínas de ligação específicas a FGF (FGFBP). As FGFBPs ligam o FGF a proteoglicanos (HSPG) presentes na superfície celular que estabilizam a interação do ligante FGF com os receptores específicos (FGFR) (Ori, Wilkinson e Fernig, 2008).

Os FGFs exercem suas funções através da interação com quatro receptores altamente conservados do tipo tirosina quinase (RTK) (FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4) que medeiam a ativação de múltiplas vias de transdução de sinal. Um quinto receptor, FGFR5, foi descrito, mas por não possuir domínio TK está relacionado à regulação negativa do sistema de sinalização (Wiedemann e Trueb, 2000).

Os FGFRs possuem três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (Ig I, II e III) (Burke *et al.*, 1998). O sítio preferencial de ligação ao FGF está no domínio 2 (Ig II) e o domínio Ig III está relacionado à especificidade. Formas alternativas na Ig III reforçam a especificidade de ligação (figura 6). A ligação do complexo FGF-HSPG ao receptor forma um complexo ternário, que promove a transfosforilação do domínio tirosina quinase na porção citoplasmática do receptor, recrutando diversas proteínas adaptadoras que ativam diferentes fatores de transcrição (Harmer *et al.*, 2004; Beenken e Mohammadi, 2009).

A via de sinalização mais predominantemente ativada pela via FGFR durante o desenvolvimento embrionário é a MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), que tem efeito principalmente na proliferação celular promovendo entrada na fase S do ciclo celular (Turner e Grose, 2010; revisado por Goetz e Mohammadi, 2013). Em outros contextos, a sinalização por MAPK também induz a parada do ciclo celular e diferenciação (Maher, 1999; Raucci *et al.*, 2004). Diversas outras vias também são ativadas pelo sistema FGF/FGFR, estando as principais destacadas na figura 7.

Dentre os membros da família FGF, o fator de crescimento de fibroblasto tipo 2 (FGF2) é o fator pró-angiogênico protótipo e melhor caracterizado. FGF2 exógeno estimula migração, proliferação, quimiotaxia e produção de proteases em culturas de células endoteliais *in vitro* (Ware e Simons, 1997; Leali *et al.*, 2010). *In vivo*, FGF2 apresenta atividade angiogênica em diferentes modelos experimentais (Folkman e Klagsbrun, 1987). Tem atividade anti-apoptótica, estimula mitogênese em células do músculo liso e em fibroblastos (Beenken e Mohammadi, 2009) e modula neovascularização durante regeneração tecidual, inflamação, aterosclerose e crescimento tumoral (Yamashita *et al.*, 2002; Presta *et al.*, 2005).

O FGF tipo 8 (FGF8) foi originalmente clonado de linhagens celulares de carcinoma mamário murino dependente de andrógenos (Tanaka *et al.*, 1992). Desempenha papéis autócrinos e parácrinos não-redundantes no crescimento de células epiteliais e do estroma e em tumores regulados por hormônios esteroides (Song *et al.*, 2000; Mattila e Harkonen, 2007). A isoforma b (FGF8b) é a que apresenta o maior potencial oncogênico em epitélios prostáticos e mamários (Song *et al.*, 2000). Seus níveis de expressão são maiores durante o desenvolvimento embrionário, enquanto que em tecidos adultos normais, sua expressão é muito restrita (Mattila e Harkonen, 2007).

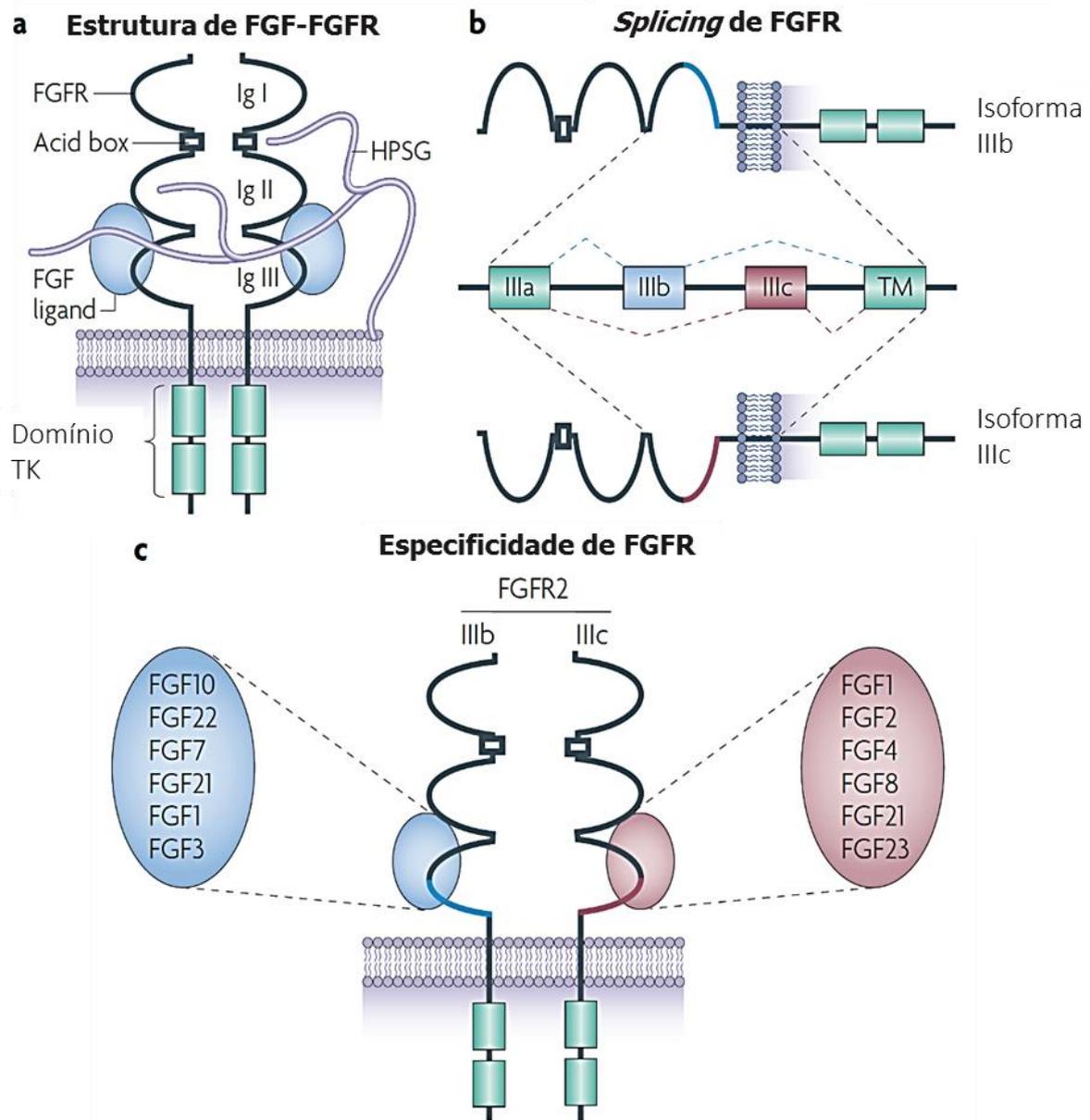


Figura 6. Estrutura do FGFR e especificidade do ligante.

A) estrutura básica do complexo FGF-FGFR compreende duas moléculas do receptor, dois FGFs e uma cadeia de proteoglicanos (HSPG). A via de sinalização de FGF compreende 4 receptores transmembranas conservados e 18 FGF ligantes. FGF se liga com baixa afinidade a receptores HSPG (roxo) da superfície celular e com alta afinidade a FGFRs específicos. O FGFR consiste de três domínios extracelulares do tipo imunoglobulina (Ig), uma hélice transmembranas simples e um domínio intracelular do tipo tirosina quinase (TK). O segundo e o terceiro domínios Ig formam o grampo de ligação ao ligante e tem domínios distintos que se ligam tanto aos FGFs quanto aos HSPG. **B)** a especificidade ao ligante é gerada por processamento alternativo do domínio Ig III. A primeira metade do Ig III é codificada por um éxon invariante (IIIa) que é cortado tanto para IIIb ou IIIc. Tecidos epiteliais predominantemente expressam a isoforma IIIb e tecidos mesenquimais expressam IIIc. **C)** exemplos da extensão da especificidade de ligantes da isoforma FGFR2. TM: região transmembrana. Modificado de Turner, 2010.

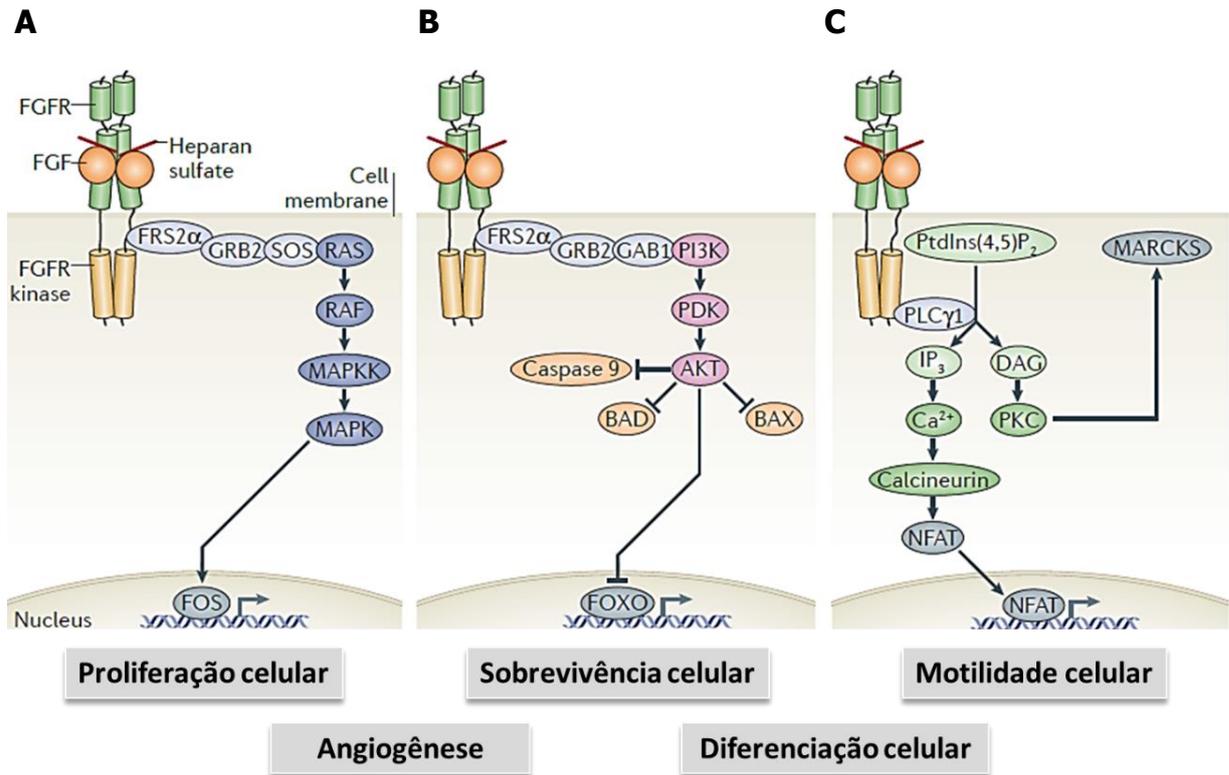


Figura 7. Sinalização mediada pelo sistema FGF-FGFR

A ligação de FGF ao FGFR induz dimerização do receptor promovendo uma transfosforilação da porção quinase do receptor. O FGFR ativado, ativa outros substratos intracelulares por fosforilação, ativando diferentes vias de sinalização e gerando diversas respostas celulares. Os principais substratos da quinase de FGFR são FRS2A (FGFR substrate 2 α) e a PLCY1. FRS2A ativado se liga a proteína adaptadora GRB2 que recruta **A**) SOS ou **B**) GAB1 (GRB2-associated binding protein 1). SOS ativa RAS (GTPase) que inicia ativação da cascata da MAPK. MAPK ativada se transloca do citoplasma para o núcleo onde fosforila fatores de transcrição, como FOS para induzir transcrição de genes específicos. O resultado dessa via é primariamente proliferação celular, mas também promove diferenciação e migração celular. GAB1 ativa quinase AKT. A ativação da quinase AKT inativa efetores pró-apoptóticos como BAD (BCL-2 antagonist of cell death) e os fatores de transcrição FOXO (forkhead box class O), desta forma promovendo sobrevivência celular. **C**) Recrutamento e fosforilação de PLCY1 inicia vias de sinalizações que participam na migração e diferenciação celular, podendo influenciar nas vias MAPK e AKT. A via por PLCY1 induz ativação de NFAT (nuclear factor of activated T cells) que estimula a expressão de genes associados a motilidade celular (modificado de Goetz e Mohammadi, 2013)

Expressão alterada dos FGF em cânceres é reportada na literatura como fator importante para o desenvolvimento neoplásico (Presta *et al.*, 2005). Nesse sentido, a identificação e caracterização de moléculas que apresentem propriedades inibidoras do sistema FGF-FGFR através do sequestro de FGF2 e FGF8, é visto como uma

importante abordagem terapêutica para o controle de doenças dependentes de angiogênese como aterosclerose (Rolph *et al.*, 2002), artrite reumatoide (Wang *et al.*, 2012), psoríase (Bhushan *et al.*, 1999), degeneração macular (Noma *et al.*, 2013) e câncer (Ribatti, 2008; Alessi *et al.*, 2009) (Leali *et al.*, 2011). A molécula PTX3 é descrita como um forte antagonista natural desse sistema, possuindo dois sítios de ligação a esses fatores (Inforzato *et al.*, 2010).

1.5 PTX3 e interação com FGF2 e FGF8

A atividade biológica de PTX3 está relacionada a sua capacidade de interagir com diferentes ligantes (Ortega-Hernandez *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2010).

PTX3 se liga a FGF2 com alta afinidade e alta especificidade, inibindo proliferação dependente de FGF2 em células endoteliais *in vitro* e angiogênese *in vivo* (Rusnati *et al.*, 2004) (figura 8), como também inibe ativação celular dependente de FGF2 em células do músculo liso, bloqueando os estímulos parácrinos e autócrinos desse fator nas células (Camozzi *et al.*, 2005). A estrutura octamérica da molécula de PTX3 comporta dois sítios de ligação com FGF2, onde as superfícies de interação estão localizadas nos tetrâmeros formados pelo domínio N-terminal (figura 5) (Inforzato *et al.*, 2010). Desta forma, a porção N-terminal é a estrutura determinante para o bloqueio da sinalização do FGFR mediado pelo FGF2.

De forma similar ao demonstrado com FGF2, PTX3 interage com a isoforma b de FGF8 (FGF8b) inibindo a angiogênese e crescimento celular dependentes de FGF8b em tumores regulados por hormônios esteroides (Leali *et al.*, 2011). Leali *et al.*, (2011) e Ronca *et al.*, (2013), mostraram que PTX3 apresenta potencial de inibição de proliferação e migração celular em linhagens tumorais Shionogi 155 (S155) derivadas carcinoma mamário murino (Leali *et al.*, 2011; Ronca, Alessi, *et al.*, 2013) e em células tumorais de próstata humano LNCaP (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013).

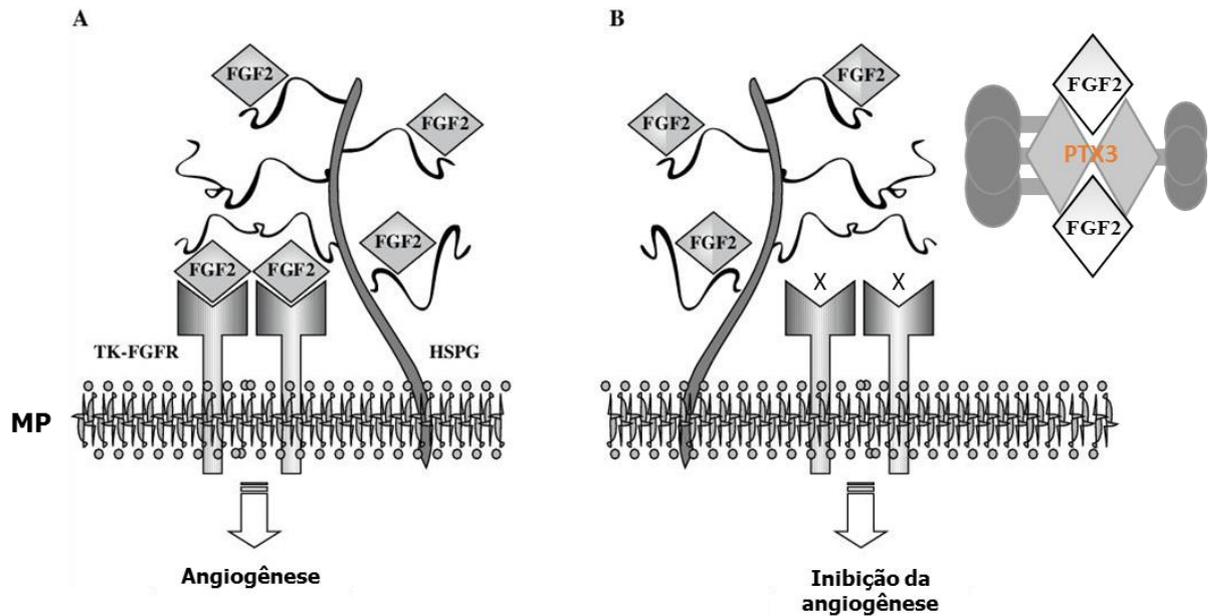


Figura 8. Efeito de PTX3 na formação do complexo ternário HSPG/FGF2/FGFR.

A) FGF2 ativa uma resposta angiogênica em células endoteliais através da interação de alta afinidade com receptores do tipo tirosina quinase (TK) e com baixa afinidade a receptores HSPG, formando um complexo ternário. **B)** PTX3 se liga a duas moléculas de FGF2 através do sítio de interação de FGF2 ao seu receptor, desta forma, PTX3 previne a formação do complexo HSPG/FGF2/FGFR, prejudicando a atividade angiogênica desse fator de crescimento. MP: membrana plasmática (Modificado de Alessi *et al.*, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A Pentraxina 3 é uma glicoproteína de fase aguda pleiotrópica com funções biológicas na fertilidade, na imunidade inata, na remodelação de tecidos, patogênese de doenças como aspergilose pulmonar (Garlanda *et al.*, 2002) e fibrose cística (Moalli, Paroni, *et al.*, 2011). Recentemente, foi identificada como sendo uma molécula capaz de se ligar especificamente aos FGFs inibindo as atividades biológicas promovidas por estes fatores. (Inforzato *et al.*, 2013) (Dias *et al.*, 2001), (Alessi *et al.*, 2009) O sistema FGF-FGFR desempenha papéis importantes em inúmeros processos tais como migração, diferenciação, sobrevivência e proliferação celulares, sendo um relevante agente pro-angiogênico (Turner e Grose, 2010).

A angiogênese, crescimento de novos capilares a partir de vasos pré-existentes, contribui para o desenvolvimento e progressão de uma variedade de condições fisiológicas e patológicas. Da mesma forma que tem um papel benéfico limitando o dano em tecidos isquêmicos, por outro lado tem sido mostrado que o grau de angiogênese pode ser um fator extremamente negativo no prognóstico de neoplasias (Buolamwini, 1999; Van Hinsbergh, Collen e Koolwijk, 1999) e outras doenças tais como a artrite reumatoide (Colville-Nash e Scott, 1992; Luchetti *et al.*, 2000), retinopatia diabética (Yoshida *et al.*, 1999), psoríase (Nielsen *et al.*, 2002), inflamação crônica e aterosclerose (Paper, 1998), nas quais a neovascularização dos tecidos afetados é um agente facilitador da injúria tecidual (Ziche, Donnini e Morbidelli, 2004).

No que se refere ao câncer, a formação de novos canais vasculares favorece a proliferação das células tumorais, invasão local e metástase hematogênica (Alessi *et al.*, 2009). Embora alguns agentes promissores tenham sido identificados como o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e seus receptores, muitos pacientes desenvolvem resistência a essa abordagem. Um dos mecanismos propostos para o escape do tumor da terapia anti-VEGF é a regulação positiva de fatores de crescimento da família FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (Alessi *et al.*, 2009).

Dados da literatura de fato mostram a expressão alterada de FGFs em diferentes tipos de tumores incluindo próstata, astrocitoma, mama, bexiga e câncer

de cólon e sugerem que a sinalização aberrante via FGFs pode favorecer o crescimento dos tumores por aumentar a proliferação e resistência das células à apoptose; aumentar a motilidade e capacidade de invasão bem como resistência à quimioterapia (Rusnati *et al.*, 2004; Leali *et al.*, 2009).

A possibilidade de modular a angiogênese alterando o equilíbrio entre o balanço pró e anti-angiogênico tem, portanto, grande potencial terapêutico. Neste sentido, são relevantes as pesquisas buscando a identificação e caracterização de moléculas com estas atividades, seus ligantes e vias de sinalização celular.

O objetivo deste estudo é caracterizar a expressão de PTX3 em diferentes tipos de células tumorais humanas e avaliar o seu efeito sobre a proliferação celular, e perfil de expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e angiogênese. Os nossos resultados contribuirão não só para a caracterização funcional de PTX3 e dos FGFs e seus receptores na modulação da angiogênese em diferentes tipos de tumores responsivos ou não a hormônios esteroides como também na avaliação do potencial terapêutico de PTX3 como agente anti-angiogênico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o padrão de expressão e a ação biológica da pentraxina 3 sobre células tumorais humanas.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1** Caracterizar o padrão de expressão basal de PTX3, FGF2, FGF8, FGFRs 1, 2, 3 e 4 em linhagens humanas derivadas de sarcoma (HT 1080, SAOS 2), cólon (HCT 116, CACO 2 e SW 480) e melanoma (SK-MEL 37 e SK-MEL 188);
- 3.2.2** Avaliar as alterações das linhagens HT 1080, SAOS 2, HCT 116, CACO 2, SW 480, SK-MEL 37 e SK-MEL 188 em resposta ao tratamento com a pentraxina 3 recombinante humana mensurando modificações na taxa de crescimento celular;
- 3.2.3** Analisar possíveis alterações no citoesqueleto das linhagens HT 1080, SAOS 2, HCT 116, CACO 2, SW 480, SK-MEL 37 e SK-MEL 188 promovidas pelo tratamento das mesmas com a pentraxina 3 recombinante humana;
- 3.2.4** Analisar o perfil de expressão de genes com atividade pro-angiogênica (FGF2 e 8, FGFRs 1-4, FGF8 e VEGF), e pro-inflamatória (TNFA, IL1B, PTX3, IL8) nas linhagens celulares em cultura em resposta ao tratamento com a pentraxina 3.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Proteína PTX3 recombinante humana

A proteína pentraxina 3 recombinante humana (rhPTX3) foi gentilmente cedida pela equipe do laboratório de Imunopatologia Experimental do *Istituto Humanitas* (Itália), coordenado pela pesquisadora Cecilia Garlanda. A proteína foi produzida em células CHO (*chinese hamster ovary*) e foi purificada por imunoafinidade em condições livres de endotoxinas. A pureza de PTX3 foi certificada por SDS-PAGE e a contaminação por LPS (< 124 pg LPS / mg de proteína) foi avaliada pelo ensaio LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) e testada pela ausência de estimulação de IL6 em monócitos (Garlanda *et al.*, 2002).

