

SIMONE MAISTRO

Ação da Vitamina D3 na linhagem epitelial mamária
HC11 *ras* transfectada com o Receptor de Vitamina D

Orientador: Dra. Miriam Hatsue Honda Federico

Campinas

1999

SIMONE MAISTRO

Ação da Vitamina D3 na linhagem epitelial mamária
HC11 *ras* transfectada com o Receptor de Vitamina D

Dissertação apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do Título de Mestre em Ciências na área
de Farmacologia

Orientadora: Dra. Miriam Honda Hatsue Federico

Campinas
1999

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	38786
PROC.	229199
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/09/99
N.º CPD	

CM-00126211-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

M287a Maistro, Simone
 Ação da vitamina D3 na linhagem epitelial mamária HC11 *ras*
 transfectada com o receptor de vitamina D / Simone Maistro.
 Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador: Miriam Honda Hatsue Federico
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

1. Vitamina D. 2. Mamas - Câncer. 3. Proliferação celular. 4.
 Células - Cultura. I. Miriam Honda Hatsue Federico. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.



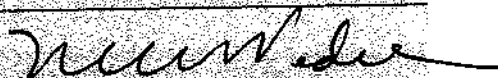
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

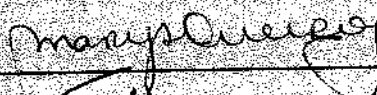
Profa. Dra. Miriam Honda Hatsue Federico

Membros:

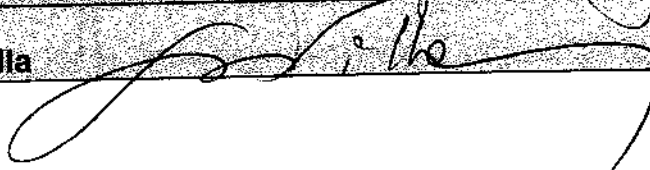
1. Profa. Dra. Miriam Honda Hatsue Federico



2. Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz



3. Profa. Dra. Luisa Lina Villa



Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data:

**Ao meu marido Flávio,
companheiro de todos os momentos,
com muito amor**

Agradecimentos

À Dra. Miriam Honda Hatsue Federico, pela orientação deste trabalho e principalmente por seus ensinamentos e por sua enorme compreensão e dedicação durante todos esses anos.

À Prof. Dra. Mitzi Brentani, pelo apoio na realização, pela leitura e sugestões de valor inestimável.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, por permitir a utilização das dependências e do Sequenciador Automático do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, no início deste trabalho.

À Dra. Vilma Regina Martins, por quem tenho profunda admiração e respeito, obrigada pelos ensinamentos valiosos e pela colaboração na execução deste trabalho.

Sra. Ana Lucia Beirão Cabral, com quem dividi muitas das minhas dificuldades na realização deste trabalho. Obrigada pela ajuda e pela amizade .

À Sra. Maria Lúcia Hirata Katayama, pela amizade e companheirismo, por estar sempre disponível em auxiliar na discussão de vários ensaios.

À Sra. Rosimeire Aparecida Roela e a aluna Valéria Cristina Silva e Vieira, pelo carinho, pela ajuda no aprendizado e na execução dos ensaios de citometria de fluxo.

Sra. Fátima Solange Pasini e Sr. Fulvio Scorza, pela amizade, companheirismo e por me ensinarem os princípios da Biologia Molecular.

À Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira, pela amizade e cooperação em todos os momentos.

À Dra. Shigueko Sonohara Pueyo, por ter me dado a oportunidade de realizar o meu aprimoramento neste laboratório e por sua amizade.

À Sra. Rosário Pereira da Silva pela colaboração relacionada à manutenção da cultura celular, pela disposição em auxiliar no desenvolvimento deste trabalho e por sua amizade.

À Sra. Maria Cristina Piñeiro Grandal pelo interesse e cuidado com que realizou o serviço de ilustração deste trabalho.

À Sra. Berenice Maria Golçalves e Sra Maria José G. Benevides pela amizade e convívio diário.

À Sra. Maria Linda da Silva e Sr. Jair Claudio Alves Oliveira, responsáveis pelo preparo dos materiais utilizados.

À Dra. Luisa Lina Villa e Dra. Mary Luci Souza Queiroz pela receptividade em participar da banca examinadora, além dos comentários valiosos quando da apresentação deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia que contribuíram para a realização de meu curso de mestrado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Oncologia Experimental, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e a todos que, direta ou indiretamente contribuíram e compartilharam comigo esta fase de minha vida, meus sinceros agradecimentos e meu reconhecimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (96/6253).

Finalmente, um agradecimento à toda minha família, pelo carinho e confiança e, em especial, aos meus pais que, com paciência e apoio intermináveis, lutaram ao meu lado e tornaram possível a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	9
Resumo.....	11
Introdução.....	12
Objetivos.....	25
Materiais e Métodos.....	27
Resultados	51
Discussão.....	73
Summary.....	81
Referências Bibliográficas.....	82

Lista de abreviaturas

β caseína	caseína do tipo beta
μg	microgramas
μl	microlitros
μM	micromolar
$1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$	1α 25-dihidroxi-vitamina D_3
24-OHase	24-Hidroxilase
$25(\text{OH})\text{VD}_3$	25-hidroxi-vitamina D_3
BSA	albumina sérica bovina
CAT	cloranfenical acetil transferase
cDNA	DNA complementar
Ci	Curie = $2,2 \times 10^{12}$ desintegrações por segundo
CON	Controle
COMMA-1D	linhagem normal de glândula mamária de camundongo
cpm	contagens por minuto
Denhardt's	ficoll 5,0 g; polivinilpirrolidona 5,0 g; BSA 5,0 g; H_2O 500ml
DEPC	dietilpirocarbonato
DIP	dexametasona $1\mu\text{M}$; insulina $5\mu\text{g/ml}$; prolactina $5\mu\text{g/ml}$
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNase	desoxirribonuclease
dNTPS	desoxirribonucleotídeos
DO	densidade óptica
DS	densidade de saturação
<i>E.coli</i>	<i>escherichia coli</i>
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGF	Fator Epidermal de Crescimento
FBS	soro fetal bovino
G418	Geneticina
h	horas
Ha-ras	oncogene <i>ras</i> da linhagem Harvey
HC-11	linhagem estabelecida de epitélio mamário murino normal
HC-11 <i>ras</i>	linhagem estabelecida de epitélio mamário murino transformada por Ha- <i>ras</i>
Kb	kilobase
LB	5g/l extrato de levedura, 10g/l triptona, 5g/l NaCl, pH 7.2

LB/agar	5g/l extrato de levedura, 10g/l triptona, 5g/l NaCl, 15g/l bácto-agar
M	molar
mA	miliAmpere
ml	mililitro
mM	milimolar
MOPS	ácido 3-N-morfolino propanesulfônico
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
nM	nanomolar
ng	nanogramas
PBS	1,5 mM KH_2PO_4 ; 137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 , pH 7
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI	iodeto de propídeo
RNA	ácido ribonucléico
RNase H	ribonuclease H
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio de cultura do Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
RAR	receptor de ácido retinóico forma <i>all trans</i>
RXR	receptor de ácido retinóico forma 13- <i>cis</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	0,15 M NaCl; 0,015 M citrato de sódio; pH 7,0
SSPE	0,15 M NaCl; 0,01 M Na_2HPO_4 , 0,8 mM EDTA; pH 7,4
T.A.	temperatura ambiente
TBE 1X	0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,7 M Ácido Bórico; 3,5 M EDTA
TE	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA
TD	tempo de dobramento
UV	luz ultravioleta
VDR	receptor de vitamina D3
VDRE	elemento responsivo à vitamina D

Resumo

A 1,25-dihidroxitamina D₃, o metabólito ativo da vitamina D₃, parece influir não só na homeostase do cálcio, mas também em vários processos celulares tais como, o controle da proliferação e diferenciação celulares. Sua ação na transcrição gênica ocorre através de interação com um receptor específico nuclear, o Receptor de Vitamina D (VDR).

VDR está presente na maioria das linhagens de carcinoma mamário e em 80% dos cânceres de mama humanos. Comparando células HC11, derivada da glândula mamária normal de camundongo, com a linhagem HC11 transformada com alelo ativado de Ha-*ras* (HC11-*ras*), Escalera e Brentani (1999) já haviam demonstrado inibição de crescimento induzido pelo tratamento com vitamina D na linhagem HC11, mas não na HC11-*ras*. Como a HC11 apresenta alto conteúdo de VDR ao contrário da HC11-*ras*, interrogamos se essa seria a causa da falha da HC11-*ras* em responder a vitamina D.

Para responder a essa pergunta, inicialmente, amplificamos por PCR a região do cDNA codificadora para VDR, a partir do RNA total da HC11 e iniciadores específicos. Com esse cDNA de VDR inserido no vetor de expressão pOP13 geramos 16 clones de HC11-*ras* transfectados com VDR, apresentando variado conteúdo de VDR. Desses clones, o clone 1 caracterizou-se como apresentando alta expressão de VDR, tanto por aumento do seu RNA mensageiro medido por ensaio de Northern como por aumento da proteína de VDR, determinada pelo uso de anticorpo monoclonal anti-VDR e analisada por citometria de fluxo (64,9% $\pm$ 8,2% de positividade); os outros clones apresentaram expressão semelhante à HC11-*ras* (HC11-*ras* = 35,93% $\pm$ 15,10%; clone 7 = 29,28% $\pm$ 10,62%; clone 13 = 31,11% $\pm$ 27,2%), sendo a expressão da linhagem HC11 = 85,5% $\pm$ 14%.

O clone 1 respondeu com inibição de proliferação, como demonstrado pelo aumento do tempo de duplicação da população, medido pela contagem de células em cultura expostas a ação da Vitamina D 10 nM durante 3 dias (controle 17,28h $\pm$ 1,98h vs. VD: 28,48h $\pm$ 7,02h; p = 0,056) quando comparado a HC11-*ras* (controle: 18,24h vs VD: 19,92h). Além disso, observamos um acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular, após o tratamento com vitamina D (controle: 79,54% $\pm$ 1,30% vs VD: 91,01% $\pm$ 2,66%, p < 0,005), como demonstrado pelo método de quantificação de conteúdo de DNA pela incorporação de Iodeto de Propídio e análise por citometria de fluxo. Note-se que esses parâmetros foram semelhantes a aqueles apresentados pela linhagem HC11 parental na presença de Vitamina D (controle: 55,9% vs VD: 82,0%). Os clones 7 e 13 com baixo conteúdo de VDR, apresentaram comportamento proliferativo semelhante ao da HC11-*ras*.

Nossos dados sugerem que, no modelo de progressão tumoral proporcionado pela linhagem HC11 e HC11-*ras*, o escape do controle de VDR determine uma vantagem proliferativa para a linhagem HC11-*ras*. O aumento de VDR, por si, restaurou no clone 1, um comportamento mais próximo da normalidade, o que leva a supor que os controles de proliferação normal sejam possíveis de serem recuperados em cânceres já estabelecidos. Uma diminuição de VDR em carcinoma mamário humano tem sido correlacionado com pior sobrevida sugerindo que as manipulações das vias de controle de VDR possam beneficiar estes pacientes.

Introdução

A ação da vitamina D é exercida pelo seu metabólito ativo, a 1,25-dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃), obtido de duas fontes: exógena, através da dieta ou produzido de maneira endógena, na pele. O precursor 7-dihidrocolesterol, presente na epiderme em grande quantidade, transforma-se, sob a ação da luz solar, naquilo que chamamos de pré-vitamina D₃ (MacLaughlin *et al.*, 1982; Holick 1994) que, por sua vez, sofre isomerização lenta à temperatura corpórea, formando a vitamina D₃ propriamente dita.

Na circulação, a vitamina D₃ liga-se a uma proteína sérica carreadora (proteína de ligação à Vitamina D - DBP), sendo desta forma transportada para o fígado, onde sofre a ação da enzima 25-hidroxilase, dando origem à 25 hidroxivitamina D₃ (25OHD₃) (Blunt *et al.*, 1968; Ponchon *et al.*, 1969; Olson *et al.*, 1976, Bouillon *et al.*, 1995). Novamente na circulação, este metabólito chega ao rim, onde ocorre a transformação para 1 α ,25 dihidroxivitamina D₃ (1,25(OH)₂D₃) pela ação da 1-hidroxilase (Holick *et al.*, 1971; Norman *et al.*, 1971). Do rim, a 1,25(OH)₂D₃ é transportada para seus tecidos alvos (figura 1). Além de importante para o intestino, onde é responsável pela absorção do cálcio, a 1,25(OH)₂D₃ também está envolvida em processos

celulares fundamentais tais como, regulação da proliferação e diferenciação celular em vários tipos celulares (Abe *et al.*, 1981; Frampton *et al.*, 1983; Mangelsdorf *et al.*, 1984)

A vitamina D₃ exerce sua atividade biológica tanto por regulação da transcrição gênica, via genômica (revisto por Hannah e Norman, 1994), quanto por uma outra via (revisto por Nemere e Farach-Carson, 1998), menos estudada, que está associada à presença de uma proteína receptora localizada na superfície externa da célula (Nemere *et al.*, 1994; Baran *et al.*, 1994), referido como receptor de vitamina D de membrana (VDRmem). Este último seria o responsável pela indução de respostas celulares rápidas, tais como a abertura de canais de cálcio (Caffrey e Farach-Carson, 1989), e ativação de vias de sinalização que envolvam a proteína quinase C (PKC) (Khare *et al.*, 1994; Bhatia *et al.*, 1995; Slater *et al.*, 1995).

A regulação da transcrição gênica pela 1,25(OH)₂D₃ ocorre através da interação desta com proteínas receptoras específicas presentes no núcleo das células-alvo, o Receptor de Vitamina D (VDR), que possui alta afinidade pelo ligante, e que pertence à família dos receptores hormonais nucleares que compreende os receptores de hormônio tireoidiano, de esteróides e de ácido retinóico (RAR e RXR) (Burmester *et al.*, 1988; Baker *et al.*, 1988).

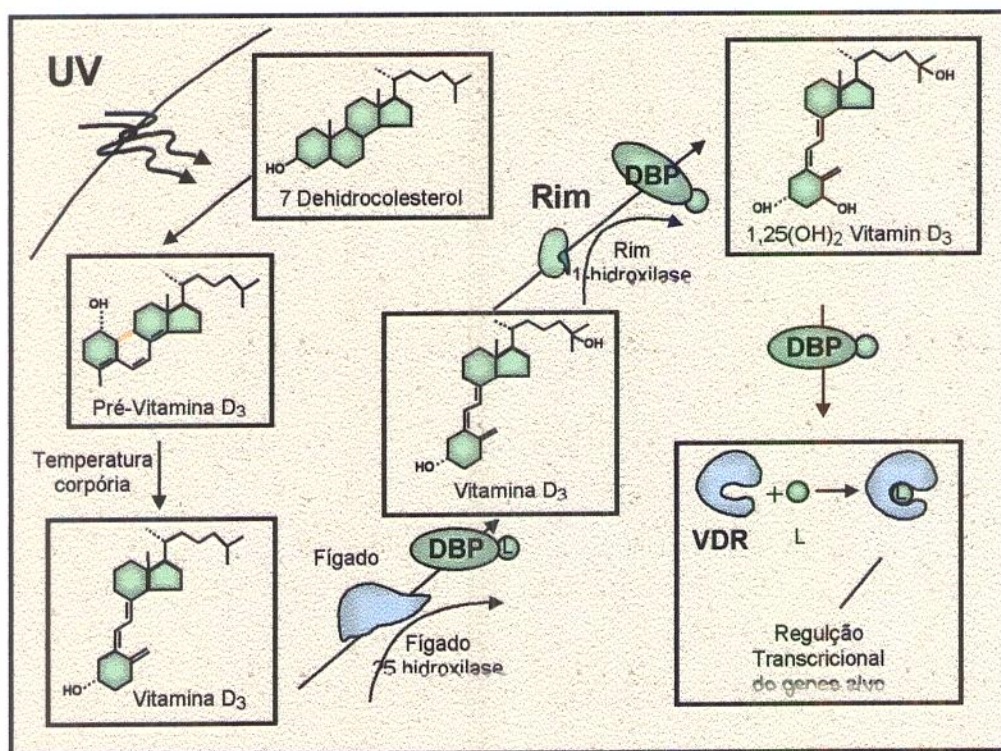


Figura 1. Síntese e modos de ação da vitamina D e seus metabólitos biologicamente importantes. Esquema adaptado de Rahual Ray, 1996.

A clonagem e o sequenciamento da fita de DNA complementar codificadora do VDR em várias espécies, tais como, porco (Dame *et al.*, 1985), galinha (McDonnell *et al.*, 1987; Elaroussi *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1997), rato (Burmester *et al.*, 1988), espécie humana (Baker *et al.*, 1988), camundongo (Kamei *et al.*, 1995), *Xenopus* (Li *et al.*, 1997) permitiram a demarcação da sua estrutura em dois domínios funcionais: de ligação ao hormônio, localizada na região carboxi-terminal, e o de reconhecimento de DNA, na porção amino-terminal (figura 2). Este último é formado por duas estruturas em projeção

semelhantes a dedos, cada uma dobrada e estabilizada, na sua base, por um átomo de zinco, sendo denominadas por isso de “dedos de zinco” (Haussler *et al.*, 1995; Towers *et al.*, 1993). Esta região é a mais conservada dentro dos receptores nucleares (Evans *et al.*, 1988; O'Malley *et al.*, 1990). O domínio C-terminal (carboxi-terminal), além de conter a região de ligação ao hormônio $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, contém outras regiões como aquele compreendido entre os resíduos 382-402 e 325-332, responsáveis pela heterodimerização com RXR (receptor de ácido retinóico) (Nakajima *et al.*, 1994) e o domínio altamente conservado E1, situado entre os aminoácidos 244 e 263 (Rosen *et al.*, 1993).

