

**LIGAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA ("INSULIN-LIKE
GROWTH FACTORS") DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DE CARCINOMA
EMBRIONÁRIO HUMANO EXTRAGONADAL (MEDIASTINAL) TERA-2**

por

James Freitas Fleck

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Curso de Pós-Graduação em Medicina - Pneumologia**

1993

MED
T
QZ310 F5931 1993

05344425

[0377392] Fleck, James Freitas. Ligação dos
fatores de crescimento semelhantes à insulina
durante a diferenciação das células de
carcinoma embrionário humano extragonadal
(mediastinal) Tera-2. 1993. 94 f. : il.

**LIGAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA ("INSULIN-LIKE
GROWTH FACTORS") DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DE CARCINOMA
EMBRIONÁRIO HUMANO EXTRAGONADAL (MEDIASTINAL) TERA-2**

Tese de Doutorado

1993

James Freitas Fleck

Orientador: Dr. João Carlos Prolla

SUMÁRIO

As células de carcinoma embrionário humano Tera-2 sofrem diferenciação quando expostas à 2.1 mM alfa-difluorometilornitina (DFMO). As células diferenciadas ligam 2-3 vezes mais [125 I] - IGF-II do que as células não-diferenciadas. A ligação de IGF-II foi consideravelmente maior do que de IGF-I tanto em células Tera-2 diferenciadas quanto não-diferenciadas.

Análise de ligação competitiva demonstrou que a ligação de [125 I] - IGF-II foi efetivamente bloqueada por IGF-II não-marcado, mas não por IGF-I não-marcado, enquanto que a ligação de [125 I] - IGF-I foi bloqueada tanto por IGF-I como por IGF-II não-marcados. As células Tera-2 indiferenciadas exibem um modelo de sítio único de ligação tanto para IGF-I ($K_D = 1.21$ nM, 7.0×10^3 sítios/célula) quanto para IGF-II ($K_D = 8.27$ nM, 3.4×10^5 sítios/célula). As células Tera-2 diferenciadas exibem um modelo de sítio único de ligação para IGF-I ($K_D = 1.03$ nM, 6.7×10^3 sítios/célula) e um modelo de dois sítios de ligação para IGF-II. Células Tera-2 diferenciadas exibem um sítio de ligação de alta afinidade-baixa capacidade ($K_{DH} = 0.31$ nM, 2.2×10^5 sítios/célula) e um sítio de ligação de baixa afinidade-alta capacidade ($K_{DH} = 15.1$ nM, 1.6×10^7 sítios/célula) para IGF-II.

Em experimentos de reação de afinidade cruzada [125 I] - IGF-I ligou-se quase que exclusivamente ao receptor do tipo I (bandas de 130 kDa e 260 kDa), enquanto que [125 I] - IGF-II ligou-se ao receptor tipo II (banda de 250 kDa) ou a uma variedade de proteínas de ligação com baixos pesos moleculares (bandas de 43 kDa, 70 kDa, 95 kDa e 130 kDa). IGF-II não-marcada preveniu reação cruzada de [125 I] - IGF-II a todas as proteínas de ligação, porém, o mesmo não aconteceu com IGF-I, sugerindo a presença de proteínas de ligação específica para IGF-II.

O número aumentado de sítios de ligação específicos para IGF-II observado após diferenciação induzida por DFMO em células de carcinoma embrionário humano Tera-2 ocorreu nos sítios de ligação de baixa afinidade. Esta mudança quantitativa pode representar um aumento no número das proteínas de ligação específicas para IGF-II.

Uma diminuição significativa nos efeitos estimulatórios de IGF-II na captação de timidina- 3 H foi observado após diferenciação induzida por DFMO em células de carcinoma embrionário humano Tera-2. Estes efeitos podem ser explicados pelo número aumentado de

proteínas de ligação observado após a diferenciação, que especificamente ligam-se à IGF-II, podendo funcionar como um "sink" fisiológico para o hormônio, diminuindo sua interação com o receptor efetivo para IGF tipo II efetivo.

SUMMARY

Tera-2 human embryonal carcinoma cells undergo differentiation when exposed to 2.1nM alpha-difluoromethylornithine. Differentiated Tera-2 cells bound 2-3 fold more [125 I] - IGF-II than undifferentiated cells. The binding of IGF-II was considerably greater than IGF-I in both undifferentiated and differentiated Tera-2 cells.

Competitive binding analysis demonstrated that [125 I] - IGF-II binding was effectively blocked by unlabeled IGF-II but not by unlabeled IGF-I, while [125 I] - IGF-I binding was blocked by either unlabeled IGF-I or unlabeled IGF-II. Undifferentiated Tera-2 cells exhibited a single-site binding model for either IGF-I ($K_D = 1.21\text{nM}$, 7.0×10^3 sites/cell) or IGF-II ($K_D = 8.27\text{nM}$, 3.4×10^5 sites/cell). Differentiated Tera-2 cells exhibited a one-site binding model for IGF-I ($K_D = 1.03\text{nM}$, 6.7×10^3 sites/cell) and a two-site binding model for IGF-II. Differentiated Tera-2 cells exhibited a high affinity-low capacity binding site ($K_{DH} = 0.31\text{nM}$, 2.2×10^5 sites/cell) and a low affinity-high capacity binding site ($K_{DH} = 15.1\text{nM}$, 1.6×10^7 sites/cell) for IGF-II.

In affinity cross-linking experiments [125 I] - IGF-I bound almost exclusively to the type I receptor (130 kDa and 260 kDa bands), whereas [125 I] - IGF-II bound either to the type II receptor (250 kDa band) or to a variety of binding proteins with lower molecular weights (43 kDa, 70 kDa, 95 kDa and 130 kDa bands). Unlabeled IGF-II but not unlabeled IGF-I prevent cross-linking of [125 I] - IGF-II to all the binding proteins suggesting the presence of IGF-II specific binding proteins.

The observed increased number of specific binding sites for IGF-II following DFMO-induced differentiation of Tera-2 human embryonal carcinoma cells occurred in the low affinity binding sites. This quantitative change might represent an increase in the number of specific IGF-II binding proteins.

A significant decrease in the stimulatory effects of IGF-II on the [³H]-thymidine uptake was observed after DFMO-induced differentiation of Tera-2 human embryonal carcinoma cells. These effects could be explained by the increased number of binding proteins observed after differentiation, which specifically binding IGF-II might function as a physiological "sink" for the hormone, decreasing its interaction with the effective type II IGF receptor.

Toda a vez que minha filha de 6 anos de idade me perguntava porquê passava tantas horas neste manuscrito, eu respondia: "Papai está tentando resolver uma quebra-cabeça."

A última vez que lhe dei a mesma resposta, eu a escutei resmungar: "Certo. Talvez ele esteja escrevendo sobre Alice no País da Maravilhas."

Eu tenho que admitir que ela estava inteiramente correta. Muitas vezes eu senti que este trabalho era um sonho implausível.

Minha doce e querida Stefania, Alice no País da Maravilhas é inteiramente dedicado para ti, e para a adorável pessoa que você chama de mãe.

AGRADECIMENTOS

Eu sou muito grato as pessoas que com sua ajuda precisa e eficiente contribuíram para esta tese.

Dr. João Carlos Prolla, amigo e orientador. Caro Prolla, trabalhar contigo tem sido um prazer e uma honra para mim. Obrigado por ter acreditado e estimulado este projeto. Conviver com tua inteligência representa um estímulo permanente ao crescimento intelectual.

Dr. George Sledge, não apenas um conselheiro, mas também um exemplo de médico e cientista.

Dr. W. Y. Hudak da Merrel Dow Pharmaceuticals (Cincinnati, OH, USA), que forneceu a alfa-difluorometilornitina (DFMO).

Dr. K. S. Hirsch da Eli Lilly Company, que forneceu os compostos recombinantes humanos IGF-I, IGF-II, [¹²⁵I] - IGF-I e [¹²⁵I] - IGF-II.

Dr. P. W. Andrews do Instituto Wistar (Philadelphia, PA, USA), que me ajudou na obtenção dos anticorpos monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81.

Joanne Dunn, Laura Nebb, Nancy Stamm e Julie Falcone, que me proveram de excelente assistência técnica.

William e June Shassere, um casal maravilhoso que se tornou minha família americana. Queridos Bill e June, eu nunca os esquecerei.

Venicio, Eloha e Jane Fleck, meus amados pais e irmã. Nada teria sido possível sem seu encorajamento e apoio emocional. Obrigado à Deus por me ter feito parte desta família.

LISTA DE CONTEÚDOS

	Página
Lista de Figuras	10
Lista de Tabelas	12
Capítulo I: INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	13
Fatores de Crescimento, Oncogenes e Proliferação Celular	14
Regulação Multifuncional da Atividade Celular	20
Regulação de Fatores de Crescimento da Célula Germinativa Normal	
Diferenciação e Função	22
Fatores de Crescimento e a Diferenciação dos Tumores de Células Germinativas	27
O Modelo de Diferenciação Tera-2 e a Expressão de IGFs	36
Capítulo II: METODOLOGIA	38
Materiais	39
Células	39
Modelo de Diferenciação	40
A alfa-difluorometilornitina (DFMO) e o Metabolismo das Poliaminas	40
Os Anticorpos Monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81	40
Análise de Imunofluorescência Indireta	44
Ensaio de Ligação	44
Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-II no Tempo	45
Análise de Saturação	45
Ensaio de Ligação Competitiva	45
Efeito da Lavagem Ácida na Ligação de IGFs	46
Reação de Afinidade Cruzada	46
Ensaio de Captação de Timidina-[³ H]	47
Estatística (Lundon Software)	47
Número de Sítios de Ligação/Célula	49
Conversão de Unidades de Concentração	50

Expressão da Ligação de IGF em moles/mg de Proteína	50
Capítulo III: RESULTADOS	52
O Modelo de Diferenciação	53
Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-II no Tempo	56
Análise de Saturação de IGF-I	57
Análise de Saturação de IGF-II	60
Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-I à	63
Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Indiferenciadas	
Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-I à	64
Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Diferenciadas	
Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-II à	65
Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Indiferenciadas	
Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-II à	66
Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Diferenciadas	
Efeitos da Lavagem Ácida na Ligação de IGFs	67
Reação de Afinidade Cruzada	69
Captação de Timidina-[³ H]	71
Capítulo IV: DISCUSSÃO	73
Capítulo V: SUMÁRIO E CONCLUSÕES	79
Sumário	79
Conclusões	23
Referências	83

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1.1. O Modelo de Competência-Progressão	19
1.2. Relação entre Embriões Normais e "Stem Cells" de Teratocarcinoma	28
2.1. Rotas Metabólicas Relevantes na Seleção Híbrida em Meios contendo Hipoxantina, Aminopterina e Timidina (meio HAT)	42
2.2. Produção de Híbridomas	43
3.1. Morfologia das Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 em ambos os Estágios de Diferenciação	54
3.2. Análise de Citometria de Fluxo com Iodeto de Propidium (IP) das Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Diferenciadas e Indiferenciadas	55
3.3. Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-II no Tempo	57
3.4. Curva de Saturação de IGF-I em Células Tera-2 Indiferenciadas	59
3.5. Curva de Saturação de IGF-I em Células Tera-2 Diferenciadas	60
3.6. Curva de Saturação de IGF-II em Células Tera-2 Indiferenciadas	62
3.7. Curva de Saturação de IGF-II em Células Tera-2 Diferenciadas	63
3.8. Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-I à Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Indiferenciadas	64
3.9. Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-I à Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Diferenciadas	65
3.10. Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-II à Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Indiferenciadas	66
3.11. Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-II à Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Diferenciadas	67
3.12. Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-I e [¹²⁵ I] - IGF-II - Ensaio Competitivo de Ponto Único	68
3.13. Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵ I] - IGF-I e [¹²⁵ I] - IGF-II após Lavagem Ácida - Ensaio Competitivo de Ponto Único	69

- 3.14. Ligação Química Cruzada de [125 I] - IGF-I e [125 I] - IGF-II para Células Tera-2 Diferenciadas e Indiferenciadas 70
- 3.15. Efeitos de IGFs na Captação de Timidina- 3 H por Células de Carcinoma Embrionário Humano Tera-2 Diferenciadas e Indiferenciadas 72

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
3.1.	Expressão de Antígenos de Diferenciação de Superfície Celular usando os Anticorpos Monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81	56
3.2.	Análise de Saturação de IGF-I em Células de Carcinoma Embrionário Humano Tera-2 Indiferenciadas	58
3.3.	Análise de Saturação de IGF-I em Células de Carcinoma Embrionário Humano Tera-2 Diferenciadas	59
3.4.	Análise de Saturação de IGF-II em Células de Carcinoma Embrionário Humano Tera-2 Indiferenciadas	61
3.5.	Análise de Saturação de IGF-II em Células de Carcinoma Embrionário Humano Tera-2 Diferenciadas	62

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Fatores de Crescimento, Oncogenes e Proliferação Celular

Os fatores de crescimento (FC) são polipeptídeos que regulam a proliferação celular, bem como outras funções, como deposição e resolução de proteínas da matriz extracelular, manutenção da viabilidade celular, diferenciação celular, quimiotaxia, ativação de células da resposta inflamatória e reparo tecidual (1). Os FC também estão implicados na patogênese de determinadas doenças. A secreção anormal de FC resulta em doenças caracterizadas por resposta celular proliferativa ou por fibrose (2). A expressão aumentada de FC pode estar envolvida numa variedade de doenças, incluindo a arteriosclerose, a fibrose pulmonar, a mielofibrose e as neoplasias (3).

Os FC atuam ligando-se à receptores específicos de alta afinidade, localizados na membrana celular. Estes receptores são ubíquos, e a maior parte das células do organismo possuem receptores para mais de um FC (4-6). Os FC estão presentes em vários tecidos adultos e embrionários, e podem ser secretados por células em cultura (6). Células não-transformadas freqüentemente necessitam de múltiplos FC para proliferarem (8-12). A exposição de uma célula a um determinado FC pode baixar o limiar para mitogenicidade de um segundo FC (3). Fibroblastos tratados temporariamente com PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) são induzidos a um estado denominado "competência", através do qual tornam-se responsivos a outros FC. Em células não-transformadas, supõe-se que a ampla distribuição dos FC, a especificidade variável para cada tipo celular e a necessidade de múltiplos FC para estimulação de tipos celulares específicos, proporciona a regulação da taxa relativa de proliferação necessária para o crescimento celular coordenado na formação tecidual durante a embriogênese e na manutenção e reparo teciduais da fase adulta (2).

Recentemente, muitos estudos tem sido feitos no sentido de avaliar os possíveis mecanismos pelos quais FC estariam envolvidos na transformação neoplásica. Estudos demonstram uma menor necessidade de nutrientes para o crescimento de células neoplásicas transformadas (15-17). Com o surgimento da técnica de cultura celular desprovida de soro e a disponibilidade de FC purificados, a proliferação independente de soro de células transformadas pode ser entendida como uma diminuição ou ausência na necessidade de FC específicos (18,19).

Esta diminuição da necessidade de FC específicos pode ser mediado através da ativação da síntese de FC autólogos (ativação autócrina) ou pela utilização de um pós-receptor que não necessite de FC específicos (2).

Hipóteses sobre o papel do modelo autócrino em células neoplásicas têm sido propostas para vários tumores (20,22). O teste do modelo autócrino em alguns destes sistemas tem levado a resultados interessantes. Utilizando-se células de osteossarcoma OS U-2 foi demonstrado que as mesmas eram capazes de produzir e expressar receptores para PDGF, bem como ocorria inibição do crescimento tumoral mediante exposição à anticorpos policlonais anti-PDGF (23). O modelo autócrino é útil para explicar o crescimento celular em ágar, a relativa independência de FC verificada em fibroblastos transformados, vários passos da transformação promovida por vírus em sarcoma símio, a independência de FC em células de osteossarcoma e até mesmo o comportamento pseudo maligno do trofoblasto placentário (24).

Outro mecanismo, envolvendo o modelo parácrino, pode ser a explicação de como a produção de FC interfere no desenvolvimento do câncer. Células tumorais podem produzir FC que estimulem células estromais (vasculares e fibroblastos) a proliferarem, elemento capital para o crescimento tumoral. De outro modo, as células estromais podem produzir FC que estimulem as células tumorais. Tal situação onde componentes do tumor (neoplásico e estromal) estimulam-se reciprocamente pode explicar porquê não é possível fazer-se crescer certas linhagens de carcinoma em cultura. Através do modelo de regulação parácrina é possível afirmar que as células epiteliais transformadas são dependentes de fatores produzidos pelas células estromais não-imortalizadas e não-transformadas encontradas no tumor, e que são incapazes de sobreviver em culturas a longo prazo (2).

As relações entre FC e câncer foram recentemente melhor caracterizadas por trabalhos que mostraram a ligação entre oncogenes e FC. Os FC aumentam a transcrição de determinados proto-oncogenes (myc e fos) (25-28), que podem regular a transcrição de outros genes implicados na proliferação celular. A interação entre FC e oncogenes têm também implicações nos conceitos de "competência" e "progressão". STERN e ROBERTS (29) mostraram que células transfectadas com o oncogene myc eram tornadas mais sensíveis a um determinado FC (EGF; Epithelial Growth Factor) do que a outro (PDGF) sob condições independentes de ancoragem. A responsividade

aumentada de células transfectadas pelo oncogene myc a um FC específico pode ser importante para as interações entre fatores de competência (FCOMP) e fatores de progressão (FPROG), em relação à estimulação da síntese de DNA. A adição seqüencial ou simultânea de FCOMP (como PDGF) e FPROG (como EGF) a um meio contendo células BALB/c 3T3 promove saída da fase Go e deslocamento no sentido da fase S (30). Pelo fato dos FPROG serem desprovidos de efeito se adicionados antes dos FCOMP, a exposição aos FCOMP pode tornar as células responsivas aos FPROG. Os efeitos dos FCOMP podem ser primariamente mediados através da regulação da produção do mRNA do oncogene myc, pois a quantidade de mRNA de myc é muito aumentada após a adição de PDGF. Da mesma forma, a indução na expressão do oncogene myc transfectado ou a micro injeção da proteína codificada por myc é suficiente para induzir competência em uma fração substancial das células tratadas. Estes resultados mostram que a maior sensibilidade à EGF pode ser uma das muitas consequências decorrentes da expressão aumentada de myc por células competentes. Estes resultados implicam em que a sensibilidade aumentada à EGF possa ser uma das consequências da expressão aumentada de myc em uma célula competente. Isto pode explicar a maior responsividade de células transfectadas por myc à EGF do que à PDGF, fato observado em culturas em ágar. STERN e ROBERTS (29) também mostraram que células transfectadas por ras aumentavam sua produção de FC (EGF e TGF-beta; Transforming Growth Factor-beta). Os autores sugeriram um modelo de cooperação entre oncogenes myc e ras na transformação celular. A transformação celular pelo oncogene ras promove a produção de FC (EGF e TGF-beta), o que explica a não-responsividade dessas células ao efeito estimulatório de fatores exógenos e demonstra um papel fundamental da estimulação autócrina na transformação destas células. Em contraste, a secreção de EGF e TGF-beta por células transfectadas por myc não foi significativamente elevada em relação às células-controle normais. Estes resultados sugerem que a estimulação autócrina é muito menos importante na transformação por myc do que por ras. Entretanto, o oncogene myc torna as células mais sensíveis aos efeitos dos FC. Levando-se em conta que a transformação pelo oncogene ras induz as células a secretarem FC e o oncogene myc as torna sensíveis aos mesmos, a cooperação entre myc e ras pode resultar, em parte, da produção de FC, induzida por ras, associada ao aumento na responsividade a estes fatores, induzida por

myc. De forma mais simples, oncogenes como myc podem amplificar os efeitos de circuitos autócrinos induzidos por oncogenes tipo ras (29).

Existem outras evidências da relação entre oncogenes e FC. O proto-oncogene c-sis codifica a cadeia beta de PDGF (31,32), c-erbB codifica o receptor de EGF (33), o produto do oncogene c-fos é muito similar ao receptor CSF-1 (34) e a proteína do oncogene p21ras está envolvida na transdução do sinal do FC, podendo ser um passo intermediário obrigatório nesta rota (35). Estes são apenas alguns exemplos de um grande número de evidências sugestivas de que muitos produtos oncogênicos estão envolvidos no mecanismo de resposta do receptor do FC que leva à transformação maligna.

Um dos maiores desafios em biologia molecular é a identificação da seqüência de eventos ocorrida entre a ligação do FC no receptor de superfície e a iniciação da síntese do DNA. O mecanismo que comunica o sinal do FC ao núcleo inclui os receptores para FC, seus substratos, determinadas enzimas-chave (incluindo lipases e quinases), proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição, proteínas ligantes do DNA e um complexo de enzimas para a replicação do mesmo (2). Como mostra o diagrama da Figura 1.1, o primeiro passo é a ligação do FC à seu receptor de superfície celular específico. Este, então, sofre uma transformação alostérica, uma redistribuição na membrana celular ou associa-se com outras proteínas de membrana (2).

O receptor para EGF é o melhor compreendido, até o presente momento, e serve como modelo para outros receptores de FC. Sabe-se que este receptor exibe um sítio extracelular de ligação para EGF ou TGF-alfa (Transforming Growth Factor-alfa), uma região transmembrana e um sítio intracelular voltado para o citoplasma que exibe atividade tirosina-quinase e sítios de ligação para substratos da fosforilação do ATP (36). Na presença de EGF, a densidade do receptor de superfície celular diminui à medida que o complexo FC-receptor é internalizado. Este fenômeno é denominado intra-regulação (37). O EGF e TGF-alfa não apenas reconhecem o mesmo receptor como também são igualmente efetivos em uma relação mol- por-mol. O EGF pode ser a forma adulta do fator de crescimento TGF-alfa embrionário (38,39). Como se sabe, as células tumorais sintetizam TGF-alfa, ao invés de EGF.

Algumas vezes, a ativação do receptor pode ocorrer na ausência de FC. O produto do oncogene erbB é homólogo a uma determinada porção do receptor para EGF no qual o sítio de

ligação tenha sido perdido, sugerindo uma forma de ativação oncogênica na qual a proteína codificada por erbB atue para liberar um sinal mitogênico, mesmo na ausência do FC (EGF) (33). Estudos recentes tem mostrado que a proteína p21ras, produto do oncogene ras, pode estar envolvida na transdução do sinal dos FC (35). Utilizando-se anticorpos monoclonais contra p21, ocorre bloqueio da estimulação da síntese do DNA mediada por EGF ou insulina, mostrando que a proteína p21ras é um intermediário obrigatório na transdução do estímulo dos FC (35). Isto também sugere um mecanismo para a transformação neoplásica, através da ativação de ras, e o estímulo proliferativo pós-receptor continuado através da proteína p21ras (2).

De acordo com o modelo de competência-progressão idealizado por PLEDGER (8,9), certos produtos de oncogenes podem estar envolvidos na competência (myc, fos, sis, myb, Ela) e outros na progressão (ras, raf/mil, Blym). Como mostrado na Figura 1.1, PDGF induz o estado de competência através do incremento na expressão dos oncogenes c-myc e c-fos. Ao tratar-se fibroblastos com PDGF, obtém-se um aumento de 40 vezes na quantidade de mRNA de c-myc dentro de 2 horas (25), e um aumento similar no mRNA de c-fos num período de 45 minutos (26-28). Os produtos de c-myc e c-fos são presumivelmente proteínas ligantes do DNA, encontradas principalmente no núcleo (40-44), podendo estar envolvidas na ativação pleiotrópica dos genes responsáveis pela regulação do crescimento. Assim, PDGF induz a um estado de "competência" podendo responder a um segundo sinal, que parte da estimulação celular por fatores de progressão como os fatores de crescimento insulinoídes (IGF; Insulin-like Growth Factor) ou EGF (fatores de progressão). Um interessante modelo de mitogênese indireta é utilizado para ilustrar a estimulação por TGF-beta em células de origem mesenquimal. O TGF-beta atua como um mitógeno indireto, através da indução da produção de FC endógenos. Foi demonstrado que o tratamento de culturas de células AKR-2B em repouso com TGF-beta resultava na indução precoce da produção de mRNA do oncogene c-sis (45). O aumento no mRNA de c-sis é seguido por uma elevação correspondente de uma proteína semelhante ao PDGF, isolada do meio de cultura. Somado a isto, os genes reguladores de PDGF (c-fos, c-myc) são estimulados por TGF-beta, porém a detecção do mRNA de c-fos e c-myc ocorre mais tardiamente quando comparada ao estímulo direto por PDGF (46). Estes resultados sugerem que a mitogenicidade de TGF-beta é mediada pela

indução de c-sis e de PDGF. Subseqüentemente ocorre estimulação autócrina de c-fos e c-myc, de outros oncogenes induzidos por PDGF e da síntese de DNA.