4.2 Linhagens celulares

As linhagens tumorais HT 1080, SAOS 2, SW 480 e CACO 2 empregadas nesse estudo foram adquiridas da ATCC (*American Type Culture Colection*) e as demais, SK-MEL 37 e SK-MEL 188 são provenientes do Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. As linhagens estão mantidas criopreservadas no banco de células do Laboratório de Genética Experimental do Departamento de Biologia Geral do ICB/UFMG.

As linhagens são do tipo aderente e as características quanto ao cariótipo, meio de cultura específico, passagem e data de congelamento estão especificados na tabela 1.

Tabela 1. Características das linhagens de células tumorais humanas utilizadas.

| Célula | Passagem | Característica | Cariótipo | Tumorigênico | Meio específico |
|---------------|-----------------|---|---|---------------------|------------------------|
| HT 1080 | 5 ^a | Fibrosarcoma Aderente | 46 cromossomos - variando de 44-48 Presença de pseudoploidia Ocorrência da perda do cromossomo 11 | Sim | DMEM |
| SAOS 2 | Não informado | Osteosarcoma Aderente | Hipotriplóide com média de 56 cromossomos Ausência do cromossomo Y | Não | McCoy 5A |
| HCT 116 | 3 ^a | Carcinoma colorretal Aderente | 62% das células apresentam 45 cromossomos 6,8% apresentam poliploidia 50% apresentam ausência do cromossomo Y | Sim | McCoy 5A |
| SW 480 | 2 ^a | Carcinoma colorretal Doença de Duke tipo B Aderente | Hipotriplóide com presença de 11-12 cromossomos marcadores comuns | Sim | DMEM |
| CACO 2 | 2 ^a | Carcinoma colorretal Aderente | Quantidade modal de cromossomos é 96, com poliploidia em 3,2% destes 10 marcadores comuns são conhecidos | Sim | DMEM |
| SK-MEL 37 | 3 ^a | Melanoma maligno Aderente | Não especificado | Sim | DMEM |
| SK-MEL 188 | 9 ^a | Melanoma maligno Aderente | Não especificado | Sim | DMEM |

4.3 Expansão e criopreservação das linhagens tumorais humanas

No procedimento de descongelamento das linhagens de células tumorais humanas (tabela 1), a ampola contendo as células foi rapidamente descongelada em banho-maria a 37 °C e as células foram gotejadas em 6 ml de meio específico (Gibco e Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) testado quanto a contaminação por micoplasmas, vírus e endotoxinas (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina (Sigma) pré-aquecido a 37 °C em garrafas de cultura com 25 cm² de superfície de crescimento (T25) (TPP). A garrafa foi incubada em estufa a 37 °C com saturação de 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído para remoção das células não aderidas e dos resíduos do crioprotetor DMSO (dimetil-sulfóxido; Sigma).

Quando a monocamada celular atingia uma densidade aproximada de 70 a 80%, as células eram desprendidas com tripsina 0,25% - EDTA 0,53 mM (Gibco) por aproximadamente 1 minuto. Uma alíquota da suspensão celular era utilizada para contagem e avaliação da viabilidade celular. A contagem era feita com o auxílio de uma câmara de Neubauer e a viabilidade avaliada usando o corante vital Azul de Tripán 0,5% (Sigma). As células eram repicadas em novas garrafas de cultura com 75 cm² (T75) ou 150 cm² (T150) de área de crescimento numa proporção de 1:2 ou 1:3. Essa expansão se fez necessária para a obtenção de quantidade de célula suficiente para o congelamento de, no mínimo, 10 ampolas contendo de 1,6 a 2,1 milhões de células por ampola. Esta estratégia foi adotada para que durante todo o projeto de pesquisa, os ensaios pudessem ser realizados utilizando células na mesma passagem.

Atingida a quantidade necessária de células, as mesmas foram criopreservadas em meio específico suplementado com 50% de FBS e 10% de DMSO e incubadas em freezer -80 °C por 24 a 72 horas sendo, em seguida, estocadas em nitrogênio líquido para armazenamento em longo prazo e após uma semana, uma ampola era descongelada para a certificação da eficiência do procedimento de criopreservação.

Durante o descongelamento, as células eram gotejadas num tubo de fundo cônico de 15 ml esterilizado contendo 5 ml de meio específico com 10% de FBS a 37

°C. O tubo foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado para a remoção completa do DMSO. O precipitado celular foi ressuspenso em 3 ml de meio 10% FBS e colocado em placas de petri com 78 cm² de área tratada para cultura de células (Costar) contendo 12 ml de meio 10% FBS. As placas eram incubadas em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂.

4.4 Curva de crescimento das linhagens tumorais

A construção da curva de crescimento consistiu em analisar o progresso da densidade da monocamada celular em relação ao tempo. Essa análise permitiu obter dados estimados do tempo de dobramento das linhagens celulares para uso nos experimentos de proliferação celular e imunofluorescência.

Todas as linhagens foram plaqueadas em meio de cultura específico para cada uma delas em placas de 24 poços estéreis nas quantidades de 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 e 8×10^4 de células viáveis na presença de 10% de soro fetal bovino (FBS) (ensaio na presença de soro) e na presença de 0,5% de FBS por 24 horas sendo em seguida suplementadas com 10% de FBS (ensaio com privação de soro).

A curva foi construída com base na estimativa da confluência da monocamada celular observada por microscopia ótica de contraste de fase nos tempos 3, 6, 22, 28 e 48 horas, cultivadas em meio contendo 10% de FBS, 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e 1% de glutamina. Alternativamente, quando indicado, as células foram privadas de soro (0,5% FBS) e monitoradas por 2, 6 e 22h e após este tempo, receberam meio suplementado com 10% FBS, antibióticos e glutamina sendo monitoradas nos tempos de 6 e 24h.

4.5 Proliferação celular

A avaliação da proliferação celular em resposta ao tratamento com PTX3 recombinante humana foi realizada pelo método MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-

difeniltetrazólio] (Sigma) e por contagem das células em câmara de Neubauer após coloração com o corante vital Azul de Tripán 0,5% (Sigma).

4.5.1 Ensaio MTT

O ensaio de MTT é baseado na capacidade das desidrogenases mitocondriais em clivarem os anéis tetrazolium do corante MTT através de enzimas oxidoredutases dependentes de NAD(P)-H, resultando na formação de cristais azuis. Estes cristais formados são impermeáveis a membrana plasmática e, desta forma, se acumulam no interior de células viáveis (figura 9). A adição de solvente (SDS + HCl) solubiliza as células, resultando na liberação dos cristais e, conseqüentemente, na coloração azul. O número de células viáveis é diretamente proporcional aos níveis de cristais azuis formados, sendo que a coloração pode ser medida por espectrofotometria (Mosmann, 1983; Tada *et al.*, 1986).

Para o ensaio de proliferação, as células foram descongeladas e expandidas conforme descrito no tópico 4.3 seguindo um esquema de plaqueamento ilustrado na figura 10.

As células foram plaqueadas em meio contendo 10% de FBS, 1% de antibióticos e L-glutamina e incubadas em estufa a 37 °C. Após 5 horas de incubação, o meio foi removido e a cultura lavada gentilmente com PBS 1X aquecido a 37 °C para remoção das células não aderidas. Foi então acrescentado meio suplementado com 0,5% de FBS, antibióticos e glutamina e a cultura foi incubada por 16 horas. Após as 16 horas de privação, uma placa (caracterizada como tempo 0h) foi submetida ao ensaio com MTT e Azul de Tripán. Nas três demais placas, o meio foi descartado, os poços lavados duas vezes com PBS 1X 37 °C e, em seguida, foram adicionados 250 µl de meio contendo 0,5 % ou 2% FBS, antibióticos e PTX3 (10 µg/ml), como esquematizado na figura 10.

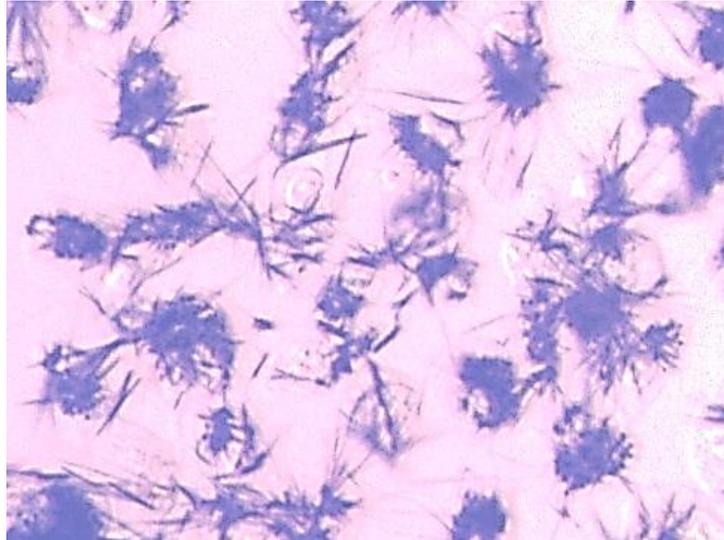


Figura 9. Aspecto da cultura de células HT 1080 tratadas com MTT.

As células HT 1080 foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, antibióticos e glutamina em estufa 37 °C e 5% de CO₂. Em tempos determinados, ao meio de cultura foi adicionado o MTT (5 mg/ml). A fotomicrografia mostra a aparência da cultura 4h30min após a incubação na presença do MTT. Os cristais de formazan aparecem corados em azul no interior das células sendo sua quantidade diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. Magnitude do aumento 100 X.

Nos tempos 24, 48 e 72h de tratamento, o meio antigo foi removido e foram adicionados 250 µl de meio específico 0,5% FBS + 50 µl de solução MTT (5 mg/ml) em PBS 1X estéril. A placa foi novamente incubada a 37 °C com 5% CO₂ por 4 horas e 30 minutos (Tada *et al.*, 1986).

Em seguida, o meio de cada poço foi cuidadosamente removido e 600 µl de solvente (SDS 10% + 0,01 M HCl) foram adicionados. A placa foi mantida sob agitação por 16 horas para a completa solubilização dos cristais de formazan.

Após as 16 horas, 300 µl do produto solubilizado de cada poço foram distribuídos em triplicatas (100 µl cada) em placas de 96 poços de fundo chato (Greiner labortechnik) e a leitura da absorbância foi feita em 590 nm no equipamento Varioskan Flash (Thermo Scientific). Como branco, foram utilizados somente 100 µl do solvente.

4.5.2 Ensaio Azul de Tripán

O corante vital Azul de Tripán é usado para corar seletivamente células mortas em uma cultura, uma vez que a membrana celular intacta das células viáveis bloqueia a passagem do corante para o interior celular.

O esquema de plaqueamento usado foi o mesmo adotado para o MTT (figura 10). Após incubação, as células foram desprendidas com 40 µl de tripsina-EDTA e ressuspensas em 100 µl de meio 10% FBS. Nesse volume, foram adicionados 112 µl de Azul de Tripán (0,5% em solução salina 0,85%). Dez microlitros da suspensão foram colocados em câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis (não coradas) na cultura foi obtida considerando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\# \text{ de células viáveis (não coradas)}}{\# \text{ total de células}} \times 100$$

O número total de células foi obtido multiplicando o número médio de células contadas por quadrante pelo fator de diluição das células que é calculado pela fórmula: volume final (células + azul de tripan)/volume de células.

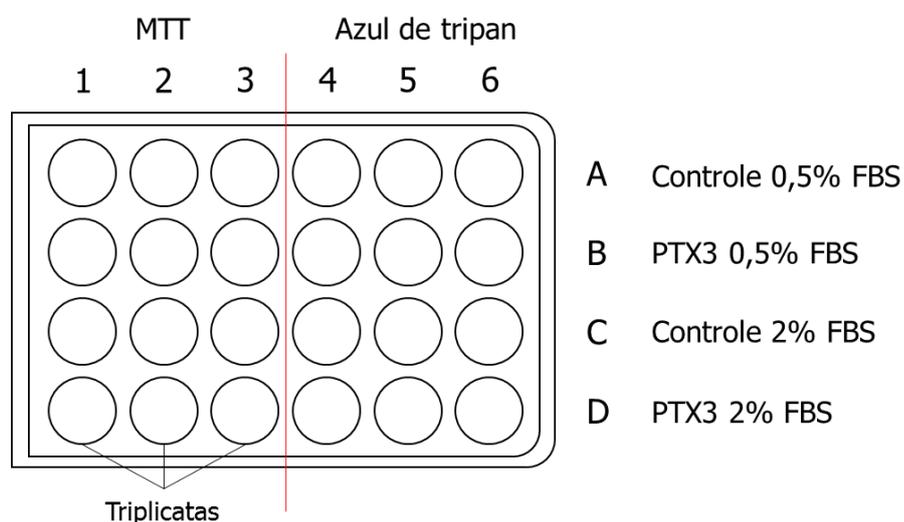


Figura 10. Esquema da placa montada para realização dos ensaios de proliferação celular.

As quatro placas foram seccionadas em duas metades, uma destinada para uso com MTT e outra para uso com Azul de Tripán. Uma quantidade de 5×10^4 células da linhagem celular HT 1080 foi plaqueada em cada poço e a proliferação foi avaliada em placas correspondentes aos tempos 0h (tempo inicial), 24, 48 e 72h (tempos com 10 µg/ml de PTX3 recombinante humana). Após 16 horas de privação de FBS, as filas A e B se mantiveram com 0,5% de FBS, enquanto as filas C e D o meio foi suplementado com 2% FBS.

4.6 Morfologia celular

4.6.1 Microscopia ótica

As modificações na monocamada celular em resposta ao tratamento com rhPTX3 foram avaliadas em microscópio ótico de contraste de fase em campo claro.

A linhagem de fibrosarcoma humano HT-1080 foi plaqueada na quantidade de 50 mil células por 1,9cm² área de crescimento em meio DMEM suplementado com 10% FBS, 1% de antibióticos e L-glutamina e após 5 horas, o meio foi substituído por meio 0,5% de FBS, 1% de antibióticos e L-glutamina e a privação se estendeu por 16 horas. Após a incubação por 16 horas, a placa foi avaliada quanto a morfologia e aspecto da monocamada, servindo de referência (tempo 0h) para as placas tratadas com a rhPTX3 (10 µg/ml) nos tempos de 24, 48 e 72h.

Nestes tempos, a aglomeração celular, desprendimento das células e aspecto geral da monocamada celular foram monitorados.

4.6.2 Imunofluorescência

As modificações no citoesqueleto celular em resposta a tratamento com a pentraxina 3 recombinante humana foram avaliadas através da análise, por imunofluorescência, dos filamentos de actinas polimerizadas.

A estratégia empregada para coloração da actina-F foi o uso da toxina faloidina, uma falotoxina presente em cogumelos da espécie *Amanita phalloides* que se liga especificamente às actinas-F.

As linhagens que expressam FGF2 foram descongeladas e plaqueadas em lamínulas de vidro, tratadas para adesão celular, previamente colocadas sob condições estéreis em placas de 24 poços (uma lamínula por poço). As células foram plaqueadas numa quantidade de 4 x 10⁴ células da linhagem SK-MEL 37, 3 x 10⁴ células de HT 1080 e 8 x 10⁴ células de HCT 116 em 300 µl de meio específico suplementado com 10% de FBS, 1% de antibióticos e L-glutamina por 24 horas. Após esse tempo, o meio foi removido e os poços foram lavados com PBS 1X a 37 °C estéril para remoção das

células mortas e do FBS e foram adicionados 300 µl de meio contendo 0,5% de FBS por mais 24 horas.

A quantidade de células plaqueadas variou de acordo com a linhagem visando obter-se uma densidade média de 40 a 60% de células ao término do experimento. Essas quantidades foram estimadas a partir dos resultados obtidos do ensaio descrito no tópico 4.4.

Após 48 horas de plaqueamento, o meio de crescimento foi removido e foram adicionados 250 µl de meio específico contendo PTX3 recombinante humana a 10 µg/ml. Após 3h de incubação, o meio com PTX3 foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X a 37 °C para remoção de resíduos de soro e células mortas. Em seguida foram adicionados 500 µl de paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma) em PBS 1X por poço para a fixação das células. Após 15 minutos, o PFA foi removido, os poços foram preenchidos com PBS 1X e a placa foi mantida a 4-8 °C por 24 horas.

As lamínulas foram retiradas dos poços com o auxílio de pinças, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas por 1 hora em câmara úmida na presença de 20 µl de faloidina (10 ng/ml) conjugada com TRITC (*Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate*) (Sigma) diluída 1:5.000 em solução bloqueadora PGN/saponina [gelatina 0,25% (Sigma); NaN₃ 0,1% (Sigma); saponina 0,1% (Amersham) em PBS 1X]. A esta solução foi acrescentado o fluoróforo marcador de ácidos nucleicos DAPI (cloridrato de 4',6-diamindino-2-fenilindol; 10 µM, Molecular Probes) na diluição 1:1000.

Após a incubação, as lamínulas foram novamente lavadas duas vezes com PBS 1X, montadas sobre 30 µl de glicerol-PPD (p- fenilenodiamina, Sigma) sobre lâminas de vidro e seladas com esmalte transparente.

As análises microscópicas das lâminas foram realizadas no departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina em microscópio de fluorescência (Olympus BX51, Nikon). As imagens nas magnitudes de 40 e 100X foram capturadas utilizando o software Imaris 7.0 (Bitplane) utilizando filtros rodamina-TRITC (excitação/emissão: 557/576 nm) e DAPI (350/470 nm). Em cada tratamento, foram adquiridas imagens de três campos

por lamínula, considerando os campos que apresentavam fluorescência específica ao alvo, menor ruído de *background* e maior quantidade de células por campo.

Foram avaliados de forma qualitativa os feixes de actina polimerizada e de lamelipódios (projeções de actina para fora da superfície celular que desempenham papéis relacionados a migração e motilidade celular (Alberts *et al.*, 2007), considerando-se como alterações modificações no padrão de intensidade, fragmentação, amplificação e ou deleção dos feixes.

4.7 Extração de RNA e transcrição reversa

4.7.1 Extração do RNA total

O RNA total das células foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies) e seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante.

Quando a monocamada celular atingia 70 a 80% de densidade, as células eram submetidas ao processo de extração de RNA. Rapidamente após a remoção do meio de cultura, a monocamada celular era lavada três vezes com PBS 1x a 37 °C. Em seguida, o PBS era completamente removido e 3 ml de reagente TRIzol (para placas de 78 cm²) era adicionado sobre a monocamada celular sendo ressuspenso várias vezes na placa até perda de viscosidade. Em seguida, o conteúdo era transferido para três microtubos de 1,5 ml (1 ml em cada) e agitado em vortex por 30 segundos. Seguidamente, a fase aquosa era separada da fase fenol-clorofórmio adicionando 0,2 ml de clorofórmio (Merck) por microtubo e centrifugando a mistura a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa era coletada e 0,5 ml de isopropanol (Merck) acrescentado para cada 1 ml de reagente TRIzol usado. Os microtubos eram incubados a temperatura ambiente por 10 minutos e novamente centrifugados (12.000 x g, 10 min, 4 °C).

O sobrenadante era removido e o precipitado de cada microtubo lavado duas vezes com 1 ml de etanol 75% (Sigma) (centrifugado a 7.400 x g, 5 min, 4 °C). O

sobrenadante era descartado e o precipitado secado ao ar por 5 a 10 minutos. O RNA obtido nos três microtubos era solubilizado em 30 µl de água Milli-Q tratada com DEPC 0,1% (Sigma), agrupado em um único tubo e armazenado a -20 °C.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) em absorbância a 260 nm e 280nm. A relação entre as absorbâncias 260/280 nm foi utilizada para estimar a contaminação por proteínas. Foram considerados de boa qualidade os RNAs cuja relação 260/280 nm estivessem entre 1,8 e 2,0.

A integridade do RNA total foi avaliada por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com brometo de etídeo a 5 mg/ml e foram considerados RNAs de boa qualidade aqueles que apresentaram bandas correspondentes aos RNAs ribossomais (rRNAs) 28S com pelo menos o dobro da intensidade das bandas correspondentes ao rRNA 18S e não apresentarem um padrão de arraste no perfil de fracionamento eletroforético.

4.7.2 Transcrição reversa

A transcrição reversa foi feita utilizando o kit ImProm-II™ (Promega). Alíquotas de 2 µg do RNA total foram misturadas a 1 µl de iniciadores de oligo(dT)₁₅ (0,5 µg/µl) e H₂O Milli-Q DEPC 0,1% em quantidade suficiente para (q.s.p.) 5 µl sendo incubados a 70 °C por 10 min e depois mantidos no gelo. Em seguida, foram adicionados à reação 4,3 µl de H₂O DEPC, 4,0 µl de tampão ImProm 5X, 3,2 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,0 µl de dNTP mix (10 mM), 0,5 µl de RNasin (40 U/µl) e 1,0 µl da enzima ImProm RT (20 U/µl). A reação foi incubada a 25 °C por 5 min, 42 °C por 60 min e 70 °C por 15 min no termociclador (Corbett, Uniscience).

Para avaliação da qualidade da transcrição reversa, 1 µl do cDNA sintetizado foi utilizado como molde em uma reação de PCR utilizando iniciadores específicos para os genes de expressão constitutiva GAPDH (*forward* 5' - CTC TCT GCT CCT CCT GTT C - 3'; *reverse* 5' - GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC - 3') e NOTCH2 (*forward* 5' - TGT GGC CAA CCA GTT CTC CT 3'; *reverse* 5' - GGC AGT CAT CAA TAT TCC TC - 3'). As

reações, em volume total de 25 µl, foram feitas sob as seguintes condições: 2,5 µl de PCR Buffer 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl; Invitrogen); 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (Promega); 0,25 µl de dNTP mix 25 mM (Eppendorf); 0,125 µl da enzima Taq DNA polimerase (Gibco, 5 U/µl); 1 µl de cada iniciador (10 pmol/µl); H₂O Milli-Q q.s.p 25 µl. Os parâmetros utilizados para as reações de PCR foram: 95 °C / 5 min - 1 ciclo; 95 °C / 30 s, 55 °C / 45 s, 72 °C / 1 min – 35 ciclos; 72 °C / 10 min – 1 ciclo.

O produto amplificado das reações foi avaliado por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo e foram consideradas de boa qualidade as amostras que apresentavam amplificação da banda correspondente aos genes alvo sem sinais de inibição da reação. Os cDNAs de boa qualidade foram estocados em freezer a -20 °C para posterior análise de expressão gênica basal utilizando iniciadores específicos para PTX3, FGF2, FGF8 e FGFR1 a 4.

4.7.3 Construção de iniciadores

A construção dos iniciadores utilizados nesse trabalho atendeu a diferentes critérios com a finalidade de assegurar alta especificidade e alta reprodutibilidade na amplificação dos transcritos alvos. O resumo desses critérios é mostrado na tabela 2.