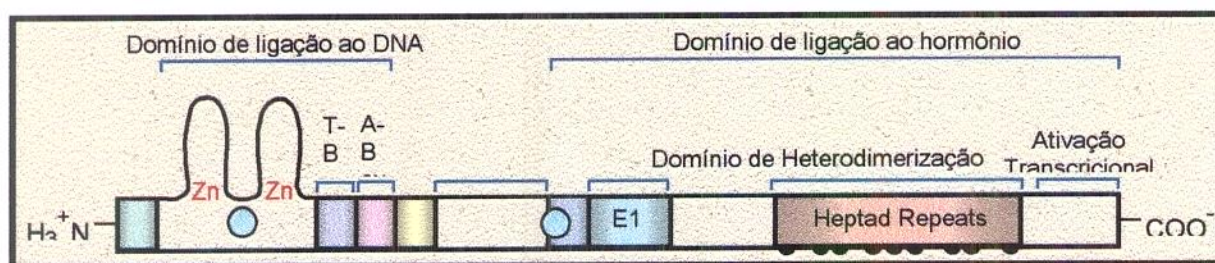


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do receptor de vitamina D, onde observa-se a presença do domínio de ligação a $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ na porção carboxi-terminal, e um domínio de ligação ao DNA, na porção amino-terminal; o círculo azul com o P é o sítio de fosforilação. Esquema apresentado por Haussler *et al.* 1995, com modificações.

O VDR é uma fosfoproteína que sofre fosforilações adicionais depois da ligação ao hormônio. No VDR humano, a proteína quinase C (PKC) fosforila a Serina-51, localizada entre os dois dedos de zinco, no domínio de ligação ao DNA (Hsieh *et al.*, 1991). A caseína quinase II (CKII) fosforila também a Serina-208, um resíduo próximo do domínio N-terminal (Jurutka *et al.*, 1993a e 1993b). Outro sítio de fosforilação, alvo de proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) parece estar entre os aminoácidos 133 e 201 (Jurutka *et al.*, 1993c), em uma região que contém resíduos não conservados entre os VDRs.

No controle transcricional de genes responsivos a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o VDR unido ao hormônio torna-se hiperfosforilado (Jurutka *et al.*, 1993b) e recruta o receptor de ácido retinóico X (RXR), formando um complexo heterodimérico que se liga fortemente ao DNA. O complexo heterodimérico $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR seletivamente reconhece elementos de resposta à vitamina D (VDREs) localizados na região promotora dos genes regulados (figura 3) por vitamina D, tais como, osteocalcina humana (Ozono *et al.*, 1990; MacDonald *et al.*, 1991) e de rato (Terpening *et al.*, 1991; DeMay *et al.*, 1990), osteopontina de camundongo (Noda *et al.*, 1990), integrina $\beta 3$ em ave (Cao *et al.*, 1993), 25-hidroxivitamina D₃-24-hidroxilase em ratos (Ohya *et al.*, 1994) e humanos (Chen e DeLuca, 1995), Calbindina-D28K em camundongo (Gill e

Chritakos 1993), Calbindina D9k em rato (Darwish e DeLuca, 1992), Pit 1 de camundongo (Rhodes *et al.*, 1993), p21 humano (Liu *et al.*, 1996) e TGF β 2 humano (Wu *et al.*, 1999). VDREs com regulação negativa existem na região 5' dos genes do colágeno tipo I (Pavlin *et al.*, 1994), sialoproteína óssea (Li e Sodek 1993), hormônio da paratireóide (PTH) (DeMay *et al.*, 1992) e peptídeos relacionados a PTH (Falzon 1996, Kremer *et al.*, 1996).

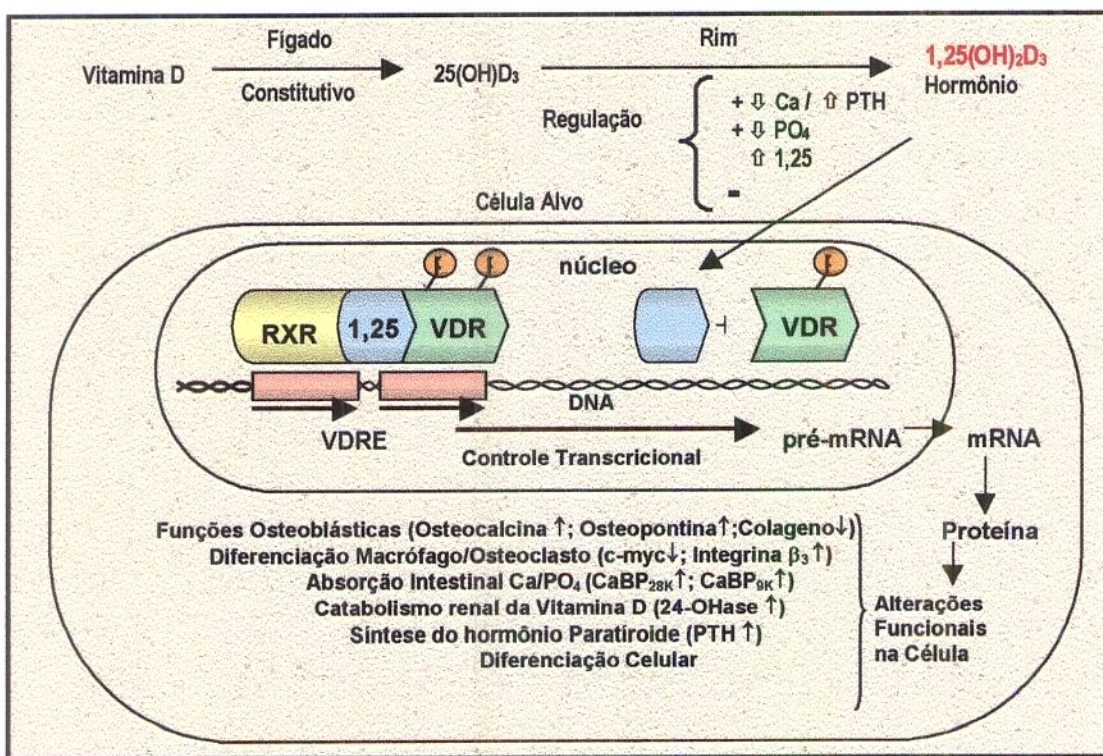


Figura 3. Metabolismo da Vitamina D e ação celular, mediada pelo heterodímero VDR-RXR ligando-se ao VDRE. Esquema apresentado por Haussler *et al.*, 1997.

A comparação dessas sequências de resposta à vitamina D indicam que elas geralmente consistem de hexâmeros na forma de repetição direta com um espaçamento de três nucleotídeos (Tabela I). Enquanto a sequência de três nucleotídeos parece não ser conservada, os hexâmeros em geral apresentam a sequência AGGTCA ou preferencialmente GGTTCA, mas ocorre uma considerável variabilidade entre elas. O espaçamento entre as repetições diretas possuem um papel crítico na determinação seletiva da resposta hormonal (Umessomo *et al.*, 1991). Em muitos estudos com VDREs separados por 3 nucleotídeos, mostra-se que o VDR forma heterodímero com o Receptor de Ácido Retinóico X (RXR) (revisto por Haussler *et al.*, 1997). O VDR pode também formar homodímero (Freedman *et al.*, 1994), interagindo com certos elementos de resposta contendo espaçamento de 5 nucleotídeos, mas isto ocorre somente sob altas concentrações do receptor, uma situação diferente da existente *in vivo*.

Tabela I. Localização e seqüência de Elementos de Resposta positivos a Vitamina D

Genes	Localização	Sequencia de Nucleotídeos
Osteocalcina de rato	- 460/- 446	GGGTGA atg AGGACA
Osteocalcina humana	- 499/- 485	GGGTGA acg GGGGCA
Osteopontina de camundongo	- 757/- 743	GGTTCA cga GGTTCa
Calbindina D9K de rato	- 489/- 475	GGGTGT cgg AAGCCC
Calbindina D28K de camundongo	- 198/- 183	GGGGGA tgtg AGGAGA
24-hidroxilase de rato	- 150/ - 136 (proximal)	AGGTGA gtg AGGGCG
	- 258/ - 244 (distal)	GGTTCA gcg GGTGCG
24-hidroxilase humana	- 169/ - 155 (proximal)	AGGTGA gcg AGGGCG
	- 291/ -277 (distal)	AGTTCA ccg GGTGTG
Integrina $\beta 3$ em ave	- 770/ - 756	GAGGCA gaa GGGAGA
TGF- $\beta 2$	-700/ -686	AATGAA gtt GGTGGA
	-761/ -747	TGTAGA aca AGTAGA
Pit 1 de camundongo	- 683/ -666	AGTTCA tgag AGTTCA
P21 humano	- 779/- 765	AGGGAG att GGTTCa

Diferente dos outros membros da família dos receptores nucleares que são produtos de múltiplos genes, o VDR é produto de um único gene. O gene de VDR humano está localizado no cromossomo 12q (Szpirer *et al.*, 1991), sendo composto por 11 exons (1a, 1b, 1c, 2 – 9), ocupando aproximadamente 75 Kb de DNA. O produto dos exons é um transcrito de mRNA de aproximadamente 4800

nucleotídeos, codificando uma proteína de 427 aminoácidos (hVDR). A primeira organização da estrutura intron-exon do gene cromossomal do VDR humano foi descrita por Baker *et al.*, em 1988. Trabalho adicional definiu a estrutura completa do gene de VDR humano (Miyamoto *et al.*, 1997).

A importância de VDR é evidenciada por dados publicados inclusive por nosso grupo, demonstrando que a linhagem mielóide HL60, quando tratada com ésteres forbólicos (PMA) ou ácido retinóico, reduz o conteúdo de VDR por célula, usando o ensaio de ligação a VD triciada. Blastos leucêmicos de pacientes também apresentam alta quantidade de VDR, sugerindo que nas células hematopoéticas, expressão alta de VDR possa ser atributo de células indiferenciadas com alto índice proliferativo (Feldman *et al.*, 1993). Em linhagens mielóides, demonstramos que a expressão de RNA mensageiro de VDR é regulada de forma diferente dependendo do tipo de diferenciador usado, se éster forbólico, ácido retinóico ou interferon γ (Feldman, *et al.*, 1993). Demonstramos também a importância da vitamina D₃ e VDR no processo de proliferação e diferenciação da linhagem celular mielóide, HL60 (Folgueira *et al.*, 1998).

A proliferação de linhagens de carcinoma mamário (Frampton *et al.*, 1983) e células de glândula mamária normal (Hosomi *et al.*, 1983; Mezzetti *et al.*, 1987) também parecem ser afetadas por vitamina D. A maioria das

linhagens de carcinoma mamário (Escaleira *et al.*, 1993; Buras *et al.*, 1994; Elstner *et al.*, 1995) e 70-80% dos cânceres de mama também expressam VDR intracelular (Eisman *et al.*, 1980; Freake *et al.*, 1984; Berger *et al.*, 1987 e 1991). Além disso, a presença de VDR em carcinomas primários de mama humanos, parecem determinar maior sobrevida global do que aqueles com tumores VDR negativos (Colston *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1991). A razão desse melhor prognóstico tem sido sugerida como sendo um efeito do VDR sobre a diferenciação da célula mamária *in vivo* (Colston *et al.*, 1989).

O efeito antiproliferativo da vitamina D₃ em células que se dividem rapidamente tem sido amplamente demonstrado em outros modelos experimentais de linhagens mamárias normais (Lazzaro & Mehta, 1996) ou maligna (Abe *et al.*, 1981). Na linhagem MCF7, derivada de carcinoma de mama humano, existem indicativos de que vitamina D poderia estar envolvida no processo de apoptose (Vandewalle *et al.*, 1995).

O câncer de mama é no mundo todo, incluindo o Brasil, um problema de saúde pública, sendo a primeira causa de morte por câncer nas mulheres em países desenvolvidos. No Brasil, estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, Ministério da Saúde) indicam que 32695 casos novos e 7165 óbitos devido câncer de mama devem ocorrer no ano de 1999. Nessa doença, mesmo quando curada, a possibilidade de recidiva tardia existe, sendo a

hormonioterapia convencional, não isenta de efeitos colaterais, e a resposta à quimioterapia nem sempre satisfatória nos casos avançados. Assim, outras drogas como a vitamina D, talvez envolvidas com controle de proliferação e morte celular programada sempre podem ser de utilidade para o tratamento desses cânceres.

A linhagem mamária HC11, estabelecida a partir de um clone de células epiteliais de mama COMMA-1D de camundongos BALB/c no meio do período gestacional (Ball *et al.*, 1988, Danielson *et al.*, 1984), representando um sistema simples com alta eficiência de resposta a hormônios lactogênicos. Trabalhos anteriores realizados com essa linhagem mostraram que a diferenciação funcional e completa, definida como a capacidade de produção de β -caseína (Taverna *et al.*, 1991), é atingida em células pré-tratadas com EGF (Fator Epidermal de Crescimento), durante dois a três dias, e a partir do terceiro dia submetidas a estímulo lactogênico (Dexametasona, Prolactina e insulina).

A proteína Ras desempenha papel importante na resposta celular a muitos fatores que controlam a proliferação e a diferenciação celulares (Satoh *et al.*, 1992). A proteína Ras inativa encontra-se ligada a GDP (guanosina difosfato) e quando ativada associa-se a GTP (guanosina trifosfato) e desencadeia uma cascata de fosforilações que são responsáveis pela transdução do sinal inicialmente deflagrado (Barbacid, 1987; Lowy e Willumsem, 1993). Este é

interrompido quando GTP é hidrolisado da molécula de Ras, que volta a se associar à GDP. Mutações nos aminoácidos 12,13 ou 61 de Ras, produzem uma oncoproteína com grande afinidade por GTP, incapaz de hidrolisá-lo de seu sítio ativo, o que leva a uma transdução constante e alterada de sinal (Haubruck e McCormick, 1991). A introdução do alelo ativado de Ha-*ras* na linhagem HC-11 levou à transformação maligna e constitui um modelo de progressão tumoral, pois induz a formação de tumor em animais transgênicos (Hynes *et al.*, 1990), ativa o receptor de EGF e suprime a indução de β -caseína, bloqueando a ativação do fator MGF (Fator de transcrição de glândula mamária) pelos hormônios lactogênicos, inibindo a diferenciação (Happ *et al.*, 1993).

Uma das diferenças fundamentais entre as linhagens HC-11 e HC11-*ras* parece ser uma falha desta última, em responder com diminuição de proliferação e indução de diferenciação, ao tratamento com hormônios lactogênicos. A HC11 original apresenta ainda maior conteúdo de VDR, tanto da proteína (HC11=86% vs HC11-*ras*=23%), como do RNA mensageiro (HC11=1 vs HC11-*ras*=0,4) dentro da faixa de concentração apresentada pelas linhagens mamárias malignas MDA-MB-231, MCF-7 e T47D, como demonstrado recentemente (Escaleira, 1997). Dados apresentados por Escaleira e Brentani (1999) demonstram ainda que a linhagem HC-11 tratada com Vitamina D diminui a proliferação, causando um acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular.

Estas constatações sugerem que a proliferação nas células mamárias HC-11 seja norteadada pelo conteúdo de VDR e a falha da linhagem HC11-*ras* em responder à vitamina D seja devido ao menor conteúdo de VDR. Não podemos descartar que mudanças de estabilidade do complexo receptor-hormônio (na forma de homo ou heterodímeros) ou alterações pós-transcricionais contribuam para esta resposta alterada, abrindo outras perspectivas para investigações futuras.

Assim, o objetivo inicial desta dissertação de mestrado foi o de estudar a influência da super-expressão do receptor de vitamina D nos parâmetros proliferativos da HC11-*ras*. Utilizamos um vetor de expressão contendo o VDR geramos clones de células HC11-*ras* transfectadas com VDR e demonstramos que os clones que expressam alto conteúdo de VDR retornaram aos padrões de crescimento apresentado pela HC11 parental.

Objetivos Específicos

- Construir um vetor de transfecção contendo o receptor de vitamina D (VDR), utilizando o vetor pOP13CAT (“LacSwitch Inducible Mammalian Expression System”, Stratagene) e gerar clones celulares, apartir da linhagem HC11-*ras* com superexpressão de VDR.
- Determinar os parâmetros de proliferação sob ação da Vitamina D nas células mamárias da linhagem HC11-*ras* com superexpressão do receptor de vitamina D em comparação com a linhagem HC11-*ras* e HC11.
- Analisar a expressão gênica de VDR através do mRNA detectado pela análise de Northern e da proteína de VDR por meio do anticorpo monoclonal anti-VDR e citometria de fluxo.

Para a geração dos clones, a linhagem mamária HC11-*ras*, foi transfectada com o plasmídeo pOP13CAT e p3'SS do “kit LacSwitch Inducible Mammalian Expression System da Stratagene” (figura 5). Este sistema envolve a expressão constitutiva da proteína Lac repressora, codificado pelo gene *lacI*, presente no p3'SS. O gene de interesse, a ser estudado, será introduzido entre os

sítios Not I, no lugar do “CAT”, no plasmídeo pOP13CAT; a expressão deste gene é controlado pelo promotor RSV-LTR. Em condições normais, a proteína Lac repressora liga-se aos sítios “lac operon” localizado após o promotor RSV-LTR, inibindo a transcrição do gene introduzido. Para a indução do gene de interesse, adiciona-se ao meio de cultura o isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG), o qual se liga à proteína Lac repressora, mudando a sua conformação e diminuindo a sua afinidade pelos sítios “lac operon” (presente no pOP13), dando início a transcrição pelo promotor RSV e liberando a expressão do cDNA transfectado.