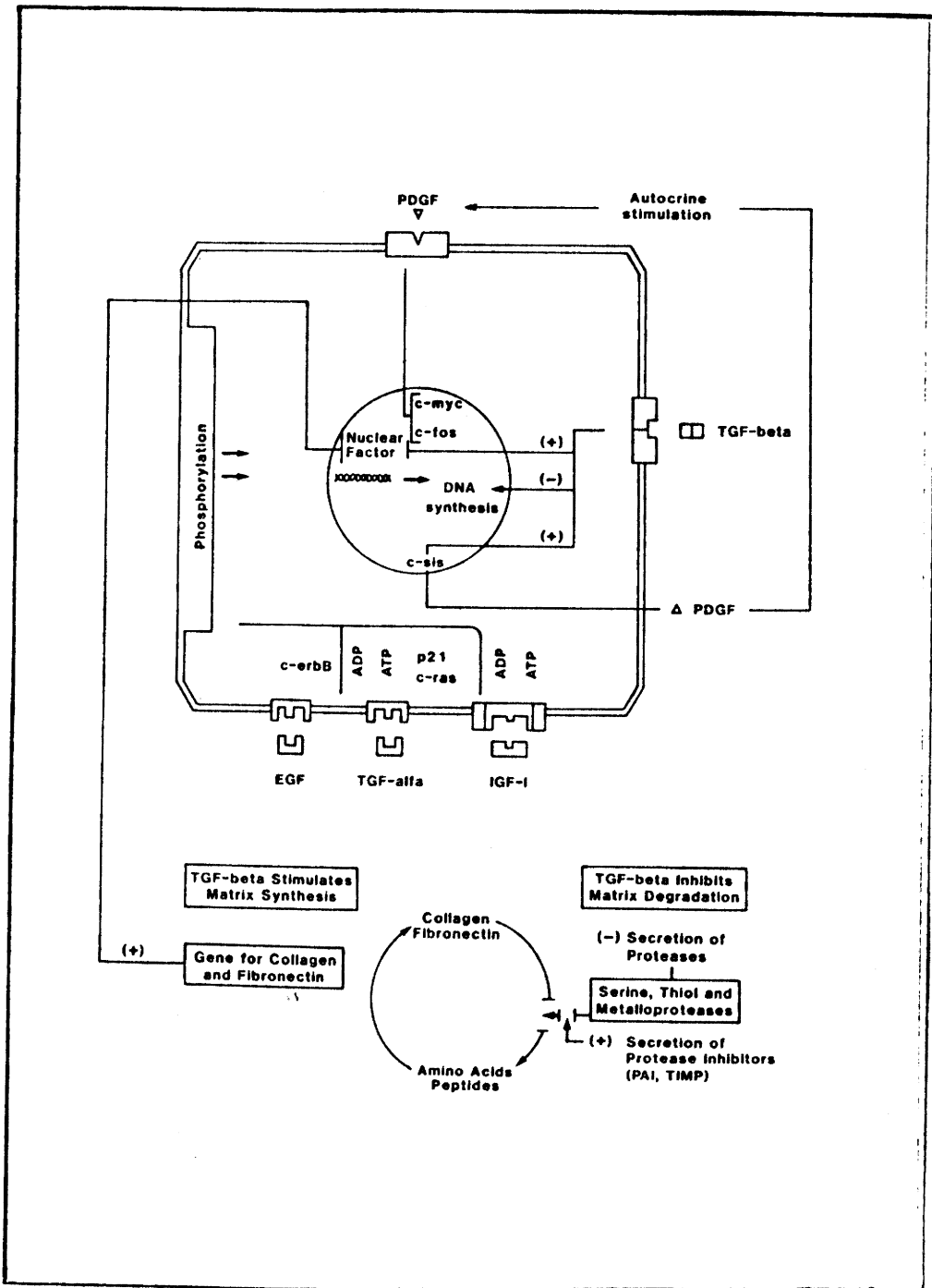


Figura 1.1. O Modelo Progressão-Competência.

A Regulação Multifuncional da Atividade Celular

O termo "multifuncional" implica que certos fatores de crescimento podem tanto estimular a proliferação e crescimento celulares como inibir estes efeitos, ou serem dotados de inúmeras funções não necessariamente relacionadas à proliferação. O FC melhor estudado no que diz respeito a regulação da atividade celular é o TGF-beta (47,48).

Recentemente, duas formas de TGF-beta foram descritas [TGF-beta-1 (Transforming Growth Factor-beta-1) e TGF-beta-2 (Transforming Growth Factor-beta-2)], mas na maioria dos trabalhos tais formas são funcionalmente indistintas (49). Entretanto, estudos tem indicado que podem existir dois receptores separados para TGF-beta-1 e TGF-beta-2, alguns dos quais com reação cruzada (49). Ambas as formas de TGF-beta pertencem a uma grande família de genes, cujos membros são dotados de funções regulatórias. Esta família inclui as inibinas e as ativinas, a substância inibitória mulleriana e o complexo gênico decapentaplégico (DPP-C) da *Drosophila*.

Inibinas e ativinas são polipeptídeos que controlam homeostaticamente a expressão de diferentes funções no eixo hipófise-ovário, em particular a expressão e liberação do FSH (Follicular Stimulating Hormone) hipofisário e a acumulação de estrógenos nas células da granulosa. Inibinas são encontradas em fluidos ovarianos e testiculares, e caracterizadas por sua habilidade em suprimir a produção de FSH. Ativinas, isoladas das mesmas fontes que as inibinas, tem função oposta: atuam principalmente estimulando seletivamente a produção de FSH. As ativinas também são chamadas proteínas liberadoras de FSH. Ao contrário do LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone), as ativinas não atuam como desencadeadoras imediatas da liberação de FSH, mas induzem produção sustentada deste hormônio por longos períodos (50,51,52,53). TGF-beta mimetiza a ação das ativinas na células hipofisárias, porém inibinas ou ativinas não são capazes de se ligar aos receptores para TGF-beta.

A família a qual pertence TGF-beta inclui também a MIS (Mullerian Inhibitory Substance), uma proteína encontrada quase exclusivamente em testículos de mamíferos (54). Ela promove regressão dos ductos mullerianos durante o desenvolvimento do trato reprodutivo de embriões masculinos, ação que o TGF-beta não consegue mimetizar.

Forte evidência do interrelacionamento da família TGF-beta e o processo de desenvolvimento é a transcrição do complexo decapentaplégico (DPP-C) da *Drosophila* (55). A transcrição do DPP-C participa de eventos críticos na formação do inseto, como a especificação dorsoventral durante a embriogênese e a morfogênese dos discos imaginais na larva. O produto da transcrição do DPP-C exibe 36% de identidade com o TGF-beta humano, e atua como fator autócrino ou parácrino na *Drosophila*.

Funcionalmente, os componentes da família de polipeptídeos relacionados à TGF-beta possuem em comum a capacidade de controlar o processo de desenvolvimento tecidual. O TGF-beta foi primeiramente caracterizado por sua habilidade em alterar a taxa de proliferação de vários tipos celulares, atuando como inibidor do crescimento na maioria dos casos (56-59). Entretanto, TGF-beta-1 e TGF-beta-2 são hoje reconhecidos como potentes reguladores da adipogênese (60), condrogênese (61), miogênese (62) e da diferenciação epitelial (63). O TGF-beta inibe a expressão de fenótipos celulares diferenciados durante a adipogênese e miogênese, atuando antes da expressão dos genes específicos para os tecidos adiposo e muscular. Sabe-se porém, que há um determinado momento nos programas de diferenciação adipogênica e miogênica a partir do qual a célula torna-se refratária ao efeito inibitório do TGF-beta. Os efeitos de TGF-beta em pré-adipócitos e mioblastos envolvem pouca ou nenhuma modificação nas taxas de replicação do DNA e de proliferação celular.

Mais recentemente, o papel importante de TGF-beta em incrementar a formação da matriz extracelular (MEx) tem sido usado para explicar seus efeitos durante a embriogênese e no reparo tecidual. O TGF-beta é um potente quimiotático para fibroblastos (64). Como aparece na Figura 1.1, TGF-beta estimula a formação da MEx e inibe sua degradação. Ainda mais, estimula a formação de colágeno e fibronectina por fibroblastos humanos (65), e também eleva os níveis de mRNA para o colágeno (I, III e V) e fibronectina em células renais de ratos (47). Estes efeitos resultam da estimulação por TGF-beta dos genes promotores da formação do colágeno e da fibronectina (47). O aumento na atividade promotora ocorre através de um sítio de ligação para o fator nuclear I (conhecido também como fator de transcrição CTF), que é uma proteína ligante do DNA ativadora da transcrição de genes eucarióticos (66). O TGF-beta também inibe a degradação de proteínas recém-formadas da MEx. Isto ocorre por dois mecanismos distintos: pelo aumento

na produção de formatina associado à secreção de inibidores das proteases ou pela diminuição na secreção das próprias proteases. Dois tipos de inibidores das proteases foram descritos: o PAI (Plasminogen Activator Inhibitor) e o TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) (68). Ambos tem sua síntese e secreção aumentadas por TGF-beta.

Alguns dos efeitos de TGF-beta na matriz extracelular são indiretos, mediados por uma célula intermediária como o macrófago. Evidências da atividade de TGF-beta nestas células são vistos através da demonstração de seu papel quimiotático para monócitos (69). O TGF-beta eleva nestas células os níveis de mRNA para mitógenos de fibroblastos, como a interleucina I (69), conseqüentemente, aumentando ainda mais sua própria secreção. Todas estas funções são importantes, na tentativa de elucidar questões como o processo da resposta inflamatória, reparo tecidual e controle da embriogênese (70).

Até o presente momento, muito pouco é conhecido a respeito do papel fisiológico intrínseco de TGF-beta como mediador endógeno da função celular "in vivo". Estudos imunohistoquímicos tem implicado TGF-beta como possível mediador de importantes funções no controle da proliferação e diferenciação do embrião (71). Tal função parece ser particularmente significativa na diferenciação de tecidos de origem mesenquimal, como osso, músculo, vasos e células sanguíneas, bem como na diferenciação de várias linhagens de células epiteliais. Um estudo recente mostrou através de imunohistoquímica a localização de TGF-beta em estruturas críticas da morfogênese embrionária, como notocorda e somitos (71). De acordo com o que foi descrito anteriormente, o produto da transcrição do DPP-C da *Drosophila*, relacionado ao TGF-beta, é importante na morfogênese do embrião da *Drosophila*, particularmente em estabelecer a informação posicional e o padrão dorsoventral das estruturas embrionárias (55). É importante tentar determinar se TGF-beta tem papel similar nos embriões vertebrados à respeito da determinação do padrão de segmentação dos somitos, responsável pela natureza segmentar da maior parte da musculatura do adulto (72).

A Regulação dos Fatores de Crescimento na Diferenciação e Função das Células Germinativas Normais

As células germinativas primordiais são células pertencentes à ambos os sexos que migram para as gônadas sexualmente indiferenciadas. Apesar de numerosos experimentos (73-78), ainda não é possível determinar quando e onde as células germinativas primordiais dos mamíferos surgem como linhagem celular.

A identificação das células germinativas primordiais foi facilitada pela descoberta de que a periferia do citoplasma destas células exibe considerável atividade da enzima fosfatase alcalina (79). Baseado nesta característica, o caminho da migração celular desde os seios endodérmicos até as gônadas pode ser traçado (80). CHIQUOINE (81), estudando embriões de rato de 8 semanas localizou as células germinativas primordiais em três sítios principais: mesoderma do alantóide, seios endodérmicos e na terminação caudal da linha primitiva. Recentemente, métodos imunológicos para caracterização das células germinativas primordiais estão sendo pesquisados. Um antisoro xenogênico foi desenvolvido contra células germinativas fetais de ratos com 12,5 dias (82). Se este antisoro reconhecer somente antígenos de células germinativas e células de teratoma, pode tornar-se um importante marcador para células germinativas, bem como ser útil no estudo de propriedades específicas da membrana plasmática germinativa. Ainda, certos anticorpos monoclonais contra diferentes tipos de células de teratoma reagem especificamente com células germinativas primordiais em embriões de idades diferentes (83).

Após as células germinativas primordiais instalarem-se nas gônadas, elas são armazenadas em compartimentos específicos, nos quais a proliferação e diferenciação são reguladas pelas células somáticas circundantes (84). As células germinativas extragonadais que não conseguem atingir as gônadas até o momento da diferenciação sexual normalmente desaparecem rapidamente (85). Entretanto, células germinativas primordiais persistem em sítios extragonadais por períodos mais longos, e podem dar origem à teratomas. Desta forma, os teratomas podem ser reproduzidos por transplante de células de embriões iniciais para diferentes sítios (86). As células germinativas primordiais das gônadas fetais podem ser induzidas a produzirem teratomas quando as gônadas são transplantadas para testículos adultos isólogos (87). Parece claro que as células germinativas primordiais exibem uma pluripotencialidade instável. Esta pode ser fatal se indevidamente controlada, e fatores do microambiente celular podem atuar como reguladores do comportamento das células germinativas.

A diferenciação testicular é caracterizada por três eventos distintos: as células germinativas e de Sertoli agrupam-se nos cordões testiculares, criando assim os compartimentos intra e extracordonais para as células germinativas; ocorre a diferenciação das células de Leydig (produtoras de esteróides), situadas no compartimento extracordonal; o testículo torna-se arredondado, minimizando assim o efeito feminilizante do mesonefro(84). As células germinativas masculinas deixadas no compartimento extracordonal ou em localizações extragonadais estão destinadas a morrer ou dão origem à teratomas (86). A sobrevivência das células é totalmente dependente de seu armazenamento dentro dos cordões testiculares. O compartimento intracordonal aparentemente cria um ambiente específico que é necessário para manutenção e controle da proliferação e diferenciação das espermatogônias. Recentemente, foi sugerido que uma proporção determinada entre as células germinativas e de Sertoli é necessária para o sustento e diferenciação das mesmas. Esta idéia é sustentada pelo fato de que, em testículos de coelho recém-nascido, as células germinativas somente sobrevivem quando intimamente associadas às de Sertoli na periferia dos cordões; nas regiões em que não existe o suporte adequado por parte das células de Sertoli, ocorre degeneração das células germinativas (88).

Duas funções principais são atribuídas às células de Sertoli: criação e manutenção de um compartimento específico onde possa ocorrer a espermatogênese; produção e secreção da MIS (Mullerian Inhibitory Substance), responsável pela degeneração dos ductos mullerianos durante a diferenciação testicular. No testículo adulto, as células de Sertoli são também responsáveis pela síntese de uma proteína de ligação para andrógenos (89), pela fagocitose de células germinativas degeneradas, pela secreção de fluidos e pela secreção de inibina, responsável por um feedback negativo para o FSH (90). Em acréscimo, as células de Sertoli são o alvo primário do FSH (91).

A diferenciação das células de Leydig, as mais potentes no sentido da síntese de andrógenos, tem lugar no compartimento extracordonal, sendo este um evento crucial no desenvolvimento testicular. Sua diferenciação ocorre pouco depois da formação dos cordões testiculares (92). Durante a diferenciação testicular, as células de Leydig adquirem características típicas de células produtoras de esteróides (93). A quantidade de retículo endoplasmático aumenta e gradualmente passa da forma rugosa para tubular agranular, terminando por ocupar a

maior parte do citoplasma. O número de mitocôndrias aumenta e as mesmas tornam-se esféricas, dotadas de cristas tubulares. Em células de Leydig fetais diferenciadas, também foram descritas na membrana plasmática junções tipo "gap" e outros pequenos agregados de partículas (94).

Ainda permanece obscuro o mecanismo que estimula algumas células do compartimento extracordonal a se diferenciarem em células de Leydig. Os altos níveis de gonadotrofinas coriônicas encontrados no sangue fetal durante a diferenciação sexual gonadal pode ser importante na estimulação inicial da síntese de esteróides pela gônada (95). Já mais tardiamente na vida fetal, a função das células de Leydig é controlada pelas gonadotrofinas hipofisárias (96). A importância das gonadotrofinas é também sugerida pelo achado de que são encontradas poucas células de Leydig nas testículos de fetos anencefálicos, nos quais a atividade das gonadotrofinas é baixa (97).

A diferenciação do trato genital masculino é também governado por hormônios produzidos pelos testículos diferenciados: a testosterona, secretada pelas células de Leydig, é responsável pelo crescimento dos ductos wolffianos, enquanto que a MIS (Mullerian Inhibitory Substance), secretada pelas células de Sertoli, promove a regressão dos ductos mullerianos (98).

Atualmente, a diferenciação e função gonadais tem sido estudada com base nas condições regulatórias do microambiente, criadas pela secreção de fatores de crescimento (FC). Recentemente, foi relatado que células da granulosa de ovários de porcos produzem somatomedina C, também denominada fator de crescimento insulinóide I [SmC ou IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I)] "in vitro" (99), e que a SmC/IGF-I exerce um efeito direto na citodiferenciação de células da granulosa de ratos e porcos, o que levou a investigação sobre se a produção local de SmC/IGF-I poderia exercer controle parácrino ou autócrino sobre o desenvolvimento das células ovarianas. As células de Sertoli, homólogo masculino das células da granulosa, também produzem SmC/IGF-I, fato já relatado na literatura (100). Utilizando cultura de células de Sertoli porcinas imaturas em meio livre de soro, foi relatado que o meio de cultura continha SmC/IGF-I. Este último foi medido tanto em meio não-fracionado quanto após o fracionamento, utilizando-se cromatografia líquida de alta desempenho. O radioimunoensaio para SmC/IGF-I mostrou que o material liberado possuía reatividade cruzada paralela com anticorpos contra SmC/IGF-I humana, sugerindo uma grande homologia entre os dois peptídeos.

Estudos atuais indicam que FC secretados por células de Sertoli podem influenciar na função esteroidogênica das células de Leydig (100,101). A liberação de SmC/IGF-I pelas células de Sertoli tem sido associada com a identificação do receptor específico nas células de Leydig. De fato, o tratamento de células de Leydig em cultura com SmC/IGF-I aumenta a ligação de LH (Luteinizing Hormone)/HCG (Human Chorionic Gonadotropin) bem como a produção basal e estimulada por HCG (Human Chorionic Gonadotropin) de esteróides, que são dose-e-tempo-dependentes (100). Quando comparado ao efeito da ligação do LH (Luteinizing Hormone) ou HCG (Human Chorionic Gonadotropin) no número total de células ou na síntese de DNA (aumentada 4.3 vezes), o SmC/IGF-I tem efeito limitado em ambos os; também é menor que o efeito da secreção de esteróides estimulada por HCG (Human Chorionic Gonadotropin), que aumenta em 15.5 vezes a testosterona. Estes resultados sugerem que a atividade de SmC/IGF-I não deve estar relacionada a um incremento na multiplicação das células de Leydig. Ainda, a inibição da síntese de DNA com ARA-C resulta sem efeito na capacidade de SmC/IGF-I em aumentar tanto a ligação de LH (Luteinizing Hormone)/HCG (Human Chorionic Gonadotropin) quanto a secreção de testosterona (100). Todas estas evidências apontam para um papel de SmC/IGF-I como possível regulador da diferenciação e função das células de Leydig, através de um mecanismo parácrino.

É interessante observar que nem FSH ou GH (Growth Hormone) são capazes de estimular a secreção de SmC/IGF-I pelas células de Sertoli. De fato, após dois dias, o FSH inibe esta secreção. Entretanto, o FGF (Fibroblast Growth Factor) e o fator de crescimento epitelial (EGF; Epithelial Growth Factor) aumentam em 2 a 3 vezes a secreção de SmC/IGF-I pelas células de Sertoli em cultura, e células pré-tratadas com FC tornam-se mais sensíveis a ação estimulatória do FSH (102). Estes resultados sugerem que fatores além do GH podem influenciar na secreção de SmC/IGF-I no testículo e, talvez, em outros tecidos. Também sugere que tanto o FGF (Fibroblast Growth Factor) quanto EGF, presentes no testículo, podem ter ação parácrina ou autócrina.

Os FC também participam da diferenciação das células germinativas. No epitélio seminífero de mamíferos, uma população estável de células de Sertoli é associada com desenvolvimento das células espermatogênicas. A progressão sincrônica da espermatogênese indica que um mecanismo para coordenar os eventos genéticos, bioquímicos e morfológicos deve existir. As células de Sertoli podem ser a fonte dos sinais regulatórios, que agem através de

mecanismos potenciais parácrinos e/ou autócrinos (103). Um sistema "in vitro" no qual células de Sertoli interagem com células espermatogênicas em diferenciação foi desenvolvido (sistema de co-cultura para células de Sertoli-células espermatogênicas), na tentativa de determinar a identidade e caracterizar funcionalmente as proteínas dotadas de efeito promotor do crescimento em células espermatogênicas. Utilizando-se tal modelo, foi demonstrado (103) que células de Sertoli e espermatócitos em paquíteno tem afinidade de ligação por SmC/IGF-I. As moléculas de SmC/IGF-I ligam-se a receptores da membrana celular e, possivelmente, são internalizadas pelas células de Sertoli e espermatócitos em paquíteno. Ao lado de uma possível função autócrina de SmC/IGF-I na proliferação das células de Sertoli, é de grande importância a observação feita através de imunocitoquímica de que espermatócitos em paquíteno apresentam ligação e endocitose mediada por receptores para SmC/IGF-I endógeno ou exógeno (31). Existe a idéia de que espermatócitos em prófase meiótica tardia (paquíteno - diplóteno) estimulados por SmC/IGF-I podem ser induzidos a progredir na divisão meiótica. De fato, isso foi observado anteriormente em divisão meiótica I em sistemas de co-cultura para células de Sertoli-células espermatogênicas (103).

Os Fatores de Crescimento e a Diferenciação dos Tumores de Células Germinativas

As células de carcinoma embrionário (CE) são células primordiais pluripotentes indiferenciadas dos teratocarcinomas e sua proliferação continuada é responsável pela malignidade dos tumores de células germinativas, aos quais dão origem. Numerosos estudos demonstram que as células de CE lembram muito as células da massa celular interna inicial (MCI) dos embriões murinos (104). A relação íntima que existe entre células embrionárias normais e as células de CE é mostrada na Figura 1.2. A célula primordial de teratocarcinoma pode ser isolada e mantida em cultura "in vitro", e linhagens clonais de células de CE podem ser produzidas. As células de CE, como as células embrionárias iniciais murinas, são pluripotentes e capazes de se diferenciarem em um grande número de tipos celulares (105). As células de CE são dotadas também de propriedades morfológicas, bioquímicas e imunológicas em comum com as células embrionárias iniciais murinas(104).

As bases da relação íntima existente entre células embrionárias normais e células de CE estão fundamentadas em três experimentos principais: quando células de CE são combinadas com células embrionárias normais, tanto por agregação à um embrião de 4 a 8 células quanto por pela injeção no blastocisto murino, elas podem participar do desenvolvimento de um rato adulto completamente normal (106); os teratocarcinomas são tumores induzíveis experimentalmente em ratos, através da transferência de um embrião de 1 a 7.5 dias para um sítio extrauterino (107); é possível produzir células semelhantes às células de CE a partir de células embrionárias iniciais murinas que tenham sido tratadas em um meio previamente condicionado por células da linhagem CE (PSA-1) (108).

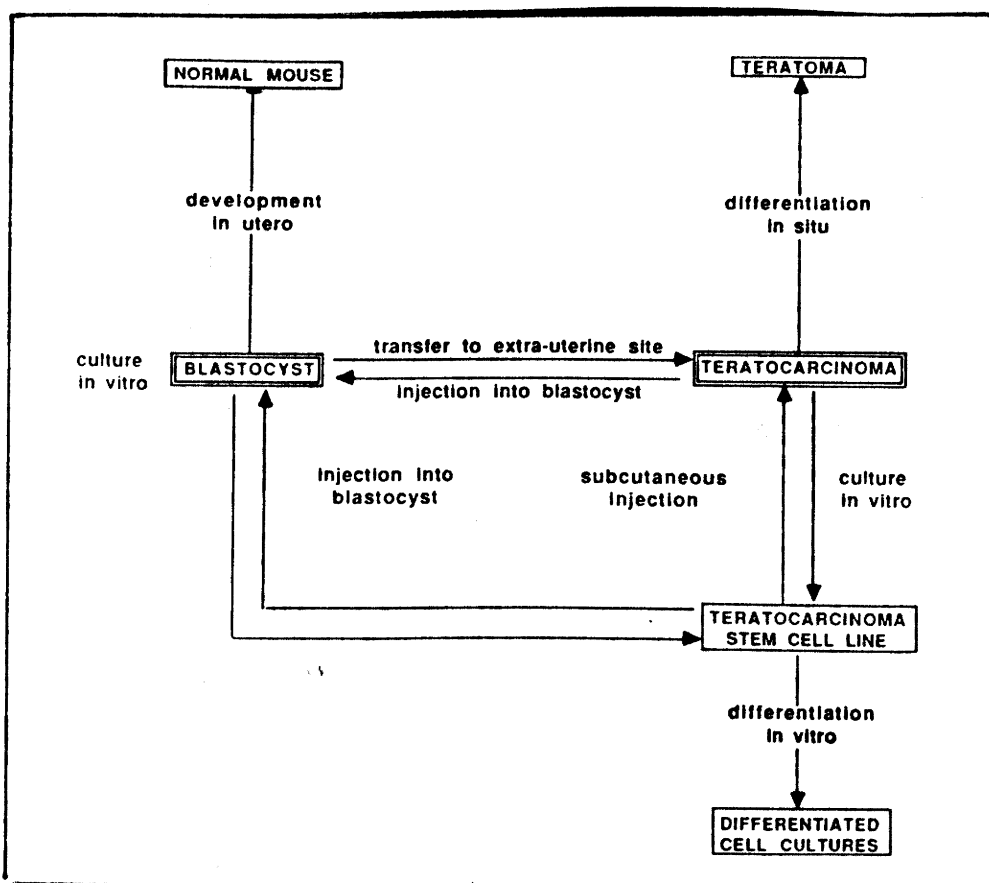


Figura 1.2. Relação entre Embriões Normais e Células de Teratocarcinoma

A observação inicial de que um meio condicionado pela linhagem PSA-1 de células de CE é capaz de estimular o crescimento de células embrionárias primordiais sugere que tal meio possa conter um fator estimulador da proliferação das células pluripotentes no embrião inicial.

e/ou iniba sua diferenciação. Em acréscimo, tal fator pode ter uma função mitogênica autoestimulatória (autócrina) para as células de CE que o produzem (108).

