

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Ações antagônicas de FGF2 em células
tumoriais de camundongo:
disparo de mitogênese e de morte celular

Érico Tosoni Costa

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Hugo Aguirre Armelin

SÃO PAULO - 2005

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

Costa, Érico Tosoni
C837a Ações antagônicas de FGF2 em células tumorais de
camundongo : disparo de mitogênese e de morte celular
/ Érico Tosoni Costa. - São Paulo, 2005.
133p

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Armelin, Hugo Aguirre

1. Célula : Cultura : Biologia 2. -Expressão gênica 3.
Controle gênico 4. Receptores : Biologia molecular I. T. II.
Armelin, Hugo Aguirre, orientador

574.87 CDD

“Ações antagônicas de FGF2 em células tumorais de camundongo: disparo de mitogênese e de morte celular”

ERICO TOZONI COSTA

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

Aprovado(a) por:

Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN
IQ - USP
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. ALICIA JULIANA KOWALTOWSKI
IQ - USP

Prof. Dr. ROBERT SCHUMACHER
IQ - USP

Profa. Dra. CHAO YUN IRENE YAN
ICB - USP

Prof. Dr. ROGER CHAMMAS
FM - USP

SÃO PAULO
03 DE AGOSTO 2005

*Se enxerguei mais longe, foi por estar de pé sobre os ombros
de gigantes.*

Isaac Newton

Aos meus grandes amigos:
os que vivem ao meu lado e os que vivem em
minhas lembranças.

Agradecimentos

Após estes anos percebi que trabalhar com pesquisa é, em muitos aspectos, parecido com ter uma “amante bela e ciumenta”. É um relacionamento de difícil convivência e, ao mesmo tempo, que me deixa fascinado, perplexo e pensativo. Exige tanta atenção que muitas noites passei acordado, loucuras regadas à café e trítio, tão envolventes que quando percebia já era dia. Não tenho dúvidas que fui seduzido. Hoje até escrevo um livro sobre ela, chamo-o de “tese” e, muito provavelmente, nunca venha a repetir tal feito para a mulher que realmente amo. Tenho certeza que este caso passageiro, como toda paixão, rendeu frutos que aqui descrevo graças à ajuda de muitos amigos. Devo-lhes meus sinceros agradecimentos:

Ao Dr. Hugo A. Armelin, grande mentor e orientador, por me receber e ensinar a trilhar pelos caminhos do pensamento científico. Pela liberdade que dá às minhas “especulações mecanísticas” e pela paciência com que as ouve e me orienta.

À Dra. Claudimara Lotfi, por me apresentar a esta “amante bela e ciumenta”, por sua eterna orientação e dedicação que, rapidamente suscitaram em mim um profundo carinho e respeito.

Aos meus pais, Jairo e Elisabeth, por todo o amor, educação e apoio que sempre me deram. Por seus ouvidos e corações sempre abertos, pelo pulso forte de meu pai e o abraço de conforto inigualável de minha mãe.

À amada Paula, minha única, verdadeira e bela amante (e, só às vezes, ciumenta). Agradeço seu amor, amizade e por despertar em mim a inexplicável vontade de querer sempre estar ao seu lado.

Às queridas Melissa e Vanessa pelo companheirismo e sinceridade, pelo indispensável apoio fraterno que me torna mais forte.

Ao Marcos Cardillo, que ainda tem muito que aprender comigo sobre pescaria, e que tem muito a me ensinar sobre a verdadeira amizade.

Às amigas Tatiana e Jacqueline que tornam nosso ambiente de trabalho um local mais agradável e amigável, por sua franqueza, pelas conversas sérias e pelas fúteis, mas não menos importantes.

Ao Gilson, o maior contador de curvas de crescimento de todos os tempos, com sua sinceridade e ajuda avançamos juntos os primeiros passos desta tese.

Aos amigos Fábio, Ale e Matheus por suas críticas ora construtivas ora destrutivas ao meu trabalho, que por muitas vezes tornaram-se um exercício prazeroso de imaginação e de especulação científica. Por aceitarem bem nossas brincadeiras e provocações mútuas.

À Dra. Bianca Zingales, por sua personalidade forte e poética e aos amigos (as), Camila, Margot, Edlaine, “Aurélio Satriani” e “Marcelo Chapéu” que transformam o bloco 9 em um local de trabalho muito mais agradável e amigável.

A todas as pessoas que foram importantes para o meu crescimento pessoal e profissional e, principalmente, àqueles grandes amigos que, embora não estejam mais ao meu lado, sua simples lembrança me descansa e inspira virtude e dedicação a tudo aquilo que amo.

Este projeto teve o suporte financeiro da FAPESP e do CNPq. Minha bolsa de estudos foi concedida pela FAPESP.

Índice

Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	11
Abreviaturas	12
Resumo	13
Summary	14
1. Introdução.....	15
1.1 Controle do Ciclo Celular e Câncer.....	16
1.2 Respostas celulares a sinais externos	17
1.3 A Biologia, expressão e sinalização de FGFs.....	18
1.4 A família de receptores de FGF	20
1.5 Receptores de FGF e câncer.....	21
1.6 FGF e câncer.....	22
1.7 Angiogênese.....	24
1.8 Transdução de sinal: do receptor à proteína Ras.....	25
1.9 A via de MAPK.....	26
1.10 O complexo AP-1.....	27
1.11 A proteína CREB	28
1.12 A via de PI3K.....	29
1.13 Ciclinas e CDKs.....	30
Proposições e Objetivos.....	32
2. Materiais.....	34
2.1. Linhagens celulares.....	34
2.2. Linhagens animais	35
2.3. Fatores de crescimento e Hormônios	36
2.4. Anticorpos.....	37
2.5. Soluções.....	37
2.6. Reagentes	38
2.7. Inibidores	38
2.8. Equipamentos.....	39

3. Métodos	40
3.1 Quantificação de proteínas pelo método de SDS-PAGE/ Western Blot.....	40
3.2 Preparação de GST-RBD (Glutathione-S-Transferase-Ras-Binding-Domain)	41
3.3 Lise celular e Precipitação de Ras-GTP.....	41
3.4 Detecção da expressão de proteínas, método de Imunocitoquímica por reação de Imunoperoxidase.....	42
3.5 Síntese de DNA detectada por incorporação de Timidina tritiada (³ HTdR) medida em espectrômetro de cintilação líquida.....	42
3.6 Medida de alongação de cadeia de DNA detectada por perfil de sedimentação em centrifugação de velocidade em gradiente de sacarose alcalina	43
3.7 Estimativa do peso molecular de DNA	44
3.8 Síntese de DNA detectada por imunofluorescência em núcleos marcados com BrdU	45
3.9 Medida de proliferação celular por contagem em hemocitômetro	46
3.10 Medida de proliferação celular por contagem de núcleos mitóticos	46
3.11 Ensaios de FACS.....	47
3.12 Quantificação do número de cópias gênicas por célula pelo método de Southern Blot.....	48
3.13 Morte celular detectada por ensaio de formação de colônias	48
3.14 Detecção de apoptose pelo método de Tunel.....	48
3.15 Estudo analítico do FGF2 por HPLC e MALDI-Tof MS (offline) (cromatografia em fase líquida em alta pressão acoplada com espectrometria de massa).....	49
3.16 Teste de flutuação de Luria e Delbrück	49
3.17 Ensaios de tumorigênese em camundongos Balb/c Nude.....	50
4. Resultados	52
4.1. Disparo da mitogênese e progressão na fase G1 do ciclo celular induzidos por FGF2 em células tumorais Y1	52
4.2. Efeitos de FGF2 na fase S do ciclo celular: iniciação de replicons e alongação das cadeias do DNA	60
4.3. FGF2 induz morte em células tumorais	66
4.4 Efeitos de inibidores de PI3K sobre a ação citotóxica de FGF2 em células Y1	78
4.5 Isolamento e caracterização de clones de células Y1 resistentes à ação citotóxica de FGF2	80
4.6 Efeitos de FGF2 na tumorigênese de células Y1 em camundongos Balb/c e Balb/c Nude.....	91
4.7 Morte induzida por FGF2 em células Y1 removidas de tumores em camundongos Balb/c Nude (células “Ex-vivo-Y1”).....	95

4.8 Efeitos de FGF2 na tumorigênese de células B-61 e EJA e seus derivados clonais selecionados como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2: B61-FRs e EJA-FR3 em camundongos Balb/c Nude	97
5. Discussão	100
5.1 Sinalização G0/G1→S por FGF2 em células tumorais Y1	103
5.2 Inibição da Progressão S→G2/Mitose por FGF2 em células tumorais Y1	105
5.3 Heterogeneidade na população de células Y1: mutação versus adaptação	106
5.4 Tumorigênese de células Y1 em camundongos Balb/c Nude	108
5.5 Prospecções Futuras.....	110
6. Conclusões	114
7. Referências	115
Curriculum Vitae.....	133

Índice de Figuras

Figura M1: Espectro de massa (MALDI) e separação em HPLC do FGF2.	36
Figura M2: Contagem de núcleos mitóticos.	47
Figura 1: Cinética de ativação de c-Ki-Ras	53
Figuras 2A e B: Cinéticas de ativação de ERK1-2.....	54
Figuras 2C, 2D e 2E: Cinéticas de ativação de ERK1-2	55
Figura 3: Cinética de ativação de CREB1	56
Figura 4: Cinética da expressão de c-Fos.....	56
Figura 5: Síntese de DNA por imunocitoquímica.....	57
Figura 6: Ativação de ERK1-2 por SDS-PAGE/ Western Blot.....	58
Figura 7: Esquema qualitativo das cinéticas de ativação/expressão do gene c-fos, proteínas e enzimas durante G1 e síntese de DNA em células Y1	59
Figura 8: Experimentos de FACS em células Y1 na presença de colcemida..	62
Figura 9: Cinética de síntese de DNA (3H-TdR e BrdU) e contagem de núcleos mitóticos em células Y1.....	63
Figura 10: Cinética de alongação da cadeia de DNA em células Y1 tratadas com FGF2	65
Figura 11: Resposta de células Y1 a diferentes membros da família de FGF.	67
Figura 12: Inibição induzida por FGF2 na proliferação de células Y1	68
Figura 13: Medidas de apoptose pelo Método de Tunel.	69
Figura 14: Alterações morfológicas induzidas por FGF2 em células Y1	69
Figura 15: Efeitos de FGF2 na proliferação de células Y1.	71
Figura 16: Proliferação celular por contagem em hemocitômetro em fibroblastos normais Swiss3T3.....	72
Figura 17: Ensaio de proliferação celular por contagem em hemocitômetro no clone Y1-RasN17-1.5.	75
Figura 18: Ensaio de morte celular por formação de colônias exibem os efeitos de FGF2 em células isoladas Y1 e Y1-RasN17-3.1	77
Figura 19: Protocolo para “teste de flutuação” adaptado para células Y1.....	80
Figura 20: Proliferação celular por contagem em hemocitômetro de células Y1 e representantes de seus derivados clonais	82

Figura 21: Ensaio de Southern Blot para medida dos níveis de amplificação do protooncogene c-ki-ras no DNA genômico de células Y1 e Y1-FR1-3.....	83
Figura 22: Níveis de expressão da proteína Ki-Ras-GTP, Ki-Ras-total, AKT e pAKT	84
Figura 23: Cinética de ativação de Erk1-2 (Western Blot) em células Y1, Y1-FR1 e Y1-FR2	85
Figura 24: Indução de síntese de DNA por marcação com BrdU e expressão da proteína c-Fos em células Y1 e em clones resistentes Y1-FR1-3.....	85
Figura 25: Ensaios de proliferação celular por contagem em hemocitômetro em células Y1 selecionadas como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2....	86
Figura 26: Medidas de proliferação celular por contagem em hemocitômetro em células Y1-FR3.....	87
Figura 27: Ensaios de morte celular por formação de colônias exibem os efeitos de FGF2 em células isoladas Y1-FR2 e Y1-FR3.....	87
Figura 28: Cinética de entrada na fase S em células Y1 e em clones resistentes Y1-FR3.....	88
Figura 29: Proliferação celular detectada por contagem em hemocitômetro em células B61 e EJA selecionadas como resistentes aos tratamentos citotóxicos de FGF2	90
Figura 30: Formação de tumores em camundongo Balb/c Nude	91
Figura 31: Gênese e cinética de progressão de tumores de células Y1 e Y1-FR3	93
Figura 32: Efeitos de FGF2 na proliferação de células “Ex-vivo-Y1” linhagens “Y1-T1” e “Y1-T2”	95
Figura 33: Morte celular, detectada por formação de colônias, induzida por FGF2 em células Y1-T1	96
Figura 34: Progressão de tumores de células EJA e EJA-FR3 em camundongos Balb/c Nude.	98
Figura 35: Regressão tumoral e simultânea seleção para resistência em terapias anti-câncer.....	110
Figura 36: Tumorigenicidade versus sensibilidade celular aos efeitos citotóxicos de FGF2 em diversas linhagens normais e tumorais.....	112

Índice de Tabelas

Tabela 1: FGF2 inibe a progressão da fase S do ciclo celular depois de induzir o início da síntese de DNA em células adrenocorticais Y1.....	61
Tabela 2: Ensaio de tumorigênese de fibroblastos Balb3T3 normais, seus clones transformados B-61 e EJA e seus revertentes normais em camundongos isogênicos Balb/c e Balb/c Nude.....	73
Tabela 3: Morte celular induzida por FGF2 detectada por formação de colônias em fibroblastos Balb3T3, seus clones transformados B-61 e EJA e revertentes.....	73
Tabela 4: Efeito de FGF2 na densidade de saturação de culturas de células Y1 e transfectantes Y1-RasN17.....	76
Tabela 5: Efeito de inibidores de PI3K na resposta citotóxica de FGF2 em células Y1.....	79
Tabela 6: Ensaios de morte celular por formação de colônias em células Y1 e seus derivados clonais coletados ao acaso (Y1-C1-23).....	81
Tabela 7: Morte celular induzida por FGF2 por formação de colônias nos clones EJA-FR3 e B61-FR1-2.....	89
Tabela 8: Tumorigênese de células Y1 e Y1-FR3 em camundongos Balb/c Nude.....	92
Tabela 9: Ensaio de tumorigênese de células EJA e B-61 e seus derivados clonais selecionados como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2: B61-FR1 e EJA-FR3 em camundongos Balb/c Nude.....	98

Abreviaturas

³ HTdR	³ H-Timidina e Timidina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
AKT ou PKB	Proteína kinase B
AVP	Arginina-Vasopressina
BrdU	Bromodeoxiuridina
CDK's	Quinases dependentes de ciclina
CREB	"Cyclic AMP Response Element Binding"
DAPI	4',6-diamino-2-phenylindole
DMEM	"Dulbecco modified Eagle medium"
DTT	ditiotreitol
EGF	"Epidermal Growth Factor"
ERK	"Extracellular signal regulated kinase"
FACS	Análise de citometria de fluxo
FCS	Soro fetal bovino
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	Receptores específicos para FGF
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HSGAG	Heparan-sulfato glicoaminoglicano
IP	Iodeto de propídio
IPTG	"Isopropilthiogalactoside"
Ly	Ly294002
MAPK	"Mitogen-Activated Protein Kinase"
MMTV	"Mouse mammary tumor virus"
pAKT	AKT fosforilada (ativa)
PBS	Solução salina tamponada
PBSA	Solução salina tamponada sem Ca ⁺² sem Mg ⁺²
pERK	ERK fosforilada (ativa)
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Kinase
PLC	"Fosfolipase-C"
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetate
PMSF	Fenilmetano Sulfonil Fluoreto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloro acético
Tunel	"Terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling"
VEGF	"Vascular Endothelial Growth Factor"
W	Wortmanina

Resumo

O objetivo desta tese é estudar o papel de FGF2 no controle do ciclo celular em células de mamíferos. Nosso principal modelo, a linhagem Y1, é derivada de um tumor funcional de córtex de camundongo que possui o proto-oncogene c-ki-ras amplificado, tendo conseqüentemente a super-expressão da proteína c-Ki-Ras na forma ativa (c-Ki-Ras-GTP). Células Y1 sincronizadas na interface G0/G1 do ciclo celular são prontamente responsivas a tratamentos de FGF2 (fator de crescimento de fibroblasto-2) sendo este capaz de ativar toda a progressão G0/G1 → S do ciclo celular, mas surpreendentemente, sob estas mesmas condições, FGF2 induz em cultura e in vivo morte celular nesta linhagem, bloqueando o progresso no ciclo após a entrada na fase S. Sob condições induzidas de baixo c-Ki-Ras-GTP, células Y1 respondem à FGF2 com um aumento na proliferação, mostrando que a indução de morte nesta linhagem está diretamente relacionado com os níveis de Ki-Ras-GTP. Além disso, a população de células Y1 é heterogênea, caracterizada por uma maioria de células FGF2-sensíveis e uma minoria de células que são selecionadas positivamente na presença de FGF2. Estas células FGF2-resistentes exibem uma resposta proliferativa a FGF2 e apresentam traços fenotípicos próximos aos observados em uma célula normal, embora o mecanismo de resistência independa da redução dos níveis de Ki-Ras-GTP. Semelhantemente, linhagens normais de fibroblastos 3T3 exibem uma resposta mitogênica a FGF2 que é substituída por uma resposta de morte após sua transformação com o oncogene EJ-ras. Nosso conjunto de resultados associados a uma nova análise dos dados bibliográficos permite-nos sugerir um novo efeito biológico de FGF2: proteção adicional contra o surgimento de tumores originados por oncogene.

Summary

The purpose of this work is to study the role of FGF2 (fibroblast growth factor-2) in the cell cycle control of mammalian cells. Our model of study is the lineage Y1, derived from a murine adrenocortical functional tumor, which presents the proto-oncogene c-k_i-ras amplified and, as a consequence, exhibits enhanced expression of the c-Ki-Ras protein in its active forms (c-Ki-Ras-GTP). Arrested Y1 cells in the G₀/G₁ interface of the cell cycle are promptly responsive to FGF2 treatments, responding with progression through G₀/G₁→S, but surprisingly, under the same conditions, FGF2 elicits a strong death response in cultured or *in vivo* cells, blocking the progress in the cell cycle after S phase entry. Under low c-Ki-Ras-GTP conditions, Y1 cells respond to FGF2 with enhanced proliferation, showing that death induction is related to c-Ki-Ras-GTP levels. Moreover, the Y1 population is heterogeneous, with a majority of FGF2-sensitive cells, and a minority of cells that can be positively selected in the presence of FGF2. These FGF2-resistant cells exhibit a proliferative response to FGF2 and phenotypic traits close to those observed in normal cells, even though the mechanisms of resistance are independent of c-Ki-Ras-GTP decrease. Comparable to that, normal lineages 3T3 display a mitogenic response to FGF2 that is substituted by a death response after their transformation with the oncogene EJ-Ras. The collection of our results associated with a review in the bibliography lead us to suggest a new biological effect of FGF2: enhanced protection against tumors originated by oncogenes.

1. Introdução

Há pouco mais de 50 anos aparecia a célebre publicação dos pesquisadores Francis Crick e James Watson. Neste artigo, publicado pela *Nature* em 25 de abril de 1953, os autores revelaram a estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucléico (DNA), descrevendo em detalhes a estrutura helicoidal formada por duas cadeias antiparalelas que se entrelaçam em torno de um eixo comum. Se não bastasse, sugeriram o mecanismo de duplicação do material genético. A descoberta tornou-se um paradigma da biologia molecular e, fixando-se como uma das peças fundamentais, impulsionou avanços até então inimagináveis na tecnologia de manipulação genética.

Como fruto desta tecnologia, avanços recentes, estimulados por uma política crescente de amparo a pesquisa científica, atingiram outro marco importante: o seqüenciamento completo do material genético de diversos organismos, desde bactérias, plantas, camundongos até o homem.

Tendo em vista que o seqüenciamento do genoma humano, no início de 2003, gerou um número enorme de nucleotídeos e genes apenas pouco superior ao genoma do milho (3,5 bilhões), podemos perceber que a admirável quantidade de informação gerada e que tem sido cuidadosamente estudada é de grande valia, mas, por muitas vezes, de difícil interpretação.

Apesar dos grandes avanços nesta área da ciência, a fronteira do conhecimento atual esbarra na capacidade de decifrarmos a função individual e conjunta das unidades funcionais do DNA: os genes.

Para a montagem correta deste complicado quebra-cabeça, o conhecimento funcional dos produtos destes genes – o RNA e as proteínas – e suas inter-relações são, sem dúvida, os próximos grandes saltos para conseguirmos aproveitar a plena potencialidade do genoma.

O estudo do ciclo celular tem-se mostrado um forte aliado nestes estudos. Através do entendimento dos mecanismos de regulação celular, controlados por diferentes biomoléculas, diferentes padrões de expressão gênica e por modificações pós-transcricionais no produto destes, poderemos

identificar e atribuir funções a peças centrais durante a montagem deste intrincado fenômeno.

1.1 Controle do Ciclo Celular e Câncer.

O perfeito desenvolvimento de um organismo depende do exato equilíbrio entre fenômenos relativamente simples, como morte, proliferação, viabilidade, crescimento, diferenciação e senescência celular, sendo que cada um destes fenômenos é controlado por famílias gênicas específicas ou “módulos de controle”.

O primoroso funcionamento do ciclo celular é o mecanismo central que interliga e administra estes “módulos”, controlando o desenvolvimento e a homeostase de tecidos e órgãos.

Câncer, por definição, consiste em alterações dinâmicas mutacionais e cumulativas no genoma, levando a uma expressão descontrolada de oncogenes associados à perda funcional de genes supressores de tumor. Nesta condição, o ciclo celular sofre alterações em módulos regulatórios que governam a correta proliferação, comprometendo a homeostase do organismo.

É aceito de forma geral que apesar do vasto catálogo de genótipos diferentes de câncer são seis as alterações essenciais na fisiologia celular que conferem o fenótipo maligno ao câncer, são elas: independência de fatores externos para proliferação, insensibilidade a sinais inibitórios, evasão à apoptose, potencial de replicação ilimitado, indução de angiogênese e metástase (*Hanahan et al., 2000*).

Apesar dos avanços tecnológicos descritos inicialmente, no que diz respeito ao câncer as descobertas restringem-se basicamente no diagnóstico precoce dos tumores. Na questão de medicamentos contra a doença, poucos foram os avanços nestes últimos 50 anos e ficamos limitados principalmente às cirurgias, terapias químicas e radiológicas.

Nos poucos casos em que há medicamentos disponíveis, estes têm uso restrito para manifestações específicas de câncer, como ocorre com alguns inibidores de proteínas quinase, como o Gefitinib (Iressa, Astra Zeneca Pharmaceuticals), um inibidor de atividade quinásica associado aos receptores

de EGF (“Epidermal Growth Factor”) que promete reduzir em 14% os casos de câncer de pulmão humano; e o 2-phenylaminopyrimidine (Gleevec, Novartis Inc.) um inibidor de quinases intracelulares utilizado em casos de leucemia mielóide crônica (*Coutre et al., 1999*). Além destes inibidores, estão os anticorpos monoclonais humanizados. Atualmente, um dos melhores desenvolvidos para estes casos é o trastuzamab (Herceptin, Genentech) que promete ser efetivo contra tumores de mama humanos com elevada expressão dos EGFR (em 20-30% dos casos), aumentando a sobrevida média dos pacientes de 20 para 25 meses (*Slamon et al., 2001*). Neste caso específico, estes anticorpos ligam-se ao domínio extracelular destes receptores inibindo sua ativação e acionando o sistema imune contra as células tumorais (*Herbst & Shin, 2002*).

Neste quesito, o entendimento da interação entre diferentes vias de sinalização, formando “redes” de informação e propagação de sinal levarão à expansão do potencial terapêutico em tratamentos que explorem a dependência do fenótipo maligno.

1.2 Respostas celulares a sinais externos

São sinais extracelulares: interações célula-célula, fatores de sobrevivência, de crescimento, mitógenos e hormônios. Tais fatores funcionam como reguladores externos, direcionando o destino de suas células-alvo dependendo dos processos metabólicos que controlem.

A resposta a estes fatores depende de mecanismos intracelulares de controle que são determinados pelo conjunto de genes expressos por cada linhagem celular. Isso permite que diferentes linhagens respondam de maneira diferente a um mesmo estímulo externo.

Este sistema de controle interno trabalha coordenando os eventos de divisão celular com a disponibilidade de nutrientes, monitorando o crescimento da célula, suas necessidades metabólicas e a progressão através das fases do ciclo celular de forma específica para cada linhagem celular.

Em princípio, mesmo em condições saturantes de mitógenos, que normalmente estimulariam divisão celular, mecanismos intracelulares atuantes

podem limitar o número de divisões de uma célula normal através do controle da expressão de proteínas-chave (como as CDK's – quinases dependentes de ciclina - ou ciclinas, p.ex.) ou do controle da atividade destas enzimas. Esta resposta interna de bloqueio do ciclo pode estar vinculada a um segundo sinal externo, como contato célula-célula ou a ausência destes (células precursoras de neurônios ou musculares que se diferenciam terminalmente após um número limitado de divisões) (para revisão: *Conlon & Raff, 1999*).

Por exemplo, alguns fatores de crescimento podem favorecer, em cultura, a sobrevivência e atuar como agentes de resistência a fatores citotóxicos ou podem aumentar a sensibilidade a estes fatores potencializando sua toxicidade. Em particular, FGF2 (“Fibroblast Growth Factor 2”) tem se mostrado capaz de agir de ambas as formas, dependendo da linhagem celular (*Coleman, 2003*).

Para uma maior clareza conceitual é necessário distinguirmos entre os fatores de crescimento, que estimulam o crescimento da célula, e mitógenos que estimulam o crescimento da população, ou seja, a progressão no ciclo celular e divisão, embora algumas moléculas estimulem as duas respostas (*Zetterberg et al., 1984*).

1.3 A Biologia, expressão e sinalização de FGFs

A família de proteínas FGFs (“Fibroblast Growth Factors”) está relacionada com uma vasta diversidade de processos biológicos como proliferação, diferenciação, organogênese e homeostase.

Tanto o FGF1 (FGF-ácido) como o FGF2 (FGF-básico) foram inicialmente isolados de extratos de pituitária bovina e descritos como mitógenos em fibroblastos 3T3 (*Armelin, 1973*).

Atualmente, já foram descritos 22 membros da família de FGFs numerados de FGF1 a FGF22, sendo que o uso das iniciais “FGF” para os demais membros foi adotado por semelhanças estruturais e por sua afinidade à proteoglicanos de membrana, especificamente o “heparan-sulfato glicoaminoglicano” (“HSGAG”), e não necessariamente por apresentarem a mesma função biológica, que é extremamente diversificada (FGF7 e FGF9 não

induzem resposta mitogênica em fibroblastos, p.ex.) (Coleman, 2003, Ornitz & Itoh, 2001, Powers et al., 2000).

Através de múltiplos sítios de iniciação de tradução, o mRNA de FGF2 humano traduz para 5 isoformas protéicas diferenciando-se entre si por suas distintas localizações subcelulares, atividades biológicas e pesos moleculares (22, 22.5, 24 e 34kDa – coletivamente chamados de “FGF2 de alto peso molecular ou HMW” – e 18kDa chamado de “FGF2 de baixo peso molecular ou LMW”). Um complexo mecanismo de controle de tradução seleciona entre a expressão da isoforma de 18kDa ou das isoformas “HMW” (Touriol et al., 2000, Vagner et al., 1996).

Embora a isoforma de 18kDa seja secretada pelas células, ela não possui nenhuma seqüência sinalizadora de secreção. Assim, as circunstâncias que induzem seu transporte para o meio extracelular são restritas e funcionam como um importante mecanismo de controle, acionado por mecanismos ainda pouco compreendidos (Ornitz & Itoh, 2001, Florkiewicz et al., 1995).

A ligação de FGFs exógenos aos “HSGAG”, exerce dois papéis fisiológicos importantes: a proteção contra degradação destes FGFs e a criação de um reservatório local com função de regular espacialmente e mobilizar a disponibilidade dos FGFs (Sommer & Rifkin, 1989, Gospodarowicz, 1987).

O disparo dos sinais biológicos acionados por FGFs ocorre de duas formas. Na primeira, a ligação conjunta de FGF nos “HSGAG” e em receptores do tipo “tirosina quinase” específicos para FGF (FGFR) transmitem o sinal de ativação em domínios quinásicos na sua porção citossólica (Ornitz et al., 2001). A segunda resposta ocorre através da internalização do complexo FGFR/FGF e associação direta com o núcleo celular (Keresztes et al., 1999).

Em algumas linhagens celulares a resposta mitogênica ao FGF2 é dependente da internalização do complexo FGFR-FGF até o núcleo. (Bossard et al., 2003).

1.4 A família de receptores de FGF

A família de FGFR é composta por proteínas transmembranares, apresentando três domínios extracelulares de imunoglobulinas (Ig1-3) (responsáveis pelo reconhecimento do ligante), uma região ácida entre Ig-1 e Ig-2 denominada “acid box”, uma hélice simples transmembranar e dois domínios intracelulares de atividade de tirosina quinase.

Desde a primeira identificação de um FGFR, na metade da década de 80 (*Olwin et al., 1986*), quatro outros foram identificados (FGFR1-4), sendo que, variações no processamento do produto de cada um destes genes transcrevem para até 7 diferentes isoformas de um mesmo tipo de FGFR. Esta grande diversidade é possível pela própria estrutura de seus genes (*Ornitz et al., 1996, Johnson et al., 1990*).

Estas diferentes isoformas exibem especificidades diferentes para cada tipo de FGF e sua expressão é regulada diferentemente em cada tecido, o que contribui para a gama de respostas biológicas tecido-específicas acionadas por todas as possíveis combinações FGFs/FGFRs. Por exemplo, as duas isoformas do FGFR2: -IIIb e -IIIc são comumente expressas em células epiteliais e mesenquimais, respectivamente, sendo que os ligantes para os receptores epiteliais são geralmente produzidos no tecido mesenquimal e vice-versa (*Ornitz & Itoh, 2001*).

Na forma inativa (monomérica), os FGFR são reconhecidos por 2 moléculas de FGF, que se ligam nas regiões Ig-2 e Ig-3, levando a sua dimerização e ativação de seus domínios de tirosina quinase (*Lemmom et al., 1994*). Embora a ativação dos receptores ocorra com alta especificidade, os proteoglicanos de membrana (“HSGAG”) são necessários para a formação estável do complexo entre FGFR/FGFR e FGF/FGFR durante a formação do dímero (*Ornitz 2000, Schlessinger et al. 2000*).

Associados a proteínas adaptadoras, tais receptores transferem o sinal de ativação para proteínas efetoras intracelulares. Esse sinal exerce o controle em diversos processos biológicos acionados por FGFs, incluindo resposta mitogênica em diferentes linhagens celulares normais e tumorais (*Stewart et. al, 1992, Paris & Pouyssegur 1991, Karey & Sirbasku 1988*); diferenciação

terminal em células PC12 (Kremer *et. al*, 1991); migração; angiogênese (Rifkin & Moscatelli 1989) e uma forte inibição de proliferação em uma série de linhagens tumorais (Liu *et. al*, 1998, McLeskey *et. al*, 1994).

Esta ampla variedade de repostas biológicas é acionada por diferentes combinações de FGFR's na forma ativa, estando muitos destes processos intimamente relacionados com a ativação de Ras, Src, PLC ("Phospholipase-C"), MAPK ("Mitogen-Activated Protein Kinase") e PI3K ("Phosphatidilinositol-3 Kinase").

In vivo, os FGFR's exercem papéis fundamentais durante a embriogênese, desenvolvimento e organogênese. Além disso, em organismos adultos os FGFR's estão envolvidos com respostas adaptativas em processos de homeostase e reparo de tecidos.

1.5 Receptores de FGF e câncer

O descontrole da via de FGF como resultado de alterações nos receptores pode ocorrer de quatro formas: expressão inapropriada, mutações pontuais, alterações no processamento do produto de cada gene ou outras modificações genômicas.

Na maioria dos casos, as mutações nos FGFR's estão associadas a anomalias no desenvolvimento e não a câncer, dentre elas: acondroplasias e hipocondroplasias (formas genéticas mais comuns de nanismo), craniosinostoses (fusão prematura das suturas craniais), sindactalias (fusão óssea e cutânea dos dedos) (McIntoshe *et al.*, 2000, Hehr *et al.*, 1999, Passos-Bueno *et al.*, 1999), além de outros desvios, desde o incorreto desenvolvimento das glândulas mamárias durante gravidez (Dickson *et al.*, 2000) até letalidade embrionária (para uma revisão: Coumoul & Deng, 2003).

Embora a real contribuição na tumorigênese não esteja bem estabelecida, FGFRs podem ser encontrados super-expressos em diferentes tecidos tumorais quando comparados às células normais (Yoshimura *et al.*, 1998, Shingu *et al.*, 1998, Morrison *et al.*, 1994). Na maioria destas amostras a super-expressão do receptor está associada com a super-expressão de um dos tipos de FGF.

Em outro trabalho, uma mutação no FGFR-1, que impede a ligação FGF2/FGFR-1, resulta em uma perda da capacidade de controle da proliferação, levando ao surgimento de tumores (*Jang et al., 2001*).

Existe ainda uma grande quantidade de mutações descritas para FGFR-3, relacionadas, em sua maioria, com defeitos no desenvolvimento, má formação óssea, diferenciação e, em alguns casos, ao desenvolvimento de câncer (*Van Rhijn et al., 2001, Kimura et al., 2001, Cappellen et al., 1999, Wang et al., 1999, Naski et al., 1996*).

Outros estudos mostram que a expressão da isoforma IIIb do FGFR2 no tecido epitelial e a normal expressão de FGF7 e FGF10 secretados por células adjacentes do estroma podem atuar como reguladores negativos da proliferação de células epiteliais (*Feng et al., 1997*).

1.6 FGF e câncer

In vivo não existem trabalhos que descrevam mutações envolvendo aumento de estabilidade ou da atividade biológica em moléculas de FGFs, sendo que o papel predominante de FGF's em cânceres é através de sua super-expressão, detectada em uma ampla variedade de tumores.

Em tumores relacionados com a super-expressão de FGFs, existem duas fontes possíveis de produção e secreção deste fator: pelas próprias células tumorais ou pelas células normais adjacentes ao tumor. Consequentemente, FGFs podem exercer uma função autócrina, parácrina ou ambas.

No primeiro caso, o nível de expressão de FGF2 tem sido relacionado com o grau de malignidade e vascularização de gliomas humanos (*Takahashi et al., 1992*), sendo que em alguns casos a produção de FGF2 por células tumorais é estimulada por sinais inflamatórios provenientes de células normais adjacentes, como *TNF- α* ("Tumor Necrosis Factor- α ") e *INF- γ* ("interferon- γ ") (*Samaniego et al., 1998*). No segundo caso, FGF-5 pode ser secretado por células normais em resposta a um tecido tumoral adjacente, não sendo detectado em condições normais (*Kornmamm et al., 1997*).

Uma terceira possibilidade de aumento na sinalização de FGFs ocorre através do aumento da disponibilidade de FGFs solúveis mobilizados, pela ação de heparanases, da matriz celular (*Bashkin et al., 1989, Vlodavsky et al., 1988*).

Em muitas linhagens tumorais FGF2 induz morte celular (*Krejci et al., 2004, Smits et al., 2000, Fenig et al., 1997, Chen et al., 1995, Zhou & Serrero, 1993*), incluindo linhagens de “Sarcomas de Ewing’s” (família de linhagens tumorais humanas isoladas predominantemente de tecido ósseo em crianças e adolescentes) (*Sturla et al., 2000*). Em linhagens tumorais humanas de mama o efeito inibitório de FGF2 é observado. Dentre estas linhagens, as células MDA-MB-134 são fortemente inibidas por FGF2, relacionando-se sua inibição com a super-expressão do FGFR-1 (*Westwood et al., 2002, McLeskey et al., 1994*). Por outro lado, em outros tumores humanos de mama, como os de células MCF-7 (que expressam baixos níveis de mRNA para FGFR-1), FGF2 induz a produção e secreção de peptidases de membrana associadas a invasão de tecidos e metástase, além de promover proliferação celular (*Liu et al., 2002*). Curiosamente, quando transfectadas com o oncogene v-H-ras (clones MCF-7ras) tais células respondem a FGF2 com uma forte inibição na proliferação, relacionada com a ativação prolongada da via de MAPK (“Mitogen Activated Protein Kinase”) (*Liu et al., 1998*).