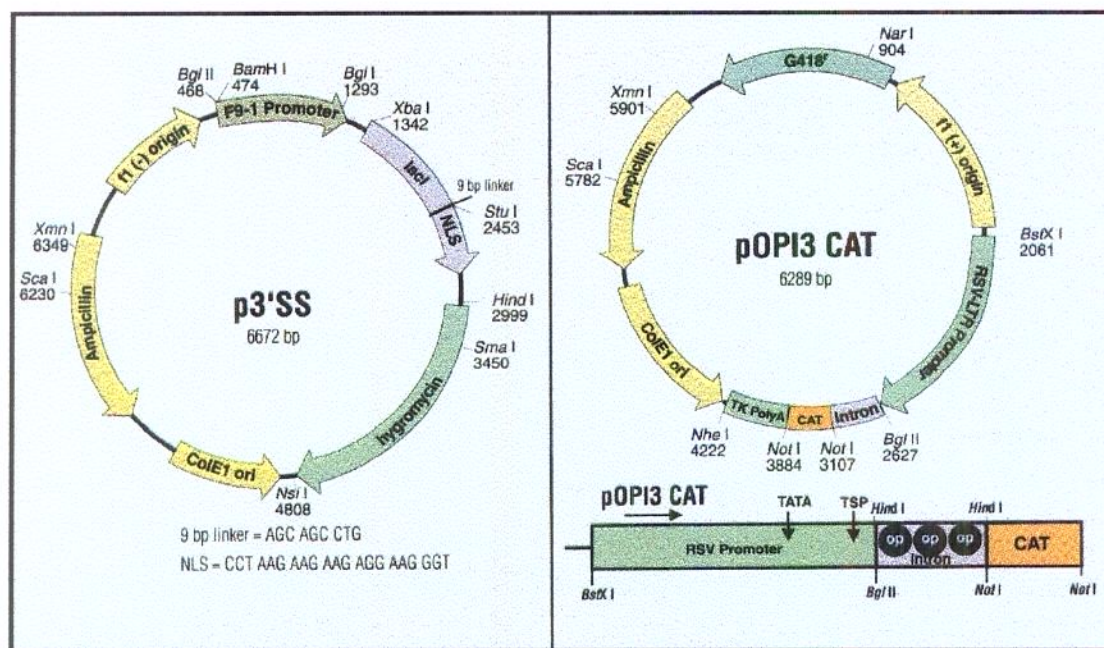


Figura 5: Esquema dos plasmídeos p3'SS e pOP13CAT.

Vetor p3'SS possui o gene *lacI* que é codificador da proteína repressora Lac, Vetor pOP13CAT contém um promotor RSV-LTR, sítios Not-I para inserção do gene de interesse e uma sequência operadora modificada do lac operon inserido após o promotor.

Materiais e Métodos

1. Obtenção do cDNA

1.1 Cultivo de células

As linhagens HC11 e HC11-*ras* foram doadas pela Dra. Nancy Hynes do Friedrich Miescher Institute, Basileia, Suíça.

A linhagem HC11 (células de epitélio de mama de camundongo) cultivada em RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), contendo 1,2 g/l de bicarbonato de sódio; 10 mM de Hepes (ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N'-2-etano-sulfônico) pH 7,4; 50 µg/ml de ampicilina, estreptomicina e gentamicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B e suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Cultilab, São Paulo, Brasil), 5 µg/ml de insulina (Sigma) e 10 ng/ml de EGF (Fator de crescimento epidermal - Sigma), foram crescidas em garrafas de 75 cm² até a confluência, em estufa a 37 °C em atmosfera constante de 5% de CO₂.

1.2. Obtenção de RNA

As células HC11 foram removidas com o auxílio de um rodo de borracha, lavadas em PBS 1X (1,5 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 3 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,4), e o precipitado recuperado por centrifugação, foram adicionados 800 µl de RNazol (Biotecx CS 105), homogenizado vagarosamente

e 80 µl de clorofórmio e então homogenizado vigorosamente, permaneceu por 15 minutos no gelo, sendo centrifugada posteriormente a 22000xg por 15 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi recuperado e adicionado isopropanol (v:v) a 4°C, permanecendo por uma hora no gelo. Esta mistura foi novamente centrifugada e o precipitado resultante (RNA) lavado com etanol 75%, seco, dissolvido em 25 µl água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e 0,5 µl de RNAsin (Promega), e estocado a -70°C.

1.3. Obtenção de cDNAs

Aos 18 µl de RNA obtido no item 1.2. foram adicionados 6 µl do tampão 5x “First Strand” (GIBCO-BRL), 3 µl de 0,1M DTT, 1,5 µl de 10mM dNTPs, e 0,3 µl do iniciador randômico hexâmero (1,6 µg/µl) da GIBCO-BRL. Esta mistura ficou por 10 minutos a 42°C antes de adicionar 1 µl da enzima “Super Script II” (200 unidades/µl) da GIBCO-BRL, permanecendo então, por mais 50 minutos a 42°C. A reação foi inativada a 75°C por 15 minutos e tratada com 3 unidades de RNase H (BRL) por 20 minutos a 37°C e novamente inativada a 75 °C por 15 minutos. Após este procedimento o cDNA pode ser utilizado para a amplificação da região de interesse.

2. Amplificação do cDNA de VDR

2.1 Oligonucleotídeos (*Primers*)

O produto da reação utilizando Transcriptase reversa e o RNA total de HC11 foi utilizado como molde para a amplificação do gene correspondente ao receptor de vitamina D de camundongo, por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os seguintes *primers*: 5'GAGGCG GCCGCAAGAGCACCCCTTGGGCTCTAC3' e 5'AGAGCGGCCGACACAGGCACCACTGTGGGCCACC3'. Os *primers* foram sintetizados no Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer - São Paulo.

2.2. Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Na reação de PCR foi utilizado 1 a 3 µl de cDNA obtido no item 1.3, sendo o volume final de 25 µl, onde foi adicionado o tampão da enzima Taq DNA Polimerase (concentração final de 1,5 mM de MgCl₂), dNTPs (0,125 mM final), os *primers* (1µM final) e 1 unidade da enzima Taq (*Thermus aquaticus*) DNA polimerase (5U/µl). A mistura foi completada com água deionizada e autoclavada.

A reação foi realizada nas seguintes condições: 1 ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de 72°C por 7 minutos. A reação foi processada em um equipamento Hybaid Omnigel (Hybrid, UK). Os produtos da PCR foram separados em gel não desnaturante de poliacrilamida, e puderam então ser analisados.

2.3. Gel não desnaturante de poliacrilamida

Uma solução 8% de poliacrilamida em TBE 1X (0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,7 M Ácido Bórico; 3,5 M EDTA) contendo acrilamida e bis-acrilamida (29:1) e água deionizada foi preparada e a esta foram adicionados persulfato de amônio 10% (1:100) e TEMED (N'N'N'N' tetrametiletilenodiamina) (1:1000) para a confecção do gel. Após a separação dos produtos à 100 Volts em tampão de corrida TBE 1X, o gel foi corado por prata.

O procedimento de coloração consistiu de uma fixação, em agitação constante por 7 minutos, com uma solução contendo 50 ml de etanol absoluto, 2,5 ml de ácido acético glacial em um volume final de 300 ml de água, após o que foi adicionado 0,3 g de nitrato de prata dissolvido em 5 ml de água que permaneceu por mais 7 minutos sob agitação. Depois o gel foi rapidamente lavado em água e foi incubado com uma solução contendo 4,5 g de NaOH, 1 ml de formaldeído 37%, água até 200 ml de água até o aparecimento das bandas.

3. Clonagem intermediária em pUC 18 - VDR de camundongo

O fragmento do VDR de camundongo, obtido por PCR foi inserido em pUC 18, seqüenciado pelo Sequenciador automático Alf (Pharmacia) para verificar a integridade da região amplificada.

O produto obtido por PCR foi separado em gel de agarose 0,8%. A banda que correspondia ao tamanho esperado foi eletroeluída em tampão TE pH 8,0. O DNA foi precipitado em 0,3 M de acetado de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto por 16 horas a -20°C. O precipitado foi então recuperado por

centrifugação a 22000xg por 5 minutos, seco e ressuspenso em água e quantificado.

Para este procedimento foi utilizado o “kit Sure Clone” (Pharmacia). O fragmento foi preparado para a ligação utilizando a atividade 3’- 5’ exonuclease da “Klenow fragment DNA polimerase I” para remover uma base 3’ despareada na extremidade e o fragmento foi concomitantemente fosforilado pela T4 Polinucleotídeo quinase.

Aproximadamente 200 ng do fragmento de DNA de VDR de camundongo amplificado, foi diluído em 16 µl de água e incubado a 37°C por 1 hora com 6 U de “Klenow”, 6 U de T4 polinucleotídeo quinase e tampão blunting/quinase 1x em um volume final de 20 µl. Ao final da reação foi adicionado 20 µl de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 22000xg por 1 minuto. O sobrenadante foi purificado em uma mini coluna de Sephacryl S 200HR (resina em 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl, pH 7,6 e 1mM EDTA) e recuperado após centrifugação.

Este procedimento permitiu tornar as extremidades abruptas para a ligação em pUC 18, que possui as extremidades abruptas e defosforiladas com BAP (“Bacterial alkaline phosphatase”).

A ligação do inserto em pUC18 foi realizada utilizando 7 µl do cDNA proveniente do material purificado na mini coluna, 50 ng do vetor

defosforilado, 10 mM DTT e tampão da enzima “T4 DNA ligase” 1x, e 1µl da enzima “T4 DNA ligase” (6 U/µl), durante 16 horas a 16°C.

4. Clonagem do inserto de VDR de camundongo no vetor pOP13CAT

4.1. Preparo do inserto

A região amplificada, como descrito no item 2, possui nas extremidades sítios para a enzima Not I, estes permaneceram intactos quando o cDNA foi clonado em pUC 18, assim usando a enzima de restrição Not I o cDNA foi separado do plasmídeo e, sendo os produtos da digestão separados gel de agarose 0,8%. A banda correspondente foi eletroeluída em tampão TE e precipitada em acetato de sódio 0,3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto, por 16 horas a -20° C. Em seguida, o DNA foi recuperado por centrifugação por 15 minutos a 22000xg, o precipitado foi seco e ressuspensão em água e quantificado em gel analítico de agarose 0,8%.

4.2. Preparo do vetor pOP13CAT

O plasmídeo pOP13CAT (“LacSwitch Inducible Mammalian Expression System”) foi digerido com a enzima de restrição Not I (BRL), que permitiu a retirada do gene CAT, gerando o fragmento de 5513 pares de base. O plasmídeo foi recuperado por eletroeluição em tampão TE e precipitado em acetato de sódio 0,3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto por 16 horas a -20° C. Em seguida, o DNA foi recuperado e quantificado em gel analítico de agarose 0,8%. As suas extremidades foram defosforiladas em uma reação com 10 unidades de CIP (“Calf Intestinal phosphatase”) e tampão NeBuffer 2 (BIOLABS), à 37°C por 30 minutos. A reação foi inativada pela adição de 5 mM

de EDTA e 10 minutos à 65°C. Na reação foram adicionados 20 µl de fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e o sobrenadante foi purificado em uma mini coluna de Sephacryl S 200HR e recuperado após centrifugação.

4.3. Ligação do cDNA de VDR no pOP13

A ligação do inserto contendo a região do receptor de Vitamina D do camundongo em pOP13 foi procedida utilizando-se 13 µl do material eletroeluido, que contém o inserto (15 ng/µl), 2 µl do vetor defosforilado (19 ng/µl), tampão da enzima “T4 DNA ligase” 1x para o volume final de 20 µl. Estes componentes foram misturados e só então foram adicionadas 400 U da enzima “T4 DNA Ligase” (Biolabs) e a reação foi incubada por 16 horas a 16°C.

A enzima foi inativada a 65°C por 15 minutos e o DNA precipitado em acetato de sódio 0,3 M e 2,5 volumes de etanol absoluto por 1 hora a -70°C. Em seguida, o cDNA foi recuperado por centrifugação por 15 minutos a 22000xg, o precipitado foi seco e ressuspenso em 10µl de água.

5. Preparação e transformação de Bactérias Competentes

Bactéria *E.coli* da cepa XL1-Blue MR strain (Stratagene), DH5α e HB 101 (GIBCO-BRL) foram crescidas em 100 ml meio de cultura LB (5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de triptona e 5 g/l de NaCl pH 7,2) em agitação constante a 37°C até atingirem a DO = 0,4 a 600 nM. Após centrifugação, o precipitado foi lavado com 10 ml de solução A (10 mM MOPS pH 6,5; 10 mM

RbCl₂) e novamente centrifugado e ressuspensionado em 10 ml de solução B (50 mM CaCl₂; 10 mM MOPS pH 6,5; 10 mM RbCl₂) permanecendo por 2 horas a 4°C. Neste ponto as bactérias ditas competentes puderam ser estocadas em 4 ml de solução B acrescida de 10% de glicerol a -70°C.

Alíquotas de 50 µl de bactérias competentes foram incubadas com 10 µl do produto das reações de ligase por 2 horas à 4°C, seguidos de um choque térmico a 42°C por 90 segundos. As células receberam a seguir 1 ml de meio LB e permaneceram por uma hora à 37°C. Depois de centrifugadas por 5 minutos, o sobrenadante foi retirado, e foi adicionado 100 µl de LB e semeadas em LB-agar (15% de bacto/ágar), contendo o antibiótico selecionador: ampicilina 100 µg/ml. Colônias de bactérias resistentes foram plaqueadas mais uma vez em LB/ágar mais antibiótico, e foram crescidas em de LB líquido mais o antibiótico selecionador para testes posteriores ou sequenciamento.

6. Extração do DNA plasmidial em pequena escala

Este procedimento foi realizado seguindo as instruções do “Kit Wizard Minipreps” (Promega). As bactérias transformadas foram inoculadas em 5 ml de LB com 100 µg/ml de ampicilina e cresceram por 16 horas a 37°C sob agitação constante. Estas foram recuperadas por centrifugação a 22000xg por 5 minutos à 4°C, lavadas em 150 µl da solução de suspensão (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM EDTA; 100 (g/ml RNase A), ressuspensionadas em 150 µl da solução de lise (0,2M de NaOH; 1% SDS), agitadas gentilmente. Após isto foi adicionado 150 µl da solução neutralizante (1,32 M de acetato de potássio), o lisado foi centrifugado a 22000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado, transferido para outro tubo, e a ele foram adicionado 500 µl da

resina. A mistura permaneceu sob agitação constante por 30 minutos, Após isto foi transferida para a uma micro coluna de onde o DNA foi extraído da resina pela adição de 50 µl de água a 75°C e centrifugadas por 1 minuto e o DNA pode ser dosado e estocado para sua utilização nos ensaios.

7. Análise do DNA proveniente da transformação com pOP13 VDR de Camundongo

O material proveniente da ligação em pOP13 foi digerido segundo um padrão de enzimas de restrição conhecido para se verificar a inserção e orientação da região do receptor de Vitamina D.

O inserto contendo a região amplificada foi clonado no sítio Not I de pOP13 localizado entre os nucleotídeos de número 3107 e 3884 segundo mapa de sítios de restrição fornecido pelo fabricante. Na posição 2633 e 3100 do vetor estão sítios para a enzima de restrição Hind III (BRL) e o inserto de VDR de camundongo possui nas regiões 1304, 1561 e 1892 sítios para a enzima Ava I (BRL), mas iremos considerar somente o sítio 1304, pois os outros sítios estão em uma região do inserto que não foi amplificada, conseqüentemente não estão presentes.

Desta forma, após uma digestão com as duas enzimas, as bandas encontradas devem ser as seguintes: de 5070, 1311 e 467 pares de bases, no caso da clonagem ter sido efetuada no sentido de leitura (“sense”) e de 6342, 467 e 39 pares de bases nos casos da clonagem ter ocorrido no sentido inverso (“anti-

sense”), como mostrado na figura 5. No caso do vetro estar vazio seram apresentadas bandas de 5045 e 467 pares de bases (aproximadamente).

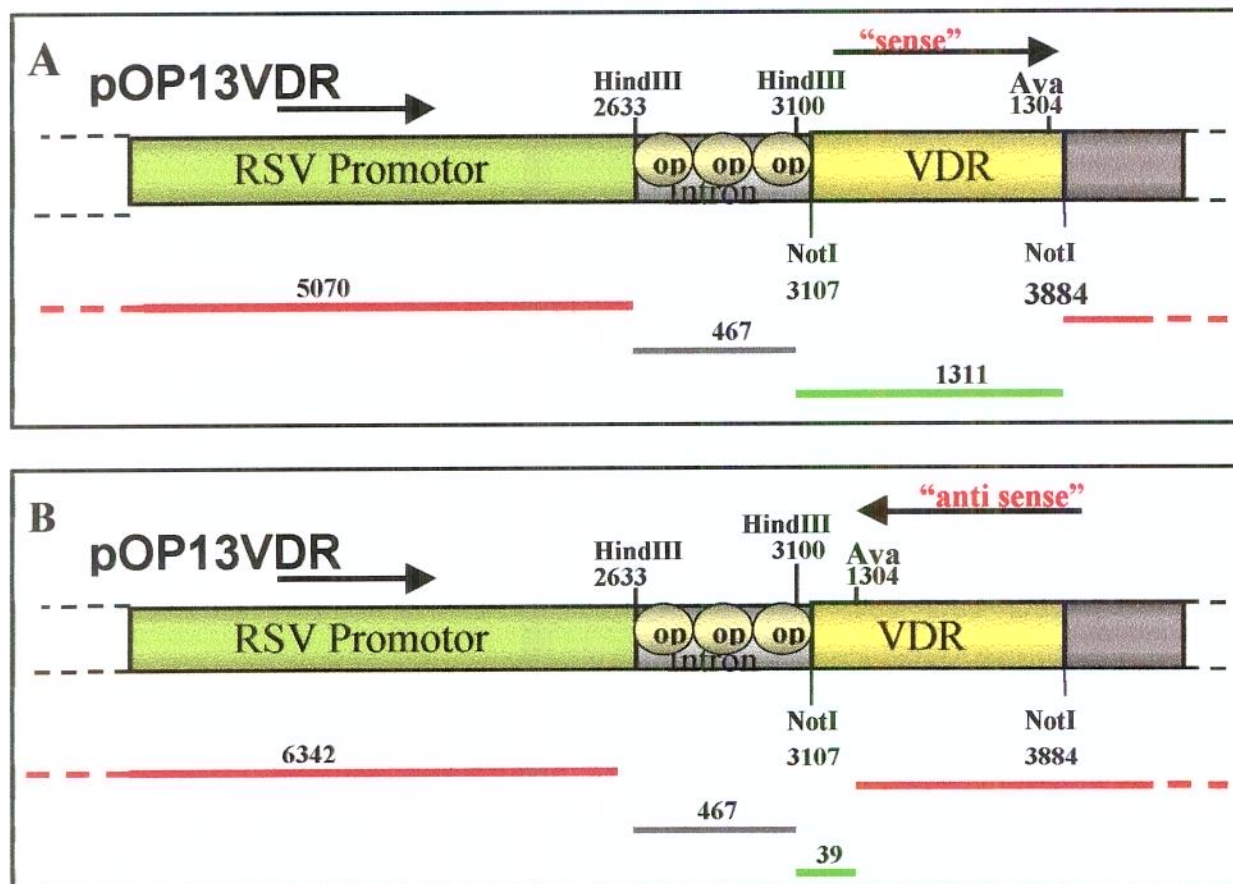


Figura 5: Esquema representando a digestão do pOP13VDR com as enzimas de restrições Hind III e Ava I.