Inicialmente a sequência nucleotídica dos transcritos foi submetida a uma análise de similaridade por alinhamento através do algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 2014) visando identificar tanto a quantidade de transcritos com diferentes isoformas proteicas, bem como o grau de similaridade entre as sequências, assegurando que o iniciador construído possuísse regiões de anelamentos presentes em todas as isoformas do transcrito alvo.

Tabela 2. Critérios utilizados para a construção dos iniciadores.

| | |
|---|--|
| Tamanho do iniciador | 16 – 23 nt ótimo 20 nt |
| Tamanho do produto amplificado | PCR em tempo real: 70 a 145 bp PCR convencional: 250 a 650 bp |
| Temperatura de <i>melting</i> | 53 – 60 °C Max ≠ 1,5 °C |
| Conteúdo GC % | 40 – 65 |
| Junção de éxon-éxon | 6 nt em 5' – 4 nt em 3' |
| Homo e heterodímeros | $\Delta G > -9.0 \text{ kcal/mole}$ |
| <i>Hairpin</i> | $-2,0 \leq \Delta G \leq 1,0 \text{ kcal/mole}$ |
| Capaz de se anelar a diferentes isoformas | |

nt = nucleotídeos; ΔG energia livre de Gibbs.

Obtida a sequência de maior similaridade e identidade, foi utilizada a ferramenta Iniciador3 (NCBI) para determinar os critérios usados na construção dos iniciadores. A Refseq mRNA 9606 do banco de dados da NCBI foi utilizada para referência humana. Os critérios adotados foram:

1. Tamanho do iniciador: entre 16 e 23 nucleotídeos, sendo 20 nucleotídeos considerado o tamanho ótimo. Este critério foi estabelecido para minimizar a geração de produtos inespecíficos ocasionado por ligação aleatória dos iniciadores.
2. Temperatura de *melting* (T_M): iniciador preferencialmente entre 53 e 60 °C, com diferença máxima de 1,5 °C de temperatura entre os iniciadores *forward* e *reverse*.
3. Conteúdo GC: entre 40 e 65% do conteúdo total de nucleotídeos da sequência do iniciador. O conteúdo GC é determinante na T_M . Esses dois critérios visam evitar a formação de estruturas secundárias, que reduzem a eficiência na geração de produtos de PCR.
4. Tamanho do produto amplificado (*amplicon*): para PCR convencional entre 250 e 650 bp e para PCR em tempo real entre 70 e 145 nucleotídeos de extensão.

5. Região de anelamento: preferencialmente nas regiões de junções de éxons existentes no gene molde do transcrito em, no mínimo, 6 nucleotídeos na porção 5' e 4 nucleotídeos na porção 3' da sequência do transcrito. Como a sequência genômica correspondente ao transcrito possui íntrons, o objetivo desta estratégia é assegurar que não haja amplificação do DNA genômico nas reações de PCR.
6. Valores correspondentes ao Expected (E)-value: este parâmetro indica o acerto de alinhamento da sequência do iniciador ao transcrito (mRNA) de interesse no banco de dados. Quanto mais próximo do zero, mais significativo é o acerto entre as duas sequências (iniciador com a sequência do transcrito alvo).
7. Formação de estruturas secundárias: As sequências candidatas dos iniciadores que tiveram melhor E-value e anelamento específico ao alvo, foram avaliadas através do algoritmo OligoAnalyzer da IDTDNA quanto à formação de estruturas secundárias. Foram avaliados os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) correspondentes às estruturas de grampos (*hairpin*), homodímeros (capacidade do iniciador se anelar a ele mesmo) e heterodímeros (capacidade do iniciador *forward* se anelar ao *reverse*) (Manthey, 2005). Valores de $\Delta G \geq -9$ kcal/mole foram usados como referência uma vez que, valores menores são apontados inibidores de PCR.

4.8 Análise da expressão gênica basal

A análise de expressão gênica basal foi feita utilizando iniciadores para os genes PTX3, FGF2, FGF8, FGFR1 a 4 e para os genes estimulados por FGF2 (Kashpur *et al.*, 2013), CXCL5 (ligante 5 quimiocina motivo C-X-C) e PTGS2 (prostaglandina-endoperoxidase-sintase 2) desenhados conforme descrito no tópico 4.3.

As reações de PCRs foram feitas nas seguintes condições: 2,5 μ l de tampão de PCR 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 500 mM KCl; Invitrogen), 1,5 μ l de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega), 0,25 μ l de mix de dNTP a 25 mM cada (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; Eppendorf), 1,0 μ l de iniciador *forward* a 10 pmol/ μ l (IDT DNA), 1,0 μ l de iniciador

reverse a 10 pmol/ μ l (IDT DNA), 0,125 μ l de Taq DNA polimerase 5 U/ μ l (Gibco), 1,0 μ l do cDNA molde, H₂O Milli-Q q.s.p 25 μ l. Como controles negativos foram feitas reações contendo todos os reagentes citados à exceção do cDNA molde (1 μ l de H₂O Milli-Q), ou, alternativamente, quando indicado, 1 ng de DNA genômico extraído de células Wish (células de membrana amniótica humana).

As reações foram incubadas no termociclador (Martercycle, Eppendorf) programado com a seguinte ciclagem: 1 ciclo de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da PCR (*amplicon*) foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1X corado com brometo de etídeo a 5 mg/ml e analisados sob iluminação UV (UVP Benchtop transiluminator). A análise das banda correspondente aos genes de interesse se deu por comparação do tamanho esperado do *amplicon* com as bandas do marcador molecular Pel HIND III (Plasmídeo Pel 45 digerido com endonuclease de restrição HIND III) gerando as bandas de tamanho conhecido de 3800, 2078, 1718, 1051, 678 e 265 pares de bases (bp).

Quando necessário, presença de bandas inespecíficas ou baixa amplificação do produto, as reações foram otimizadas visando aumento ou a diminuição da estringência pela modificação das temperaturas de anelamento (T_A) ou regulando as concentrações de MgCl₂ nas reações.

Para certificação de que a estratégia de construção dos iniciadores em regiões de junções de éxons estava sendo eficaz na prevenção de amplificação a partir de DNA genômico, foram feitas reações usando como molde 100 ng de RNA total. Dessa forma foi possível estimar a contaminação de DNA genômico no RNA total extraído e sua contribuição na formação do produto amplificado.

4.9 Análise estatística

Na avaliação da proliferação celular pelo método de MTT e Azul de Tripán, para comparação de variáveis contínuas em apenas dois grupos de comparação não paramétrico foi empregado o teste ANOVA com correção de Geisser-Greenhouse.

Foram considerados valores estatisticamente significantes aqueles com $p < 0,05$. Os gráficos representativos dos resultados foram obtidos no software Microsoft Excel 2013 e as análises estatísticas foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Características morfológicas das linhagens celulares

A observação por microscopia ótica de contraste de fase foi utilizada em todas as etapas dos experimentos para análise da morfologia das linhagens celulares na cultura *in vitro*.

A linhagem SW 480 é derivada de adenocarcinoma primário de cólon humano. O crescimento destas células foi descrito originalmente por Leibovitz como uma “mistura de pequenas ilhas de células epiteliais e células bipolares individuais”. Em análises por microscopia eletrônica, a linhagem SW 480 apresenta um aspecto poligonal com microvilos (Leibovitz *et al.*, 1976). O mesmo padrão descrito por ele foi observado nas nossas culturas como é mostrado na figura 11 A-1. Células do tipo epitelial, formato fusiforme, que crescem fortemente aderidas à superfície das placas para cultura celular, tendendo a formar agregados multicelulares bem característicos.

SAOS 2 é uma linhagem derivada de osteosarcoma humano primário e foi isolada por Fogh (Fogh, Fogh e Orfeo, 1977). Não têm potencial tumorigênico quando injetadas em camundongos NUDE (Rodan *et al.*, 1987; Muff *et al.*, 2007). A linhagem possui uma morfologia tipo osteoblasto, onde as células em culturas subconfluentes são grandes e poligonais com núcleo arredondado ou em forma de elipse, apresentando heterogeneidade na população (Rodan *et al.*, 1987; Muff *et al.*, 2007). A morfologia das células SAOS 2 (figura 11 A-3) observada nos nossos experimentos apresenta um padrão muito similar ao descrito por Muff (2007).

A linhagem HT1080 é proveniente de um fibrosarcoma isolado de acetábulo humano (Rasheed *et al.*, 1974). Apresenta uma quantidade numerosa de células gigantes multinucleadas, mas a cultura é composta predominantemente por células com tipo morfológico arredondado cuja superfície celular é lisa, sem microvilos. Em confluência, crescem sobrepostas em camadas múltiplas, formando “microtumores”. Nas nossas culturas (figura 11 A-5), HT 1080 apresentou aspecto semelhante ao descrito por Rasheed (1974) onde se observam células grandes, heterogêneas e

achatadas. É uma linhagem altamente proliferativa, ocupando rapidamente a superfície de crescimento.

A linhagem HCT116 foi isolada de carcinoma colorretal humano. Apresenta morfologia do tipo epitelial e suas populações são descritas por Brattain (1981) como "células poligonais de forma compacta". Apresentam alto potencial de formação de colônias em ensaios de soft-agar sendo altamente tumorigênicas em xeno enxerto subcutâneo em camundongos NUDE (Brattain *et al.*, 1981; Rajput *et al.*, 2008). Nas linhagens cultivadas nesse projeto, as células cresceram de forma muito agrupada, formando grumos com poucas ou nenhuma junção livre entre as células onde é difícil a visualização individual das células (figura 11 A-7).

CACO-2 é uma linhagem contínua derivada de adenocarcinoma colorretal do intestino grosso de humanos. Foi isolada no Sloan-Kettering Institute for Cancer Research por Jorgen Fogh (Fogh, 1975). Em cultivo, CACO-2 se diferencia espontaneamente, expressando diversas características morfológicas e funcionais de enterócitos maduros. São células que crescem em monocamada, apresentando morfologia cilíndrica polarizada, com microvilosidades no lado apical e pequenas junções entre as células adjacentes. A população de células, mesmo em fase estacionária de crescimento, é caracterizada pela presença de subpopulações com morfologias variadas (revisado por Sambuy *et al.*, 2005) também observadas nos nossos cultivos (figura 11 A-9).

SK-MEL 188 (figura 11 A-13) e SK-MEL 37 (figura 11 A-11) são linhagens de melanoma humano isolados de pacientes do Memorial Sloan Kettering (SK) Cancer Center, ambas possuem formato achatado e predominantemente fusiforme. SK-MEL 188, comparativamente as outras linhagens, é a que apresenta extremidades mais alongadas e estreitas (Carey *et al.*, 1976; Spielholz *et al.*, 1995).

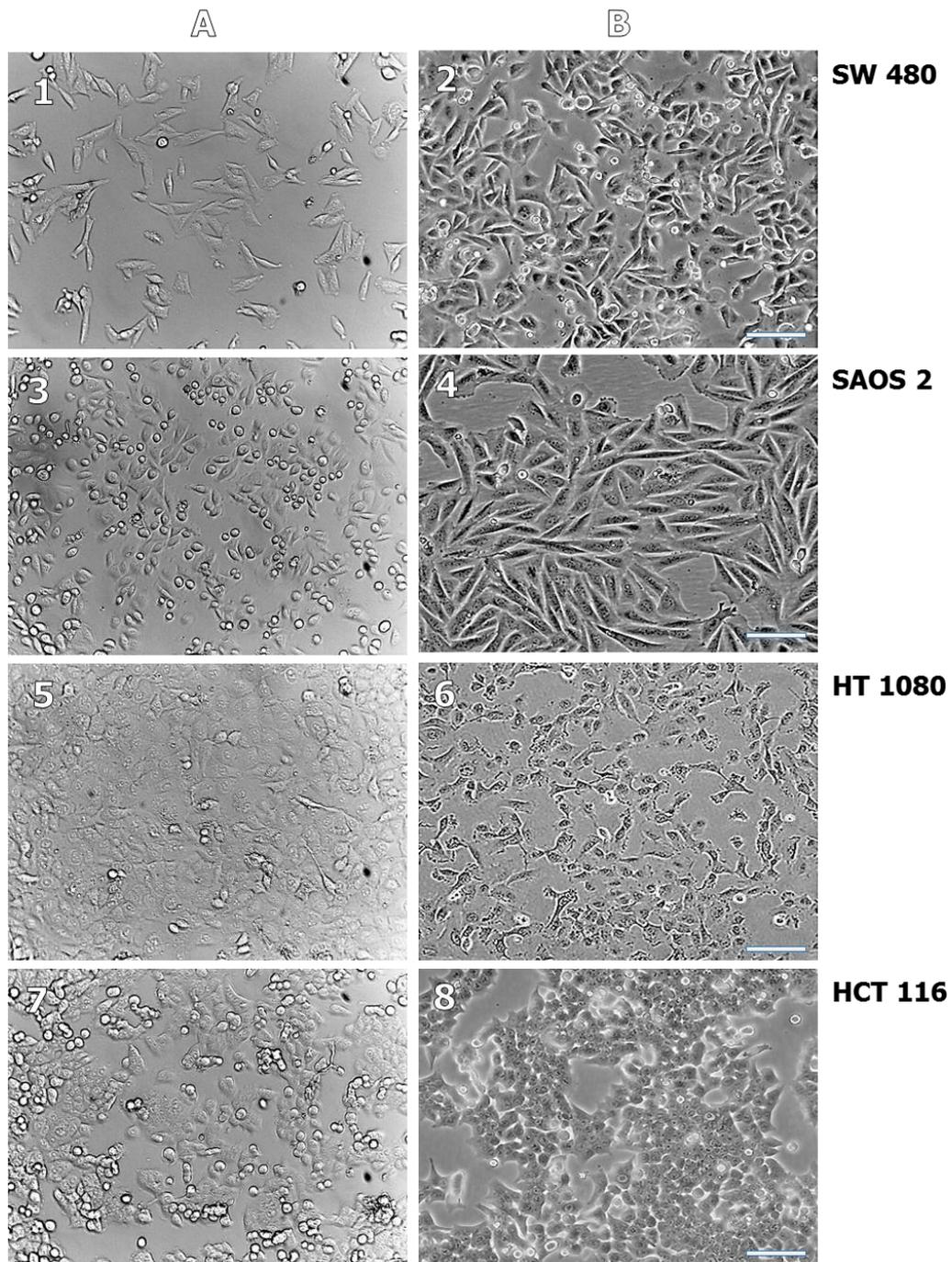


Figura 11.1 Aspectos morfológicos das células tumorais cultivadas *in vitro*.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio específico suplementado com 10% de FBS, 1% de antibióticos e L-glutamina em estufa a 37 °C e atmosfera saturada com 5% de CO₂. Nos painéis da esquerda (A) são mostradas as fotomicrografias das células cultivadas no nosso laboratório para uso neste projeto. Nos painéis da direita (B), imagens das mesmas células fornecidas pela ATCC e publicadas pelo grupo de origem da linhagem. Microscopia de contraste de fase, magnitude do aumento de 40x. Barra de escala 100 μm.

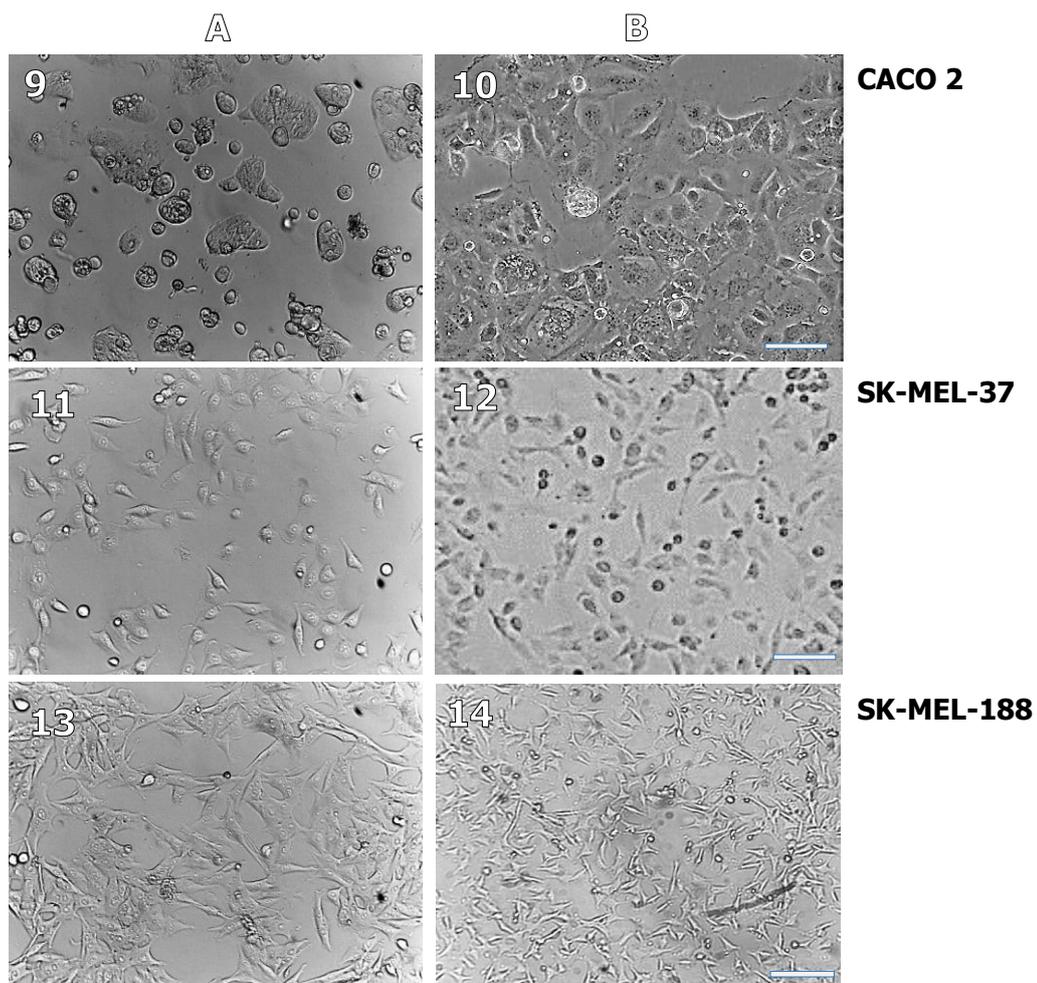


Figura 11.2. Aspectos morfológicos das células tumorais cultivadas in vitro.

As linhagens celulares foram cultivadas em meio específico suplementado com 10% de FBS, 1% de antibióticos e L-glutamina em estufa a 37 °C e atmosfera saturada com 5% de CO₂. Nos painéis da esquerda (A) são mostradas as fotomicrografias das células cultivadas no nosso laboratório para uso neste projeto. Nos painéis da direita (B), imagens das mesmas células fornecidas pela ATCC e publicadas pelo grupo de origem da linhagem. Microscopia de contraste de fase, magnitude do aumento de 40x. Barra de escala 100 µm.

5.2 Curva de crescimento das células

O tempo de dobramento das linhagens de células tumorais HT 1080, SAOS 2, HCT 116, SW 480, CACO 2, SK-MEL 37 e SK-MEL 188 foi avaliado estimando-se a evolução da confluência das culturas em monocamada ao longo do tempo.

Foram adotadas duas estratégias: na primeira as células foram cultivadas na presença de 10% de soro durante todo o tempo (curvas da esquerda nos gráficos, Figura 12 e 13); na segunda condição, as células foram privadas de soro (0,5%) por um período de 22 horas, após o qual o meio de cultura foi substituído por um outro suplementado com 10% de FBS. Esta segunda estratégia foi adotada buscando-se sincronizar o ciclo de divisão celular das culturas.

As células foram semeadas em placas de cultura de 24 poços (1,9 cm²/poço) nas quantidades de 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 e 8×10^4 células viáveis por poço (avaliadas pela coloração com o corante Azul de Tripán). Após 18h de incubação, o meio foi substituído para remoção das células não aderidas. Nas culturas sem privação de soro o meio foi substituído por um novo contendo 10% de FBS (tempo 0h para as curvas da esquerda nos gráficos – Figura 12 e 13).

Nas culturas privadas de soro, por sua vez, após 18h o meio foi substituído por outro contendo 0,5% de FBS e as mesmas foram incubadas sob privação de soro por 22h. Após este tempo, foi acrescentado 10% de FBS às culturas (tempo 0 para as curvas da direita dos gráficos – Figura 12 e 13).

A cada tempo indicado, as culturas foram observadas sob microscopia ótica de contraste de fase e a confluência da monocamada estimada em porcentagem de área ocupada pela monocamada em relação à área da superfície livre total do poço de 1,9 cm² da placa de cultura (figura 12 e 13).

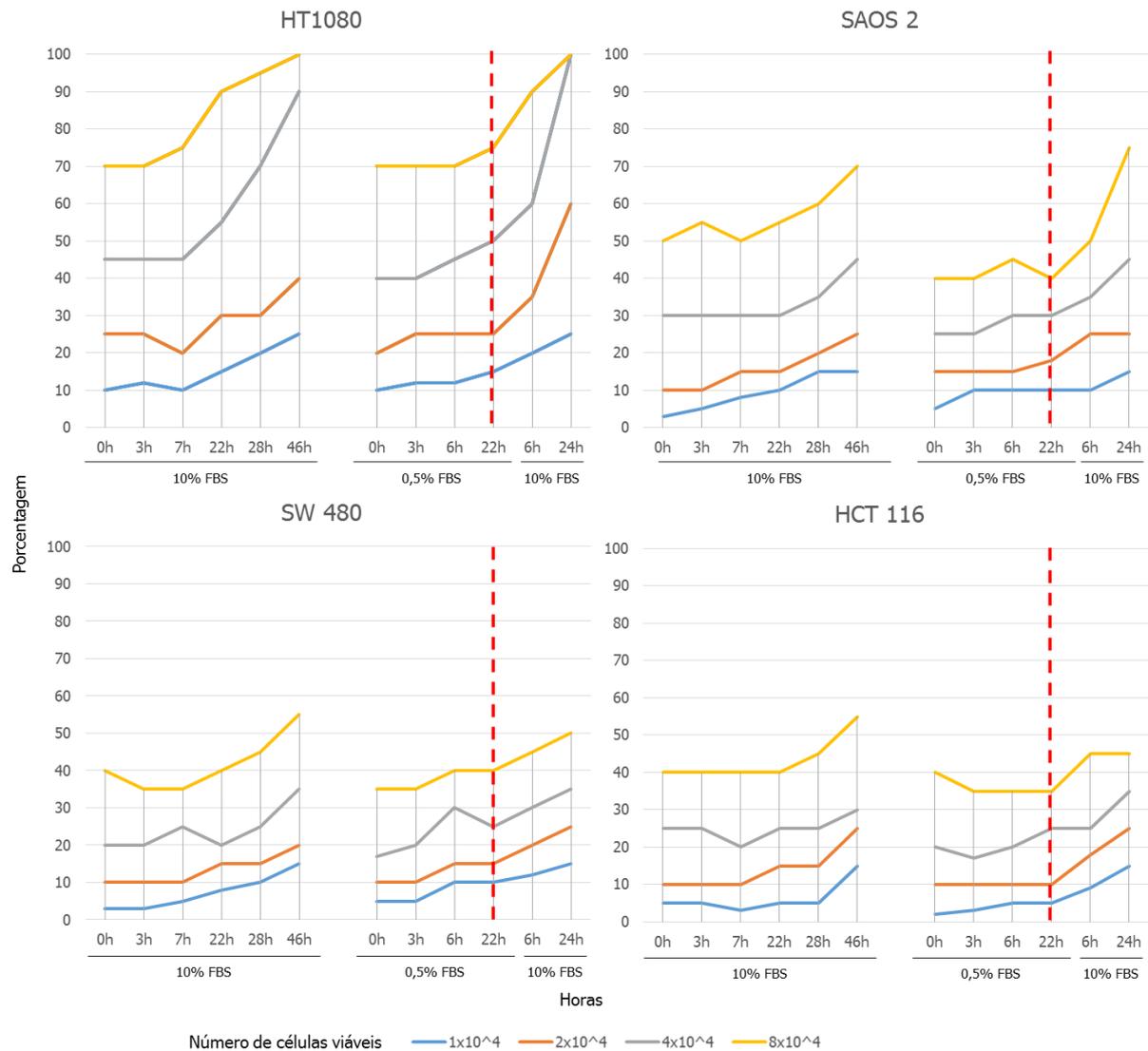


Figura 12. Curva de crescimento das linhagens tumorais humanas HT 1080, SAOS 2, SW 480 e HCT 116 na presença de 0,5% e 10% de FBS.