Um exemplo clássico de integração viral em células de mamíferos é o modelo de MMTV (“mouse mammary tumor virus”) que pode induzir a super-expressão de proto-oncogenes (“amplicons”), conferindo fenótipo tumorigênico para as células. Trabalhos recentes nesta área têm identificado uma série de locos gênicos sob o controle de MMTV, dentre eles: FGF-3 (*Peters et al., 1983*), FGF-4 (*Peters et al., 1989*) e FGF-8 (*MacArthur et al., 1995*). Entretanto, não é observado incremento na expressão de mRNA para FGF3-4 na maioria destes tumores. Além disso, o oncogene que codifica para ciclina D1 é encontrado, invariavelmente, no mesmo “amplicon” de FGF3-4, sugerindo que estes podem não estar relacionados no processo tumorigênico (*Lammie & Peters, 1991*).

Como visto, muitos trabalhos evidenciam uma relação positiva entre tumorigênese e expressão de FGF e de seus receptores, embora outros mostrem uma relação nula ou negativa. Neste contexto, a principal hipótese do

trabalho aqui apresentado, baseada nos resultados obtidos e em uma nova revisão de dados bibliográficos, leva-nos a sugerir uma nova função biológica exercida por FGF2: ativação de uma resposta supressora de tumor.

De fato, uma nova análise da correlação entre células tumorais e alterações na expressão de FGF2, sugere que estas alterações possam atuar como mecanismos adicionais de controle homeostático, acionados em resposta ao surgimento de células que adquiriram determinados tipos de amplificações oncogênicas.

1.7 Angiogênese

O processo de angiogênese é absolutamente necessário para o crescimento de tumores, sendo regulado pelo fino equilíbrio entre indutores e inibidores do processo (fatores angiogênicos e angiostáticos, respectivamente) (*Risau, 1997, Folkman, 1971*). Embora tratamentos anti-angiogênicos sejam amplamente empregados no combate a tumores, trabalhos recentes evidenciam que a hipóxia causada por estes tratamentos pode selecionar células resistentes mais agressivas, além de induzir metástase (*Blagosklonny, 2004*).

Alguns membros da família de FGF, em particular, FGF1 e FGF2, são moléculas angiogênicas (*Folkman & Shing, 1992*) podendo atuar sinergisticamente na presença de VEGF (“Vascular Endothelial Growth Factor”) (*Goto et al., 1993*).

In vivo, a proliferação de células de tumores de células- β não é diretamente afetada pela redução da sinalização via FGFR2 (através de sua competição com a forma solúvel do receptor do tipo 2, sFGFR2), mas indiretamente, através da diminuição do processo de angiogênese (*Compagni et al., 2000*).

Na área de pesquisa cardiovascular, um grande número de trabalhos tem estudado a utilização terapêutica de FGF2, dada suas propriedades angiogênicas, como proteção cardíaca adicional contra isquemias no miocárdio (*Detillieux et al., 2004, Aviles et al., 2003*).

1.8 Transdução de sinal: do receptor à proteína Ras

A grande maioria das respostas celulares à ativação de FGFR é mediada por proteínas adaptadoras localizadas na parte interna da membrana plasmática: FRS2 α e FRS2 β (Xu et al., 1998, Hadari et al., 1998, Kouara et al., 1997). Estas proteínas possuem domínios de ligação à fosfo-tirosinas (PTB) e múltiplos sítios de fosforilação que servem como domínios de ligação para outras proteínas, como Grb2 (proteína adaptadora), Shp2 (tirosina fosfatase) e SOS (fator de troca de nucleotídeo) (Hadari et al., 1998, Kouara et al., 1997).

Semelhantemente às mutações inativadoras em FGFRs, a inativação gênica de FRS2 α resulta em letalidade embrionária e em defeitos severos na gastrulação (Hadari et al., 2001).

Em condições normais, FRS2 α funciona como conectora entre o sinal de ativação dos FGFRs até as vias de Ras, MAPK e PI3K (“Phosphatidylinositol-3 Kinase”), entre outras.

A família de proteínas Ras é composta por três tipos principais de isoformas: N-Ras, H-Ras e Ki-Ras, cada qual diferindo entre si por poucas modificações na porção C-terminal.

O descontrole da atividade de Ras, levando ao aumento dos níveis de Ras ligado à GTP (guanosina trifosfato) não está somente relacionado com a formação de altas porcentagens de tumores (30% do total dos cânceres humanos, atingindo os maiores índices em pâncreas 90%, e adrenocarcinomas 50% (Bos et al., 1990), como também é o ponto central de uma série de vias de sinalização intracelular. Análises quantitativas estimam que em 50% dos tumores humanos os níveis de transcritos de ras estão duas a dez vezes aumentados em relação ao tecido normal (Barbacid, 1987).

De uma forma resumida, a atividade de Ras é controlada pelo equilíbrio entre Ras ativo (Ras-GTP) e Ras-inativo (Ras-GDP), determinado pela atividade competitiva entre duas famílias de proteínas: as GEF's (“Guanidine nucleotide Exchange factor”, que inclui a proteína SOS) que facilitam a liberação de GDP do complexo Ras-GDP, ativando Ras; e as GAP's (“GTPase Activating Proteins”) que aumentam a atividade GTPásica do complexo Ras-GTP, inativando-o (Bollag & McCormick, 1991).

A princípio, existem dois modelos bioquímicos que resultam na amplificação dos níveis de Ras-GTP em uma célula normal. O primeiro consiste em mutações pontuais no gene ras, que originam duas possíveis alterações metabólicas dependendo da localização do códon mutado: a redução a atividade GTPásica (resistência à ação das GAP's) ou a facilitação da troca de GDP por GTP. Tanto uma como outra mutação favorecem a estabilização de Ras ativo (Ras-GTP). O segundo modelo não envolve mutações em nenhum dos códons essenciais, mas relaciona-se com a amplificação do gene ras e, conseqüentemente, a super-expressão de seu produto, favorecendo um aumento dos níveis de Ras-GTP.

A troca de Ras-GDP por GTP confere alterações conformacionais no complexo, o que permite a interação e a transmissão do sinal de Ras-GTP para inúmeras proteínas efetoras.

Dentre os efetores mais estudados de Ras estão as proteínas da família de Raf, que são os primeiros componentes de uma via de kinases denominada via de MAPK, as proteínas RalGDS, PI3K e PKC (para uma revisão: *Malumbres & Pellicer, 1998*).

1.9 A via de MAPK

Desde a descoberta inicial de MAPK em células de mamíferos (*Boulton et al., 1990*), foram identificados e reunidos, por homologia e funcionalidade, dezenas de genes da família de MAPK incluindo: ERK's ("extracelular signal regulated kinase"), p38's e JNK's (*Robinson & Cobb, 1997*). Todos estes genes são regulados por diferentes quinases com certa especificidade, como: MEK1-2 que regula ERK1-2 e JNK-quinase (ou JNKK) que regula JNK.

A via de ERK mais estudada é composta por, no mínimo, cinco kinases ativadas em série, denominadas: Raf, MEK1-2 e ERK1-2.

A ativação das ERK's, através de sua fosforilação e dimerização, regula a atividade de proteínas citossólicas e, sendo translocadas para o núcleo celular, podem fosforilar uma série de fatores de transcrição regulando a expressão gênica e permitindo, dentre outras ações, a progressão no ciclo celular (*Brunet et al., 1999, Gonzalez et. al, 1993*).

Dentre os substratos das ERK's, os mais estudados são: phospholipase A₂, RSK's (Proteínas ribossomais kinases), alguns fatores de transcrição da família TCF (ternary complex factor: Elk-1 e CREB-1), c-Myc, além de proteínas do complexo AP-1. A magnitude e duração da ativação das Erk's no núcleo celular determinam o repertório de membros de proteínas das famílias Fos e Jun que serão expressos e disponíveis para formarem complexos de transcrição durante a primeira fase do ciclo celular (*Cook et al., 1999*).

Apesar da ativação de ERK1-2 estar relacionada com sinais mitogênicos (*Widmann et al., 1998*) sua atividade deve ser cuidadosamente regulada, pois controla outros fenômenos como senescência (*Wellbrock et al., 2004*), inibição de proliferação (*Pumiglia et al., 1997*), diferenciação terminal (*Qui et al., 1992*) ou proteção contra apoptose (*Kazama & Yonehara, 2000, Gardner & Johnson, 1996*).

Após um estímulo mitogênico ERK1 pode regular negativamente uma série de quinases, dosando os sinais mitogênicos extracelulares, como exemplo, regulando negativamente Raf-1 através de sua fosforilação em sítios específicos (*Dougherty et al., 2005*). No caso de FGFR's, a proteína adaptadora FRS2 α pode ser alvo de um mecanismo de inibição intracelular, induzido por ERK-1, como forma de atenuar sinais prolongados via FGFR \rightarrow FRS2 α \rightarrow Ras \rightarrow MAPK (*Lax et al., 2002*).

1.10 O complexo AP-1

AP-1 foi o primeiro fator de transcrição identificado em células de mamíferos (*Angel & Karin, 1991*) e atua na regulação de uma série de processos celulares como proliferação, morte, sobrevivência e diferenciação (para uma revisão: *Shaulian & Karin, 2002*).

AP-1 consiste em várias combinações diméricas entre membros das famílias Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 e Fra-2), Jun (c-Jun, JunB e JunD), Maf (c-Maf, MafB, MafA, MafG/F/K e Nrl) e ATF (ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF, JDP1 e JDP2) que se dimerizam através de um zíper de leucina e ligam-se ao DNA através de uma região básica adjacente (*Chimenov & Kerppola, 2001*).

c-fos e c-jun são homólogos de oncogenes retrovirais, sendo c-Jun indispensável na transformação induzida por Ha-Ras (*Johnson et al., 1996*).

As diferentes combinações de membros disponíveis para formação dos complexos AP-1 dependem da magnitude e duração da ativação de MAPK, evidenciando que diferenças quantitativas na duração de MAPK-ativa culminam em diferenças qualitativas na expressão gênica e estabilização de proteínas expressas (*Cook et al., 1999, Okasaki & Sagata, 1995, Hill et al., 1994*).

Estes complexos reconhecem no DNA seqüências consenso denominadas TRE (“TPA responsive element”) e CRE (cAMP response elements) (*Chimеноv & Kerppola, 2001*) o que regula diretamente o controle da transcrição de vários genes, incluindo ciclina D1 e genes do próprio complexo (*Shaulian & Karin, 2001, Schontal et al., 1989, Angel et al., 1988*).

A afinidade de ligação do complexo AP-1 por sítios específicos do DNA é determinada pelas diferentes combinações possíveis de dímeros (*Ryseck & Bravo, 1991*), e a formação de um complexo AP-1 estável, é uma das etapas iniciais e indispensáveis para a estimulação da síntese de DNA (*Abate & Curran, 1990*).

1.11 A proteína CREB

O fator de transcrição CREB (“Cyclic AMP Response Element Binding”) é o responsável pela transmissão do sinal de uma série de mensageiros celulares, como cAMP (“3’5’cyclic AMP”), despolarização de membrana, cálcio intracelular, além de ser alvo de vias controladoras de processos biológicos, como crescimento e diferenciação (*Gonzalez & Montminy., 1989*).

A ativação de CREB1, através da fosforilação do resíduo serina-133, aumenta sua afinidade pela proteína CBP (“CREB-binding-protein”) (*Chrivia et al. 1993*) promovendo sua interação e ligação ao DNA em seqüências consenso TGANNTCA, em regiões denominadas CRE (Cyclic AMP response element) o que regula o controle da transcrição de vários genes como os do complexo AP-1 e TCF (*Ginty et al. 1994, Bourchuladze et al. 1994*).

1.12 A via de PI3K

Alguns fosfolipídeos de membrana funcionam como substâncias-chave na mediação de vários processos celulares como transmissão de sinal e controle da divisão.

Enzimas relacionadas com a hidrólise destes lipídeos são denominadas de fosfolipases e assumem um papel fundamental no processo de divisão celular.

Atualmente, PI3K é reconhecida como uma das mais importantes proteínas-quinase regulatórias de vias de sinalização dependentes de lipídeos de membrana. Possui duas subunidades: a regulatória, p85, e a catalítica, p110 (*Kapeller et al., 1994*), e apresenta dupla atividade enzimática (lipídio e proteína kinase) o que lhe permite acionar um grande número de sinais de regulação de funções celulares como proliferação, evasão à apoptose e transformação (*Carpenter et al., 1993*).

O efeito protetor da expressão de alguns genes supressores de tumor é muitas vezes ativado pela inibição da via de PI3K. Um produto destes genes é a proteína fosfatase PTEN, que atua inativando lipídeos de membrana ativados por PI3K (*Wu et al., 1998*). Alguns inibidores específicos de PI3K (wortmanina e LY294002) induzem uma significativa redução na taxa de proliferação e previnem a transformação maligna (*Valhos et al., 1994, Yano et al., 1993*).

Os principais efetores de PI3K relacionados com proliferação são: PKC (proteína quinase C), algumas pequenas proteínas G e MAPK's (*Krasilnikov, 2000*). Por outro lado, os principais efetores relacionados com evasão a apoptose são: a via de AKT (ou PKB – proteína kinase B) e das “enzimas dependentes de AKT” (GSK-3, ILK, caspases, BLC2, p.ex.) (*Toker, 2000*). Em ambos os casos, a ativação destes efetores depende do tipo celular e do estímulo utilizado.

A máxima atividade catalítica de AKT, uma serina/treonina quinase, envolve o reconhecimento de lipídeos de membrana ativados por PI3K e a fosforilação em dois resíduos específicos (treonina-308 e serina-473), um dependente e outro independente de PI3K, respectivamente (*Toker, 2000*).

Uma vez ativa, AKT deixa a porção interna da membrana plasmática para fosforilar (inativar) substratos citoplasmáticos envolvidos em processos apoptóticos, incluindo membros da família pró-apoptótica de bcl-2 (*Datta et al., 1997*) e proteases como a caspase-9 (*Cardone et al., 1998*) e ser translocada para o núcleo aonde induz a ativação de fatores de transcrição como CREB, E2F e NF-KB (*Kandel & Hay, 1999*).

Estudos em células da glia demonstram que a ação combinada das vias de Ras e PI3K induz transformação em astrócitos, evidenciando que a atividade em apenas uma das vias é insuficiente para tumorigênese (*Holland et al., 2000*).

No nosso modelo de estudo, linhagem tumoral Y1 de córtex de adrenal de camundongo quando mantida na interface G0/G1 apresentam um basal constitutivo de AKT ativada (pAKT) relacionados aos altos níveis de Ki-Ras-GTP expressos nestas células, evidenciando que alterações nos níveis de Ras-GTP podem levar à ativação de AKT (*Forti et al., 2002*).

1.13 Ciclinas e CDKs

As maiores transições do ciclo celular em células eucarióticas são orientadas por proteínas quinase dependentes de ciclina (CDKs). Apesar dos níveis de expressão das CDKs serem constantes ao longo de todo o ciclo, o controle temporal e coordenação da atividade das CDKs são controlados por mecanismos rígidos que requerem sua ligação com proteínas denominadas ciclinas e sua fosforilação por CAK ("CDK-activating quinase"). O complexo CDK-ciclina ainda pode estar sob o controle de subunidades regulatórias (conjuntamente denominadas de "CKI" – inibidores de ciclinas quinases) (*Morgan, 1995 e 1997*).

Diferentes membros da família das CDKs, em associação com diferentes ciclinas, atuam em momentos distintos de toda a transição G1→S→G2/Mitose. Como exemplo deste processo a progressiva acumulação das ciclinas A e B durante o ciclo celular e sua abrupta degradação durante a anáfase da mitose medeiam a entrada e saída da mitose, respectivamente, através do controle da atividade de CDK-1 (*Kelly & Brown, 2000*).

Estímulos mitogênicos, através da atividade de ERK, medeiam a fosforilação e estabilização de fatores de transcrição, como c-Myc, que induzem a expressão de ciclinas D1 e suprimem a expressão dos CKIs (p15^{Ink}, p16^{Ink}, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p.ex.) favorecendo a atividade catalítica do complexo ciclina-CDK e a progressão no ciclo celular (Sears & Nevins, 2002). Um destes inibidores, p27^{Kip1}, atua na transição G1→S prevenindo uma prematura entrada na fase S do ciclo celular.

A associação ciclina D-CDK-4 e CDK-6 induz a fosforilação e inativação da proteína Rb (Morgan, 1997), permitindo a transcrição de genes dependentes de E2F como: ciclinas B e E, componentes para replicação do DNA (ORCs, DNA-polimerase α) e progressão na fase S (Sears & Nevins, 2002).

Alguns trabalhos sugerem que Rb é o único substrato essencial de ciclina D-CDK4/6, sendo que células que perdem Rb não requerem ciclina D para proliferação (Sherr C.J., 2004).

Células tumorais Y1, expressam níveis constitutivamente altos de c-Ki-Ras-GTP, levando a uma ativação crônica de AKT e conseqüentemente a permanente inibição da expressão de p27^{Kip1} (Forti et al., 2002).

Proposições e Objetivos

Nosso laboratório tem como principal objetivo o estudo do controle do ciclo celular em células de mamíferos, definindo os mecanismos moleculares centrais na transição das fases $G_0/G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2/M$ deste ciclo, e que controlam processos biológicos fundamentais como proliferação e morte celular.

Nos últimos anos o principal modelo celular em estudo é a linhagem tumoral Y1 de córtex de adrenal de camundongo que, associada a uma série de clones e inibidores moleculares específicos, nos permitiram o entendimento parcial e a elaboração de uma rede de controle dos sinais disparados por receptores de FGF2, ACTH₁₋₃₉ (Hormônio Adrenocorticotrópico) e AVP (Arginina-Vasopressina) (Loffi & Armelin, 1999 e 2001, Loffi et al., 2000, Lepique et al., 2000 e 2004, Forti et al., 2000 e 2002, Schwindt et al., 2003, Rocha et al., 2003).

Nestes trabalhos, a análise dos efeitos de FGF2 na linhagem Y1 era observada no intervalo $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ e apresentada como um forte sinal mitogênico. De fato, FGF2 induz em células Y1 a ativação e expressão de fatores necessários para as transições $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ do ciclo celular, como a ativação de Erk1-2, indução genes de resposta primária, ciclina D1 e fosforilação de Rb (Armelin et. al, 1996; Loffi et. al, 1997 e 2000, Rocha et al., 2003 e dados não publicados).

Neste projeto de tese fizemos uma análise mais ampla do ciclo celular, particularmente focalizando a transição $G_1 \rightarrow S \rightarrow M$. Nossas observações preliminares mostraram que FGF2 bloqueia a transição $S \rightarrow M$ causando morte celular de células tumorigênicas Y1.

De conhecimento prévio que, além de ser um potente agente angiogênico e neurotrófico, FGF2 (18kDa) exerce um forte efeito mitogênico em culturas primárias de células adrenocorticais não transformadas (Esch et al., 1985), nossos novos resultados sugeriram-nos a hipótese de que FGF2 dispara um processo de morte celular exclusivamente em células tumorigênicas, cujo estudo se transformou no principal foco deste trabalho.

Tendo esta motivação como pano de fundo os objetivos experimentais específicos desta tese foram:

- 1) Caracterização dos sinais mitogênicos iniciais ($G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$) disparados por FGF2;
- 2) Descrição e caracterização dos efeitos de FGF2 *in vitro* e *in vivo* na proliferação e morte celular das linhagens celulares tumorais adrenais de camundongo Y1 e fibroblastos Balb3T3 transformados pelo oncogene Ha-ras-V12 (sub-linhagens B61 e EJA);
- 3) Seleção e caracterização de clones celulares resistentes à morte celular causada por FGF2.

2. Materiais

2.1. Linhagens celulares

Células de carcinoma de adrenocórtex de camundongo, linhagem Y1 obtida da American Type Collection (Rockville, MD, 1973). Possuem o proto-oncogene c-Ki-ras amplificado, tendo como consequência direta uma elevada expressão da proteína Ki-Ras na forma ativada (Ki-Ras-GTP) (*Schwab et al., 1983; Kimura & Armelin, 1988*).

As linhagens Y1-RasN17, clones 3.1, 1.5 e 2.7 são transfectantes condicionais de Y1 carregando o mutante dominante negativo Ha-RasN17 sob o controle do promotor MMTV responsivo a dexametasona (*Forti et al., 2002*).

Os derivados clonais de Y1 selecionados, em ensaios de morte celular por formação de colônias, como resistentes aos tratamentos citotóxicos de FGF2 foram denominados de Y1-FGF-resistentes, ou simplesmente: Y1-FR1-3, numerados de acordo com a ordem em que foram isolados.

As células denominadas “Ex-vivo-Y1” foram originadas de tumores de células Y1 crescidos em camundongos Balb/c Nude, removidos em ambiente estéril, dissociados mecanicamente em pequenos agregados celulares mantidos em DMEM + soro (FCS10%) até adesão à superfície da placa de cultura. Os clones de células “Ex-vivo-Y1” denominados de “Y1-T1” e “Y1-T2” (“T”=tumor) foram obtidos do tumor controle (i.e. animais não tratados com FGF2) e do tumor de animais tratados com FGF2, respectivamente.

A linhagem Balb3T3, clone A-31, são células mesenquimais pluripotentes de embrião de camundongos isogênicos Balb/c (*Aaronson & Todaro, 1968*) e seus derivados, clones EJA e B-61 (*Kovary et al., 1989*) foram obtidos por co-transfecção dos plasmídeos pHSV-neo e pEJ-6,6, que contém o oncogene humano EJ-ras clonado (*Shih & Weinberg, 1982*). Seus clones, selecionados como resistentes aos tratamentos citotóxicos de FGF2 foram denominados de B61-FR1-7 (numerados de acordo com a ordem em que foram isolados) e EJA-FR3 (o único clone resistente a FGF2 isolado da linhagem EJA).

O clone revertente de B-61: 4-AB, e os clones revertentes de EJA: 2A, 3D e 5A, foram selecionados por dependerem de fatores de crescimento para sintetizarem DNA (através da adição de um análogo tóxico de timidina –FUDR – na ausência de fatores estimuladores de entrada na fase S) e mostraram-se com capacidade tumorigênica reduzida em relação às células parentais (Rocha K.M. & Armelin H.A., dados não publicados).

As linhagens celulares adrenais Y1, as fibroblásticas Balb3T3 parentais normais, as sub-linhagens transformadas B-61, EJA e seus respectivos revertentes não tumorigênicos são mantidas em meio completo: DMEM (“Dulbeco’s modified Eagle medium”) + 1,2 g/ml de bicarbonato de sódio + soro fetal bovino (FCS10%). Os transfectantes condicionais Y1-RasN17-3.1, -1.5 e -2.7 são mantidas em meio completo adicionado de 100µg/ml de geneticina. Os derivados clonais resistentes a FGF2 (Y1-FR1-3, B61-FR1-7 e EJA-FR3) são mantidos em meio completo adicionado de 1nM de FGF2. As culturas são mantidas a 37°C em uma atmosfera úmida com 5%CO₂/ 95% ar.

2.2. Linhagens animais



Mus Domesticus Domesticus, linhagens Balb/c imunocompetentes e imunodeficientes (Nude), isogênicos, criados e fornecidos pelo Biotério de Produção e experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP. Foram mantidos a 22°C, umidade 55% e luminosidade de 12h luz/12h escuro. A nutrição é comercial extrusada e esterilizada. O tratamento dos animais segue as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, [http:// www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)).

2.3. Fatores de crescimento e Hormônios

FGF1 e **FGF2** recombinantes (fatores de crescimento de fibroblasto bovino, formas ácida e básica, respectivamente) produzido e gentilmente doado pelo Dr. A. G. Gambarini (Instituto de Química, USP). São armazenados em pequenas alíquotas (135 μ M) em PBSA e diluídos 1:1000 em DMEM no momento anterior a adição no meio celular.

Como controle da preparação do FGF2 do Dr. A.G. Gambarini, utilizamos FGF2 bovino (forma básica recombinante) produzido e doado pelo Dr. Paulo L. Ho (Instituto de Biotecnologia – Butantan – SP) e o FGF2 humano (forma básica recombinante) comprado da Sigma (St. Louis, MO). Ambos apresentaram resultados semelhantes.

A análise de nossa preparação de FGF2 (seção 3.15) baseou-se em ensaios de HPLC-MS e MALDI-TOF, com a ajuda do Dr. Daniel Carvalho Pimenta (Centro de Toxinologia Aplicada – CAT – Butantan – SP) (**Fig. M1**) que garantem 90-95% de pureza em nossa preparação de FGF2, e em ensaios de medidas de endotoxina (CONFAR – FCF – USP) que adequaram o uso do FGF2 em células de mamíferos.

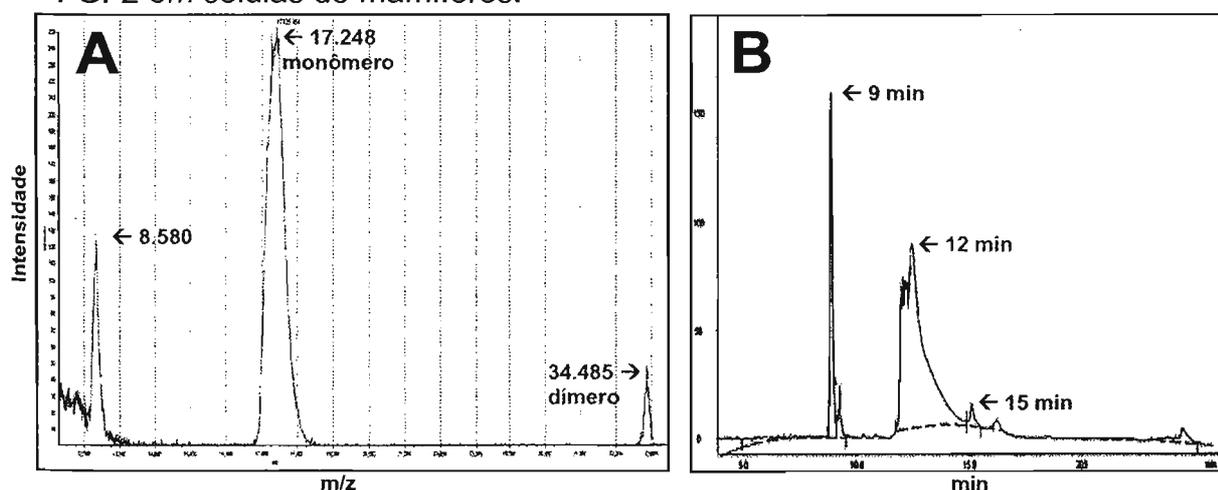


Figura M1: (A) Espectro de massa (MALDI) e (B) separação em HPLC do FGF2 recombinante bovino. O valor teórico m/z de $(M+H^+)$ para o FGF2 recombinante humano é 17.103 (Venkataraman et al., 1999). No espectro podemos observar os dímeros de FGF2-FGF2 (34.485) e o pico de $m/z = 8.580$ que corresponde ao monômero com carga dupla $(M+2H^+)$. A calibração foi sempre externa, utilizando padrões de massa molecular correspondentes a faixa de massa a ser analisada (mioglobulina).

FGF4 e **FGF5** ambos humanos (formas recombinantes) comprados da Sigma (St. Louis, MO).

PMA (phorbol 12-myristate-13-acetate) um análogo de DAG (diacilglicerol), um segundo mensageiro intracelular ativador de PKC, adquirido da Sigma.

Di-butilil-cAMP um análogo do mensageiro intracelular cAMP utilizado como ativador de PKA adquirido da Sigma (St. Louis, MO).

2.4. Anticorpos

- **Policlonais de coelho:** anti-c-Fos, anti-c-Myc, anti-phospho-CREB1 (Ser133), anti-ciclina D1 e anti-ciclina A todos da Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA);
- **Monoclonais:** anti-Ki-Ras da Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) e anti-BrdU (Amersham-Pharmacia) ambos de camundongo
- IgG (Fab specific) anti-mouse conjugado com FITC da Sigma;
- Anticorpo anti-AKT, anti-phospho-AKT (Ser473), anti-Erk1-2 e anti-phospho-Erk1-2 (Thr202 e Tyr204) da New England Biolabs (Beverly, MA);
- Anticorpo horseradish peroxidase labelled anti-rabbit (HRP) (Amersham-Pharmacia).

2.5. Soluções

- **Líquido de cintilação** (4g PPO + 0,1g POPOP + 1L Tolueno);
- **Tripsina** (solução 0,1% em PBSA e 1 mM de EDTA);
- **PBS** – KCl 2,7mM, NaCl 137mM, Na₂PO₄ anidro 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM, CaCl₂.2H₂O 0,68mM e MgCl₂.6H₂O 0,49mM (pH 7,2);
- **PBSA** – NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂PO₄ anidro 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM;
- **DMEM** + 1,2g/ml de bicarbonato de sódio);
- **Corante Ponceau** (0,1%Ponceau, 10%ácido acético glacial);
- **TBST** (10mM Tris base pH8,0, 150mM NaCl, 0,2% Tween-20);
- **Tampão de transferência** para SDS-PAGE: 25mM Tris-base, 0,2M glicina, 20% metanol (pH8,5);

- **Tampão de corrida** para SDS-PAGE: 25mM Tris-base, 250mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3;
- **Tampão de lise** “RIPA”: 10mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 0,1% SDS;
- **Tampão de amostra** (2X): Tris-HCl 100mM, ditiotretitol 200mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20%;
- **Tampão de lise branda** (para ensaios de alongação de cadeia de DNA): Triton X-100 0,5%, NaCl 0,1M e EDTA 10mM);
- **Tampão de lise nuclear** (para ensaios de alongação de cadeia de DNA): NaOH 0,3N, NaCl 1M, EDTA 10mM.

2.6. Reagentes

³H-Timidina e Timidina, membrana de nitrocelulose Hybond-c extra e Kit ECL Western Blot Enhanced Chemiluminescence (todos Amersham-Pharmacia); DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole), Dexametasona, BrdU (bromodeoxyuridine), DAB (Diaminobenzina), IP (iodeto de propidium), ácido trifluoroacético (TFA), Acetonitrila e Albumina (BSA) (todos Sigma); FCS (Fetal Calf Serum - Cultilab); Reagente Bradford (Bio Rad); SDS (sodium dodecyl sulfate), Metanol, Etanol, HCl e Formaldeído em solução (Merck); Kit Vecstatin Elite ABC (Vector laboratories); NP40 (Dupon); Colcemida (Gibco); Kit In Situ Cell Death detection, POD (Roche Diagnostics); IPTG (“isopropilthiogalactoside”).

2.7. Inibidores

- **Inibidores** para tampão de lise SDS/PAGE: ortovanadato de sódio (1mM), aprotinina (2µg/ml), pepstatina (2µg/ml) e PMSF (2µg/ml) todos da Sigma e DTT;
- **Inibidores de quinases de vias de sinalização**: inibidores de PI3K: Wortmanina e Ly294002 (Cell Signaling Technology).

2.8. Equipamentos

Espectrofotômetro de Cintilação Líquida Computadorizado (Packard); Paquímetro; Seringas para Insulina (Becton Dickinson AR); aparelho FACSTARplus (Becton Dickinson, San Jose, CA) com laser de ion Argônio (488nm) usando o software Lyses II; estufas de CO₂ para cultura de células (Forma Scientific); HPLC binário (Shimadzu Class 10Avp); coluna C18 (Waters NovaPak, 2mm x 150 mm); microscópio óptico de fluorescência (Microscópio Nikon Fluophot).

3. Métodos

3.1 Quantificação de proteínas pelo método de SDS-PAGE/ Western Blot

São plaqueadas 5×10^6 células/P60 (placas Corning – 60 mm) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24 horas.

Em experimentos aonde as células são sincronizadas em G0, as células são lavadas 1x PBS + 2x DMEM (ambos à 37°C) aonde permanecem em DMEM na ausência de soro, por 48 horas para sincronismo em G0. Após este período as células são estimuladas no chamado “tempo 0h” pelos tratamentos adequados.

Em células não sincronizadas em G0, após 24h do plaqueamento as células são lavadas 1x PBS + 2x DMEM (ambos à 37°C) e iniciam-se imediatamente os tratamentos adequados (tempo 0h). No tempo 0h as células são estimuladas com os fatores descritos em cada experimento e, no caso de pulsos, após seu término as células são lavadas 1x PBS e 2x DMEM e retornam para DMEM ± FCS10%.

Após os tratamentos as células são lavadas (1X PBS, 37°C) e lisadas com o tampão de lise “RIPA” + inibidores. Raspam-se imediatamente as placas, centrifuga-se a 14.000 rpm por 10 min (Microcentrifuga Eppendorf). O sobrenadante é alíquotado e guardado em freezer à -80°C. Reserva-se uma alíquota para dosagem de proteínas, que é feita utilizando-se o reagente de Bradford. Uma vez quantificadas, alíquotas de 50-100µg são aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida (10-15%) e a eletroforese ocorre a 35 v por 16h.

As proteínas são transferidas a uma membrana de nitrocelulose (Hybond-c extra), aonde ocorre o processo de reação com os anticorpos primário (“overnight” 4°C em TBST + 5% leite desnatado) e secundário (1h 27°C em TBST), e posterior revelação com o Kit ECL.

3.2 Preparação de GST-RBD (Glutathione-S-Transferase-Ras-Binding-Domain)

A bactéria BL21 transformada com o plasmídeo pGEX-2T-RDB, foi inoculada em meio 2YT + 100µg/ml ampicilina e mantidas a 37°C por 16h.

Cerca de 3ml desta pré-cultura foi inoculado em 300ml de 2YT + 2% glicose + 100µg/ml ampicilina mantidas a 37°C até alcançar a A_{600} entre 0,6- 0,8. Neste ponto adicionou-se 1mM de IPTG e incubou-se por 2h. A suspensão de bactérias foi centrifugada por 10 min a 8krpm (4°C). O sedimento foi ressuspenso em 10ml PBS contendo 0,5-2mM DTT, 0,1µM aprotinina, 1µM de leupeptina, 1µM pepstatina e 1mM PMSF. As bactérias foram sonicadas por 10 ciclos (4°C, Microtip, 60W), procedimento este que se repetiu por 6 vezes. Após a adição de Triton X-100 na concentração final de 1%, misturou-se lentamente por 30 min (4°C), centrifugou-se a 3krpm por 10 min e adicionou-se glicerol na concentração final de 10%.

Os lisados bacterianos ricos em GST-RBD foram aliqotados e guardados a -80°C. Antes e após a indução com IPTG, retirou-se uma alíqota de 500µl, centrifugou-se e ressuspenso em 100µl de 1x tampão de amostra de SDS e foi utilizado 20µl para análise em 15% SDS-PAGE.

3.3 Lise celular e Precipitação de Ras-GTP

São plaqueadas 25×10^6 células/P150 (placas Corning – 150 mm) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24 horas e, se necessário, sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1.

Decorridos os tratamentos inicia-se o processo de lise celular com a lavagem das células (1x PBS), adição de tampão de lise "RIPA" + inibidores de proteases/fosfatases + 1mM $MgCl_2$ e raspagem. Os lisados são centrifugados a 14.000 rpm por 10 min, aliqotados e estocados a -80°C.

O lisado de GST-RBD (seção 3.2) é incubado com "beads" de glutathione-sepharose (Amersham-Pharmacia) por 1h à temperatura ambiente. Após a incubação, centrifuga-se (2krpm, 4 min) e lava-se 3x com tampão de lise "RIPA". A seguir incubou-se 50µg da proteína de fusão imobilizada (GST-RBD-

Glutathiona-Sepharose) com 800µg de proteína do lisado de células por 1 hora a 4°C. Centrifuga-se e lava-se 3x com tampão de lise “RIPA” + inibidores e ressuspende-se os “beads” em tampão de amostra de proteínas. As proteínas são fracionadas em gel 15% SDS-acrilamida.

3.4 Detecção da expressão de proteínas, método de Imunocitoquímica por reação de Imunoperoxidase

São plaqueadas cerca de 2×10^5 células/lamínula (1,3cm) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24 horas e, se necessário, sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1.