A- representa o cDNA de VDR clonado no sentido "sense", que após a digestão apresenta três bandas com aproximadamente, 5070 (somatória das duas bandas em vermelho), 1311 (verde) e 467 (azul) pares de bases.

B- representa o cDNA de VDR clonado no sentido "antisense", que após a digestão apresenta três bandas com aproximadamente, 6342 (somatória das duas bandas em vermelho), 39 (verde) e 467 (azul) pares de bases.

8. Isolamento do DNA em larga escala - pOP13VDR de camundongo “sense” e p3'SS

Este procedimento foi realizado seguindo as instruções do “Kit FlexiPrep” - Pharmacia .

As bactérias transformadas foram inoculadas em 5 ml de LB com 100 µg/ml de ampicilina e cresceram por 16 horas, a 37°C, sob agitação constante. Após este procedimento foi retirado 1 ml e inoculado em 250 ml de LB, mantendo-se nos mesmos padrões de crescimento. Estas foram recuperadas por centrifugação a 7700xg por 10 minutos a 4°C, lavadas em 50 ml de STE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA) e ressuspensas em 15 ml da solução I (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 400 µg/ml RNase I) e 1 ml de lisozima (10 mg/ml), permanecendo no gelo por 5 minutos. Então foi adicionado 15 ml da solução II (0,2 de NaOH, 1% SDS), agitadas varias vezes e incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos; adicionou-se 15 ml de solução III (acetato de potássio), permanecendo novamente no gelo por 5 minutos. O lisado foi centrifugado a 12000xg por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado, transferido para outro tubo, e precipitado com 2 volumes de Etanol absoluto por 1 hora no -70°C, que foi recuperado por centrifugação, seco e ressuspendido em 15 ml de Sephaglas FP [resina em uma solução de guanidina-HCl (7 M guanidina-HCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA)]

permanecendo por 1 hora a temperatura ambiente. A resina-DNA foi centrifugada e lavada com 15 ml de “Wash Buffer”, com 15 ml de Etanol 70%. O DNA foi extraído da resina pela adição de 2,5 ml de água, e quantificado em gel analítico de agarose 0,8%.

9. Transfecção estável da linhagem celular HC11 ras

Os DNAs de pOP13VDR de camundongo e o p3'SS foram introduzidos nas células usando-se o método de precipitação com fosfato de cálcio (Ausubel *et al.*, 1992). As células foram plaqueadas um dia antes da transfecção num número adequado que permitisse uma confluência de aproximadamente 60% no dia da transfecção. Esta linhagem celular é cultivada em RPMI acrescido de 10% de soro fetal, 5 µg/ml de insulina (Sigma) e 10 ng/ml de EGF (Fator de crescimento epidermal - Sigma) e três horas antes do início do experimento as células receberam meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 1,2 g/l de NaHCO₃, 10 mM de Hepes pH 7,4 e 100 µg/ml de estreptomocina e ampicilina, suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Os DNAs a serem transfectados (27 µg de pOP13VDR de camundongo e 3 µg de p3'SS em uma garrafa de 75 cm²) foram ressuspensos em 500 µl de água estéril mais 50 µl de 2,5 M de CaCl₂. Um volume de 500 µl de tampão 2x HeBs (0,28 M NaCl, 50 mM Hepes, 1,48 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) foi

gotejada sob esta solução e agitada lentamente pelo despreendimento de bolhas com uma pipeta de 1 ml. O precipitado foi formado lentamente por 20 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi adicionada às garrafas de forma que seu volume fosse 1/10 do meio de cultura. A incubação foi de 16 horas a 37°C. A fase líquida foi desprezada, sendo as células submetidas a um “choque” de glicerol (10 % em DMEM) por 1 minuto. A seguir as células foram “lavadas” com DMEM e re-alimentadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Dois dias após a transfecção as células foram repicadas e divididas em dois lotes, um lote foi congelado e o outro foi diluído na proporção de 1:10 e selecionadas com G418 (200µg/ml) e Higromicina (250µg/ml) durante 14 dias. Colônias independentes foram recolhidas das placas com o uso de anéis de clonagem e plaqueadas isoladamente. Parte das células de cada clone foram congeladas e a outra mantida em cultura para a realização dos experimentos.

Experimentos realizados com os clones obtidos

10. Cultura de células

As linhagens celulares HC11, HC11-ras e os 16 clones obtidos após transfecção com o cDNA de VDR, foram cultivadas em RPMI 1640 contendo 1,2 g/l de bicarbonato de sódio; 10 mM de HEPES (ácido N-2-hidroxietil-

piperazina-N²-2-etano-sulfônico) pH 7,4; 50 µg/ml de ampicilina, estreptomicina e gentamicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B e suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5 µg/ml de insulina (Sigma) e 10 ng/ml de EGF (Fator de crescimento epidermal - Sigma), em estufa a 37 °C em atmosfera constante de 5% de CO₂.

O meio de cultura foi preparado com água milliQ e esterilizado por passagem através de membrana de nitrocelulose (0,2 µ de porosidade). O soro fetal foi inativado por calor, 30 minutos a 56°C.

Para a manutenção das linhagens, estas foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e antes de atingirem a confluência, foram lavadas com PBS-EDTA e tripsinizadas com ATV (0.2% tripsina, 0.02% EDTA), seguindo-se à adição de RPMI com 10% de soro fetal bovino, e as aliquotas provenientes da tripsinização foram transferidas para outras garrafas.

Para a preservação das linhagens celulares utilizou-se o congelamento, onde as células foram mantidas na presença de meio de cultura, 30% de soro fetal bovino e 10% de DMSO e congeladas, sucessivamente, a -20°C (2h), -70°C (24h) e -180°C em nitrogênio líquido. As células foram congeladas em aliquotas de 1 ml em ampolas de congelamento e o nitrogênio líquido em container apropriado.

11. Extração de DNA celular

As células HC11, HC11-*ras* e os clones obtidos da transfecção estável foram crescidos até a confluência em uma garrafa de 25 cm², retiradas e lavadas com PBS. Os precipitados celulares foram ressuspensos em 500 µl de TES (20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS) e proteinase K (20 µg/ml) e incubados a 37°C por 18 horas. As amostras foram a seguir extraídas uma vez com fenol:clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e centrifugadas a 22000xg por 10 minutos. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e extraída duas vezes com clorofórmio/álcool isoamílico 24:1 e centrifugadas a 22000xg por 10 minutos. O DNA precipitado em acetato de sódio 0,3 M e dois volumes de etanol por 16 horas à -20 °C. Em seguida, o DNA foi recuperado por centrifugação por 15 minutos a 5000xg, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e dissolvido em água. A concentração do DNA foi determinada pela leitura à densidade ótica de 260 nm (1 DO = 50 µg/ml) e a razão 260/280 nm igual ou superior a 1,8.

11.1. Análise do DNA por “Dot Blot”

A membrana de nylon Hybond-N (Amershan) foi previamente equilibrada em 2x SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de sódio pH 7,0), colocadas no aparato de “dot blot” à vácuo. Em cada poço foi adicionado 300 µl

de solução desnaturante (1,6 N NaOH, 0,1 M EDTA). Depois foram aplicados na membrana 3 a 5 µg de DNA em 300 µl de solução desnaturante. A membrana secou à temperatura ambiente por 16 horas e as amostras fixadas por exposição a UV por 10 minutos.

A membrana foi pré-hibridizada com 6x SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de sódio pH 7,0), 10 x Denhardt's (1 g/ml Ficoll 400, 1 g/ml polivinilpirolidona, 1 g/ml soro albumina bovina), 0,5% SDS, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão por 6 horas a 56°C. Após este tempo foi adicionado a sonda radioativa, permanecendo por 16 horas nas mesmas condições.

Os DNAs usados como sonda foram marcados com [α 32 P] dCTP pelo método de "random priming" (Feinberg e Vogelstein, 1983) usando o kit "Random Primers DNA Labelling System" da BRL. Foram eles: o fragmento de 1,4 Kb do pOP13VDR rato/Not I para o cDNA de VDR de rato, e fragmento de 0,467 Kb do pOP13CAT/Hind III, que contém o cDNA correspondente a região "lac operon" do plasmídeo. Cada membrana recebeu 1×10^7 cpm de sonda/ml. A membrana foi lavada duas vezes a temperatura ambiente e mais duas vezes à por 56°C, com 2x SSC e 0,1% SDS. Filmes de raio X foram expostos à membrana, por 24 horas a -70 °C.

12. Extração do RNA celular (Ausubel *et al*, 1992)

As células dos clones obtidos da transfecção estável foram cultivadas em RPMI com 10% de soro, acrescida de 5 mM de IPTG por 4 e 8 horas numa superfície de 50 cm² ; também foram cultivadas células nas mesmas condições na ausência de IPTG (controle). Estas foram lisadas com 3,5 ml de solução de guanidina (4M isotiocianato de guanidina, 25mM acetato de sódio pH 7,0, 0,1M β -mercaptoetanol, 0,5% N-laurilsarcosina). O lisado viscoso foi passado 8 vezes através de uma agulha de 21G, para quebra do DNA cromossomal e diminuição de sua viscosidade. O lisado foi colocado sobre um colchão de 3,0 ml de cloreto de cézio 5,7 M (dissolvido em 0,1 M EDTA pH 8,0) e centrifugado por 15 horas à 15 °C num rotor Beckman SW 41 a 25.000 rpm. O sobrenadante foi removido e o precipitado contendo o RNA foi seco e recuperado em 1,0 ml de etanol absoluto gelado, sendo transferido para um tubo “eppendorf”, onde foi centrifugado. O sobrenadante foi removido e ao precipitado foram adicionados 270 μ l de água, 30 μ l de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 1 ml de etanol absoluto, permanecendo por 6 horas no -20 °C. Após este período o RNA foi recuperado por centrifugação e re-precipitado como descrito acima. Este foi então re-dissolvido em água e a sua concentração foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260 nm. Esta leitura nos permite o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade ótica

(D.O.) corresponde a aproximadamente 40 ug/ml de RNA de fita simples e a relação entre as leituras a 260 nm e 280 nm (D.O.260/D.O.280) permite estimar a pureza do ácido nucleico. Esta relação para uma preparação pura de RNA deve ser de 1,7 a 2,0. Se houver uma contaminação da preparação com proteína, a relação será significamente menor (Maniatis e col., 1989). O material foi estocado a -70°C até o uso. Além disso, a concentração do RNA foi confirmada após a eletroforese em mini-gel analítico de agarose e a integridade do mesmo também, onde todas as amostras apresentavam os RNAs 28S e 18S preservados.

12.1. Análise do RNA por “Northern blotting”

Amostras de 20 μg de RNA celular preparadas como descrito no item 12 foram ajustadas para 5 μl em H_2O MilliQ. Acrescentou-se 25 μl de tampão da amostra [750 μl de formamida deionizada, 150 μl de tampão MOPS 10x, 240 μl de formaldeído, 100 μl de H_2O MilliQ, 100 μl de glicerol, 80 μl de azul de bromofenol (10% peso/volume)] e incubadas por 15 minutos à 65°C . A seguir, foi adicionado 1 μl de brometo de etídeo 1,0 mg/ml. O RNA foi a seguir separado em gel de agarose preparado com 1,3 gramas de agarose em 127 ml de água MilliQ, 14 ml de tampão MOPS [0,02M ácido 3-(N-morfolino) propa-sulfônico]; 0,005 M acetato de sódio; 0,0001 M EDTA pH 7,0] e 6,0 ml

de formaldeído 37%. A eletroforese foi realizada a 60 mA constante, com agitação do tampão à temperatura ambiente por 4 a 5 horas. A frente da amostra contendo azul de bromofenol migrou aproximadamente 9 cm. Seguindo-se a eletroforese, o RNA foi visualizado diretamente sobre um transluminador Foto UV 450 DNA, no comprimento de onda de 254 nm e fotografado.

Após lavagem adequada sob agitação (1x água MilliQ, 15min/T.A por 1 vez; 2x SSC 15 min/T.A. por 2 vezes) o material foi transferido através de um sistema a vácuo para a membrana de nylon (Hynbond N) utilizando-se o aparelho Vacugene XL (Pharmacia). Desfeito o sistema, a membrana foi devidamente identificada quanto ao material usado, número da série, a localização das bandas-padrão e foi seca a temperatura ambiente. Posteriormente, o RNA foi fixado à membrana na radiação ultra-violeta no comprimento de onda de 254 nm por 3 minutos.

A membrana foi pré-hibridizada com 5x SSPE (0,75M NaCl, 0,05M NaH_2PO_4 , 4mM EDTA pH 7,4), 5x Denhart's (1g/ml Ficoll 400, 1g/ml polivinilpirolidona, 1g/ml soro albumina bovina), 1% SDS, 100 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de espermatozoides de salmão e 50% de formamida durante 20 horas à 42 °C. A hibridização das membranas foi realizada na mesma condição que a de pré-hibridização mais 5% de sulfato de dextrana e a sonda radioativa. Quando a sonda de DNA complementar ao RNA ribossomal de 18S foi usada, a

hibridização foi precedida com a mesma solução sem sulfato de dextrana e com 200 µg/ml de espermatozoides de salmão, por 3 horas a 60°C.

Os DNAs usados como sonda foram marcados com [α 32 P] dCTP pelo método de “random priming” (Feinberg e Vogelstein, 1983) usando o kit “Random Primers DNA Labelling System” da BRL. Os DNAs são, um fragmento de aproximadamente 0,400 Kb do pOP13CAT/ApaI + Sca I (BRL), correspondendo a região TK poly (A) do plasmídeo; o receptor de vitamina D do pOP13VDR murino/Not 1 e o fragmento usado para expressão do RNA ribossomal de 18S de 1,9 Kb do plasmídeo pBR322. Cada membrana recebeu 5×10^6 cpm de sonda/ml. A membrana foi lavada duas vezes a T.A. por 15 min. (2x SSPE, 0,1% SDS), uma vez a T.A. por 15 min. (1x SSPE, 1% SDS), uma vez a T.A. por 15 min. (0,2x SSPE 0,1% SDS) e uma vez a 52 °C por 30 min. (0,1x SSPE, 0,1% SDS). A membrana hibridizada com a sonda de rRNA 18S foi lavada nas mesmas condições só que a 60°C para a lavagem com 0,1x SSPE, 0,1% SDS.

Filmes de raio X foram expostos à membrana à -70 °C, por 5 dias ou até obtenção de sinal adequado. As bandas impressionadas no filme foram quantificadas usando-se um densitômetro ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech). Os valores normalizados do mRNA de interesse são dados pela razão entre o sinal apresentado pela amostra após hibridização com a sonda adequada e

o apresentado após hibridização com o DNA de controle interno, ou seja, rRNA 18S.

13. Citometria de fluxo

13.1. Quantificação de DNA e determinação da fração de células em cada fase do ciclo celular

A fração de células em cada fase do ciclo celular foi determinada pela quantificação de DNA com iodeto de propídio (PI-Sigma), um agente que se intercala de maneira estequiometricamente a cada 4 pares de bases da dupla hélice de ácido nucleico.

Os ensaios foram realizados de acordo com a técnica descrita por Vindelov e Christensen (1990). Resumidamente, cerca de 1×10^6 células são submetidas a centrifugação e lavadas com PBS. Ao sedimento celular adicionou-se 200 μ l de tampão (250 mM sacarose, 40 mM citrato de sódio, 5% DMSO). Desta maneira as células podem ser processadas a seguir ou estocadas por período de tempo de até 5 anos a -70°C .

Imediatamente após o descongelamento das células, adicionou 450 μ l da solução A (30mg/l tripsina), misturando gentilmente por inversão do tubo, e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Este passo visa a permeabilização da membrana celular. A seguir foi acrescentado 375 μ l da

solução B (0,5 g/l de inibidor de tripsina, 0,1 g/l ribonuclease A) que tem por objetivo neutralizar a tripsina e eliminar mínimas quantidades de RNA dupla hélice que possam estar presentes na amostra. Após 10 minutos a temperatura ambiente foi adicionado 375 µl da solução C (416 mg/l iodeto de propídio) à 4°C. Após 15 minutos filtramos as amostras em “nylon mesh” 30 µm (Spectrum Medical Industries, Houston, Tx, EUA). Estas soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque contendo 3,4 mM citrato de sódio, 0,1% Nonidet P40, 1,5 mM espermina, 0,5 mM Tris.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson), foram analisadas 10.000 partículas por amostra, em fluxo não superior a 100 células/segundo. O conteúdo de DNA foi avaliado pela fluorescência vermelha (long pass filter, 610 nm), captado como fluorescência 2 (FL2), analisado em escala linear. A população celular a ser analisada foi selecionada em histograma bivariado de área de FL2 (FL2-A) versus largura de FL2 (FL2-W), para eliminar agregados de 2 ou mais células, que poderiam dar a falsa impressão de serem células com conteúdos de DNA correspondente a DNA tetraplóide (4n) ou até 6n cromossomos.

A análise da porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo, G0/G1, S e G2/M foi realizada utilizando-se o software Cellfit da Beckton Dickson.

13.2. Ensaio de imunofluorescência indireta para análise da expressão de VDR

Cerca de 10^6 células, foram diluídas em PBS/Etanol absoluto 70% gelado com agitação e mantidas a 4°C até serem processadas. As células foram lavadas 1 vez com PBS e 1 vez com PBS/0,5% de leite desnatado. Após centrifugação, as células foram ressuspensas em 200 µl e divididas em dois tubos, um tubo foi incubado com o anticorpo contra VDR (VD2F12) (Dame *et al*, 1988) biotinilado na diluição de 1:100, por 1 hora sob agitação a 4°C, o outro tubo nas mesmas condições mas sem o anticorpo. Após lavagem com PBS/0,5% leite desnatado/0,1% Tween 20, as células foram expostas a 50 µl de avidina FITC (2,5 µg/ml) em PBS, por 30 minutos a 4°C, na ausência de luz. A seguir as células foram lavadas, duas vezes, ressuspensas em PBS e analisadas quanto a expressão da proteína de por citometria de fluxo. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (Beckton Dickson), foram analisadas 10.000 células por amostra, em uma velocidade não superior a 100 células/segundo.