As linhagens tumorais foram semeadas nas quantidades de 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 e 8×10^4 em meio contendo 10% de FBS por 46h ou em meio contendo 0,5% de FBS por 22h sendo, em seguida, novamente suplementado com 10% FBS por mais 24 horas como especificado. A curva foi construída através da análise por microscopia ótica de contraste de fase onde foi observada a porcentagem relativa entre a área ocupada pela monocamada celular e área livre disponível para crescimento na superfície dos poços de 1,9 cm². Linhas pontilhadas em vermelho indicam tempo final de privação de soro (0,5%) e reposição de 10% de FBS no meio de cultura.

Na linhagem de fibrosarcoma humano HT 1080, é possível mensurar o tempo de dobramento de ± 24 horas evidenciado nas quantidades de 2×10^4 e 4×10^4 no gráfico imediatamente após a suplementação com 10% de FBS após privação por 22 horas. Nas demais linhagens, em virtude do tempo de experimentação, não foi possível indicar um tempo exato de dobramento, porém é possível estimar que a linhagem de

osteosarcoma humano tem tempo de dobramento >24 horas e de ∓ 6 horas na linhagem HCT 116 quando semeada a 1×10^4 e 2×10^4 .

Não foi possível mensurar o tempo de dobramento para ambas as linhagens de carcinomas de cólon SW 480 (figura 12) e CACO 2 (figura 13) em virtude de tempo de cultivo ser insuficiente para a expansão da cultura.

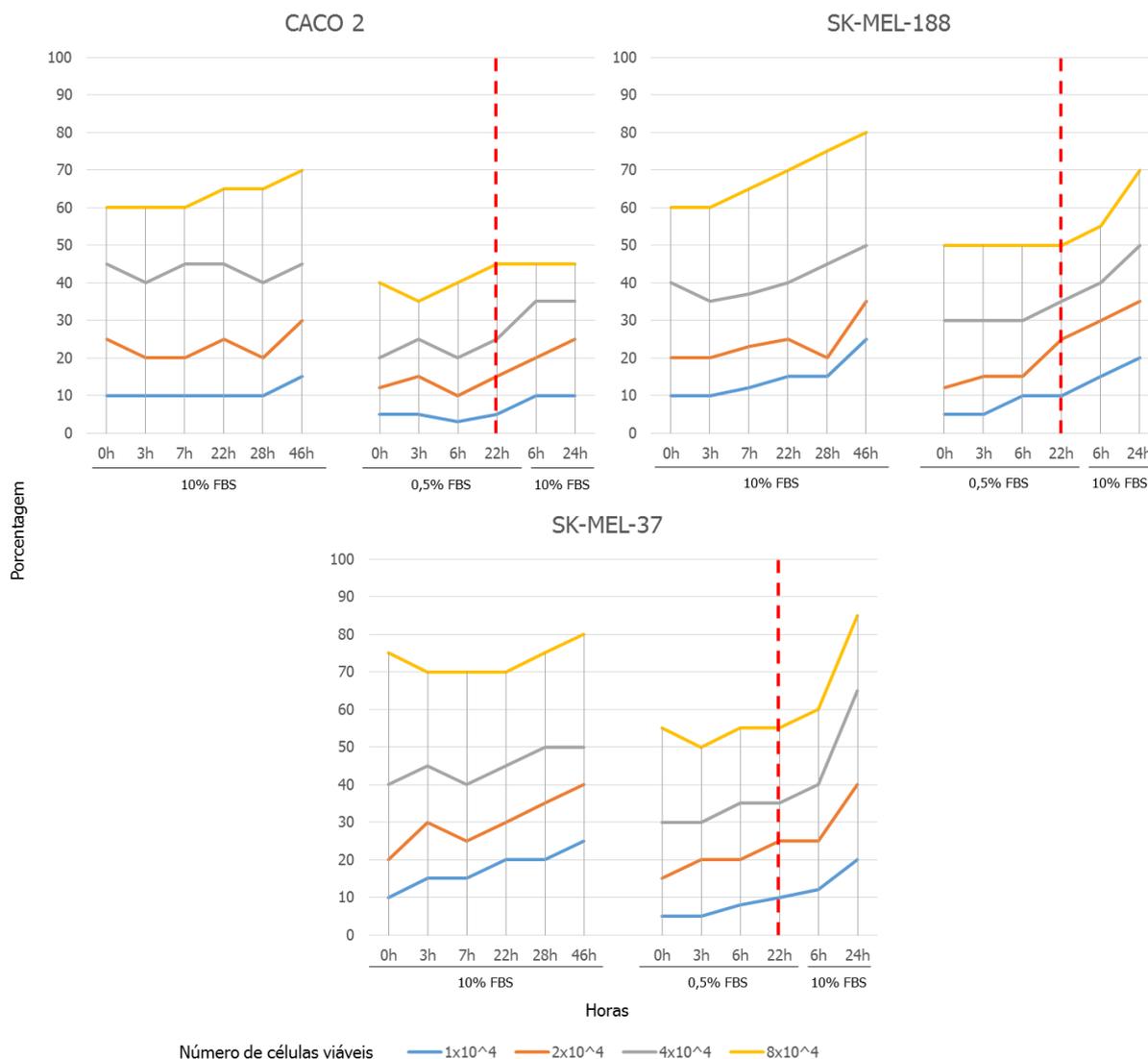


Figura 13. Curva de crescimento das linhagens tumorais humanas CACO 2, SK-MEL 188 e SK-MEL 37 na presença de 0,5% e 10% de FBS.

As linhagens tumorais foram semeadas nas quantidades de 1×10^4 , 2×10^4 , 4×10^4 e 8×10^4 em meio contendo 10% de FBS por 46h ou em meio contendo 0,5% de FBS por 22h sendo, em seguida, novamente suplementado com 10% FBS por mais 24 horas como especificado. A curva foi construída através da análise por microscopia ótica de contraste de fase onde foi observada a porcentagem relativa entre a área ocupada pela monocamada celular e área livre disponível para crescimento na superfície dos poços de $1,9 \text{ cm}^2$. Linhas pontilhadas em vermelho indicam tempo final de privação de soro (0,5%) e reposição de 10% de FBS no meio de cultura.

Nas linhagens de melanoma humano SK-MEL 37 e SK-MEL 188, o tempo de dobramento pode ser estimado em aproximadamente 24 horas nas quantidades semeadas de 1×10^4 e 3×10^4 de células por poço de $1,9 \text{ cm}^2$ de SK-MEL 37 e de 1×10^4 células de SK-MEL 188. Em ambos os casos os dados foram obtidos das curvas da direita provenientes da privação de soro por 22 horas seguido de suplementação com 10% de FBS.

De acordo com os dados obtidos nesses gráficos, estipulamos o número de células a serem plaqueadas para os experimentos seguintes de análise de proliferação celular pelos métodos MTT e Azul de Tripán, bem como para os ensaios de alteração morfológica do citoesqueleto de actina-F por imunofluorescência.

5.3 Avaliação das alterações na taxa de proliferação celular das linhagens em resposta ao tratamento com rhPTX3

A taxa de proliferação celular, bem como o impacto de PTX3 recombinante humana sobre ela foram avaliados por microscopia ótica (figura 14) pelo ensaio usando MTT (figura 15A) e pelo corante vital Azul de Tripán (figura 15B). O método MTT avalia a proliferação celular por atividade mitocondrial das células aderidas na placa de cultura por espectrofotometria. O ensaio com Azul de Tripán além de fornecer a quantidade de células vivas contadas em câmara de Neubauer, fornece a viabilidade da cultura (figura 15C). Essas medições foram realizadas nos tempos 0, 24h, 48h e 72 horas após o tratamento das células com rhPTX3 ($10 \mu\text{g/ml}$) em $250 \mu\text{l}$ de meio contendo 0,5% ou 2% FBS.

Na figura 14, são mostradas fotomicrografias representativas da cultura de fibrosarcoma humano HT 1080 antes (Tempo 0) e após o tratamento com a PTX3 em meio contendo 0,5% de FBS. A confluência não sofreu grandes alterações, permanecendo em volta de 70% durante todo o tempo do experimento, com exceção do tempo de 72h quando foi observado um desprendimento das células da monocamada e a presença de muitas células mortas em suspensão. Nos poços das culturas controle o mesmo perfil de confluência foi observado (imagens não mostradas).

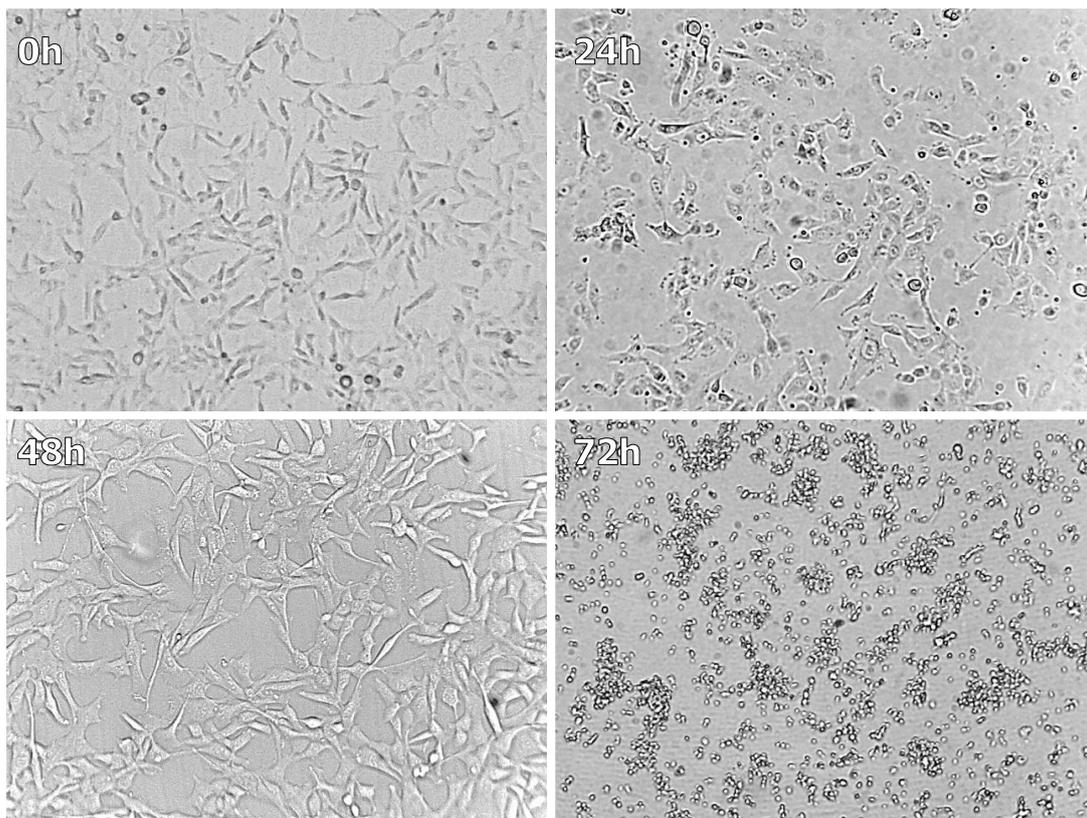


Figura 14. Aspectos da linhagem HT 1080 durante o ensaio de proliferação celular em presença de PTX3 em meio 0,5% FBS.

Um total de 50 mil células da linhagem tumoral de HT 1080 foram semeadas em poços de 1,9 cm² em meio DMEM com 10% FBS, 1% de antibióticos 1% e L-glutamina sendo incubadas a 37 °C em estufa com atmosfera saturada 5% de CO₂. Após 5h, as células não aderidas foram removidas e foi acrescentado meio contendo 0,5% de FBS. As células foram incubadas e dezesseis horas após a incubação, as células foram submetidas ao tratamento com 10 µg/ml de rhPTX3. As culturas foram avaliadas morfológicamente por microscopia ótica de campo claro nos tempos 0h, 24h, 48h e 72h. Magnitude de aumento: 0, 24 e 72h – 40X; 48h – 100X.

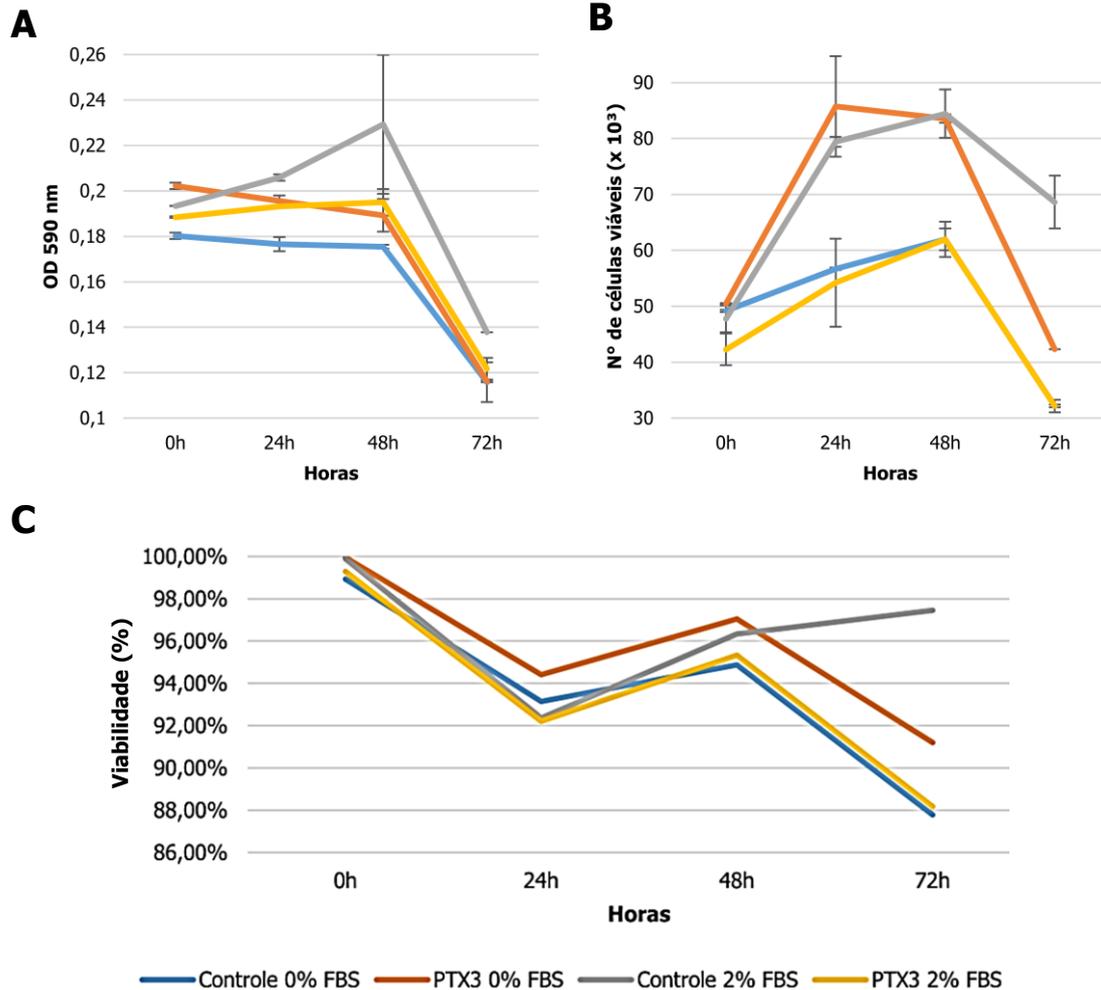


Figura 15. Análise da proliferação celular por MTT e Azul de Tripán.

Uma quantidade de 50 mil células foram plaqueadas em triplicata em poços de 1,9 cm² e cultivadas em meio 10% de FBS até atingir confluência de 70%. Após esse tempo, a cultura foi privada de soro por 16 horas e a mesma foi tratada com rhPTX3 como mostra o esquema acima. **Azul:** 0% FBS; **laranja:** PTX3 0% FBS; **cinza:** 2% FBS e **amarelo:** PTX3 2% FBS. As linhas representam a proliferação celular. **A)** MTT nos tempos 0, 24, 48 e 72h com 10 µg/ml de rhPTX3; -p=0,0717. **B)** ensaio com Azul de Tripán nos tempos 0, 24, 48 e 72h com 10 µg/ml de rhPTX3; p=0,0394. **C)** porcentagem das células viáveis. OD 590 – densidade ótica a 590 nm. Barras de erro: desvio padrão.

Na contagem de células pelo ensaio com Azul de Tripán (figura 15B), a curva no tempo 48h indica que houve inibição da proliferação no grupo tratado com rhPTX3 em meio contendo 2% de FBS comparado ao grupo controle 2% de FBS (p=0,0394). Embora uma tendência de aumento da taxa de proliferação celular promovida por PTX3 tenha sido observada nas condições em que o soro foi suprimido, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as curvas das células

tratadas com a pentraxina 3 em comparação com as não tratadas em nenhum dos tempos analisados.

Em relação a viabilidade celular (figura 15C), todas as culturas apresentaram perda na taxa de viabilidade nas primeiras 24 horas. A cultura cujo meio de cultura foi suplementado com 2% de FBS, manteve a maior taxa mesmo após 72h de incubação (~98%). As curvas mostram que PTX3 aparentemente não interfere na viabilidade da linhagem HT 1080.

5.4 Avaliação das alterações no citoesqueleto das linhagens HT 1080, HCT 116, SK-MEL 37 promovidas pelo tratamento das mesmas com rhPTX3

Foram analisadas por imunofluorescência as possíveis modificações no citoesqueleto das linhagens tumorais em resposta ao tratamento com a rhPTX3. Para este ensaio, foram selecionadas as linhagens HCT 116, HT 1080 e SK-MEL 37 as quais apresentaram expressão basal do gene FGF2 (figura 25).

As células foram cultivadas em lamínulas tratadas para aderência celular colocadas em placas de 24 poços, conforme descrito no tópico 4.6.2 e tratadas com 10 µg/ml de rhPTX3 por três horas em meio específico para cada célula suplementado com 0,5% de FBS, contendo 1% de antibióticos e L-glutamina. Os tratamentos foram feitos em duplicatas e as imagens foram capturadas em três áreas diferentes de cada lâmina.

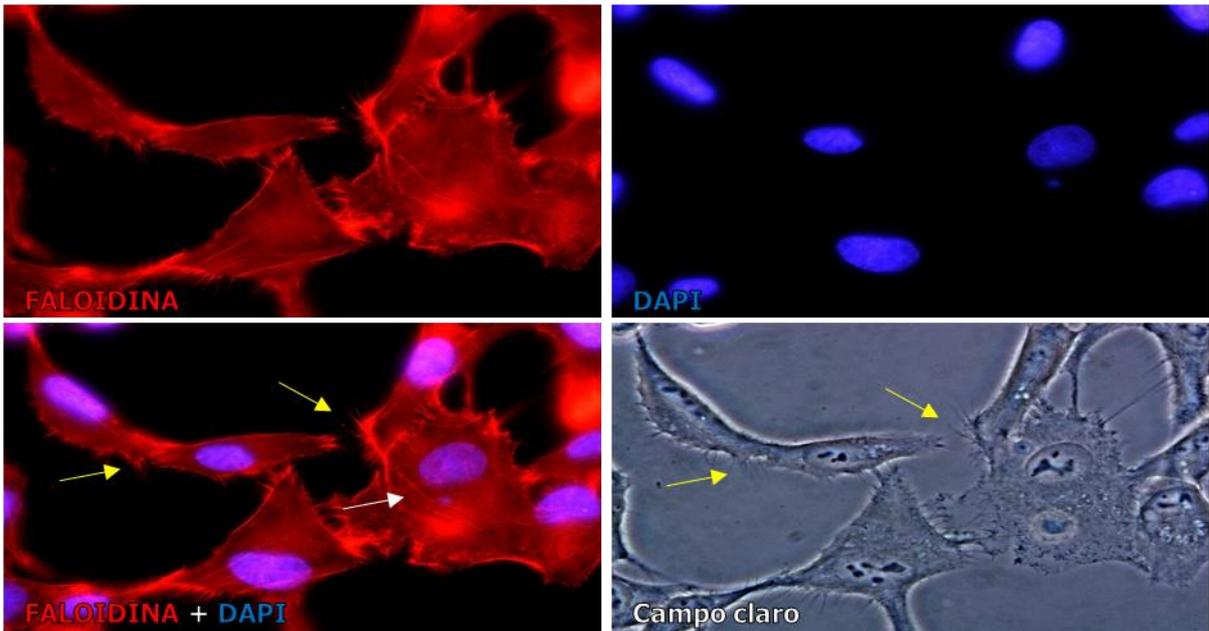
Nas células HT 1080 foram observados grandes números de filopódios e fibras transcitoplasmáticas. O padrão de coloração para actina parece estar mais homogêneo sem áreas mais intensas ao redor do núcleo (figura 16.1A). A exceção da aparente diminuição do número de filopódios, nenhuma outra alteração foi observada nas células após o tratamento com rhPTX3 (figura 16.1B).

Em SK-MEL 37 (figura 16.2C e D) não foram evidenciadas diferenças relevantes de marcação entre os grupos controle e tratados. As células de ambas as

culturas apresentaram filopódios curtos abundantes, e as fibras transcelulares foram evidenciadas com intensidade maior de marcação na região cortical das células.

Na figura 16.3, são mostradas fotomicrografias representativas das culturas das células HCT 116 que foram feitas em duplicatas. Foi observado nas células controle não tratadas, uma coloração para actina (vermelho) mais intensa nas regiões corticais das células (setas amarelas) bem como uma área de intensidade maior, perinuclear em um dos polos dos núcleos (cabeça de seta em verde no detalhe da figura 16.3E). Inúmeras fibras transcelulares também foram visualizados (setas brancas na Figura 16.3E). O padrão de actina nas células tratadas parece ser mais difuso (figura 16.3F) em comparação com o controle, não tendo sido observados nestas células filamentos transcelulares e nem tampouco áreas mais intensas de coloração ao redor dos núcleos. Parece também haver uma diminuição da frequência de filopódios nas células tratadas (Figura 16F).