Decorridos os tratamentos, duas lamínulas de cada condição são coletadas, as células fixadas em formaldeído 3,7% (10 min), lavadas e permeabilizadas com 1% de NP40. As reações inespecíficas são eliminadas com soro normalizador (10% em PBSA + 0,3% de Triton) e incubadas com o anticorpo primário específico em PBSA + 1mg/ml BSA, por 16h à 4° C.

Utiliza-se o Kit Vectastin Elite ABC (Vector laboratories) e DAB (Sigma) para evidenciar as proteínas em questão. As lâminas prontas são contra-coradas com hematoxilina e posteriormente diferenciadas com LiCO_3 .

As lâminas prontas foram analisadas em microscópio óptico. Foi contado um total de 10^3 núcleos/experimento em cada condição experimental (N=1000).

3.5 Síntese de DNA detectada por incorporação de Timidina tritiada ($^3\text{HTdR}$) medida em espectrômetro de cintilação líquida

São plaqueadas 5×10^4 células/well (multi-well Corning, 24 wells/placa) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24 horas e, se necessário, sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1.

No tempo 0h as células são estimuladas com os fatores descritos em cada experimento e, no caso de pulsos, após seu término as células são lavadas 1x PBS e 2x DMEM e retornam para o meio completo.

Após ou juntamente aos tratamentos foi adicionado ao meio de cultura ^3H -Timidina ($1\text{-}2\mu\text{Ci/ml}$, 10^{-12}M a 10^{-7}M) por períodos e condições descritos em cada experimento.

Completados os tratamentos o meio com o radioativo era retirado e as células eram fixadas com ácido tricloroacético (TCA10%) e lisadas com NaOH 0,5M. O lisado é então transferido para filtros de papel, que são lavados com 1x TCA 5%, 2x etanol (70%) 1x Acetona e secos em estufa à 40°C por 2h.

Os filtros já secos são colocados em frascos apropriados contendo 5 ml de líquido de cintilação e contados no contador de cintilação líquida.

3.6 Medida de alongação de cadeia de DNA detectada por perfil de sedimentação em centrifugação de velocidade em gradiente de sacarose alcalina

São plaqueadas 5×10^4 células/well (multi-well Corning, 24 wells/placa) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24 horas. Ainda em meio completo, as células são tratadas com FGF2 (1nM) e, posteriormente, ^3H -Timidina ($1,5\text{-}2\mu\text{Ci/ml}$, 10^{-12}M) é adicionada em pulsos de 4 min ou 30 min nos intervalos indicados.

Após o pulso de ^3H -timidina, o meio era retirado, as células lavadas e retornadas para DMEM + FCS 10% + Timidina 10^{-5}M , aonde permaneciam por mais algumas horas para alongação da cadeia de DNA marcada com radioativo ou eram imediatamente lisadas.

Completados os tempos de alongação, o meio era retirado e as células lisadas em “tampão de lise branda” por 1 min, que preserva núcleos. Os núcleos, aderidos às placas, eram então lisados em “tampão de lise nuclear” por 30 min a 37°C .

Paralelamente preparam-se gradientes alcalinos lineares de 5-20% de sacarose em tubos do rotor Spinco SW50.1, em cujo topo uma alíquota do lisado nuclear é depositada, seguindo-se uma centrifugação por 2h a 25.000 rpm e 20°C . Coletam-se os gradientes através de uma bomba peristáltica, gotejando-se o material em filtros de papel (3 cm^2), que são lavados 1x TCA

5%, 2x etanol (70%), 1x Acetona, secos em estufa à 40°C e contados em espectrômetro de cintilação.

3.7 Estimativa do peso molecular de DNA

Para uma série homóloga de polímeros é possível relacionar o peso molecular da macromolécula (M) e seu coeficiente de sedimentação (S), como descrito por *Studier* (1965).

Num gradiente de sacarose, uma aproximação bastante razoável estabelece que S é diretamente proporcional à distancia percorrida pela macromolécula durante a centrifugação, expressa como o número da fração do gradiente em que a partícula está presente (N) (*Martin & Ames, 1961*), número este contado a partir do topo do gradiente e desconsiderada as três primeiras frações.

Equação (1):

$$\text{se: } S_n = K \times (M_n)^\alpha \text{ e } S_1/S_2 = N_1/N_2, \text{ logo } N_1/N_2 = \left| M_1/M_2 \right|^\alpha$$

K e α são constantes e dependem da conformação física da molécula. O valor de α é estimado em 0,400 para DNA em gradientes alcalinos (*Studier, 1965*).

O cálculo do peso molecular relativo médio (p.m) do DNA radiativo está baseado no perfil de sedimentação da população de macromoléculas ao longo das frações (F_i) do gradiente de sacarose. Para tal, usamos a quantidade de radioatividade presente em cada fração (r_i) conforme equação (2) abaixo (*Ehmann & Lett, 1973*):

$$\text{p.m} = \frac{\sum (r_i \times F_i)}{\sum r_i}$$

3.8 Síntese de DNA detectada por imunofluorescência em núcleos marcados com BrdU

A síntese de DNA pode ser determinada pela detecção da incorporação de BrdU (Bromodeoxiuridina) diluído no meio de cultura e incorporado na molécula de DNA. Posteriormente, as medidas da porcentagem de núcleos marcados podem ser determinadas pelo método de imunofluorescência indireta.

Para tal, são plaqueadas cerca de 2×10^5 células/lamínula (1,3cm) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24h e, se necessário, sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1.

No tempo 0h as células são estimuladas com os fatores descritos em cada experimento e, no caso de pulsos, após seu término as células são lavadas 1x PBS e 2x DMEM e retornam para DMEM \pm 10%FCS. Após ou juntamente aos tratamentos foi adicionado ao meio de cultura BrdU (50-100 μ M) por períodos e condições descritos em cada experimento.

No caso dos clones Y1-RasN17, o indutor de expressão de RasN17 (dexametasona, 0,5 μ M) é adicionado 12h antes do tempo 0h.

Decorridos os tempos de estímulo e incorporação, duas lamínulas de cada condição são coletadas e as células são lavadas (1x PBS a 37°C) e fixadas em metanol gelado por 10 min, lavadas (1x PBS a 37°C) e incubadas com HCl (1,5M) para desnaturação do DNA.

Após esse período inicia-se então a imunofluorescência, primeiramente com o anticorpo monoclonal anti-BrdU, por 1h e depois com o secundário anti-mouse com fluoresceína (FITC) por 30 min. Finalmente DAPI (corante fluorescente de cromatina) é adicionado e as lamínulas são montadas. As lamínulas são analisadas em microscópio de fluorescência (Microscópio Nikon Fluophot) usando dois diferentes filtros de excitação: o filtro UV330-338 (para visualização das células coradas com DAPI, i.e. número total de células) e o filtro IF420-490 (para as células marcadas com FITC). Foi contado um total de 10^3 núcleos/experimento corados com DAPI em cada condição experimental (N=1000).

3.9 Medida de proliferação celular por contagem em hemocitômetro

São plaqueadas $3-5 \times 10^4$ células/ P35 (Corning – 35mm) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24h e, se necessário, sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1. No tempo 0h as células são estimuladas com os fatores descritos em cada experimento e, no caso de pulsos, após seu término as células são lavadas 1x PBS e 2x DMEM e retornam para o meio completo.

Decorrido esse período iniciam-se os tratamentos (tempo 0h) sendo as células diariamente coletadas: as células de duas placas de cada condição são lavadas, suspensas em tripsina e diluídas 1:4 em DMEM. Imediatamente após a coleta, uma amostra é utilizada para contagem em hemocitômetro (câmara de Neubauer).

No caso dos clones Y1-RasN17, o indutor de expressão de RasN17 (dexametasona $0,5 \mu\text{M}$) é adicionado 12h antes do tempo 0h.

Nos experimentos com os inibidores de PI3K (Wortmanina, 100nM ou Ly294002, $5 \mu\text{M}$), as adições sempre ocorreram 60 min antes do tempo 0h.

3.10 Medida de proliferação celular por contagem de núcleos mitóticos

Para tal, são plaqueadas cerca de 2×10^5 células/lamínula (1,3cm) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) por 24h e, se necessário, sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1.

No tempo 0h as células são estimuladas com os fatores descritos em cada experimento e, no caso de pulsos, após seu término as células são lavadas 1x PBS e 1x DMEM e retornam para o meio completo.

No momento adequado, duas lamínulas de cada condição são coletadas e as células fixadas em formaldeído 3,7%, lavadas e seu DNA corado com DAPI.

As lamínulas são analisadas em microscópio de fluorescência usando o filtro UV330-338 para visualização das células coradas. Foi contado um total de $4-6 \times 10^3$ núcleos em cada condição de tratamento por experimento (N=4000-

6000). Foram considerados positivos os núcleos que apresentavam a cromatina condensada caracterizando as fases da mitose, conforme ilustrado abaixo:

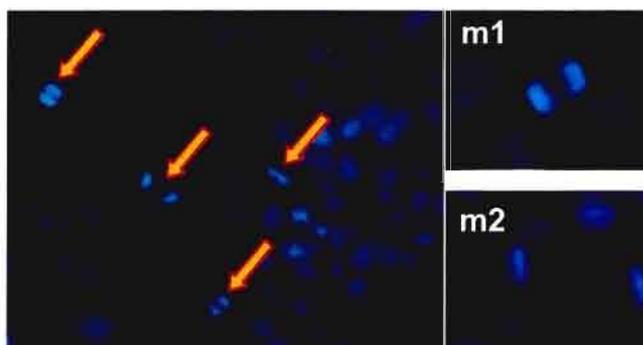


Figura M2: Contagem de núcleos mitóticos. Fotos representativas do método (núcleos mitóticos indicados). (m1 e m2 = detalhes de núcleos nas fases anáfase e metáfase, respectivamente).

3.11 Ensaio de FACS

São plaqueadas 5×10^6 células/P60 (Corning – 60 mm) em DMEM + soro (FCS10%) por 24h. Em seguida, as células são sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1. e são estimuladas no tempo 0h com FGF2 (135pM) ou soro (FCS10%) por 48h. Após as primeiras 24h de tratamento, as células são incubadas com colcemida (1 μ g/ml, 24h) um desestabilizador de microtubúlos que bloqueia o ciclo celular na interface G2/M.

As células são tripsinizadas, ressuspensas em DMEM + FCS10%, centrifugadas (2000 rpm, 10 min) e fixadas em etanol 70%. Outra centrifugação e são suspensas em PBS e tratadas com RNase (DNase free) (100 μ g/ml) por 4h. Decorrido esse período é adicionado IP (iodeto de propidium) por 30 min.

As amostras são gentilmente analisadas pelo Prof. Ivan Schumacher (IQ – USP), em aparelho FACSTARplus usando o software Lyses II.

3.12 Quantificação do número de cópias gênicas por célula pelo método de Southern Blot

São plaqueadas 12×10^6 células/P100 (placas Corning – 100 mm) em meio DMEM + 10%FCS por 48 horas. O DNA genômico foi extraído conforme já descrito em SamBrook et al., 1989 e submetido a uma digestão de 2h com ECO RI (Pharmacia), que libera quatro fragmentos de tamanhos diferentes esperados para c-Ki-Ras. Após os fragmentos de DNA terem sido fracionados em gel de agarose (0,8% em 0,5X TBE), o gel foi transferido por capilaridade para membrana de nitrocelulose e as membranas hibridizadas com o fragmento de Ki-ras marcado com ^{32}P .

3.13 Morte celular detectada por ensaio de formação de colônias

O protocolo padrão resume-se ao plaqueamento de 400-1000 células/P60 (placas Corning – 60 mm) em meio completo (diferente para cada tipo celular, seção 2.1.) \pm FGF2 (concentração indicada em cada experimento). Decorridas 24 horas, as células são lavadas (1x PBS + 2x DMEM, a 37°C) e retornam ao meio completo ausente de FGF2 para o crescimento das colônias estabelecidas. O meio completo ausente de FGF2 é renovado a cada 2-3 dias até o momento da fixação. Após 10-15 dias formam-se colônias visíveis e suas células são fixadas em formaldeído 3,7% por 15 min e coradas em violeta genciana (10 min).

3.14 Detecção de apoptose pelo método de Tunel

São plaqueadas 2×10^5 células/lamínula (1,3cm) em DMEM + 10% FCS por 24h e sincronizadas em G0 como apresentado na seção 3.1. As células são estimuladas, no tempo 0h, por FGF2 (135pM) ou soro (FCS10%) por 12-48h. Após esse período as lamínulas são lavadas e fixadas (15 min em formaldeído 3,7%) e segue-se o protocolo de marcação de fitas quebradas de DNA descrito

em: **Instruction manual – Roche** (versão 4, 1999) também na página da web: <http://biochem.roche.com/pack-insert/16848179A.pdf>

As lamínulas são analisadas em microscópio de fluorescência usando os filtros de excitação: UV330-338 e o filtro IF420-490. Foi contado um total de 10^3 núcleos corados com DAPI/experimento em cada condição de tratamento (N=1000).

3.15 Estudo analítico do FGF2 por HPLC e MALDI-Tof MS (offline) (cromatografia em fase líquida em alta pressão acoplada com espectrometria de massa)

As amostras de 1µl de FGF2 recombinante, produzidas e doadas pelo Dr. A. G. Gambarini (IQ, USP) e armazenadas a 135µM em PBSA, foram separadas por um HPLC binário, utilizando uma coluna C18 (Waters NovaPak, 2mmx150mm), sob fluxo constante (1ml/min), gradiente de 10-80% por 40 min e monitorada por absorvância a 220nm (solvente A = ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e solvente B= acetonitrila 90% + 0,1% TFA).

As frações foram manualmente coletadas, secas em um sistema de speed-vac e ressuspensas em 5µl em solução 0,1% TFA. Esta solução foi misturada 1:1 (v/v) com uma solução saturada de matriz (ácido sinápinico) e cerca de 0,4µl foi depositado sobre o amostrador do MALDI-ToF.

A calibração foi sempre externa, utilizando padrões de massa molecular correspondentes a faixa de massa a ser analisada.

Esta mistura foi seca ao ambiente e depois introduzida no espectrômetro para análise em modo positivo linear para análise de proteínas. A aquisição do sinal foi feita no modo automático e o processamento de dados foi realizado pelo modulo de análise do programa de controle (Amersham).

3.16 Teste de flutuação de Luria e Delbrück

A adaptação do teste de flutuação de *Luria e Delbück* (1943) consistiu em ensaios de formação de colônias (como descrito na seção 3.13) divididos em dois componentes (ver **Fig. 22**): 1) placas com cerca de 400 células Y1/P60

(Corning, 60 mm) em DMEM + soro \pm FGF2 (1nM, 24h) para cálculo da frequência de células FGF2-resistentes e; 2) uma série de controles de igual plaqueamento, mas na ausência de FGF2 para isolamento de 23 colônias crescendo em DMEM + soro representando “culturas secundárias” escolhidas aleatoriamente na população de células Y1 (denominados de células Y1-C1-23).

Estas “culturas secundárias” são individualmente submetidas aos mesmos ensaios de formação de colônias para cálculo da frequência de células FGF2-resistentes, descritos acima.

De acordo com Luria e Delbrück temos duas hipóteses possíveis: 1) a Lamarckiana, aonde o fenótipo “FGF2-resistente” é induzido por FGF2, neste caso assume-se que cada célula tem a mesma chance de sobrevivência e assim a variação na distribuição de células resistentes nas “culturas secundárias” deverá ser igual ao valor observado na cultura estoque de células Y1; 2) a Darwiniana, assume-se que as células FGF2-resistentes pré-existem na população de células Y1 sendo apenas selecionadas por FGF2, neste caso a variação na distribuição de células resistentes nas “culturas secundárias” deverá ser muito maior do que na população de células Y1 e deve seguir uma equação de Poisson.

3.17 Ensaios de tumorigênese em camundongos Balb/c Nude

10^6 células são suspensas em 0,1ml de DMEM \pm 2ng de FGF2 e são, após 10 min, injetadas subcutâneamente na região dorso-lombar direita/camundongo Balb/c Nude FCF/IQ (5-7 semanas de vida) (ver **Fig.30**).

Tratamentos locais de FGF2 (400ng FGF2/kg) em 0,1ml DMEM são administrados após 24 horas e posteriormente a cada 48 horas da injeção inicial. Nos animais controle (i.e. não tratados com FGF2) são administradas injeções de 0,1ml de DMEM.

Após 10-20 dias da injeção inicial o estabelecimento do tumor é determinado por exame visual e com paquímetro são tiradas as medidas de comprimento e largura do tumor. Os animais cujos tumores superem uma área de 5cm^2 ou estiverem próximo a necrosar são sacrificados por inalação de éter.

Alguns tumores já estabelecidos (2-4cm²) foram removidos em ambiente estéril, lavados e dissociados mecanicamente em agregados celulares mantidos em DMEM+FCS10% até adesão à superfície da placa de cultura. Os clones de células “Ex-vivo-Y1” denominados de “Y1-T1” e “Y1-T2” foram obtidos do tumor controle (i.e. animais não tratados com FGF2) e do tumor de animais tratados com FGF2, respectivamente. Após atingirem densidade de saturação os clones são transferidos e comparados às células Y1 originais quanto à sua semelhança morfológica e resposta de indução da proteína c-Fos por tratamentos de ACTH₁₋₃₉ (hormônio adrenocorticotrópico).

4. Resultados

4.1. Disparo da mitogênese e progressão na fase G1 do ciclo celular induzidos por FGF2 em células tumorais Y1

Medimos concentrações relativas de Ki-Ras-GTP através da alta afinidade específica entre Ki-Ras-GTP e GST-RBD (“glutathione-S-transferase-Raf-binding-domain”), cujo complexo [Ki-Ras-GTP/(GST-RBD)] foi isolado por adsorção a glutathiona-sepharose e, por último, estimamos os níveis da proteína p21-Ki-Ras por Western Blot com anticorpos específicos para c-Ki-Ras (Santa Cruz, CA).

A **figura 1** mostra os resultados de uma cinética de estimulação de células Y1 sincronizadas em G0/G1 e tratadas com FGF2 (1nM) ou soro (FCS 10%). O lisado total (**Fig. 1B**) representa 10% do volume de lisado celular utilizado para os ensaios de afinidade de Ki-Ras-GTP (**Fig. 1A**). Estes resultados evidenciam que FGF2 induz ativações seqüenciais de c-Ki-Ras ao longo da fase G1 do ciclo celular, envolvendo uma primeira ativação transiente e rápida (30seg-1min), seguida de ativações tardias mais longas (30min-1h; 5h).

Estas observações sugerem que a atividade de Ki-Ras-GTP é requerida em momentos distintos: no disparo do sinal mitogênico (“G1-inicial”) e, mais tardiamente, durante a progressão da fase G1 do ciclo celular (“G1-tardio”).

Nesta mesma figura observamos que tratamentos de Soro induzem apenas dois aumentos na ativação de c-Ki-Ras: o primeiro ocorre após 15 minutos da adição de soro e o segundo, mais tardio, ocorre entre 2-5 horas. Estas diferentes cinéticas de ativação de Ki-Ras entre soro e FGF2 implicam em diferentes conjuntos de efetores sendo ativados/inibidos ao longo de G1.

Em alguns trabalhos com fibroblastos NIH3T3, microinjeções de anticorpos anti-Ras bloqueiam a progressão $G1_{\text{tardio}} \rightarrow S$ induzida por soro (Mulcahy *et al.*, 1985), mostrando que atividade de Ras é essencial em múltiplos pontos de G1 (Dobrowolski *et al.*, 1994).

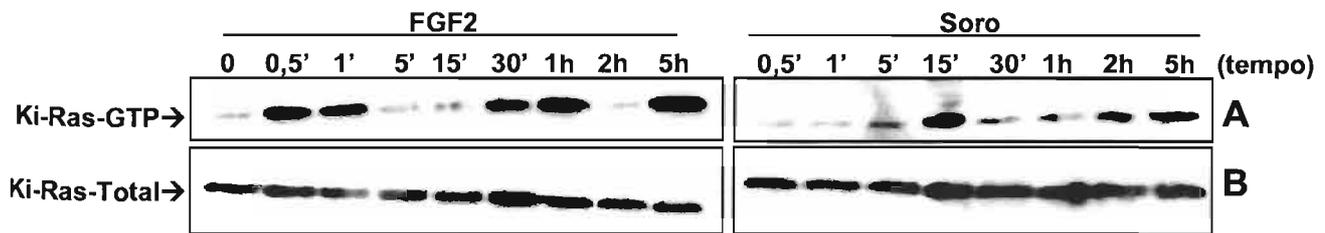
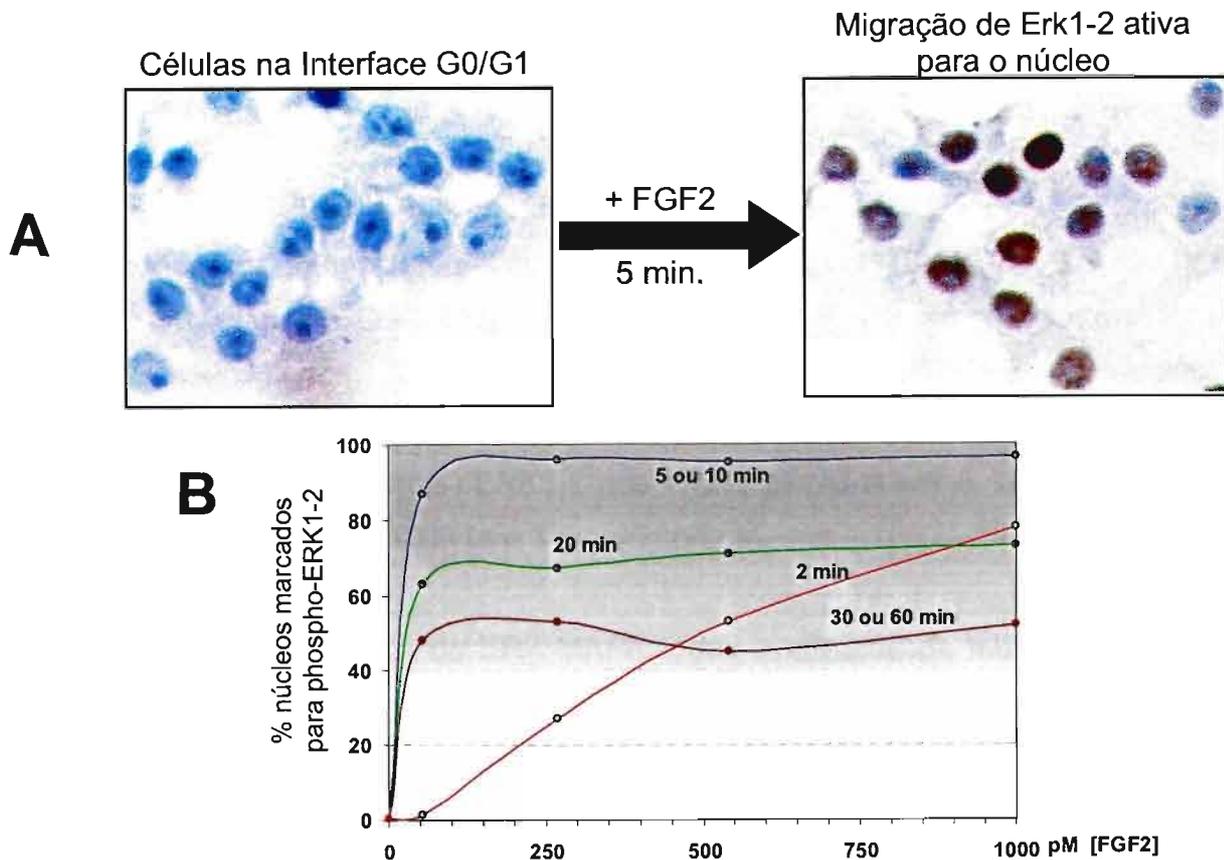


Figura 1: Cinética de ativação de c-Ki-Ras, pelo método de SDS-PAGE/ Western Blot, em células Y1 sincronizadas em G0 e tratadas com FGF2 (1nM) ou Soro (FCS 10%). (A) Ki-Ras-GTP foi isolada do lisado total por precipitação de alta afinidade com GST-RBD e foi utilizado o anticorpo anti-c-Ki-Ras para sua detecção. O lisado total, sem precipitação em GST-RBD, foi incubado com o anticorpo anti-Ki-Ras (B). Os lisados totais em B representam 10% do volume utilizado para os ensaios de precipitação de Ki-Ras-GTP.

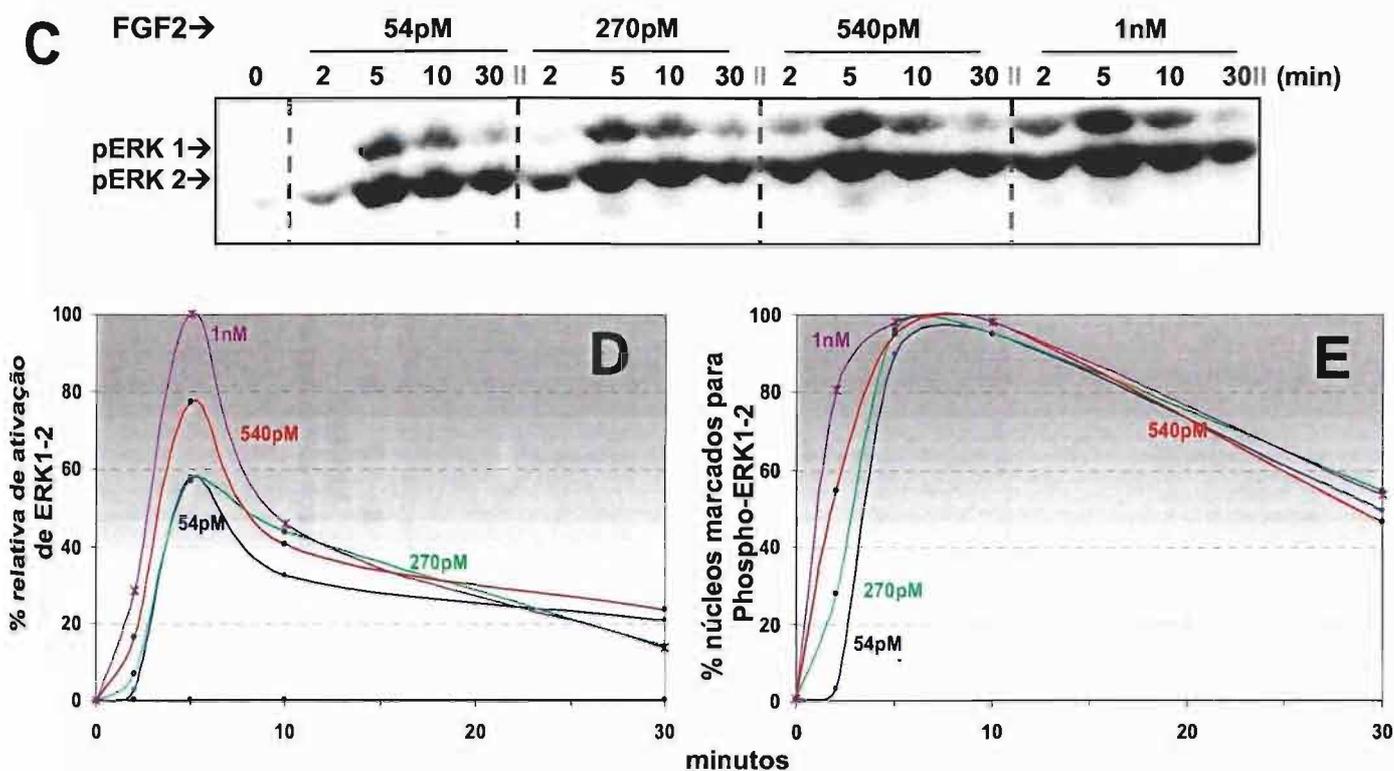
Através da utilização de métodos complementares: imunocitoquímica e SDS-PAGE/ Western Blot, é possível acompanhar a ativação total de ERK (fosforilação), a porcentagem de células estimuladas e a migração da forma ativa (phospho-ERK ou pERK) do citoplasma para o núcleo. Para tal, células Y1 foram sincronizadas em G0 e tratadas com FGF2 (54, 270, 540pM ou 1nM) pelos períodos indicados e submetidas a análises por ambas as metodologias.

Os resultados deste estudo cinético (**Fig. 2**) mostram o seguinte: a) essencialmente todas as células da população são estimuladas independentemente da concentração de FGF2; b) a ativação de ERK e a entrada de pERK no núcleo são ambos dependentes de tempo e dose de FGF2 ($ED_{50\%}^{2min} = 375pM$ e $ED_{50\%}^{>5min} = 20-30pM$); c) a desativação de pERK (desfosforilação) é independente da concentração de FGF2; d) o ensaio de Western Blot revela um perfil com um aumento agudo em 5min seguido de um decaimento compatível com uma cinética de primeira ordem (**Fig. 2C e 2D**); e) por outro lado, o perfil de porcentagem de núcleos marcados é qualitativamente diferente, sugerindo uma cinética mais complexa e um decaimento muito mais lento (**Fig. 2E**). Estes perfis cinéticos diferentes são conciliáveis se admitirmos que a parcela de pERK nuclear seja pequena em relação a pERK total e por isso deve contribuir pouco para a cinética detectada por Western Blot. O conjunto destes resultados e respectiva interpretação

implicam que o compartimento nuclear de pERK está sujeito a uma rede de controle diferente do compartimento citoplasmático de pERK. Esta conclusão não pode ser confirmada pela contagem de citoplasma marcado com anti-pERK, pois os valores da porcentagem de citoplasma marcado não são tão confiáveis como os de núcleos marcados. Mas, deve-se enfatizar que embora a porcentagem de núcleos marcados sejam quantificações muito confiáveis, não é possível por estes ensaios imunocitoquímicos estimar níveis de pERK por núcleo. Para, pelo menos em parte, superar esta limitação é possível indagar se a porcentagem de núcleos marcados com anti-phospho-ERK se correlaciona com ativação de fatores de transcrição e indução de genes sabidamente acionados por phospho-ERK.



Figuras 2A e B: Cinéticas de ativação de ERK1-2 por FGF2 pelo método de imunocitoquímica (A e B). Células Y1 sincronizadas em G0/G1 foram estimuladas por FGF2 nas concentrações e tempos indicados. N=3000 (em 3 experimentos).



Figuras 2C, 2D e 2E: Cinéticas de ativação de ERK1-2 por FGF2 pelos métodos de imunocitoquímica (E) e Western Blot (C e D). Células Y1 sincronizadas em G0/G1 foram estimuladas por FGF2 nas concentrações e tempos indicados. (D) Curva de decaimento de pERK1-2 por análise densitométrica dos resultados em C em valores percentuais relativos (N=1). (E) Curva de decaimento de pERK1-2 dos dados plotados em A. Nos ensaios de imunocitoquímica N=3000 (em 3 experimentos).

A ativação da via de ERK-MAPK induz a ativação de muitos fatores de transcrição como, por exemplo, proteínas do complexo TCF, como CREB1. A ativação de CREB1 (fosforilação do resíduo S133) promove sua ligação aos promotores e indução da transcrição de genes do complexo AP-1 (c-Fos e c-Jun) que são requeridos para a progressão da fase G1 do ciclo celular (*Ginty et al. 1994, Bourtchuladze et al. 1994*).

A cinética da **figura 3** indica que células Y1 tratadas com FGF2 por 10 min mostram 88% de núcleos marcados com anti-pCREB1. Além disso, a cinética da **figura 4** mostra 80% de núcleos marcados por anti-c-Fos em células Y1 tratadas com FGF2 por 2h. Portanto os resultados das figuras 2, 3 e 4 demonstram que há estreita correlação entre ativação de ERK (5 min, 98%),

ativação de CREB1 (10 min, 88%) e indução da proteína c-Fos (2h, 80%) em células Y1 sincronizadas em G0/G1 e estimuladas com FGF2. Mas, esta correlação não implica necessariamente numa relação linear de causa-efeito através da via $FGFR \rightarrow pERK \rightarrow pCREB1 \rightarrow \text{gene c-fos}$.

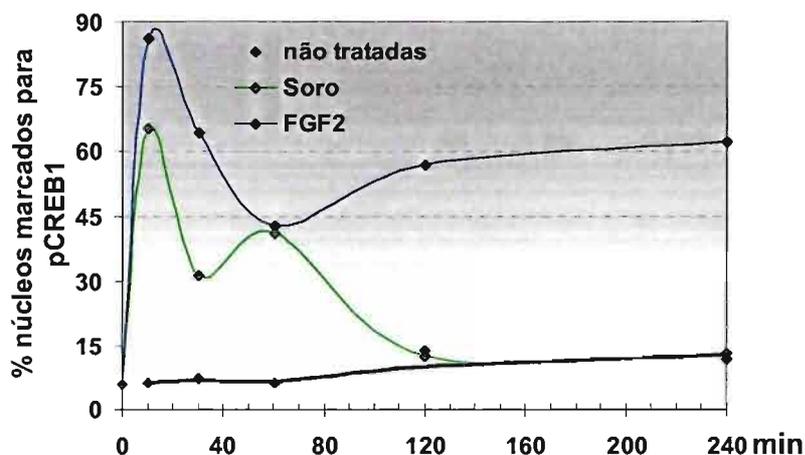


Figura 3: Cinética de ativação de CREB1, pelo método de imunocitoquímica em células Y1 sincronizadas em G0 e estimuladas por tratamentos de Soro (FCS 10%) ou FGF2 (135pM) e coletadas periodicamente. Foi utilizado o anticorpo anti-phospho-Ser133-CREB1. N=3000 (em 3 experimentos independentes).

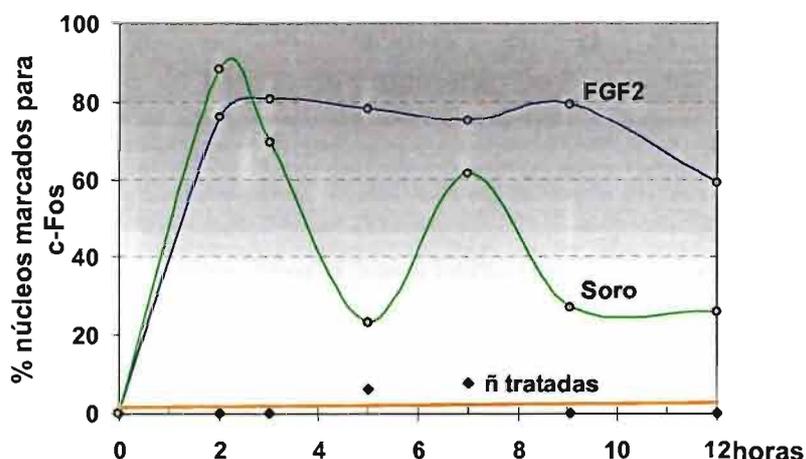


Figura 4: Cinética da expressão de c-Fos. Ensaios de imunocitoquímica em células Y1 sincronizadas em G0 e estimuladas por tratamentos de FGF2 (135pM) ou soro (FCS10%) e coletadas periodicamente. Foi utilizado o anticorpo anti-c-Fos (Santa Cruz). N=1500 (em 2 experimentos independentes).