14. Parâmetros de crescimento: Tempo de dobramento

As linhagens HC11, HC11-*ras* e os clones 1, 7 e 13 foram plaqueadas com distribuição homogênea em placas de 35 mm e incubadas a 37

°C em atmosfera de 5% de CO₂. Foram plaqueadas 2×10^4 células em 10% de soro fetal bovino tratado (com carvão dextrana) e 5 µg/ml de insulina. O meio foi substituído a cada dois dias e três placas de cada linhagem foram coletadas em períodos determinados (24, 48, 72, 96 e 120 horas), para contagem de células em câmara de Neubauer. Os resultados obtidos foram analisados em papel semi-log e foram calculados os respectivos tempos de dobramento de cada linhagem em cada condição estudada.

RESULTADOS

Construção do vetor de transfecção contendo o receptor de vitamina D (VDR)

A primeira parte de nosso trabalho consistiu no isolamento do cDNA específico de VDR, a partir da linhagem HC11, usando a reação de polimerase em cadeia (PCR) e oligonucleotídeos iniciadores específicos para VDR de camundongo. Para isso, sintetizamos oligonucleotídeos iniciadores, incluindo sítios reconhecidos pela enzima Not I nas extremidades 5', apresentando as seqüências (5'**GAGGCGGCCGCAAGAGCACCTTGGGCTCTAC3'**) direcionada para a extremidade 5', e (5'**AGAGCGGCCGCA CAGGCACCACTGTGGGCCACC3'**) para a extremidade 3' (veja na figura 6, as regiões correspondentes no cDNA). O motivo para a clonagem do cDNA de VDR direto da linhagem HC11 foi o fato de termos descoberto que o cDNA completo clonado por Burmester *et al.* (1988), e doado pelo Prof. DeLucca, que pretendíamos usar, não continha os primeiros 250 nucleotídeos.

O produto proveniente da clonagem do cDNA específico de VDR de camundongo em pUC 18 foi em seguida usado para transformar bactérias DH5 α , sendo que 35 colônias foram obtidas. Destas, com auxílio da reação de PCR e oligonucleotídeos específicos para pUC 18, selecionamos três colônias que possuíam o inserto. Desta, uma foi usada em todos os experimentos a

seguir, sendo que nesta., o sequenciamento automático de cerca de 500 nucleotídeos de cada extremidade permitiu concluir que a sequência obtida correspondia aos 1340 pares de bases da sequência completa necessária para codificar a proteína receptora de vitamina D (figuras 7A e 7B).

```

1cgtccaccgc cagaccagag ttcttttggc cggacagatc tgtgagactt ccaggagagc acccttgggc tctactcacc
81 ctgtctcttc agggatggag gcaacagcgg ccagcacctc cctgcccgc cctggtgact ttgaccgaa cgtgccccgg
161 atctgtggag tgtgtggaga ccgagccaca ggcttcact tcaatgctat gacctgtgaa ggctgcaaag gtttctcag
241 gcggagcatg aagcggagg ccctgttcac ctgtccctc aatggagatt gccgcacac caaggacaac cggcgacact
321 gccaggcctg ccggctcaaa cgctgtgtgg acatcggcct gatgaaggag ttcacctga cagatgagga ggtacagcgt
401 aagagggaga tgataatgaa gagaaaagag gaagaggcct tgaaggacag tctgaggccc aagctatctg aagaacaaca
481 gcacatcata gccatctgc tggacgccc ccacaagacc tatgaccca cctacgtga cttcaggac ttcggcctc
561 cagttcgtat ggacggaagt acagggagct atttccaag gccacactc agcttctcc ggaactcctc ctctccagc
641 tctgacctgt acaccacctc actagacatg atggaacct cggcttttc caacctggat ctgaacggag aggattctga
721 tgaccctgt gtagctctgg acctgtctc tctctccatg ctgcccacc tggctgacct tgcagttac agcatcaaaa
801 aggtcatcgg ctttgccaag atgatccag gattcaggga tctcacctc gatgaccaga ttgtctgt taagtcaagc
881 gccattgagg tgatcatgtt acgtccaac cagctttca ccatggatga tatgtctgg gactgtggca gccaggacta
961 caagtacgac gtcaccgatg tctccaaagc tgggcacacc ctggagctga tcgagcccct cataaagtc caggtggggc
1041 tgaagaagct gaactacat gaggaagagc atgtcttct catggccatc tgcatgtct cccgggaccg acctggggtc
1121 caggacgcca agctggtgga agccattcag gaccgcctat ccaacacgct gcagacctac atccgtctgc gccaccgcc
1201 ccagggcagc caccagctct atgccaagat gatccagaaa ctggccgacc tgcggagcct caacgaggaa cactccaaac
1281 aataccctc cctctcttc cagcccgaga atagcatgaa gtcacaccc ctgtgtctgg aggtgtctgg caatgagatc
1361 tctgaccag ggtggcccac agtgggtgcct gggtaggggc gctctccag agccctgtgc ccaggcctg ggcttggtg
1441 cagcccagca gtgcctctg cctttctgg agttcagtc tctctgccc atggcctctg tctgtctgcc tcatccttc
1521 tctgcccag ctaaacacct ggtctccct tctgtagac ctgagttgc tctgtctct tgagacctca gttaggagag
1601 gctgtgttt atctgacaaa ggaactcaat tgggataga gggcaggggc tgaaggcgga actctgccta ggggatgcct
1681 ccaccacaag gggctgtgc ttgttcaag ggaggcaggc agaagagacg cattactcc tcaggacag gtacctgcac
1761 ctccctcac tccagccca cctgcccaca gctagttag aaatctggc cctgctgcg aagggtacac aacctacca
1841 tcatccctac tgtgtccgt ctcgtctgc cgctgtctg tgtattctg acccggggga gtaggtcact gagggcctc
1921 ctctctctgc ctttactc acggggtca ctactgcca agatgacaa atacactacc acacgaacca aggagcactc
2001 acccagccct gcagttccca ctttgaggt ttgccatgg gaa

```

Figura 6. Sequência completa de nucleotídeos do cDNA do receptor de vitamina D de rato (Burmester *et al.*, 1988). A região correspondente aos iniciadores utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR), está representada em azul. A metionina inicial e o codon de terminação estão em vermelho

A clonagem intermediária do cDNA de VDR em pUC 18 e a presença dos sítios NotI nas extremidades permitiu a excisão daquele do plasmídeo pUC 18 e a sua re-clonagem no vetor pOP13, previamente digerido com a mesma enzima. Com a transformação realizada com esse vetor obtivemos 242 clones resistentes ao antibiótico ampicilina. Analisamos 16 clones por digestão enzimática, utilizando as enzimas Aval e Hind III.

Desta forma, após digestão, as bandas esperadas seriam as seguintes: de 5070, 1311 e 467 pares de bases no caso da clonagem ter sido efetuada no sentido de leitura (“sense”) e outras três de 6342, 467 e 39 pares de bases no caso ter ocorrido clonagem no sentido inverso (“anti-sense”). Se o vetor estivesse vazio deveríamos encontrar duas bandas: de 5045 e 467 pares de bases (aproximadamente). Foram encontrados dois clones “sense” e dois clones “anti-sense”. A figura 8 mostra este padrão de restrição enzimática do vetor pOP13VDR e a digestão diagnóstica de dois clones obtidos que confirmam a orientação “sense” de um e “anti-sense” do outro. Escolhemos ao acaso um dos clones “sense” e o vetor controle p3'SS para crescer em larga escala, preparando-os para a transfecção.

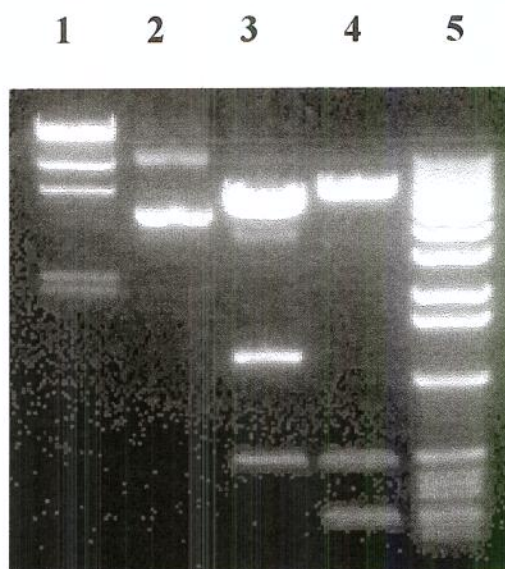


Figura 8. - Foto do gel de agarose, ilustrando dois clones de pOP13VDR de camundongo. Coluna 1, DNA λ / Hind III; coluna 2, DNA não digerido proveniente de um clone pOP13VDR camundongo “sense”; coluna 3 e 4 os clones digeridos com Hind III e Ava I, “sense” (5070, 1311, 467 pares de bases) e “anti-sense” (6342, 467, 39 pares de bases), respectivamente; coluna 5, 1Kb ladder (GIBCO-BRL).

O ensaio de transfecção estável da linhagem celular HC11-ras com pOP13 gerou clones com diferentes expressões constitutivas de VDR

Do ensaio de transfecção da linhagem celular HC11-*ras* feita pelo método de precipitação com fosfato de cálcio utilizando o pOP13VDR e p3'SS, obtivemos 16 clones.

Ensaio de “Dot Blot”, realizado com, o DNA extraído dos clones e utilizado como sonda uma região do próprio plasmídeo pOP13CAT correspondente ao “lac operon” (região “Intron”), localizada a montante do local

de inserção do cDNA de VDR (Figura 5), mostrou positividade forte em todos os clones e fraca no controle HC11-*ras* (Figura 9). Isto nos fez concluir que os clones 1,7 e 13, apresentando sinal mais forte que o controle, haviam sido transfectados. A repetição desse experimento de “Dot Blot”, utilizando como sonda o cDNA de VDR, mostrou serem esses resultados confiáveis, sugerindo que esses clones teriam sido transfectados com sucesso (Figura 10).

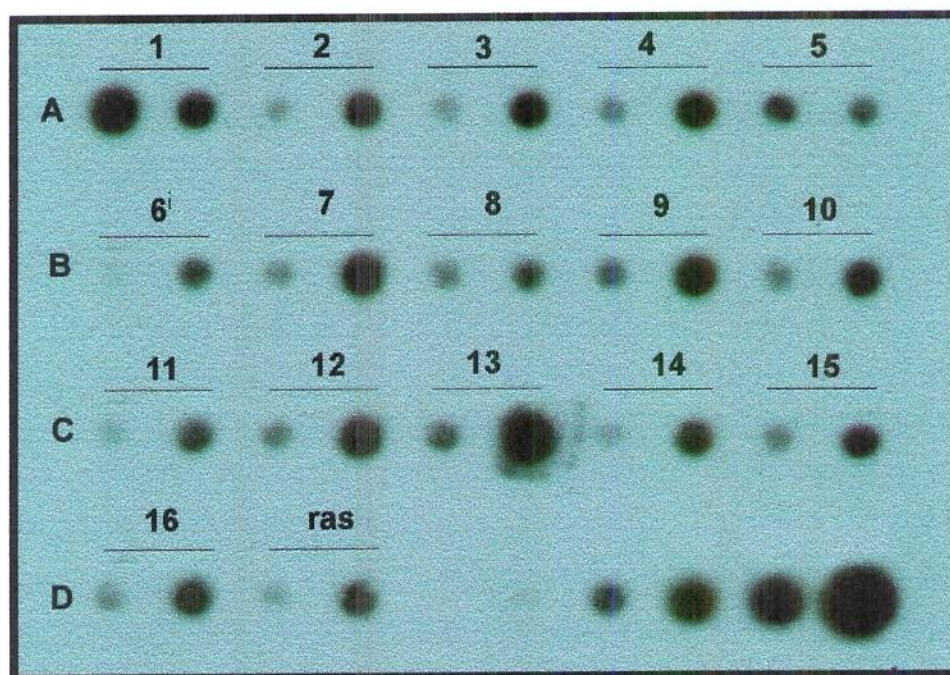


Figura 9: “Dot Blot” dos clones de HC11-*ras* transfectados com pOP13VDR e p3’SS. 3 e 5 µg de DNA extraído dos clones de HC11-*ras* Linha (A): clones de números 1 a 5; na (B): clone 6 a 10; na (C): clones 11 a 15; na (D): clone 16, célula HC11-*ras* e o plasmídeo pOP13CAT, 0,1ng, 1ng, 5ng, 10ng e 50ng. A hibridização foi executada com o fragmento de 0,467 Kb do pOP13CAT/Hind III, que contém o cDNA correspondente a região “lac operon” do plasmídeo, marcado com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. A figura mostra o autorradiograma obtido após exposição de um filme de raio X à membrana por 16 horas. O clone 1 está invertido.

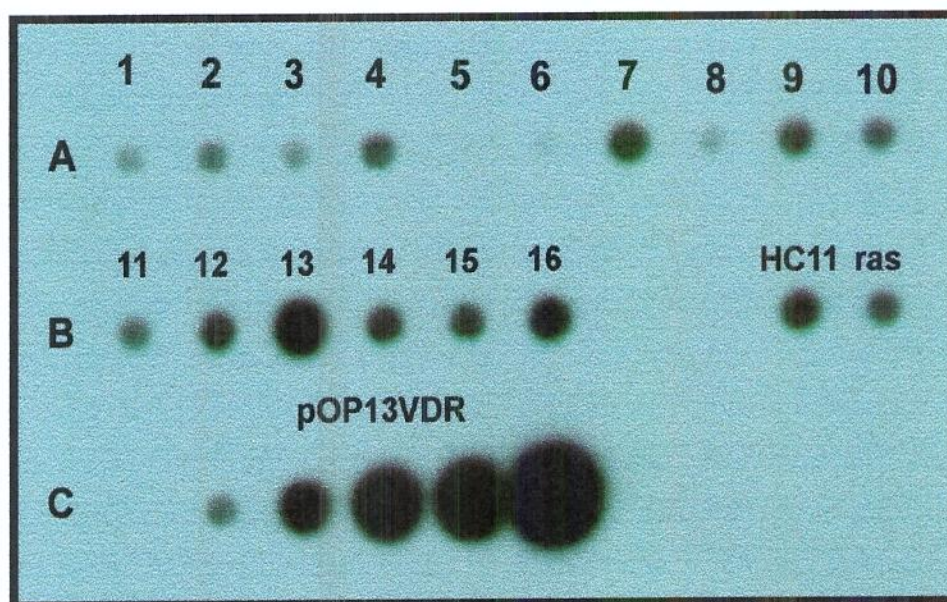


Figura 10. - “Dot Blot” dos clones de *HC11-ras* transfectados com **pOP13VDR** e **p3'SS**. 3 μ g de DNA extraído dos clones de *HC11-ras* (linha “A”: de números 1 a 10, na “B”: 11 a 16, as linhagens *HC11* e *HC11-ras*, na “C” o plasmídeo **pOP13VDR** murino, 0,1ng, 1ng, 5ng, 10ng e 50ng. A hibridização foi executada com o fragmento de 1,4 Kb do **pOP13VDR** rato/Not I que contém o cDNA do VDR, marcado com $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP. A figura mostra o autoradiograma obtido após exposição de um filme de raio X à membrana por 16 horas.

A análise por “Northern blot” das linhagens celulares *HC11*, *HC11-ras*, dos clones 1, 7 e 13 gerados a partir da linhagem *HC11-ras*, quando hibridizados com a sonda correspondente ao DNA do VDR (retirada do **pOP13VDR** com Not I) revelou um transcrito de peso molecular de 4,6 Kb e um de aproximadamente 2,4 Kb em todas as amostras. A análise densitométrica

destas bandas, considerando as somatórias das duas bandas, referentes aos transcritos de 4,6 e 2,4 Kb, mostrou que os clones 1 e 7 possuem menor intensidade de sinal do que a linhagem HC11 e maior do que o apresentado pela HC11-*ras*, o clone 13 apresentou intensidade de sinal menor que a HC11-*ras*, como mostra a figura 11.

Os resultados apresentados referem-se aos ensaios realizados com os clones sem adição de IPTG, pois após uma série de ensaios utilizando concentrações e tempos de tratamentos diferentes com IPTG, não observamos diferenças entre as células controle e as tratadas. Ensaio de Northern utilizando RNA total das linhagens celulares HC11, HC11-*ras* e dos clones 1 e 13 (tratados com 5 mM de IPTG por 4 e 8 horas) foi, realizado para verificar se o mRNA correspondente a proteína Lac I estaria sendo processada. A hibridização com a sonda correspondente ao cDNA correspondente a “Lac I” (retirada do p3’SS com XbaI e Eco RV) não demonstrou nenhum transcrito de mensageiro da proteína Lac I nesses clones. Este resultado sugere que o plasmídeo responsável pela produção da proteína repressora não esteja presente ou não seja funcional nos clones.