A HT 1080 controle



B HT 1080 tratado

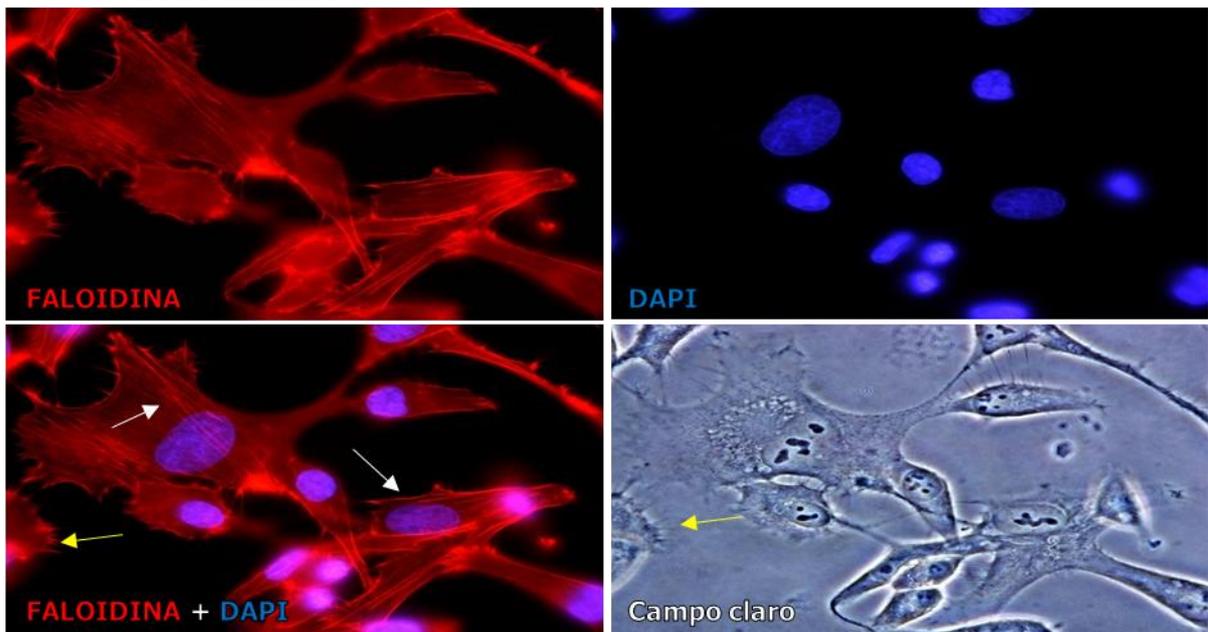
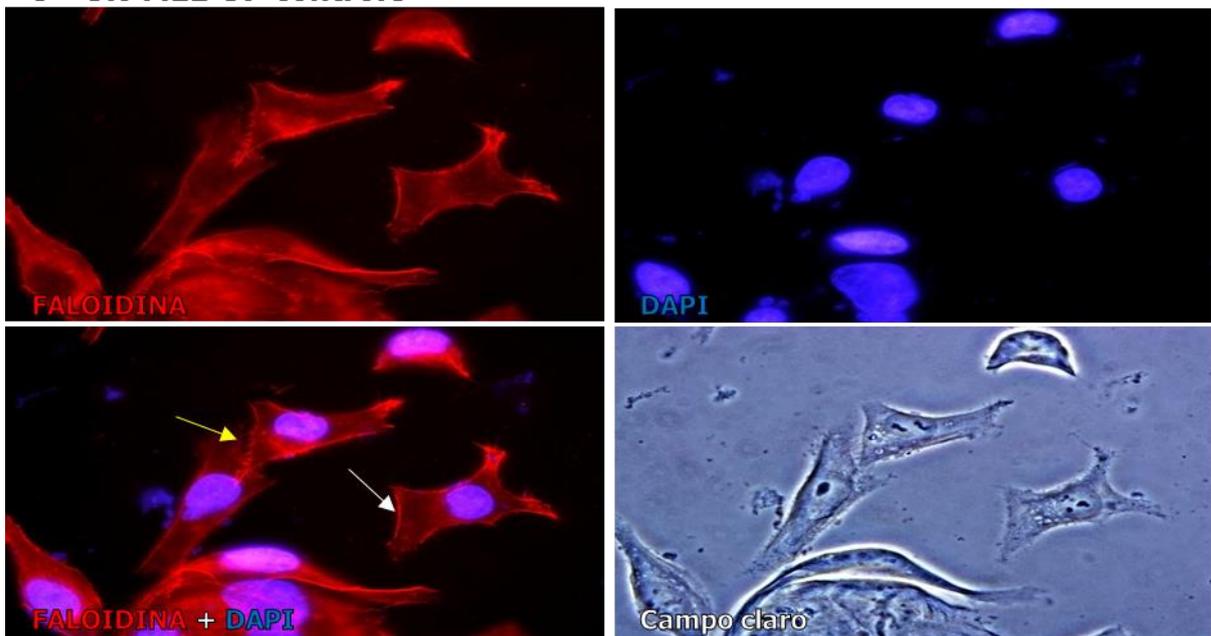


Figura 16.1 Fotomicrografias de fluorescência das linhagens HT 1080, SK-MEL 188 e HCT 116.

Em **A** e **B**, a linhagem HT 1080 foi semeada numa quantidade de 3×10^4 células/poço de 1,9 cm² contendo DMEM e 10% de FBS por 24 horas. Após esse tempo a cultura foi lavada 2x com PBS 1X 37 °C para remoção de células mortas e de resíduos de FBS e as células foram incubadas em DMEM 0,5% de FBS por mais 24 horas. Em seguida, no grupo controle, o meio foi trocado para DMEM 0,5% FBS e no grupo tratado DMEM 0,5% + 10 µg/ml de rhPTX3. Ambos foram incubados por 3 horas. Após, a monocamada celular foi lavada 2x com PBS 1X 37 °C e as células foram fixadas com PFA 4% sendo seguidamente incubadas com faloidina-TRIC e DAPI por 1 hora e as fotomicrografias foram obtidas por fluorescência. As setas em branco indicam os feixes de actina. As setas em amarelo apontam os lamelipódios e extensões de filopódios.

C SK-MEL-37 controle



D SK-MEL-37 tratado

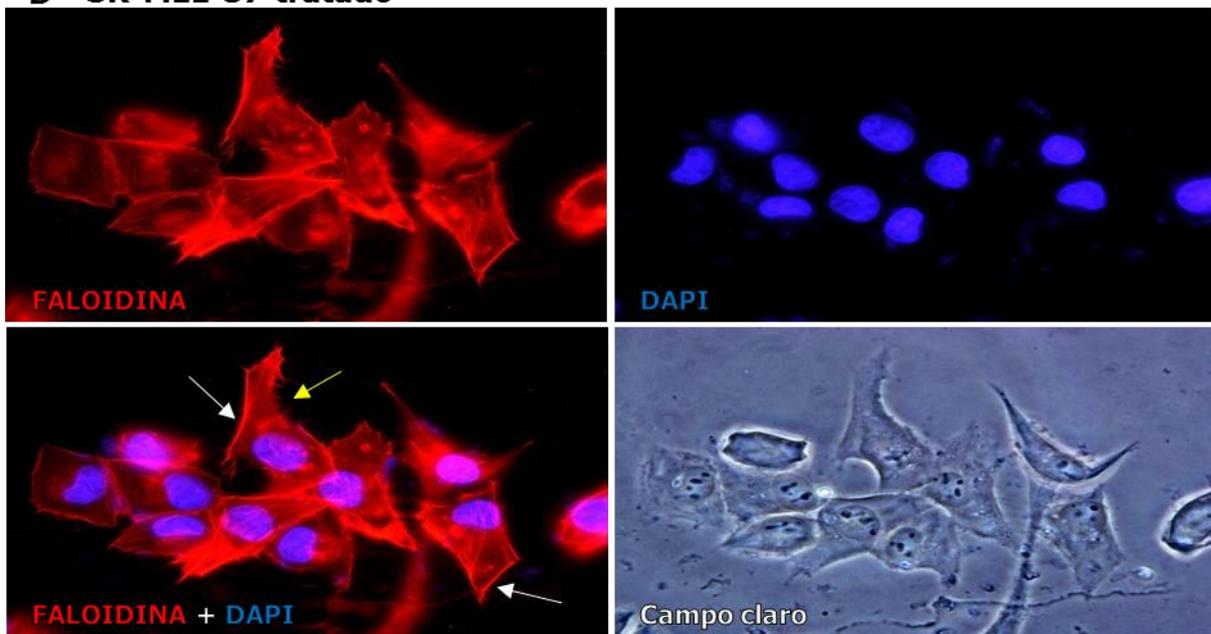
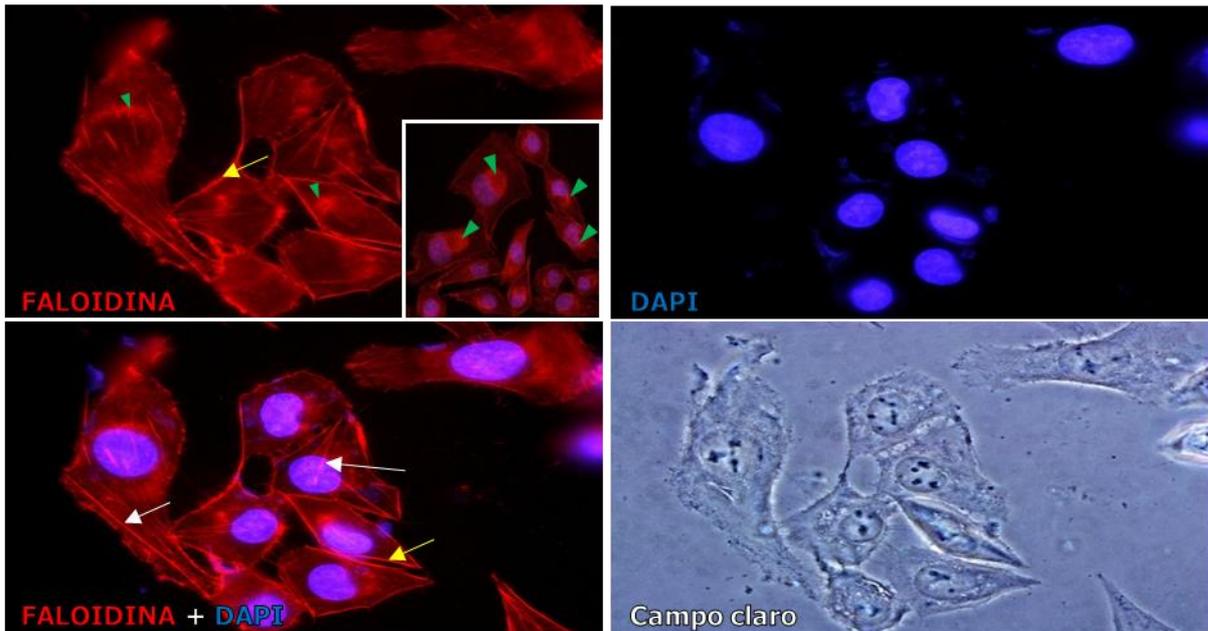


Figura 16.2 Fotomicrografias de fluorescência das linhagens HT 1080, SK-MEL 188 e HCT 116.

Em **C** e **D**, a linhagem de melanoma humano SK-MEL 37 foi semeada numa quantidade de 4×10^4 células/poço de $1,9 \text{ cm}^2$ contendo DMEM e 10% de FBS por 24 horas. Após esse tempo a cultura foi lavada 2x com PBS 1X 37 °C para remoção de células mortas e de resíduos de FBS e as células foram incubadas em DMEM 0,5% de FBS por mais 24 horas. Em seguida, no grupo controle, o meio foi trocado para DMEM 0,5% FBS e no grupo tratado DMEM 0,5% + 10 $\mu\text{g/ml}$ de rhPTX3. Ambos foram incubados por 3 horas. Após, a monocamada celular foi lavada 2x com PBS 1X 37 °C e as células foram fixadas com PFA 4% sendo seguidamente incubadas com faloidina-TRIC e DAPI por 1 hora e as fotomicrografias foram obtidas por fluorescência. As setas em branco indicam os feixes de actina. As setas em amarelo apontam os lamelipódios e extensões de filopódios.

E HCT 116 controle



F HCT 116 tratado

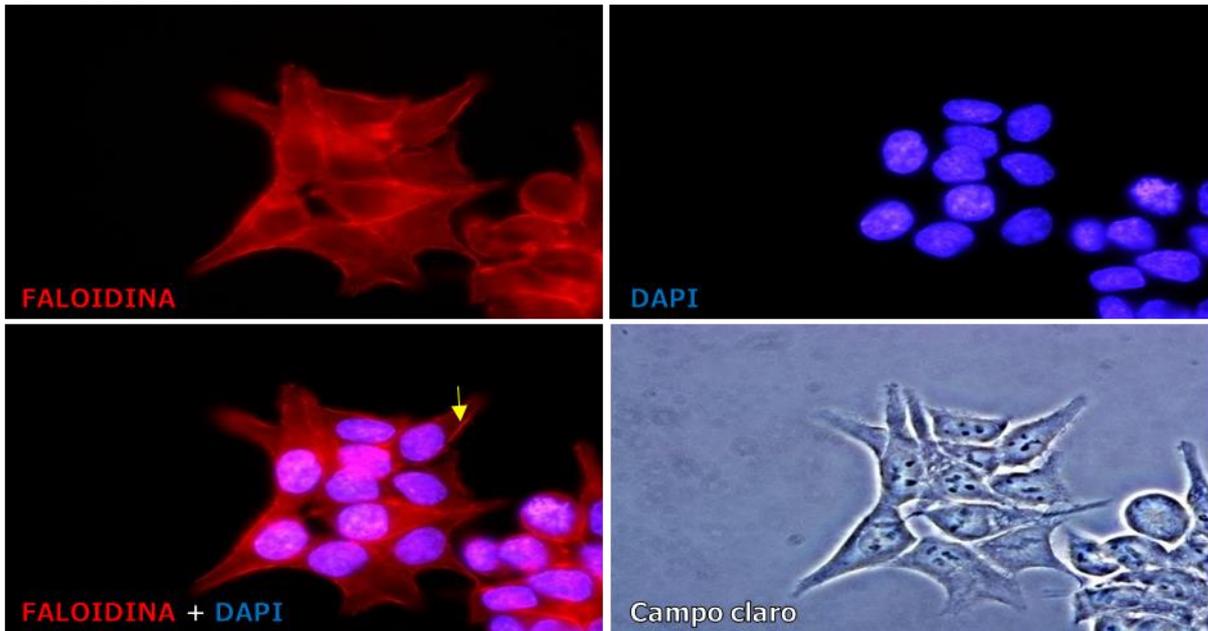


Figura 16.3 Fotomicrografias de fluorescência das linhagens HT 1080, SK-MEL 188 e HCT 116.

Em **E** e **F**, a linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT 116 foi semeada numa quantidade de 8×10^4 células/poço de $1,9 \text{ cm}^2$ contendo meio McCoy e 10% de FBS por 24 horas. Após esse tempo a cultura foi lavada 2x com PBS 1X 37°C para remoção de células mortas e de resíduos de FBS e as células foram incubadas em McCoy 0,5% de FBS por mais 24 horas. Em seguida, no grupo controle, o meio foi trocado para McCoy 0,5% FBS e no grupo tratado McCoy 0,5% + $10 \mu\text{g/ml}$ de rhPTX3. Ambos foram incubados por 3 horas. Após, a monocamada celular foi lavada 2x com PBS 1X 37°C e as células foram fixadas com PFA 4% sendo seguidamente incubadas com faloidina-TRIC e DAPI por 1h e as fotomicrografias foram obtidas por fluorescência. Setas em branco: feixes de actina. As setas em amarelo apontam as fibras de actina na região cortical da célula. Cabeças de seta em verde: marcação perinuclear.

5.5 Análise do perfil de expressão basal dos genes

5.5.1 Desenho dos iniciadores

Para o início da construção dos iniciadores, as sequências dos transcritos (mRNAs) foram analisadas utilizando o programa BLASTn. Foi observado que, dos nove genes alvos, cinco codificavam diferentes isoformas. A fim de construir um iniciador que se anelasse a todos, foi selecionada a região de maior similaridade entre as isoformas.

Vários critérios foram utilizados para a construção dos iniciadores incluindo anelamento em junção de éxon (quando possível), formação de estruturas secundárias analisados (figura 17 e 18), conteúdo GC e temperatura de *melting* (T_M). O resumo geral dos iniciadores está descrito na tabela 3.

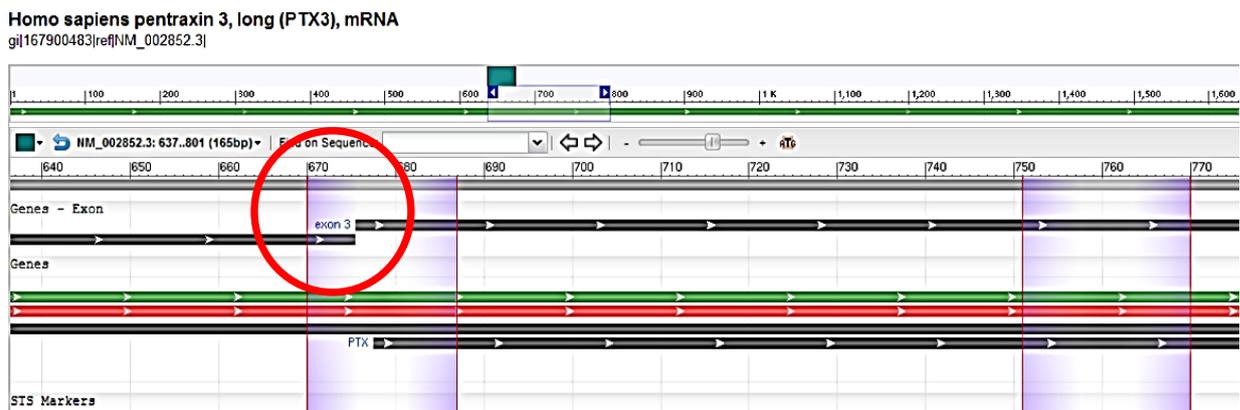


Figura 17. Representação da região da sequência do transcrito de PTX3 usada na construção dos iniciadores para RT- PCR.

Gráfico representativo da sequência do mRNA de PTX3 (NCBI) indicando a região de junção de éxons utilizada preferencialmente para construção do iniciador *forward*. Nº de acesso: NCBI NM_002852.3. Os retângulos roxos apontam a posição dos iniciadores construídos para esse mRNA. A região circulado em vermelho, indica a junção de éxon que serviu como região delimitante para a construção do iniciador *forward*.

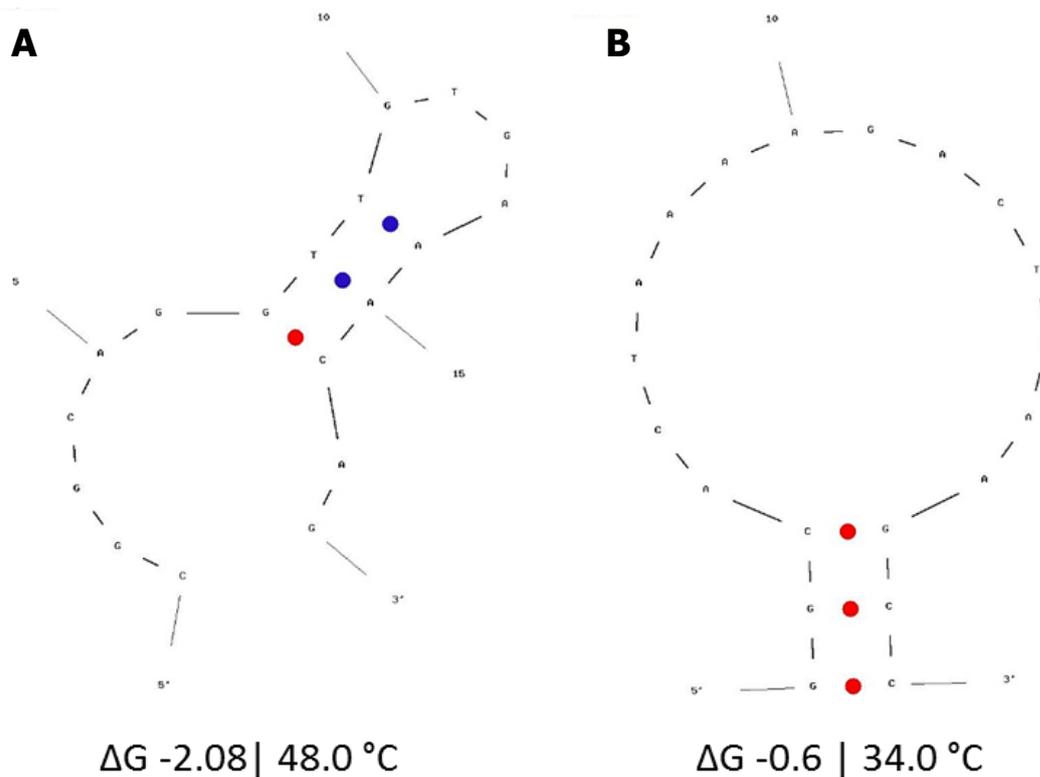


Figura 18. Exemplos de estruturas secundárias (*hairpins*) possíveis de serem formadas nos iniciadores para PTX3.

A sequência dos iniciadores *forward* (**A**) e *reverse* (**B**) desenhados para PTX3 foram submetidos a uma análise quanto a formação de estruturas secundárias na ferramenta OligoAnalyzer (IDTDNA). Ambas indicam o ΔG mínimo estimado de cada estrutura e a T_M de formação do *hairpin*. Quanto mais próximo o valor de ΔG for de 0 e menor a T_M para formação dessas estruturas, menor é a possibilidade de acontecerem erros na PCR.

A figura 18 exemplifica estruturas secundárias em forma de alça (*hairpin*) possíveis de serem obtidas através do pareamento entre nucleotídeos presentes numa mesma sequência. Para o gene PTX3, foram desenhados iniciadores cujos valores de ΔG obtidos estavam na faixa de 0 e -9 kcal/mole. Esses grampos nos iniciadores *forward* e *reverse*, são possíveis de serem feitas a temperaturas específicas (T_M 48 °C e 34 °C, respectivamente) diferente das temperaturas obtidas para o anelamento dos mesmos no sequência do molde de cDNA de PTX3 (T_M 54,9 e 55 °C, respectivamente).