Por outro lado, o fato de praticamente toda a população de células Y1 sincronizadas em G0/G1 responderem a FGF2 executando as etapas iniciais da resposta mitogênica não garante uma eficiente progressão através de G1 e entrada na fase S. Pelo contrário, um pulso de 2h de FGF2 causa uma elevação na porcentagem de núcleos marcados com BrdU de apenas 10%, conforme documentado na **figura 5**:

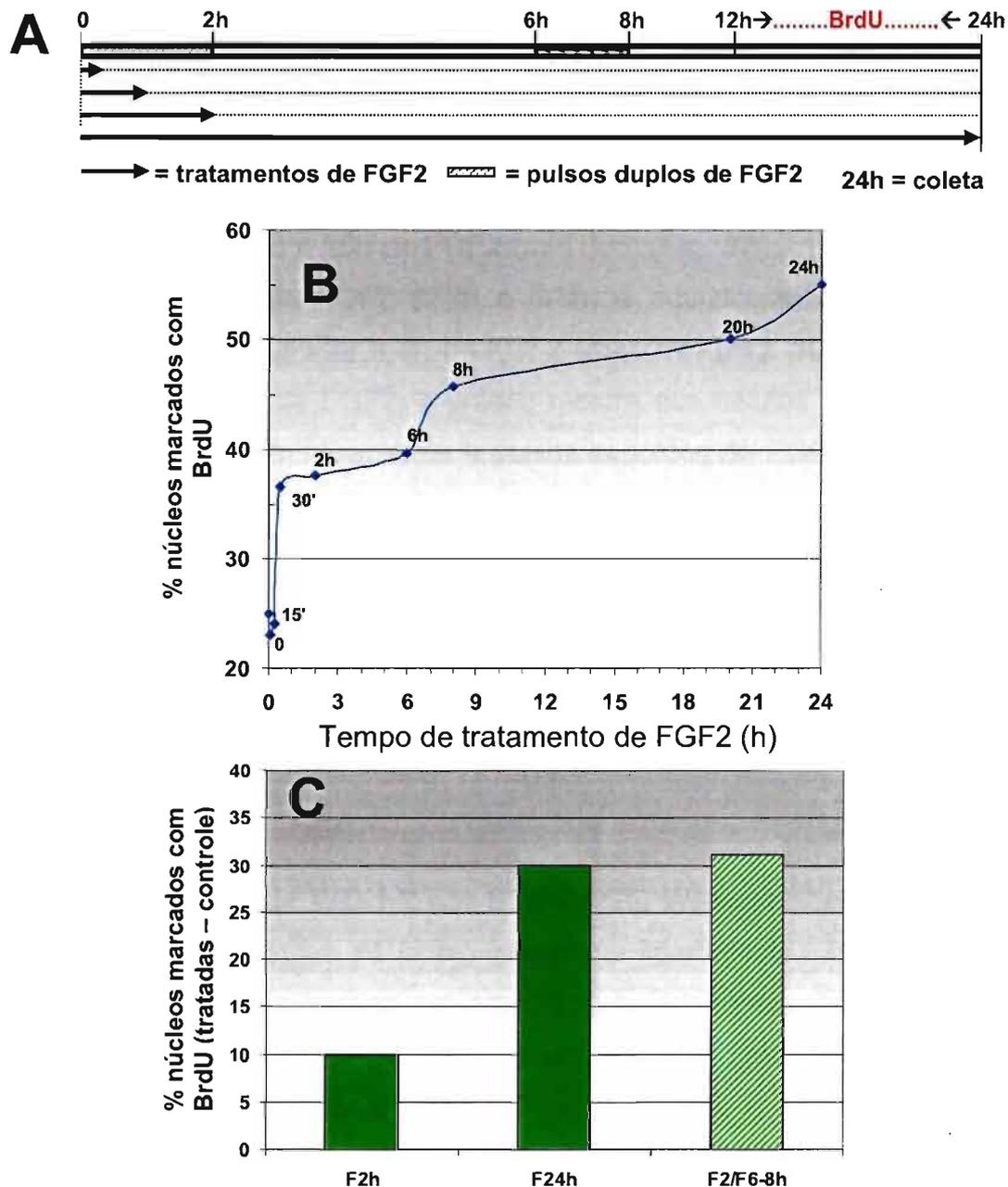


Figura 5: Síntese de DNA por imunocitoquímica (marcação com BrdU) (A) Protocolo experimental para estudo de pulsos e tratamentos contínuos de FGF2: células Y1 sincronizadas em G0 são estimuladas por pulsos de 5 min a 20 horas, tratamentos sustentados de 24 horas ou pulsos duplos de FGF2.

Após cada pulso as células são lavadas e retornam ao meio sem soro (DMEM) até a fixação, que ocorre no tempo de 24 horas. (B) Ensaio em células Y1 segundo protocolo em A, na ausência de **segundos pulsos**. N=3000 (em 2 experimentos independentes). (C) Segundo protocolo em A, células Y1 foram submetidas a pulsos iniciais (2h) e segundos pulsos de FGF2 entre 6-8h (F2h/F6-8h) e coletadas em 24 horas. N=2000 (em 2 experimentos independentes). A marcação com BrdU (75µM) ocorre sempre entre 12-24 h.

Esta figura mostra mais que isso: a) 30 min é o tempo mínimo de FGF2 para que células atinjam a fase S (**Fig. 5B**); b) são estatisticamente significantes as diferenças no número de células que atingem a fase S entre tratamentos de 2h, 8h e 20h de FGF2 ($p \leq 0,025$) (**Fig. 5B**); c) a combinação de dois pulsos de 2h de FGF2 (0-2h e 6-8h) é equivalente a um tratamento contínuo de 24h e superior a 8h de FGF2 ($p \leq 0,025$) (**Fig. 5C**). A respeito dos pulsos consecutivos de FGF2, a prática mostra que células Y1 sincronizadas em G0/G1 respondem igualmente a pulsos seguidos de FGF2, em termos de ativação de ERK1-2 (**Fig. 6**).

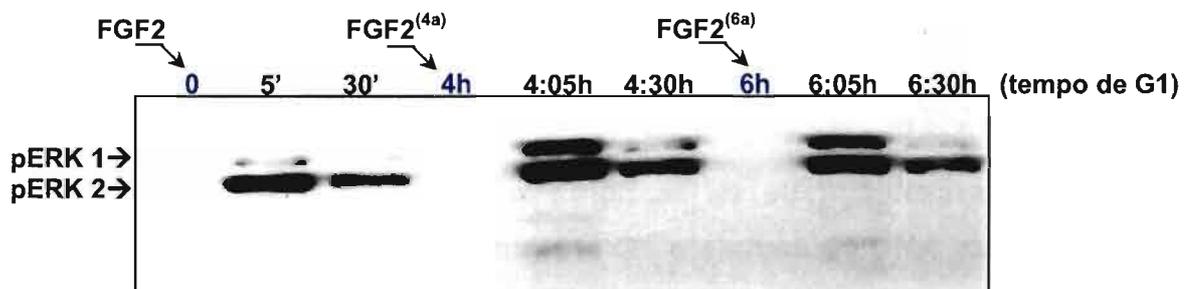


Figura 6: Ativação de ERK1-2 por SDS-PAGE/ Western Blot. FGF2 (54pM) foi adicionado em células Y1 sincronizadas na interfase G0/G1 em diferentes momentos de G1. Os tempos em azul (0, 4 e 6h) representam a adição de FGF2. Todas as placas foram estimuladas por FGF2 no tempo 0h: sendo que seis delas, após 5 min de tratamento, foram lavadas e retornaram ao meio DMEM até um segundo tratamento tardio de 54pM de FGF2 na 4ª ou 6ª hora (FGF2(4a ou 6a)) de 5 ou 30 min. Em todos os casos foi utilizado o anticorpo anti-phospho-ERK1-2. N=1.

Desta forma, mostramos até agora que FGF2 é capaz disparar uma sinalização tipicamente mitogênica em praticamente 100% das células Y1 sincronizadas em G0/G1 envolvendo a rápida ativação de proteínas-chave como Ki-Ras, ERK1-2 e CREB1 e, também a indução do gene c-fos. Apesar da eficiência desse disparo, atingindo a totalidade da população de células, o processo não é suficiente para garantir a entrada de 100% das células na fase S, conforme esquematizado abaixo na **Figura 7**:

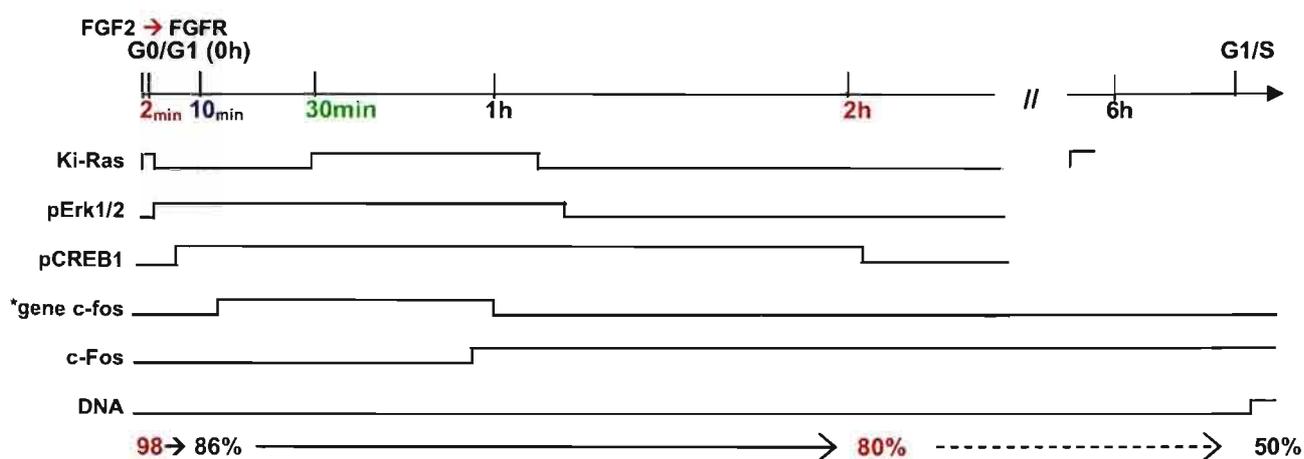


Figura 7: Esquema qualitativo das cinéticas de ativação/expressão do gene c-fos, proteínas e enzimas durante G1 e síntese de DNA em células Y1 inicialmente sincronizadas em G0/G1 e submetidas a tratamentos sustentados de FGF2. As porcentagens referem-se à parcela da população de células Y1 que atingiram sincronicamente aquele momento do ciclo celular, evidenciado por expressão/ativação protéica ou síntese de DNA. \square = ativação/expressão. *=dados obtidos da Ana P. Lepique e Hugo A. Armelin (não publicados).

4.2. Efeitos de FGF2 na fase S do ciclo celular: iniciação de replicons e alongação das cadeias do DNA

Em células Y1, FGF2 dispara uma resposta mitogênica induzindo a transição G0→G1 e a entrada na fase S medida pela porcentagem de núcleos marcados com BrdU, conforme resultados já publicados por nosso laboratório (*Lepique et al., 2004, Rocha et al. 2003, Schwindt et al., 2002, Lotfi & Armelin, 1999 e 2001, Lotfi et al., 1997, Armelin et al., 1996*), confirmados e expandidos pelos dados relatados nesta tese (**Fig. 1 a 6** e esquema da **Fig. 7**). Entretanto, a comparação do índice de marcação com BrdU com a tomada de radioatividade em DNA pela incorporação de timidina tritiada, em células Y1 tratadas com FGF2, sugeriu um quadro muito diferente, até então despercebido. FGF2 age como mitógeno estimulando células Y1 a entrar na fase S, mas é danoso às células que não conseguem processar corretamente a síntese de DNA, não completando a fase S.

A **Tabela 1** reúne resultados de marcação com BrdU, incorporação de ³H-TdR e índice mitótico para células Y1 sincronizadas em G0/G1 e estimuladas por soro e/ou FGF2. Os dados de marcação com BrdU indicam a estimulação conhecida: Soro 5,2 vezes maior que o controle, Soro+FGF2 4,6 e FGF2 3,3 vezes maior. Já a incorporação de ³H-TdR mostra a estimulação esperada para Soro (4,7 vezes), mas uma redução drástica da tomada da tomada de radiatividade em DNA para células tratadas com soro+FGF2 ou FGF2. Em concordância com esses resultados observa-se um esperado aumento no índice mitótico para Soro (5,2 vezes), enquanto células tratadas com Soro+FGF2 e FGF2 mostram acentuada queda no índice mitótico em relação ao controle (respectivamente, 0,6 e 0,0 vezes).

Tabela 1**FGF2 inibe a progressão da fase S do ciclo celular depois de induzir o início da síntese de DNA em células adrenocorticais Y1.**

Células Y1 sincronizadas em G0/G1 foram estimuladas por tratamentos de 18h de soro (FCS10%) e/ou FGF2 (1nM). Durante as últimas 8h anteriores a coleta as células foram tratadas com BrdU (50 μ M) ou ³H-Timidina (³HTdR, 1 μ Ci/ml; 10⁻⁷M) sendo então processadas como descrito em Métodos. *N=1500. **N=2. ***N=6000.

Condições	Marcação com BrdU* (%)	Incorporação de ³ HTdR** (cpm . 10 ³)	cpm ³ HTdR . 10 ³ / %BrdU	Núcleos mitóticos*** (%)
Não tratadas	18	17,1 \pm 4,4	0,95	1,2 \pm 0,6
Soro (FCS)	94	80,6 \pm 3,7	0,85	6,2 \pm 1,8
FCS + FGF2	82	32,2 \pm 5,2	0,39	0,7 \pm 0,7
FGF2	60	17,5 \pm 5,2	0,29	0

Estes resultados são compatíveis com um bloqueio do ciclo celular na fase S devido a detrimetos causados por FGF2 no sistema de replicação de DNA das células Y1. Esta última conclusão é confirmada por uma análise citofluorimétrica da progressão de células Y1 através do ciclo celular. A **figura 8** mostra que células Y1 sincronizadas em G0/G1 estimuladas por soro e depois bloqueadas na mitose por 24h de colcemida exibem um perfil de distribuição com grande acúmulo de células com um conteúdo 4N de DNA. Por outro lado, células Y1 submetidas a tratamento idêntico, mas com FGF2 em lugar de soro mostram um perfil com quantidades negligenciáveis de células 4N (**Fig. 8**). Nestes ensaios, poderia ser esperado que a população de células tratadas com FGF2 acumulasse na fase S do ciclo celular, pois sabemos que tratamentos de FGF2 por 24 horas induzem o início de síntese de DNA. Esta aparente discrepância pode ser explicada pela pequena síntese de DNA, detectada pelos baixos níveis de incorporação de timidina, que ocorre nestas condições (conforme mostrado na **Tabela 1**). Assim, o baixo conteúdo de DNA duplicado tornaria indistinguível, por esta metodologia, células em G1 de células no início da fase S do ciclo celular.

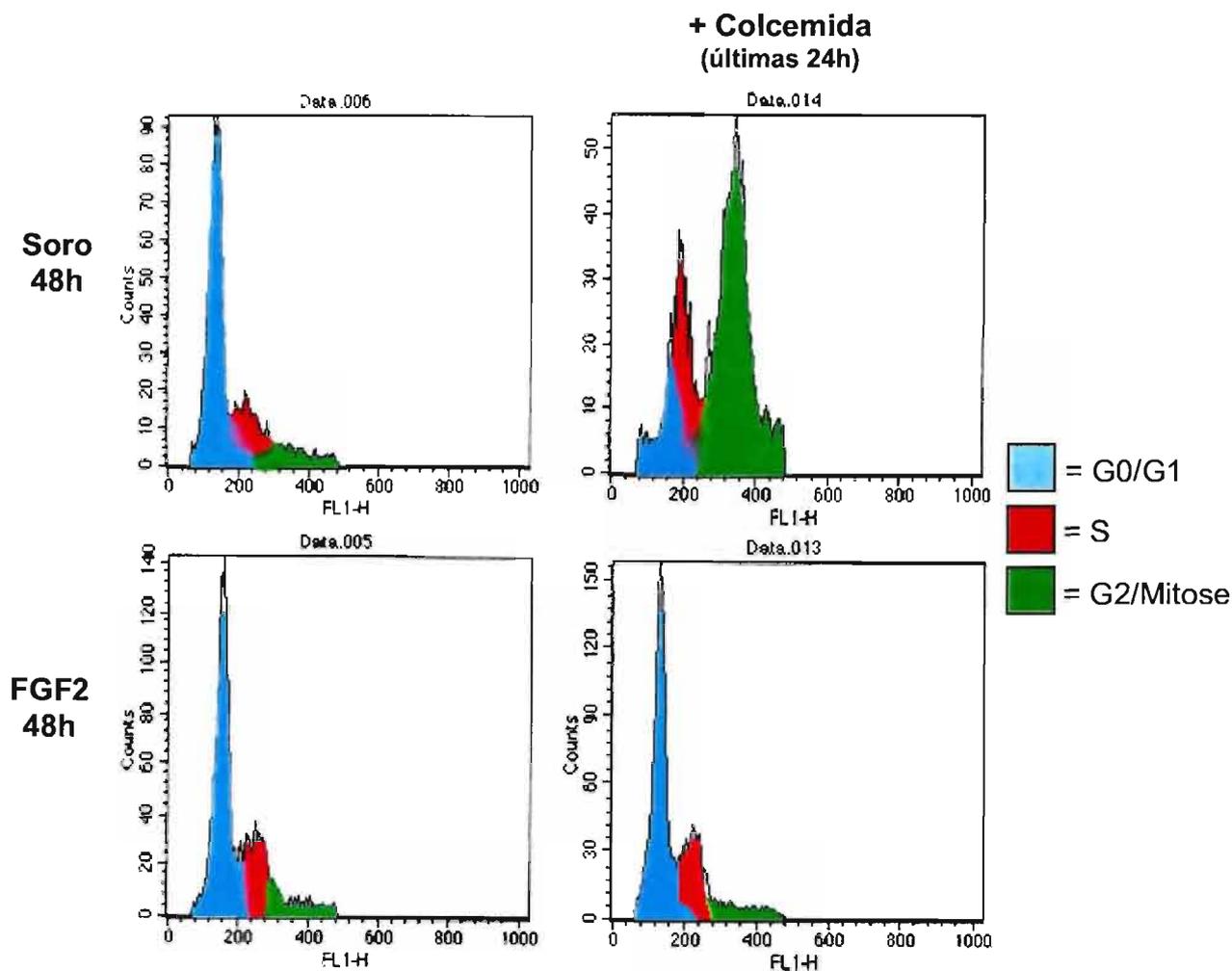


Figura 8: Experimentos de FACS em células Y1 sincronizadas em G0 e tratadas com soro (FCS10%) ou FGF2 (135pM) por 48 horas, na presença de colcemida (0,1µg/ml) durante as últimas 24 horas. O procedimento de preparação das amostras está descrito em Métodos. As células foram coletadas após 24 horas da adição de colcemida. Nota-se que, na presença de colcemida, apenas em tratamentos de soro ocorre acúmulo em G2/Mitose. N=2.

Para avançar na compreensão do bloqueio da fase S causado por FGF2 fomos analisar a síntese de DNA em culturas exponenciais de células Y1. Pulsos periódicos de ^3H -Timidina (30 min, $1,5\mu\text{Ci/ml } 10^{-12}\text{M}$) e de BrdU (30 min, $100\mu\text{M}$) foram aplicados ao longo de 14h após a adição de FGF2 (1nM) ao meio de cultura de células Y1 crescendo exponencialmente em DMEM+FCS10%. Os resultados da **figura 9** mostram que FGF2 inibe intensamente a tomada de ^3H -Timidina em DNA entre 4 e 8h após a sua

adição. O mesmo protocolo indica que a marcação por BrdU não diminui, pelo contrário, tende a aumentar indicando que as células continuam entrando na fase S. Além disso, o índice mitótico não cai até cerca de 10h após a adição de FGF2 demonstrando que durante esse período as células estão progredindo ao longo de S, G2 e mitose. Assim somente as células pós-mitóticas na fase G1 são vulneráveis à ação inibitória de FGF2 evidenciada pela redução acentuada da tomada de ³H-Timidina em DNA (Fig. 9).

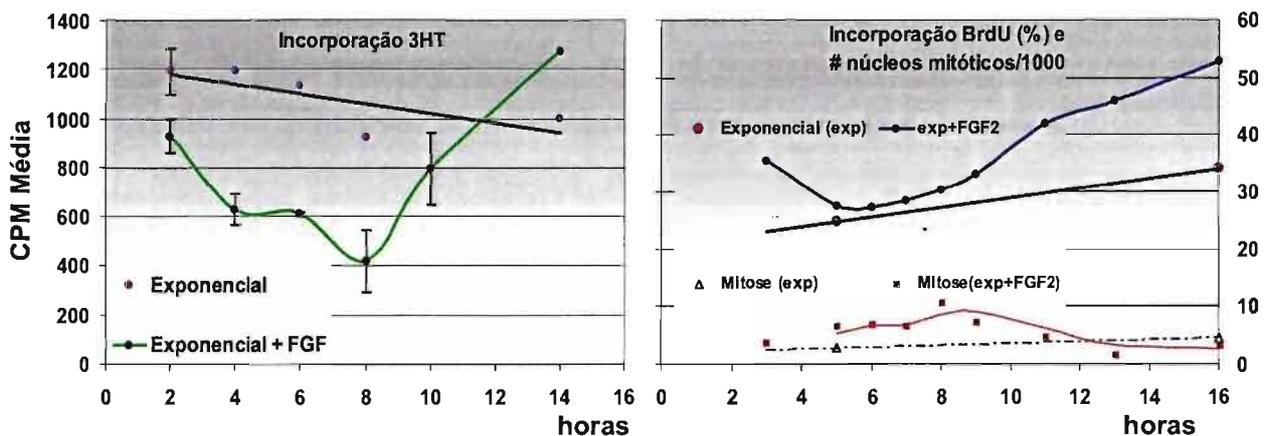


Figura 9: Cinética de síntese de DNA (incorporação de 3H-TdR ou BrdU) e contagem de núcleos mitóticos em células Y1 crescendo exponencialmente (Exp) e coletadas em pontos entre 2-14h após a adição de FGF2 (1nM) no tempo 0h. A incorporação de ³H-TdR (1,5 μ Ci/ml, 10⁻¹²M) ou BrdU (100 μ M) ocorreu durante os 30min precedentes aos tempos de coleta. Após 4-8 horas da adição de FGF2, as células apresentaram maior redução na incorporação de timidina (46-54%) (N=2), mas não na incorporação de BrdU (N=2000, em 2 experimentos). Para os valores de núcleos mitóticos, N=6000 (em 2 experimentos).

No conjunto, estes dados sugerem que FGF2 promove a entrada das células em G1 na fase S (i.e. iniciação da síntese de DNA), mas bloqueia a correta progressão da síntese de DNA possivelmente levando à morte celular.

As razões possíveis para o comprometimento da síntese de DNA nas células sob ação de FGF2 poderiam ser: a) iniciação abortiva, b) alongação deficiente das cadeias em crescimento e c) ambas iniciação abortiva e alongação deficiente.

Buscamos testar as possibilidades dessas alternativas para explicar o bloqueio da fase S por FGF2 medindo velocidade de alongação de cadeias pelo perfil de sedimentação de DNA durante a centrifugação em gradientes de sacarose alcalinos.

Para tal, culturas exponenciais de células Y1, mantidas em DMEM+FCS10%, foram tratadas com FGF2 (1nM) e após 6 horas marcadas com pulsos curtos de ^3H -Timidina (4 min, $2\mu\text{Ci/ml}$, 10^{-12}M). Parte das culturas foram coletadas para lise celular imediatamente após o pulso de ^3H -Timidina, outras foram transferidas para meio fresco com timidina fria (10^{-6}M) e mantidas por mais 2h para serem coletadas, lisadas e submetidas a centrifugação de velocidade em gradiente de sacarose, conforme descrito em Métodos.

Os resultados destes ensaios, apresentados na **figura 10**, mostram que as cadeias de DNA marcadas com ^3H -TdR no início da 6ª hora têm a mesma velocidade de alongação na presença ou na ausência de FGF2: o valor do peso molecular relativo médio (p.m) das cadeias de DNA marcadas com trítio, em células Y1 em crescimento exponencial (Exp) coletadas na 6ª e 8ª hora passa de 12,5p.m para 24,2p.m, enquanto que na presença de FGF2 (Exp+FGF) estes valores são de 11,5p.m e 23,6p.m, respectivamente. Além disso, pelos valores de tomada de ^3H -TdR em DNA por célula deduz-se que células em presença constante de FGF2 por 6 à 8h têm, em média, 54% menos cadeias em alongação por célula que na ausência de FGF2 (**Tabela 1**).

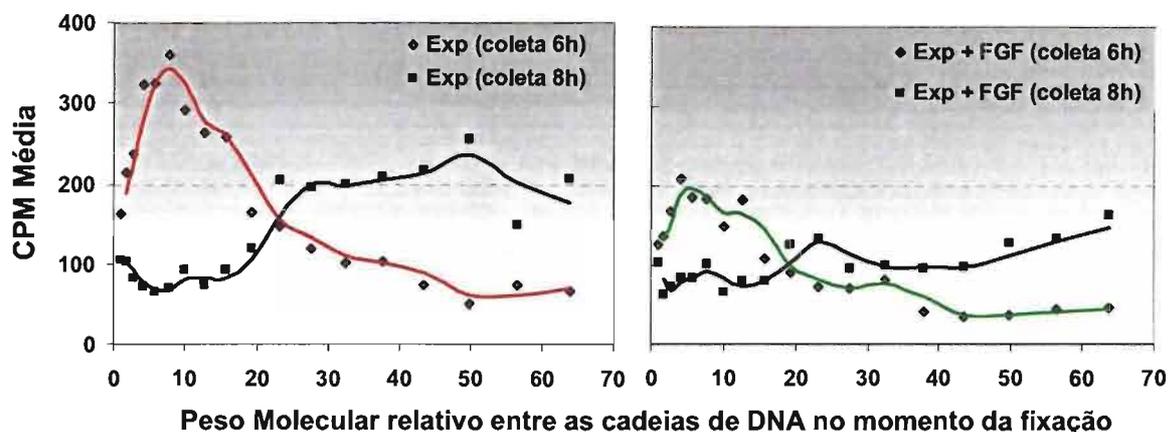


Figura 10: Cinética de alongação da cadeia de DNA em células Y1 crescendo exponencialmente (Exp) e tratadas com FGF2 (Exp+FGF) no tempo 0h. Após 5:56h da adição de FGF2 ocorreu a incorporação de $^3\text{H-TdR}$ ($2\mu\text{Ci/ml}$, 10^{-12}M) por 4 min. Após o término do período de incorporação as células ou foram fixadas e processadas na 6ª hora (coleta 6h) ou foram lavadas, o meio radioativo retirado e substituído por DMEM + FCS10% + Timidina fria (10^{-5}M) e fixadas após 2 horas (coleta 8h). N=1.

Por conseguinte, o efeito de FGF2 é causar iniciação abortiva ou mesmo bloqueio total de iniciação em mais da metade dos replicons das células que entraram na fase S.

Conjuntamente, os resultados: a) da seção 4.1, mostrando que FGF2 dispara a transição $G0/G1 \rightarrow S$ e b) desta seção, analisando marcação com BrdU, tomada de $^3\text{H-Timidina}$ (Tabela 1 e Fig. 9) e velocidade de alongação de cadeia de DNA (Fig. 10), suportam convincentemente a hipótese de que FGF2 promove progressão celular através da fase G1 (efeito mitogênico), mas células Y1 que vêm FGF2 na fase G1, apesar de serem estimuladas a entrar na fase S, tornam-se incapazes de iniciar replicons eficientemente e por isso não conseguem replicar corretamente seu DNA e nem concluir a fase S.

4.3. FGF2 induz morte em células tumorais

Procuramos verificar se o bloqueio do ciclo celular de células Y1 na fase S por FGF2 pode induzir morte celular. Fomos também averiguar se este é um efeito específico de FGF2, uma vez que células Y1 expressam os FGFR 1, 2 e 3 e, portanto, podem responder a diversas formas de FGF. Conforme os resultados relatados em seguida demonstram, FGF2, de fato, causa morte celular em células Y1, em concentrações fisiológicas e através de um processo específico para este fator. Além disso, cabe adiantar que este efeito de morte induzida por FGF2 não é restrito à linhagem Y1, podendo ser característica comum de linhagens tumorais, mas não de células normais.

Os FGFs 1, 2, 4 e 5 promovem uma robusta ativação da via de ERK1-2 (**Fig.11A**). Apesar disso, dentre os FGFs utilizados, FGF2 bloqueia mais eficientemente a transição S→G2→M (**Fig.11B**), inibindo drasticamente a proliferação de células Y1 em DMEM+FCS10% (**Fig.11C**). Somam-se a estas evidências experimentais os resultados de ensaios de crescimento de colônias documentados na **figura 11D**: FGF2 inviabiliza 85% das células, enquanto FGF1 e 4 tem moderado efeito negativo e FGF5 é pouco efetivo. Curvas dose-resposta (**Fig.12**) mostram que FGF2 desencadeia morte celular em concentrações fisiológicas com uma dose-efetiva-50% de 65pM.

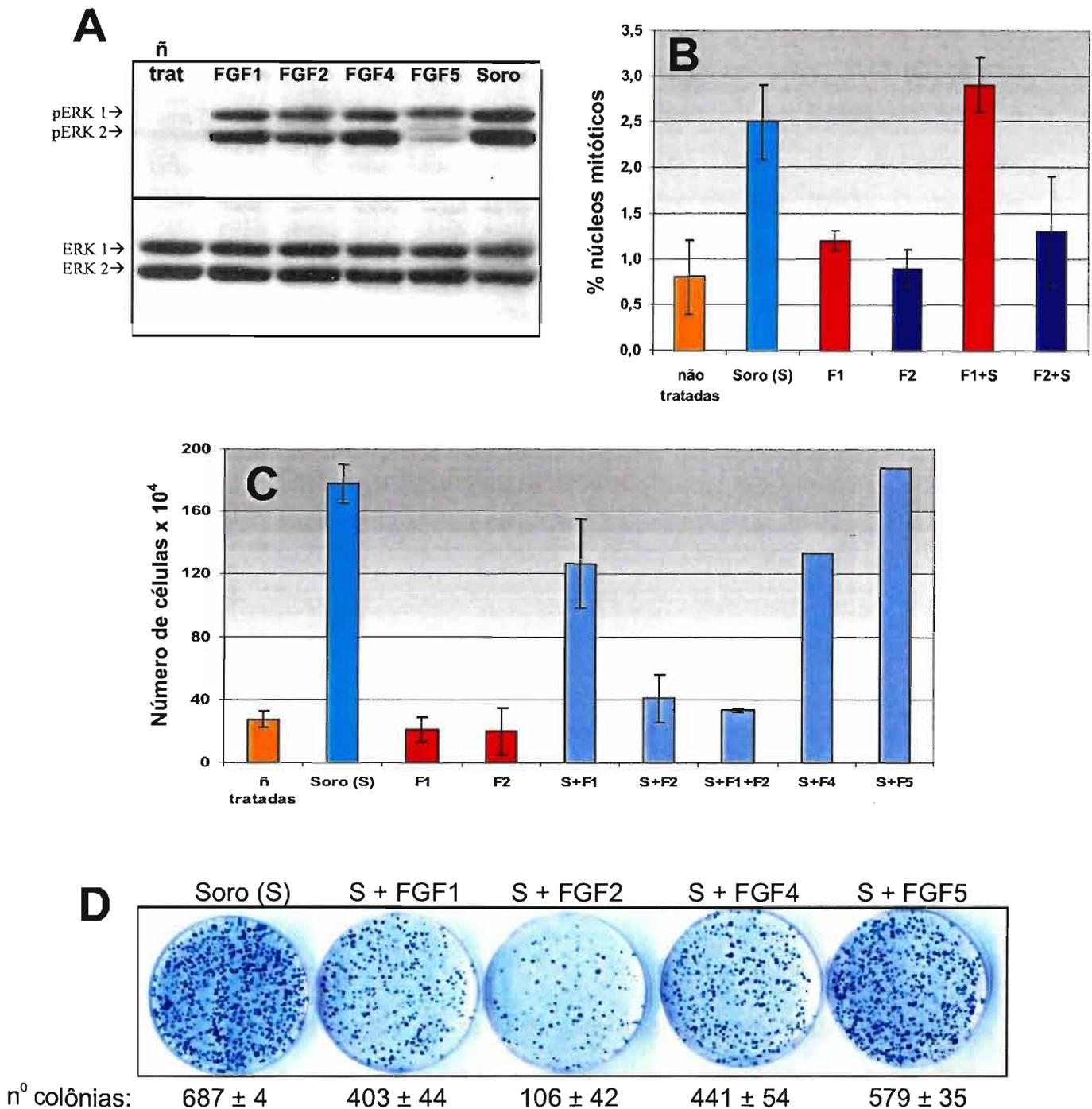


Figura 11: Resposta das células Y1 a diferentes membros da família de FGF. (A) ativação de ERK1-2, (B) contagem de núcleos mitóticos, (C) proliferação de células Y1 (hemocitômetro) e (D) formação de colônias. (A) Ensaios de SDS-PAGE-Western Blot: ativação de ERK1-2 após 5 min de FGF1, -2, -4 ou -5 (1nM) em células Y1 sincronizadas em G0/G1. (B) células Y1 sincronizadas em G0 são estimuladas com Soro (FCS10%, S) e/ou FGF1 ou FGF2 (570pM) por 23h e a porcentagem de núcleos mitóticos é analisada.

N=4000. (C) células Y1 em DMEM+FCS10% foram lavadas e tratadas com FCS10% e/ou FGFs (1nM) por 6 dias, quando foram contadas. N=3. (D) células Y1 plaqueadas em baixa densidade (~15 células/cm²) em DMEM+FCS10% ± FGFs (1nM). Após 24h do plaqueamento meio era trocado por DMEM+FCS10% até o surgimento de colônias visíveis. (N=3). O meio de cultura era renovado a cada 2 dias. FGF1=F1; FGF2=F2; FGF4=F4; FGF5=F5.

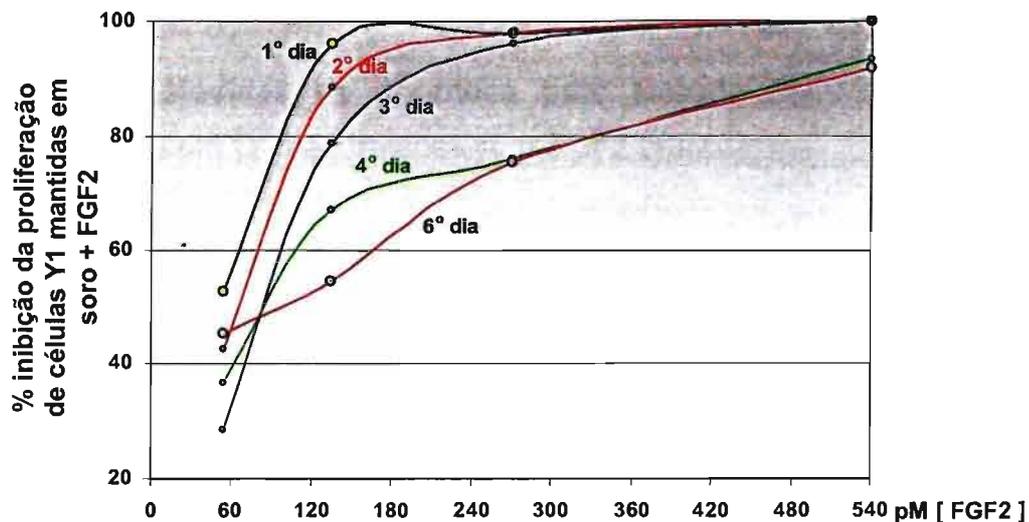


Figura 12: Inibição induzida por FGF2 (54-540pM) na proliferação de células Y1 promovida por soro (FCS10%) por contagem em hemocitômetro ao longo de 6 dias. O meio de cultura era renovado a cada 2 dias. ED50%=65pM. N=3.

Células bloqueadas na fase S são, sabidamente, muito suscetíveis a morte por apoptose. No entanto, ensaios de Tunel (Fig. 13) e ensaios de fragmentação de DNA em gel de acrilamida (dados não apresentados), para testarmos se FGF2 induz apoptose em células Y1 revelaram-se negativos. Apesar disso, células tratadas com Soro ou FGF2 por 14 horas apresentam o mesmo conteúdo intracelular de ATP (dados não apresentados), sugerindo que o metabolismo energético não foi afetado por FGF2 permitindo a hipótese do acionamento de um mecanismo ativo de morte celular (dependente de ATP).

Não obstante, exame microscópico das culturas de Y1 tratadas com FGF2 revela uma abundância de células com intensas modificações morfológicas notoriamente inviáveis (Fig. 14).