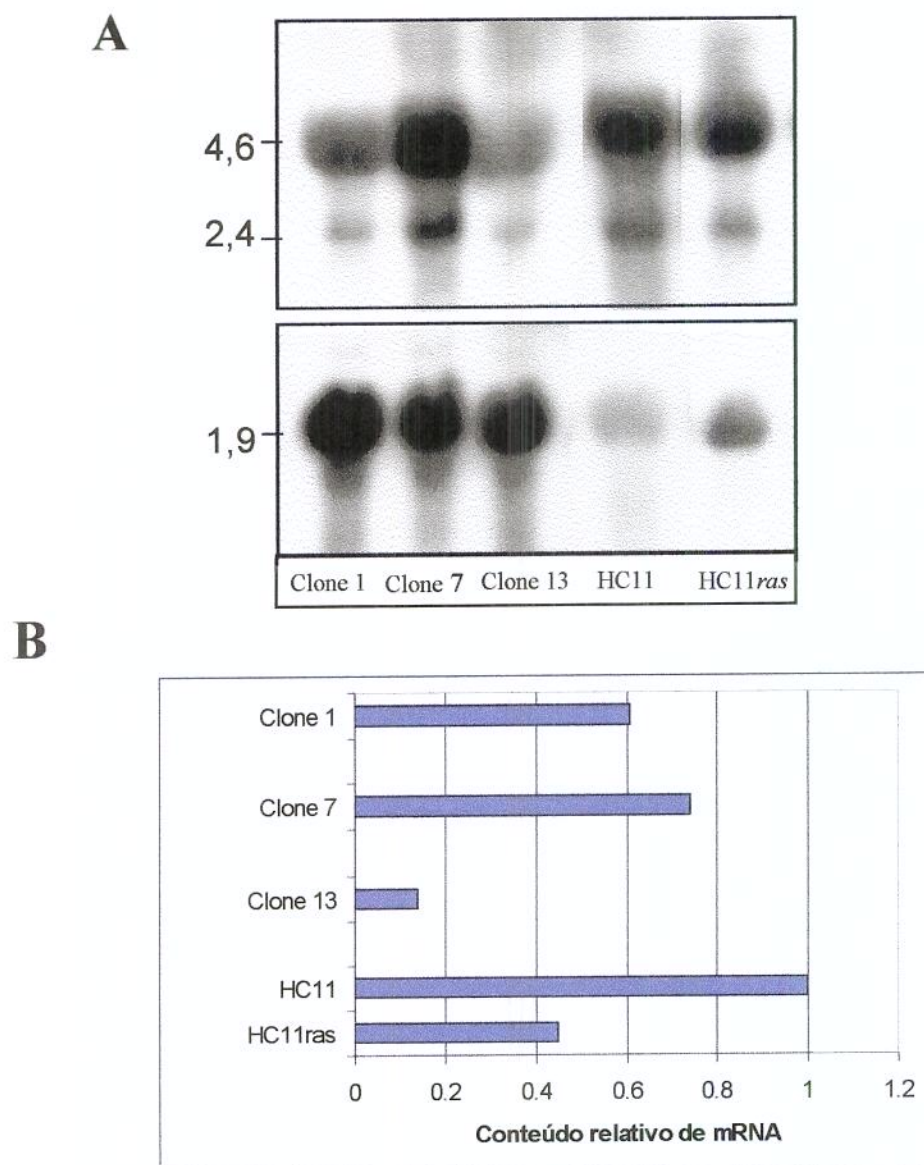


Figura 11. Expressão dos mRNAs de VDR e do rRNA 18S em células HC11, HC11 ras e dos clones 1, 7 e 13.

A- RNA total extraído de células HC11, HC11-*ras* e dos clones 1, 7 e 13, derivados HC11-*ras* transformada com pOP13VDR, foram separados em gel de agarose, em seguida transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda de DNA complementar aos RNAs de VDR (4,6 Kb e 2,4 Kb) e ao rRNA 18S (1,9 Kb) marcadas com [α - 32 P] dCTP. A figura mostra uma composição dos autoradiogramas obtidos a partir da exposição de filmes raio X à membrana, após hibridização com cada uma das sondas separadamente.

B- Gráfico representativo das quantidades relativas de mRNA de VDR, estimada em relação a quantidade do rRNA 18S e expressa em uma unidade arbitrária, considerando o mRNA de VDR em HC11 como tendo valor 1.

A análise por citometria de fluxo das células HC11, HC11-*ras*, dos clones 1, 7 e 13 utilizando o anticorpo contra VDR (VD2F12) (Dame *et al.*, 1988) biotinizado, mostrou que a linhagem HC11-*ras* apresenta menor expressão de VDR quando comparada à linhagem HC11 controle, apresentando $35,9\% \pm 15,10\%$, e $85,51\% \pm 14\%$, respectivamente, de positividade para VDR. A expressão de VDR do clone 1, em condições basais, foi similar aquela apresentada pela linhagem HC11 e significativamente maior que a da linhagem HC11-*ras*, apresentando $64,9\% \pm 8,2\%$ de células positivas. Os clones 7 e 13 apresentaram expressão semelhante à das células HC11-*ras*, como mostra a figura 13.

Estes dados sugerem que os clones tranfectados, embora não sejam modulados por IPTG, expressam proteína de VDR em quantidades variáveis constitutivamente. O tratamento com IPTG, independente da concentração e tempo de exposição não mudou a expressão de VDR medidos por citometria de fluxo, indicando que o vetor p3'SS contendo o cDNA responsável pela proteína repressora estaria ausente ou não funcional.

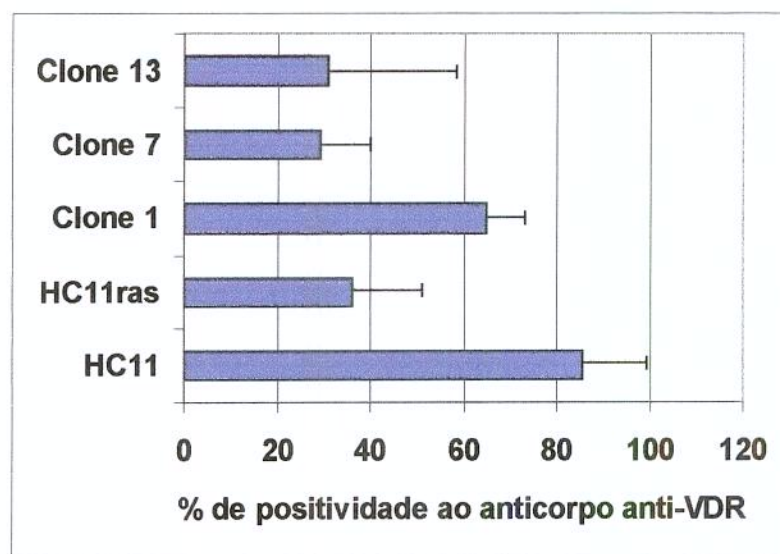


Figura 13. Expressão da proteína de VDR nas linhagens HC11, HC11 ras, clones 1, 7 e 13. A expressão da proteína do receptor de vitamina D foi determinado por citometria de fluxo em ensaio usando anticorpo monoclonal específico para o receptor, conforme descrito em métodos. Os resultados representam a média (barras) e o desvio padrão (haste) das porcentagens de positividade determinadas em 8 ensaios no caso das linhagens HC11 e HC11-ras, e 4 nos clones.

Vitamina D influi sobre parâmetros proliferativos dos Clones de HC11-ras contendo o vetor de expressão de VDR

A. Linhagens HC11ras com diferente conteúdo de VDR apresentam diferentes curvas de crescimento populacional

Conforme ilustrado na figura 14, a vitamina D confirmou ser um potente inibidor de crescimento das células da linhagem epitelial mamária murina HC11, que passou a apresentar uma velocidade de proliferação diminuída

após exposição a 10 nM de vitamina D por 5 dias, quando comparadas às células não tratadas, consideradas como controle. Na linhagem transformada HC11-*ras* nas mesmas condições, não houve queda na proliferação. Verificamos, portanto, que a linhagem celular HC11, mas não a linhagem HC11 *ras*, apresenta diminuição de proliferação em resposta a vitamina D3.

Na tabela 2 estão representados os valores numéricos relativos ao tempo de dobramento (TD) da linhagem HC11, HC11*ras* e dos clones 1, 7 e 13, antes e após o tratamento com 10 nM de vitamina D3 por 5 dias. Os dados mostram um aumento no tempo de dobramento da linhagem HC11 após tratamento com Vitamina D em relação às células controle (Controle: $18.64\text{h} \pm 0.79\text{h}$ vs $35.68\text{h} \pm 4.3\text{h}$; $n=3$; $p= 0.002$). Na linhagem HC11-*ras*, após tratamento com vitamina D, observou-se um menor incremento no tempo de dobramento em relação ao controle (controle: 18.24h horas vs VD: 19,92h). O clone 1, apresentou aumento significativo no tempo de dobramento quando exposto a Vitamina D (controle: $17.28\text{h} \pm 1.98\text{h}$ vs VD: $28.48\text{h} \pm 7.02\text{h}$; $n=3$; $p=0.056$), estes valores são semelhante aos apresentados pela linhagem HC11. Os clones 7 e 13, após exposição a vitamina D, apresentaram um aumento discreto do tempo de dobramento, (controle: $17.52\text{h} \pm 3.9\text{h}$ vs $21.52\text{h} \pm 4.9\text{h}$; controle: 26.26h vs VD: 31.56h, respectivamente), intermediário aquele apresentado pela linhagem

HC11 e HC11*ras*. As figuras 14 e 15, representam as curvas de crescimento da linhagem HC11, HC11*ras* e dos clones, antes e após o tratamento com 10 nM de vitamina D3 por 5 dias.

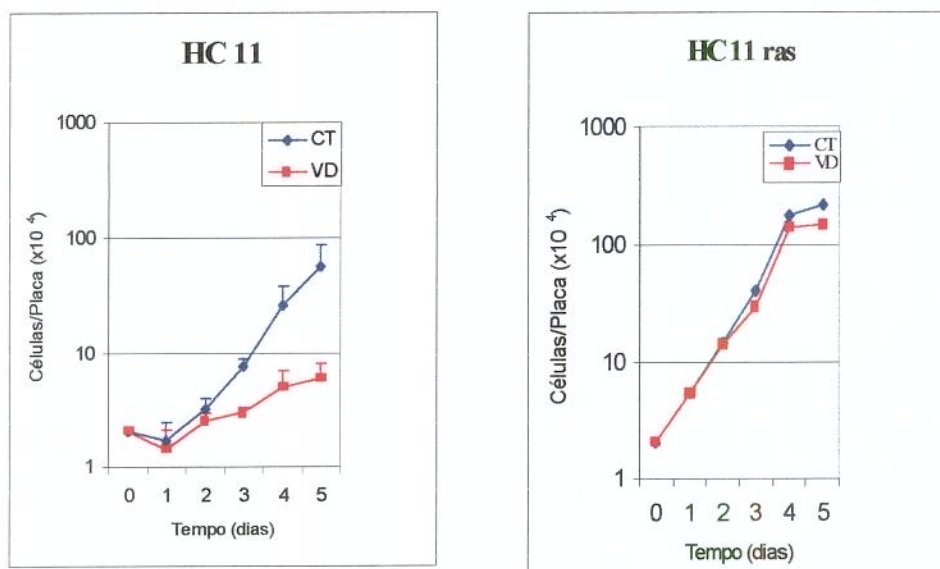


Figura 14 – Curvas de crescimento populacional das células HC11 e HC11-*ras* sob ação da vitamina D3. 2×10^4 células foram plaqueadas em meio RPMI, contendo 10% de FBS tratado e 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina (CT), segundo descrito em métodos. Após 24 horas o meio foi substituído por outro contendo 10 nM de vitamina D3 (vermelho) ou meio normal de cultivo (azul). Nos dias indicados, as células foram retiradas das placas, contadas e foram calculados os respectivos tempos de dobramento (TD) em dias. Na ordenada está representada a densidade celular, na abscissa o tempo em dias. Os resultados estão expressos pela média e pelo desvio padrão de 3 ensaios no caso da linhagem HC11. Para a linhagem HC11-*ras* foi feito 1 ensaio. No caso da linhagem HC11 parental, a análise estatística demonstrou diferença significativa entre o grupo tratado com Vitamina D em relação ao controle ($p < 0,05$, teste ANOVA).

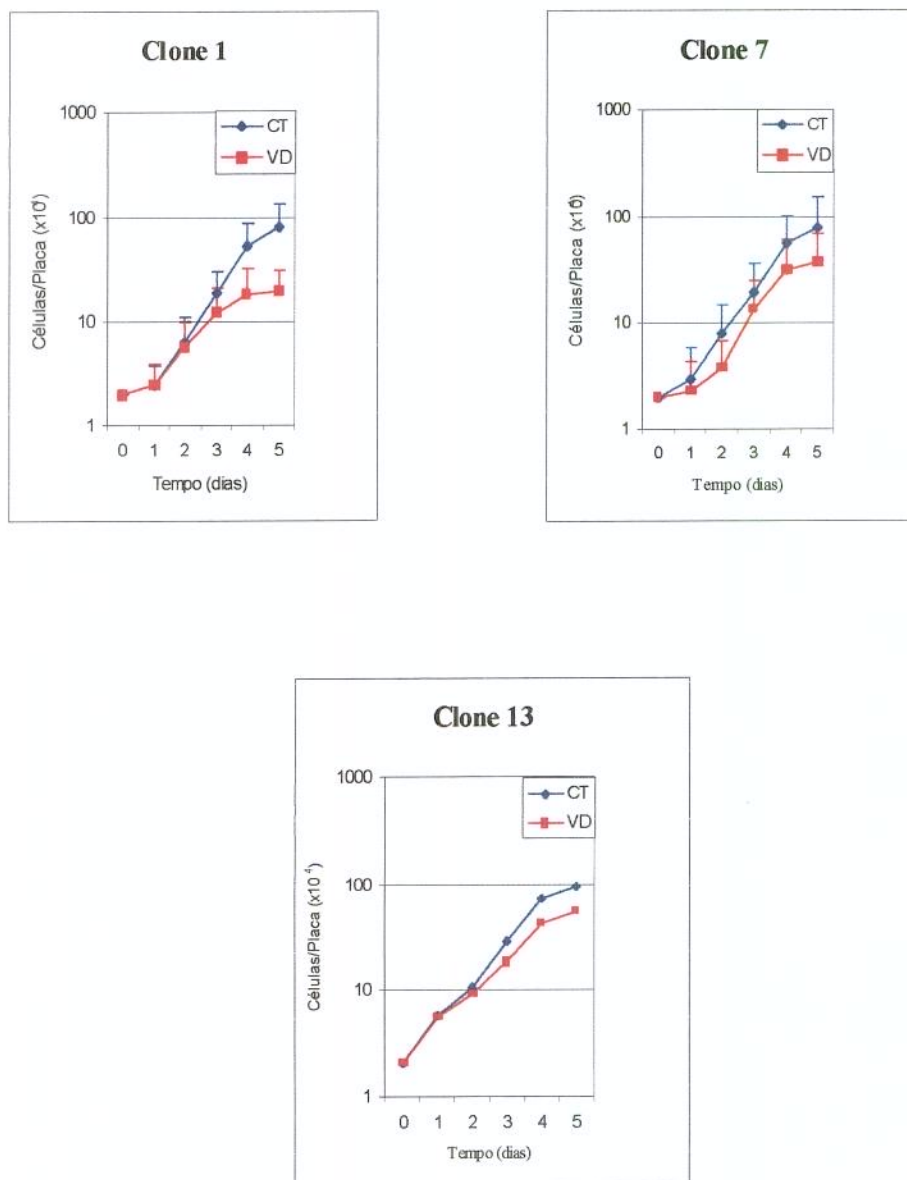


Figura 15. Curva de crescimento populacional da linhagem HC11-ras transfectada com pOP13VDR e p3'SS em resposta ao tratamento com Vitamina D. Os Clones 1, 7 e 13, na quantidade 2×10^4 células foram plaqueadas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS tratado e $5 \mu\text{g/ml}$ de insulina (CT), segundo descrito em métodos. Após 24 horas o meio substituído por outro contendo 10 nM de vitamina D3 (em vermelho) ou meio normal de cultivo (em azul). Nos dias indicados, as células foram retiradas das placas, contadas e foram calculados os respectivos tempos de dobramento (TD) em dias. Na ordenada está representada a densidade celular, na abscissa o tempo em dias. Os resultados estão expressos pela média e pelo desvio padrão. O número de ensaios para o clone 13 foram de 2: - para os outros clones foram de 3. A análise estatística do clone 1 com relação ao controle com $p=0,056$, análise feita pelo teste ANOVA.

HC11	TD (horas)
Controle	18,64 ± 0.79
Vitamina D3	33.12 ± 4.31 ★
HC11- <i>ras</i>	TD (horas)
Controle	18.24
Vitamina D3	19.92
Clone 1	TD (horas)
Controle	17.28 ± 1.98
Vitamina D3	28.48 ± 7.02
Clone 7	TD (horas)
Controle	17.52 ± 3.91
Vitamina D3	21.52 ± 4.93
Clone 13	TD (horas)
Controle	26.76
Vitamina D3	31.56

Tabela 2- Parâmetros de crescimento de células HC11, HC11 ras, Clones 1, 7 e 13. 2×10^4 células foram plaqueadas em meio RPMI + 10% de FBS tratado e 5 µg /ml de insulina (CT), segundo descrito em métodos ou na presença de 10 nM de vitamina D3 por cinco dias consecutivos. As células das linhagens indicadas foram coletadas diariamente e foram calculados os respectivos tempos de dobramento (TD) correspondentes ao início da fase exponencial de crescimento em condições normais ou após tratamento hormonal. O número de ensaios para a linhagem HC11-ras foi de 1, para o clone 13 foi de 2 e as demais amostras foram de 3.

★ - análise estatística significativa com relação ao controle com $p < 0,05$, feita pelo teste ANOVA.

Como mostrado na figura 16, os resultados expressos em porcentagem de inibição de crescimento em relação às células sem tratamento hormonal, demonstram uma inibição de crescimento pela vitamina D3 de $88\% \pm 2.44\%$, quando considerado o número de células em cultura no quinto dia consecutivo de tratamento com VD em relação ao controle considerado como

100%. Na linhagem HC11 *ras*, a inibição foi menor, de 30%, também medida no quinto dia de tratamento. Os clones também tiveram inibição do crescimento em relação ao controle, sendo que o clone 1 com maior expressão de VDR apresentou a maior porcentagem de inibição ($76\% \pm 1.41\%$) medido no quinto dia de tratamento. O clone 7 e 13, que apresentam menor expressão de proteína medida pelo ensaio de imunofluorescência, apresentaram inibição de $46\% \pm 21.4\%$ e de 31% , respectivamente, no mesmo espaço de tempo.