Na tentativa de avaliar a atividade estimuladora de crescimento de meios condicionados por células de CE (MC-CE), células de CE PSA-1 privadas de soro foram tratadas com concentrações crescentes de MC-CE, obtendo-se uma curva dose-resposta para a incorporação de timidina tritiada no DNA (109). Um aumento de 17 vezes na captação de timidina tritiada foi observada para uma concentração de MC-CE de 150 ug/mL. EGF ou PDGF não estimularam a captação de timidina tritiada nesta linhagem celular. Foi também demonstrado que MC-CE afetava a proliferação e diferenciação de células eritroleucêmicas Friend (109). A linhagem de células eritroleucêmicas Friend é obtida pela inoculação do vírus da leucemia Friend em ratos, sendo composta por células hematopoiéticas transformadas bloqueadas em sua diferenciação (110). Entretanto, sua diferenciação pode ser induzida pelo uso de dimetilsulfóxido (DMSO) ou de hexametilbisacetamida (HMBA) (110,111), bem como inibida por promotores tumorais, como o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (112). O aparecimento de RNA da globina e a síntese de hemoglobina são marcadores usuais da diferenciação eritrocítica (113). Meios tipo MC-CE são capazes de estimular a proliferação de células Friend privadas de soro e também de inibir a diferenciação induzida por DMSO ou HMBA (109). A positividade do teste da benzidina (que consiste na medição do percentual de células que acumulam hemoglobina) quando utilizado em culturas- controle de células eritroleucêmicas Friend expostas ao DMSO é de 75%, após 5 dias de tratamento. Quando MC-CE é colocado em concentração mais alta observa-se inibição na diferenciação da ordem de mais de 90%, o que é verificado pela presença de 10% de células positivas para benzidina e pela diminuição da acumulação de RNA de alfa-globina. Em acréscimo, este achado sugere ocorrência à nível pré-translacional. Nem EGF ou PDGF são capazes de inibir a diferenciação induzida por DMSO em células Friend (109). Quando uma terceira linhagem celular (fibroblastos murinos NIH-3T3 privados de soro) é exposta à MC-CE, um aumento de 18 vezes na captação de timidina tritiada é observado. Efeito semelhante consegue ser obtido com o uso de EGF ou PDGF. As células NIH-3T3 também apresentam um fenótipo transformado, que inclui alterações na morfologia celular e crescimento independente de ancoragem em ágar (109).

A relação entre meios de cultura tipo MC-CE e outros fatores de crescimento foi avaliada, e parece altamente improvável que qualquer das atividades detectadas em MC-CE sejam relacionadas à EGF, TGF-alfa ou PDGF (109). Tal afirmação decorre das seguintes observações:

-não ocorre competição entre MC-CE e EGF em ensaios de ligação à receptores.

-EGF ou PDGF purificados não mimetizam os efeitos de MC-CE em células PSA-1 ou Friend, provavelmente porquê estas linhagens celulares não exibam receptores.

-considerando a semelhança entre TGF-alfa e EGF (ambos competem pelo mesmo receptor), é improvável a relação entre TGF-alfa e MC-CE.

-não ocorre competição entre MC-CE e PDGF em ensaios de ligação com ¹²⁵I marcado;

-MC-CE não é capaz de promover a fosforilação da tirosina no receptor de 175 kD de PDGF.

-PDGF purificado não mimetiza os efeitos de MC-CE nem de PSA-1 na linhagem de células eritroleucêmicas Friend.

Outros modelos têm sido descritos para avaliação da função regulatória de FC durante a diferenciação de células de teratocarcinoma, bem como na embriogênese inicial. Fatores de crescimento insulinóides I e II (IGF-I; Insulin-like Growth Factor-I e IGF-II; Insulin-like Growth Factor-II) têm sido associados com tal função. Os níveis séricos de IGF-I são controlados pelo GH e, conseqüentemente, IGF-I é implicado como mediador das ações de GH no crescimento ósseo durante a puberdade (114). Já as concentrações plasmáticas de IGF-II (Insulin-like Growth Factor-II) não são controladas pelo GH, mas estão elevadas no feto (115), levando a se pensar que IGF-II pudesse regular o crescimento fetal "in vivo" (116). De fato, moléculas semelhantes à IGF-II são sintetizadas por vários tecidos fetais, como o fígado (117), fibroblastos (118), mioblastos (119),

rim, coração, pulmão e mesênquima do botão das extremidades, bem como o intestino e cérebro (116). Recentemente, a transcrição de IGF-II foi encontrada disseminada em tecidos de fetos humanos de primeiro trimestre (120). Todos estes achados levaram à hipótese de que IGF-II atuaria "in vivo" como fator de crescimento parácrino, onde sua secreção local resultaria na proliferação das células vizinhas (116,119). Moléculas semelhantes à IGF-II poderiam também ser expressas e atuariam em estágios iniciais do embrião no desenvolvimento de mamíferos. Tal idéia surgiu do achado de que células de CE murino expressam receptores e respondem à IGF-II exógeno "in vitro" (121-123).

HEATH e REES (124), utilizando uma linhagem de células de CE (PC13), desenvolveram um modelo diferente no qual as células PC13 indiferenciadas são induzidas à diferenciação em resposta ao ácido retinóico (AR). Disto resulta a formação de um tipo celular aparentemente homogêneo, denominado PC13 END, que lembra o mesoderma extra-embriônico, após a implantação do mesmo. A diferenciação induzida por AR em células PC13 é acompanhada por uma queda no número de receptores de membrana para IGF-I disponíveis, e pela expressão de moléculas que, na estrutura e atividade, lembram IGF-II(125). Foi sugerido que estes dois fenômenos estivessem ligados, e que a produção endógena de moléculas semelhantes à IGF resultasse na ocupação dos receptores para IGF das células PC13 END, acompanhado de uma aparente diminuição no número de sítios disponíveis para a ligação de IGF exógeno ("down-regulation"). Este fenômeno têm sido associado com o comportamento de células malignas. No entanto, as células PC13 END são não-tumorigênicas "in vivo" e exibem um tempo de vida proliferativa finito "in vitro", o que sugere ser a proliferação celular induzida por mecanismo autócrino uma potencial característica de certas linhagens celulares embrionárias, bem como de células malignas (125). A síntese autócrina de moléculas semelhantes à IGF pelas células PC13 END pode ser uma explicação para a dependência de densidade celular para sua multiplicação, na ausência de FC exógenos (124). Pode existir, inclusive, um "feedback" entre as células PC13 e PC13 END (124); as células PC13 END poderiam secretar substâncias (IGF) que mantenham a proliferação de seus "parentes" indiferenciados, enquanto que células PC13 talvez exerçam um efeito mitogênico sobre as células PC13 END (125).

A habilidade de secretar moléculas semelhantes à IGF-II no meio condicionado foi recentemente testada em várias linhagens de células de CE murinas, em estágios diferenciados e indiferenciados (126). As células de CE utilizadas como modelos para células primordiais indiferenciadas foram as linhagens F9, PCC4 e Nulli CE. As células diferenciadas incluíram Dif5, PYS-2 e PSA- 5E. A linhagem Dif5, composta por células semelhantes ao endoderma, foi obtida a partir de células F9 após exposição prolongada ao AR. São células capazes de permanecer aptas a crescer na ausência de soro ou outros suprimentos hormonais, representando assim um bom sistema para condicionamento de grandes quantidades de meio em meio livre de soro, na tentativa de isolar FC. A linhagem PYS-2 tem algumas propriedades semelhantes ao endoderma parietal, este o primeiro tipo celular a aparecer durante o desenvolvimento embrionário inicial (104). Finalmente, a linhagem PSA-5E lembra células do endoderma visceral do embrião inicial (127).

A análise dos meios condicionados pelo crescimento das linhagens celulares indiferenciadas mostrou que F9, Nulli e PCC4 continham apenas pequenas quantidades de IGF-II imunorreativo, medido por ensaio direto (3-6 ng/10⁶ células/24h). A linhagem PYS-2 e Dif5 produziram grandes quantidades de substâncias semelhantes à IGF-II(respectivamente 16 ng/10⁶ células/24h e 33 ng/10⁶ células/24h). Entretanto, a maior quantidade de atividade de IGF-II foi observada na linhagem PSA- 2E (41 ng/10⁶ células/24h), indicando que as células do endoderma visceral são as células primariamente responsáveis pela produção de substâncias semelhantes à IGF-II durante o desenvolvimento embrionário inicial (126).

A habilidade em reconhecer e ligar FC através de receptores específicos de superfície celular certamente é o fator que determina quais as células que podem responder a um FC específico. As linhagens F9 e PYS-2 possuem receptores para IGF-II murino (128). Entretanto, nem Dif5 ou PSA-5E (as duas linhagens que secretam as maiores quantidades de IGF-II) possuem receptores para IGF-II murino (126). Esta ausência de receptores indica que tais linhagens celulares são incapazes de responder à IGF-II ou podem representar a "down-regulation" do receptor específico.

Muitos estudos tem sido conduzidos descrevendo a estrutura e os efeitos fisiológicos dos receptores de IGF. O receptor para IGF-I (tipo I) compartilha várias propriedades com o

receptor para insulina e não especificamente liga tanto insulina quanto IGF-II, embora com menos afinidades do que com seu homoligante (129). O efeito fisiológico do receptor tipo I é provavelmente o de mediar respostas de crescimento (130). O receptor para IGF-II (tipo II) não compartilha de nenhuma homologia com os receptores para insulina ou para IGF-I e reações cruzadas com estes hormônios são muito pouco prováveis. Recentemente foi descrita uma homologia de 80% entre a seqüência do receptor para IGF-II humano e o receptor cation-dependente para manose-6-fosfato bovino (131). Como mencionado por ROTH (132), isto "amplifica o quebra-cabeça" de determinar quais respostas são mediadas pelo receptor tipo II. Muitos estudos sugerem que as respostas à IGF-II são mediadas pelo receptor tipo I (133-134). Recentemente, entretanto, vários sistemas tem indicado que o IGF-II pode funcionar através de seu próprio receptor tipo II (135-138).

Os efeitos dos IGF também podem ser modulados através de proteínas ligantes de IGFs (139-142). Várias destas proteínas tem sido identificadas no soro e fluido amniótico humanos. Uma destas proteínas de ligação, isolada de fluido amniótico humano, demonstrou inibir o crescimento de células de coriocarcinoma humano JEG-3 "in vitro" (143). As proteínas ligantes podem ter funções inibitórias ou estimulatórias. Embora proteínas ligantes tenham sido isoladas a partir de células de teratocarcinoma murino, sua importância funcional não foi, ainda, inteiramente identificada. Proteínas ligantes podem estar relacionadas ao processo de modulação da diferenciação celular. Usando um sistema de células de carcinoma murino, HEATH (125) recentemente mostrou que as proteínas ligantes são produzidas por células diferenciadas, e não por células indiferenciadas.

Outro FC investigado durante a embriogênese inicial através de modelos de diferenciação de teratocarcinoma é o PDGF. Duas linhagens de células de CE (F9 e PC13) foram testadas e não foram capazes de ligar quantidades significativas de PDGF exógeno, o que é consistente com a liberação de substâncias semelhantes à PDGF em seu meio condicionado (144). Do mesmo modo que foi proposto para outros sistemas, as células indiferenciadas CE podem produzir toda a atividade semelhante à PDGF que necessitam para sua função autócrina e, conseqüentemente, não respondem à PDGF exógeno (145). Entretanto, células diferenciadas semelhantes ao endoderma, derivadas de células de CE (células F9 diferenciadas, PSA-5E e PYS-2)

podem ligar PDGF exógeno, mas às custas de uma diminuição de 90% na produção de atividade semelhante a PDGF. Isto levanta a possibilidade de que PDGF (ou outro fator muito semelhante) possa influenciar na proliferação celular e/ou comportamento celular na embriogênese inicial, através de um mecanismo parácrino (144). Em um estudo mais antigo (146), foi relatado que uma linhagem celular CE multipotente (PSA-1G) secretava uma grande quantidade de um fator semelhante à PDGF, e que células PSA-1G semelhantes à fibroblastos espontaneamente diferenciadas exibiam uma especificidade de ligação para PDGF aumentada na ordem de 20 a 30 vezes, quando comparadas ao nível basal de ligação das células PSA-1G primordiais. Um trabalho mais recente (147), mostrou que células diferenciadas semelhantes ao endoderma (Dif5, PSA-5E e PYS-2) exibiam especificidade de ligação para PDGF marcado com ¹²⁵I, e que as células PSA-5E respondiam à PDGF como agente quimiotático. De acordo com o que foi previamente mencionado, a linhagem celular semelhante ao endoderma visceral (PSA-5E) produz pouca atividade semelhante a PDGF, em contraste com as células semelhantes ao endoderma parietal (PYS-2) e células Dif5, capazes de produzir grandes quantidades da mesma. Entretanto, é importante frisar que esta atividade semelhante a PDGF mostra-se diferente de PDGF em propriedades bioquímicas (estabilidade térmica, peso e carga molecular), à despeito de sua capacidade de competir efetivamente pelos sítios de ligação para PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) nas células-alvo.

De muito interesse é o relato recente (148) à respeito da indução de diferenciação para células tipo mesodérmicas (MES-1) a partir da agregação de células de CE pluripotentes P19 expostas à DMSO. As células MES-1 expressam receptores para PDGF e exibem resposta mitogênica quando expostas ao mesmo, tendo também sido demonstrada a fosforilação do receptor para PDGF induzida pelo homoligante. Porém, outras linhagens derivadas de P19, isoladas a partir de agregados tratados com AR e que lembram células neuroectodérmicas ou endodérmicas, não respondem à PDGF. Nestas células, PDGF não se liga a receptores, não induz fosforilação nem provoca resposta mitogênica (148). Estes resultados estão de acordo com os efeitos de PDGF em células mesodérmicas somáticas previamente descritos (149).

A diferenciação de certas linhagens de teratocarcinoma murino (F9 e PC13) está associada com um aumento significativo na ligação com EGF (150-151). Porém, ocorre um

aumento muito maior na ligação com EGF quando da diferenciação de PC13 em comparação com F9, o que provavelmente se deve a formação de diferentes linhagens celulares derivadas das primeiras. As células F9 diferenciadas exibem propriedades do endoderma parietal, em contraste com células PC13 diferenciadas, intimamente relacionadas ao endoderma visceral. Estes achados estão de acordo com observações realizadas em embriões, onde o endoderma visceral liga-se consideravelmente mais à EGF do que o endoderma parietal (152).

Utilizando sondas imunológicas, CARLIN e ANDREWS (153) estudaram a expressão do receptor para EGF na superfície celular de linhagens de CE humano (2102Ep cl. 4D3 e Ntera-2 cl. D1), e mostraram resultados diferentes dos obtidos com células de CE murino. A expressão de receptores para EGF foi observada na superfície de células de CE humano indiferenciadas. O tratamento da linhagem Ntera-2 cl. D1 com AR durante 7 dias (visando a indução da diferenciação) resultou no decréscimo significativo dos níveis de expressão do receptor para EGF. Esta diferença pode ser explicada considerando que, em ratos, receptores para EGF foram detectados no endoderma e trofoectoderma, nenhum dos quais surgido a partir da diferenciação das células Ntera-2 cl. D1 (153). Além disso, os teratocarcinomas humanos e murinos diferem na expressão de marcadores imunológicos (154). As células de CE murino expressam o antígeno lactosaminoglicana SSEA-1, mas não o antígeno globo-série SSEA-3, que é encontrado em embriões no estágio de clivagem; já as células de CE humano expressam SSEA-3 e não SSEA-1. Ainda mais, o coriocarcinoma é um componente comum dos teratocarcinomas humanos, o mesmo não acontecendo nos murinos. Uma possível interpretação destas observações seria que as células de CE humano corresponderiam a um estágio mais precoce da embriogênese (mórula ou massa celular interna inicial) do que as células de CE murino, que geralmente lembram o ectoderma primitivo (104).

O modelo de diferenciação murino para as linhagens celulares F9 e PC13 foi também recentemente testado para a expressão de receptores para TGF-beta (155). O tratamento de ambas linhagens celulares com AR conduz ao surgimento de células irreversivelmente diferenciadas que exibem grande quantidade de receptores para TGF-beta, em contraste com a pobre ou ausente expressão por parte das células de CE indiferenciadas. Coerente com a ligação de TGF-beta à células diferenciadas F9 e PC13 é o achado de que linhagens semelhante ao endoderma parietal

(PYS-2) e semelhante ao endoderma visceral extraembrionário (PSA-5E) também ligam TGF-beta (155), considerando que ambas as linhagens celulares de CE (F9 e PC13) apresentam propriedades do endoderma extraembrionário após sua diferenciação (endoderma extraembrionário visceral para PC13 e endoderma extraembrionário parietal para F9). Foi demonstrado que TGF-beta exerce efeito inibitório na proliferação de células diferenciadas (155). Estes resultados sugerem que TGF-beta pode desempenhar um importante papel não apenas na diferenciação tumoral, mas também no desenvolvimento embrionário inicial. Tal fato é reforçado pelo achado de que o gene da *Drosophila* envolvido na formação do padrão das estruturas embrionárias (DPP-C) é capaz de codificar para uma proteína que exibe significativa homologia de aminoácidos com TGF-beta (55).

Como um todo, os achados aqui descritos mostram que, dependendo da natureza da etapa de diferenciação, as células de CE podem desenvolver diferentes expressões de receptores para FC, bem como diferentes respostas aos FC exógenos. Quando presentes em um tumor ou em um embrião em desenvolvimento, as diferentes expressões de receptores e respostas a FC fornecem o modo através do qual o crescimento de uma população celular específica pode ser regulado seletivamente. Quando consideramos que tanto as células de CE indiferenciadas quanto suas linhagens derivadas diferenciadas secretam FC, conclui-se que interações dinâmicas e cooperatividade podem formar um mecanismo regulatório essencial para o desenvolvimento de tumores de células germinativas bem como da embriogênese inicial.

O Modelo Tera-2 de Diferenciação e a Expressão de Fatores de Crescimento

Semelhantes à Insulina

A linhagem celular de carcinoma embrionário humano Tera-2 sofre diferenciação quando exposta à 2.1 mM de alfa-difluorometilornitina (DFMO) por 3 dias (156). Células Tera-2 indiferenciadas expressam receptores para IGF-II, mas não para insulina (157). Embora isto não tenha sido especificamente testado, a expressão de receptores para IGF-I por células Tera-2 indiferenciadas tem sido considerada pouco provável (157). O receptor para IGF tipo I liga não especificamente a insulina e IGF-II. Entretanto, em células Tera-2 indiferenciadas, a insulina não

compete pelos sítios de ligação para IGF-II, o que sugere a ausência de receptores tipo I e a presença de sítios específicos de ligação para IGF-II.

Recentemente, o efeito fisiológico de diversos fatores de crescimento tem sido testado na linhagem celular Tera-2 indiferenciada. BIDDLE et al (158) demonstrou que IGFs são os únicos fatores de crescimento exógenos necessários para manter o crescimento das células Tera-2 em um meio livre de soro. Um aumento na expressão do mRNA de IGF-II também tem sido observado em tumores de células germinativas de pacientes com câncer testicular, sugerindo que IGF-II pode agir como um fator de crescimento autócrino ou parácrino (159). Tem sido também demonstrado que IGF-II é capaz de inibir a diferenciação celular em linhagem de células de carcinoma embrionário de rato de diferenciação espontânea (124). Ainda mais, D'ERCOLE et al (116) relataram que a codificação genética para IGF-II é expressa de um modo dependente da etapa de desenvolvimento, com promotores distintos para tecidos fetais e adultos. Esta observação levou a idéia de que a expressão de IGF-II pode estar envolvida no processo de diferenciação celular.

A despeito da importância dos IGFs como reguladores do crescimento dos tumores de células germinativas e sua diferenciação, pouco é sabido a respeito da interação receptor-ligante em tumores de células germinativas humanas diferenciados. No presente trabalho, a ligação de IGFs durante a indução da diferenciação em linhagem de células de carcinoma embrionário humano Tera-2 é descrita. As alterações na diferenciação induzida nas células Tera-2 são observadas na ligação de [125 I]-IGF-II às proteínas de ligação específica. Estas alterações na ligação à IGF-II podem ser importantes na expressão do fenótipo diferenciado.

CAPÍTULO II

METODOLOGIA

Materials

IGF-I, IGF-II, [125 I]-IGF-I, [125 I]-IGF-II, derivados de DNA recombinante humano, foram fornecidos pelo Lilly Research Center, Eli Lilly Company (Indianápolis, IN). A alfa-difluorometilornitina (DFMO) foi um presente do Dr. W.Y. Hudak da Merrel Dow Pharmaceuticals (Cincinnati, OH). Os dois anticorpos monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81 foram obtidos através do Dr. P.W. Andrews do Instituto Wistar (Philadelphia, PA). Os ensaios de ligação foram conduzidos usando o Laboratório Automático Biomek 1000 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA).

Células

As células de carcinoma embrionário humano Tera-2, passagem 26, foram obtidas a partir da American Tissue Culture Collection (Rockville, MD) e mantidas em Meio Mínimo Essencial (Eagle) (MEM) com sais balanceados Earles (GIBCO, Grand Island, NY), suplementado com 200mM L-glutamina, 10mM de aminoácidos não-essenciais, NaHCO_3 , Gentamicina e soro fetal bovino a 10% (Sigma, St. Louis, MO), em uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO_2 a 37°C. As células foram subcultivadas a cada 3-4 dias com 2x tripsina/EDTA em salina com tampão fosfato (PBS) num pH 7.4 e colocadas em placas de 6-orifícios, em uma densidade de 1.0×10^5 células/orifício. Os orifícios estavam subconfluentes no momento de cada procedimento experimental. Antes de cada ensaio, as células eram mudadas para um meio MEM contendo soro fetal bovino carvão coberto com dextran a 10%. A quantidade de células foi determinada em cada experimento pela tripsinização das células aderidas em orifícios representativos e contadas com um contador Coulter (Hialeah, FL). A concentração proteica foi avaliada de acordo com o método de BRADFORD (160).

O Modelo de Diferenciação

Vinte e quatro horas após a colocação nas placas, a diferenciação foi induzida através da exposição das células de carcinoma embrionário humano Tera-2 à um meio MEM contendo 2.1 mM DFMO diariamente por três dias, de acordo com o descrito por SCHINDLER et al (161). Todos os procedimentos experimentais foram realizados no quinto dia após a colocação em placas. A diferenciação foi avaliada através de modificações na morfologia, parâmetros de citometria de fluxo e alterações na expressão dos dois antígenos de superfície celular usando os anticorpos monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81. Imunofluorocitometria foi usada na avaliação da expressão dos antígenos de diferenciação na superfície celular.

A Alfa-difluorometilornitina (DFMO) e o Metabolismo das Poliaminas

O papel exato das poliaminas no metabolismo celular não está claro. Usando-se diferentes sistemas experimentais foi possível demonstrar que tanto um aumento quanto uma diminuição na síntese das poliaminas pode ocorrer durante o processo de diferenciação (162-163). A inibição da ornitina-decarboxilase, que é a primeira enzima envolvida na síntese das poliaminas, induz diferenciação nas células de carcinoma embrionário humano. Esta pode ser conseguida com a alfa-difluorometilornitina (DFMO), um inibidor específico da ornitina-decarboxilase ativado por enzima (164). O tratamento das células de carcinoma embrionário humano com 2.1 mM de DFMO resulta em diferenciação extensa e é acompanhado por uma diminuição significativa nos níveis de putrescina e espermidina (164).

Os Anticorpos Monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81

Os anticorpos monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81 foram produzidos pelo Dr. P.W. Andrews no Instituto Wistar (Philadelphia, PA), usando o método descrito por KÖHLER e MILSTEIN (165) e o processo de seleção descrito por LITTLEFIELD (166). A Figura 2.1 mostra as rotas metabólicas importantes na seleção híbrida. O processo de LITTLEFIELD está baseado no fato de

que quando a rota principal biosintética para guanosina está bloqueada pelo antagonista do ácido fólico aminopterina existe uma rota alternativa na qual os metabólitos nucleotídeos hipoxantina ou guanina são convertidos à guanosina monofosfato através da enzima hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase (HGPRT). Células que não possuam HGPRT (células HGPRT -) morrem em um meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), pelo fato de que tanto a rota principal quanto a alternativa estão bloqueadas. Entretanto, uma célula HGPRT - pode crescer em um meio HAT se a enzima faltante for adicionada pela fusão com uma célula HGPRT +. A Figura 2.2 mostra o mecanismo de produção dos hibridomas e a síntese dos anticorpos monoclonais. Células esplênicas de ratos atímicos são fusionadas com células de mieloma HGPRT - usando polietilenoglicol. Os produtos de fusão binucleados são denominados heterocariontes. Na próxima divisão, os núcleos se fundem, gerando células híbridas, que crescem em meio HAT. Células de mieloma não fusionadas morrem em meio HAT, e células esplênicas não fusionadas só podem sobreviver poucos dias em cultura. Os híbridos são testados para a produção de um anticorpo de especificidade desejada, e clonados por diluição limitante.

No Instituto Wistar, os hibridomas são produzidos pela fusão das células de mieloma não secretante P3X63Ag8.Sp2/0 com células esplênicas de ratos machos BALB/c que foram hiperimunizados com células de carcinoma embrionário humano 2102Ep c1.2A6. Os sobrenadantes dos orifícios nos quais as colônias cresceram foram inicialmente rastreados para reatividade nas células 2102Ep por um ensaio de radioimunoligação indireto. Colônias selecionadas produtoras de anticorpos que se ligavam às células 2102Ep foram clonados por diluição limitante, e os sobrenadantes concentrados das culturas e líquido de ascite foram preparados para investigação mais detalhada. A classe de imunoglobulina (Ig) foi determinada por análise de dupla-difusão dos sobrenadantes concentrados das culturas usando reagentes Ig classe-específicos. Os anticorpos TRA-1-60 e TRA-1-81 foram selecionados a partir de 70 hibridomas que produziam anticorpos que reagiam com células de carcinoma embrionário 2102Ep. A análise de dupla-difusão revelou que ambos os anticorpos eram da classe IgM, e que reagiam fortemente com a linhagem celular NT2/D1 de células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas clonadas (167).