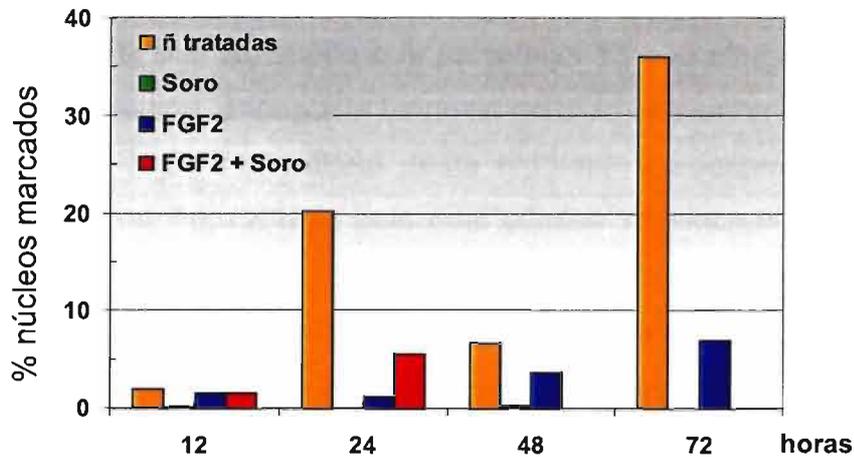


Figura 13: Medidas de apoptose pelo Método de Tunel. Células Y1 sincronizadas em G0 são tratadas com FGF2 (135pM) e/ou Soro (FCS10%) ao longo de 12, 24, 48 e 72 horas e a porcentagem de núcleos com fragmentação de DNA analisada pelo método de Tunel. N=1500.

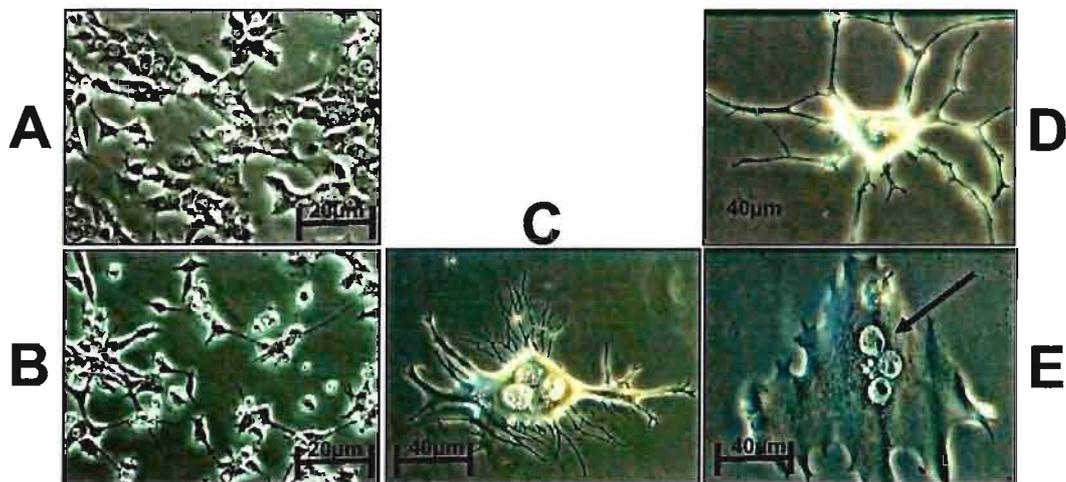


Figura 14: Alterações morfológicas induzidas por FGF2 em células Y1. (A) Morfologia da população de células Y1 (3×10^4 células Y1/P35) em DMEM+FCS 10% não tratadas com FGF2 ao longo do experimento. (B) células em A + FGF2 (1nM) por 14 horas. (Entre as condições A e B, apesar das modificações morfológicas e bloqueio do ciclo celular, o mesmo conteúdo de ATP intracelular é detectado nas duas populações, dados não apresentados). (C-E) Morfologia de células Y1 isoladas (50-100 células/cm²) em DMEM+FCS 10% e tratadas com pulsos de 24h de FGF2 (1nM). Após esse período FGF2 é removido do meio e as células Y1 são mantidas em meio completo por 15 dias (idem ao protocolo de formação de colônias, seção 3.13). O meio é renovado a cada 2 dias. A seta indica uma célula com três núcleos ou nucleóides.

A hipótese sugerida pelo conjunto de resultados já apresentados (**Tabela 1, Fig. 8, 9 e 10**) supõe que as células Y1 são atingidas por FGF2 na fase G1 e vão exibir o fenótipo de bloqueio do ciclo celular na fase S seguinte.

Para um teste mais direto desta hipótese foi desenhado o protocolo esquematizado na **figura 15A**, pelo qual células Y1 sincronizadas em G0/G1 são realimentadas com soro no tempo 0h e tratadas por pulsos periódicos de 4h de FGF2 até 20h. As culturas assim tratadas foram coletadas no tempo 20h para medir o índice mitótico (**Fig. 15B**) e em 96h para contar o número de células na população (**Fig. 15C**).

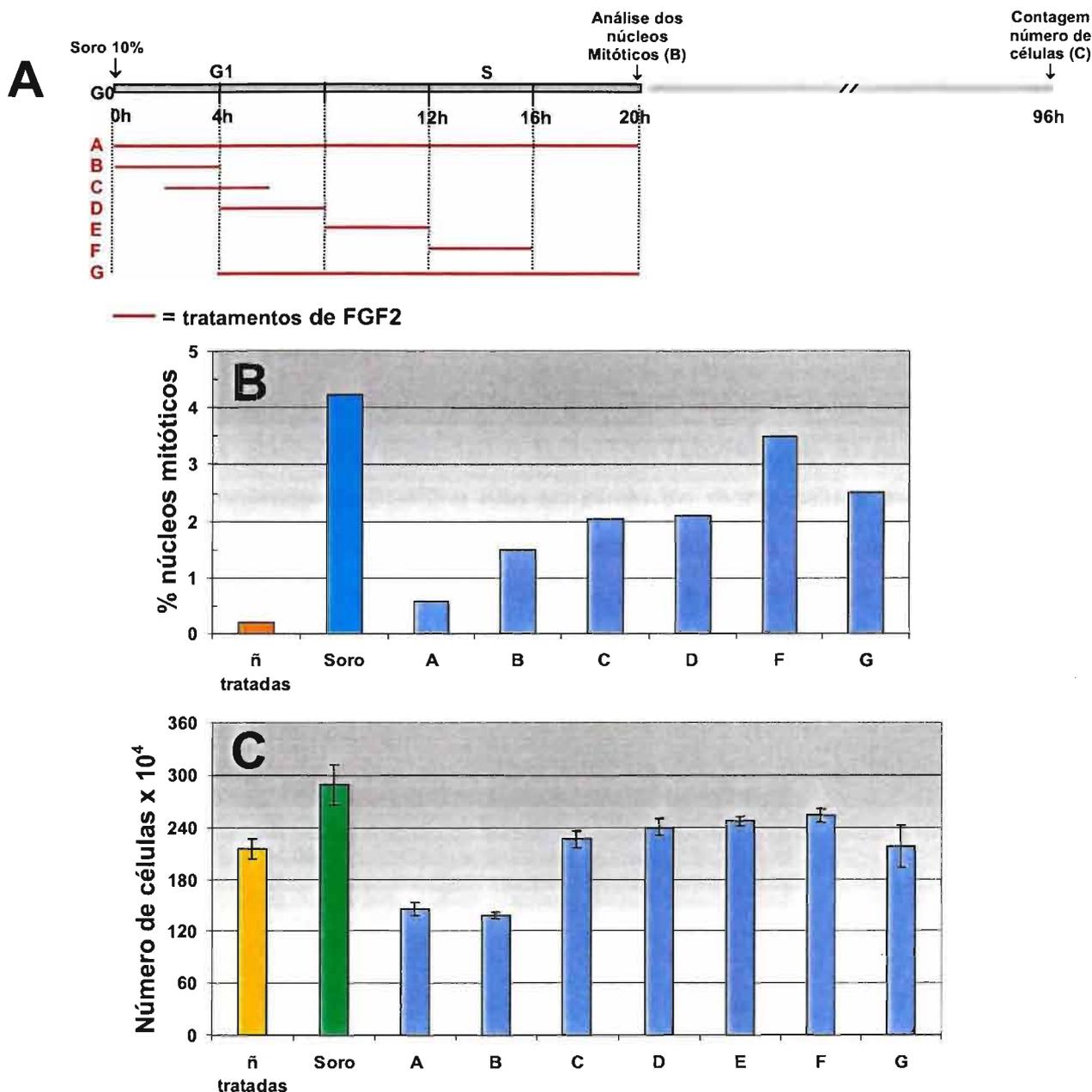


Figura 15: Efeitos de FGF2 na proliferação de células Y1. (A) Esquema do protocolo utilizado: células Y1 sincronizadas em G0 são estimuladas por tratamentos de soro (FCS10%) em 0h. Decorrido este estímulo inicial, FGF2 (540pM) é adicionado em pulsos periódicos (4h) ou tratamentos longos de até 20 horas em diferentes períodos de G1, conforme indicado (A - G). As culturas assim tratadas foram coletadas no tempo 20h para medir o índice mitótico (B) (N=6000) e em 96h para contar o número de células na população (C). Decorridos os pulsos de FGF2 as células foram lavadas e retornaram para meio DMEM + FCS 10%. Os resultados em (C) foram obtidos em duplicatas independentes. Após a 20^a hora todas as células retornaram para DMEM + FCS10%, sendo o meio de cultura renovado diariamente até a 96^a h.

Os resultados claramente corroboram a hipótese proposta, isto é: as células são mais sensíveis ao efeito citotóxico do FGF2 nas primeiras 4h de G1 com 70% de redução no índice mitótico, enquanto entre 12 e 16h a redução no índice mitótico é de apenas 22% (Fig. 15B). Os resultados de contagem de células (Fig. 15C) mostram proliferação diminuída coerente com os dados de redução no índice mitótico.

Neste ponto é oportuno destacar que fibroblastos murinos não tumorais das linhagens Swiss3T3 (Fig. 16) e Balb3T3 (Tabelas 2 e 3) respondem à atividade mitogênica de FGF2 e não ao efeito de morte celular induzido por este fator. Sugerindo que linhagens celulares normais não apresentam o fenótipo morte celular induzida por FGF2, que seria característico de linhagens tumorais, tipificadas pela linhagem tumoral Y1.

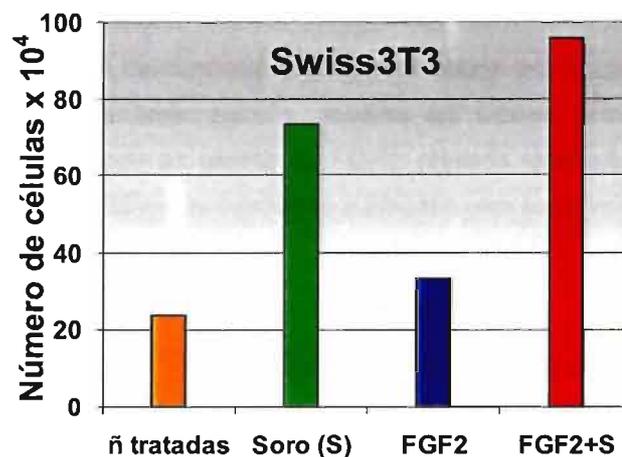


Figura 16: Proliferação celular por contagem em hemocítmetro em fibroblastos normais Swiss3T3 plaqueados em DMEM+FCS10% e, após 24h, lavados e mantidos em DMEM ± Soro (FCS10%) ± FGF2 (270pM) e coletadas após 72h. N=2.

Tabela 2

Ensaio de tumorigênese de fibroblastos Balb3T3 normais, seus clones transformados B-61 e EJA e seus revertentes normais em camundongos isogênicos Balb/c e Balb/c Nude.

Linhagem celular	# animais com tumor / # total animais	
	Camundongos Balb/c ¹	Camundongos Balb/c Nude
Balb 3T3	0 / 4	1 / 4
B-61	3 / 3	7 / 7
4-AB*	1 / 13	0 / 6
EJA	4 / 4	4 / 4
3D**	0 / 9	6 / 6
5A**	6 / 49	0 / 5
2A**	0 / 18	3 / 6

* - revertente normal de B-61 com capacidade tumorigênica reduzida;

** - revertentes normais de EJA;

¹. Parte dos resultados em camundongos Balb/c foi obtido em trabalhos anteriores do nosso laboratório e serviram de base para a escolha de clones com diferentes capacidades tumorigênicas para testarmos os efeitos de FGF2. Nossos resultados recentes reproduziram exatamente os dados anteriores, aumentando a amostragem experimental.

Tabela 3

Morte celular induzida por FGF2 (1nM) detectada por formação de colônias em fibroblastos Balb3T3, seus clones transformados B-61 e EJA e revertentes mantidos em DMEM + FCS10%.

Linhagem celular	# Colônias / placa		% inibição
	controle	+ FGF2	
Balb 3T3	234 ± 12	219 ± 17	7%
B-61	123 ± 9	56 ± 5	54%
4-AB*	26 ± 2	34 ± 4	*---
EJA	106 ± 7	45 ± 18	58%
3D**	897 ± 53	931 ± 66	*---
5A**	61 ± 6	47 ± 2	24%
2A**	91 ± 10	70 ± 4	23%

* - revertente normal de B-61 considerado não tumorigênico; ** - revertentes normais de EJA;

* - FGF2 induziu aumento do número de colônias.

FGF2 era adicionado somente nas primeiras 24 horas, sendo substituído por DMEM + FCS 10% até o surgimento de colônias visíveis. O meio de cultura era renovado a cada 2 dias. N=7.

Em favor desta hipótese vem a importante observação de que sublinhagens clonais de Balb3T3 transformadas pelo oncogene humano EJ-ras anteriormente isoladas e caracterizadas em nosso laboratório (Kovary *et al.*, 1989) são sensíveis à ação citotóxica de FGF2. Ensaio de formação de colônias mostraram claramente que as linhagens transformadas e tumorigênicas: B61 e EJ-A (ver tumorigenicidade na **Tabela 2**) são muito sensíveis ao efeito citotóxico de FGF2, enquanto a linhagem parental Balb3T3 não é (**Tabela 3**). Mais interessante ainda são as observações obtidas com clones revertentes com capacidade tumorigênica reduzida (linhagens 2A, 3D, 5A e 4AB, ver **Tabela 2**) isolados há algum tempo atrás das linhagens tumorais B61 e EJ-A (Kátia Rocha & Hugo Armelin, dados não publicados). Estes revertentes são total ou parcialmente resistentes a FGF2, sugerindo que o traço fenotípico sensibilidade ao efeito de morte de FGF2 segrega junto com capacidade tumorigênica da linhagem.

As linhagens Y1-RasN17-1.5, -2.7 e -3.1, são transfectantes estáveis derivados de células Y1 que carregam o gene mutante dominante negativo Ha-rasN17, sob controle do promotor de MMTV, cuja atividade é induzida por dexametasona ou outro glucocorticóide. Sob estímulo de dexametasona (0,5 μ M) estes clones expressam altos níveis da proteína dominante negativa p21-Ha-RasN17, causando a redução das elevadas concentrações constitutivas de Ki-Ras-GTP a valores negligenciáveis, que por sua vez elimina a ativação constitutiva da via de PI3K \rightarrow AKT (Forti *et al.*, 2002). Desta forma estes transfectantes exibem um fenótipo condicional em função da atividade constitutiva da via Ki-Ras-GTP \rightarrow PI3K \rightarrow AKT que pode ser desligada através da indução de Ha-RasN17.

O clone transfectante Y1-RasN17-1.5 se comporta como a linhagem parental Y1 tendo sua proliferação fortemente inibida por FGF2 (**Fig. 17**), mas na presença de dexametasona as células Y1-RasN17-1.5 são resistentes à ação citotóxica de FGF2 assemelhando-se aos fibroblastos normais das linhagens 3T3 (**Fig. 16**). Estes resultados indicam que a redução da atividade constitutiva da via oncogênica Ki-Ras-GTP \rightarrow PI3K \rightarrow Akt é suficiente para tornar as células Y1 resistentes à morte induzida por FGF2.

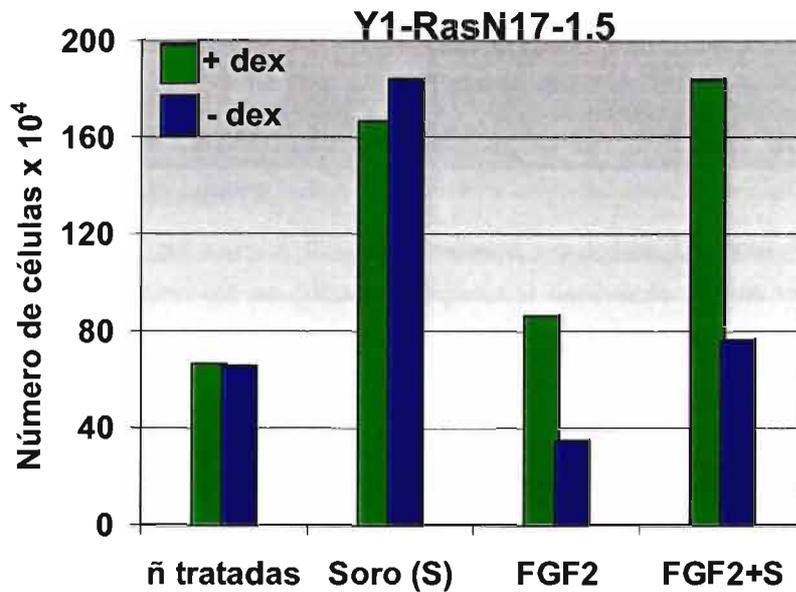


Figura 17: Ensaio de proliferação celular por contagem em hemocítômetro no clone Y1-RasN17-1.5. As células Y1 mantidas em DMEM+FCS10% ± dexametasona (dex, 0,5µM) por 12h foram lavadas e mantidas em DMEM ± dex ± Soro (FCS10%) ± FGF2 (270pM) e coletadas após 72h. N=2.

A **Tabela 4** resume dados de proliferação da linhagem parental Y1 e de três clones transfectantes da série Y1-RasN17 (RasN17-1.5, -2.7 e -3.1), em termos de densidade de saturação das culturas, destacando os efeitos de FGF2 na presença e na ausência de dexametasona. A densidade de saturação das células Y1 se reduz de 50-60% devido à ação de FGF2, independentemente de dexametasona. Entre os transfectantes RasN17, FGF2 também causa uma diminuição na densidade de saturação (20 a 65%), mas dexametasona reverte o efeito de FGF2 de negativo para positivo, sendo que no caso do transfectante RasN17-3.1 o efeito positivo de FGF2 é muito acentuado, promovendo um aumento de 2,4 vezes na densidade de saturação.

Tabela 4

Efeito de FGF2 na densidade de saturação de culturas de células Y1 e transfectantes Y1-RasN17.

Células em DMEM + soro (FCS10%) são tratadas no tempo 0h com FGF2 (270pM). O experimento é prolongado até as culturas atingirem a densidade de saturação (~6-7dias). O meio de cultura é renovado a cada 2 dias. A adição de dexametasona (0,5µM) ocorreu 24h antes da adição de FGF2.

Tipo Celular	Dexa	Densidade final (células/cm ² x 10 ⁴)	
		Soro	Soro + FGF2
Y1	-	40 ± 1,2	16,6 ± 3
	+	38	19,5
R3.1	+	16,8	39,5
R2.7	-	43	35
	+	33 ± 3	33 ± 3
R1.5	-	39,6	14
	+	32	30,5

A **figura 18** documenta os resultados de um ensaio de crescimento de colônias, medindo diretamente morte celular induzida por FGF2 em células Y1 plaqueadas em baixa densidade (14 células/cm²). Conforme se nota FGF2 inviabiliza a maior parte das células Y1 (87,8 ± 7,8% é valor médio e desvio padrão da inibição obtida na contagem de um total de 2370 colônias), seja na ausência ou na presença de dexametasona. Por outro lado, no caso do transfectante RasN17-3.1 dexametasona reverte o efeito de FGF2 de negativo para positivo, promovendo um aumento de 50% no número de colônias obtidas em meio DMEM+FCS10%.

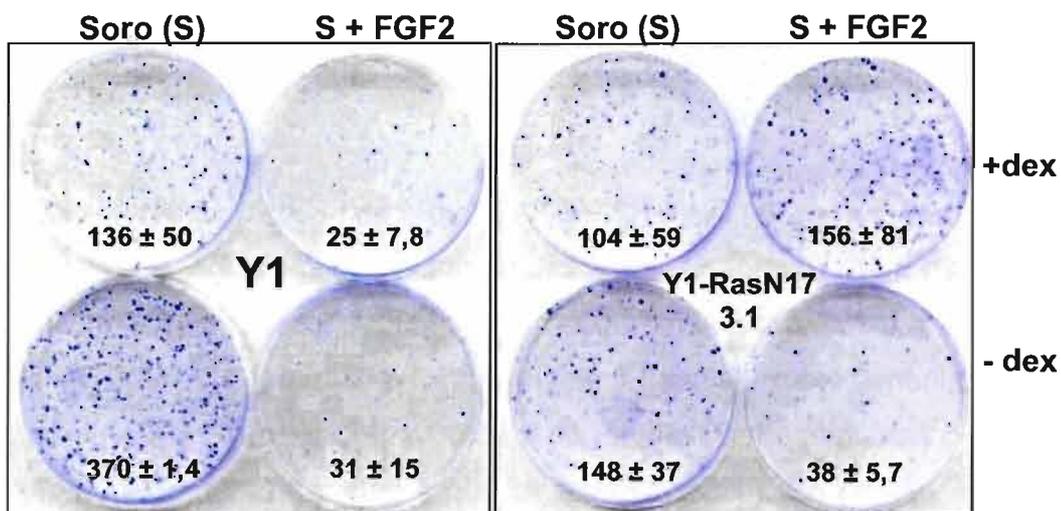


Figura 18: Ensaio de morte celular por formação de colônias exibem os efeitos de FGF2 em células isoladas Y1 e Y1-RasN17-3.1 na presença (+dex) ou ausência (-dex) de dexametasona (0,5µM). As células foram plaqueadas em DMEM + Soro (FCS10%, **S**) (14 células/cm²) e após 24h do plaqueamento foi adicionado FGF2 (540pM) na presença ou ausência de dexametasona (0,5µM). O número abaixo de cada placa representa a média e o desvio padrão do número de colônias obtidas em cada condição (N=2).

4.4 Efeitos de inibidores de PI3K sobre a ação citotóxica de FGF2 em células Y1

Sabidamente a via de Ras-GTP→PI3K→Akt é necessária para a transição G0/G1→S do ciclo celular e para evitar apoptose. Além disso, esta via é reconhecidamente oncogênica. Particularmente em células Y1, Ki-Ras-GTP→PI3K→Akt é mantida em níveis basais cronicamente altos, presumivelmente, um componente causal do fenótipo tumoral destas células. A novidade surgida deste trabalho é que os níveis basais altos desta via tornam as células Y1 passíveis de morte celular induzida por FGF2

Para avançarmos no estudo dos mecanismos moleculares a jusante de Ki-Ras-GTP, subjacentes à ação citotóxica de FGF2, utilizamos os inibidores específicos de PI3K: Ly294002 (5 μ M) e Wortmanina (100nM), num protocolo de medida da atividade citotóxica de FGF2, em células Y1, através de ensaio de formação de colônias. É conhecido de nossas publicações anteriores (Forti et al, 2002) que a inibição de PI3K, em células Y1, provoca rápida desativação de Akt e tudo o que vem a jusante desta quinase. A questão focalizada por este experimento é se a inibição de PI3K e, portanto da via PI3K→Akt, é suficiente para proteger células Y1 da atividade citotóxica de FGF2.

Os resultados mostrados na **Tabela 5** indicam que os inibidores garantem proteção apenas parcial das células Y1 frente à ação nociva de FGF2. Estes resultados estão de acordo com a hipótese de que altos níveis basais de KiRas-GTP→PI3K→Akt tornam as células Y1 suscetíveis de morte induzida por FGF2, mas sua interpretação não está livre de dúvidas: o protocolo envolve um tempo de tratamento com FGF2 relativamente longo, 24h, durante o qual não há garantia de que PI3K esteja totalmente inibida. Com este protocolo só um resultado de 100% de proteção das células Y1 seria de interpretação fácil e sugeriria que a via relevante seria de PI3K para baixo.

Estes resultados indicando proteção parcial implicam na possibilidade de que outras vias a jusante de Ki-Ras-GTP, independentes de PI3K, sejam também relevantes.

Tabela 5

Efeito de inibidores de PI3K na resposta citotóxica de FGF2 em células Y1.

Células Y1 mantidas em DMEM + Soro (FCS10%) são tratadas com inibidores de PI3K por 2 h antes da adição de FGF2 (1nM) por mais 24 h. Decorrido este período as células são lavadas e retornam para DMEM + FCS 10% por 15 dias. O meio era renovado a cada 48 horas. N=3. Ly= L294002 (5µM) e W= wortimanina (100pM) são ambos inibidores de PI3K.

Tratamentos	# Colônias formadas	% Morte celular (induzida por FGF2)
Soro (S)	128 ± 51	78%
S + FGF2 (F)	27 ± 16	
S + Ly	80 ± 38	42%
S + Ly + F	46 ± 15	
S + W	112 ± 82	56%
S + W + F	49 ± 26	

4.5 Isolamento e caracterização de clones de células Y1 resistentes à ação citotóxica de FGF2

Os ensaios de formação de colônias mostram que FGF2 inviabiliza a maior parte das células Y1 plaqueadas, mas uma pequena parcela de colônias sempre sobrevive (**Fig. 18**). Estas colônias sobreviventes podem ser originárias de clones minoritários pré-existentes no estoque padrão de células Y1 que resistem à ação citotóxica de FGF2. Para testar esta hipótese foram adotadas duas medidas: a) foi montado um “teste de flutuação” (*Luria & Delbruck, 1943*), conforme esquematizado na **figura 19**, pelo qual foi isolada uma série de clones coletados ao acaso, numerados de Y1-C1 a Y1-C30; b) 3 colônias que cresceram em presença de FGF2, a partir de densidade de plaqueamento muito baixa (5-6 células/cm²), foram selecionadas como sub-linhagens clonais resistentes a FGF2, denominadas Y1-FR1, Y1-FR2 e Y1-FR3 (Y1-FGF-resistentes), para análise posterior.

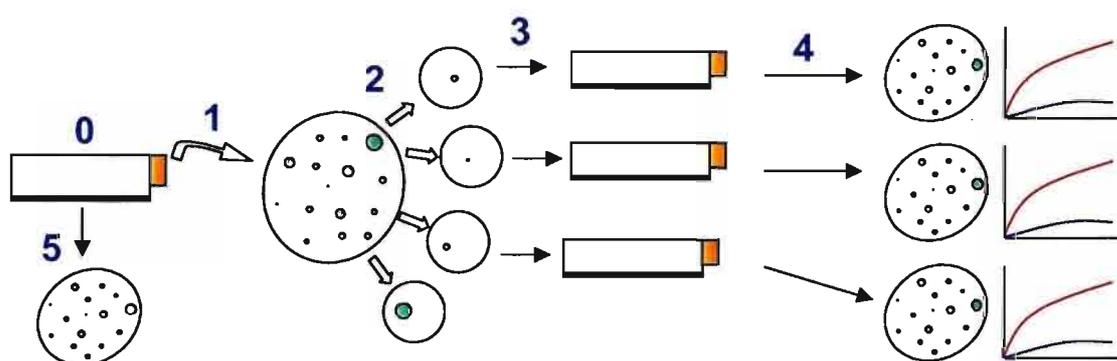


Figura 19: Protocolo para “teste de flutuação” adaptado para células Y1. 0= estoque padrão de células Y1 em cultura (DMEM + FCS10%). 1= plaqueamento para ensaio inicial de formação de colônias em células mantidas em meio DMEM + FCS 10%. 2= multiplicação de uma célula isolada e isolamento de colônias denominadas de “Y1-C1-30”. 3= expansão de cada colônia a um estoque clonal de 1-2 x 10⁶ células congelado e amostrado para novos ensaios de colônia e proliferação em DMEM+soro ± FGF2 (4). 5= ensaios paralelos de citotoxicidade de FGF2 na população inicial de células Y1.

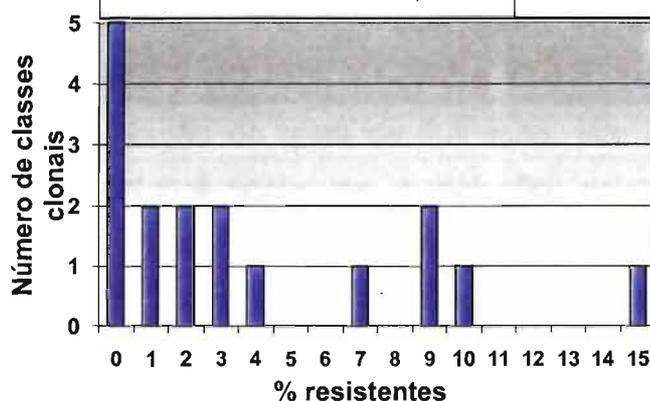
Os resultados do teste de flutuação reunidos na **Tabela 6** são compatíveis com a hipótese de que a população estoque de células Y1 é heterogênea caracterizada por uma maioria de células sensíveis a FGF2 que coexiste com clones minoritários resistentes a esse fator. Além disso, a **figura 20** mostra curvas de proliferação para alguns dos clones isolados ao acaso da população de Y1, revelando a maioria sensível à ação inibitória de FGF2, com uma única exceção o clone Y1-C10 cuja capacidade de proliferação é baixíssima (compatível com a baixa eficiência de formação de colônias, dados não apresentados), mas sua resposta a FGF2 é positiva.

Tabela 6

Ensaio de morte celular por formação de colônias em células Y1 e seus derivados clonais coletados ao acaso (Y1-C1-23).

Foram plaqueadas 600 células/placa e imediatamente tratadas com soro (FCS10%) ± FGF2 (1nM). O meio foi renovado a cada 2 dias até o estabelecimento das colônias. A porcentagem de resistentes refere-se a soma do número de colônias em 4 placas, em soro+FGF2 em relação a soma do número de colônias obtido em soro. N=8 para células Y1 e N=4 para cada clone.

Tipo celular	% resistentes	Tipo celular	% resistentes
Y1	12 ± 7,8	Y1-C12	8,9
Y1-C1	1	Y1-C13	6,7
Y1-C3	2,8	Y1-C14	0
Y1-C4	0	Y1-C15	1
Y1-C5	1,9	Y1-C16	0
Y1-C6	0	Y1-C18	0
Y1-C7	1,8	Y1-C20	2,9
Y1-C9	10	Y1-C22	8,7
Y1-C10	15,2	Y1-C23	3,6



Projecção gráfica da Tabela 6.

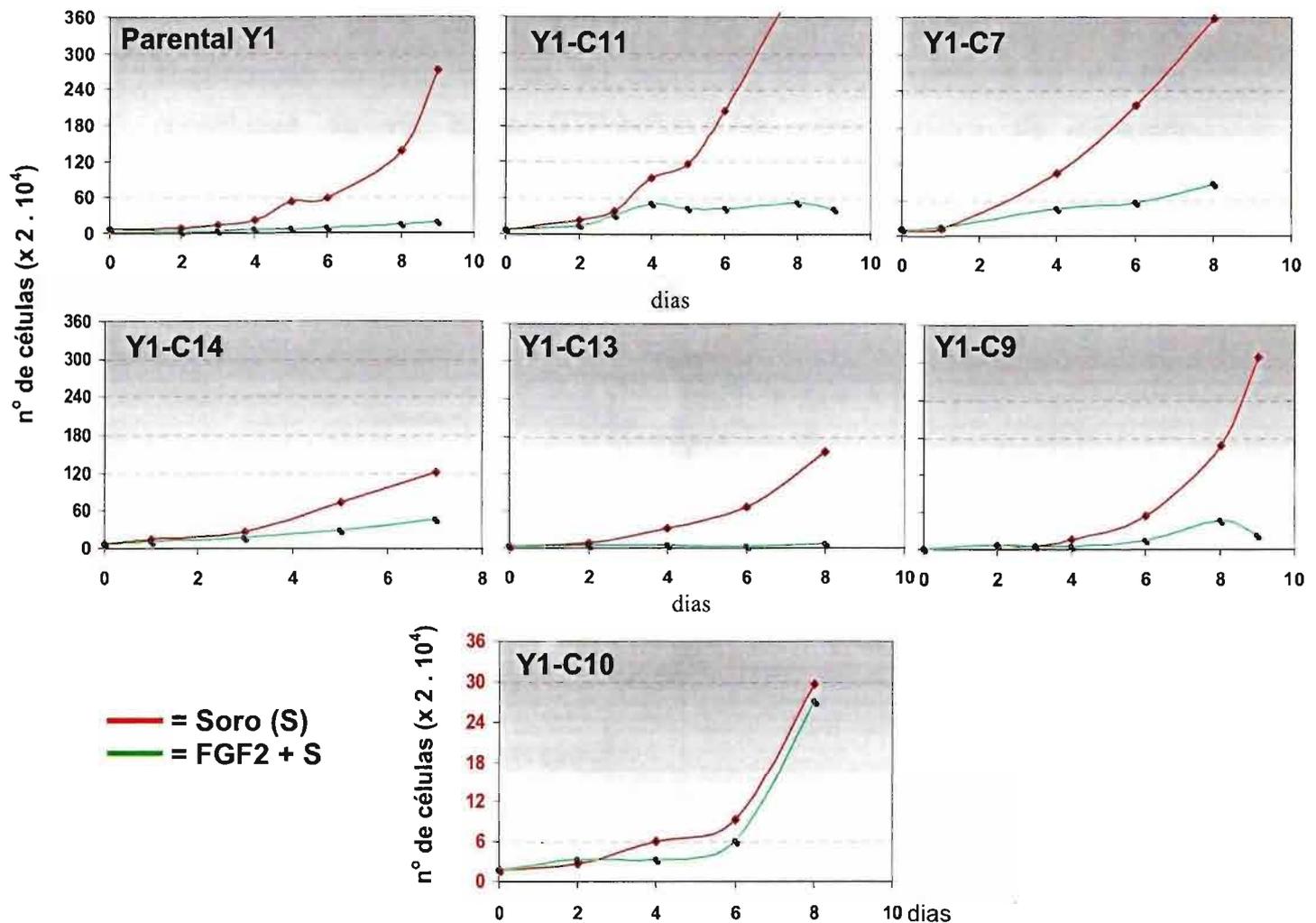


Figura 20: Proliferação celular por contagem em hemocitômetro de células Y1 e representantes de seus derivados clonais: Y1-C7, C9, C10, C11, C13 e C14. 2-6 $\times 10^4$ células são plaqueadas em DMEM + soro (FCS10%) e após 24h são tratadas com FGF2 (1nM, tempo 0h) e coletadas após os dias indicados. O meio de cultura é renovado diariamente. Os resultados foram obtidos em duplicatas.

Por outro lado, a análise dos clones de células Y1 selecionados para resistência a FGF2 (Y1-FR1, Y1-FR2 e Y1-FR3) deu resultados concordantes com a interpretação do teste de flutuação. Isto é, tratam-se de clones que surgem espontaneamente na população estoque de células Y1, mas permanecem minoritários porque proliferam pouco em DME-10%FCS, tendo sua proliferação favorecida quando o meio é suplementado com FGF2 e, por isso, são facilmente selecionados.

Assim, os 3 clones, Y1-FR1, -FR2 e -FR3, mantêm os níveis de amplificação do gene *c-k-ras*, da expressão de seu produto e da ativação constitutiva da via $Ki-Ras-GTP \rightarrow PI3K \rightarrow Akt$ característicos da linhagem parental Y1 (Fig. 21 e 22), demonstrando que a resistência a FGF2 não se deve à perda da amplificação de *Ki-ras* e o conseqüente desaparecimento da ativação constitutiva de $Ki-Ras-GTP \rightarrow PI3K \rightarrow AKT$.