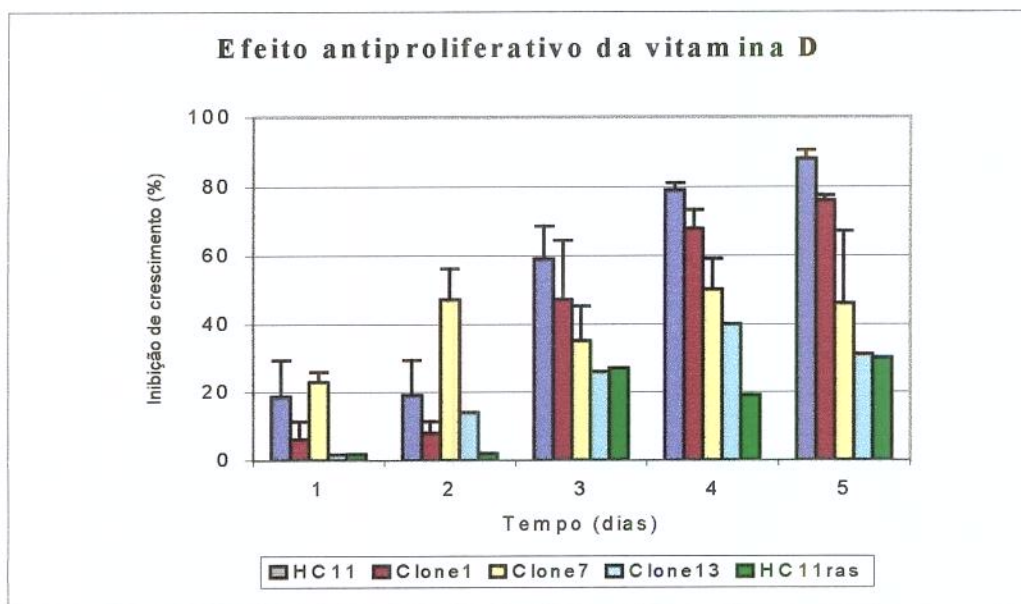


Figura 16. Inibição de crescimento pela vitamina D3 em HC11, HC11 *ras*, Clones 1, 7 e 13: tempo-dependência. 2×10^4 células foram plaqueadas em meio RPMI + 10% de FBS tratado e $5 \mu\text{g/ml}$ de insulina (CT), segundo descrito em métodos ou na presença de 10 nM de vitamina D3 por cinco dias consecutivos. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do crescimento em relação às células sem tratamento hormonal. Na ordenada está representada a inibição de crescimento, expressa em porcentagem e na abscissa, o tempo em dias. O número de experimentos para a linhagem HC11-*ras* foi de 1, para o clone 13 foi de 2 e as demais amostras foram de 3.

B. Clones com maior quantidade de VDR apresentam um aumento de fração de células na fase G0-G1 do ciclo celular medido por citometria de fluxo.

O tratamento com Vitamina D, 10 nM, por 72 horas, acarretou diminuição da proliferação no clone 1, à semelhança do acontecido com a linhagem parental HC11 submetida ao mesmo tratamento, enquanto que os clones 7 e 13, com quantidade de VDR intermediário, apresentaram comportamento proliferativo não diferente estatisticamente daquele apresentado pela HC11 *ras*.

Na linhagem HC11, HC11 *ras* e no clone 1, VD induziu aumento da porcentagem de células em fase G0/G1 do ciclo celular e queda de fração de fase S, medido por incorporação de iodeto de propídio e análise por citometria de fluxo. Este efeito foi acentuado nas linhagens HC11 (controle: 55,9% vs VD: 82,0% em G0/G1) e no clone 1 (controle: 79,54% $\pm$ 1,3% vs VD: 91,01% $\pm$ 2,66% em G0/G1, $p = 0,0026$; $n=3$). Em relação à linhagem transformada por *ras* (controle: 57,92 $\pm$ 10,8% vs VD: 65,69% $\pm$ 11,1% em G0/G1, $n=5$), esses valores não diferiram para os clones 7 e 13, conforme mostra a figura 17.

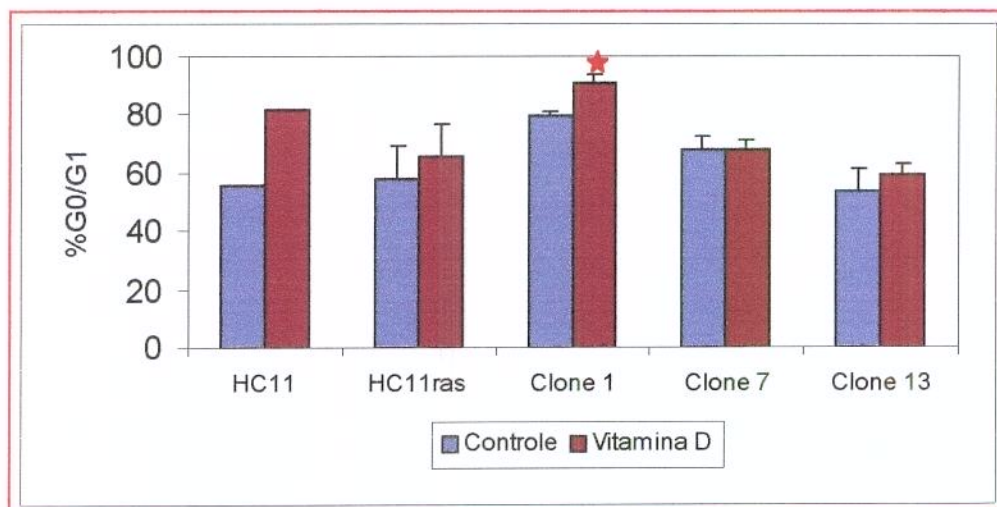


Figura 17. Determinação da fração de células em G0/G1 nas linhagens HC11, HC11 ras, clones 1, 7 e 13. As linhagens foram tratadas com vitamina D, 10 nM por 72 horas. A porcentagem de células em G0/G1 no ciclo celular foi determinada pela incorporação de iodeto de propídeo, como descrito em métodos. O gráfico mostra a média e o desvio padrão para 3 ensaios independentes. ★- significativo com relação ao controle com $p < 0.005$, análise feito pelo teste ANOVA.

Alterações Morfológicas dos subclones de HC11-ras transfectadas com VDR

Observações realizadas diariamente, durante o trabalho, com o auxílio de um microscópio óptico mostraram que a células HC11 parentais apresentam baixa relação núcleo-citoplasma, são mais fibroblastóides e, crescem mais esparsas. Quando tratadas com vitamina D3, esta linhagem sofreu uma grande queda na proliferação e passaram a apresentar células mais arredondadas, ocorrendo um aumento do volume citoplasmático. A linhagem transformada por Ha-ras apresentou um núcleo maior e formato estrelar, algumas com

prolongamentos em relação à linhagem parental e maior empilhamento. A adição de vitamina D provocou na HC11ras aumento discreto no tamanho nuclear, sem qualquer alteração estrutural.

Os clones transfectados apresentaram características morfológicas muito semelhantes, com células possuindo um núcleo maior e formato menos estrelado que a HC11ras. Quando tratadas com vitamina D, apresentaram-se mais arredondadas.

Em relação aos demais clones obtidos após a transfecção com pOP13VDR e p3'SS, foram realizados ensaios para a determinação da proteína de VDR. A determinação da distribuição de células pelo ciclo celular foi realizada após tratamento com vitamina D 10 nM, com IPTG 10 mM e vitamina D mais IPTG. Estes ensaios foram realizados na fase final da escrita deste manuscrito e são mostrados na próxima tabela.

HC11 = proteína 85%

	<i>G0-G1</i>	S	S + G2M
Controle 72 h	55.9	23.4	21.20
VD 72 h	82.0	15.7	51.44

Clone 1 = proteína 64,87%

	<i>G0-G1</i>	S	S + G2M
Controle 72 h	79.54	18.63	20.37
VD 72 h	91.01	6.61	8.98
IPTG	50.88	25.00	49.12
IPTG + VD	63.94	14.49	36.05

Clone 2 = proteína 15,2%

	<i>G0-G1</i>	S	S + G2M
Controle 72 h	76.12	8.88	23.88
VD 72 h	81.83	9.13	18.18
IPTG	78.19	9.16	21.82
IPTG + VD	81.31	5.99	18.69

Clone 3 = proteína 16,54

	<i>G0-G1</i>	S	S + G2M
Controle 72 h	57.76	28.92	42.24
VD 72 h	59.22	32.20	40.78
IPTG	55.71	31.45	44.29
IPTG + VD	60.72	28.25	39.29

Clone 4 = proteína 15,99%

	<i>G0-G1</i>	S	S + G2M
Controle 72 h	88.21	8.13	11.80
VD 72 h	88.04	8.88	11.97
IPTG	86.93	9.51	13.07
IPTG + VD	89.32	7.29	10.67

Clone 5 = proteína -

	<i>G0-G1</i>	S	S + G2M
Controle 72 h	64.99	18.30	35.01
VD 72 h	71.71	13.17	28.28
IPTG	67.52	21.41	32.48
IPTG + VD	76.86	14.94	23.15

Clone 6 = proteína 35,83%

	G0-G1	S	S + G2M
controle 72 h	56.22	18.28	43.79
VD 72 h	55.64	21.94	44.37
IPTG	55.90	19.65	44.10
IPTG + VD	54.00	22.47	46.00

Clone 7 = proteína 29,28%

	G0-G1	S	S + G2M
controle 72 h	61.41	21.40	4208
VD 72 h	65.62	16.00	34.38
IPTG	59.03	22.382	40.6
IPTG + VD	63.83	20.26	36.17

Clone 8 = proteína 11,07%

	G0-G1	S	S + G2M
controle 72 h	48.63	29.89	51.37
VD 72 h	51.92	26.39	48.08
IPTG	48.46	29.21	51.44
IPTG + VD	49.78	23.75	50.22

Clone 11 = proteína 11,33%

	G0-G1	S	S + G2M
controle 72 h	48.5	35.06	5105
VD 72 h	57.61	27.37	42.39
IPTG	52.41	32.71	47.59
IPTG + VD	59.36	28.02	40.64

Clone 13 = proteína 31,11%

	G0-G1	S	S + G2M
controle 72 h	70.71	21.24	29.29
VD 72 h	73.29	17.90	26.71
IPTG	74.68	18.07	25.31
IPTG + VD	76.05	18.65	23.95

HC11 *ras* = proteína 32,88%

	G0-G1	S	S + G2M
controle 72 h	66.76	20.33	33.24
VD 72 h	65.41	24.88	34.6

Discussão

Numerosos estudos têm evidenciado a importância da vitamina D no processo de proliferação e diferenciação celulares, tanto *in vivo* como *in vitro* (Abe *et al.*, 1981). Receptores de vitamina D têm sido demonstrados em células de glândula mamária normal (Hosomi *et al.*, 1983; Mezzetti *et al.*, 1987), em linhagens de carcinoma (Buras, *et al.*, 1994; Elstner *et al.*, 1995) e em 70-80% dos cânceres de mama (Eisman *et al.*, 1980; Freake *et al.*, 1984; Berger *et al.*, 1987 e 1991).

Dados anteriores do grupo, utilizando a linhagem epitelial mamária HC11, isolada a partir de células de camundongo BALB/c, durante o período gestacional, demonstraram que esta linhagem apresenta diferenças no conteúdo de VDR e quando tratada com vitamina D apresenta diminuição de proliferação, causando um acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular, quando comparada com a mesma linhagem após transformação maligna pela ação do proto-oncogene Ha-*ras*.

Estes resultados sugerem que a proliferação nas células mamárias HC11 seja norteadas pelo conteúdo de VDR e a falha da linhagem HC11-*ras* em responder à vitamina D seja devido ao menor conteúdo de VDR. Para responder a esta pergunta, resolvemos estudar a influência da super-expressão

do receptor de vitamina D nos parâmetros proliferativos da HC11-*ras*. Uma análise comparativa foi efetuada com linhagem parental HC11.

O nosso primeiro passo foi isolar cDNA do receptor de VDR derivado de HC11, passo em que tivemos vários problemas. De início, tentamos usar o cDNA clonado por Burmester *et al.* (1988) doado pelo Prof. DeLucca (Biochemistry, Wisconsin, U. USA), descrito como sendo o cDNA correspondente à sequência inteira do mRNA de VDR. Após uma série de insucessos em clonar esse cDNA no vetor pOP13, descobrimos que este cDNA não continha os primeiros 250 pares de base. Por este motivo, construímos primers e com auxílio da PCR e a linhagem HC11 como molde, amplificamos e seqüenciamos o cDNA do VDR específico de camundongo. Talvez por essas dificuldades, a literatura apresente poucos trabalhos de transfecção com VDR. Em células hematopoéticas, transfecção permanente com VDR foi descrito por Hewison *et al.* (1994 e 1996), utilizando o fragmento da posição 4 a 2005 do original de 4600 pares de bases do cDNA de VDR humano para gerar clones “sense” e “antisense”; em linhagem de câncer de próstata, Hedlung *et al.* (1996) e Zhuang *et al.* (1997) utilizaram um fragmento de 2,0 Kb do cDNA de VDR humano, e em linhagem osteoblástica de camundongo (Takeshita *et al.* 1998), os autores utilizaram um vetor de expressão de VDR de rato pSG-VDR. Uma fonte de dificuldades pode ser a

existência de regiões não traduzidas no mRNA de VDR humano bastante longas, de função ainda desconhecida.

Obtidos os clones, verificamos que a transfecção de fato havia ocorrido. Embora a sequência de pOP13VDR e do p3'SS, que contém o gene lacI responsável pela produção da proteína repressora estejam presentes, a modulação por variação de concentrações e tempo de exposições a IPTG indicou que a proteína repressora ou não estaria sendo sintetizada ou não seria funcional. Embora o modelo pOP13 seja descrito como funcional inclusive *in vivo* (Wu *et al.* 1997), a própria Stratagene lançou recentemente no mercado um plasmídeo similar contendo um repressor induzido por um promotor mais potente (Stratagene, 1997), e também um anticorpo policlonal que reconhece a proteína Lac, produzido pelo plasmídeo p3'SS. Este anticorpo foi utilizado em dois trabalhos (Lu *et al.*, 1998; Erhardt e Pittman, 1998), onde os autores transfectam as linhagens celulares primeiramente com o plasmídeo p3'SS, que é selecionado por higromicina e em seguida confirmam o sucesso da transfecção detectando a proteína Lac I, por Western blotting e com o uso do anticorpo. Em seguida os clones são transfectados com o c-DNA de interesse. Outros autores, como Kampfer *et al.* (1998), usando o mesmo vetor pOp13 para co-transfecção dos genes de PKC λ , PKC ϵ e PKC ζ com o oncogene Ha-Ras a mesma linhagem HC11, utiliza como controle o próprio vetor de

expressão pOP13 vazio, o que nos leva a supor que talvez o autor tenha tido a mesma dificuldade que nós tivemos, e tenha usado o plasmídeo como um vetor de expressão puro. No nosso caso, os ensaios de Northern blot, usando como sonda o cDNA de lacI confirmaram que o RNA mensageiro da proteína repressora não estava presente nos nossos clones.

O transcrito de 4,6 Kb, detectado pelo ensaio de Northern Blot, encontrado em outras linhagens de origem mamária que expressam VDR (Hall *et al.*, 1990) e também descrito por outros membros do nosso grupo (Escaleira *et al.*, 1994), foi detectado normalmente. Além desse transcrito, detectamos um transcrito de 2,4 Kb que não havia sido visualizado nos ensaios anteriores com a linhagem em questão. Esse transcrito foi descrito em células de camundongo por Krishnan e Feldman (1991 a/b) que descreve 3 transcritos de VDR de 7,5Kb, 4,4Kb e 2,4Kb). Em células leucêmicas humanas, dados do grupo focalizando linhagens estabelecidas (Folgueira *et al.*, 1998) e em células leucêmicas de pacientes e leucócitos de sangue periférico de indivíduos normais, apresentam somente o transcrito de 4,6 Kb (Federico *et al.*, não publicado). A nossa interpretação foi de que embora as transfecções tenham sido um sucesso, a formação do inibidor não estaria ocorrendo.

Os resultados de citometria de fluxo, mostrando que o clones são

heterogêneos quanto a expressão de VDR proteína, confirmaram nossa idéia de que a transfecção com o vetor pOP13 contendo cDNA de VDR estava sendo expresso constitutivamente. Além disso, tanto a linhagem HC11 *ras*, como a HC11 parental, apresentaram baixo e alto conteúdo de VDR respectivamente, de acordo com os dados obtidos no laboratório anteriormente (Escaleira e Brentani, 1999).

A vitamina D é um potente inibidor de crescimento das células da linhagem HC11, mas não da linhagem HC11 *ras*, como demonstrado pelo aumento da fração de células em G0/G1 do ciclo celular após exposição, resultado esse que reproduziu aquele já encontrado por Escaleira e Brentani, 1999. Verificamos, que o clone 1, que apresenta altos níveis de VDR proteína, sofre inibição de crescimento quando tratado com VD, como demonstrado pelo aumento de células em G0/G1. Estes resultados, indicando um comportamento semelhante ao da linhagem HC11, sugerem que o conteúdo maior de VDR (em relação à célula HC11-*ras*) possa estar relacionado com essas diferenças proliferativas. Os resultados estão de acordo com os relatados por Sebag *et al.* (1992), os quais, utilizando modelo de queratinócitos transformados por *ras*, sugerem que as diferenças na magnitude da resposta antiproliferativa frente a vitamina D talvez possam ser relacionadas com as diferenças na abundância do receptor nas duas linhagens. Os dados deste

último e os nossos, juntos, sugerem que o a interação de *ras* e de VDR possam estar ocorrendo de forma independente da linhagem celular.

Em relação a inibição de proliferação apresentada pela vitamina D, pode-se dizer que diferentes mecanismos de ação podem estar envolvidos. A vitamina D induz marcadores bioquímicos e morfológicos de apoptose nas células de câncer de mama MCF-7 (Narvaez *et al.*, 1996). Nas linhagens HC11 e HC11-*ras*, como em outras linhagens mamárias, a inibição de crescimento provocada pelo tratamento com vitamina D não está associada com apoptose, como demonstrado pela ausência do padrão em escada na análise da fragmentação do DNA em gel de agarose (Escaleira e Brentani, 1999). Em uma variedade de células leucêmicas, a vitamina D induz parada em G1 do ciclo celular (Pols *et al.*, 1990). Este efeito sobre o ciclo celular parece correlacionado com a expressão de ciclina dependente de quinase (CDK) e inibidores de ciclina dependente de quinase (CKIs) induzidos por vitamina D, que incluem p21 e p27 e membros da família INK4, foi demonstrado na linhagem celular mielomonocítica U937 (Liu, *et al.*, 1996). A indução de p21 pela vitamina D na linhagem U937 parece ser mediada por um VDRE identificado no promotor do p21 humano e também através de mecanismos transcricionais (Liu, *et al.*, 1996).