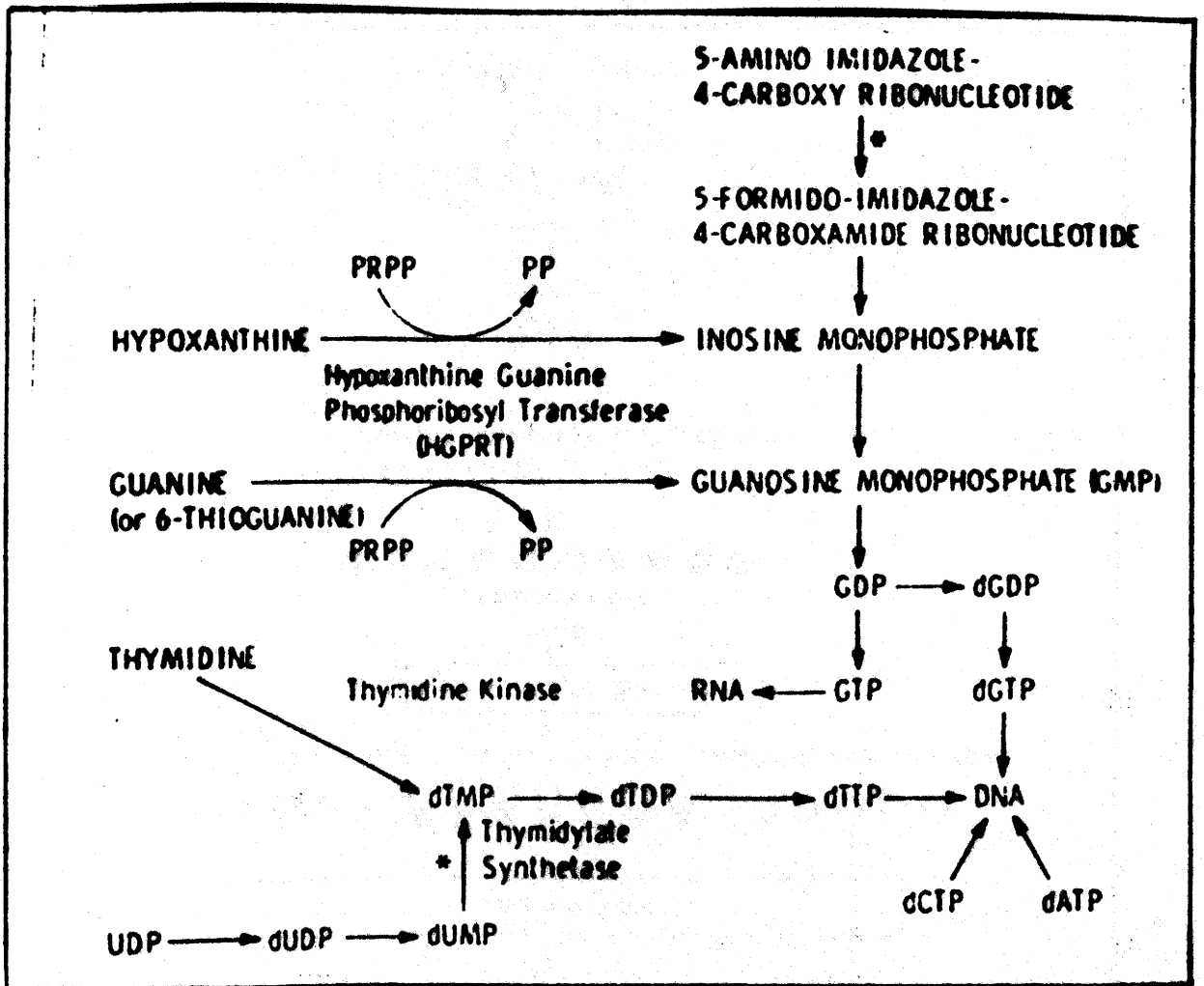


Figura 2.1. Rotas metabólicas relevantes na seleção híbrida em meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT). Quando as rotas metabólicas de síntese são bloqueadas com o análogo do ácido fólico aminopterina, as células dependem das enzimas de "salvamento" HGPRT e timidina quinase. As células HGPRT⁻ podem ser selecionadas em meio contendo os análogos tóxicos de base 6-tioguanina e 8-azaguanina, que são incorporados à célula via HGPRT. Apenas as células HGPRT⁻ sobrevivem. As células HGPRT⁺ não podem crescer em meio HAT, a não ser que sejam fusionadas com células HGPRT⁺.

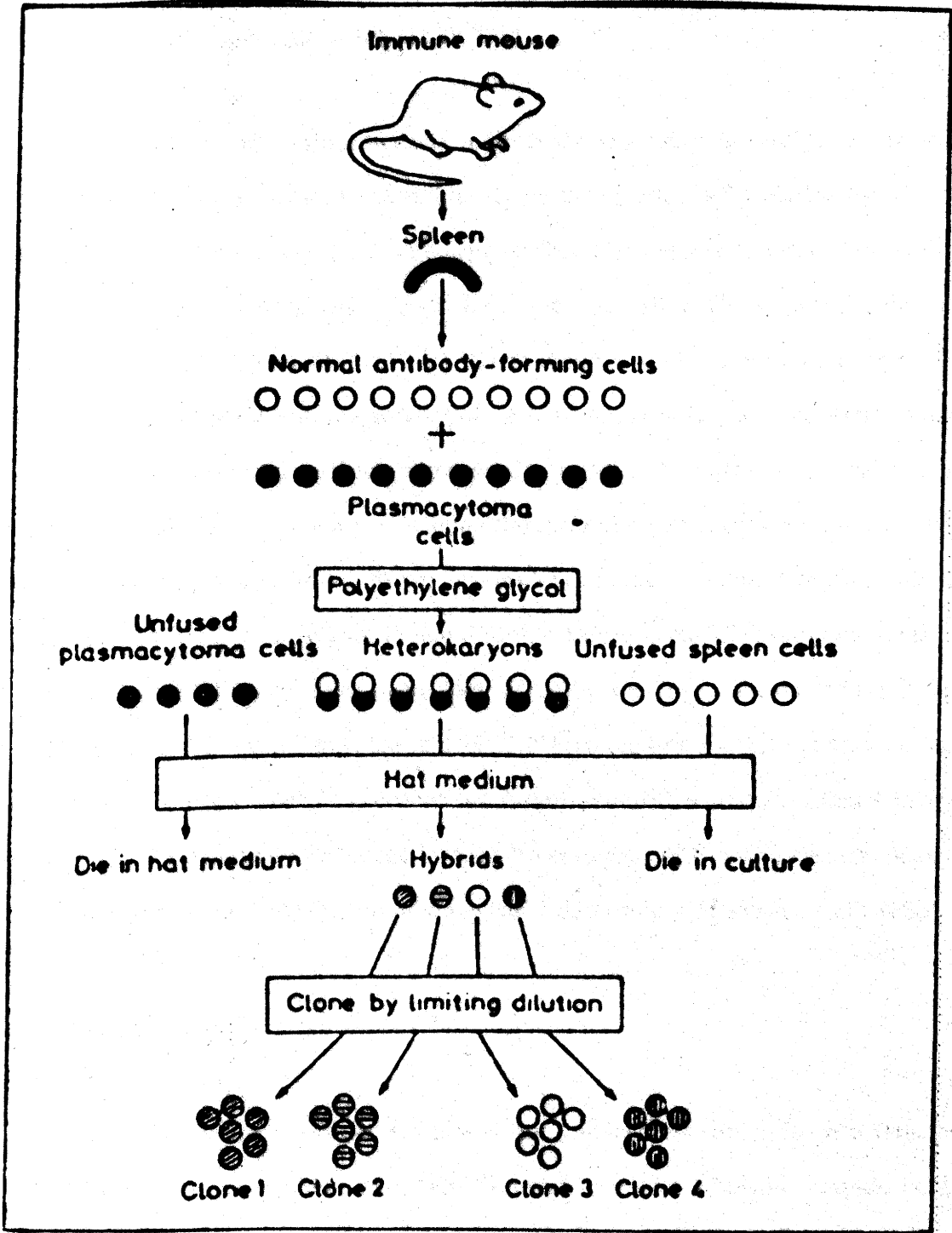


Figura 2.2. Produção de Hibridomas

A Análise de Imunofluorescência Indireta

A análise por imunofluorescência indireta da expressão de antígenos da superfície celular foi desenvolvida através de citofluorimetria de fluxo, usando um Ortho Cytofluorograph 50H. Um volume de 50ul contendo 5×10^5 células Tera-2 em estágio diferenciado (DFMO+) ou indiferenciado (DFMO-) em suspensão foram incubadas por 1h a 4°C com 50ul do anticorpo monoclonal IgM primário (TRA-1-60-ou TRA-1-81) na diluição 1:100. O anticorpo monoclonal IgG 24K foi usado como um controle negativo, pois a linhagem celular de carcinoma embrionário humano Tera-2 não expressa o antígeno correspondente. IgG 24K foi também usado na diluição 1:100 e incubado com células Tera-2 em estágio diferenciado e indiferenciado por 1h a 4°C. Após a primeira incubação as células Tera-2 foram lavadas 3 vezes com PBS frio, e então incubadas pela segunda vez por 1h a 4°C com IgM de coelho anti-rato fluoresceína(FITC)-conjugada em diluição 1:1000 quando a primeira incubação fosse com TRA-1-60 ou TRA-1-81, ou com IgG de coelho anti-rato fluoresceína(FITC)-conjugada em diluição 1:1000 quando a primeira incubação fosse com 24K. Os reagentes fluoresceína(FITC)-conjugados foram adquiridos junto a Cappel Laboratories (Cochranville, PA). As células foram então lavadas 3 vezes com PBS gelado, resuspensas em 1ml de PBS, e analisadas por citofluorimetria de fluxo como descrito por LOKEN e STALL (168).

Ensaio de Ligação

As células foram colocadas em placas num meio MEM contendo soro fetal bovino a 10%. Após 24h, o meio foi mudado para MEM contendo soro fetal bovino tratado com carvão coberto com dextran a 10%. No quinto dia após a colocação nas placas, o meio foi coletado e as células foram lavadas duas vezes com o meio de ligação (solução salina tamponada livre de fenol vermelho de Hank com 25 mM HEPES contendo 0.1% de albumina bovina, em pH 7.4). As células foram incubadas tanto com [125 I] - IGF-I ou com [125 I] - IGF-II, com ou sem IGF-I ou IGF-II. O meio foi aspirado e as células lavadas 3 vezes com PBS gelado. As células foram solubilizadas com 1.0ml de SDS a 3% e coletadas para contagem em um contador gama.

Ligação de [¹²⁵I] - IGF-II no Tempo

Tanto as células tratadas como as não tratadas com DFMO foram expostas a 15 fmoles/ml de [¹²⁵I] - IGF-II em meio de ligação, e a ligação específica foi determinada em vários momentos. A ligação não específica foi estimada incubando as células com 15 fmoles de [¹²⁵I] - IGF-II na presença de um excesso de IGF-II(1ug/ml). A ligação específica foi estimada pela subtração das contagens de cintilação não específica do total das contagens de cintilações. O tempo máximo de ligação foi determinado e os sítios de ligação foram quantificados tanto nas células indiferenciadas quanto nas diferenciadas.

Análise de Saturação

Tanto as células tratadas como as não tratadas com DFMO foram incubadas por 90 minutos com várias concentrações de IGF-I e IGF-II, cada qual contendo respectivamente [¹²⁵I] - IGF-I ou [¹²⁵I] - IGF-II a 1% e a ligação específica foi determinada. A ligação não específica foi estimada incubando-se as células com concentrações representativas tanto de [¹²⁵I] - IGF-I como de [¹²⁵I] - IGF-II, com excesso de respectivo IGF não marcado (1ug/ml). Análise de regressão foi utilizada para estimar a ligação não específica em cada ponto. A ligação específica foi calculada como descrito anteriormente. Os dados foram analisados usando o Lundo I Radioligand Binding Software (Lundo Software, Inc., Cleveland, OH) para determinar o modelo da curva de ligação que exibía a melhor correlação estatística, e as constantes de dissociação (K_D s) foram estimadas para ambos os ligantes tanto nas células indiferenciadas quanto nas diferenciadas.

Ensaio de Ligação Competitiva

Os experimentos foram conduzidos usando tanto [¹²⁵I] - IGF-I quanto [¹²⁵I] - IGF-II. Células tratadas e não tratadas com DFMO foram incubadas com 15 fmoles/ml de [¹²⁵I] - IGF-I e várias concentrações de IGF-I e/ou IGF-II não marcadas por 90 minutos a 23°C. A ligação específica foi determinada em cada ponto como mencionado anteriormente. Os dados foram

analisados com Lundo I Radioligand Binding Software (Lundo Software, Inc., Cleveland, OH). O modelo da curva de ligação que exibia o melhor formato estatístico e os respectivos K_D s para ambos ligantes foram estimados tanto para as células indiferenciadas quanto nas diferenciadas.

Efeito da Lavagem Ácida na Ligação de IGF

Células Tera-2 tratadas e não tratadas com DFMO foram lavadas em ácido para remover a superfície celular dos ligantes aderidos. As células foram expostas a uma solução de ácido acético 0.2 M contendo 0.5 M de NaCl e 0.1% de albumina bovina em pH 2.5, durante 4 minutos a 4°C. As células restantes (controle) foram similarmente incubadas apenas em meio de ligação. Após duas lavagens com meio de ligação, as células de ambos grupos foram incubadas com 15 fmoles/ml de [125 I] - IGF-I ou [125 I] - IGF-II. O ensaio de ligação competitiva (ponto único) foi conduzido utilizando IGF-I não marcado, IGF-II não marcado ou nenhum competidor tanto nas células lavadas com ácido quanto nas não lavadas com ácido. A ligação foi bloqueada após 90 minutos de incubação a 23°C e as células foram lavadas com PBS gelado. A solubilização foi feita com sulfato dodecil sódico (SDS) a 3% para a contagem de cintilação gama. A ligação dos IGFs às células lavadas em ácido foi comparada às células pré-incubadas com meio de ligação em pH 7.4.

Afinidade de Ligação Cruzada

Os receptores na afinidade de ligação cruzada para IGFs I e II envolvem quatro etapas básicas: formação dos complexos ligante-receptor sob condições de ligação em equilíbrio, adição de um agente para ligação cruzada adequado aos complexos ligante-receptor pré-formados, terminação da reação de reação cruzada através da remoção do excesso do agente de reação cruzada que não reagiu e preparação da amostra de afinidade marcada para análise subsequente (169).

Células Tera-2 tratadas e não tratadas com DFMO foram incubadas por 90 minutos a 10°C em um meio contendo 200 fmoles/ml de [125 I] - IGF-I ou [125 I] - IGF-II com ou sem 1 μ g de IGF-I ou IGF-II não marcados. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS

gelado e os IGF ligados foram submetidos à reação cruzada usando disuccinimidil suberato recém preparado 0.1 mM, em 0.1 mM N-2-hidroxietilpiperazina-N1-2-ácido etanesulfônico (HEPES) em pH 8.0. A reação de reação cruzada foi sustada usando 10mM Tris, em pH 7.4. As células foram solubilizadas com SDS a 0.3% em 0.06 M Tris-HCl, em pH 6.8. Ditiotretitol foi utilizado para quebrar as ligações dissulfídricas e as amostras foram então analisadas por eletroforese em gel de sulfato dodecil sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE), de acordo com o método descrito por LAEMMLI (170).

Ensaio de Captação de Timidina Tritiada

Células Tera-2 tratadas e não tratadas com DFMO foram colocadas em placas de 24-orifícios numa densidade de 1.0×10^4 células/orifício em MEM contendo soro fetal bovino a 10%, e então mudadas para MEM contendo soro fetal bovino tratado com carvão coberto com dextran a 10%. Tanto as células diferenciadas quanto as não diferenciadas foram subseqüentemente tratadas em várias concentrações de IGF-I ou IGF-II, em uma faixa situada entre 1ng/ml até 100ng/ml. Após 24h, o sobrenadante foi removido e substituído por um meio contendo 1uCi/ml de timidina tritiada. Duas horas após, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes em PBS gelado, precipitadas com ácido tricloroacético a 10% e fixadas com metanol gelado. As células, então, foram solubilizadas com SDS a 3%, coletadas e transferidas a frascos contendo 10ml de fluido para cintilação antes da análise por espectrometria de cintilação líquida.

Estatística (Lundon Software)

O Lundon Software ' é um programa desenvolvido para avaliar o melhor enquadramento estatístico aos dados fornecidos. Este programa não prova que um dado modelo é correto; apenas ele mostra se os dados não são inconsistentes com a existência do modelo.

No Lundon Software a inferência estatística é baseada na seleção aleatória das amostras. É difícil fazer a afirmação definitiva de que uma série de observações é uma representação aleatória da população. Entretanto, é possível concluir-se que em certas

circunstâncias os dados não representam uma amostra aleatória. O teste usado no Lundo Software para detectar a presença de amostra não-aleatória em uma série de amostras é o Teste Runs.

No gráfico, cada ponto pode ser descrito por seu "resíduo", ou distância vertical a partir do ponto até a melhor curva que descreve o conjunto de dados como um todo. Os resíduos possuem tanto um sinal + (acima da curva) como - (abaixo da curva) quanto a magnitude. Uma 'run' é definida como um ou mais resíduos positivos ou negativos consecutivos. Assim, uma 'run' pode conter tão pouco quanto um dado ou tanto quanto todos os dados do conjunto. Parece claro que muitos 'runs' curtos ou poucos 'runs' longos representam amostra não-aleatória. O Teste Runs é calculado por uma rotina estatística no Lundo Software, e um valor de p menor que 0.05 indica um nível significativo de amostra não-aleatória. Assim, um nível significativo de amostra não-aleatória deve conduzir a atenção ao conjunto de dados como sendo suspeito. Uma vez que um conjunto de dados é suspeito, as condições de ensaio devem ser revisadas e/ou outros modelos devem ser considerados.

Embora o Teste Runs indique quando há uma significativa amostra não-aleatória no conjunto de dados, ele não é aplicável para comparar a "qualidade do enquadramento" entre dois modelos. A "qualidade do enquadramento" pode ser obtida utilizando o somatório dos erros quadrados residuais (SSE) e o teste F. Nós devemos aceitar o modelo com um SSE significativamente baixo. Entretanto, se a diminuição no valor do SSE entre dois modelos é mínimo, o modelo menos complexo dos dois é a escolha apropriada.

Os valores de SSE para dois modelos consecutivos, junto com seus "graus de liberdade" (GL) correspondentes são usados para determinar o valor de F baseado na seguinte equação:

$$F = (SSE_1 - SSE_2) \times GL_2 / (GL_1 - GL_2) \times SSE_2$$

SSE1 = soma dos erros quadrados residuais do primeiro modelo

SSE2 = soma dos erros quadrados residuais do segundo modelo

GL1 = graus de liberdade do primeiro modelo

GL2 = graus de liberdade do segundo modelo

O valor de GL é o número de pontos menos o número de parâmetros estimados para o modelo, e deve sempre ser um valor positivo. Os parâmetros incluem a constante de dissociação (K_D), que é a concentração onde 50% do ligante é deslocado do receptor, e o B_{max} , que representa a quantidade em moles/mg de proteína do ligante específico ligado no nível de saturação. No modelo de um sítio de ligação existe um K_D e um B_{max} (2 parâmetros). No modelo de dois sítios de ligação existem dois K_D e dois B_{max} (4 parâmetros). Conseqüentemente, se o experimento tem 20 pontos no conjunto de dados, o GL será $(20-2=18)$ para o modelo de um sítio e $(20-4=16)$ para o modelo de dois sítios.

O teste F determina a significância ou valor de p para a inclusão de parâmetros adicionais ao modelo. Se o teste F indica que o valor de probabilidade é maior que 0.05 ($p > 0.05$), o modelo de menor complexidade deve ser escolhido como o modelo que melhor representa o conjunto de dados, o que significa que o conjunto de dados não embasa a existência de um modelo mais complexo.

O Número de Sítios de Ligação para IGF/Célula

Nos ensaios de ligação, o número de sítios de ligação para IGF/célula é encontrado pela seguinte equação:

$$B_{max} \text{ (moles/mgP)} \times P_d \text{ (mgP/ml)} \times CC \text{ (1ml/\#células)} \times A\# \text{ (sítios/mol)}$$

P = proteína

P_d = determinação da proteína

CC = contagem de células (contador Coulter)

$A\#$ = número de Avogadro (6.02×10^{23})

O B max é um dos parâmetros obtidos através da Lundo Radioligand Binding Software e é expresso em moles/mg de proteína.

Conversão de Unidades de Concentração [(cpm/ml → Molar (M)]

A concentração de IGF ligado foi primeiro determinada por cintilação em contagens/ml (cpm/ml) e após expressa em molar (M). A unidade de conversão foi atingida seguindo-se os seguintes passos:

PASSO 1 (cpm/ml → dpm/ml):

$$\text{dpm/ml} = \text{cpm/ml} / 0.82$$

PASSO 2 (dpm/ml → uCi/ml):

$$\text{uCi/ml} = \text{dpm/ml} / 2.22 \times 10^6$$

PASSO 3 (uCi/ml → nmoles/ml):

$$\text{nmoles/ml} = \text{uCi/ml} / \text{SA}^*$$

* SA = Atividade específica de [¹²⁵I] - IGF (expressa em uCi/ml)

PASSO 4 [(nmoles/ml → molar (M)]:

$$\text{M} = 10^{-6} \text{ nmoles/ml}$$

Expressão da Ligação de IGF em moles/mg de Proteína

1. Siga os Passos 1-3 da seção "Conversão das Unidades de Concentração".
2. Obtenha o valor da determinação de proteína usando o método de Bradford. O valor deverá ser expresso em mg de proteína /ml.

3. Divida a concentração de IGF em nmoles/ml pela determinação de proteína em mg de proteína/ml. O resultado deverá ser expresso em nmoles/mg de proteína.

4. Multiplique nmoles/mg de proteína por 10^{-9} e o resultado deverá ser expresso em moles/mg de proteína.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

O Modelo de Diferenciação

O inibidor da ornitina decarboxilase DFMO induz diferenciação de células de tumores germinativos murinos e humanos *in vitro* (161,164). Quando células de carcinoma embrionário humano Tera-2 são expostas a 2.1 mM DFMO por 72h elas passam por extensa diferenciação. Como é mostrado na Figura 3.1, a diferenciação foi demonstrada por uma morfologia alterada. As células de carcinoma embrionário indiferenciadas de formato clássico regular achatam-se e modificam-se assumindo formato fusiforme.

A análise de citometria de fluxo das células de carcinoma embrionário humano Tera-2 mostrou uma importante mudança no ciclo celular após a diferenciação induzida pelo DFMO. A análise de citometria de fluxo com iodeto de propidium (IP) tanto para as células Tera-2 indiferenciadas (não tratadas) quanto para as diferenciadas (tratadas com DFMO) é mostrada na Figura 3.2. Durante o processo de diferenciação induzido pelo DFMO houve uma diminuição significativa no percentual de fases G₂ + M e uma aumento correspondente no percentual de fases G₀ + G₁. Estes achados podem explicar a diminuição de 95% ocorrida na taxa de crescimento das células Tera-2 após a diferenciação induzida.

A expressão de antígenos de diferenciação na superfície celular foi testada por análise de imunofluorescência indireta utilizando citofluorimetria de fluxo. A Tabela 3.1 mostra as modificações ocorridas na expressão dos antígenos de superfície celular durante a indução da diferenciação na células Tera-2. O valor basal de fluorescência foi determinada utilizando o anticorpo monoclonal de carcinoma de mama 24K, que não é expresso pelas células de carcinoma embrionário humano. Os valores observados para os anticorpos monoclonais TRA-1-60 e TRA-1-81 representa o percentual de células Tera-2 acima do valor basal de fluorescência e são representados pelos valores médios de três estudos consecutivos. Um aumento significativo na expressão de TRA-1-60 e TRA-1-81 foi observado durante a diferenciação induzida por DFMO nas células de carcinoma embrionário humano Tera-2.