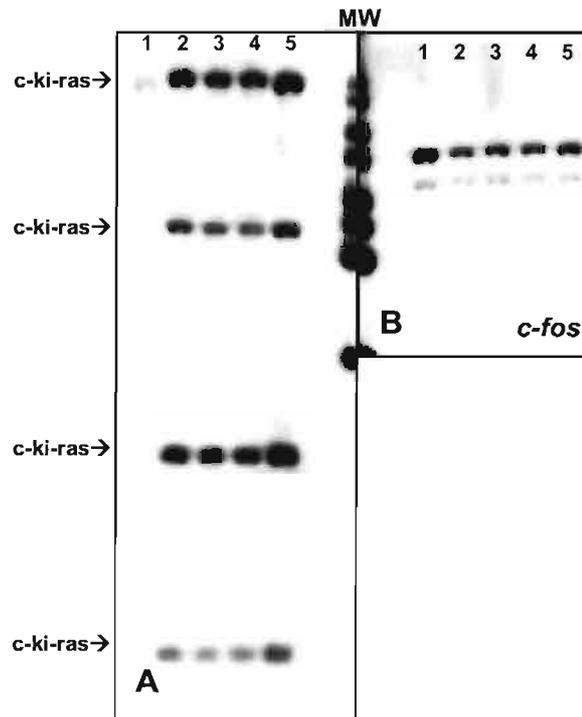


Figura 21: Ensaio de Southern Blot para medida dos níveis de amplificação do protooncogene *c-k-ras* no DNA genômico de células Y1 e clones Y1-FR1-3 mantidas em DMEM+Soro por 48h. (A). Após digestão parcial do DNA de células Y1 e clones Y1-FR1-3 com *ECO-RI*, nota-se uma amplificação de 8-10 vezes do gene *c-k-ras* em relação ao fibroblasto normal Balb3T3. A membrana foi lavada e incubada com sonda para o gene *c-fos*, utilizado como controle (B). MW = 'molecular weight', 1 = clone Balb3T3; 2 = células Y1; 3, 4 e 5 = Y1-FR1, -FR2 e -FR3, respectivamente. N=1.

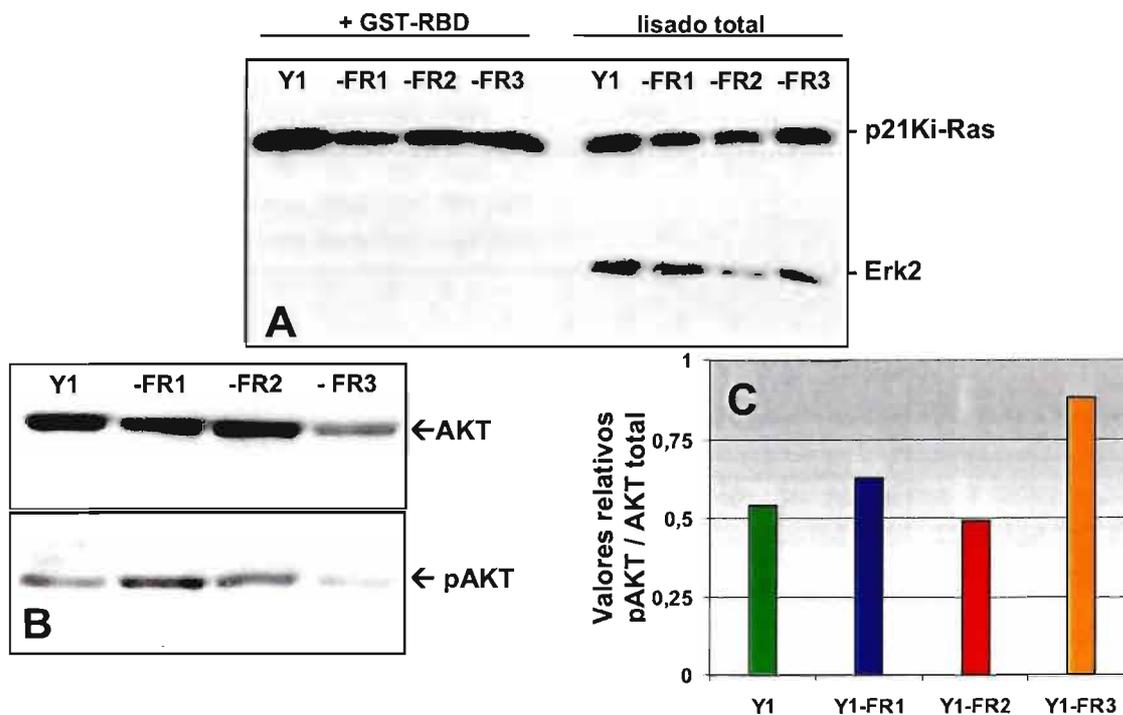


Figura 22: Níveis de expressão da proteína Ki-Ras-GTP, Ki-Ras-total (A), AKT e pAKT (AKT ativa) (B) por SDS-PAGE/ Western Blot em células Y1 e clones resistentes Y1-FR1-3 sincronizados na interface G0/G1. (C) Análise densitométrica do filme em B (valores relativos: pAKT ÷ AKT). N=2.

Além disso, todos os clones Y1-FR mostram robusta resposta da via de sinalização de FGF2, conforme atestam a ativação de ERK1-2 (Fig. 23), a indução da proteína c-Fos (Fig. 24B) e o estímulo de entrada de células na fase S (Fig. 24A). Estes resultados evidenciam que a resistência destes clones não decorre de lesões com perda de função na via canônica de sinalização de FGF2.

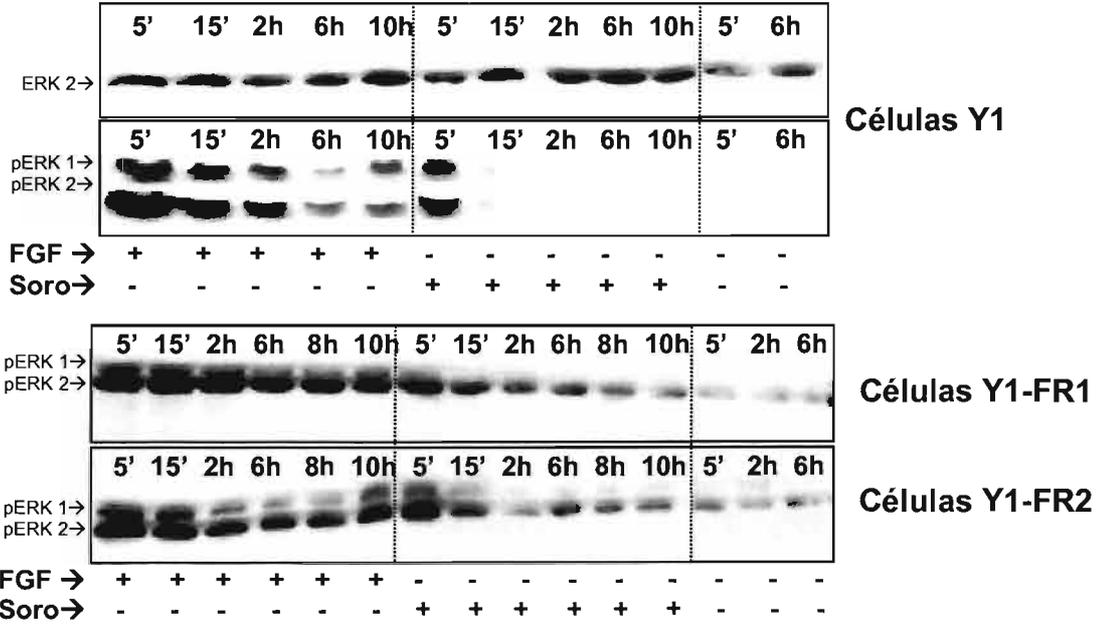


Figura 23: Cinética de ativação de Erk1-2 (Western Blot) em células Y1, Y1-FR1 e Y1-FR2 mantidas em meio DMEM + soro (FCS10%) por 48 horas e tratadas no tempo zero com FGF2 (270pM) ou FCS 10% e coletadas após os tempos indicados.

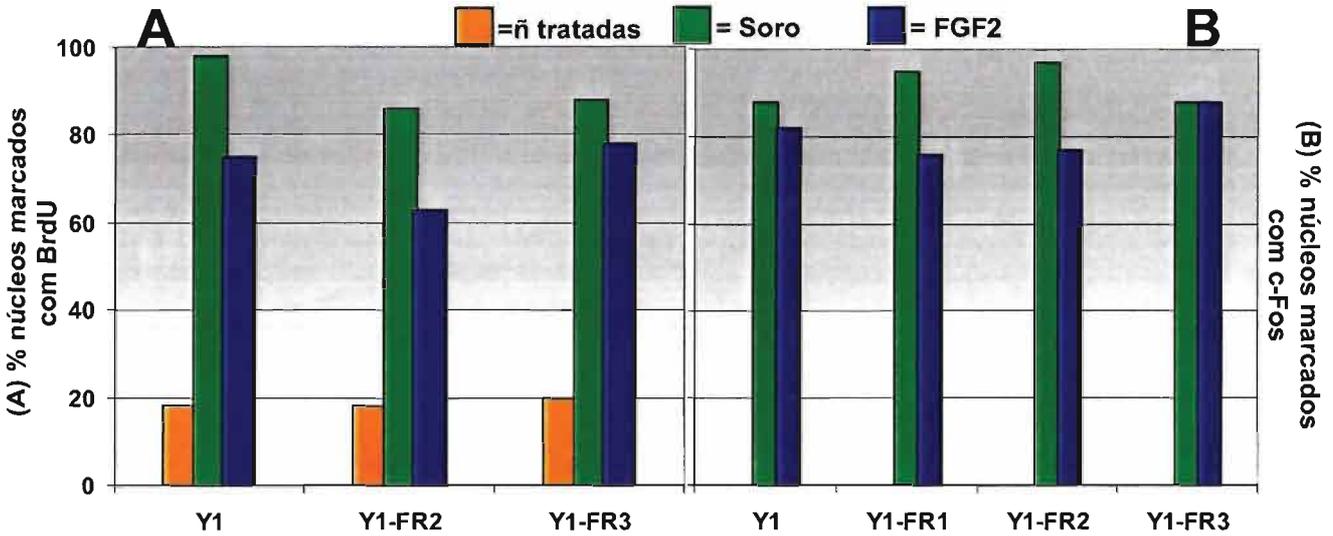


Figura 24: Indução de síntese de DNA por marcação com BrdU (A) e expressão da proteína c-Fos (B) em células Y1 e em clones resistentes Y1-FR1-3 sincronizadas em G0 e estimuladas com FGF2 (270pM) ou soro (FCS10%). Em (A) BrdU (50µM) foi adicionado após a 12ª hora e as células fixadas após 24 horas do início dos tratamentos. Em (B) as células foram fixadas após 2 horas do início dos tratamentos. N =1000.

Quanto ao crescimento populacional, os clones Y1-FR1 e 2 são moderadamente inibidos por FGF2 (Fig. 25A e 25B), enquanto o Y1-FR3 cresce pobremente em soro, mas otimamente se o soro for complementado com FGF2 (Fig. 25C). Neste último caso a proliferação de Y1-FR3 é praticamente dependente de FGF2, sendo este efeito específico de FGF2, uma vez que não pode ser substituído por FGF1 (Fig. 26).

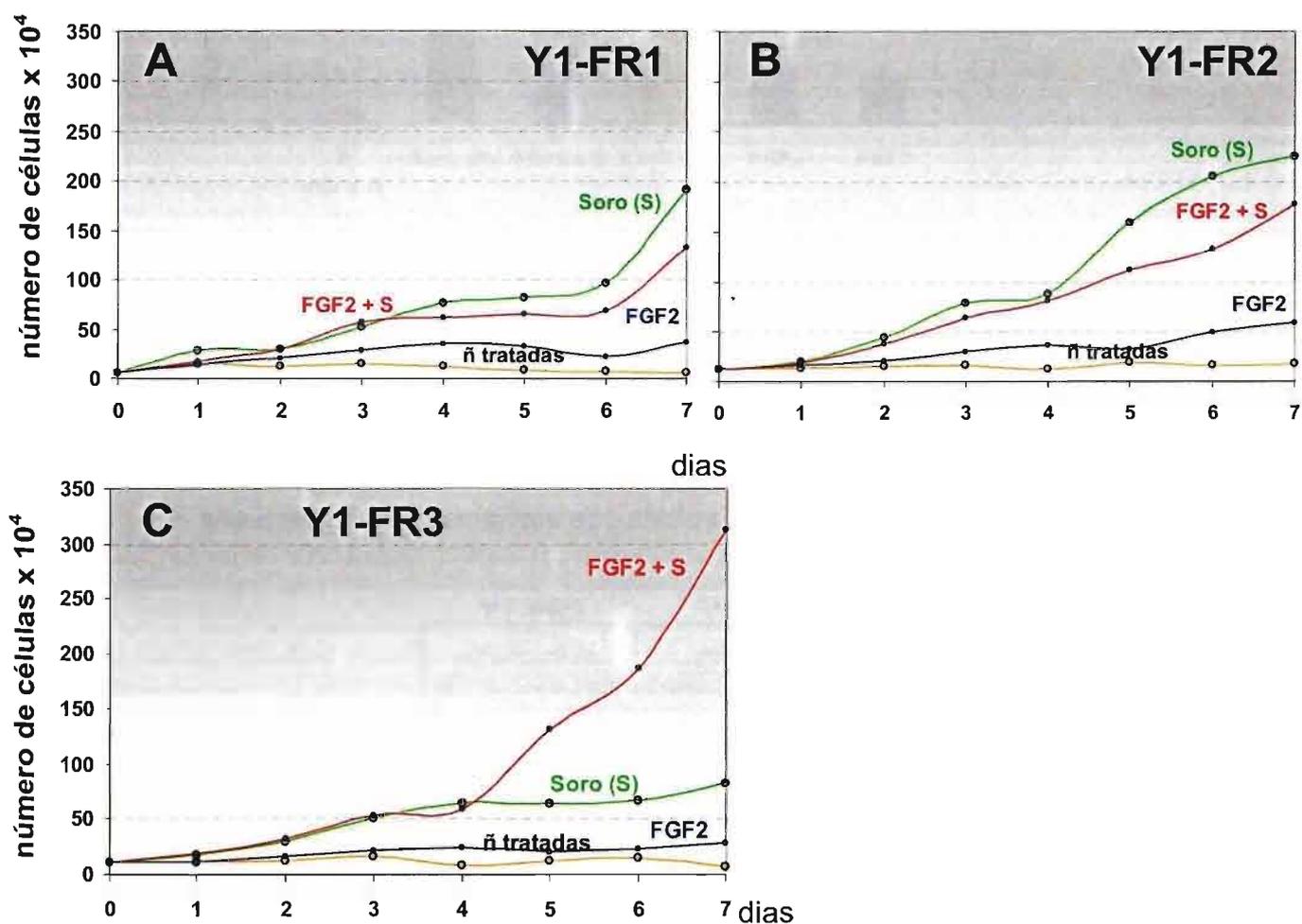


Figura 25: Ensaio de proliferação celular por contagem em hemocítmetro em células Y1 selecionadas como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2: Y1-FR1-3. Células em DMEM + soro (FCS 10%) são, no tempo 0h, lavadas e mantidas em DMEM \pm FGF2 (270pM) ou DMEM+Soro (FCS10%) \pm FGF2 (270pM). O meio de cultura era renovado a cada 48 horas.

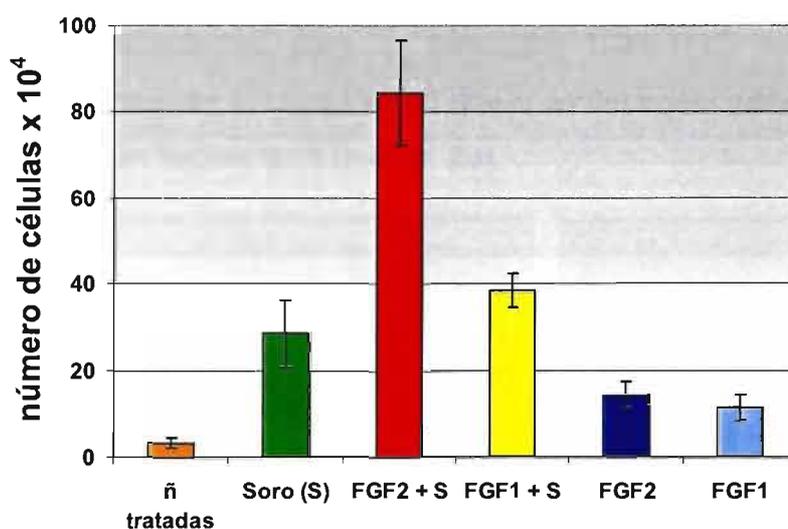


Figura 26: Medidas de proliferação celular por contagem em hemocitômetro em células Y1-FR3 sincronizadas em G0/G1 e tratadas com soro (FCS10%) ± FGF2 (270pM) ou FGF1 (270pM) por 72 horas. N=2.

Ensaio de morte celular por formação de colônias mostram que células Y1-FR são totalmente insensíveis aos efeitos citotóxicos de FGF2 (Fig. 27).

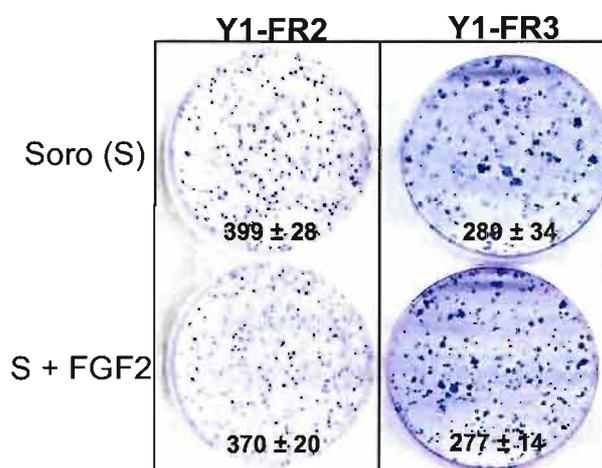


Figura 27: Ensaio de morte celular por formação de colônias exibem os efeitos de FGF2 em células isoladas Y1-FR2 e Y1-FR3. As células foram plaqueadas em DMEM + Soro (FCS10%, S) ± FGF2 (540pM) (~14 células/cm²) e após 24h o meio era trocado por DMEM + FCS10% até o surgimento de colônias visíveis. O número abaixo de cada placa representa a média e o desvio padrão do número de colônias obtidas em cada condição (N=4). O meio de cultura era renovado por DMEM+FCS10% a cada 2 dias.

Os clones Y1-FR, principalmente FR3, quando mantidos na interface G0/G1 e estimulados para a transição G0/G1→S mostram um maior sincronismo com um G1 mais longo que o da linhagem parental Y1, iniciando a síntese de DNA depois de 11h (Fig. 28).

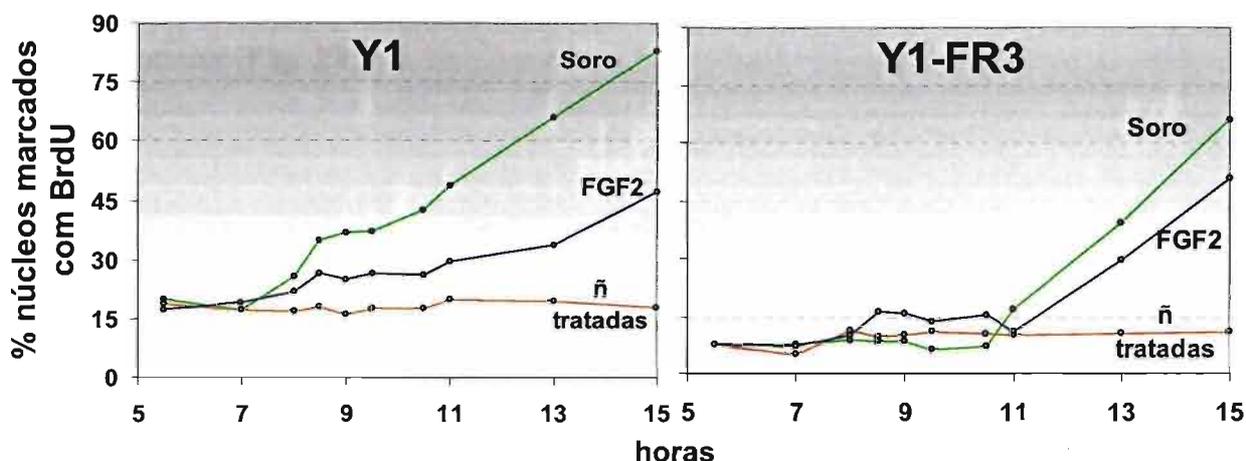


Figura 28: Cinética de entrada na fase S em células Y1 e em clones resistentes Y1-FR3 sincronizadas em G0 e estimuladas com soro (FCS10%) ou FGF2 (270pM) no tempo 0h e coletadas em diferentes tempos. BrdU (50µM) foi adicionado no tempo 0h. N=1500 (obtido em duplicatas).

Esta observação fenomenológica sugere que os eventos componentes da progressão celular através de G1 estão re-arranjados nas células Y1-FR3. Por último, cabe destacar que o fenótipo resistência a FGF2 não é estável, se os clones Y1-FRs forem mantidos em meio com apenas soro tendem a progressivamente reverter ao fenótipo sensível à ação citotóxica de FGF2 característico da linhagem parental Y1. Mas, quando mantidos em meio com soro + FGF2 permanecem indefinidamente resistentes a FGF2.

Para fazer um teste adicional destes procedimentos fomos selecionar clones celulares dos fibroblastos transformados B61 e EJ-A capazes de crescer em meio contendo FGF2, seguindo os mesmos procedimentos adotados para selecionar clones de Y1 resistentes a FGF2. A partir de plaqueamentos de baixa densidade (5-6 células /cm²) foram obtidas colônias que cresceram em DMEM+FCS10%+FGF2 e deram origem às sublinhagens clonais EJA-FR3 e B61-FR1 a 5.

Por ensaios de formação de colônia, EJA-FR3 se revelou bastante sensível a FGF2, enquanto B61-FR1 e 2 são significativamente resistentes a

esse fator (**Tabela 7**). Por outro lado, as curvas de proliferação na **figura 29** mostram que todas as sub-linhagens EJA-FR3, B61-FR1, -FR2 e -FR5 são resistentes a FGF2. Em particular, os clones derivados de B61: B61-FR1, -FR2 e -FR5 só proliferam significativamente se o meio DMEM+FCS10% for complementado com FGF2 sendo, portanto, linhagens dependentes de FGF2 para crescer (**Fig. 29**).

Tabela 7

Morte celular induzida por FGF2 por formação de colônias nos clones EJA-FR3 e B61-FR1-2

Os clones EJA-FR3 e B61-FR1-2 foram, derivados de células EJA e B-61 selecionados como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2.

Linhagem celular	# Colônias / placa		Inibição
	ñ tratadas	+ FGF2	
EJA-FR3*	148 ± 11,3	73,5 ± 29	51%
B-61-FR1**	120 ± 14	102 ± 17	15%
B-61-FR2**	42 ± 8	38 ± 5	10%

*clones normais de EJA e **clones normais de B-61, selecionadas como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2;

Para seleção dos clones resistentes: FGF2 foi adicionado ao meio de cultura e após ~20 dias, as colônias remanescentes foram isoladas e mantidas em DMEM + FCS 10% + 1nM FGF2 até o estabelecimento de linhagens que proliferavam na presença de FGF2. O meio de cultura era renovado a cada 2 dias na presença de 1nM de FGF2.

Para este ensaio: FGF2 era adicionado somente nas primeiras 24 horas, sendo substituído por DMEM + FCS 10% até o surgimento de colônias visíveis. O meio de cultura era renovado a cada 2 dias na ausência de FGF2. N=2.

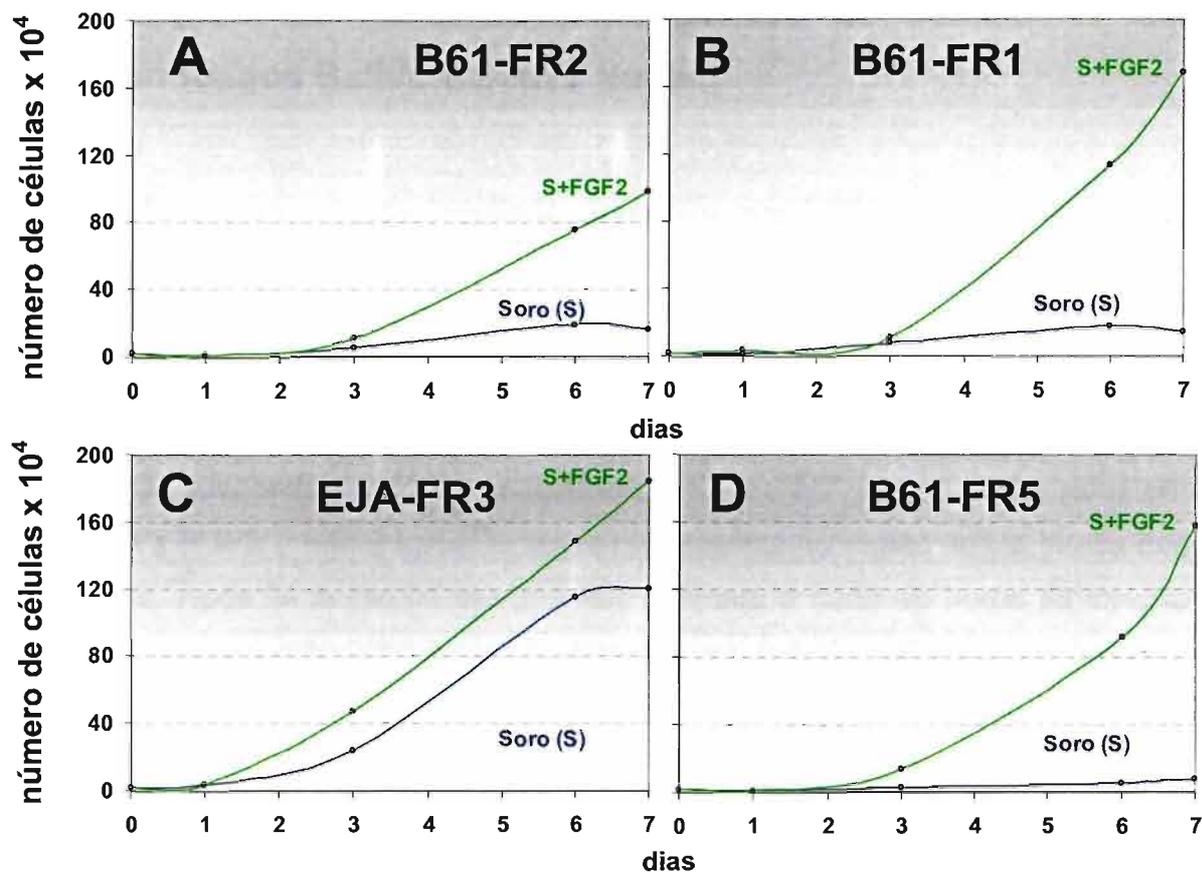


Figura 29: Proliferação celular detectada por contagem em hemocítômetro em células B61 e EJA selecionadas como resistentes aos tratamentos citotóxicos de FGF2, mantidas em DMEM + soro (FCS10%) ± FGF2 (1nM) e coletadas após os dias indicados. O meio de cultura é renovado diariamente. Os resultados foram obtidos em duplicatas (N=2).

Conforme apresentado mais adiante a sublinhagem EJA-FR3 induz a formação de tumores de progressão mais lenta do que sua parental EJ-A (Fig. 34), enquanto a sublinhagem B61-FR1 não é tumorigênica (Tabela 9), reafirmando a observação mencionada acima que sensibilidade a FGF2 e tumorigenicidade são características fenotípicas fortemente ligadas.

4.6 Efeitos de FGF2 na tumorigênese de células Y1 em camundongos Balb/c e Balb/c Nude.

Até agora, nossos resultados mostram que FGF2 induz intensa morte celular em células tumorigênicas Y1 (seção 4.3), porém sub-linhagens resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2 co-existem na população estoque de células Y1 (células Y1-FRs, seção 4.5).

Para analisarmos os efeitos de FGF2 na tumorigênese de células Y1 e Y1-FR3, suspendemos 10^6 células/Balb/c Nude (5-7 semanas de vida) em DMEM \pm FGF2 (1nM) e após 10 minutos injetamos na região dorsal direita dos animais. Após 24 horas iniciais e posteriormente a cada 48 horas da injeção inicial os camundongos foram injetados com 0,1ml DMEM/camundongo \pm FGF2 (20ng) durante os dois meses decorrentes. Após 8-15 dias do início, o estabelecimento do tumor foi determinado por exame visual e com paquímetro foram tiradas as medidas de comprimento e largura do tumor para cálculo aproximado da área, conforme ilustrado na **figura 30**:



Figura 30: Injeção subcutânea na região dorsal direita de 10^6 células/camundongo Balb/c Nude (seta vermelha) e progressão de tumores de células Y1. Foi observado 100% de surgimento de tumores de células Y1 no grupo controle (16/16).

No grupo dos animais controle (-FGF2) observamos 100% de formação de tumores de células Y1 (16/16) e 50% de formação de tumores de células Y1-FR3 (2/4), enquanto no grupo dos animais tratados com FGF2 somente 46% apresentaram a formação de tumores de células Y1 (6/13) e 50% de tumores de células Y1-FR3 (2/4) após 30 dias da injeção das células (**Tabela**

8). Os demais camundongos não desenvolveram tumores mesmo após o 70º dia.

Tabela 8

Tumorigênese de células Y1 e Y1-FR3 em camundongos Balb/c Nude.

Injetadas 10^6 células/animal Y1 ou Y1-FR3 subcutaneamente em camundongos Balb/c Nude nos grupos controle (-FGF2) ou tratados (+FGF2). O tempo de latência é determinado por exame visual. Os camundongos restantes não desenvolveram tumores mesmo após o 70º dia.

Tipo celular	Grupo	% surgimento de tumor (30 dias)	Latência (dias)
Y1	Tratado (+ FGF2)	46% (6/13)	11
	Controle (- FGF2)	100% (16/16)	13
Y1-FR3	Tratado (+ FGF2)	50% (2/4)	27
	Controle (- FGF2)	50% (2/4)	29

Estes resultados evidenciam que: a) células Y1-FR3 apresentam menor capacidade tumorigênica (50% menos em relação às células parentais Y1, $p \leq 0,02$); b) células Y1-FR3 apresentam um aumento de 2,4 vezes no tempo de latência ($p \leq 0,01$); c) o forte efeito citotóxico de FGF2 observado em células Y1 *in vivo*, não é observado em seus derivados Y1-FR3 ($p \leq 0,01$).

Estes dados corroboram a hipótese que durante seleção de subpopulações de células Y1-FGF2-resistentes, FGF2 favoreceu a proliferação de células com capacidade tumorigênica reduzida e, conjuntamente com os dados de síntese de DNA em células Y1-FR3 (rever **Fig. 28**), sugerem que FGF2 seleciona para células menos agressivas e mais dependentes dos sinais mitogênicos de FGF2 para proliferação. No caso de tumores de células Y1 foram observadas diferenças significantes na gênese e cinética de progressão dos tumores entre os grupos controle (-FGF2) e tratados (+FGF2) ($p \leq 0,01$) (**Fig. 31**).

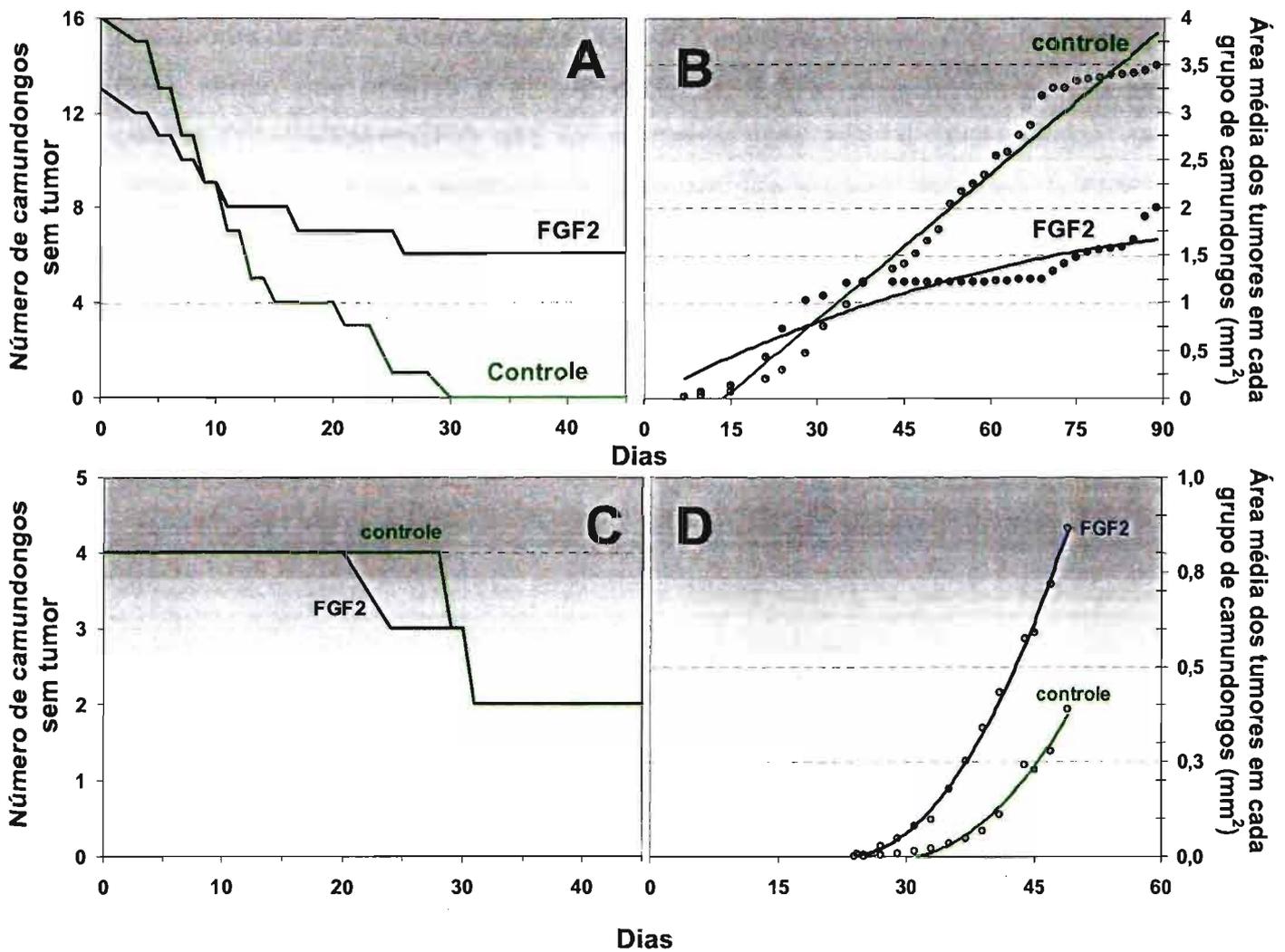


Figura 31: Gênese (esquerda) e cinética de progressão (direita) de tumores de células Y1 (A e B) e Y1-FR3 (C e D) em camundongos Balb/c Nude. Em (B) e (D) foram plotadas a média das áreas dos tumores obtidos no grupo controle (-FGF2) e a média das áreas dos tumores do grupo tratado (+FGF2). Os grupos 'controle' e 'tratado' mostram-se significativamente diferentes com $p=0,0015$.

Nosso protocolo de ensaios de tumorigênese implica na suspensão de células Y1 em solução DMEM \pm FGF2 1nM para posterior injeção nos animais. Uma informação importante nestes experimentos é verificar se apenas o contato de FGF2 com as células em suspensão (por cerca de 5-10 min) poderia estar exercendo os efeitos anti-tumorigênicos observados. Para tal, foram testadas injeções de células Y1 em DMEM (sem FGF2) e submetidas a injeções posteriores de FGF2 (aplicadas após 24h e posteriormente a cada 48h

da injeção inicial de células). Nestas condições observamos que as injeções posteriores de FGF2 foram capazes de inibir em 50% o surgimento de tumores (2/4), sendo que apenas a adição inicial de FGF2 conjuntamente com as células (Y1+DMEM+FGF2) não foi suficiente para inibir a tumorigênese de células Y1 (3/3). Estes resultados evidenciam que o efeito citotóxico de FGF2 observado em células Y1 em cultura é reproduzido *in vivo* quando administrado localmente e em injeções periódicas de apenas 20ng/animal (~400ng FGF2/kg).