Tabela 3. Lista dos iniciadores construídos para RT- PCR.

| Alvo | Sequência 5' – 3' | Nº bp | Tamanho Amplicon (bp) | T _M °C | %GC | Localização nos éxons | Especificidade para Isoformas |
|--------------|------------------------------------|----------|-----------------------------|----------------------|-------|-----------------------------|-------------------------------------|
| FGF2 | Fw: TTC AAG GAC CCC AAG CGG | 18 | 320 | 57.9 | 61.1% | 1 | - |
| | Rv: TGC CCA GTT CGT TTC AGT G | 19 | | 55.6 | 52.6% | 3 | |
| FGF8 | Fw: CCA AGA GCA ACG GCA AAG G | 19 | 306 | 57.2 | 57.9% | 4 e 5 | A, B, E, F, G |
| | Rv: CCA GGC AGC ACC TAT CG | 17 | | 55.7 | 64.7% | 5 | |
| FGFR1 | Fw: CAG ATA ACA CCA AAC CAA ACC G | 22 | 331 | 54.4 | 45.5% | 4 | 1~4, 10~14 |
| | Rv: GAC CGC TCC ACG ACA TC | 17 | | 55.8 | 64.7% | 6 e 7 | |
| FGFR2 | Fw: ACA AAG ACA AGC CCA AGG AG | 20 | 558 | 55.3 | 50.0% | 11 | 1~9, 11 |
| | Rv: CGA AGG ACC AGA CAT CAC TC | 20 | | 54.9 | 55.0% | 15 e 16 | |
| FGFR3 | Fw: CAG GAG CAG TTG GTC TTC G | 19 | 486 | 55.7 | 57.9% | 3 | 1, 2 e 3 |
| | Rv: CCG CAG CTT GAT GCC T | 16 | | 56.0 | 62.5% | 5 e 6 | |
| FGFR4 | Fw: GCT GTG AGA AGG AGA TGC G | 19 | 465 | 55.8 | 57.9% | 2 | 1, 2 e 3 |
| | Rv: GTG TCC AGT AGG GTG CTT G | 19 | | 55.5 | 57.9% | 4 e 5 | |
| PTX3 | Fw: ACT CGG AAT GGG ACA AGC | 18 | 471 | 54.9 | 55.5% | 2 | - |
| | Rv: AGG CAC TAA AAG ACT CAA GCC | 21 | | 55.0 | 47.6% | 3 | |
| PTGS2 | Fw: CAG TCC ACC AAC TTA CAA TGC | 21 | 642 | 54.1 | 47.6% | 4 | - |
| | Rv: CTC TCC TAT CAG TAT TAG CCT GC | 23 | | 54.2 | 47.8% | 7 e 8 | |
| CXCL5 | Fw: TCT TCG CTC CTC CAA TCT CC | 20 | 414 | 56.3 | 55.0% | 1 | - |
| | Rv: TTT CCT TGT TTC CAC CGT CC | 20 | | 55.4 | 50.0% | 3 e 4 | |

bp = *base pair*; T_M = temperatura de *melting* em graus Célsius (°C); %GC – porcentagem do conteúdo Guanina Citosina na sequência do iniciador. Isoformas – possibilidade do par de iniciador amplificar as diferentes isoformas de um transcrito. Código de acesso na plataforma NCBI para identificação da sequência utilizada na construção dos iniciadores: **FGF2** NM_002006.4; **FGF8** NM_006119.4; **FGFR1** NM_023110.2; **FGFR2** NM_000141.4; **FGFR3** NM_000142.4; **FGFR4** NM_002011.3; **PTX3** NM_002852.3; **PTGS2** NM_000963.3; **CXCL5** NM_002994.4.

5.5.2 Extração, quantificação e análise da qualidade do RNA total

O RNA total foi extraído das culturas celulares em monocamada de 70 a 90% de confluência conforme descrito no tópico 4.7.1.

A quantificação do RNA total extraído foi feita a partir de 1 µl da diluição de 1:20 do RNA total em H₂O tratada com DEPC através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm no equipamento Nanodrop. As quantidades de RNA obtidas são mostradas na tabela 4.

De todas as culturas, foi obtido um excelente rendimento com uma média de 211,33 µg de RNA total de cada placa de 78 cm² de área. A estimativa da contaminação do RNA total por proteínas foi feita a partir da razão entre a leitura a 260 e 280nm (comprimento de onda onde ocorre absorção da luz pelas proteínas) e a contaminação por sais inibidores foi estimada pela razão 260 e 230 nm (comprimento de onda onde ocorre absorção da luz por sais presentes na amostra).

Como pode ser observado pelos dados da tabela 4 todas as amostras apresentaram valores excelentes tanto para contaminação por proteínas quanto por sais, uma vez que os valores considerados aceitáveis para a razão 260/280 e 260/230 são respectivamente 1,8 e 1,8-2,2.

Tabela 4. Aspectos quantitativos e qualitativos do RNA total extraído das culturas celulares.

| ID da amostra | RNA total (µg/µl) | Microgramas totais (µg) | 260/280nm | 260/230nm |
|---------------|-------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| Caco 2 | 7,208 | 216,24 | 1,91 | 2,06 |
| SW 480 | 5,130 | 153,90 | 1,92 | 2,1 |
| SK-MEL 37 | 7,718 | 231,54 | 2,06 | 1,79 |
| HT 1080 | 4,448 | 133,44 | 1,88 | 2,25 |
| SKMEL 188 | 7,856 | 235,68 | 1,9 | 2,09 |
| Saos 2 | 6,262 | 187,86 | 1,95 | 1,88 |
| HCT 116 | 10,690 | 320,70 | 1,94 | 2,29 |

A leitura no Nanodrop além de fornecer dados quantitativos que estimam a quantidade e a pureza do RNA total extraído, também gera uma curva onde podem ser visualizados a representação gráfica da absorbância nos comprimentos de onda 230, 260 e 280 nm (figura 19). Como é possível observar, os picos de absorbância para todas as amostras de RNA total extraído se deram com maior amplitude no comprimento de onda 260 nm indicando que o procedimento de extração de RNA total gerou excelentes produtos com baixa contaminação por proteínas e sais.

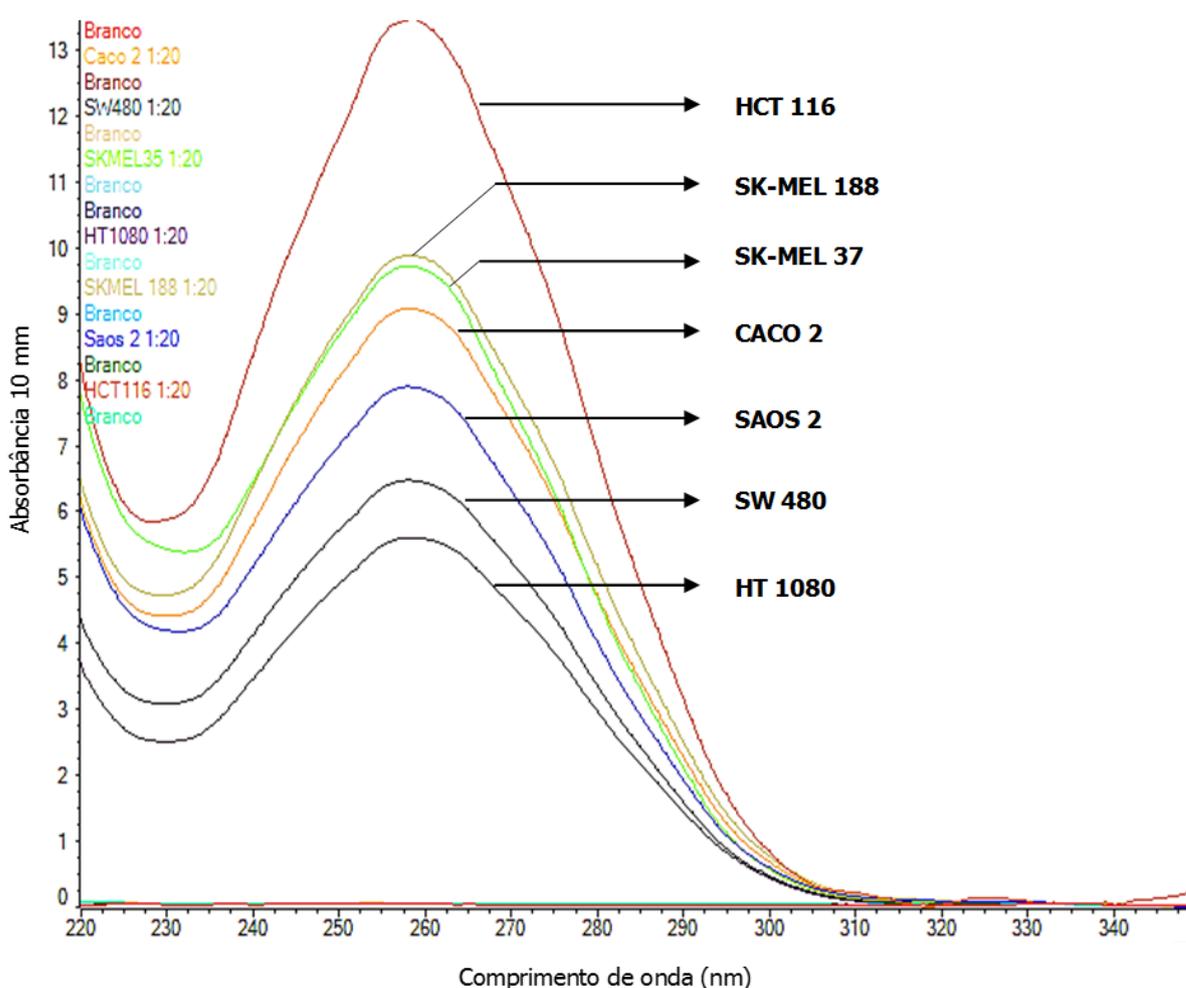


Figura 19. Curvas da absorvância do RNA total extraído.

O RNA total extraído das culturas celulares com ~70% de confluência foi diluído 1:20 em H₂O Milli-Q DEPC e 1 µl dessa diluição foi usada para análise do grau de pureza por espectrofotometria. As curvas indicam o pico máximo de absorvância no comprimento de onda referente a ácidos nucleicos (260 nm) e outros contaminantes como sais (230 nm) e proteínas (280 nm). Entre cada amostra de RNA total foi realizada a leitura de 1 µl de H₂O Milli-Q DEPC.

Os RNA totais extraídos das linhagens CACO 2, SW 480, SK-MEL 37, HT 1080, SK-MEL 188, SAOS 2, HCT 116 também foram submetidos a análise de integridade. Para isso, 400 ng de cada amostra foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% em TAE 1X.

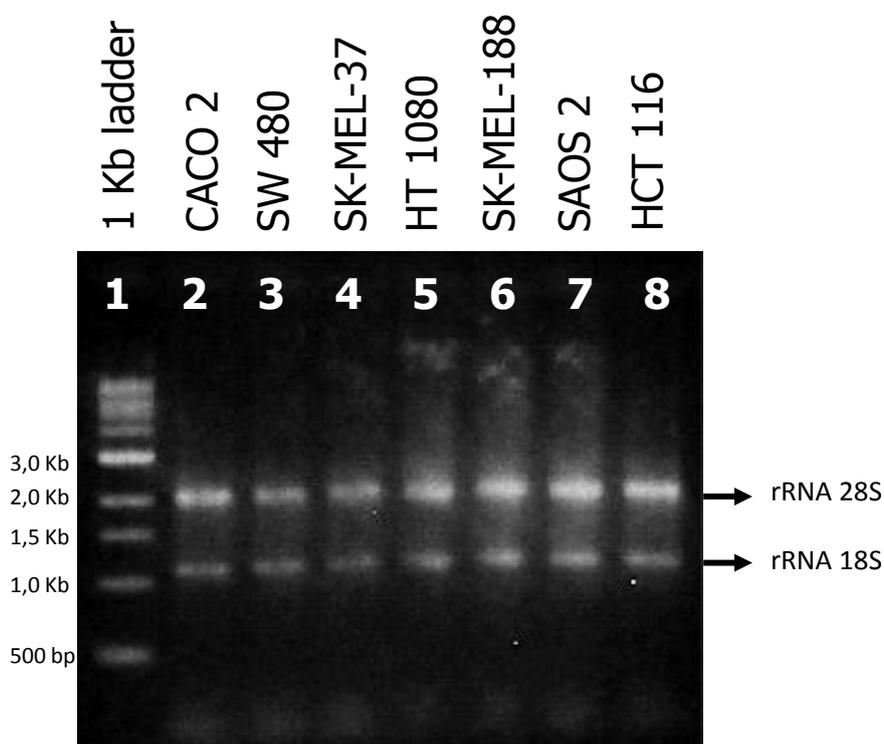


Figura 20. Análise da integridade do RNA total extraído das culturas celulares.

Uma quantidade de 400 ng de RNA total extraído das culturas celulares foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com brometo de etídeo.

Canaleta 1: marcador de tamanho molecular DNA ladder 1 kb; **canaletas 2 a 8:** 400 ng de RNA total das linhagens CACO 2; SW 480; SK-MEL 37; HT 1080; SK-MEL

Como pode ser observado na figura 200, os RNAs totais extraídos apresentaram boa qualidade evidenciada pela presença das bandas referentes aos rRNAs 28S com o dobro da intensidade do rRNA 18S e com pouco ou nenhum arraste, sugerindo haver pequena ou nenhuma degradação do material ácido ribonucleico. Levando em consideração os dados estimados de pureza obtidos na espectrofotometria e de integridade obtida por fracionamento eletroforético, os RNAs totais extraídos das células em cultura foram reversamente transcritos para análise da expressão gênica basal.

5.5.3 Avaliação da qualidade da transcrição reversa

Os RNAs totais obtidos das linhagens celulares, foram submetidos ao processo de transcrição reversa como descrito no tópico 4.7.2.

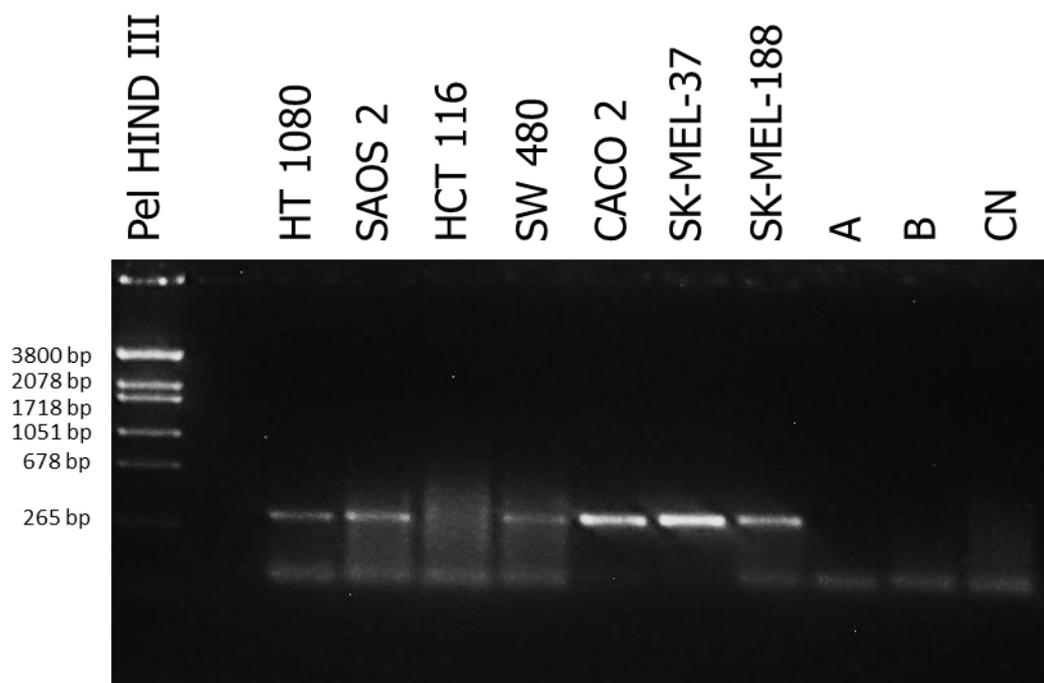


Figura 21. Avaliação da qualidade da transcrição reversa utilizando iniciadores para NOTCH (310 bp).

Dois microgramas do RNA total das culturas celulares em monocamada com ~70% de confluência foram reversamente transcritos utilizando iniciadores oligo(dT)₁₅ e o kit ImProm II (Promega). Os cDNAs sintetizados (1 µl da reação) foram utilizados como molde em PCR convencional utilizando iniciadores específicos para o gene NOTCH2. Os produtos amplificados (6 µl) foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1,2% em TAE 1X corado com brometo de etídeo. **Canaleta 1**: marcador de tamanho molecular Pel HIND III (4 µl); Demais canaletas: produto amplificado das amostras de cDNA (1 µl) das linhagens HT 1080; SAOS 2; HCT 116; SW 480; CACO 2; SK-MEL 37; SK-MEL 188; **A**) 1 ng DNA genômico Wish; **B**) 10 ng DNA genômico Wish; **CN** – controle negativo. Para os produtos da PCR, foram adicionados 1 µl de tampão de corrida de DNA 6X em 6 µl de amostra.

As intensidades das bandas visualizadas proveniente dos produtos de PCR utilizando iniciadores para NOTCH2 (figura 21) não padrão uniforme entre as amostras de cDNA reversamente transcritos a partir dos RNAs extraídos das linhagens celulares em cultura. Nesse sentido, uma segunda reação foi feita utilizando iniciador para o gene GAPDH (figura 22).

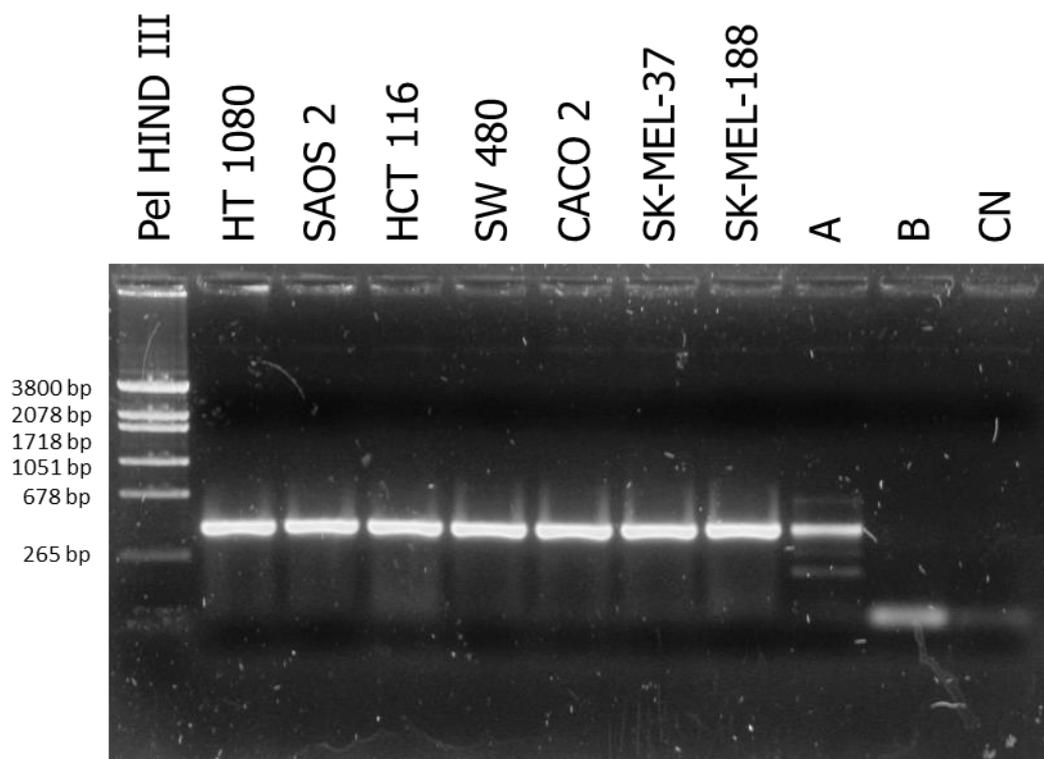


Figura 22. Análise da qualidade da transcrição reversa usando iniciador para o gene GAPDH (437 bp).

Dois microgramas do RNA total das culturas celulares em monocamada com ~70% de confluência foram reversamente transcritos utilizando iniciadores oligo(dT)₁₅ e o kit ImProm II (Promega). Os cDNAs sintetizados (1 µl da reação) foram utilizados como molde em PCR convencional utilizando iniciadores específicos para o gene GAPDH. Os produtos amplificados (6 µl) foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1,2% em TAE 1X corado com brometo de etídeo. **Canaleta 1**: marcador de tamanho molecular Pel HIND III (4 µl); Demais canaletas: produto amplificado das amostras de cDNA (1 µl) das linhagens HT 1080; SAOS 2; HCT 116; SW 480; CACO 2; SK-MEL 37; SK-MEL 188; **A**) 1 ng DNA genômico Wish; **B**) 10 ng DNA genômico Wish; **CN** – controle negativo. Para os produtos da PCR, foram adicionados 1 µl de tampão de corrida de DNA 6X em 6 µl de amostra.

A reação de PCR usando o iniciador para GAPDH mostrou amplificação uniforme entre as amostras de cDNA sintetizadas. Entretanto, na amostra A (1 ng de DNA genômico), foi observada amplificação na mesma altura dos transcritos indicando que o iniciador se anela a DNA genômico. Isso pode sugerir que as bandas das amostras de cDNA não são provenientes somente do transcrito alvo em caso de ter havido contaminação por DNA genômico durante o procedimento de extração do RNA total.

Considerando as bandas apresentadas por ambos iniciadores (NOTCH2 e GAPDH), as reações de PCR subsequentes foram feitas utilizando dois moldes: cDNA e 100 ng de RNA total.

5.5.4 Análise da expressão gênica basal

As linhagens tumorais foram avaliadas por RT-PCR quanto ao nível de expressão basal dos genes PTX3, FGF2, FGF8, FGFR1 a 4, PTGS2 e CXCL5.

A figura 23 mostra que os iniciadores para FGF2 se ligam especificamente aos moldes de cDNA, visualizado pela ausência de bandas nas reações cujos moldes era o RNA total. Em FGFR1 e FGFR2 são observadas bandas inespecíficas nas amostras de RNA total, porém com intensidade e peso diferentes das PCRs feitas com cDNA como molde.

Na figura 24, o produto amplificado de PTX3 referente as amostras de cDNA das linhagens celulares foi feita de forma específica, sem amplificação nas reações de RNA total. Para os genes FGFR3 e FGFR4 houve amplificação específica nos moldes de cDNA e pouca ou nenhuma amplificação nas PCRs utilizando como molde o RNA total.

Com relação as reações utilizando iniciadores para o gene GAPDH, foi observada amplificação nas amostras cujos alvos eram cDNA e de RNA total, indicando que todas as amostras estavam contaminadas com DNA genômico (figura 24).

As temperaturas de anelamento otimizadas para o par de iniciadores durante o experimento são: FGF2 – 55 °C; FGFR1 – 60 °C; FGFR2, FGFR3 e FGFR4 – 55 °C; PTX3 – 50 °C e GAPDH – 55 °C; FGF8 – não houve amplificação.