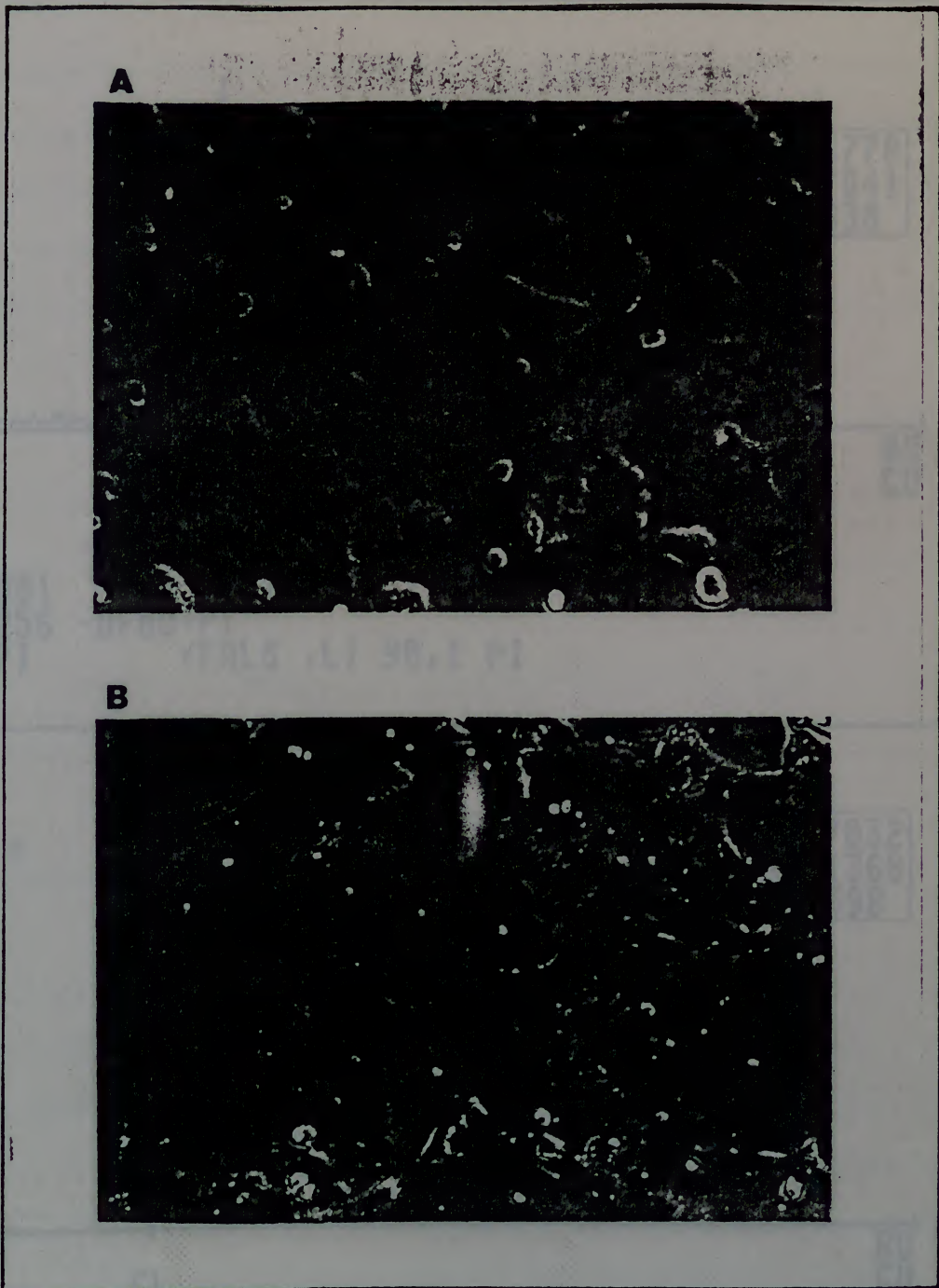


Figura 3.1. Morfologia das células de carcinoma embrionário humano Tera-2 em ambos os estágios de diferenciação. As células Tera-2 indiferenciadas (não tratadas) (A) demonstram morfologia típica de carcinoma embrionário, enquanto que as células Tera-2 diferenciadas (tratadas com DFMO) (B) mostram morfologia alterada com células de formato fusiforme.

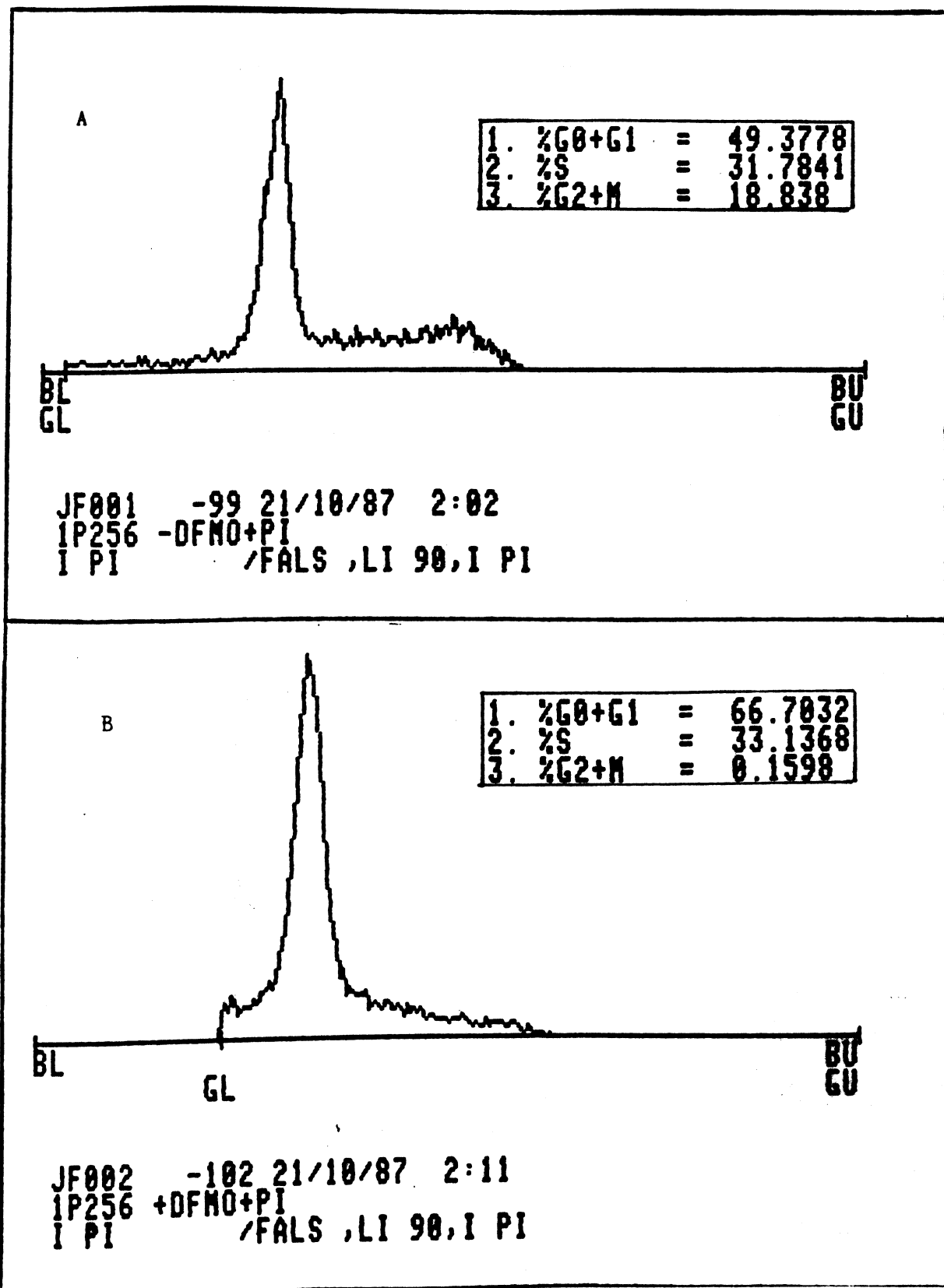


Figura 3.2. Análise de citometria de fluxo com iodeto de propidium (IP) tanto para as células Tera-2 indiferenciadas (não tratadas) (A) quanto para as células Tera-2 diferenciadas (tratadas com DFMO) (B).

Tabela 3.1. Expressão dos antígenos de diferenciação na superfície celular usando os anticorpos monoclonais (MoAb) TRA-1-60 e TRA-1-81. O MoAb de carcinoma de mama 24K foi utilizado como controle negativo para avaliar o valor basal de fluorescência. Os dados mostrados abaixo representam o percentual de células que expressam fluorescência acima do valor basal nas células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas (DFMO -) e nas diferenciadas (DFMO +).

Tratamento	MoAb		
	24K	TRA-1-60	TRA-1-81
DFMO -	0.84	55.2	23.2
DFMO +	0.96	96.7*	75.7*

Ligação de [¹²⁵I] - IGF-II no Tempo

Uma alteração significativa na ligação de IGF-II foi observada como conseqüência da diferenciação induzida por DFMO nas células de carcinoma embrionário humano Tera-2. Como é mostrado na Figura 3.3, as células Tera-2 tratadas com DFMO (diferenciadas) exibem um aumento de 2 a 3 vezes na ligação de IGF-II quando comparadas às células não tratadas (indiferenciadas). Tanto as células Tera-2 indiferenciadas quanto as diferenciadas aumentaram a ligação de IGF-II ao longo do tempo, com um pico de ligação ocorrendo após 90 minutos, que foi utilizado como o tempo ótimo de incubação nos experimentos de ligação subseqüentes.

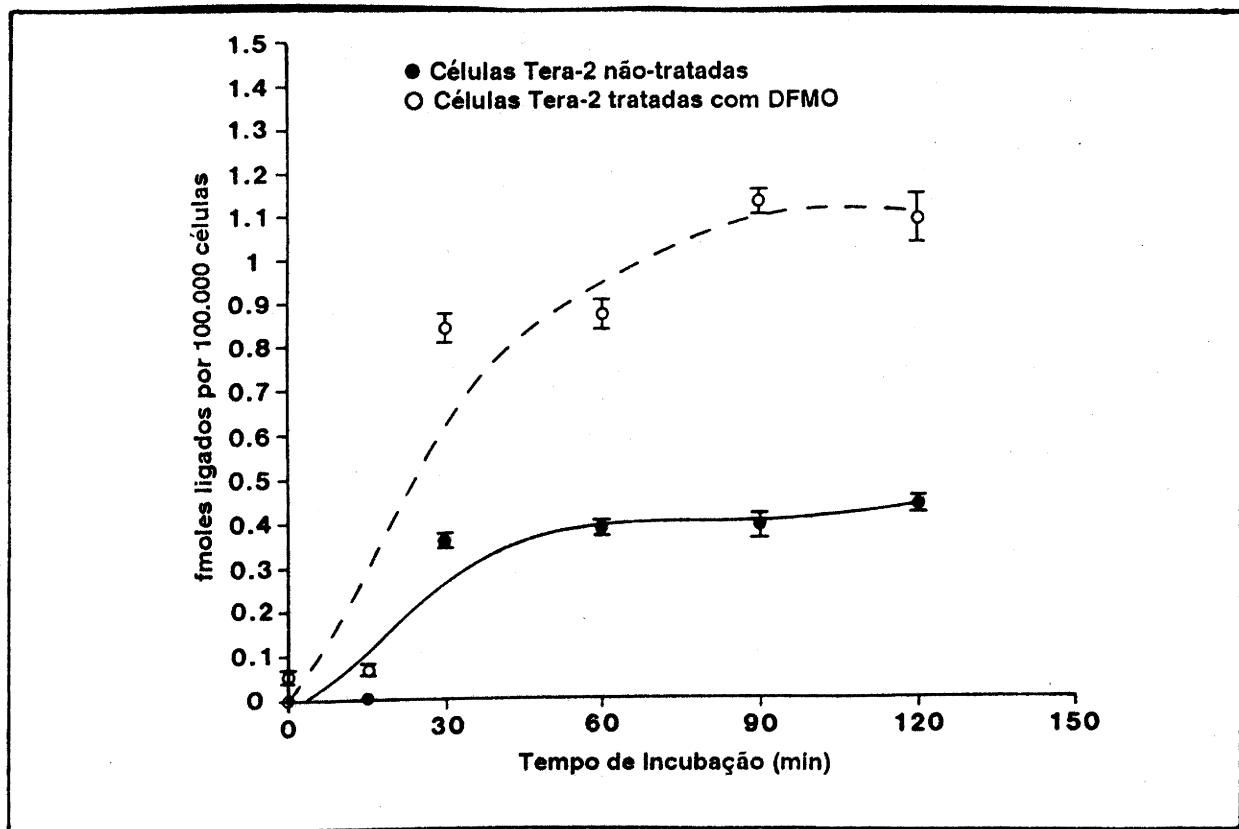


Figura 3.3. Ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II no Tempo. Células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas foram expostas a 15 fmols de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II e a ligação específica foi determinada em vários momentos. Existe um aumento na ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II pelas células diferenciadas quando comparado às células indiferenciadas. O pico da ligação ocorreu aos 90 minutos.

Análise de Saturação de IGF-I

As células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas (não tratadas) e diferenciadas (tratadas com DFMO) foram incubadas por 90 minutos em concentrações crescentes de IGF-I (indo de 10^{-11} a 10^{-7} M), cada uma contendo 1% de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I.

A análise de saturação revelou um modelo de sítio único de ligação tanto nas células Tera-2 indiferenciadas (Tabela 3.2, Figura 3.4) quanto nas diferenciadas (Tabela 3.3, Figura 3.5). Embora o Teste Runs tenha mostrado que ambos modelos eram baseados em grupos de dados randômicos, não houve diferença significativa no SSE entre os modelos de ligação em sítio único

ou em dois sítios, o que não suporta a existência de um modelo de dois sítios para a ligação de IGF-I em ambos os estágios de diferenciação.

Não ocorreram modificações apreciáveis tanto no número de sítios de ligação quanto na afinidade para ligação à IGF-I durante o processo de diferenciação. Usando o modelo escolhido de sítio único de ligação em ambos os estágios da diferenciação, os parâmetros mudaram de um B max de 5.2×10^{-14} moles/mg de proteína e um K_D de 3.2×10^{-10} M nas células Tera-2 indiferenciadas para um B max de 3.1×10^{-14} moles/mg de proteína e um K_D de 8.1×10^{-11} M nas células Tera-2 diferenciadas. (Tabela 3.3).

Tabela 3.2. Análise de saturação de IGF-I em células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas (não tratadas).

	Modelo de Sítio Único	Modelo de Dois Sítios
B max 1 (moles/mg de proteína)	5.2×10^{-14}	1.9×10^{-14}
KD1 (M)	3.2×10^{-10}	3.7×10^{-10}
B max 2 (moles/mg de proteína)	-	3.6×10^{-14}
KD2 (M)	-	9.5×10^{-10}
SSE	2.2×10^{-28}	1.7×10^{-28}
+ RES	10 _w	7
- RES	4	7
GL	12	10
RUNS	$p > 0.05$	$p > 0.05$

Tabela 3.3. Análise de saturação de IGF-I em células de carcinoma embrionário humano Tera-2 diferenciadas (tratadas com DFMO).

	Modelo de Sítio Único	Modelo de Dois Sítios
B max 1 (moles/mg de proteína)	3.1×10^{-14}	3.0×10^{-14}
KD1 (M)	8.1×10^{-11}	7.1×10^{-11}
B max 2 (moles/mg de proteína)	-	1.0×10^{-12}
KD2 (M)	-	3.3×10^{-7}
SSE	1.3×10^{-28}	1.3×10^{-28}
+ RES	5	6
- RES	7	6
GL	10	8
RUNS	$p > 0.05$	$p > 0.05$

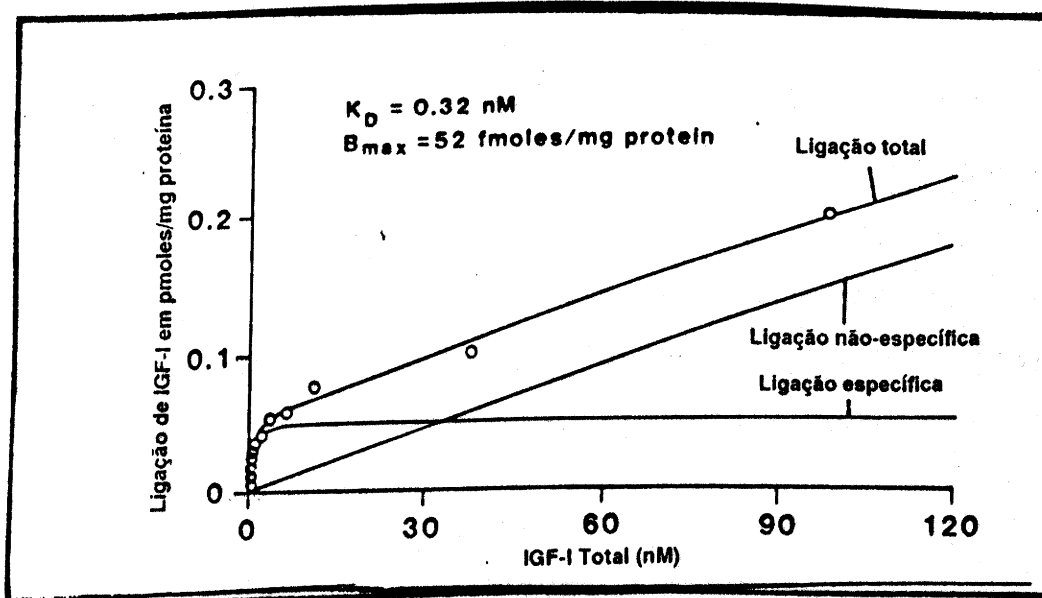


Figura 3.4. Curva de Saturação de IGF-I em células Tera-2 indiferenciadas.

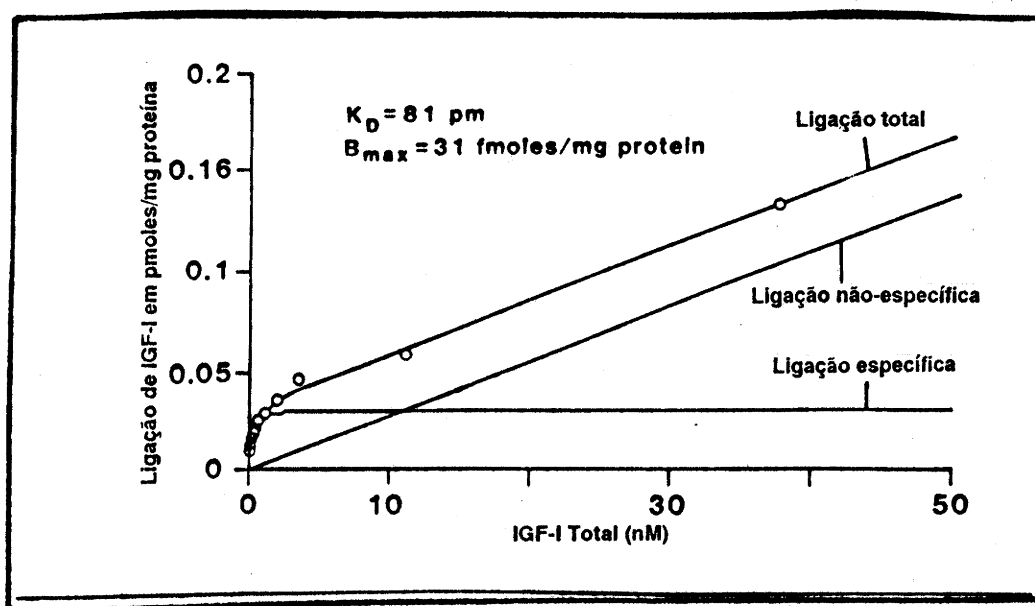


Figura 3.5. Curva de Saturação de IGF-I em células Tera-2 diferenciadas.

Análise de Saturação de IGF-II

Células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas (não tratadas) e diferenciadas (tratadas com DFMO) foram incubadas por 90 minutos em concentrações crescentes de IGF-II (indo de 10^{-11} a 3.2×10^{-8} M), cada uma contendo 1% de $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II.

A análise de saturação revelou um modelo de sítio único de ligação para IGF-II nas células Tera-2 indiferenciadas (Tabela 3.4, Figura 3.6). A análise estatística não deu suporte ao modelo de dois sítios de ligação para IGF-II nas células Tera-2 indiferenciadas, como consequência de um alto SSE e um nível significativo ($p < 0.01$) de amostra não-aleatória. Entretanto, após a diferenciação induzida das células Tera-2, o melhor enquadramento estatístico foi observado no modelo de dois sítios de ligação (Tabela 3.5, Figura 3.7). Embora o Teste Runs mostrasse que ambos os modelos eram baseados em conjuntos de dados aleatórios, o modelo de dois sítios de ligação exibe um SSE mais baixo e um enquadramento significativamente melhor baseado no valor obtido no Teste F.

Existem modificações quantitativas e qualitativas na ligação de IGF-II às células Tera-2 após a diferenciação induzida por DFMO. Os sítios de ligação para IGF-II aumentaram de um B_{max} de 4.7×10^{-12} moles/mg de proteína nas células indiferenciadas até um B_{max} de mais de 1.1×10^{-10} moles/mg de proteína após a diferenciação induzidas nas células Tera-2. As células

Tera-2 diferenciadas mostraram um sítio de alta afinidade e baixa capacidade ($KD1 = 1.1 \times 10^{-9}$ M, $B \text{ max } 1 = 2.6 \times 10^{-12}$ moles/mg de proteína) e um sítio de ligação de baixa afinidade e alta capacidade ($KD2 = 4.0 \times 10^{-8}$ M, $B \text{ max } 2 = 1.1 \times 10^{-10}$ moles/mg de proteína) para IGF-II. A ligação de IGF-II nas células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas foi também consideravelmente maior do que a ligação de IGF-I.

Tabela 3.4. Análise de saturação de IGF-II em células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas (não tratadas).

	Modelo de Sítio Único	Modelo de Dois Sítios
B max 1 (moles/mg de proteína)	4.7×10^{-12}	9.6×10^{-14}
KD1 (M)	2.3×10^{-9}	4.5×10^{-10}
B max 2 (moles/mg de proteína)	-	3.8×10^{-10}
KD2 (M)	-	1.5×10^{-7}
SSE	1.9×10^{-25}	5.1×10^{-18}
+ RES	3	-
- RES	7	10
GL	8	6
RUNS	$p > 0.05$	$p < 0.01$

Tabela 3.5. Análise de saturação de IGF-II em células de carcinoma embrionário humano Tera-2 diferenciadas (tratadas com DFMO).

	Modelo de Sítio Único	Modelo de Dois Sítios
B max 1 (moles/mg de proteína)	2.6×10^{-11}	2.6×10^{-12}
KD1 (M)	8.3×10^{-9}	1.1×10^{-9}
B max 2 (moles/mg de proteína)	-	1.1×10^{-10}
KD2 (M)	-	4.0×10^{-8}
SSE	2.4×10^{-25}	4.5×10^{-26}
+ RES	7	7
- RES	3	3
GL	8	6
RUNS	$p > 0.05$	$p > 0.05$
Teste F	-	2.2×10^{-3}

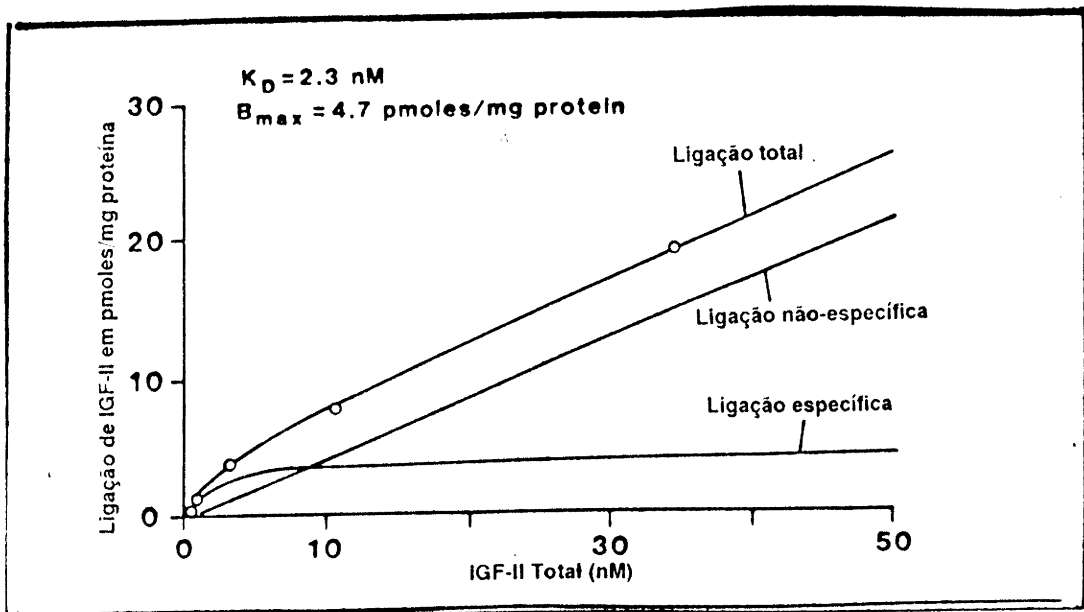


Figura 3.6. Curva de Saturação de IGF-II em células Tera-2 indiferenciadas.

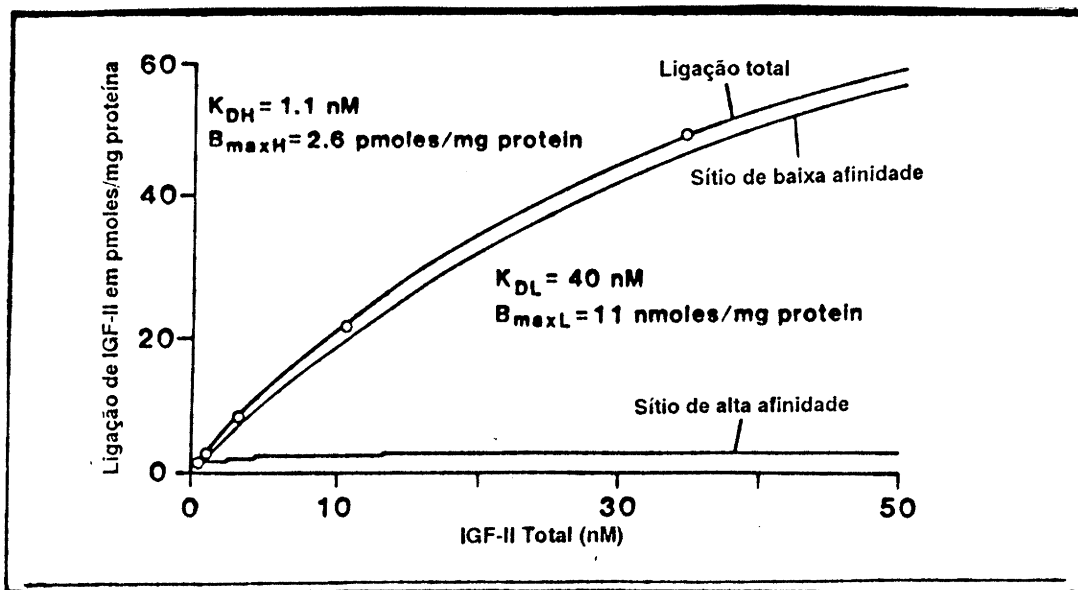


Figura 3.7. Curva de Saturação de IGF-II em células Tera-2 diferenciadas.