4.7 Morte induzida por FGF2 em células Y1 removidas de tumores em camundongos Balb/c Nude (células “Ex-vivo-Y1”)

Dois tumores de células Y1 (2-4cm²) foram removidos em ambiente estéril, lavados e dissociados mecanicamente em agregados celulares mantidos em DMEM+FCS10% até adesão à superfície da placa de cultura. Os clones de células “Ex-vivo-Y1” denominados de “Y1-T1” e “Y1-T2” foram obtidos do tumor controle (i.e. animais não tratados com FGF2) e do tumor de animais tratados com FGF2, respectivamente (como mais bem descrito na seção 3.17).

Após obtenção e expansão clonal, foram efetuados ensaios de proliferação e formação de colônias aonde pudemos observar que ambas as linhagens de células “Y1-Ex-vivo” respondem à FGF2 com uma forte inibição de sua proliferação em cultura, sendo até mais intensa que a observada em células Y1. (Fig. 32 e 33)

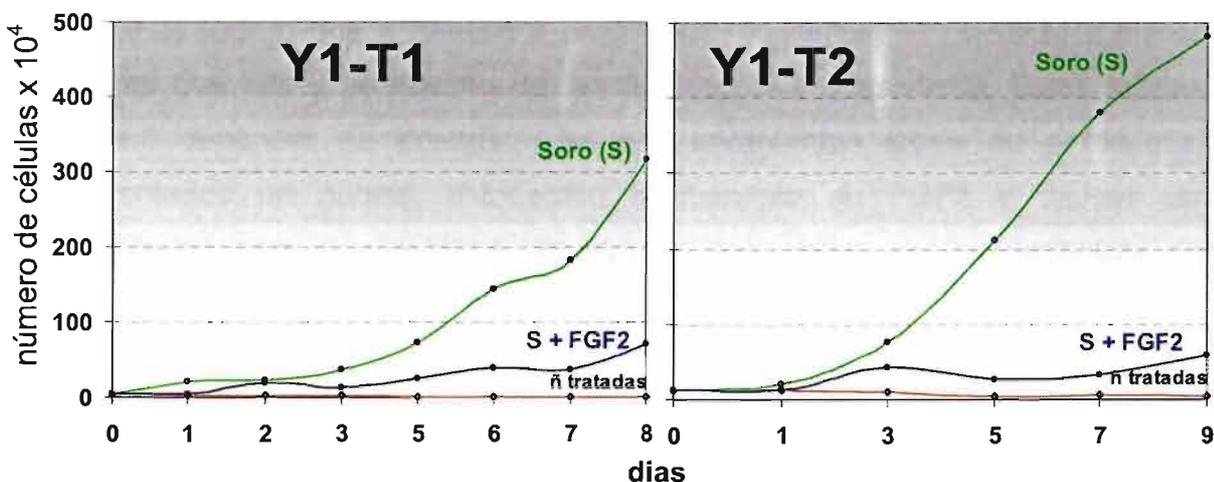


Figura 32: Efeitos de FGF2 na proliferação de células “Ex-vivo-Y1” linhagens “Y1-T1” e “Y1-T2”. As células são plaqueadas em DMEM + Soro (FCS10%, S) e, após 24h, no tempo 0h o meio é trocado por DMEM+ Soro ± FGF2 (1nM) ou as células são lavadas e mantidas em DMEM puro (=ñ tratadas) por 8-9 dias. O meio de cultura foi renovado diariamente. N=2.

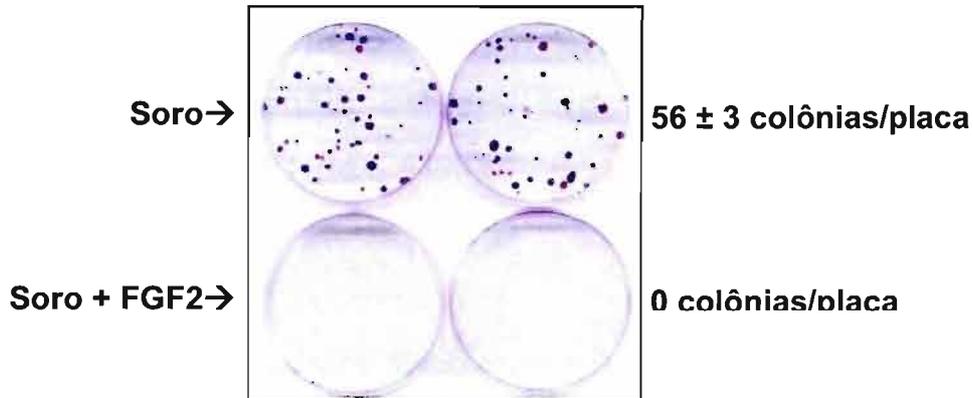


Figura 33: Morte celular, detectada por formação de colônias, induzida por FGF2 em células Y1-T1. 400 células/placa são plaqueadas em DMEM + FCS10% ± FGF2 (1nM). O meio de cultura era renovado a cada 2 dias ao longo de 15 dias. Após 24h o meio era trocado por DMEM+ Soro (FCS10%) até o surgimento de colônias visíveis. (N=2).

O fato da linhagem Y1-T2 em cultura ser sensível a tratamentos de FGF2 apesar de ter surgido em um camundongo no grupo dos tratados (+FGF2) sugere que a gênese e progressão do tumor "T2" deve-se a outros fatores que não a expressão de um fenótipo FGF2-resistente. Estes fatores podem depender da dosagem, se são tratamentos locais ou sistêmicos, sustentados ou pulsos, estocagem e liberação do FGF2 e devem ser otimizados para uma máxima observação dos efeitos anti-tumorigênicos de FGF2, como será mais bem discutido na seção 5.

4.8 Efeitos de FGF2 na tumorigênese de células B-61 e EJA e seus derivados clonais selecionados como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2: B61-FRs e EJA-FR3 em camundongos Balb/c Nude

As linhagens de células fibroblásticas B-61 e EJA são tumorigênicas (rever **Tabela 2**) e respondem com mais de 54% de inibição de formação de colônias aos tratamentos de FGF2 (rever **Tabela 3**). Semelhantemente aos clones Y1-FRs isolados como sub-linhagens de células Y1 resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2 (seção 4.5), ensaios de morte celular por formação de colônias foram efetuados para seleção de clones de células B-61 e EJA FGF2-resistentes (B61-FR e EJA-FR). Usando o mesmo protocolo para células Y1, após seleção e expansão clonal suspendemos isoladamente 10^6 células B61, B61-FR1, EJA ou EJA-FR3 em solução DMEM \pm FGF2 (1nM) e após 10 min injetamos na região dorsal direita de camundongos Balb/c Nude (5-7 semanas de vida), sendo que após 24 h e posteriormente a cada 48 h da injeção inicial os camundongos foram injetados com solução de 0,1ml DMEM/camundongo \pm FGF2 (20ng) durante os 2 meses decorrentes.

Nos animais controle (i.e. não tratados com FGF2) observamos a formação de tumores em 100% dos animais para as linhagens EJA (4/4), EJA-FR3 (3/3) e B-61 (7/7) e 0% para as linhagens B61-FR1 (0/5). Embora células EJA-FR3 induzam formação de tumores em 100% dos animais, foram observadas diferenças quanto à velocidade de progressão dos tumores de EJA e EJA-FR3 e ao tempo médio de latência: 6 e 13 dias, respectivamente (**Tabela 9 e Fig. 34**).

Tabela 9

Ensaio de tumorigênese de células EJA e B-61 e seus derivados clonais selecionados como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2: B61-FR1 e EJA-FR3 em camundongos Balb/c Nude.

Suspendemos 10^6 células B61 ou EJA em solução DMEM \pm FGF2 (1nM) e após 10 min injetamos na região dorsal direita de camundongos Balb/c Nude (5-7 semanas), sendo que após 24 h e posteriormente a cada 48 h da injeção inicial os camundongos foram injetados com solução de 0,1ml DMEM/animal \pm FGF2 (20ng) durante os 2 meses decorrentes. As células EJA-FR3 e B61-FR1 foram suspensas em DMEM e não submetidas a tratamentos de FGF2 durante o ensaio. O tempo de latência é determinado por exame visual. O camundongo restante não desenvolveu tumor mesmo após o 40º dia

Tipo celular	Tratamento	% surgimento de tumor (30 dias)	Latência (dias)
EJA	+ FGF2	91% (10/11)	8,6
	Sem FGF2	100% (4/4)	6
EJA-FR3*	Sem FGF2	100% (3/3)	13
B-61	+ FGF2	100% (8/8)	7,5
	Sem FGF2	100% (7/7)	5,5
B-61-FR1**	Sem FGF2	0% (0/5)	----

* - clone de EJA, selecionado como resistente aos efeitos citotóxicos de FGF2 em cultura;
 ** - clone de B61, selecionado como resistente aos efeitos citotóxicos de FGF2 em cultura.

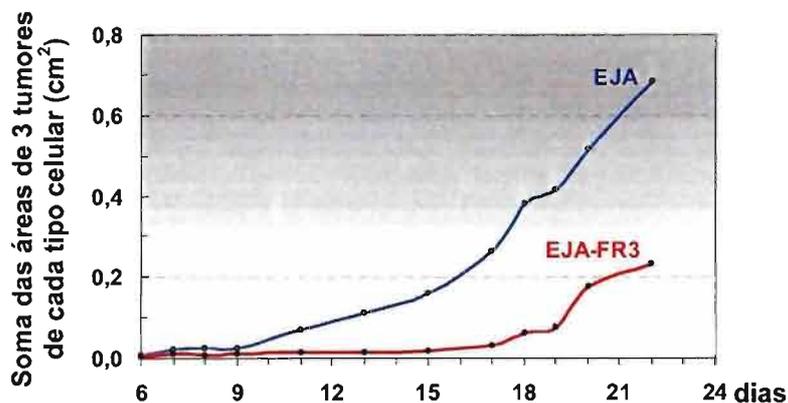


Figura 34: Progressão de tumores de células EJA e EJA-FR3 em camundongos Balb/c Nude. 10^6 células/animal foram injetadas no dia 0 e o crescimento dos tumores medidos por análise visual e paquímetro. Em ambos os casos 100% dos animais apresentaram tumores (4/4 para células EJA e 3/3

em células EJA-FR3). Foi plotada a média das áreas dos tumores obtidos em cada linhagem.

Como visto na **Tabela 9**, o efeito anti-tumorigênico de FGF2 é reduzido nos animais injetados com células EJA (9%; 1/11) e ausente nos animais injetados com células B-61 (0/5). Apenas resultados com as células B-61-FR1 corroboram os ensaios de tumorigênese de células Y1-FR3 (seção 4.6), sugerindo que as sub-populações de células tumorais B-61 selecionadas como resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2 caracterizam-se por sua reduzida capacidade tumorigênica.

5. Discussão

Fatores de crescimento são moléculas capazes de induzir células-alvo quiescentes a percorrerem a fase G1 do ciclo celular até atingirem um ponto crítico deste processo, comprometendo-as a iniciarem a síntese de DNA.

Também chamado de “checkpoint de entrada em S”, esse ponto crítico coincide principalmente com a fosforilação da proteína Rb, regulada positivamente pela atividade dos complexos ciclina D-CDK-4 e -CDK-6 e negativamente por inibidores destes complexos, como p27^{Kip1}.

Até atingirem esse “checkpoint” as células-alvo estão sob um rígido controle intracelular o que permite gerar uma série de outros “checkpoints” garantindo que a próxima etapa na progressão do ciclo não se inicie até que a etapa anterior tenha sido completada, que as condições intra- e extra-celulares sejam favoráveis (i.e. ausência de moléculas inibitórias, disponibilidade de nutrientes e fatores de progressão e densidade celular favorável) e que o tamanho celular seja adequado. O descontrole deste processo pode levar ao surgimento de células tumorais.

Neste contexto, tive a enorme satisfação de após 32 anos da descoberta de FGF2 pelo Prof. Armelin H.A. (*Armelin H.A., 1973*) ainda avançar significativamente no estudo dos múltiplos efeitos induzidos por este fator no controle do ciclo celular em células de mamíferos.

Nestes estudos mostramos que FGF2 é capaz de inibir a progressão em cultura e a tumorigênese de células adrenocorticais Y1 em camundongos Balb/c Nude. Nesse modelo, os sinais disparados por FGF2 no início e meio de G1 atuam estimulando a progressão G0/G1→S e bloqueando a transição S→G2/Mitose.

A principal dificuldade encontrada na etapa conclusiva deste trabalho decorre da própria nomenclatura histórica do fator estudado: “FGF” ou “Fibroblast Growth Factor”, que foi fundamentada na atividade mitogênica de FGF2 em fibroblastos 3T3 (*Armelin H.A., 1973*), o que gera um inicial “cepticismo científico” quando afirmamos que o “fator de crescimento de fibroblasto-2” induz morte celular.

De fato, o uso das iniciais FGF em todos os 22 membros da família não implica que todos estes fatores possuam a mesma atividade biológica, mas por apresentarem-se estruturalmente relacionados. Dentre os membros da família de FGF utilizados (FGF1, FGF2, FGF4 e FGF5) mostramos que FGF2 exerce o maior bloqueio na proliferação de células Y1 (ver **Fig. 11D**).

Associado a isso, muitos dos efeitos de FGF2 descritos na literatura o correlacionam com progressão no ciclo celular de células normais e tumorais, seja através de sua atividade angiogênica e/ou proteção contra apoptose (*Liu et al., 2001, Song et al., 2000, Coleman et al., 2000, Compagni et al., 2000, Menzel et al., 1996, Huang et al., 1994, Moscatelli & Quarto, 1989*). Elevados níveis de FGF2 na urina ou no soro de pacientes com câncer são correlacionados com um prognóstico ruim em alguns modelos (*Nguyen et al., 1994*).

Apesar disso, muitos outros trabalhos evidenciam efeitos citotóxicos de FGF2 na progressão de células tumorais (*Williamson et al., 2004, Kim MS et al., 2004, Raucci et al., 2004, Krejci et al., 2004, Westwood et al., 2002, Smits et al., 2000, Sturla et al., 2000, Wang et al., 1998, Liu et al., 1998, Fenig et al., 1997, Chen et al., 1995, McLeskey et al., 1994*) e outros associam altos níveis de FGF2 com um melhor prognóstico em cânceres (*Colomer et al., 1997*).

Quanto ao papel de FGF2 no desenvolvimento de tumores, a história também é controversa: alguns trabalhos em camundongos transgênicos (Tyrrp1-Tag) que desenvolvem tumores agressivos na retina, invasivos, metastásicos e que expressam FGF2 (RPE, "retinal pigment epithelium"), foram modificados geneticamente e seus descendentes apresentaram-se deficientes para FGF2 (Tyrrp1-Tag^{FGF2^{-/-}}). Apesar de apresentarem alterações fenotípicas, como defeitos neuronais, redução da pressão sangüínea, diminuição da massa óssea e atraso na cicatrização de feridas, o desenvolvimento do tumor nesses animais mostrou-se independente da expressão de FGF2 (*Foletti et al., 2002*). Em outros trabalhos a expressão de FGF2 sugere-se ser importante no crescimento de melanomas e outros tumores (*Bikfalvi et al., 1997, Halaban et al., 1988*).

Não encontramos qualquer trabalho que mostre citotoxicidade de FGF2 em células normais, sugerindo que estes efeitos ocorram especificamente em determinadas linhagens tumorais. Em alguns casos FGF2 pode regular positiva

ou negativamente a sensibilidade de células normais e tumorais tratadas com drogas quimioterápicas (Coleman, 2003, Liu et al., 2001, Huang et al., 1994).

De uma forma geral, os dados descritos na literatura indicam que FGF2 é um peptídeo multi-potente capaz de ativar diferentes funções celulares em diferentes células-alvo.

Neste quesito, os receptores de FGF (FGFRs) também merecem uma atenção especial. Alguns estudos evidenciam que alterações no padrão de expressão de isoformas do FGFR2 em células epiteliais (da isoforma FGFR2-IIIb para a FGFR2-IIIc) podem levar ao estabelecimento de alças autócrinas, até então inexistentes, através da ativação específica de FGFR-IIIc por FGF2, ocasionando proliferação independente de sinais do estroma, perda do fenótipo diferenciado e malignização (Yan G. et al., 1993). Outros estudos mostram que se reduzirmos a expressão de FGFR2-IIIb induz-se a transformação maligna em células epiteliais, sendo que as mais agressivas apresentam níveis elevados da expressão de FGFR1. Curiosamente, ao passo que a expressão deliberada de FGFR1 acelera o estabelecimento do fenótipo maligno, a restauração dos níveis de expressão de FGFR2-IIIb nestas mesmas células reduz a proliferação e restaura a dependência dos sinais do estroma e o fenótipo diferenciado (Feng et al., 1997).

Estas observações revelam que diferentes receptores de FGF exercem diferentes funções no desenvolvimento e progressão do fenótipo maligno. Neste contexto, *fgfr2-IIIb* pode ser interpretado como um gene supressor de tumor.

Embora FGF2 seja um ligante pouco específico para o produto do gene *fgfr2-IIIb* (sugerido como um gene supressor de tumor por Feng et al., 1997), sugerimos que FGF2 induz morte em células Y1 por ser capaz de ativar uma combinação específica de FGFR's que juntos disparam um sinal predominantemente citotóxico nestas células.

A utilização de outros membros da família de FGF mostra que outras combinações FGFs-FGFRs podem transduzir sinais citotóxicos menos intensos (FGF1 e FGF4) ou ausentes (FGF5).

Neste trabalho sugerimos que FGF2 ative sinais citotóxicos em tipos específicos de células tumorais, mostrando-se diretamente relacionados com alta expressão de Ras-GTP. Neste caso, sugerimos o uso de "Fibroblast Guard

Factor-2” como nomenclatura alternativa de FGF2, pois a citotoxicidade induzida por FGF2 pode atuar como um mecanismo de “guarda”, ou de “proteção”, contra a proliferação de células induzida por oncogene.

Complementar a isso, mostramos que sub-linhagens de células Y1, que sustentam a alta expressão de Ras-GTP, podem ser resistentes aos efeitos citotóxicos de FGF2 (células Y1-FR's). Neste contexto, alguns resultados preliminares, por PCR semi-quantitativo, evidenciam uma redução de até 5 vezes na expressão do mRNA do FGFR2 em células Y1-FR3 quando comparadas às células parentais Y1 (dados em estudo, não apresentados nesta tese). Estes dados sugerem que o mecanismo que controla a resposta de morte ou de proliferação pode também ser regulado por alterações no padrão de expressão dos FGFR's.

5.1 Sinalização G0/G1→S por FGF2 em células tumorais Y1

O progresso de uma população de células ao longo do ciclo celular é controlado e pode ser medido pela presença ou ausência de uma série de proteínas cuja ativação/expressão e inativação/proteólise devem ser coordenadamente controladas. Além disso, a organização espacial destas proteínas também determina a correta passagem de uma fase do ciclo para a próxima.

Nos últimos 9 anos, nosso laboratório tem avançado significativamente no estudo do sinal mitogênico inicial disparado por FGF2 em células Y1. Este sinal permite que detectemos em 0,5min a ativação de c-Ki-Ras, em 5 min a presença de ERK1-2 ativas no núcleo de 100% da população (**Fig. 2**, ED50% de 30pM) e, em 2h, a expressão nuclear de c-Fos em 80% da população (**Fig. 4**). Estes dados caracterizam a transição G0→G1 e a progressão sincrônica de 80% das células até a 2ª hora de G1.

Além disso, sabemos que FGF2 é capaz de induzir toda a progressão por G1 e entrada na fase S, pois: a) ele estabiliza a expressão da proteína c-Myc até a 6ª hora de G1 (com ED50% de 25pM) (*Lepique et al., 2004*); b) induz a expressão das ciclinas D1 e E entre 5-6ªh de G1 (*Schwindt et al., 2003*); c) induz a fosforilação da proteína Rb (4-8h de G1); e d) induz a síntese de DNA,

detectada por marcação com BrdU, em 50% da população após 12h da adição de FGF2 (Rocha et al., 2003).

Desta forma, notamos que a sinalização mitogênica inicial exige a coordenação de uma complexa maquinaria celular envolvida em importação e exportação de fatores do citoplasma para o núcleo, a ativação de fatores de transcrição e a expressão dos produtos de muitos genes que juntos induzem a progressão em G1→S.

Notamos ao longo desta progressão uma perda gradual do sincronismo populacional, aonde apenas 35% da população de células estimuladas a saírem de G0/G1 atinge a fase S em tratamentos de 2h de FGF2. Este efeito pode ser otimizado através da manutenção de FGF2 no meio de cultura ou através de segundas adições de FGF2, entre 4-6h em células pré-tratadas com FGF2 entre 0-2h (**Fig. 5**).

Esta “perda de sincronismo” populacional decorre, em nossa opinião, de dois fatores principais: 1) adotarmos medidas globais de análise populacional; e 2) conceitualizarmos vias metabólicas como entidades distintas responsáveis cada uma por um determinado fenômeno biológico. No primeiro caso, refiro-me a ensaios baseados em ‘lise celular’ aonde a análise da síntese de uma biomolécula compromete-se a ser uma medida quantitativa global de milhares de células que, de fato, não representa a variabilidade metabólica intrínseca de cada célula da população. No segundo caso, mesmo adotando métodos de análise de expressão individual (contagem de núcleos marcados, p.ex.) ainda não compreendemos claramente como as diferentes vias de sinalização interagem formando redes de sinalização cada vez mais complexas na medida em que nos aproximamos de um fenômeno biológico. Por exemplo: a ativação de ERK1-2 em 100% da população por tratamentos de FGF2 é uma resposta ultra rápida (2-5min), linear e independente de outros sinais que não sejam os disparados por FGFR→Ras→Mek1-2. Relativamente mais complexo é o processo de síntese de DNA, que não deve depender somente da quantidade de ERK1-2 ativa, mas da influência de outras vias metabólicas inter-relacionadas como: vias de sinalização de nutrientes como a síntese de nucleotídeos, vias regulatórias de crescimento (i.e. volume celular), vias de morte e de controle homeostático (integridade de membrana, equilíbrio entre síntese e degradação protéica, p.ex.). Naturalmente nada disso levaria a uma

explicação mecanística para o efeito sinérgico de dois pulsos de FGF2, o que dispensaria para tal um trabalho futuro à parte.

5.2 Inibição da Progressão S→G2/Mitose por FGF2 em células tumorais Y1

Embora nos últimos anos, nosso laboratório tenha avançado no estudo do sinal mitogênico inicial disparado por FGF2 em células Y1 na transição G0/G1→S, o sinal citotóxico que aqui descrevemos induzido por FGF2 é uma descoberta recente, detectado como um bloqueio na transição S→G2, inicialmente descrito em *Costa et al.* (2004) e aprofundada nesta tese.

Esse efeito de morte, embora não identificado e independente das vias canônicas de apoptose, abrange mais de 88% da população de células Y1 e é peculiar a FGF2, sendo muito reduzido nos outros membros testados da família de FGF, como: FGF1, FGF4 e FGF5 (41%, 36% e 16% de citotoxicidade, respectivamente) (**Fig. 11D**).

Como mostramos, reduzindo-se os níveis c-Ki-Ras-GTP expressos em células Y1 o efeito citotóxico induzido por FGF2 é substituído por uma resposta mitogênica clássica, permitindo toda a progressão G0/G1→S→G2/M. Além disso, alguns ensaios recentes sugerem que esta redução pode ocorrer após algumas horas da adição de FGF2 que também garante a resposta mitogênica de células Y1 aos tratamentos de FGF2. Se comprovado, isto sugere que a redução dos níveis expressos de c-Ki-Ras-GTP possa ser crucial apenas em momentos posteriores ao disparo do sinal de FGF2→FGFR (dados em estudo).

O mecanismo pelo qual FGF2 exerce estes efeitos ainda é desconhecido, mas nossos resultados sugerem que o bloqueio S→G2 ocorre através da iniciação abortiva ou bloqueio de mais de 50% dos replicons na fase S, embora não altere a velocidade de alongação de cadeias de DNA já em crescimento (seção 4.2, **Fig. 10**).

Alguns trabalhos recentes em linhagens de ESFT (sarcomas de Ewing's) sugerem que o efetor de FGF2 na indução de morte celular é a ativação prolongada da proteína p38^{MAPK} – uma proteína quinase, da família das MAPK, envolvida com o disparo de sinais de stress celular – que levaria a um aumento

da expressão de múltiplos receptores de sinais de morte celular, dentre eles o p75^{NTR} (Williamson et al., 2004). Em outros modelos celulares FGF2 também se mostrou capaz de induzir morte celular relacionada com aumento da expressão de p38^{MAPK} ativa (Raucci et al., 2004). Em células Y1 ensaios preliminares detectaram aumento na expressão de p38^{MAPK} ativa em tratamentos de 12h de FGF2 (dados em estudo). Outros trabalhos sugerem que o bloqueio da proliferação celular pode estar subordinado ou independente da ativação das vias canônicas de apoptose. No caso de células BGC-823 (linhagem de câncer gástrico humano) ambos TPA (éster de forbol) e ATRA (ácido retinóico *trans*) são capazes de bloquear a proliferação, embora apenas TPA induza apoptose (Wu et al., 2002). Neste caso específico, ambos atuam através da ativação de um receptor nuclear (Nur77) embora os sinais apoptóticos de TPA sejam desencadeados não somente pela ativação como pela translocação de Nur77 do núcleo para a mitocôndria. Em nosso laboratório análises de microarray em células Y1 tratadas com FGF2 apresentam intensa indução da expressão do mRNA para Nur77 (dados da Paula F. Asprino e Dr. Hugo A. Armelin, não publicados).

A resposta de ativação de p38^{MAPK} e expressão/localização de Nur77 em células Y1 por FGF2 ainda não são conclusivas, mas são alvos potenciais para caracterização molecular do fenômeno de morte celular induzido por este fator e do surgimento de sub-populações de células Y1 com fenótipo FGF2-resistente, como será abordado na próxima seção.

5.3 Heterogeneidade na população de células Y1: mutação *versus* adaptação

Independentemente se a manutenção de uma população tumoral qualquer segue um padrão estocástico ou hierárquico de proliferação (neste último caso é assumido a existência de “stem-cells” tumorais), é constatado que existe uma heterogeneidade intrínseca dentro desta população, ou seja, existem sub-populações distinguíveis por pequenas alterações em vias metabólicas.

No caso específico de células Y1, a heterogeneidade na população pode ser caracterizada pelo fenótipo “resistência” ou “sensibilidade” aos tratamentos de FGF2. Neste caso, FGF2 atua como um agente de seleção: inibindo a parcela maior da população de células Y1 ($87,8 \pm 7,8\%$), mas permitindo a proliferação de uma minoria ($12,2 \pm 7,8\%$, N=2370 colônias).

A análise dos resultados do isolamento de clones coletados ao acaso (Y1-C1-23, seção 4.5), adaptada do “teste de flutuação” de *Luria & Delbrück* (1943), sustenta a afirmação que a heterogeneidade na população de células Y1 deve-se a sub-linhagens pré-existentes no estoque de células, evidenciada por diferentes porcentagens de células FGF2-resistentes entre as populações secundárias e a população parental, e por uma distribuição do número de classes clonais com mesma porcentagem de resistência diferente de uma curva normal, o que seria esperada no caso do fenótipo resistência ser induzido, e não selecionado, por FGF2. Além disso, células Y1 selecionadas como resistentes aos tratamentos citotóxicos de FGF2 (Y1-FRs, seção 4.5) se mantidas em cultura por 20-30 dias na ausência de FGF2 retornam ao fenótipo parental (i.e. sensível a FGF2), evidenciando que o fenótipo “FGF2-resistente” não é estável na ausência de FGF2, mostrando que essa heterogeneidade é incompatível com a hipótese de ser originada por mutação gênica, ou seja, não é de origem genética, mas deve-se a uma variação selecionada por FGF2, de natureza epigenética.

De uma forma resumida, mostramos que a população de células Y1 é heterogênea e está formada por 88% de células susceptíveis à inibição por FGF2, sendo estocástico o surgimento de células resistentes (em oposição à homogeneidade como um fenômeno adaptativo). Na presença deste fator, selecionam-se células com traços fenotípicos de células normais: velocidade de proliferação reduzida em soro (**Fig. 25**), mais dependentes de sinais externos para proliferação (evidenciada pela redução dos níveis basais de núcleos marcados com BrdU, **Fig. 28**), aumento do tamanho da fase G1 (**Fig. 28**) e com capacidade tumorigênica reduzida (**Tabela 8 e Fig. 31**).

5.4 Tumorigênese de células Y1 em camundongos Balb/c Nude

Uma peculiaridade das células Y1 é possuírem o proto-oncogene c-Ki-ras amplificado, tendo como conseqüências: a expressão elevada da proteína Ki-Ras ativa (Kimura & Armelin, 1988, Schwab et. al, 1983, e **Fig. 21 e 22A**), a manutenção de níveis basais elevados da proteína AKT fosforilada (*Forti et al. 2002 e 2000* e **Fig. 22B**) e, dependente da via de AKT, uma elevada expressão de c-Myc (*Lepique et al., 2004*).

A ativação destas vias controla sinais que impulsionam a transição G1→S e a evasão a apoptose mesmo na ausência de sinais mitogênicos, o que confere um fenótipo tumorigênico às células que as possuam (*Hanahan & Weinberg, 2000*). Denominamos de “núcleo ativado” a rede de sinalização que garante a ativação e expressão basal elevada destas proteínas oncogênicas em células Y1.

Mesmo em tentativas de reduzirmos a atividade do “núcleo ativado” em células Y1 através da redução dos níveis de Ki-Ras-GTP nossos ensaios *in vivo* não evidenciam reduções na gênese de tumores de células Y1 expressando altos ou baixos níveis desta proteína na forma ativa (dados não apresentados). Embora estes resultados não relacionem os níveis de Ki-Ras-GTP e tumorigênese em células Y1, a manutenção e gênese de melanomas *in vivo* mostram-se intimamente dependentes da expressão de H-Ras-GTP, sendo que sua inativação relaciona-se com intensa regressão tumoral (*Chin et al., 1999*).

Apesar destes e de outros resultados confirmarem o papel de Ras na tumorigênese (*Shirasawa et al., 1993*), alguns tumores induzidos condicionalmente a expressarem baixos níveis de Ras-GTP podem persistir ou ressurgirem, tornando-se melanomas “Ras-independentes”, ou ainda, sugere-se que a presença continua de H-Ras-GTP confira a capacidade de células tumorais evadirem do sistema imune do camundongo (*Doherty et al., 1994*).

Em se tratando de sistema imune, alguns trabalhos correlacionam elevados níveis intracelulares de FGF2 em linfócitos com uma redução dos níveis de apoptose e aumento da viabilidade, criando uma vantagem adicional que pode originar certos tipos de leucemia seja através da expansão clonal,

progressão tumoral ou resistência a terapias citotóxicas (Menzel et al., 1996). Nesse trabalho, Menzel e colaboradores sugerem que a origem do excesso de FGF2 na urina e soro de pacientes com certos tipos de leucemia (CLL, “Chronic Imphocytic leukemia”), é da super-produção intracelular de FGF2 em linfócitos B.

Embora não existam trabalhos nesta área, a produção e secreção de FGF2 por células do sistema imune, somando-se a citotoxicidade de FGF2 em células expressando altos níveis de Ki-Ras-GTP, pode ser interpretada como uma ferramenta adicional do sistema imune na proteção contra certos tipos reconhecidos de câncer.

Deve ser mencionado que no nosso modelo os efeitos protetores de FGF2 na formação de tumores de células Y1 podem estar subestimados, pois não dispusemos de ensaios variando a dose de FGF2/camundongo ou outras formas de administração. Em modelos animais, ensaios clínicos para proteção contra isquemias no miocárdio, FGF2 é administrado diariamente em até 100µg FGF2/kg. Comparativamente utilizamos no nosso modelo administrações de FGF2 a cada 48 horas de apenas 2-4µg FGF2/kg. Em humanos, para o mesmo propósito, foi utilizado com sucesso um sistema de liberação constante aonde cirurgicamente FGF2 é adicionado adsorvido em pastilhas de heparina-alginato (Laham et al., 1999, Sellke et al., 1998).

5.5 Prospecções Futuras

Quase que por definição, as terapias anti-câncer efetivas (quimioterapias ou radioterapias) selecionam para resistência. Na maioria das vezes, matando células sensíveis e induzindo regressão tumoral aumentam a sobrevida do paciente, mas simultaneamente tendem a selecionar células resistentes ao agente citotóxico. Estes clones geralmente proliferam originando tumores reincidentes mais agressivos e resistentes a estes agentes.

Semelhantemente, antibióticos invariavelmente selecionam para bactérias cada vez mais resistentes e agressivas, pois eficientemente matam as bactérias sensíveis.

Em ambos os casos, como se governados por uma regra única, a seleção para resistência não ocorre sem uma resposta à terapia e, temporariamente, sem a regressão dos sintomas da doença. A questão é o que exatamente será selecionado (Fig. 35).

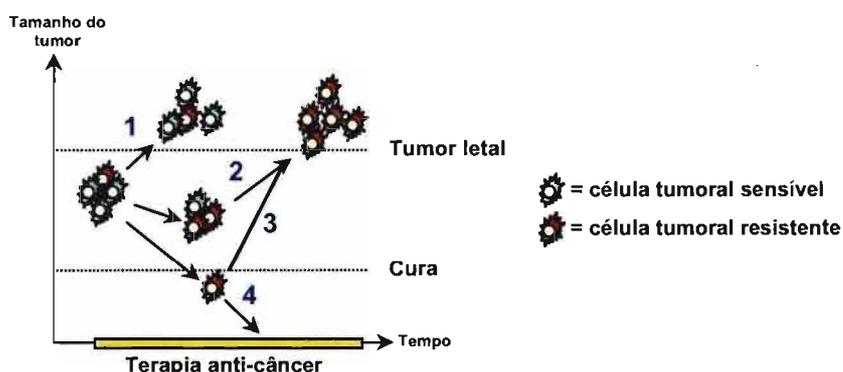


Figura 35: Regressão tumoral e simultânea seleção para resistência em terapias anti-câncer (adaptado de "Blagosklonny, 2004"). 1= Terapia não efetiva: não induz morte celular ou seleção de resistentes. No nosso modelo, os efeitos de FGF1 em células Y1 poderiam exemplificar essa situação (Fig. 3.1). 2 e 3 = Terapias efetivas que induzem morte celular, regressão tumoral e sobrevida, mas permitem a seleção de clones resistentes e agressivos. No nosso modelo, os efeitos de FGF2 em células EJA poderiam exemplificar essa situação (Tabela 10). 4= Combinação efetiva de duas ou mais terapias: indução de grande mortandade celular e regressão tumoral intensa.

Como um exemplo, em certos tipos de cânceres o inibidor da tirosina quinase Bcr-Abl – Gleevec (“Imatinib mesylato”) – seleciona para resistência exatamente por matar células leucêmicas que dependam da expressão de Bcr-Abl. Gleevec seleciona clones resistentes seja pela amplificação de Bcr-Abl ou por outro mecanismo de sobrevivência (*Druker, 2002, Sawyers, 2002*). Outro exemplo ocorre em terapias de tumores de próstata usando anti-andrógenos (*Reese, 2000*). Nestes casos, as terapias selecionam para células hormônio-independentes mais agressivas, resistentes às terapias e originando tumores letais (*Zietman et al., 1996*).

Neste contexto, não é surpreendente que mesmo terapias anti-angiogênicas, se efetivas, selecionem para resistência. Em condições de baixo oxigênio e nutrientes (efeitos de uma terapia anti-angiogênica efetiva), alguns clones reincidentes podem super-expressar a proteína HIF-1 que, inibe a apoptose e induz metástase e proliferação através do controle da expressão de fatores de crescimento/sobrevivência autócrinos e parácrinos como VEGFs, FGFs, matriz metaloproteinase-2, catepsina D, fibronectina 1 e TGF- α (para uma revisão: *Blagosklonny, 2004*).

No caso específico de células tumorais Y1, mostramos que o efeito citotóxico de FGF2 observado em *in vivo* e em cultura não é observado em seus clones selecionados como resistentes Y1-FR3 que apresentam uma capacidade tumorigênica 50% menor em relação às células parentais Y1 e um aumento de 2,5 vezes no tempo de latência (**Tabela 8 e Fig. 31**).