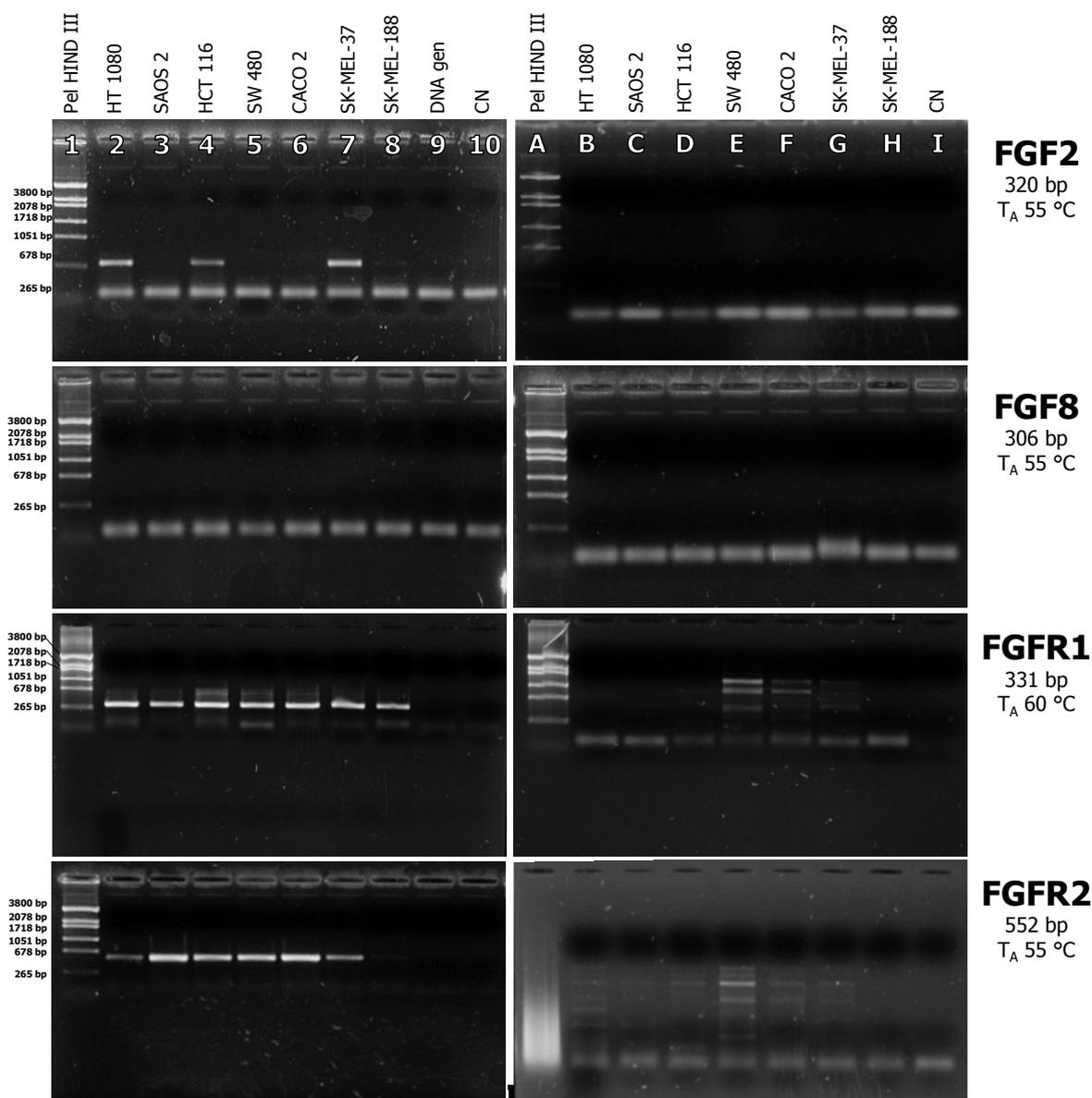


Figura 23. Análise do perfil de expressão dos genes FGF2, FGF8, FGFR1, FGFR2, nas linhagens de células tumorais humanas.

As reações de PCRs foram feitas utilizando como moldes: 1 µl de cDNA (**2 a 8**) provenientes da transcrição reversa do RNA total extraído das células tumorais e 100 ng do próprio RNA total (**B a I**). **1 e A**: 4 µl do marcador de peso molecular Pel HIND III; **9**: 1 ng DNA genômico Wish; **10 e I**; controle negativo.

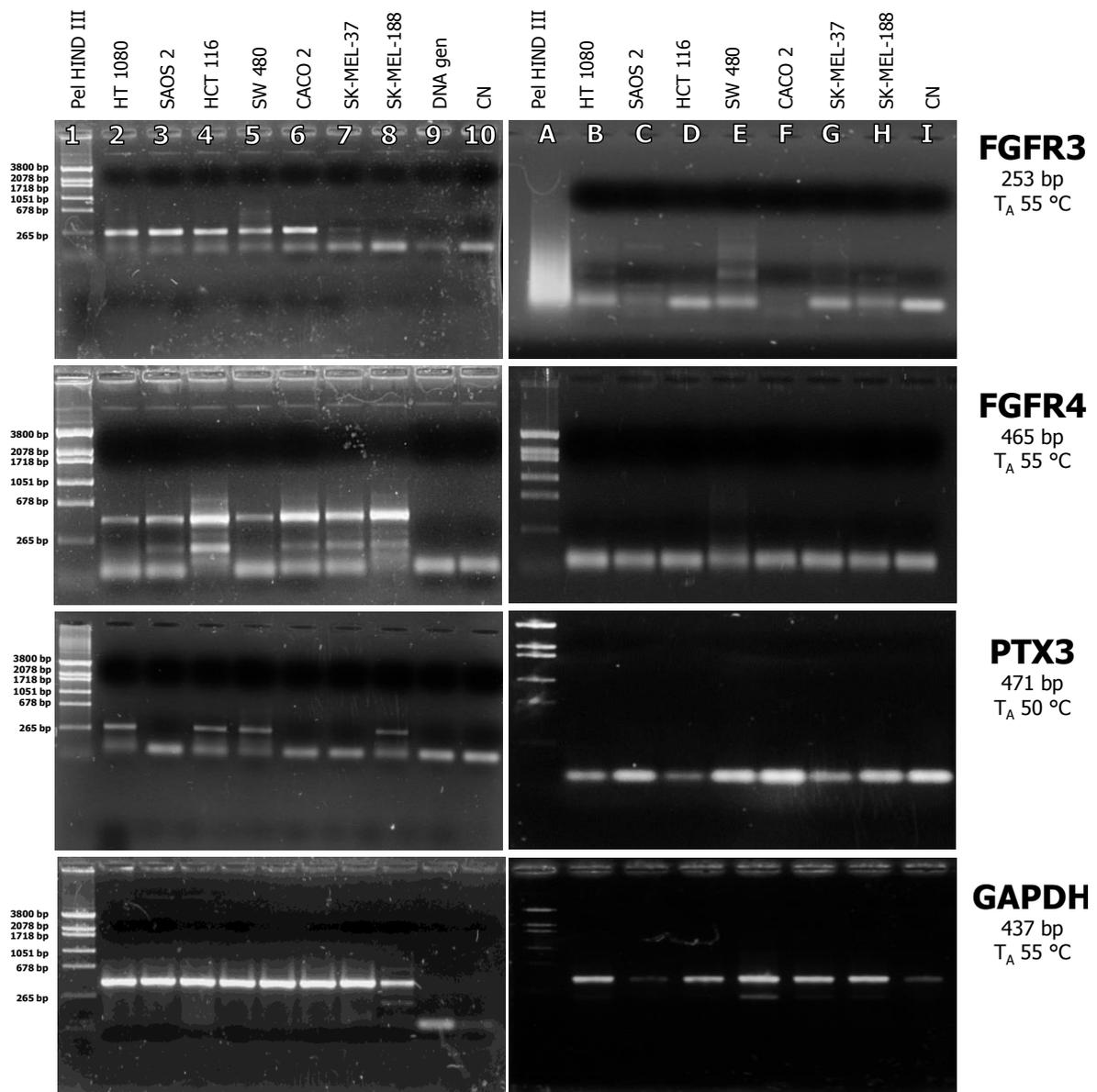


Figura 24. Análise do perfil de expressão dos genes FGFR3, FGFR4, PTX3, GAPDH nas linhagens de células tumorais humanas.

As reações de PCRs foram feitas utilizando como moldes: 1 µl de cDNA (**2 a 8**) provenientes da transcrição reversa do RNA total extraído das células tumorais e 100 ng do próprio RNA total (**B a I**). **1 e A**: 4 µl do marcador de peso molecular Pel HIND III; **9**: 1 ng DNA genômico Wish; **10 e I**; controle negativo.

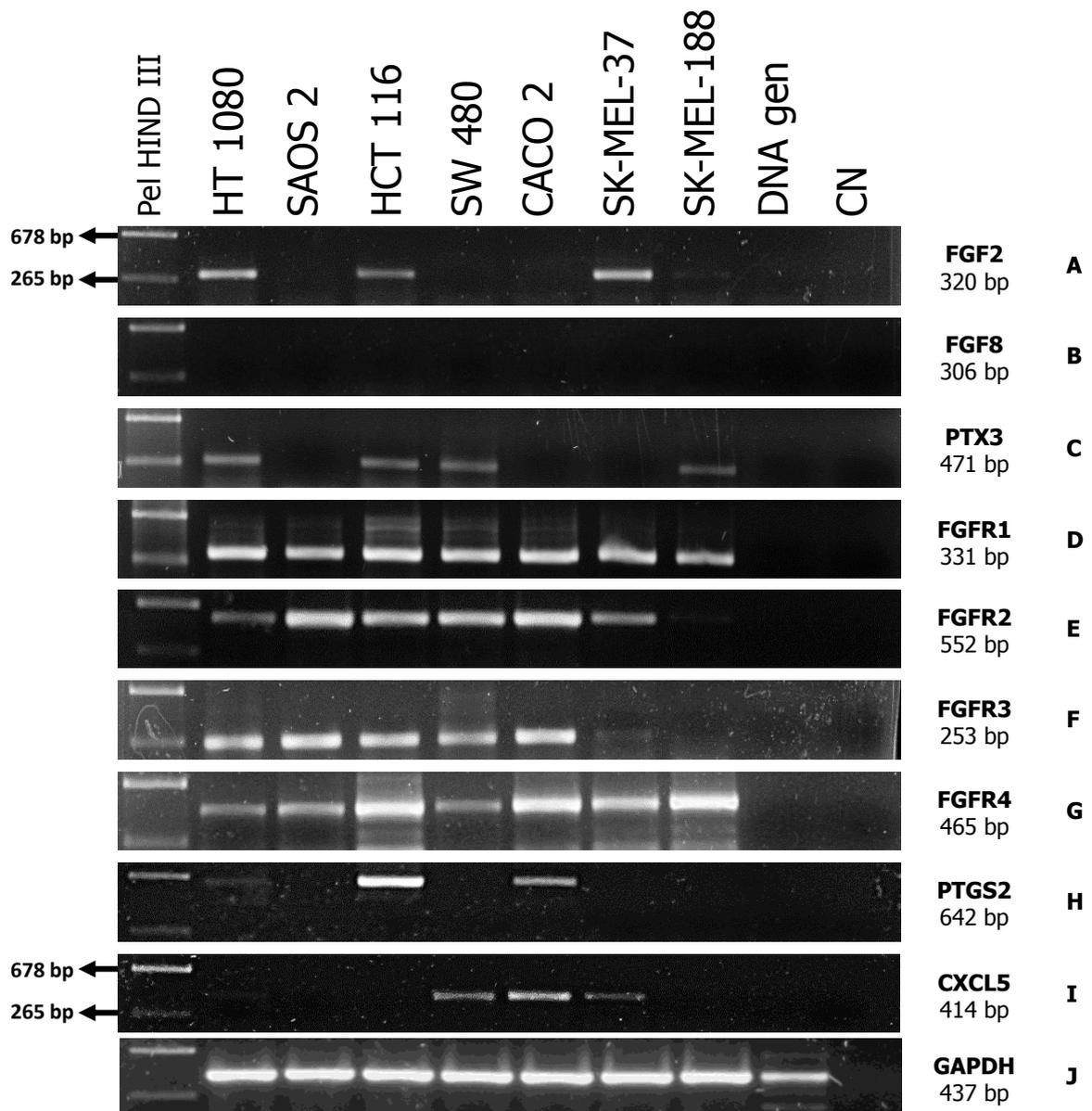


Figura 25. Análise geral do perfil de expressão dos genes FGF2, FGF8, PTX3, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PTGS2, CXCL5, nas linhagens de células tumorais humanas.

Um volume de 15 µl de cada amostra foi aplicado nas canaletas obedecendo a ordem esquematizada na imagem. **Canaleta 1:** 4 µl marcador Pel HIND III; São mostrados apenas os tamanhos referentes a 678 e 265 bp do marcador, em todos os géis. Para cada 15 µl de amostra do produto de PCR, foram adicionados 2,5 µl de tampão de corrida de DNA 6X.

Os géis mostram que as linhagens HT 1080, HCT 116, SK-MEL 37 e SK-MEL 188 expressam FGF2, sendo esta última de forma menos intensa. Os géis referentes a PTGS2 e CXCL5 (figura 25 H, I) revelam bandas nas linhagens HT1080, HCT 116 e SK-MEL 37 o que contribui para a certificar a expressão de FGF2 nestas linhagens. Estas mesmas linhagens expressam todos os receptores de FGF 1 a 4 (figura 25 D-G), exceto SK-MEL 188 que não expressa FGFR3. SK-MEL 37 não expressa PTGS2, mas expressa CXCL5.

A linhagem SK-MEL 188, apesar de expressar FGF2, não expressa PTGS2 nem CXCL5, por isso não será utilizada nos ensaios.

As células da linhagem CACO 2 expressam PTGS2 e CXCL5 mesmo não expressando FGF2. Todas as amostras de cDNA, exceto SK-MEL 188, expressam os quatro receptores de FGF. Nas linhagens HT 1080, HCT 116 e SK-MEL 188 que expressam FGF2, também expressaram PTX3. Nenhuma linhagem expressa FGF8. A tabela 5 esquematiza a expressão gênica basal dos genes estudados comparadas a expressão de GAPDH (figura 25 J).

Tabela 5. Perfil da expressão basal dos genes FGF2, FGF8, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, PTX3, PTGS2 e CXCL5 nas linhagens tumorais humanas.

| Linhagens | Genes | | | | | | | | |
|------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
| | FGF2 | FGF8 | FGFR1 | FGFR2 | FGFR3 | FGFR4 | PTX3 | PTGS2 | CXCL5 |
| HT 1080 | + | - | + | + | + | + | + | + | + |
| SAOS 2 | - | - | + | + | + | + | - | - | - |
| HCT 116 | + | - | + | + | + | + | + | + | - |
| SW 480 | - | - | + | + | + | + | + | - | + |
| CACO 2 | - | - | + | + | + | + | - | + | + |
| SK-MEL 37 | + | - | + | + | + | + | - | - | + |
| SK-MEL 188 | + | - | + | + | - | + | + | - | - |

+ expressão positiva; - expressão não detectada.

Diante dos dados da expressão gênica basal, as linhagens que foram utilizadas nos tratamentos com rhPTX3 são HT 1080, HCT 116 e SK-MEL 37.

6 DISCUSSÃO

A pentraxina 3 é uma glicoproteína de fase aguda expressa em diferentes tipos celulares incluindo células do sistema imune como macrófagos e células dendríticas. PTX3 exerce várias funções biológicas que perpassam desde o reconhecimento e opsonização de patógenos, até a fertilidade feminina e regulação da resposta imune inata. Estudos recentes apontaram que PTX3 tem um papel importante na biologia vascular por ser um possível antagonista natural da angiogênese. Esta ação de PTX3 ocorreria em consequência da sua habilidade de se ligar a membros específicos de uma família de proteínas, os FGFs, que são importantes fatores pro-angiogênicos. O efeito desta interação sobre o potencial tumorigênico e metastático de células tumorais, entretanto, precisa ser mais investigado. O objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão de PTX3, FGF2 e FGF8 bem como de seus receptores em diferentes linhagens de células derivadas de tumores humanos e avaliar o impacto de PTX3 sobre a taxa de proliferação e morfologia destas células. Aqui mostramos que as células derivadas de fibrosarcoma HT 1080, de carcinoma colorretal HCT 116 e melanomas da linhagem SK-MEL 188 expressam tanto PTX3 quanto FGF2 de forma constitutiva. Mostramos também que a proteína PTX3 recombinante humana parece inibir a proliferação das células HT 1080, bem como promover modificações no padrão e na organização das fibras de actina-F e do número de filopódios nas linhagens HT 1080 e HCT 116.

A angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos a partir de endotélios previamente existentes) é um processo natural e importante que acontece em organismos saudáveis, sendo uma das primeiras etapas da organogênese (Dewitt, 2005). Na idade adulta, a angiogênese ocorre em diferentes situações fisiológicas tais como a regeneração de lesões teciduais, isquemias, formação do endométrio e da placenta. Entretanto, seu efeito é indesejado quando favorece a gênese e desenvolvimento de determinadas doenças tais como a degeneração macular, psoríases, endometrioses, artrite e cânceres (revisado por Ribatti, 2008).

Falhas no balanço da produção de fatores angiogênicos e/ou de seus inibidores naturais é a principal causa de promoção de neovascularização nos tumores e doenças dependentes de angiogênese (Hanahan e Weinberg, 2000). Por consequência, a capacidade de modular o equilíbrio de produção entre os fatores pro- e anti-angiogênicos, mostra-se como uma promissora alternativa terapêutica.

Em cânceres, a angiogênese é um processo pelo qual um tumor sólido desenvolve seu próprio suprimento de oxigênio e nutrientes, além da drenagem de metabólitos, pelo sequestro da vasculatura circundante que invade a massa tumoral e neoangiogênese, favorecendo o seu subsequente crescimento, progressão e metástase (Van Hinsbergh, Collen e Koolwijk, 1999). Entre as dezenas de fatores angiogênicos e de citocinas que são altamente expressas em tumores, a família dos VEGFs (*vascular endothelial growth factors*) e seus receptores (VEGFRs) (Ziche, Donnini e Morbidelli, 2004) tem sido investigada extensivamente devido a capacidade de promover o crescimento de células vasculares endoteliais derivadas de artérias, veias e de vasos linfáticos. Apesar dos esforços no desenvolvimento de estratégias anti-angiogênicas para tratamento clínico de cânceres com base na inibição do sistema VEGF/VEGFR, muitos pacientes em diferentes estágios de progressão neoplásica mostraram-se resistentes a essa abordagem devido a uma complexa resposta compensatória que mantém a indução angiogênica a partir da expressão de outros fatores (Tassi e Wellstein, 2006). Evidências experimentais indicaram que a resistência a drogas que bloqueiam VEGF está relacionada com a regulação positiva da interação FGF2/FGFR (*fibroblast growth factor 2 / receptor*) e que o controle desse sistema pode ser um mecanismo de evasão ao tratamento anti-VEGF em cânceres (Alessi *et al.*, 2009).

De fato, estudos mostram a regulação positiva da sinalização da via FGF2/FGFR em tumores diferentes tipos de tumores humanos e murinos (Shain *et al.*, 1996; Nissen *et al.*, 2007; Turner e Grose, 2010). Esses achados indicam que a sinalização via FGF representa um importante componente na expansão tumorigênica e angiogênica e que tais fatores, assim como seus receptores, podem ser alvos no desenvolvimento de abordagens terapêuticas para doenças dependentes de angiogênese, dentre elas as neoplasias (Beenken e Mohammadi, 2009). Neste sentido,

torna-se imprescindível a realização de estudos que visem a identificação de inibidores de FGFs e FGFRs com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação.

A descoberta de que PTX3 se liga especificamente a FGF2 e FGF8 fomentou o desenvolvimento de pesquisas buscando desvendar o efeito desta interação na biologia vascular uma vez que a pentraxina parece agir como um antagonista natural de membros da família dos FGFs (Presta *et al.*, 2005; Alessi *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2011; Leali *et al.*, 2012). Foi detectada a expressão de PTX3 em carcinoma mamário e de próstata e estudos realizados *in vitro* usando modelos experimentais de membrana corio-alantóide de ovo de galinha embrionado e células tumorais transfectadas com PTX3 (Leali *et al.*, 2011) sugeriram que PTX3 seria capaz de inibir a angiogênese promovida por FGF. Embora estes estudos tenham apontado o potencial de PTX3 como agente anti-angiogênico *in vitro* e *in vivo* eles não são suficientes para avaliar a ação da pentraxina em outros tipos de tumores e nem em sistemas *in vivo* nos quais o sistema imune está ativo.

A proposta do nosso trabalho foi caracterizar o perfil de expressão em vários tipos de tumores incluindo aqueles não responsivos a hormônios esteroides e avaliar, posteriormente, o desenvolvimento do tumor *in vivo* em circunstâncias onde o tratamento dos mesmos será feito com a proteína recombinante ou usando um peptídeo sintético análogo ao seu sítio de ligação aos FGFs.

Inicialmente, foram analisadas as curvas de crescimento das células de cada uma das linhagens tumorais na ausência e na presença de soro fetal bovino. Este ensaio teve o objetivo não só de estimar o número de células a serem plaqueadas nos ensaios subsequentes para análise do citoesqueleto, mas também de observar o impacto da carência do soro nesta proliferação e, em alguns casos, possibilitaram até mesmo estimar o tempo de dobramento das linhagens. Observamos que as células de fibrosarcoma HT 1080 apresentam um tempo de dobramento em torno de 24h e a HCT 116, de carcinoma colorretal, de aproximadamente 6-8h. Para as linhagens de melanoma SK-MEL 37 e SK-MEL 188, estimou-se que o tempo de dobramento é de aproximadamente 24h e que as linhagens SAOS 2, SW 480, CACO 2, levam mais de 24 horas para dobrarem seu número. As linhagens nas quais não foi detectada a expressão do gene de FGF2, (SAOS 2, SW 480 e CACO 2), parecem ser as que

apresentam o maior tempo de dobramento (>24h) em comparação com demais linhagens que expressam este gene e seus receptores.

Embora a estratégia de sincronização do ciclo celular nas culturas pela privação inicial do soro e depois pelo acréscimo deste tenha se mostrado produtiva em alguns casos, a influência do número de células semeadas inicialmente parece ter tido um impacto de mesma magnitude do que a privação do soro sobre a taxa de proliferação das células. Diversos estudos mostram que as junções gap nos canais de interação célula-célula modulam vias de sinalização que regulam o crescimento celular e que o crescimento isolado de células individuais prejudica a expansão geral da cultura (Loewenstein e Rose, 1992). Isto pôde ser observado em nossos resultados quando analisamos a evolução das culturas cujas células foram semeadas nas quantidades iniciais de 1×10^4 , 2×10^4 e 4×10^4 células/poço no tempo de 24h na presença de soro (figuras 12 e 13, curvas da esquerda dos gráficos). Para quase todas as linhagens plaqueadas sob estas condições, exceto a HT 1080, as culturas não atingiram 50% de confluência da monocamada. O mesmo efeito pode ser observado também na privação de soro (figuras 12 e 13, curvas da direita dos gráficos). O efeito mais contundente da privação do soro, nas condições do nosso experimento, foi observado nas linhagens HT 1080, SK-MEL 188 e SK-MEL 37, quando plaqueadas na maior densidade. Interessantemente, estas 3 linhagens, além da HCT 116 são as que expressam constitutivamente FGF2 e seus receptores. A produção endógena de FGF1 e FGF2 foi reportada como moduladora da proliferação de linhagens de células tumorais de fibrosarcoma tanto humanos quanto murinas (Shain et al., 1996; Nissen et al., 2007).