Ensaio de Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de [¹²⁵I] - IGF-I às Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Indiferenciadas

Os dados mostrados na Figura 3.8 demonstram os efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de [¹²⁵I] - IGF-I às células Tera-2 indiferenciadas. Tanto IGF-I quanto IGF-II não marcados competiram eficientemente pelos sítios de ligação para [¹²⁵I] - IGF-I. O K_D para IGF-I foi estimado em $1.21 \times 10^{-9} \text{ M}$ e foram calculados 7.0×10^3 sítios de ligação/célula. Usando o heteroligante, O K_D observado foi $3.6 \times 10^{-9} \text{ M}$, o que significa que IGF-II compete com igual afinidade pelos esperados 7.8×10^3 sítios de ligação para [¹²⁵I] - IGF-I.

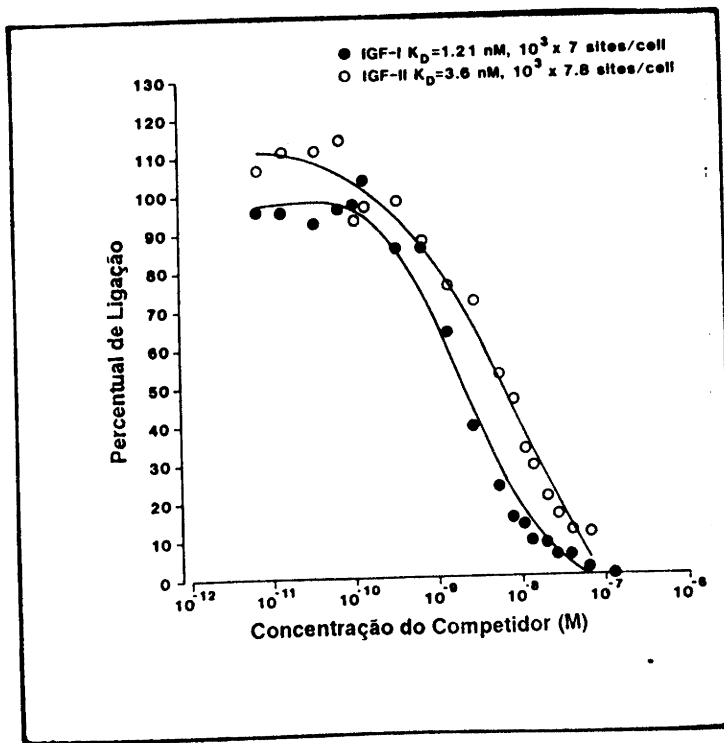


Figura 3.8. Efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I em células Tera-2 indiferenciadas (não tratadas).

Ensaio de Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I às Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Diferenciadas

Os dados mostrados na Figura 3.9 demonstram os efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I às células Tera-2 diferenciadas. Tanto IGF-I quanto IGF-II não marcados competiram com similar afinidade por $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I ($K_D = 1.03 \times 10^{-9} \text{ M}$ para IGF-I como competidor, e $K_D = 3.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ para IGF-II como competidor). Não houve diferença significativa na afinidade de IGF-I por seus sítios de ligação em células diferenciadas ($K_D = 1.03 \times 10^{-9} \text{ M}$) quando comparado às células indiferenciadas ($K_D = 1.21 \times 10^{-9} \text{ M}$). O número de sítios de ligação para IGF-I não teve alteração significativa durante o processo de diferenciação (próximo a 7.0×10^3 sítios/célula).

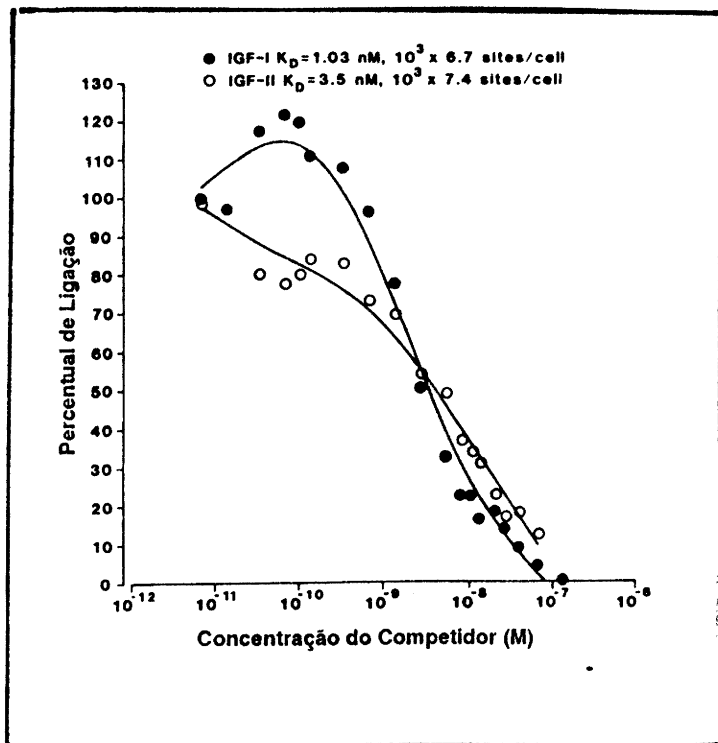


Figura 3.9. Efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I em células Tera-2 diferenciadas (tratadas com DFMO).

Ensaio de Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II às Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Indiferenciadas

Os dados mostrados na Figura 3.10 demonstram os efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II às células Tera-2 indiferenciadas. Embora o homoligante tenha eficientemente competido pelos sítios de ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II, IGF-I não mostrou competição. IGF-II mostrou um K_D de $8.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ e houveram 3.4×10^5 sítios de ligação/célula, um número consideravelmente maior do que aquele observado na ligação de IGF-I (7.0×10^3 sítios/célula) nas células Tera-2 indiferenciadas.

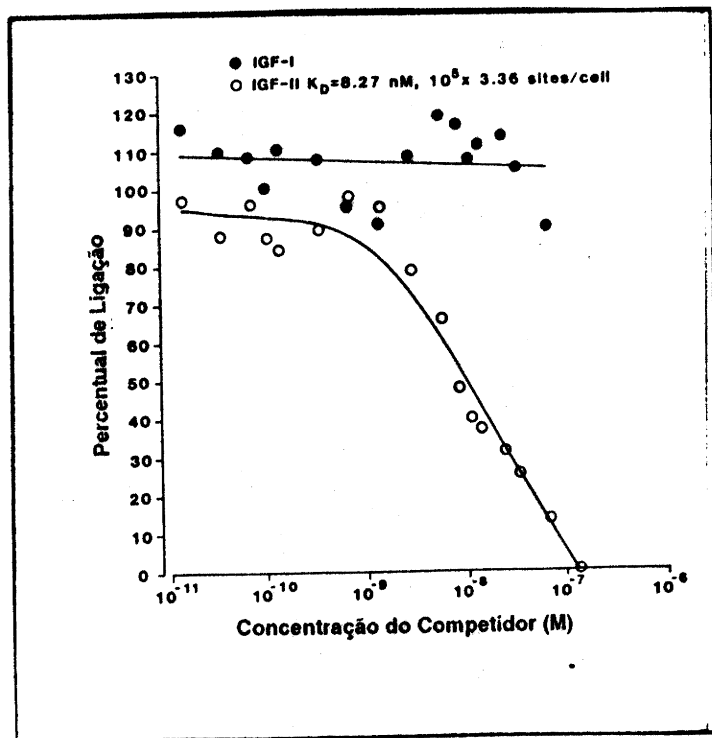


Figura 3.10. Efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II em células Tera-2 indiferenciadas (não tratadas).

Ensaio de Ligação Competitiva - Efeitos de IGF-I e IGF-II na Ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II às Células de Carcinoma Embrionário Tera-2 Diferenciadas

Os dados mostrados na Figura 3.11 demonstram os efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II às células Tera-2 diferenciadas. Novamente, IGF-I falhou em competir pelos sítios de ligação para $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II. Quando comparadas às células Tera-2 indiferenciadas, que possuem um sítio de ligação único para IGF-II, as células diferenciadas exibem um sítio de ligação com alta afinidade e baixa capacidade ($K_D = 3.1 \times 10^{-10} \text{ M}$, $2.2 \times 10^5 \text{ sítios/célula}$) e outro com baixa afinidade e alta capacidade ($K_D = 1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$, $1.6 \times 10^7 \text{ sítios/célula}$). Estes dados indicam um aumento dramático no número de sítios de ligação para IGF-II durante o processo de diferenciação, especialmente nos sítios de baixa afinidade.

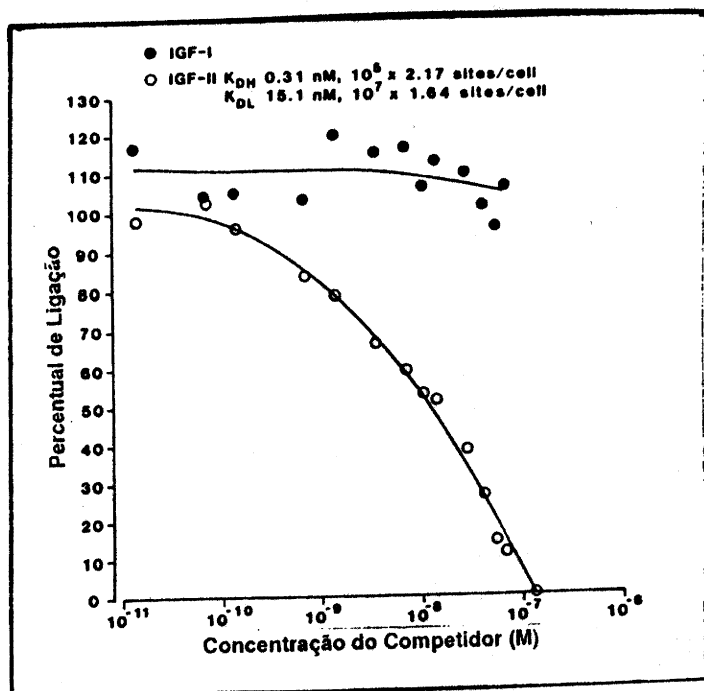


Figura 3.11. Efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação de $[^{125}I]$ - IGF-II em células Tera-2 diferenciadas (tratadas com DFMO).

Efeitos da Lavagem Ácida na Ligação à IGF

Usando um ensaio de ligação competitiva de ponto único, tanto as células Tera-2 indiferenciadas quanto as diferenciadas exibiram ligação à IGF-II que foi aproximadamente 20 vezes maior do que em relação à IGF-I (Figura 3.12).

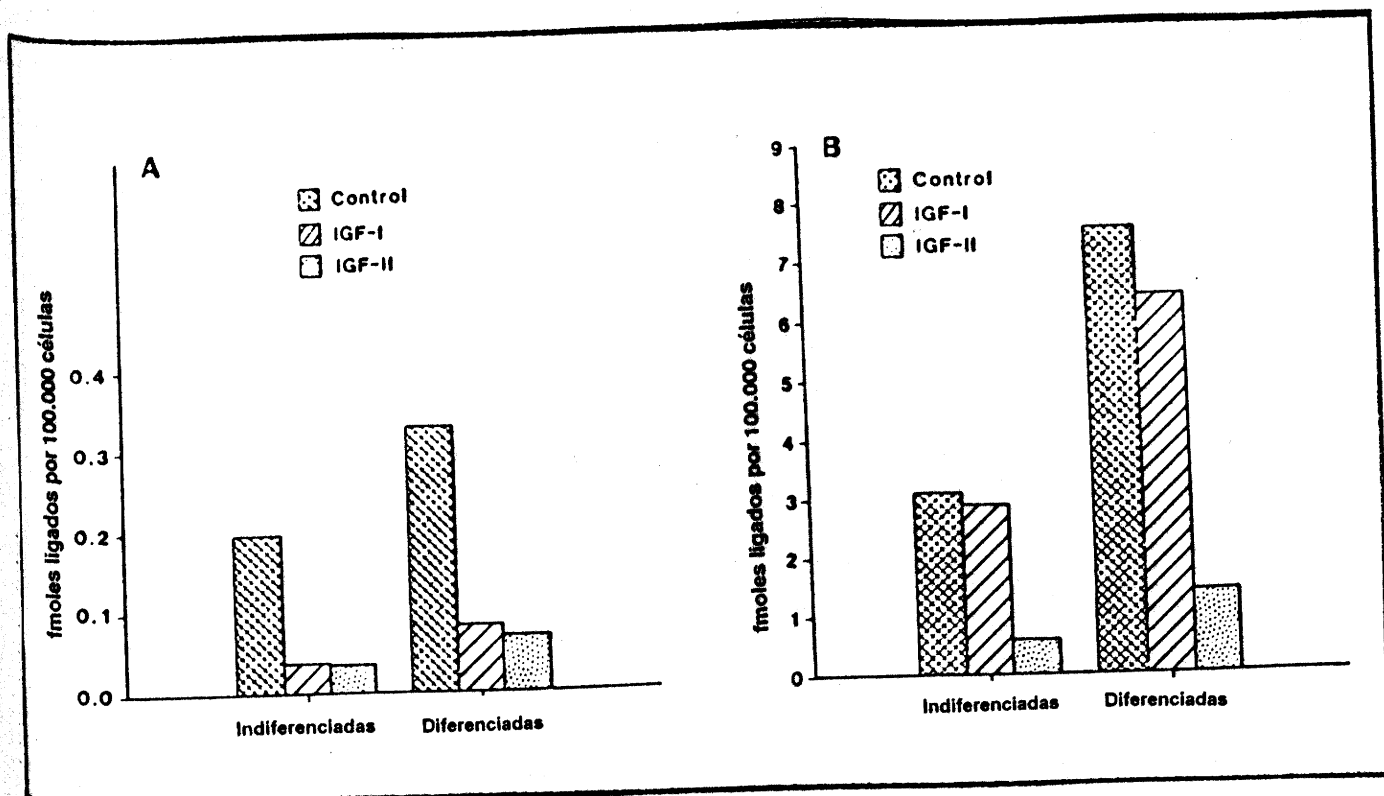


Figura 3.12. Efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação tanto de $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I (A) quanto $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II (B) - Ensaio competitivo de ponto único.

Para explorar mais a possibilidade de que as células Tera-2 pudessem estar secretando quantidades suficientes de IGFs para ocupar os receptores tipo I disponíveis com uma importante subestimação da população de receptores tipo I, as células foram lavadas com ácido para remover os ligantes endógenos na superfície celular.

Embora a lavagem ácida tenha aumentado a ligação tanto de IGF-I quanto de IGF-II em ambos os estágios da diferenciação, o número de receptores tipo I permanecia limitado, e tanto IGF-I quanto IGF-II pareceram possuir afinidades semelhantes por estes sítios de ligação (Figura 3.13).

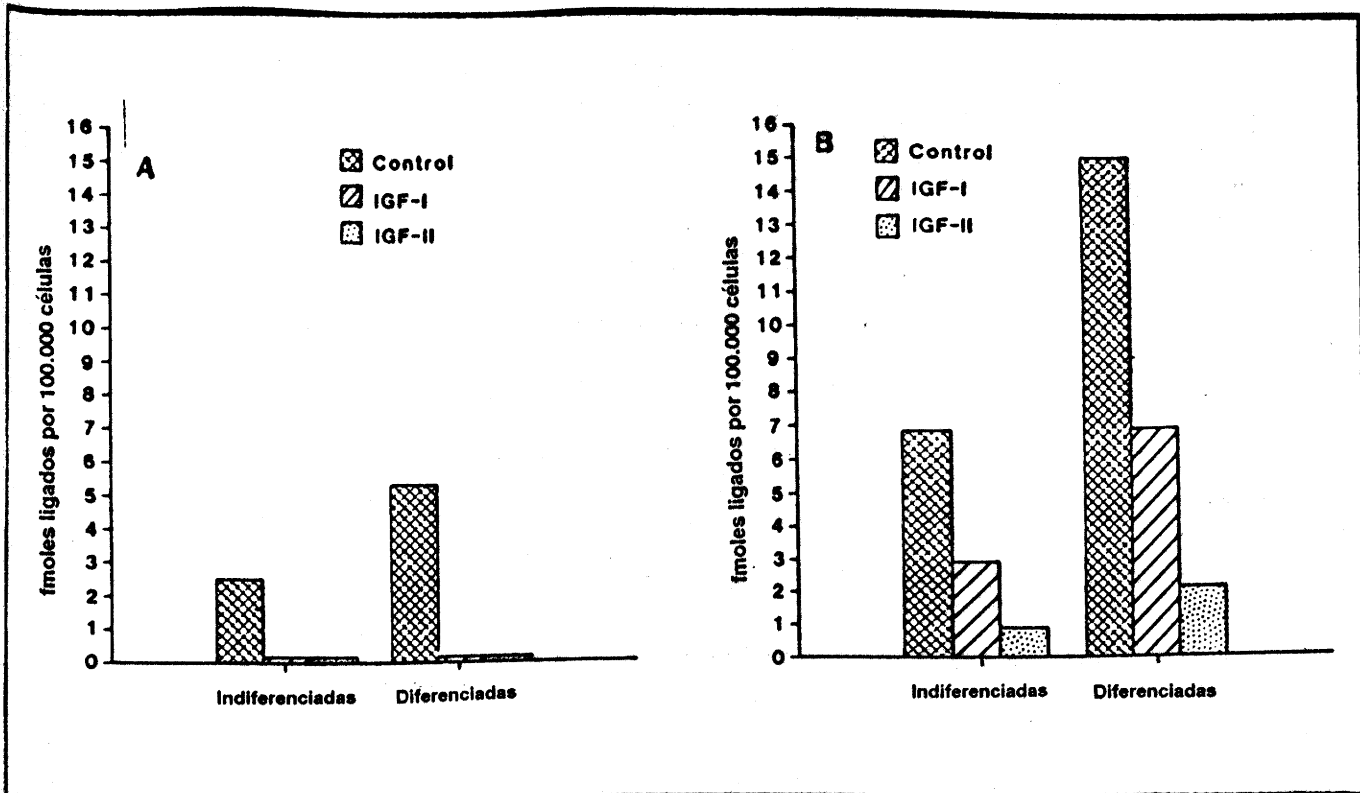


Figura 3.13. Efeitos de IGF-I e IGF-II na ligação tanto de $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I (A) quanto $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II (B) após lavagem ácida - Ensaio competitivo de ponto único.

Reação de Afinidade Cruzada

De modo a observar a natureza da modificação observada na ligação de IGF durante a diferenciação das células de carcinoma embrionário humano Tera-2, experimentos de afinidade de ligação cruzada foram realizados tanto nas células Tera-2 indiferenciadas quanto nas diferenciadas.

A ligação química cruzada de $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I tanto às células Tera-2 indiferenciadas quanto diferenciadas (Figura 3.14. A) indicou que o ligante liga-se à proteínas de pesos moleculares de aproximadamente 130 kDa (subunidade alfa do receptor tipo I para IGF) e 260 kDa (um dímero da subunidade alfa do receptor tipo I para IGF). A ligação de $[^{125}\text{I}]$ -IGF-I em ambas as bandas pode ser impedida pela adição de IGF-I ou IGF-II não marcados.

A ligação química cruzada de $[^{125}\text{I}]$ -IGF-II tanto às células Tera-2 indiferenciadas quanto diferenciadas (Figura 3.14. B) indicou que o ligante liga-se à proteínas de pesos

moleculares de 250 kDa (o peso molecular antecipado do receptor tipo II para IGF) e 130 kDa (o peso molecular antecipado da subunidade alfa do receptor tipo I para IGF). $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II também ligou-se a uma variedade de proteínas de baixo peso molecular (95 kDa, 70 kDa e 43 kDa) em ambos os estágios da diferenciação. Embora IGF-II não marcada bloqueasse o sítio para $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II, IGF-I não marcada não competiu pelos sítios de ligação de IGF-II. Enquanto que a maioria dos $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I ligaram-se a receptores do tipo I (bandas de 130 kDa e 260 kDa), a maioria dos $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II fez ligação cruzada com proteínas de ligação específica. A incapacidade de IGF-I não marcado em competir com $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II pela banda de 130 kDa levantou a hipótese de que esta banda não fosse o receptor tipo I, mas também uma proteína de ligação específica de IGF-II.

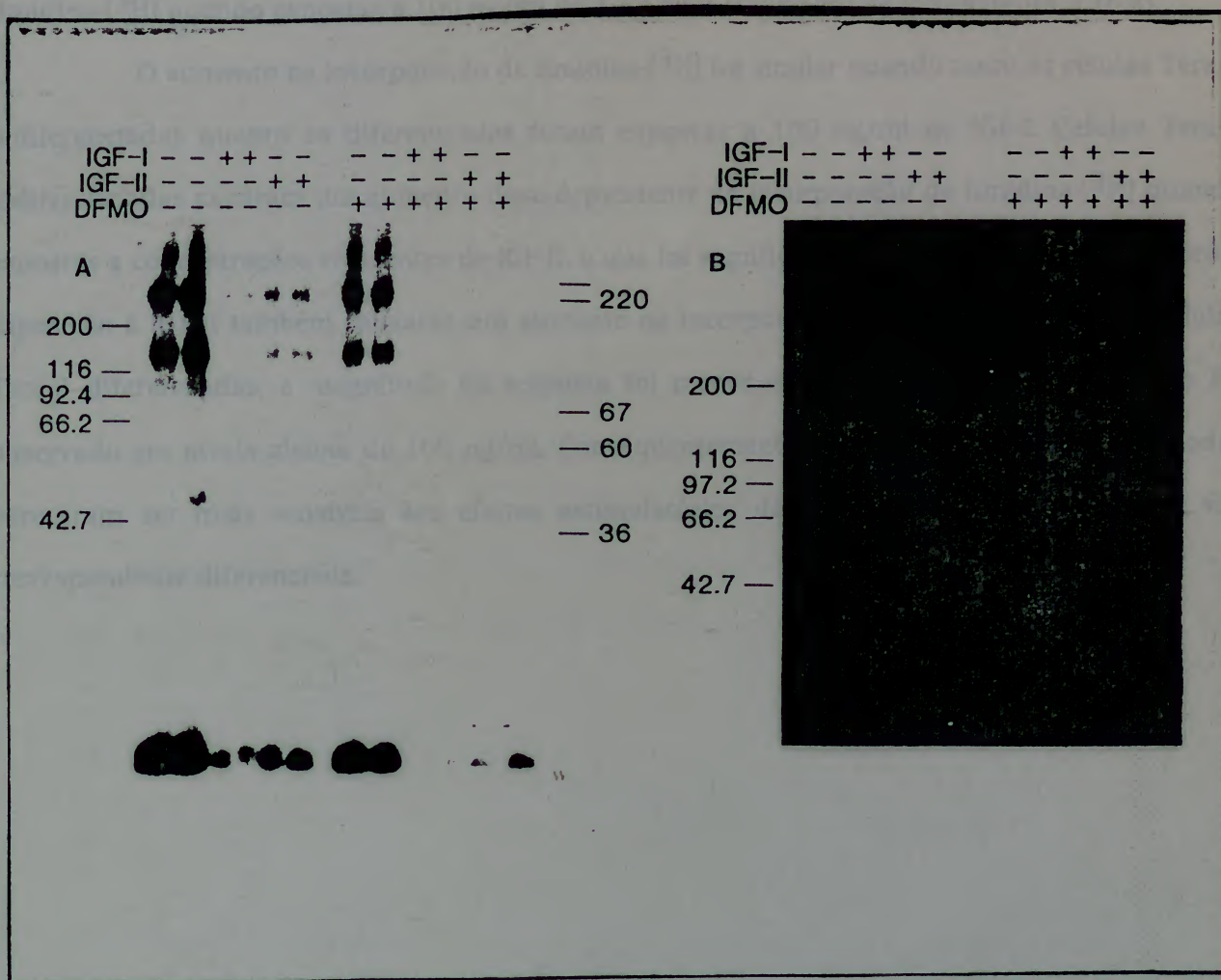


Figura 3.14. Reação de afinidade cruzada tanto de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-I (A) quanto de $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II (B) à células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas (DFMO -) e diferenciadas (DFMO +).

Captação de Timidina-[³H]

A modificação significativa na ligação à IGF após a diferenciação induzida por DFMO nas células de carcinoma embrionário humano Tera-2 conduziu a avaliação dos efeitos de IGFs na incorporação de timidina-[³H] por células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas.

As células Tera-2 indiferenciadas exibiram um aumento significativo na incorporação de timidina-[³H] quando expostas à 100 ng/ml de IGF-I ou igualmente a 50 ou 100 ng/ml de IGF-II(Figura 3.15.A).

As células Tera-2 diferenciadas exibiram um aumento significativo na incorporação de timidina-[³H] quando expostas à 100 ng/ml de IGF-I ou a 100 ng/ml de IGF-II(Figura 3.16.B).

O aumento na incorporação de timidina-[³H] foi similar quando tanto as células Tera-2 indiferenciadas quanto as diferenciadas foram expostas à 100 ng/ml de IGF-I. Células Tera-2 indiferenciadas exibiram um aumento dose-dependente na incorporação de timidina-[³H] quando expostas a concentrações crescentes de IGF-II, o que foi significativo em 50 e 100 ng/ml. Embora a exposição à IGF-II também causasse um aumento na incorporação de timidina-[³H] pelas células Tera-2 diferenciadas, a magnitude da resposta foi menor e um aumento significativo não foi observado em níveis abaixo de 100 ng/ml. Conseqüentemente, as células Tera-2 indiferenciadas pareceram ser mais sensíveis aos efeitos estimulatórios de IGF-II quando comparadas à sua correspondente diferenciada.