Comportamento semelhante é observado em fibroblastos da linhagem B-61 que induzem 100% (7/7) de formação de tumores em camundongos Balb/c Nude, e em seus derivados não tumorigênicos B61-FR1 selecionados como resistentes aos tratamentos de FGF2 (**Tabela 9**) (embora não tenhamos testado se os clones B61-FRs mantêm o transgene rasV12). Em cultura os clones Y1-FR3 apresentam uma maior dependência de sinais externos e sincronicidade para entrada na fase S, ou seja, exibem um controle da transição G0/G1 \rightarrow S mais próximo ao observado em linhagens normais (**Fig. 28**).

Estes dados evidenciam que o surgimento de resistência à FGF2 nestas linhagens permite a proliferação de células com capacidade tumorigênica e

velocidade de progressão eliminada ou reduzida, ou seja, os efeitos citotóxicos de FGF2 são mais fortes em linhagens tumorais mais agressivas (**Fig. 36**).

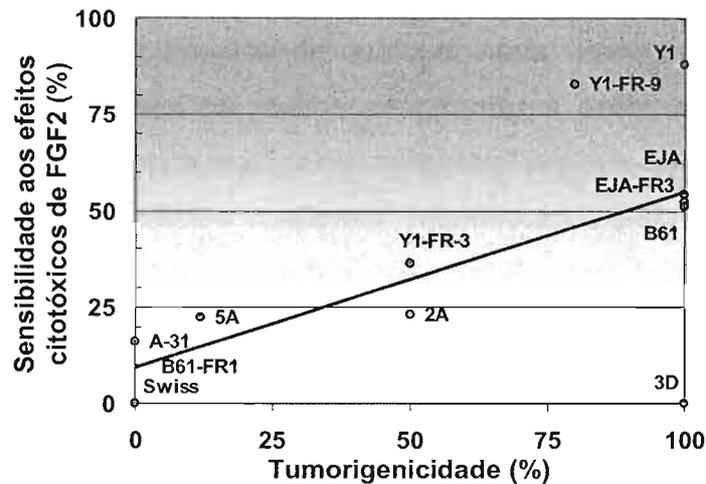


Figura 36: Tumorigenicidade versus sensibilidade celular aos efeitos citotóxicos de FGF2 em diversas linhagens normais (A-31 e Swiss) e tumorais (Y1, B61, EJA, 2A, 3D e 5A) e em seus clones selecionados como resistentes a FGF2 (Y1-FR3, EJA-FR3 e B61-FR1). A tumorigenicidade foi medida pela porcentagem de camundongos Balb/c Nude que desenvolveram tumores e a sensibilidade à FGF2 calculada pela porcentagem de colônias inibidas por FGF2 (1nM, 24h) em cada linhagem em cultura crescendo em meio com soro.

Potencial uso de FGF2 em terapias anti-câncer

A demonstração dos efeitos citotóxicos de FGF2 em células tumorais de camundongo (linhagens Y1 e fibroblastos transformados) em cultura e *in vivo*, além de linhagens tumorais humanas, como células de tumor de mama (MCF-7) (Wang et al., 1998, Fenig et al., 1997) e neuroepiteliomas (SK-N-MC) (Westwood et al., 2002, Smits et al., 2000), podem sugerir o uso de FGF2 como um agente combinado em terapias contra cânceres específicos.

Embora contra-intuitivo, devido aos “efeitos colaterais” de FGF2 (indução de angiogênese e proliferação de certas linhagens, p.ex.) o uso clínico de FGF2 já está sendo estudado em modelos animais e humanos.

Clinicamente FGF2 tem sido testado na proteção contra isquemias (CDI – “chronic ischemic damages”) em tecidos cardíacos justamente por sua

capacidade angiogênica e citoprotetora, garantindo sobrevivência, preservação e funcionalidade do tecido cardíaco, produzindo resultados promissores (*Jiang et al., 2004, Detillieux et al., 2004*). Além disso, em alguns casos a proteção induzida por FGF2 é ausente de qualquer nova vascularização o que dirige a atenção somente para os efeitos citoprotetores deste fator (*Horrigan et al., 1999 e 1996*).

Os maiores “efeitos colaterais” manifestados pelo uso clínico de FGF2 nestes estudos incluem: insuficiência renal demonstrada por proteinúria, hipotensão e alguns efeitos transientes na retina (*Detillieux et al., 2004*).

Complementar, Bailly e colaboradores (*Bailly et al., 2000*) demonstraram que uma única mutação, substituindo a serina 117 por uma alanina no FGF2 humano (S117A) diminui sua capacidade de induzir a proliferação (i.e. não estimula síntese de DNA em fibroblastos NIH-3T3 e em células endoteliais bovinas) sem afetar sua capacidade de diferenciação (em células PC12). Esse mutante não mitogênico de FGF2 (S117A-FGF2) também exibe as mesmas propriedades protetoras no tecido cardíaco com a vantagem da eliminação de alguns dos “efeitos colaterais” de FGF2 (*Jiang et al., 2004*).

Com o avanço da engenharia e biologia molecular e a possibilidade de construção de mutantes de FGF2 associado a sua habilidade de controlar a proliferação de certas linhagens tumorigênicas, acreditamos que o uso controlado destes mutantes poderão originar iniciativas terapêuticas complementares envolvendo a via de ativação deste multi-potente peptídeo e o controle da proliferação de células tumorais. Além disso, o aprofundamento no estudo do mecanismo de resistência (linhagens próximas às linhagens normais) e sensibilidade (linhagens com fenótipo maligno acentuado) pode levar-nos a trilhar caminhos potencialmente muito importantes, dado o grande interesse prático (i.e. estudo do câncer) e teórico (i.e. controle do ciclo celular).

6. Conclusões

1. A linhagem Y1 de células adrenocorticais tumorais nos permitiu demonstrar experimentalmente a existência de duas respostas biológicas antagônicas induzidas por FGF2: a) uma clássica, a resposta mitogênica e b) outra nova e não suspeitada, uma resposta de morte celular. A resposta mitogênica leva à transição $G1 \rightarrow S$, enquanto a resposta de morte impede a replicação normal do DNA, bloqueando a transição $S \rightarrow G2/M$. Mas, a resposta de morte celular só ocorre se os níveis de c-Ki-Ras-GTP, cronicamente muito altos em Y1, forem mantidos. Do contrário, a resposta mitogênica prevalece e o ciclo $G0/G1 \rightarrow S \rightarrow G2/M$ é completado.

2. A resposta de morte celular induzida por FGF2 não é exclusiva da linhagem tumoral Y1, pois também é observada em fibroblastos 3T3 malignamente transformados pelo oncogene H-rasV12. Esta resposta de morte celular, aparentemente específica de células tumorais, não envolve as vias canônicas de apoptose.

3. É possível selecionar clones celulares resistentes a FGF2 a partir das populações de células tumorais Y1 e 3T3-RasV12. Estes clones resistentes a FGF2 mantêm altos níveis constitutivos de Ki-Ras-GTP, mas mostram fenótipo tumorigênico reduzido ou inexistente. O fenótipo resistência a FGF2 aparece espontânea e aleatoriamente na população e está sujeito a uma elevada taxa de reversão se os clones resistentes forem cultivados na ausência de FGF2. Aparentemente, o surgimento destes clones resistentes se deve a mudanças epigenéticas de ocorrência estocástica e alto grau de reversibilidade.

7. Referências

- Aaronson S.A. & Todaro G.J., 1968. Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science* **162**, 1024-1026;
- Abate C., & Curran T., 1990. Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1. *Seminars in Cancer Biology* **1**, 19-26;
- Angel P. & Karin M., 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**, 129-157;
- Angel P., Hattori K. & Karin M., 1988 The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**, 875-885;
- Armelin H.A. & Lotfi C.F.P., 1999. Control of the adrenocortical cell cycle: interaction between FGF2 and ACTH. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 841-843;
- Armelin H.A., 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *PNAS* **70**, 2702-2706;
- Armelin H.A., Lotfi C.F.P. & Lepique A.P. Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical cells., 1996. *End. Res.* **22**, 373-383;
- Aviles R.J., Annex B.H. & Lederman R.J., 2003. Testing clinical therapeutic angiogenesis using basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Br. J. Pharmacol.* **140**, 637-646;
- Bailly K., Soulet F., Leroy D., Amalric F. & Bouche G., 2000. Uncoupling of cell proliferation and differentiation activities of basic fibroblast growth factor. *FASEB* **14**, 333-344;
- Baldin V., Lukas J., Marcote M.J., Pagano M. & Draetta G., 1993 Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* **7(5)**, 812-821;
- Barbacid M., 1987 ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 779-827;
- Bashkin P., Doctrow S., Klagsbrun M., Svahn C.M., Folkman J. & Vlodavsky I., 1989. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial

extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules *Biochemistry* **28**, 1737-1743;

- Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G. & Rifkin D., 1997. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine Rev.* **18**, 26-45;
- Blagosklonny M.V., 2004. Antiangiogenic therapy and tumor progression. *Cancer Cell* **5**, 13-17;
- Bollag G. & McCormick F., 1991. Regulators and effectors of ras proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 601-632;
- Bos J.L., 1990. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689;
- Bossard C., Laureli H., Van den Berghe L., Meunier S., Zanibellato C. & Prats H., 2003. Translokine is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nature Cell Biol.*, **5**, 433-439;
- Boulton T.G., Yancopoulos G.D., Gregory J.S., Slaughter C., Moomaw C., Hsu J. & Cobb M.H., 1990. An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science*, **249**, 64-67;
- Bourchuladze R., Frenguelli B., Blendy J., Cioffi D., Schutz G. & Silva A.J.R., 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**, 59-68;
- Brunet A., Roux D., Lenormand P., Dowd S., Keyse S. & Pouyssegur J., 1999. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.*, **18**, 664-674;
- Cantley L.C., Auger K., Carpenter C.L., Duckworth B., Graziani A., Kapeller R. & Soltoff S., 1991. Oncogenes and signal transduction. *Cell* **64**, 281-302;
- Cappellet D., Oliveira C., Ricol D., Medina S.G.D., Bourdin J., Sastre-Garau X., Chopin D., Thiery J.P. & Radvanyi F., 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat. Genet.* **23**, 18-20;

- Cardone M.H., Roy N., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Franke T.F., Stanbridge E., Frisch S. & Reed J.C., 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318-1321;
- Carpenter C.L., Auger K., Duckworth B., Hou W., Schaffhausen B. & Cantley L.C., 1993. A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 1657-1665;
- Coleman A. B., 2003. Positive and negative regulation of cellular sensitivity to anti-cancer drugs by FGF-2. *Drug Resistance Updates* **6**, 85-94;
- Coleman A.B., Momand J. & Kane S.E., 2000. Basic fibroblast growth factor sensitizes NIH 3T3 cells to apoptosis induced by cisplatin. *Mol. Pharmacol.* **57**, 324-333;
- Colomer R., Aparicio J., Montero S., Guzman C., Larrodera L. & Cortes-Funes H. S., 1997. Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma. *Br. J. Cancer* **76**, 1215-1220;
- Compagni A., Wilgenbus P., Impagnatiello MA., Cotten M. & Christofori G., 2000. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res.* **60**, 7163-7169;
- Conlon I. & Raff M., 1999. Size control in animal development. *Cell* **96**, 235-244;
- Cook S.J., Aziz N. & McMahon M., 1999. The repertoire of fos and jun proteins expressed during the G1 phase of the cell cycle is determined by the duration of mitogen-activated protein kinase activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 330-341;
- Costa E.T., Forti F.L., Rocha K.M., Moraes M.S. & Armelin H.A., 2004. Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. *Endocrine Res.* **30**, 503-509;
- Coumoul X. & Deng C., 2003. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth Defects Res* **69**, 286-304;
- Coutre P, Mologni L., Cleris L., Marchesi E., Buchdunger E., Giardini R., Formelli F., Gambacorti-Passerini C., 1999. In vivo eradication of human

- BCR/ABL-positive leukemia cells with an ABL kinase inhibitor. *J. Nat. Cancer Inst.* **91**, 163-168;
- Chen J.K., Chao H.H. & Yang V.C., 1995. Inhibition of the growth of a human nasopharyngeal carcinoma cell line by bFGF is mediated via FGFR-1. *FASEB J.* **9**, 1211-1219;
 - Chimenov Y. & Kerppola T.K., 2001. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* **6**, 533-542;
 - Chin L., Tam A., Pomerantz J., Wong M., Holash J., Bardeesy N., Shen Q., O'Hagan R., Pantginis J., Zhou H., Horner J.W., Cordon-Cardo C., Yancopoulos G.D. & DePinho R.A., 1999. Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* **400**, 468-472;
 - Chrivia J.C., Kwok R.P., Lamb N., Hagiwara M., Montminy M.R. & Goodman R.H., 1993. *Nature (London)* **365**, 855-859;
 - Datta S.R., Dudek H., Tao X., Masters S., Fu H., Gotoh Y. & Greenberg M.E., 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**, 231-241;
 - Detillieux K.A., Cattini P.A. & Kardami E., 2004. Beyond angiogenesis: the cardioprotective potential of fibroblast growth factor-2. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**, 1044-1052;
 - Dickson C., Creer A. & Fanti V., 2000. Mammary gland oncogenes as indicators of pathways important in mammary gland development. *Oncogene* **19**, 1097-1101;
 - Dobrowolski S., Harter M. & Stacey D.W., 1994. Cellular ras activity is required for passage through multiple points of the G0/G1 phase in BALB/c 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.* **14**, 5441-5449;
 - Dougherty M.K., Muller J., Ritt D.A., Zhou M., Zhou X.Z., Coperland T.D., Conrads T.P., Veenstra T.D., Lu K.P. & Morrison D.K., 2005. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol. Cell* **17**, 215-224;
 - Druker B.J., 2002. Perspectives on the development of a molecularly targeted agent. *Cancer Cell* **1**, 31-36;
 - Efimova T., LaCelle P., Welter J.F., Eckert R.L., 1998. Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1,

- MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 24387-24395;
- Ehmann U.K. & Lett J.T., 1973. Review and evaluation of molecular weight calculations from the sedimentation profiles of irradiated DNA. *Radiat. Res.* **54**(1), 152-162;
 - Esch F., Baird A., Ling N., Ueno N., Hill F., Denoroy L., Klepper R., Gospodarowicz D., Böhlen P. & Guillemin R., 1985. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *PNAS* **82**, 6507-6511;
 - Feng S., Wang F., Matsubara A., Kan M. & McKeehan W.L., 1997. Fibroblast growth factor receptor 2 limits and receptor 1 accelerates tumorigenicity of prostate epithelial cells. *Cancer Res.* **57**(23), 5369-5378;
 - Fenig E., Wieder R., Paglin S., Wang H., Persaud R., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z. & Yahalom J., 1997. Basic fibroblast growth factor confers growth inhibition and mitogen-activated protein kinase activation in human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **3**, 135-142;
 - Florkiewicz R.Z., Majack R.A., Buechler R.D., Florkiewicz E., 1995. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell Physiol.* **162**, 388-399;
 - Foletti A., Ackermann J., Schmidt A., Hummler E. & Beermann F., 2002. Absence of fibroblast growth factor 2 does not prevent tumor formation originating from the RPE. *Oncogene* **21**, 1841-1847;
 - Folkman J. & Shing Y., 1992. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934;
 - Folkman J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182-1186;
 - Forti F.L. & Armelin H. A., 2000. ACTH inhibits a Ras-dependent anti-apoptotic and mitogenic pathway in mouse Y1 adrenocortical cells. *Endocr Res* **26**, 911-914;
 - Forti F.L., Schwindt T.T., Moraes M.S., Eichler C.B. & Armelin H. A., 2002. ACTH promotion of p27(Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical

tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation. *Biochemistry* **6**, 10133-10140;

- Gardner A.M. & Johnson G.L., 1996. Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 14560-14566;
- Ginty D.D. Bonni A. & Greenberg M.E., 1994 Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* **77**, 713-725;
- Gonzalez F.A., Seth A., Raden D.L., Bowman D.S., Fay F.S., Davis R.J., 1993. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J. Cell Biol.* **122**, 1089-1101;
- Gonzalez G. A. & Montminy M. R., 1989, Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59** 675-680;
- Gospodarowicz, 1987. Isolation and characterization of acidic and basic fibroblast growth factor. *Methods in Enzymology*, **147**, 106-119;
- Goto F., Goto K., Weindel K. & Folkman J., 1993. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab. Invest.* **69**, 508-517;
- Hadari Y.R., Gotoh N., Kouhara H., Lax I. & Schlessinger J., 2001. Critical role for the docking-protein FRS2 alpha in FGF receptor-mediated signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8578-8583;
- Hadari Y.R., Kouhara H., Lax I. & Schlessinger J., 1998. Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol. Cell Biol.* **18**, 3966-3973;
- Halaban R., Kwon B.S., Ghosh S., Delli B.P. & Baird A., 1988. bFGF as an autocrine growth factor for human melanomas. *Oncogene Res.* **3**, 177-186;

- Hanahan D., Weinberg R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70;
- Hehr U. & Muenke M., 1999. Craniosynostosis syndromes: from genes to premature fusion of skull bones. *Mol Genet Metab.* **68**, 139-151;
- Herbst R.S. & Shin D.M., 2002. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* **94**, 1593-1611;
- Hill C.S., Wynne J. & Treisman R., 1994. Serum-regulated transcription by serum response factor (SRF): a novel role for the DNA binding domain. *EMBO J.* **13**, 5421-5432;
- Holland E.C., Celestino J., Dai C., Schaefer L., Sawaya R.E. & Fuller G.N., 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature Genet.* **25**, 55-57;
- Horrigan M.C., Maclsaac A.I., Nicolini F.A., Vince D.G., Lee P., Ellis S.G. & Topol E.J., 1996. Reduction in myocardial infarct size by basic fibroblast growth factor after temporary coronary occlusion in a canine model. *Circulation* **94**, 1927-1933;
- Horrigan M.C., Malycky J.L., Ellis S.G., Topol E.J. & Nicolini F.A., 1999. Reduction in myocardial infarct size by basic fibroblast growth factor following coronary occlusion in a canine model. *Int. J. Cardiol.* **68**, Supl 85-91;
- Huang A., Jin H. & Wright J.A., 1994. Aberrant expression of basic fibroblast growth factor in NIH-3T3 cells alters drug resistance and gene amplification potential. *Exp. Cell Res.* **213**, 335-339;
- Jang J., Shin K. & Park J., 2001. Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Res* **61**, 3541-3543;
- Jiang Z-S., Srisakuldee W., Soulet F., Bouche G. & Kardami E., 2004. Non-angiogenic FGF-2 protects the ischemic heart from injury, in the presence or absence of reperfusion. *Cardio. Res.* **62**, 154-166;
- Johnson D.E., Lee P.L., Lu J. & Williams L.T., 1990. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol.* **10**, 4728-4736;

- Johnson R., Spiegelman B., Hanahan D. & Wisdom R., 1996. Cellular transformation and malignancy induced by ras require c-jun. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4504-4511;
- Kandel E.S. & Hay N., 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* **253**, 210-229;
- Kapeller R. & Cantley L.C., 1994. Phosphatidylinositol 3-kinase. *BioEssays* **16**, 565-576;
- Karey K.P. & Sirbasku D.A., 1988. Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 beta-estradiol. *Cancer Res.* **48**, 4083-4092;
- Kazama H. & Yonehara S., 2000. Oncogenic K-Ras and basic fibroblast growth factor prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Cell Biol.* **148**, 557-566;
- Kelly T.J. & Brown G.W., 2000. Regulation of chromosome replication. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 829-880;
- Keresztes M. & Boonstra J., 1999. Import(ance) of growth factors in(to) the nucleus. *J. Cell Biol.* **145**, 421-424;
- Kim MS., Kim C.J., Jung H.S., Seo MR., Juhn YS., Shin H.Y., Ahn H.S., Thiele C.J. & Chi J.G., 2004. Fibroblast growth factor 2 induces differentiation and apoptosis of Askin tumour cells. *J. of Pathology* **202**, 103-112;
- Kimura E. & Armelin H.A., 1988 Role of proto-oncogene c-Ki-ras amplification and overexpression in the malignancy of Y-1 adrenocortical tumor cells. *Braz. J. of Med. Biol. Res.* **21**, 189-201;
- Kimura T., Suzuki H., Ohashi T., Asano K., Kiyota H., Eto Y., 2001. The incidence of thanatophoric dysplasia mutations in FGFR3 gene is higher in low-grade or superficial bladder carcinomas. *Cancer* **92**, 2555-2561;
- Kornmamm M., Ishiwata T., Beger H.G. & Korc M., 1997. Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpressed in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions. *Oncogene* **15**, 1417-1424;

- Kouhara H., Hadari Y.R., Spivak-Kroizman T., Schilling J., Bar-Sagi D., Lax I. & Schlessinger J., 1997. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89**, 693-702;
- Kovary K., Armelin M.C.S. & Armelin H.A., 1989. Ha-Ras-1 oncogene dosage differentially affects Balb/3T3 cells' growth factor requirement and tumorigenicity. *Oncog. Res.* **4**, 55-64;
- Krasilnikov M.A., 2000. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry* **65**, 68-78;
- Krejci P., Bryja V., Pachernik J., Hampl A., Pogue R., Mekikian P. & Wilcox W.R., 2004. FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells *Exp. Cell Res.* **297**, 152-164;
- Kremer N.E., D'arcangelo G., Thomas S.M., DeMarco M., Brugge J.S. & Halegoua S., 1991. Signal transduction by nerve growth factor and fibroblast growth factor in PC12 cells requires a sequence of src and ras actions. *J. Cell Biol.* **115**, 809-819;
- Laham R.J., Sellke F.W., Edelman E.R., Pearlman J.D., Ware J.A., Brown D.L., Gold J.P. & Simons M., 1999. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Circulation* **100**, 1865-1871;
- Lammie G.A. & Peters G., 1991. Chromosome 11q13 abnormalities in human cancer. *Cancer Cells* **3**, 413-420;
- Landschulz W.H., Jonhson P.F. & McKnight S.L., 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764;
- Lax I., Wong A., Lamothe B., Lee A., Frost A. & Hawes J., 2002. The docking protein FRS2alpha controls a MAP kinase-mediated negative feedback mechanism for signaling by FGF receptors. *Mol. Cell* **10**, 709-719;

- Lemmom M.A. & Schlessinger J., 1994 Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization *Trends in Biochem. Sci.* **19**, 459-463;
- Lepique A.P., Forti F.L., Moraes M.S. & Armelin H.A., 2000. Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocr. Res.* **26**, 825-832;
- Lepique A.P., Moraes M.S., Rocha K.M., Eichler C.B., Hajj G.N.M. Schwindt T.T. & Armelin H.A., 2004. c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *J. Mol. Endoc.* **33**, 623-638;
- Liu B., Fang M., Lu Y., Mendelsohn J. & Fan Z., 2001. Fibroblast growth factor and insulin-like growth factor differentially modulate the apoptosis and G1 arrest induced by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* **20**, 1913-1922;
- Liu J.F., Crépin M., Liu JM., barritault D. & Ledoux D., 2002. FGF-2 and TPA induce matrix metalloproteinase-9 secretion in MCF-7 cells through PKC activation of the Ras/ERK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1174-1182;
- Liu J.F., Issad T., Chevet E., Ledoux D., Courty J., Caruelle J.P., Barritault D., Crépin M. & Bertin B., 1998. Fibroblast growth factor-2 has opposite effects on human breast cancer MCF-7 cell growth depending on the activation level of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur. J. Biochem.* **258**, 271-276;
- Lotfi C.F., Costa E.T., Schwindt T.T., Armelin H.A., 2000 Role of ERK/MAP kinase in mitogenic interaction between ACTH and FGF2 in mouse Y1 adrenocortical tumor cells. *End. Res.* **4**, 873-877;
- Lotfi C.F.P. & Armelin H.A., 2001. cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* **168**, 381-389;
- Lotfi C.F.P., Todorovic Z., Armelin H.A. & Schimmer B.P., 1997. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *Journal of Biol. Chem.* **272**, 29886-29891;

- Luria S. E. & Delbruck M., 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**, 491-511;
- MacArthur C.A., Shankar D.B. & Shackleford G.M., 1995. Fgf-8, activated by proviral insertion, cooperates with the Wnt-1 transgene in murine mammary tumorigenesis. *J. Virol.* **69**, 2501-2507;
- Malumbres M., Pellicer A., 1998. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front in Bioscience*, **3**, 887-912;
- Martin R.G. & Ames B.N., 1961. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.* **236**, 1372-1379;
- McIntosh I., Bellus G.A. & Jab E.W., 2000. The pleiotropic effects of fibroblast growth factor receptors in mammalian development. *Cell Struct Funct* **25**, 85-96;
- McLeskey S.W., Ding I.Y.F., Lippman M.E. & Kern F.G., 1994. MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res.* **54**, 523-530;
- Menzel T., Rahman Z., Calleja E., Wilson E.L., Wieder R. & Gabrilove J., 1996. Elevated intracellular level of basic fibroblast growth factor correlates with stage of chronic lymphocytic leukemia and is associated with resistance to fludarabine. *Blood* **3**, 1056-1063;
- Morgan D.O., 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134;
- Morgan D.O., 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261-291;
- Morrison R.S., Yamagushi F., Bruner J.M, Tang M., McKeehan W. & Berger M.S., 1994. Fibroblast growth factor receptor gene expression and immunoreactivity are elevated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **54**, 2794-2799;
- Moscatelli D. & Quarto N., 1989. Transformation of NIH 3T3 cells with basic fibroblast growth factor or the hst/K-fgf oncogene causes downregulation of the fibroblast growth factor receptor: reversal of

- morphological transformation and restoration of receptor number by suramin. *J. of Cell Biol.* **109**, 2519-2527;
- Mulcahy L.S., Smith M.R., Stacey D.W., 1985. Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* **313**, 241-243;
 - Naski M.C., Wang Q., Xu J. & Ornitz D.M., 1996. Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Nat Genet.* **13**, 233-237;
 - Newton A.C., 1995. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 28495-28498;
 - Nguyen M., Watanabe H., Budson A.E., Richie J.P., Hayers D.F. & Folkman J., 1994. Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 356-361;
 - Okasaki K. & Sagata N., 1995. The Mos/MAP kinase pathway stabilizes c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J.* **14**, 5048-5049;
 - Olwin B.B and Hauschka S.D. 1986. Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. *Biochem.* **25**, 3487-3492;
 - Ornitz D.M. & Itoh N., 2001 Fibroblast growth factors. *Genome Biology* **2(3)**, 3005.1-3005.12;
 - Ornitz D.M., 2000. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* **22**, 108-112;
 - Ornitz D.M., Xu J., Colvin J.S., McEwen D.G., MacArthur C.A., Coulier F., Gao G. & Goldfarb M., 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J. Biol Chem.* **271**, 15292-15297;
 - Paris S. & Pouyssegur J., 1991. Mitogenic effects of fibroblast growth factors in cultured fibroblasts. Interaction with the G-protein-mediated signaling pathways. *Ann. NY Acad. Sci.* **638**, 139-148;
 - Passos-Bueno M.R., Wilcox W.R., Jabs E.W., Sertie A.L., Alonso L.G. & Kitoh H., 1999. Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum. Mutat.* **14**, 115-125;

- Peters G., Brookes S., Smith R. & Dickson C., 1983. Tumorigenesis by mouse mammary tumor virus: evidence for a common region for provirus integration in mammary tumors. *Cell* **33**, 369-377;
- Peters G., Brookes S., Smith R., Placzek M. & Dickson C., 1989. The mouse homolog of the hst/k-FGF gene is adjacent to int-2 and is activated by proviral insertion in some virally induced mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5678-5682;
- Powers C.J., McLeske S.W. & Wellstein A., 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *End-Rel. Cancer* **7**, 165-197;
- Pumiglia K.M. & Decker S.J., 1997. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **94**, 448-452;
- Qui M. & Greene S., 1992. PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron*. **9**, 705-717;
- Raucci A., Laplantine E., Mansukhani A. & Basilico C., 2004. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 1747-1756;
- Reese D.M., 2000. Choice of hormonal therapy for prostate cancer. *Lancet*. **355**, 1474-1475;
- Rifkin D.B. & Moscatelli D., 1989. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* 109, 1-6;
- Risau W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674;
- Robinson M.J. & Cobb M.H., 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 180-186;
- Rocha K.M., Forti F.L., Lepique A.P. & Armelin H.A., 2003. Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: roles of ACTH. *Micros. Res. Technique* **61**, 268-274;
- Ryseck R.P. & Bravo R., 1991. -JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* **6**, 533-542;

- Samaniego F., Markhan P.D., Gendelman R., Watanabe Y., Kao V., Kowalski K., Sonnabend J.A., Pintus A., Gallo R.C. & Ensoli B., 1998. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development. *Am. J. of Pathology* **152**, 1433-1443;
- Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis T., 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press;
- Sawyers C.L., 2002. Disabling Abl-perspectives on Abl kinase regulation and cancer therapeutics. *Cancer Cell* **1**, 13-15;
- Schlessinger J., Plotnikov A.N., Ibrahimi O.A., Eliseenkova A.V., Yeh B.K., Yayon A., Linhardt R.J. & Mohammadi M., 2000. *Mol. Cell.* **6**, 743-750;
- Schontal A., Buscher M., Angel P., Rahmsdorf H.J., Ponta H., Hattori K., Chiu R., Karin M. & Herrlich P., 1989 Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Oncogene* **4**, 629-636;
- Schwab M., Alitalo K., Varmus H., Bishop J. & George D., 1983. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature* **303**, 497-501;
- Schwindt T.T., Forti F.L., Juliano M.A., Juliano M. & Armelin H.A., 2003 Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry* **6**, 10133-40;
- Sears R.C. & Nevins J.R., 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J. Biol. Chem.* **277**, 11617-11620;
- Sellke F.W., Laham R.J., Edelman E.R., Pearlman J.D. & Simons M., 1998. Therapeutic angiogenesis with basic fibroblast growth factor: technique and early results. *Ann. Thorac. Surg.* **65**, 1540-1544;
- Shaulian E. & Karin M., 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-2400;

- Sherr C.J. & Roberts J.M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512;
- Sherr C.J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**, 1059-1065;
- Sherr C.J., 2004. Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-246;
- Shih C. & Weinberg R.A., 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* **29**, 161-169;
- Shingu K., Fujimori M., Ito K., Hama Y., Kasuga Y., Kobayashi S., Ito N. & Amano J., 1998. Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor-1 in thyroid diseases: difference between neoplasms and hyperplastic lesions. *Endocr J* **45**, 35-43;
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. et al., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.*, **344**, 783-792;
- Smits V.A.J., Van Peer M.A., Essers M.A.G., Klompmaker R., Rijksen G. & Medema R.H., 2000. Negative growth regulation of SK-N-MC cells by bFGF defines a growth factor-sensitive point in G2. *J. Biol. Chem.* **275**, 19375-19381;
- Sommer A. & Rifkin D.B., 1989. Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *J. Cell. Phys.* **138**, 215-220;
- Song S., Wientjes M.G., Gan Y. & Au J.L.S., 2000. Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **18**, 8658-8663;
- Stewart A.J., Westley B.R. & May F.E.B., 1992. Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen. *Br. J. Cancer* **66**, 640-648;
- Studier F.W., 1965. Sedimentation Studies Of The Size and Shape of DNA. *Mol. Biol.* **11**, 373-390;

- Sturla L., Westwood G., Selby P.J., Lewis I.J. & Burchill S.A., 2000. Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **60**, 6160-6170;
- Takahashi J.A., Fukumoto M., Igarashi K., Oda Y., Kikuchi H. & Hatanaka M., 1992. *J. Neurosurgery* **76**, 792-798;
- Taylor S. J. & Shalloway D., 1996. Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr. Biology* **6**, 1621-1627;
- Thomas S.M., DeMarco M., D'Arcangelo G., Halegoua S. & Brugge J.S., 1992. Ras is essential for nerve growth factor- and phorbol ester-induced tyrosine phosphorylation of MAP kinases. *Cell* **68**, 1031-1040;
- Toker A., 2000. Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol. Pharmacology* **57**, 652-658;
- Touriol C., Roussigne M., Gensac M.C., Prats H., Prats A.C., 2000. Alternative translation initiation of human fibroblast growth factor 2 mRNA controlled by its 3'-untranslated region involves a Poly(A) switch and a translational enhancer. *J. Biol. Chem.* **275**, 19361-19367;
- Vagner S., Touriol C., Galy B., Audigier S., Gensac M.C., Almaic F., Bayard F., Prats H., Prats A.C., 1996. Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J. Cell Biol.* **135**, 1391-1402;
- Van Rhijn B.W., Lurkin I., Radvanyi F., Kirkels W.J., Van der Kwast T.H. & Zwarthoff E.C., 2001. The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate. *Cancer Res.* **61**, 1265-1268;
- Venkataraman G., Shriver Z., Davis J.C. & Sasisekaran R., 1999. Fibroblast growth factors 1 and 2 are distinct in oligomerization in the presence of heparin-like glycosaminoglycans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1892-1897;
- Vlahos C., Matter W., Hui K. & Brown R., 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241-5248;

- Vlodavsky I., Eldor A., Bar-Ner M., Fredman R., Cohen IR & Klagsbrun M., 1988 Heparan sulfate degradation in tumor cell invasion and angiogenesis. *Adv. Exp. Med Biol* **233**, 201-210;
- Wang Y., Spatz M.K., Kannan K., Hayk H., Avivi A., Gorivodsky M., Pines M., Yayon A., Lonai P. & Givol D., 1999. A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4455-4460;
- Wellbrock C., Karasarides M. & Marais R., 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 875-885;
- Westwood G., Dibling B.C., Cuthbert-Heavens D. & Burchill S.A., 2002. Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway. *Oncogene* **21**, 809-824;
- Whitmarsh A.J., Davis R.J., 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J.Mol.Med.* **74**, 589-607;
- Widmann C., Gerwins P., Johnson N.L., Jarpe M.B. & Johnson G.L., 1998. MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2416-2429;
- Williamson A.J.K., Dibling B.C., Boyne J.R., Selby P. & Burchill S.A., 2004. Basic fibroblast growth factor-induced cell death is effected through sustained activation of p38MAPK and up-regulation of the death receptor p75NTR. *J. Biol. Chem.* **279**, 47912-47928;
- Wood K.W., Sarnecki C., Roberts T.M., & Blenis J., 1992. ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* **68**, 1041-1050;
- Wu Q, Liu S., Ye XF., Huang ZW. & Su WJ., 2002. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*, **23**, 1583-1592;
- Wu X., Senechal K., Neshat M., Whang Y. & Sawyers C., 1998. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **95**, 15587-15591;

- Xu H., Lee K.W. & Goldfarb M., 1998. Novel recognition motif on fibroblast growth factor receptor mediates direct association and activation of SH2 adapter proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 17987-17990;
- Yan G., Fukabori Y., McBride G., Nikolaropolous S. & McKeehan W.L., 1993. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol. Cell Biol.* **13(8)**, 4513-4522;
- Yano H., Nakanishi S., Kimura K., Hanai K., Saitoh Y., Fukui Y., Nonomura Y. & Matsuda Y., 1993. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of phosphatidylinositol 3-kinase in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 25846-25856;
- Yao R. & Cooper G.M., 1995. Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**, 2003-2006;
- Yoshimura N., Sano H., Hashiramoto A., Yamada R., Nakajima H., Kondo M. & Oka T., 1998. The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clinical Immunology and Immunopathology* **89**, 28-34;
- Zetterberg A., Engstrom W. & Dafgard E., 1984. The relative effects of different types of growth factors on DNA replication, mitosis, and cellular enlargement. *Cytometry* **5**, 368-375;
- Zhou J. & Serrero G., 1993. Fibroblast growth factor inhibits proliferation of a highly tumorigenic insulin-independent teratoma-derived cell line. *Growth Factors* **9**, 123-131;
- Zietman A.L., Dallow K.C., McManus P.A., Heney N.M. & Shipley W.U., 1996. Time to second prostate-specific antigen failure is a surrogate endpoint for prostate cancer death in a prospective trial of therapy for localized disease. *Urology* **47**, 236-239;