A cultura das células em condições de baixo soro, ou ausência de soro, também teve como objetivo avaliar a capacidade das diferentes linhagens de proliferarem sob estas condições. Em virtude da dualidade de funções de PTX3 observadas na resposta imune, seria conveniente avaliar alguma possível atividade pró-proliferativa mediada por PTX3 nas células cultivadas nos tratamentos feitos na ausência de soro. Como o FBS possui em sua composição altos níveis de fatores que promovem crescimento celular e baixos níveis de fatores inibitórios de crescimento (Zheng et al., 2006) sua presença poderia mascarar um possível efeito no aumento da taxa de proliferação promovida por PTX3.

PTX3 parece modular negativamente a taxa de proliferação das células de fibrosarcoma HT 1080 (figura 15B). Este achado corrobora dados da literatura que mostram a ação proliferativa de FGF2 em células de fibrosarcoma humano e murino (Shain et al., 1996; Nissen et al., 2007) e os estudos que relatam o efeito inibitório de PTX3 sobre as ações biológicas de FGF2 (Camozzi *et al.*, 2005; Alessi *et al.*, 2009; Leali *et al.*, 2010; Leali *et al.*, 2011). No nosso contexto, mostramos que as células HT 1080 expressam constitutivamente FGF2, os FGFRs 1-4 e também PTX3. Entretanto, o tratamento com a pentraxina exógena foi suficiente para inibir a proliferação celular mesmo na presença de outros fatores de crescimento como o soro fetal bovino. Uma abordagem interessante para confirmar estes achados, seria avaliar a proliferação destas células na ausência da pentraxina para verificar se a PTX3 endógena exerce algum controle sobre a taxa de proliferação desta linhagem. Além disso, analisar curvas de proliferação na presença de concentrações diferentes da PTX3 pode ser uma estratégia para avaliar uma possível relação dose/resposta.

Sob as condições do ensaio preliminar realizado com a linhagem de fibrosarcoma humano HT 1080, foi percebida a necessidade de utilizar volume maior do que os 250 µl de meio adicionados por poço, uma vez que após 48h de cultura houve um esgotamento do meio indicado pela mudança de pH. Além disso, um plaqueamento em densidade mais baixa é recomendável para que a observação da evolução das culturas possa ser feita por tempo mais longo. Estes fatores podem ter contribuído para o declínio da cultura no tempo de 48h e inviabilidade das células observadas no tempo de 72h (figuras 14 e 15). No que tange à densidade de células a serem plaqueadas, ela deve ser mais baixa para possibilitar a análise por tempo mais longo, mas não deverá ser tão baixa a ponto de impactar negativamente a taxa de proliferação como já discutido anteriormente.

O ensaio de incorporação de MTT foi empregado na análise das diferenças na proliferação celular da linhagem HT 1080 em resposta ao tratamento com PTX3. Embora este tipo de ensaio não seja específico para avaliar proliferação celular, visto que o resultado é a indicação do número de células viáveis no momento da leitura da placa, muitos trabalhos, utilizam a medição de incorporação de MTT em tempos diferentes a fim de inferir a proliferação celular (Possik, 2008). Embora o ensaio de

MTT seja adequado para avaliação indireta da taxa de proliferação celular, superóxidos presentes nas células também reduzem os sais tetrazolium, gerando produtos de formazan não relacionados à atividade mitocondrial. Em comparação ao MTT, o ensaio Azul de Tripán fornece dados menos precisos sobre a proliferação celular, mas é mais acurado quanto à estimativa da viabilidade celular (Wang, Yu e Wickliffe, 2011) e é um método simples e barato. Portanto, as duas abordagens podem ser complementares e foram adotadas nos experimentos.

Entretanto, o ensaio utilizando o MTT, conforme feito aqui, não forneceu dados informativos (figura 15A) uma vez que os valores de absorbância obtidos foram muito baixos, saindo da faixa de correlação entre concentração e absorbância conforme descrito pela lei de Beer-Lambert. O protocolo do MTT será aperfeiçoado para os experimentos futuros. Embora, ainda que o volume de solvente recomendado pela literatura tenha sido criteriosamente seguido nesse ensaio (100 µl de solvente/0,31 cm²) (Tada et al., 1986), pretendemos reduzir o volume para um volume mínimo capaz de solubilizar completamente os cristais de formazan.

Portanto, para uma estimativa mais acurada do tempo de dobramento das células e do efeito do tratamento com PTX3 sobre a taxa de proliferação das mesmas, novos experimentos deverão ser conduzidos nos quais as condições experimentais serão otimizadas com base nestes experimentos preliminares realizados. Desta forma, serão revistos o tempo de privação das células com soro e o número de células adequado para obter uma densidade inicial média. Além disso, pretende-se realizar as análises do crescimento em intervalos de tempo menores e regulares (12-12h) e por um tempo maior, considerando como tempo final do experimento aquele em que a taxa de crescimento das células apresentar declínio após a monocamada ter atingido 100% de confluência. Pretendemos também aperfeiçoar o protocolo com MTT reduzindo o volume de solvente para adequá-lo às nossas condições experimentais.

Alterações sutis foram observadas no citoesqueleto das células das linhagens tumorais HT 1080 e HCT 116. Os filopódios (projeções finas e ricas em actina da membrana plasmática que funcionam como antenas para as células sondarem o ambiente e que desempenham um papel importante na migração celular (Mattila e

Lappalainen, 2008)) e os filamentos transcelulares de actina-F foram analisados quanto ao nível de abundância e intensidade de marcação com faloidina.

Em HT 1080, uma diminuição aparente na abundância dos filopódios foi detectada, enquanto em HCT 116 parece haver uma diminuição ou ausência de filamentos transcelulares. Esses achados, entretanto, devem ser quantificados para que se possa afirmar com certeza que os mesmos são significativos. Para tal, um maior número de campos por lamínula deve ser examinado, e um número maior de células analisado em cada campo. Caso sejam confirmados, poderão ser sugestivos de que PTX3 possa exercer um papel inibitório da motilidade e da capacidade de migração destas células o que pode impactar o potencial tumorigênico dessas linhagens. Yamada e colaboradores trataram células tumorais de câncer de pulmão com um agente que promove a desestabilização da estrutura de actina. O tratamento levou à diminuição de filopódios nas células e também inibiu a migração celular analisada em ensaio *transwell* (Yamada et al., 2009). Os lamelipódios e filopódios desempenham função primordial nas células influenciando uma série de eventos incluindo, adesão e motilidade celular e invasão tumoral.

A análise da expressão gênica revelou que as linhagens HT 1080, SK-MEL 37, HCT 116 e SK-MEL 188 expressam FGF2, sendo que as duas primeiras linhagens parecem apresentar os maiores níveis de expressão destes fatores. (Embora as PCRs realizadas não sejam quantitativas, os níveis semelhantes de GAPDH, permitem esta extrapolação). Todas as linhagens expressam receptores para FGF. Há muitos casos descritos na literatura da ativação constitutiva da via de sinalização FGF/FGFR em células tumorais o que contribui para a tumorigênese (revisado por Beenken e Mohammadi, 2009). Nossos experimentos não permitem esta avaliação. Entretanto, pretendemos analisar por *Western blot*, empregando anticorpos específicos para as formas fosforiladas de proteínas da via de sinalização tais como FRS2 (*fibroblast growth factor receptor substrate 2*) e PLCG1 (fosfolipase C gama 1), se nas linhagens existe a ativação constitutiva da via FGF/FGFR. Embora inicialmente a análise de expressão tenha sido qualitativa com o intuito de selecionar as linhagens que expressavam os fatores de crescimento para realização dos ensaios de migração celular e tumorigênese *in vivo*, iniciadores já foram desenhados (tabela 6 - anexo I)

para que uma avaliação quantitativa possa ser feita por meio de RT-PCR em tempo real, inclusive avaliando as alterações no padrão de expressão promovidas por PTX3.

Os produtos amplificados por PCR utilizando como molde os cDNAs sintetizados a partir da transcrição reversa e iniciadores específicos tanto para NOTCH2 quanto para GAPDH sugerem haver dois tipos de problemas distintos nos RNAs extraídos: variabilidade na integridade entre as amostras e contaminação com DNA genômico.

Os genes de expressão constitutiva como GAPDH e NOTCH2 são essenciais ao metabolismo basal das células e são expressos em níveis constantes tanto em células sob condições fisiopatológicas quanto em células normais (Eisenberg e Levanon, 2003). Na análise utilizando iniciadores específicos para NOTCH2, foi observada grande variação na intensidade das bandas do produto amplificado a partir das amostras de cDNA (figura 21). O transcrito completo de NOTCH2 possui 34 éxons e 11 Kbp. Os iniciadores *forward* e *reverse* usados na amplificação do transcrito NOTCH2 se anelam dentro dos éxons 4 e 5, respectivamente, e, portanto, mais próximos à região 5' do transcrito. Uma boa amplificação de NOTCH2 a partir de cDNAs molde indica, portanto, boa integridade do RNA total e boa eficiência da transcrição reversa. Essa estratégia indicou, que nas nossas amostras, embora as reações de transcrição reversa tenham sido realizadas no mesmo dia com os mesmos reagentes houve uma variação de sua eficiência nas amostras o que reflete uma variabilidade da qualidade do RNA total. Além disso, uma vez que utilizamos para a transcrição reversa oligo(dT), pode ter sido privilegiada a transcrição reversa da porção mais 3' dos transcritos.

Como a maioria dos transcritos dos genes alvo deste estudo, apresentam tamanho bem menor que o transcrito de NOTCH2 e muitos dos iniciadores se anelavam na região 3', utilizamos uma segunda estratégia que foi avaliar a amplificação do gene GAPDH a partir dos cDNAs. O transcrito completo de GAPDH possui 9 éxons e 1,4 Kbp. Os sítios de anelamento dos iniciadores *forward* e *reverse* usados estão nos éxons 1 e 2, respectivamente, na porção 5' do transcrito. A figura 22 mostra que o produto amplificado utilizando iniciadores para GAPDH variou pouco entre as diferentes amostras de cDNA. Esses dados indicaram que apesar da qualidade do RNA total não ser homogênea entre todas as amostras o mesmo apresenta qualidade suficiente para

os ensaios propostos, incluindo a RT-PCR em tempo real na qual os amplicons são pequenos.

A amplificação de um produto a partir do RNA total, utilizando iniciadores para GAPDH, indicou a presença de contaminação por DNA genômico nas amostras. Embora o RNA total extraído não tenha sido tratado com DNase para remoção do DNA genômico, nos valem de estratégias para contornar tal amplificação indesejada. Uma delas foi o desenho dos iniciadores preferencialmente em regiões de junção de éxons ou, alternativamente, em éxons diferentes de forma a garantir que não houvesse amplificação a partir do DNA genômico ou que produtos amplificados de tamanhos diferentes fossem obtidos a partir cDNA e do DNA genômico. A construção de iniciadores em junções de éxons é reportada como um método para promover maior especificidade nas reações de PCR, bem como para impedir amplificação de contaminantes como DNA genômico (Shulzhenko et al., 2003).

Nas reações utilizando os pares de iniciadores para PTX3, FGF2, FGF8 e FGFR1-4, foi constatada a eficiência da estratégia adotada na construção destes iniciadores. PTX3, FGF8 e FGFR1-4 são iniciadores onde o *forward* ou *reverse* foram desenhados em região de junção de éxon onde é evidenciada a qualidade de especificidade desta estratégia quando comparada com os produtos amplificados usando iniciadores para GAPDH. Uma vez que não houve amplificação significativa a partir do RNA total usado como molde, podemos inferir que as bandas visualizadas são produtos amplificados a partir do cDNA correspondente aos genes de interesse.

Os resultados preliminares mostrados aqui comprovam a relevância e a necessidade do aprofundamento desses estudos visando avaliar a ação de PTX3 em linhagens tumorais no contexto da presença de FGFs e o impacto de seu papel biológico nos processos neoplásicos. Neste sentido este estudo será continuado tomando como base os dados e procedimentos apresentados aqui para analisar todas as demais linhagens de células tumorais. O perfil de expressão dos genes também será avaliado por RT-PCR em tempo real, comparando-se o padrão de expressão das células em resposta a PTX3 com os controles não tratados. Para esta finalidade iniciadores já foram desenhados seguindo os critérios descritos no item 4.7.3 e os mesmos são apresentados na tabela 06 do Anexo I.

Além disso, estes estudos serão ampliados durante o meu doutoramento quando buscaremos caracterizar a atividade biológica de PTX3 no desenvolvimento de processos neoplásicos e angiogênicos *in vivo*, bem como avaliar o potencial de PTX3 como indicador de neoplasias em tecidos humanos. Para tal investigaremos o padrão de crescimento de tumores experimentalmente induzidos pela inoculação das células tumorais (sarcoma – HT 1080; melanoma – SK-MEL 37 e 188; cólon – HCT116) transfectadas com o cDNA do gene PTX3 humano em camundongos nude bem como analisaremos o impacto do tratamento sistêmico e local com a PTX3 recombinante humana e um pentapeptídeo correspondente ao sítio de ligação de PTX3 a FGF sobre este crescimento. Pretendemos também analisar o padrão de angiogênese, inflamação e expressão de genes de resposta inflamatória, nos tumores experimentalmente induzidos, após a sua remoção, através de histologia, RT-qPCR, imunohistoquímica e/ou Western Blot.

Em colaboração com o grupo do Laboratório de Patologia Investigativa do Hospital A.C. Camargo em São Paulo, buscaremos avaliar PTX3 como potencial biomarcador de sarcomas de pacientes humanos por imunohistoquímica através da técnica de tissue microarray (TMA).

Com os dados gerados a partir destes estudos esperamos contribuir para a caracterização da ação de PTX3 no processo tumorigênico e angiogênico; elucidar alguns aspectos das vias e mecanismos de ação de PTX3 os quais possam fundamentar ou não seu emprego como possível alvo farmacológico ou como agente antitumoral para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas antitumorais multimodais e avaliar o potencial de PTX3 como candidato a biomarcador a ser usado no diagnóstico e prognóstico de sarcomas.

Em dezembro de 2013, Ronca e colaboradores (2013) mostraram, pela primeira vez, que PTX3 modula negativamente a proliferação, motilidade, invasão e potencial metastático em células tumorais de melanoma murino através de inibição da via FGF2/FGFR1. Neste contexto, foi mostrado que a expressão de FGF2 estava associada ao fenótipo prometastático das células de melanoma na transição epitélio-mesênquima sendo responsável pelas inúmeras modificações morfogênicas, incluindo polaridade e adesão celular, reorganização do citoesqueleto, migração e invasão

(Ronca, Di Salle, *et al.*, 2013). Em junho deste mesmo ano, estes autores também haviam mostrado que PTX3 inibe o *loop* autócrino de estimulação de FGF2 e FGF8, exibindo propriedades anti-mitogênicas e anti-proliferativas em linhagens derivadas de tumores prostáticos humanos e murinos responsivos a hormônios esteroides (Ronca, Alessi, *et al.*, 2013).

Os achados de Ronca e colaboradores não podem ser tomados como desencorajadores para a continuidade deste projeto. Eles corroboram a relevância dos estudos propostos neste trabalho e que esforços devem ser feitos para agilizar a obtenção dos nossos resultados e publicação dos mesmos frente a competitividade existente na área.

7 CONCLUSÕES

- As linhagens celulares apresentaram características morfológicas semelhantes às descritas na literatura.
- A Pentraxina 3 parece modular negativamente a proliferação celular da linhagem tumoral derivada de fibrosarcoma humano HT 1080;
- Os dados sugerem que PTX3 diminui o número de filopódios nas células HT 1080 e a quantidade de filamentos transcelulares nas células da linhagem HCT 116.
- As linhagens HT 1080, HCT 116, SK-MEL 37 e SK-MEL 188 apresentam expressão basal de FGF2, sendo nesta última a expressão menos intensa;
- As linhagens HT 1080, HCT 116 e SK-MEL 37 expressam os receptores de FGF 1 a 4 de forma constitutiva;
- A linhagem SK-MEL 188 apresenta expressão basal dos receptores de FGF 1, 2 e 4;
- PTX3 é expressa de forma constitutiva nas linhagens HT 1080, HCT 116, SW 480 e SK-MEL 188.

8 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

BURKE, D. et al. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. **Trends Biochem Sci**, v. 23, n. 2, p. 59-62, Feb 1998. ISSN 0968-0004 (Print) 0968-0004.

CAMOZZI, M. et al. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 9, p. 1837-42, Sep 2005. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020751> >.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KASHPUR, O. et al. FGF2-induced effects on transcriptome associated with regeneration competence in adult human fibroblasts. **BMC Genomics**, v. 14, p. 656, 2013. ISSN 1471-2164.

KUNES, P. et al. Pentraxin 3 (PTX 3): an endogenous modulator of the inflammatory response. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 920517, 2012. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22577258> >.

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

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

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

_____. Long pentraxin 3/tumor necrosis factor-stimulated gene-6 interaction: a biological rheostat for fibroblast growth factor 2-mediated angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 3, p.

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

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

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

LEIBOVITZ, A. et al. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. **Cancer Res**, v. 36, n. 12, p. 4562-9, Dec 1976. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

LUCHETTI, M. M. et al. Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol**, v. 119, n. 1, p. 196-202, Jan 2000. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10606983> >.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NG, P. M. et al. C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. **Embo j**, v. 26, n. 14, p. 3431-40, Jul 25 2007. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189.

NIELSEN, H. J. et al. Elevated plasma levels of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 decrease during improvement of psoriasis. **Inflammation Research**, v. 51, n. 11, p. 563-567, 2002/11/01 2002. ISSN 1023-3830. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/PL00012428> >.

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

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

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

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

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

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

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

PERI, G. et al. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. **Circulation**, v. 102, n. 6, p. 636-41, Aug 8 2000. ISSN 0009-7322.

PRESTA, M. et al. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 4, p. 723-38, 2007 Jul-Aug 2007. ISSN 1582-1838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760835> >.

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

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

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

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

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

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

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

RODAN, S. B. et al. Characterization of a human osteosarcoma cell line (Saos-2) with osteoblastic properties. **Cancer Res**, v. 47, n. 18, p. 4961-6, Sep 15 1987. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472.

ROLPH, M. S. et al. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 22, n. 5, p. e10-4, May 2002. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12006411> >.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TANAKA, A. et al. Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 19, p. 8928-32, Oct 1 1992. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

TANIO, M.; WAKAMATSU, K.; KOHNO, T. Binding site of C-reactive protein on M-ficolin. **Mol Immunol**, v. 47, n. 2-3, p. 215-21, Dec 2009. ISSN 0161-5890.

TASSI, E.; WELLSTEIN, A. Tumor angiogenesis: initiation and targeting - therapeutic targeting of an FGF-binding protein, an angiogenic switch molecule, and indicator of early stages of gastrointestinal

adenocarcinomas -. **Cancer Res Treat**, v. 38, n. 4, p. 189-97, Dec 2006. ISSN 1598-2998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19771241> >.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO I

Tabela 6. Lista dos iniciadores desenhados para RT-PCR em tempo real linhagens humanas utilizando os critérios como quantidade de isoformas, tamanho do amplicon e conteúdo GC.

| Alvo | Sequência do Primer | Primer pb | Amplicon | Tm | %GC | Exon junction |
|------------------|----------------------------|-----------|----------|------|-------|---------------|
| FGF2 | Fw: AGAGCGACCCTCACATCAAG | 20 | 79bp | 56.8 | 55.0% | 645/646 |
| | Rv: CGGTTAGCACACACTCCTTTG | 21 | | 56.1 | 52.4% | - |
| FGF8B | Fw: CGGACACCTTTGGAAGC | 17 | 102bp | 53.7 | 58.8% | - |
| | Rv: CTTTGCCGTTGCTCTTGG | 18 | | 54.7 | 55.6% | 459/460 |
| FGFR1 | Fw: GGACGCAACAGAGAAAGACT | 20 | 125bp | 54.8 | 50.0% | - |
| | Rv: TGACATACAAGGGACCATCCT | 21 | | 55.4 | 47.6% | 2605/2606 |
| FGFR2 | Fw: GAGTGATGTCTGGTCCTTCG | 20 | 117bp | 54.9 | 55.0% | 2704/2705 |
| | Rv: ATTCTGTGCCTTCCTTCAGC | 21 | | 54.8 | 47.6% | - |
| FGFR3 | Fw: CTTGGGGAGGGCTGCTT | 17 | 116bp | 57.9 | 64.7% | - |
| | Rv: TCAGTGGCATCGTCTTTTCA | 20 | | 54.9 | 50.0% | 1790/1791 |
| FGFR4 | Fw: GCTCAAAGACAACGCCTCT | 19 | 109bp | 55.4 | 52.6% | 1686/1687 |
| | Rv: GCAGACACCAAGCAGGTT | 18 | | 55.7 | 55.6% | - |
| FGFBP | Fw: AGACTCACAGATGGATGACA | 20 | 121bp | 52.8 | 45.0% | - |
| | Rv: GCACACCAGGCTCTTG | 16 | | 53.7 | 62.5% | 897/898 |
| TNFA | Fw: CCCAGAGGGAAGAGTTC | 18 | 122bp | 54.5 | 61.1% | - |
| | Rv: GCTTGAGGGTTTGCTACA | 18 | | 52.6 | 50.0% | 455/456 |
| VEGFA | Fw: TGCCCACTGAGGAGTC | 16 | 126bp | 53.8 | 62.5% | - |
| | Rv: CTCTATCTTTCTTTGGTCTGC | 21 | | 50.7 | 42.8% | 1430/1431 |
| VEGFR1 (FLT1) | Fw: ACAACAGGATGGTAAAGACT | 20 | 87bp | 51.0 | 40.0% | 3777/3778 |
| | Rv: TCAGAGAAGGCAGGAGTT | 18 | | 52.7 | 50.0% | - |
| VEGFR2 (KDR) | Fw: CTACAAGACCAAAGGGGCAC | 20 | 130bp | 55.8 | 55.0% | 3119/3120 |
| | Rv: CTCCTCCACAAATCCAGAGC | 20 | | 55.4 | 55.0% | - |
| PTX3 | Fw: CGGCAGGTTGTGAAACAG | 18 | 101bp | 54.3 | 55.5% | 675/676 |
| | Rv: GGCCTAAAAGACTCAAGCC | 20 | | 53.7 | 50.0% | - |
| IL1B | Fw: GCTGCTCTGGGATTCTCTTC | 20 | 107bp | 55.4 | 55.0% | - |
| | Rv: TGCCACTGTAATAAGCCATCA | 21 | | 54.1 | 44.9% | 134/135 |
| IL8 | Fw: GCTCTGTGTGAAGGTGC | 17 | 77bp | 53.7 | 58.8% | 217/218 |
| | Rv: GGTTTGGAGTATGTCTTTATGC | 22 | | 51.5 | 40.9% | - |