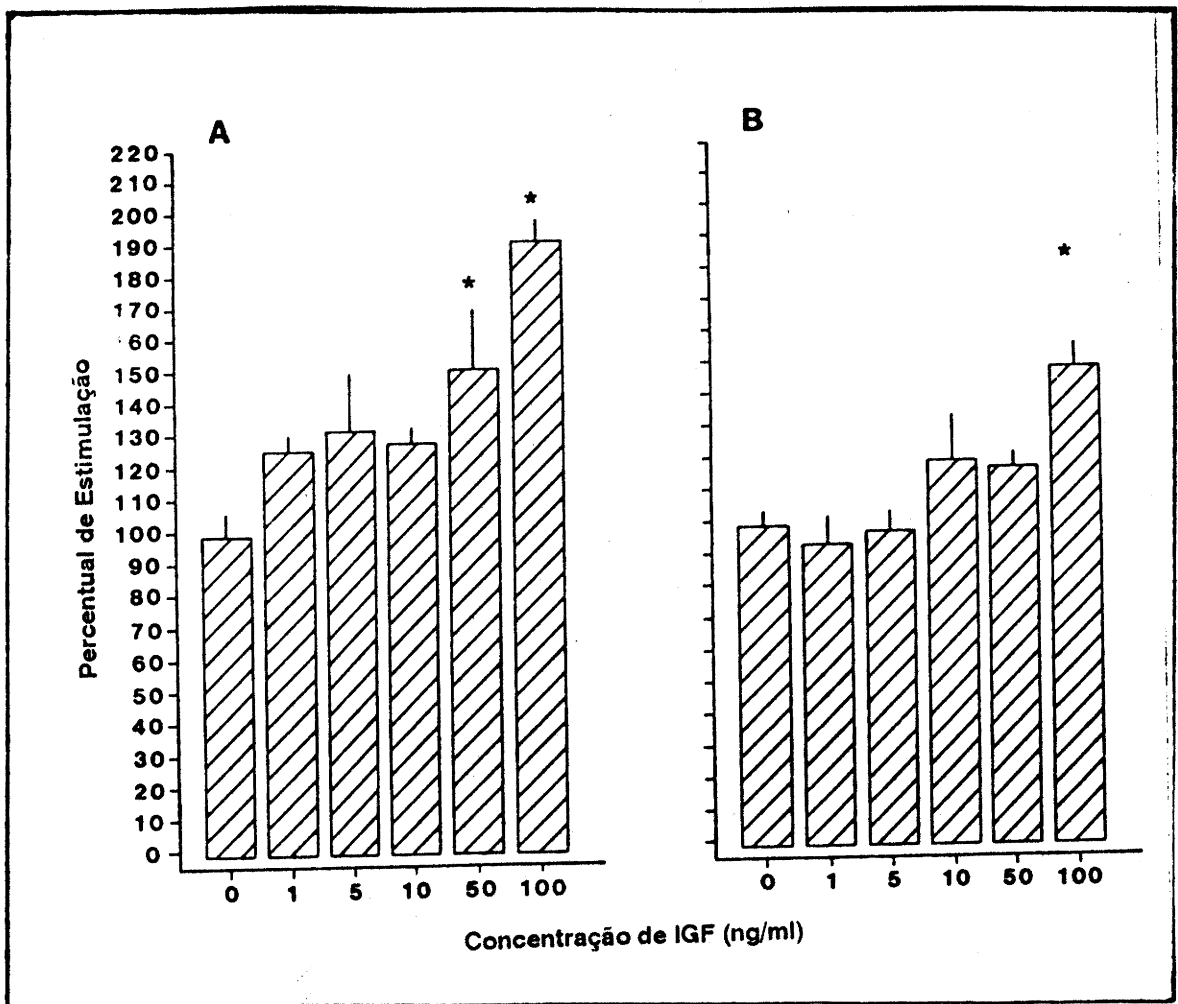


Figura 3.15. Efeitos dos IGFs na captação de timidina-[³H] pelas células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas (A) e diferenciadas (B).

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO

”

Os tumores de células germinativas representam o análogo maligno das células germinativas e, assim, são multipotentes in vitro e in vivo (171). Clinicamente, a capacidade de submeter-se à diferenciação espontânea é manifestada na formação dos teratomas (172). Teratomas, por sua vez, podem passar por outras diferenciações até carcinomas, sarcomas, neuroblastomas e leucemias (173-174). Não obstante o fato dos tumores de células germinativas indiferenciados serem caracterizados por taxas de crescimento elevadas e por um alto potencial maligno (175), os teratomas ocasionam a morte do paciente através de um crescimento local lento porém persistente ("the growing teratoma syndrome") (176).

Os fatores microambientais que regulam diferenciação e crescimento dos tumores de células germinativas não são bem compreendidos. Estudos in vitro em sistemas humanos e murinos tem implicado os IGFs na regulação do crescimento e diferenciação dos tumores de células germinativas (123,125-128,157). BIDDLE et al (158) afirmaram que os IGFs são os únicos polipeptídeos exógenos requeridos para manter o crescimento de células de carcinoma embrionário humano Tera-2 in vitro. Este trabalho vai além desta observação, analisando a ligação de IGF às células de carcinoma embrionário humano Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas in vitro.

No presente estudo, as células Tera-2 indiferenciadas ligaram [¹²⁵I] - IGF-I e [¹²⁵I] - IGF-II. Houve importante diferença quantitativa na ligação de IGFs, com uma ligação aproximadamente 20 vezes maior de IGF-II do que de IGF-I. A análise da ligação de IGF às células Tera-2 indiferenciadas sugere que tanto as ligações de IGF-I quanto de IGF-II sejam caracterizadas por um modelo de ligação de sítio único.

A ligação de IGF-I às células Tera-2 diferenciadas pode ser caracterizada como um modelo de sítio único, com alta afinidade e baixa capacidade, com sítios por célula quantitativamente similares aos vistos em células Tera-2 indiferenciadas. A ligação de IGF-II às células Tera-2 diferenciadas, entretanto, diferiu quantitativamente e qualitativamente daquela observada nas células Tera-2 indiferenciadas. A indução da diferenciação com DFMO resultou num aumento de 2 a 3 vezes na ligação de IGF-II às células Tera-2. A ligação de IGF-II às células Tera-2 diferenciadas foi melhor descrita por um modelo de dois sítios, um de baixa afinidade e alta capacidade e outro com alta afinidade e baixa capacidade.

Levantou-se a hipótese de que os sítios de ligação de baixa afinidade - alta capacidade para IGF-II pudessem representar proteínas ligantes de IGF. Estas proteínas ligantes têm sido identificadas em vários sistemas, e podem tanto inibir como estimular os efeitos no crescimento mediada por IGFs (139-142). Uma destas proteínas de ligação, isolada de fluido amniótico humano, mostrou inibir o crescimento de células de coriocarcinoma JEG-3 *in vitro* (143). Em um sistema de carcinoma embrionário murino, as proteínas ligante de IGFs foram produzidas por células diferenciadas, mas não por células indiferenciadas (125). Resultados similares foram observados em nosso modelo de diferenciação Tera-2, onde o aumento na ligação de IGF-II após a indução da diferenciação pode ser interpretado por um aumento nas proteínas ligantes. Para testar esta hipótese, a ligação de afinidade cruzada de IGFs foi realizada em ambos os estágios da diferenciação de células Tera-2.

A reação de afinidade cruzada de [125 I] - IGF-I com células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas ocorre principalmente com proteínas que exibem pesos moleculares de aproximadamente 130 kDa e 260 kDa, respectivamente a subunidade alfa do receptor tipo I e um dímero da subunidade alfa do receptor tipo I. IGF-I e IGF-II não marcados são igualmente efetivos em bloquear a ligação de [125 I] - IGF-I em ambas as bandas que representam o receptor tipo I (130 e 260 kDa). Este efeito foi observado nas células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas e é concordante com a baixa especificidade do receptor para IGF tipo I previamente descrita (129).

A reação de afinidade cruzada de [125 I] - IGF-II com células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas ocorre principalmente com proteínas que exibem pesos moleculares de aproximadamente 250 kDa (consistente com o receptor tipo II), 130 kDa (compatível com a subunidade alfa do receptor tipo I), 95 kDa, 70 kDa e 30 kDa (proteínas de ligação). A adição em excesso de IGF-I não conseguiu bloquear a ligação de [125 I] - IGF-II, enquanto que a adição em excesso de IGF-II foi efetiva em bloquear a ligação de [125 I] - IGF-II a todos os sítios de ligação em todos os estágios da diferenciação. Estes efeitos sugerem que todos os sítios de ligação descritos são específicos para IGF-II, incluindo as proteínas de ligação. A incapacidade de IGF-I não marcada em competir com [125 I] - IGF-II pela banda de 130 kDa levanta a hipótese de que esta banda não seja o receptor tipo I. A banda de 130 kDa observada no experimento de ligação cruzada com [125 I] - IGF-II pode também corresponder a uma proteína específica de ligação para IGF-II com

uma peso molecular similar ao que é observado no receptor para IGF tipo I. Os dados obtidos com ligação competitiva confirmam a incapacidade de IGF-I não marcado em competir com $[^{125}\text{I}]$ - IGF-II em ambos os estágios da diferenciação. Como esperado, IGF-II não marcado efetivamente competiu com o homoligante.

As alterações observadas na expressão da ligação de IGF-II após a diferenciação induzida por DFMO foram quantitativas e qualitativas. Após a diferenciação induzida nas células Tera-2, o número de sítios de ligação/célula para IGF-II aumentou em dois logs. O número mudou de 3.4×10^5 sítios de ligação/célula nas células Tera-2 indiferenciadas para mais de 1.6×10^7 sítios de ligação/célula após a diferenciação induzida. Modificações qualitativas foram baseadas na afinidade e capacidade dos sítios de ligação para IGF-II. Células Tera-2 indiferenciadas exibem apenas sítios de ligação de alta afinidade-baixa capacidade no ensaio de ligação competitiva, que podem corresponder ao receptor para IGF tipo II predominante. A falha nos ensaios de ligação competitiva em expressar sítios de ligação de baixa afinidade pode ser uma consequência da inabilidade do modelo matemático em discriminar diferenças na afinidade diante de um pequeno número de sítios de ligação/célula (baixa capacidade). As células Tera-2 diferenciadas expressam tanto o sítio de ligação de alta afinidade-baixa capacidade (receptor para IGF tipo II) quanto o sítios de ligação de baixa-afinidade-alta capacidade, que podem corresponder a um número aumentado de proteínas de ligação específicas para IGF-II.

Baseado nos ensaios de ligação competitiva e nos experimentos de reação de afinidade cruzada é possível afirmar que o número de receptores tipo II para IGF não se modifica durante a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2, pois o número de sítios de ligação de alta afinidade-baixa capacidade é muito similar em ambos os estágios de diferenciação. O aumento substancial no número de sítios de ligação para IGF-II durante a diferenciação das células Tera-2 ocorreu nos sítios de ligação de baixa afinidade, que foram considerados proteínas de ligação. Estas proteínas de ligação, especificamente, ligam IGF-II e podem funcionar com um "sink" fisiológico para o hormônio, diminuindo sua interação com o receptor tipo II efetivo.

Os efeitos estimulatórios de IGF-I na captação de timidina- $[^3\text{H}]$ foram similares nas células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas. Em ambos os estágios de diferenciação, um aumento significativo na incorporação de timidina- $[^3\text{H}]$ apenas na concentração mais alta de IGF-I

(100 ng/ml). Este efeito é consistente com a ausência de modificações quantitativas ou qualitativas na ligação de IGF-I durante a diferenciação induzida por DFMO nas células de carcinoma embrionário humano Tera-2. O ensaio de ligação de [125 I] - IGF-I mostrou a presença de sítios de ligação para IGF-I com similar afinidade e capacidade nas células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas. Em ambos os estágios da diferenciação das células Tera-2, ocorreu um pequeno número (7.0×10^3) de sítios de ligação/célula para IGF-I, com afinidades similares ($K_D = 1$ nM). A ligação cruzada de [125 I] - IGF-I demonstrou que IGF-I liga-se, quase que exclusivamente, aos receptores tipo I (bandas de 130 e 260 kDa) em ambos os estágios de diferenciação das células Tera-2. Quando todos estes dados são levados em consideração é possível concluir que as células Tera-2 ligam IGF-I a um número limitado de receptores do tipo I, o que não se modifica após a diferenciação induzida por DFMO. O efeito estimulatório significativo de IGF-I na captação de timidina- 3 H que ocorreu apenas na concentração mais alta é também uma consequência do pequeno número de receptores tipo I observados em ambos os estágios da diferenciação das células Tera-2.

Os efeitos estimulatórios de IGF-II na captação de timidina- 3 H foram similares nas células Tera-2 indiferenciadas e diferenciadas. Nas células Tera-2 indiferenciadas, um aumento significativo na incorporação de timidina- 3 H foi observado quando as células foram tratadas com 50 ou 100 ng/ml de IGF-II. Entretanto, após a diferenciação induzida por DFMO, um aumento significativo na incorporação de timidina- 3 H foi observado apenas na concentração mais alta de IGF-II (Insulin-like Growth Factor-II)(100 ng/ml). Estes efeitos são consistente com as modificações quantitativas e qualitativas na ligação a IGF-II observada após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2.

Ensaios de ligação mostraram um aumento significativo na ligação de IGF-II após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2. Os ensaios de ligação também demonstraram que a ligação de IGF-II aumentou nos sítios de baixa afinidade, com nenhuma modificação apreciável no número de receptores de alta afinidade. Os experimentos de ligação cruzada com [125 I] - IGF-II demonstraram a presença de receptor para IGF tipo II (250 kDa) e de uma variedade de proteínas de ligação (43 kDa, 70 kDa, 95 kDa e 130 kDa) em ambos os estágios da diferenciação das células Tera-2. Todos estes sítios de ligação são específicos para IGF-II. O

receptor tipo II pode corresponder aos sítios de ligação de alta afinidade, que não se alteram após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2. As proteínas de ligação podem corresponder aos sítios de ligação de baixa afinidade, que aumentam significativamente após a indução da diferenciação. Quando todos estes dados são levados em consideração é possível concluir que o número aumentado de proteínas de ligação expresso pelas células Tera-2 após a diferenciação induzida por DFMO é responsável pelo efeito de "sink" fisiológico. As proteínas de ligação especificamente ligam IGF-II, e diminuem sua interação com o receptor tipo II efetivo. Embora o receptor tipo II tenha uma afinidade mais alta por IGF-II do que as proteínas de ligação, estas são expressas por células Tera-2 diferenciadas em um número que é pelo menos dois logs de magnitude mais alto do que o do receptor tipo II. Este número aumentado das proteínas de ligação pode explicar o efeito estimulatório diminuído na captação de timidina-[³H] e crescimento observados após diferenciação induzida por DFMO em células de carcinoma embrionário humano Tera-2.

CAPÍTULO V

SUMÁRIO

»

A ligação dos fatores de crescimento semelhantes à insulina foi avaliada durante a diferenciação induzida em células de carcinoma embrionário humano Tera-2. A diferenciação foi induzida tratando-se as células com um solução 2.1 mM de alfa-difluorometilornitina (DFMO) por 72 horas, o que resultou em alteração da morfologia, uma diminuição na taxa de crescimento e uma expressão aumentada de dois antígenos diferentes (TRA-1-60 e TRA-1-81).

Quando incubadas com [125 I] - IGF-I, as células Tera-2 diferenciadas ligaram 2 a 3 vezes mais IGF-II do que as células Tera-2 indiferenciadas. Entretanto, nenhuma modificação foi observada na ligação à IGF-I durante o processo de diferenciação. A ligação à IGF-II foi aproximadamente 20 vezes maior do que à IGF-I em ambos os estágios da diferenciação das células Tera-2. A ligação de [125 I] - IGF-II foi efetivamente bloqueada pela adição de IGF-II não marcada, mas não por IGF-I não marcada, enquanto que a ligação de [125 I] - IGF-I foi bloqueada tanto por IGF-I quanto por IGF-II não marcados.

Num ensaio de ligação competitiva, IGF-I falhou em competir pelos sítios de ligação de IGF-II em concentrações inferiores a 10^{-7} M. Uma modificação qualitativa também foi observada nos sítios de ligação para IGF-II após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2. Células Tera-2 indiferenciadas exibiram uma classe única de sítios de ligação para IGF-II (Insulin-like Growth Factor-II)($K_D = 8.3$ nM, 3.4×10^5 sítios/célula), enquanto que as células Tera-2 diferenciadas expressaram duas classes de sítios de ligação para IGF-II: um sítio de alta afinidade-baixa capacidade ($K_{DH} = 0.31$ nM, 2.2×10^5 sítios/célula) e um sítio de baixa afinidade-alta capacidade ($K_{DL} = 15.1$ nM, 1.6×10^7 sítios/célula).

Em experimentos de ligação química cruzada, [125 I] - IGF-I ligou-se quase que exclusivamente ao receptor tipo I, e [125 I] - IGF-II ligou-se tanto ao receptor tipo II quanto a uma variedade de proteínas de ligação. IGF-II não marcado (mas não IGF-I não marcado) preveniu a ligação cruzada de [125 I] - IGF-II às proteínas de ligação, sugerindo a presença de proteínas de ligação específica para IGF-II. O número aumentado observado de sítios de ligação específicos para IGF-II após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2 pode representar proteínas de ligação, pois esta alteração quantitativa ocorreu principalmente no sítios de ligação de baixa afinidade.

Uma diminuição significativa nos efeitos estimulatórios de IGF-II na captação de timidina-[³H] foi observada após a diferenciação induzida por DFMO nas células de carcinoma embrionário humano Tera-2. Estes efeitos podem ser explicados pelo número aumentado de proteínas de ligação específicas para IGF-II presente após a diferenciação. As proteínas de ligação para IGF-II podem funcionar como um "sink" fisiológico para o hormônio, diminuindo sua interação com o receptor tipo II efetivo.

CONCLUSÕES

* A alfa-difluorometilornitina (DFMO) induz diferenciação em células de carcinoma embrionário humano Tera-2.

* A ligação de IGF-II é consideravelmente maior do que a ligação de IGF-I, em ambos os estágios de diferenciação das células Tera-2.

* A diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2 resulta em um aumento de 2 a 3 vezes na ligação de IGF-II.

* Tanto nas células Tera-2 indiferenciadas como nas diferenciadas, IGF-I liga-se a um número limitado de receptores de alta afinidade, e não ocorrem modificações quantitativas ou qualitativas na ligação de IGF-I após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2.

* Células Tera-2 indiferenciadas ligam IGF-II em uma classe única de sítios de ligação de alta afinidade. Após a diferenciação induzida por DFMO, as células Tera-2 ligam IGF-II não apenas aos sítios de ligação de alta afinidade previamente mencionados, mas também a um grande número de sítios de ligação de baixa afinidade.

* Os sítios de ligação de baixa afinidade-alta capacidade para IGF-II observados após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2 podem representar proteínas de ligação específicas demonstradas nos experimentos ligação de afinidade cruzada.

* O grande número de proteínas de ligação para IGF-II observadas após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2 pode funcionar como um "sink" fisiológico para o hormônio. O efeito de "sink" fisiológico diminui a interação de IGF-II com o receptor para IGF tipo II efetivo, o que pode explicar a diminuição significativa nos efeitos estimulatórios de IGF-II na captação de timidina-[³H] observada após a diferenciação induzida por DFMO nas células Tera-2.

REFERÊNCIAS

1. Deuel, T.F. Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth. *Ann Rev Cell Biol* 3: 443-492, 1987.
2. Goustin, A.S., Leof, E.B., Shipley, G.D., and Moses, H.L. Growth factors and cancer. *Cancer Res* 46: 1015-1029, 1986.
3. Denekamp, J., and Hobson, B. Endothelial proliferation in normal and tumor blood vessels. *Microvasc Res* 27: 388, 1984.
4. Wrann, M., Fox, C.F., and Ross, R. Modulation of epidermal growth factor receptors on 3T3 cells by platelet-derived growth factor. *Science* 210: 1363-1365, 1980.
5. Fabricant, R.N., DeLarco, J.E., and Todaro, G.J. Nerve growth factor receptor on human melanoma cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 565-569, 1977.
6. Bowen-Pope, D.S., DiCorleto, P.E., and Ross, R. Interactions between the receptors for platelet-derived growth factor and epidermal growth factor. *J Cell Biol* 96: 679-683, 1983.
7. Shields, R. Growth factors for tumors. *Nature* 272: 670-671, 1978.
8. Pledger, W.J., Stiles, C.D., Antoniades, H.N., and Scher, C.D. An ordered sequence of events in required before BALB/c-3T3 cells become committed to DNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2839-2843, 1978.
9. Leof, E.B., Wharton, W., VanWyk, J.J., and Pledger, W.J. Epidermal growth factor (EGF) and somatomedin C regulate G1 progression in competent BALB/c-3T3 cells. *Exp Cell Res* 141: 107-115, 1982.
10. Barnes, D., Sato, G. Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell* 22: 649-655, 1980.
11. Walthall, B.J., Ham, R.G. Multiplication of human diploid fibroblasts in a synthetic medium supplemented with EGF, insulin and dexametasone. *Exp Cell Res* 134: 301-309, 1981.
12. Tsao, M.C., Walthall, B.J., Ham, R.G. Clonal growth of human keratinocytes in a defined medium. *J Cell Physiol* 110: 219-229, 1982.
13. Wharton, W., Leof, E., Olashaw, N., O'Keefe, E.J., and Pledger, W.J. Mitogenic response to epidermal growth factor (EGF) modulated by platelet-derived growth factor in cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* 147: 443-448, 1983.
14. O'Keefe, E.J., Pledger, W.J. Review: a model of cell control - sequential events regulated by growth factors. *Mod Cell Endocrinol* 31: 167-186, 1983.
15. Temin, H.M. Studies on carcinogenesis by avian sarcoma viruses. The differential effect of serum and polyanions on multiplication of uninfected and converted cells. *J Natl Cancer Inst* 37: 167-175, 1966.
16. Paul, D., Lipton, A., and Klinger, I. Serum factor requirements of normal and simian virus-40-transformed 3T3 mouse fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 645-648, 1971.
17. Dullbeco, R. Topoinhibition and serum requirement of transformed and untransformed cells. *Nature* 227: 802, 1970.
18. Kaplan, P.L., Anderson, M., and Ozanne, B. Transforming growth factor production enables cells to growth in the absence of serum: an autocrine system. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 485-489, 1982.

19. Moses, H.L., Proper, J.A., Volkenant, M.E., Wells, D.J., and Getz, M.J. Mechanism of growth arrest of chemically transformed cells in culture. *Cancer Res* 38: 2807-2812, 1978.
20. Sporn, M.B., and Todaro, G.J. Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *N Engl J Med* 303: 878-880, 1980.
21. Moses, H.L., and Robinson, R.A. Growth factors, growth factor receptor and cell cycle control mechanisms in chemically transformed cells. *Fed Proc* 41: 3008-3011, 1982.
22. Clemmons, D.R., and VanWik, J.J. Evidence of a functional role of endogenously produced somatomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J Clin Invest* 75: 1914-1918, 1985.
23. Betsholtz, C., Westermarck, B., Ek, B., and Heldin, C.H. Coexpression of a PDGF-like growth factor and PDGF receptors in a human osteosarcoma cell line: implication for autocrine receptor activation. *Cell* 39: 447-457, 1984.
24. Goustin, A.S., Betsholtz, C., Pfeifer-Ohlsson, S., Persson, H., Rydnert, J., Bywater, M., Holmgren, G., Heldin, C.H., Westermarck, B., and Ohlsson, R. Coexpression of the *sis* and *myc* proto-oncogenes in developing human placenta suggests autocrine control of trophoblast growth. *Cell* 41: 301-312, 1983.
25. Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D., and Leder, P. Cell-specific regulation of the *m-myc* gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 35: 603-610, 1983.
26. Greenberg, M.E., and Ziff, E.B. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* 311: 433-448, 1984.
27. Muller, R., Bravo, R., Burckhardt, J., and Curran, T. Induction of *c-fos* gene and protein by growth factors precedes activation of *c-myc*. *Nature* 312: 716-720, 1984.
28. Kruijer, W., Cooper, J.A., Hunter, T., Verma, I.M. Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein. *Nature* 312: 711-716, 1984.
29. Stern, D.F., Roberts, A.B., Roche, N.S., Sporn, M.B., and Weinberg, R.A. Differential responsiveness of *myc*- and *ras*-transfected cells to growth factors: selective stimulation of *myc*-transfected cells by epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 6: 870-877, 1986.
30. Scher, C.D., Shepard, R.C., Antoniades, H.N., Stiles, C.D. Platelet-derived growth factor and the regulation of the mammalian cell cycle. *Biochem Biophys Acta* 560: 217-241, 1979.
31. Waterfield, M.D., Scrace, G.T., Whittle, N., Stroombant, P., Johnson, A., Wasteson, A., Westermarck, B., Heldin, C.H., Huang, J.S., and Deuel, T.F. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28_{sis} of simian sarcoma virus. *Nature*, 304: 35-39, 1983.
32. Doolittle, R.G., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., Devare, S.G., Robbins, K.C., Aaronson, S.A., and Antoniades, H.N. Simian sarcoma virus oncogene *v-sis* is derived from the gene (or genes) encoding a platelet derived growth factor. *Science* 221: 275-277, 1983.
33. Downward, J., Yarden, Y., Mayer, E., Scarce, G., Totty, N., Stockwell, P., Ullrich, A., Schlessinger, J., and Waterfield, M.D. Close similarity of epidermal growth factor receptor and *v-erbB* oncogene protein sequences. *Nature* 307: 521-527, 1984.
34. Sherr, C.J., Rettenmier, C.W., Sacca, R., Roussel, M.F., Look, A.T., and Stanley, E.R. The *c-fms* proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1. *Cell* 41: 665-676, 1985.
35. Mulcahy, L.S., Smith, M.R., and Stacey, D.W. Requirement of *ras* proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature* 313: 241-243, 1985.

36. Cohen, S., Hushiro, H., Stoscheck, C., and Chinkers, M. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed membrane vesicles. *J Biol Chem* 257: 1523-1531, 1982.
37. Pastan, I.H., and Willingham, M.C. Journey to the center of the cell: role of the receptosome. *Science* 214: 504-509, 1981.
38. Rose, S.P., Pruss, R.M., and Herschman, H.R. Initiation of 3T3 fibroblast cell division by epidermal growth factor. *J Cell Physiol* 86: 593-598, 1975.
39. Shipley, G.B., Childs, C.D., Volkenant, M.E., and Moses, H.L. Differential effects of epidermal growth factor, transforming growth factor and insulin on DNA and protein synthesis and morphology in serum-free cultures of ARK-2B cells. *Cancer Res* 44: 710-716, 1984.
40. Person, H., and Leder, P. Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. *Science* 225: 718-721, 1984.
41. Curran, T., Miller, A.D., Zokas, L., and Verma, I.M. Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* 36: 259-268, 1984.
42. Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R., and Eisen, R.N. Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* 29: 417-439, 1982.
43. Alitalo, K., Ramsay, G., Bishop, J.M., Pfeiffer, S.O., Colby, W.W., and Levinson, A.D. Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. *Nature* 306: 274-277, 1983.
44. Eisemann, R.N., Tashibana, C.Y., Abrams, H.D., and Hanna, S.R. V-myc and c-myc encoded proteins are associated with the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* 5: 114-126, 1985.
45. Leof, E.B., Proper, J.A., Goustin, A.S., Shipley, G.D., DiCorleto, P.E., and Moses, H.L. Induction of the c-sys mRNA and activity similar to platelet-derived growth factor by transforming growth factor beta: a proposed model for indirect mitogenesis involving autocrine activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2453-2457, 1986.
46. Leof, E.B., Proper, J.A., and Moses, H.L. Transforming growth factor type beta regulation of actin mRNA. *J Cell Physiol* 127: 83-88, 1986.
47. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M., and Crombrugghe, B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. *J Cell Biol* 105: 1039-1045, 1976.
48. Massague, J. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. *Cell* 49: 437-438, 1987.
49. Cheifetz, S., Wheaterbee, J.A., Tsang, M.L.S., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R., and Massague, J. The transforming growth factor beta system: a complex pattern of cross reactive ligands and receptors. *Cell* 48: 409-415, 1987.
50. Hutchinsinon, L.A., Findlay, J.K., Vos, F.L., and Robertson, M.D. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor beta and bovine actin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 1405-1412, 1987.
51. Mason, A.J., Hayflick, J.S., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Ying, S.I., Guillemin, R., Niall, H., and Seeburg, P.H. Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor beta. *Nature* 318: 659-663, 1985.
52. Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D., and Spiess, J. Purification and characterization of an FSH-releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321: 776-779, 1986.

53. Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, S., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321: 779-782, 1986.
54. Cate, R.L., Mattaliano, R.J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N.M., Cheung, A., Ninfa, E.G., Frey, A.Z., Gash, D.J., Chow, E.P., Fisher, R.A., Bertonis, J.M., Torres, G., Wallner, B.P., Ramachandran, K.R., Ragin, R.C., Manganaro, T.F., MacLaughlin, D.T., and Donahoe, P.K. Isolation of the bovine and human genes from mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45: 685-698, 1986.
55. Padgett, R.W., StJohnston, R.D., and Gelbart, W.M. A transcript of a Drosophila pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor beta family. *Nature* 325: 81-84, 1987.
56. Holey, R.W., Bohlen, P., Fava, R., Baldwin, J.H., Kleeman, G., and Armour, R. Purification of kidney epithelial cell growth inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5989-5992, 1980.
57. Tucker, R.F., Shipley, G.D., Moses, H.L., and Holley, R.W. Growth inhibition of BSC-1 cells closely related to TGF-beta transforming growth factor. *Science* 226: 705-707, 1984.
58. Roberts, A.B., Anzano, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F., and Sporn, M.B. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 119-123, 1985.
59. Like, B., and Massague, J. The antiproliferative effect of type beta transforming growth factor occurs at a level distal from receptors for growing-activating factors. *J Biol Chem* 261: 1342-1369, 1986.
60. Ignatz, R.A., and Massague, J. Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8530-8534, 1985.
61. Seyedin, S.M., Thompson, A.F., Bentz, H., Rosen, D.M., McPherson, J.M., Conti, A., Siegel, R.N., Gallupi, G.R., and Piez, K.A. Cartilage-inducing factor A: apparent identity to transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 261: 5693-5695, 1986.
62. Massague, J., Cheifetz, S., Endo, T., Nadal-Guinard, B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8206-8210, 1986.
63. Masui, T., Wakefield, L.M., Lechner, J.F., LaVeck, M.A., Sporn, M.B., and Harris, C.C. Type beta transforming growth factor is the primary differentiation-inducing serum factor from normal human bronchial epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2438-2442, 1986.
64. Postlethwaite, A.E., Keski-Oja, J., Moses, H.L., and Kang, A.H. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 165: 251-256, 1987.
65. Ignatz, R., and Massague, J. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337-4345, 1986.
66. Jones, K.A., Kadonaga, J.T., Rosenfeld, P.J., Kelly, T.J., and Tjian, R. A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell* 48: 79-89, 1987.
67. Laiho, M., Sakesela, O., Andreasen, P.A., and Keski-Oja, J. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor beta. *J Cell Biol* 103: 2403-2410, 1986.

68. Docherty, A.J.P., Lyons, A., Smith, B.J., Wright, E.M., Stephens, P.E., Harris, T.J.R. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318: 66-69, 1985.
69. Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wakefield, L.M., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Roberts, A.B., and Sporn, M.B. Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 5788-5792, 1987.
70. Hay, E.D. Collagen and embryonic development. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Hay ED (ed). Plenum Publishing Corp., New York, 379-409, 1981.
71. Heine, U.I., Flandres, K., Roberts, A.B., Munoz, E.F., and Sporn, M.B. Immunocytochemical localization of TGF-beta during embryonal development in mice. *Proc Am Assoc Cancer Res* 28: 53, 1987.
72. Bellairs, R., Ede, D.A., Lash, J.W. (ed): *Somites in Developing Embryos*. Plenum Publishing Corp., New York, 320pp.
73. Nussbaum, M. Die differenzierung des geschlechts in tierreich. *Arch Mikrosk Anat* 18:1-121, 1880.
74. Weismann, A. *Das Keimplasm. Eine theorie der vererbung*. Jena, Germany, Fischer, 1892.
75. Addy, E.M. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *Int Rev Cytol* 43: 229-280, 1975.
76. Mintz, B. Continuity of the female germ cell line from embryo to adult. *Arch Anat Microsc Morphol* 48: 155-172, 1959.
77. McLaren, A. The fate of germ cells in the testis of fetal sex-reversed mice. *J Reprod Fertil* 61: 461-467, 1981.
78. Miyayama, Y., Fuyuta, M., and Fujimoto, T. Ultrastructural observation on the origin, ameboid features, and associations of the human primordial germ cells. *Acta Anat Nippon* 52: 255-268, 1977.
79. McKay, D.C., Hertig, A.T., Adams, E.C., and Danziger, S. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec* 117: 201-219, 1953.
80. Mintz, B., Russel, E.S. Gene induced embryogenical modification of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool* 134: 207-230, 1957.
81. Chiquoine, A.D. The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118: 135-145, 1954.
82. Heath, J.K. Characterization of a xenogeneic antiserum raised against the fetal germ cells of the mouse: cross-reactivity with embryonal carcinoma cells. *Cell* 15: 299-306, 1978.
83. Eddy, E.M., and Hahnel, A.C. Establishment of the germ cell line in mammals. In: *Current Problems in Germ Cell Differentiation*, McLaren and Wylie (ed.), Cambridge, UK, Cambridge Univ Press, 1983, pp 41-69.
84. Byskov, A.G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66: 71-117, 1986.
85. Jirasek, J.E. *Development of the Genital System and Male Pseudohermaphroditism*. Baltimore, MD, Johns Hopkins Univ Press, 1981.

86. McIlhinney, R.A.J. The biology of the human germ cell tumours. Experimental approaches. In: *Current Problems in Germ Cell Differentiation*, McLaren and Wylie (ed.), Cambridge, UK, Cambridge Univ Press, 1983, pp 175-197.
87. Stevens, L.C. Comparative development of normal and partenogenic mouse embryos, early testicular and ovarian teratomas and embryoid bodies. In: *Teratoma and Differentiation*. Sherman and Solter (ed.), New York, Academic Press, 1975, pp 17-32.
88. Gondos, B., and Byskov, A.G. Germ cell kinetics in the neonatal rabbit testis. *Cell Tissue Res* 215: 143-151, 1981.
89. Ritzen, E.M., Hansson, V., and French, F.S. The Sertoli Cells, In: *The Testis*, Burger and Kretser (ed.), New York, Raven Press, 1981, pp 171-194.
90. Fawcett, D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: *Handbook of Physiology. Male Reproductive System*, Greep and Astwood (ed.), Washington D.C., Am Physiol Soc, 1975, pp 21-51.
91. Sterberger, E. Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol Rev* 51: 1-22, 1971.
92. Eik-Nes, K. Patterns of steroidogenesis in the vertebrate gonads. *Gen Comp Endocrinol Suppl* 2: 87-100, 1969.
93. Gondos, B. Cellular interrelationships in the human fetal ovary and testes. In: *Advances in Morphology of Cells and Tissues*, New York, Liss Press, 1981, pp 373-381.
94. Gondos, B, and Connell, C.J. Cellular interrelationships in the fetal rabbit testis. *Arch Androl* 1: 19-30, 1978.
95. Clements, J.A., Reyes, F.I., Winter, J.S.D., and Faiman, C. Studies on the human sexual development III. Fetal pituitary and serum, and amniotic fluid concentration of KH, CG and FSH. *J Clin Endocrinol Med* 42: 9-19, 1976.
96. Molsberry, R.L., Carr, B.R., and Mendelson, C.R. Human chorionic gonadotropin binding to human fetal testis as a function of gestational age. *J Clin Endocrinol Metab* 55: 791-794, 1982.
97. Zondek, L.H., Zondek, T. Ovarian hilar cells and testicular Leydig cells in anencephaly. *Biol Neonate* 43: 211-219, 1983.
98. Josso, N. Differentiation of the genital tract: stimulators and inhibitors. In: *Mechanism of Sex Differentiation in Animals and Man*, Austin and Edwards (ed.), London, Academic Press, 1981, pp 165-203.
99. Hammond, J.M., Barano, J.L.S., Skaleris, D., Knight, A.B., Romanus, J.A., Rechler, M.M. Porcine granulosa cells secrete somatomedin C/Insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 117: 2553-2555, 1985.
100. Benahmed, M., Morera, A.M., Chauvin, M.C., and Peretti, E. Somatomedin C/Insulin-like growth factor I as a possible intratesticular regulator of Leydig cell activity. *Mol Cell Endocrinol* 50: 69-77, 1987.
101. Sharpe, R.M. Tubular factors influence Leydig cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 30: 29-49, 1984.
102. Chatelain, P.G., Naville, D., and Saez, J.M. Somatomedin C/Insulin-like growth factor I-like material secreted by porcine Sertoli cells "in vitro": Characterization and regulation. *Bioch Bioph Res Comm* 146: 1009-1017, 1987.

103. Tres, L.L., Smith, E.P., VanWyk, J.J., and Kierszbaum, A.L. Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin C in rat Sertoli-spermatogenic cell co-cultures. *Exp Cell Res* 162: 33-50, 1986.
104. Martin, G.R. Teratocarcinoma and mammalian embryogenesis. *Science* 209: 768-776, 1980.
105. Martin, G.R., Wiley, L.M., and Damjanov, I. The development of cystic embryoid bodies "in vitro" from teratocarcinoma stem cells. *Dev Biol* 61: 69, 1977.
106. Papaioannou, V.E., and Rossant, J. Effects of embryonic environment on proliferation and differentiation of embryonal carcinoma cells. *Cancer Surv* 2: 165-179, 1983.
107. Solter, D., Dominis, E.D., and Danjanov, I. Embryo-derived teratocarcinoma. I. The role of strain and gender in the control of teratocarcinogenesis. *Int J Cancer* 24: 770-776, 1979.
108. Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634, 1981.
109. Jakobovitz, A., Banda, M.J., and Martin, G.R. Embryonal carcinoma-derived growth factors: specific growth-promoting and differentiation-inhibiting activities. *Cancer Cells* 3: 393-399, 1985.
110. Friend, C., Sher, W., Holland, J.C., and Sato, T. Hemoglobin synthesis in murine virus induced leukemic cells "in vitro": stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulphoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 378, 1971.
111. Marks, P.A., Rifkins, R.A., Bank, A., Terada, H., Reuben, R., Fibach, E., Nudel, U., Salman, J., and Gazitt, Y. Eukaryotic cell differentiation: induction of differentiation of murine erythroleukemia cells. ICN-UCLA. *Symp Mol Cell Biol* 10: 145, 1978.
112. Yamasaki, H.E., Fibach, E., Nudel, U., Weinstein, I.B., Rifkind, R.A., and Marks, P.A. Tumours promoters inhibit spontaneous and induced differentiation of murine erythroleukemia cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3451, 1977.
113. Orkin, S.H., Harosi, F.I., and Leder, P. Differentiation in erythroleukemia cells and their somatic hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 98, 1975.
114. VanWyk, J.J., Underwood, L., Hutz, R., Clemmons, D., Voina, S., and Weaver, R. The somatomedins: a family of insulin-like hormones under growth hormone control. In: *Recent Progress in Hormonal Research*, Greep (ed.), New York, Academic Press, 1974, pp 259-318.
115. Moses, A., Nissley, S., Short, P., Rechler, M.M., White, R., Knight, A., and Higa, O. Increased levels of MSA, and IGF, in fetal rat serum. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3649-3653, 1981.
116. D'Ercole, A.J., Applewhite, G., and Underwood, L. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol* 75: 315-326, 1980.
117. Rechler, M., Eisen, J., Higa, O., Nissley, S.P., Moses, A., Schiling, E., Fennoy, I., Bruni, C., Phillips, L., and Baird, K.K. Characterization of a somatomedin (insulin-like growth factor) synthesized by rat liver organ culture. *J Biol Chem* 254: 7942-7953, 1979.
118. Adams, S., Kapodia, M., Mills, D., and Daughaday, W. Release of insulin-like growth factors and binding protein activity into serum-free medium of cultured human fibroblasts. *Endocrinology* 115: 520-526, 1983.
119. Hill, D., Crace, G., Fowler, L., Holder, A., and Milner, R. Cultured rat myoblasts release peptide factors which are immunologically and biologically similar to somatomedins. *J Cell Physiol* 119: 349-358, 1984.

120. Scott, J., Cowell, J., Robertson, M., Preitsley, L., Wadey, R., Hopkins, B., Pritchard, J., Bell, G., Graham, C.F., and Knott, T. Insulin-like growth factor II gene expression in Wilms tumor and embryonic tissues. *Nature* 35: 309-315, 1985.
121. Stern, P.L., and Heath, J.K. Growth control of teratocarcinomas. In: *Development in Mammals*, Johnson M (ed.), 1983, pp 107-143.
122. Heath, J.K., and Deller, M.J. Serum-free culture of PC13 murine embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol* 115: 225-230, 1983.
123. Heath, J.K., and Isacke, C.M. PC13 embryonal carcinoma derived growth factor. *EMBO J* 3: 2957-2962, 1984.
124. Heath, J.K., and Rees, A.R. Growth factors in mammalian embryogenesis. In: *Growth Factors in Biology and Medicine*, Ciba Foundation Symposium, 1985, pp 3-22.
125. Heath, J.K., and Shi, W.K. Developmentally regulated expression of insulin-like growth factors by differentiated murine teratocarcinomas and extraembryonic mesoderm. *J Embryol Exp Morph* 95: 193-212, 1986.
126. Nagarajan, L., Anderson, W.B., Nissley, S.P., Rechler, M.M., and Jetten, A.M. Production of insulin-like growth factor II (MSA) by endodermal-like cells derived from embryonal carcinoma cells: possible mediator of embryonic cell growth. *J Cell Physiol* 124: 199-206, 1985.
127. Adamson, E.D., Evans, M.J., and Magrane, G.G. Biochemical markers of the progress of differentiation in cloned teratocarcinoma cell lines. *Eur J Biochem* 79: 607-615, 1977.
128. Nagarajan, L., and Anderson, W.B. Insulin promotes the growth of F9 embryonal carcinoma cells apparently by acting through its own receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 106: 974-980, 1982.
129. Ebina, Y., Ellis, L., Jarnagin, K., Edery, M., Graf, L., Clauser, E., Ou, J.H., Masiarz, F., Kan, Y.W., and Goldfine, I.D. The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*, 40: 747-758, 1985.
130. King, G.L., Kahn, C.R., Rechler, M.M., and Nissley, S.P. Direct demonstration of separate receptors for growth and metabolic activities of insulin and multiplication-stimulation activity (an insulin-like growth factor) using antibodies to insulin receptor. *J Clin Invest*, 66: 130-140, 1980.
131. Tong, P.Y., Tollefsen, S.E., and Cornfeld, S. The cation-independent mannose-6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor II. *J Biol Chem*, 263: 2585-2588, 1988.
132. Roth, R.A. Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: The puzzle amplified. *Science* 239: 1269-1271, 1988.
133. Czech, M.P., Yu, K.T., and Seals, J.R. Cellular signaling for the insulin receptor. *Diabetes Care* 7: 8-16, 1984.
134. Furlanetto, R.W., DiCarlo, J.N., and Wisehart, C. The type-II insulin-like growth factor receptor does not mediate deoxyribonucleic acid synthesis in human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 1142-1149, 1987.
135. Nishimoto, I., Ohkuni, Y., Ogatya, E., and Kojima, I. Insulin-like growth factor II increases cytoplasmic free calcium in competent Balb/c 3T3 cells treated with epidermal growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 142: 275-286, 1987.

136. Shimizu, M., Torti, F., and Roth, R.A. Characterization of insulin and insulin-like growth factor receptors and responsivity of a fibroblast/adipocyte cell line before and after differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 552-558, 1986.
137. Rosenfeld, R.G., and Pham, H. Production of monoclonal antibodies to rat insulin-like growth factor II (IGF-II) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 146: 717-724, 1987.
138. Morgan, D.O., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Sith, M.C., Roth, R.A., and Rutter, W.J. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature*, 329: 301-307, 1987.
139. Binoux, M., Hossenloop, P., Hardouin, S., Seurin, D., Lassare, C., and Gourmelon, M. Somatomedin (insulin-like growth factor) binding proteins. *Hormone Res*, 24: 141-151, 1986.
140. Clemmons, D.R., Elgin, R.G., Han, V.K.M., Cassela, S.J., D'Ercole, A.J., and Van Wyk, J.J. Cultured fibroblasts monolayers secrete a protein that alter the cellular binding of somatomedin C/insulin-like growth factor I. *J Clin Invest* 77: 1548-1556, 1986.
141. DeVroded, M., Tseng, L., Katsoyannis, P.G., Nissley, S.P., and Rechler, M.M. Modulation of insulin-like growth factor I binding to human fibroblasts monolayer cultures by insulin-like growth factor carrier proteins released to the incubation media. *J Clin Invest* 77: 602-612, 1986.
142. Elgin, R.G., Busby, W.H.J., and Clemmons, D.R. An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3254-3258, 1987.
143. Ritvos, O., Ranta, T., Jalkane, J., Suikkari, A.M., Voutilainen, R., Bohn, H., and Rutanen, E.M. Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF-I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 122: 2150-2157, 1988.
144. Rizzino, A., and Bowen-Pope, D.F. Production of PDGF-like growth factors by embryonal carcinoma cells and binding of PDGF to their endoderm-like differentiated cells. *Dev Biol* 110: 15-22, 1985.
145. Seifert, R.S., Schwartz, S.M., and Bowen-Pope, D. Developmentally regulated PDGF-like molecules. *Nature* 311: 669-671, 1984.
146. Gudas, L.J., Singh, J.P., Stiles, C.D. Secretion of growth regulatory molecules by teratocarcinoma stem cells. In: *Teratocarcinoma Stem Cells: Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, Silver LM, Martin GR, Strickland S (ed.), Cold Spring Harbor, 1983, pp 229-236.
147. Grotendorst, G.R., Harvey, A.K., Nagarajan, L., Anderson, W.B., and Gatewood, E. Differentiation-dependent production of a platelet-derived growth factor-like mitogen by endoderm cells derived from embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol* 134: 437-444, 1988.
148. Mummery, C.L., Feijen, A., Moolenaar, W.H., Van Den Brink, C.E., and Laati, S.W. Establishment of a differentiated mesodermal line from PC19 EC cells expressing functional PDGF and EGF receptors. *Exp Cell Res* 165: 229-242, 1986.
149. Stiles, C.D., Pledger, W.J., VanWik, J.J., Antoniades, H.N., and Scher, C.D. Hormonal control of early events in the BALB/c-3T3 cell cycle: commitment to DNA synthesis. *Cold Spring Harbor Conf Cell Proliferation* 6: 425, 1979.
150. Rees, A.R., Adamson, E.D., and Graham, C.F. Epidermal growth factor receptors increase during the differentiation of embryonal carcinoma cells. *Nature* 281, 309-311, 1979.
151. Rizzino, A., Orme, L.S., and DeLarco, J.E. Embryonal carcinoma cell growth and differentiation. Production of and response to molecules with transforming growth factor activity. *Exp Cell Res* 143: 143-152, 1983.

152. Adamson, E.D., and Rees, A.R. Epidermal growth factor receptors. *Molec Cell Biochem* 34: 129-152, 1981.
153. Carlin, C.R., and Andrews, P.W. Human embryonal carcinoma cells express low levels of functional receptor for epidermal growth factor. *Exp Cell Res* 159: 17-26, 1985.
154. Fenderson, B.A., Andrews, P.W., Nudelman, E., Clausen, H., and Halomory, S. Glycolip core structure switching from globo-to-talco-and ganglio-series during retinoic acid-induced differentiation of tera-2-derived human embryonal carcinoma cells. *Dev Biol* 122: 21-34, 1987.
155. Rizzino, A. Appearance of high affinity receptors for TGF-beta transforming growth factor during differentiation of murine embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 47: 4386-4390, 1987.
156. Schindler, J., Kelly, M., and McCann, P.P. Inhibition of ornithine decarboxylase induces embryonal carcinoma cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 114: 410-417, 1983.
157. Engström, W., Rees, A.R., and Heath, J.K. Proliferation of a human carcinoma-derived cell line in serum-free medium: Inter-relationship between growth factor requirements and membrane receptor expression. *J Cell Sci* 73: 361-373, 1985.
158. Biddle, C., Li, C.H., Schofield, P.N., Tate, V.E., Hopkins, B., Engström, W., Huskinsson, N.S., and Graham, C.F. Insulin-like growth factors and the multiplication of tera-2, a human teratoma-derived cell line. *J Cell Sci* 90: 475-484, 1988.
159. Engström, W., Hopkins, B., and Schofield, P. Expression of growth regulatory genes in primary human testicular neoplasms. *Int J Androl* 10: 79-84, 1987.
160. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for protein quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248-254, 1976.
161. Schindler, J., Kelly, M., and McCann, P.P. Inhibition of ornithine decarboxylase induces embryonal carcinoma cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 114: 410-417, 1983.
162. Bethel, D.R., and Pegg, A.E. Increase in polyamine biosynthesis during the differentiation process. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 272-278, 1981.
163. Jetten, A.M., Jetten, M.E.R., and Sherman, M.I. Decrease in the polyamine biosynthesis during differentiation. *Exp Cell Res* 124: 381-391, 1979.
164. Uhl, L., Kelly, M., and Schindler, J. Alpha-difluoromethylornithine induces differentiation of a human carcinoma cell line *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 140: 66-73, 1986.
165. Köhler, G., and Milstein, C. Continuous cultures of fused cells segregating antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-503, 1975.
166. Littlefield, G.W. Selection of hybrids from mating fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science* 145: 709-710, 1964.
167. Andrews, P.W., Banting, G., Damjanov, I., Arnaud, D., and Avner, P. Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma*, 3: 347-360, 1984.
168. Loken, M.R., and Stall, A.M. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. *J Immunol Meth*, 50: 85-112, 1982.
169. Massague, J., and Czech, M.P. Affinity cross-linking of receptors for insulin and the insulin-like growth factors I and II. In: *Methods in Enzymology*, Jakoby, W.B. & Pastan, I.H. (Ed), N.Y., Academic Press, 1985, pp 179-187.

170. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature New Biology* 227: 680-685, 1970.
171. Lohrer, P.J., Sledge, G.W., and Einhorn, L.H. Heterogeneity among germ cell tumors of the testis. *Semin Oncol* 12: 304-316, 1985.
172. Kleinsmith, L.J., and Pierce, G.B. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 24: 1544-1548, 1964.
173. Ulbright, T.M., Loehrer, P.J., Roth, L.M., Einhorn, L.H., Williams, S.D., and Clarck, S.A. The development of non-germ cell malignancies within germ cell tumors. A clinicopathologic study of 11 cases. *Cancer* 54: 1824-1833, 1984.
174. Nichols, C.R., Hoffman, R., Einhorn, L.H., Williams, S.D., Wheeler, L.A., and Garnick, M.B. Hematologic malignancies associated with primary mediastinal germ-cell tumors. *Ann Intern Med* 102: 603-609, 1985.
175. Sledge, G.W., Eble, J.N., Roth, B.J., Wuhrman, B.P., Fineberg, N., and Einhorn, L.H. Relation of proliferative activity to survival in patients with advanced germ cell cancer. *Cancer Res* 48: 3864-3868, 1988.
176. Logothetis, C.J., Samuels, M.L., Trinade, A., and Johnson, D.E. The growing teratoma syndrome. *Cancer* 50: 1629-1635, 1982.