O efeito de VDR em outras linhagens, entretanto, pode ser diferente. Em algumas linhagens de câncer de próstata, por exemplo, VDR influiria no crescimento de forma semelhante ao nosso modelo (Hedlung *et al.*, 1996; Zhuang *et al.*, 1997), isto é, a resposta depende do conteúdo de VDR. Por outro lado, Zhuang e Burnstein (1998) demonstram que as linhagens LNCaP e ALVA 31 de câncer de próstata exibem uma relação inversa entre níveis de VDR e resposta antiproliferativa perante a vitamina D. Quanto a interferência de *ras*, este parece sofrer interação com VDR também em queratinócitos imortalizados pelo papiloma vírus tipo 16 e transformados pelo oncogene *ras* ativado. Nesse modelo, os queratinócitos malignos não são somente resistentes ao efeito inibitório da vitamina D mas também a sua influência transcricional, neste modelo eles reportam a primeira incidência que a resistência ao tratamento com vitamina D ocorreria por disruptura do complexo VDR-RXR (Salomon *et al.* 1998).

Em resumo, estabelecemos 3 clones de HC11*ras* transfectada com cDNA de VDR com expressão variável de VDR, sendo a capacidade de inibição de proliferação paralela à quantidade de VDR expressa constitutivamente. A curva de crescimento do clone 1, portador de alta expressão de VDR, sugere uma reversão no padrão de crescimento, passível agora de ser inibido pelo tratamento com vitamina D, semelhante à da

linhagem HC11 parental e diferente da HC11*ras*. Isto sugere que, no modelo de progressão tumoral proporcionado pela linhagem HC11 e HC11 *ras*, o escape do controle de VDR seja importante para determinar uma vantagem proliferativa para a linhagem HC11 *ras*. Não é possível dizer no caso dos nossos clones, se o aumento de VDR influi na reversão do padrão de curva de crescimento diretamente ou se outros mediadores estariam envolvidos. Pode-se dizer que, o aumento de VDR por si só levou o clone 1 a um comportamento mais próximo da normalidade, o que leva a imaginar que os controles de proliferação normal sejam passíveis de serem recuperados em cânceres já estabelecidos. Nos outros clones, não observamos uma perfeita proporcionalidade entre a expressão de VDR e inibição de crescimento em resposta à vitamina, o que sugere que realmente existam outros mediadores da ação de VD. Além disso, VDR diminuído em carcinoma mamário humano tem sido correlacionado com pior sobrevida (Freake *et al.*, 1984 e Eisman *et al.*, 1987) sugerindo que as manipulações das vias de controle de VDR possam beneficiar esses pacientes.

Summary

Vitamin D₃, through its active metabolite 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂ D₃), is a powerful regulator of calcium homeostasis and is involved in the regulation of cell growth and differentiation in a large variety of cells. Its action is mediated primarily through binding to a member of the nuclear hormone receptor superfamily, the vitamin D receptor (VDR).

Most breast cancer cells lines express VDR and breast carcinoma patients presenting with VDR positive tumors appear to be associated with longer disease free survival as compared to patients with negative tumours. HC-11 cells, a mammary epithelial lineage established from midpregnant BALB/c mice, but not HC11 transformed with *Ha-ras* showed a strong growth inhibition with higher percentage of cells arrested in G0/G1 phase of cell cycle when exposed to vitamin D₃. In this work we asked whether the low VDR content would be the underlying cause of the lack of response of the HC11-ras cells to Vitamin D treatment.

In order to study the effect of VDR overexpression in HC11-ras cell growth, we first obtained the mouse VDR cDNA using total HC11 RNA as the template for PCR. Using this VDR cDNA cloned into the Not-1 site of the pOP13 expression vector, we generated 16 VDR-transfected HC11-ras clones expressing variable amount of VDR. Clone 1 presented with high VDR mRNA content, as determined by Northern blotting and high VDR protein, as measured by using biotilated anti-VDR MoAb and flow cytometry (64% $\pm$ 8,2% VDR positive cells). Clones 7 and 13 presented VDR content similar to HC11-ras (HC11-ras = 35,93% $\pm$ 15,10%; clone 7= 29,28% $\pm$ 10,62%; clone 13= 31,11% $\pm$ 27.2%) and lower than HC11 (85,5% $\pm$ 14% VDR positive cells).

Clone 1 was growth inhibited, when treated with Vitamin D 10 nM during 72 hours, as showed by Cell Doubling Time (CT: 17,28h $\pm$ 1,98h vs. VD: 28,48h $\pm$ 7,02h, $p = 0,056$) when compared to HC11-ras (CT: 18,24h vs VD: 19,92h). In addition, clone 1 increased G0/G1 phase fraction, determined by flow cytometry, when exposed to Vitamin D (CT: 79,54% $\pm$ 1,3 vs VD: 91.01% $\pm$ 2,66; $p < 0,005$). In keeping with these data, Clones 7 and 13 presenting with lower VDR content, were not growth inhibited as expected.

Our data suggest that, in HC11 tumor progression model, the lack of susceptibility of HC11-ras to growth inhibition induced by Vitamin D treatment might be reputed to its low VDR content. Furthermore, the effect of VDR replacement in clone 1, restoring HC11 susceptibility to Vitamin D treatment, suggests VDR might be a possible therapeutic target in breast cancer.

Bibliografia

ABE, J.; NAKANO, T.; NISHII, Y.; MATSUMOTO, T.; OGATA, E.; IKEDA, K. A novel vitamin D₃, 22-oxa-1,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits the growth of human breast cancer *in vitro* and *in vivo* without causing hypercalcemia. *Endocrinology* 129: 832-837, 1981.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. In *Current Protocols in Molecular Biology*, New York, Greene Publishing Associates, 1992.

BAKER, A. R.; McDONNELL, D. P.; HUGHES, M.; CRISO, T. M.; MANGELSDORF, D. J.; HAUSSLER, M. R.; PIKE, J. W.; SHINE, J.; O'MALLEY, B. W. Cloning and expression of full length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3294-3298, 1988.

BALL, R. K.; FRIIS, R. R.; SCHOENENBERGER, C. A.; DOPPLER, W.; GRONER, B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-Kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *Embo Journal* 7:2089-2095, 1988.

BARAN, D. T.; RAY, R.; SORENSEN, A.M.; HONEYMAN, T.; HOLICK, M.F. Binding characteristics of a membrane receptor that recognizes 1 α ,25-dihydroxyvitamin D and its epimer, 1 β ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Jour. Cell Biochem.* 56:510-517, 1994.

BARBACID, M. ras genes. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 779-827, 1987.

BERGER, U.; WILSON, P.; MCCLELLAND, R. A.; COLSTON, K.; HAUSSLER, M. R.; PIKE, J. W.; COOMBES, R. C. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptor in breast cancer. *Cancer Res.*, 47: 6793-6799, 1987.

BERGER, U.; MCCLELLAND, R. A.; WILSON, P.; GREENE, G. L.; HAUSSLER, M. R.; PIKE, J. W.; COLSTON, K.; EASTON, D.; COOMBES, R. C. Immunocytochemical determination of estrogen receptor, progesterone receptor, and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor in breast cancer and relationship to prognosis. *Cancer Res.*, 51: 239-244, 1991.

- BHATIA, M.; KIRKLAND, J. B.; MECKLING-GILL, K. A. Monocytic differentiation of acute promyelocytic leukemia cells in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is independent of nuclear receptor binding. *Jour. Biol. Chem.* 270:15962-15965, 1995.
- BLUNT, J. W.; DeLUCA, H. F.; SCHNOES, H. K. 25-hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D₃. *Biochemistry* 7: 3317-3322, 1968.
- BOUILLON, R.; OKAMURA, W. H.; NORMAN, A. Structure-function relationship in the Vitamin D endocrine system. *Endocr. Rev* 16: 200-257, 1995.
- BURAS, R. R.; SCHUMAKER, L. M.; DAVOODI, F.; BRENNER, R. V.; SHABAHANG, M.; NAUTA, R. J.; EVANS, S. R. T. Vitamin D receptors in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 31:191-202, 1995.
- BURMESTER, J. K.; MAEDA, N.; DeLUCA, H. F. Isolation and expression of rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1005-1009, 1988.
- BURMESTER, J. K.; WIESE, J.R.; MAEDA, N.; DeLUCA, H. F. Structure and regulation of the rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9499-9502, 1988b.
- CAFFREY, J. M.; FARACH-CARSON, M. C. Vitamin D₃ metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcome cells. *Jour. Biol. Chem.* 264:20265-20274, 1989.
- CAO, X.; ROSS, F. P.; ZHANG L.; MacDONALD, P. N.; CHAPEL, J.; TEITELBAUM, S.L. Cloning of promoter for the avian integrin β 3 subunit gene and its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Jour. Biol. Chem.* 268: 27371-27380, 1993.
- CHEN, K-S; DeLUCA, H. F. Cloning of the human 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene promoter and identification of two vitamin D-responsive elements. *Biochim Biophys Acta.* 1263:1-9, 1995.
- COLSTON, K. W.; BERGER, U.; COOMBES, R. C. Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. *Lancet* 1:188-191, 1989.

DAME, M. C.; PIERCE, E. A.; DeLUCA, H. F. Identification of the porcine intestinal 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gels by renaturation and immunoblotting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7825-7829, 1985.

DAME, M. C.; PIERCE, E. A.; PRAHL, J. M.; HAYES, C. E.; DeLUCA, H. F. Monoclonal antibodies to the porcine intestinal receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: interaction with distinct receptor domains. *Biochemistry*. 25: 4523-4534, 1986.

DANIELSON, K. G.; OBORN, C. J.; DURBAN, E. M.; BUTEL, J. S.; MEDINA, D. Epithelial mouse mammary cell line exhibiting normal morphogenesis "in vivo" and functional differentiation "in vitro". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3756-3760, 1984.

DARWISH, H. M.; DeLUCA, H. F. Identification of a 1,25-dihydroxyvitamin D₃ -response element in the 5' flanking region of the rat calbindin D-9K gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 603-607, 1992.

DeMAY, M. B.; KIERNAN, M. S.; DeLUCA, H. F.; KRONENBERG, H. M. Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8097-8101, 1992.

DeMAY, M. B.; GERARDI, J. M.; DeLUCA, H. F.; KRONENBERG, H. M. DNA sequences in the rat osteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 369-373, 1990.

EISMAN, J. A.; MACINTYRE, T. J.; FRAMPTON, R. J.; KING, R. J. Normal and malignant breast tissue is a target organ for 1,25-(OH)₂ vitamin D₃. *Clinical Endocrinology*. 13:267-272, 1980.

EISMAN, J. A.; BAKLA, D. H.; TUTTON, R. S. M. Suppression of "in vivo" growth of human cancer solid tumor xenografts by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.* 47: 21-25, 1987.

ELAROUSSI, M. A.; PRAHL, J. M.; DeLUCA, H. F. The avian vitamin D receptors: primary structures and their origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11596-11600, 1994.

ELSTNER, E. LINKER-ISRAELI, M.; SAID, J.; UMIEL, T.; de VOS, S.; KOEFFER, H. P. 20-epi-vitamin d3 analogues: a novel class of potent inhibitors of proliferation and inducers of proliferation and differentiation of human breast cancer cell lines. *Cancer res.* 55:2822-2830, 1995.

ERHARDT, J. A.; PITTMAN, R. N. p21^{waf1} induces permanent growth arrest and enhances differentiation, but does not alter apoptosis in PC12 cells. *Oncogene* 16:443-451, 1998.

ESCALEIRA, M. T. F.; SONOHARA, S.; BRENTANI, M. M. Sex steroids-induced up-regulation of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ receptor in T47D breast cancer cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 45:257-263, 1993.

ESCALEIRA, M. T. F.; NOGUEIRA, C. R.; BRENTANI, M. M. Effects of 17 β Estradiol and triiodothyronine (T₃) on breast cancer vitamin D receptors (VDR). In Norman, A.W.; Bouillon, R.; Thomasset, M. eds. New York. Vitamin D- a pluripotent steroid hormone: structural studies, molecular endocrinology and clinical applications, p. 522-523. 1994.

ESCALEIRA, M. T. F. Ação da vitamina D₃ na linhagem epitelial mamária HC11. Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências. 1997.

ESCALEIRA, M. T. F. and BRENTANI, M. M. Vitamin D receptor (VDR) expression in HC-11 mammary cells: regulation by growth-modulatory agents, differentiation and Ha-ras transformation. *Breast Cancer Research and Treatment* 54(2):123-134, 1999.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor super family. *Science* 240:889-895, 1988.

FALZON, M. DNA sequences in the rat parathyroid hormone-related peptide gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ mediated transcriptional repression. *Molecular Endocrinology* 10: 672-681, 1996.

FELDMAN, J.; FEDERICO, M. H. H.; SONOHARA, S.; KATAYAMA, M. L. H.; KOIKE, M. A. A.; ROELA, R. A.; SILVA, M. R. P.; BRENTANI, M. M. Vitamin D₃ binding activity during leukemic cell differentiation. *Leukemia Research* 17: 97-101, 1993.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137:266-267, 1983.

FOLGUEIRA, M. A. A.; FEDERICO, M. H. H.; KATAYAMA, M. L. H.; SILVA, M. R. P.; BRENTANI, M. M. Expression of vitamin D receptor (VDR) in HL-60 cells is differentially regulated during the process of differentiation induced by phorbol ester, retinoic acid or Interferon γ . *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol* 66(4): 193-201, 1998.

FRAMPTON, R. J.; OMOND, S. A.; EISMAN, J. A. Inhibition of human cancer cell growth by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ metabolites. *Cancer Res.* 43: 4443-4447, 1983.

FREAKE, H. C.; ABEYASEKERA, G.; IWASAKI, J.; MARCOCCI, C.; McINTYRE, I.; McCLELLAND, R. A.; EASTON, D. F.; COOMBES, R. C. Measurement of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in breast cancer and their relationship to biochemical and clinical indices. *Cancer Res.* 44:1677-1681, 1984.

FREEDMAN, L. P.; ARCE, V.; FERNANDEZ, R. P. Ligand modulates the conversion of DNA-bound vitamin D₃ receptor (VDR) homodimers into VDR-retinoid X receptor heterodimers. *Mol. Endocrinol.* 8:265-273, 1994.

GILL, R. K.; CHRISTAKOS, S. Identification of sequence elements in mouse calbindin-D28K gene that confer 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and butyrate-inducible responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2984-2988, 1993.

HALL, R. E.; LEE, C. S. L.; ALEXANDER, I. E.; SHINE, J.; CLARKE, C. L.; SUTHERLAND, R. L. Steroid hormone receptor gene expression in human breast cancer cells: inverse relationship between estrogen and glucocorticoid receptor messenger RNA levels. *Int J. Cancer* 46: 1081-1087, 1990.

HANNAH, S. S.; NORMAN, A. W. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D_3 regulated expression of the eukaryotic genome. *Nutr. Rev.* 52:11, 376-382, 1994..

HAPP, B.; HYNES, N. E.; GRONER, B. Ha-ras and v-raf oncogenes, but not int-2 and c-myc, interfere with lactogenic hormone-dependent activation of mammary gland specific transcription factor. *Cell Growth & Differentiation* 4: 9-15, 1993.

HAUBRUCK, H. e McCORMICK, F. Ras p21: effects and regulation. *Biochimica Biophysica Acta* 1072: 215-229, 1991.

HAUSSLER, M. R.; JURUTKA, P. W.; HSIEH, J-C; THOMPSON, P. D.; SELZNICK, S. H.; HAUSSLER, C. A.; WHITFIELD, G. K. New understading of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone*. 17: 33S-38S. 1995.

HAUSSLER, M. R.; HAUSSLER, C. A.; JURUTKA, P. W.; THOMPSON, P. D.; HSIEH J-C; REMUS, L. S.; SELZNICK, S. H.; WHITFIELD, G. K. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease state. *Journal of Endocrinology*. 154: S57-S73. 1997.

HEDLUNT, T. E.; MOFFATT, K. A.; MILLER, G. J. Stable expression of the nuclear vitamin D receptor in the human prostatic carcinoma cell line JCA-1; evidence that the antiproliferative effects of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 are mediate exclusively through the genomic signaling pathway. *Endocrinology* 137:1554-1561, 1996.

HEWISON, M.; DABROWSKI, FAULKNER, L.; HUGHSON, E; M.; VADHER, S.; HUT, A.; BRICKELL, P. M; O'RIORDAN, J. L. H.; KATZ, D. R. Transfection of vitamin D receptor cDNA into monoblastoid cell line U937. The role of vitamin D_3 in homotypic macrophage adhesion. *The Journal of Immunology*, 153:5709-19, 1994.

HEWISON, M.; DABROWSKI, M.; VADHER, S.; FAULKNER, L.; COCKERILL, F. J.; BRICKELL, P. M.; O'RIORDAN, J. L. H.; KATZ, D. R. Antisense inhibition of vitamin D receptor expression induces apoptosis in monoblastoid U937 cells. *The Journal of Immunology*, 156:4391-4400, 1996.

HOLICK, M. F.; SCHNOES, H. K.; DeLUCA, H. F.; SUDA, T.; COUSINS, R.J. Isolation and identification of $1,25$ -dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D active in intestine. *Biochemistry*, 10:2799-2804, 1991.

HOLICK, M. F. McCollum Award Lecture, Vitamin D – New horizons for the 21st century. *Am. J. Clin. Nutr.* 60: 619-630, 1994.

HOSOMI, J.; HOSOI, J.; ABE, E.; SUDA, T.; KUROKI, T. Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by 1α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinology* 3(6): 1950-1957, 1983.

HYNES, N. E.; TAVERNA, D.; HARWERTH, I. M.; CLARDIELLO, F.; SALOMON, D. S.; YAMAMOTO, T.; GRONER, B. Epidermal growth factor receptor, but not c-erb-2, activation prevents lactogenic hormone induction of β -casein gene in mouse mammary epithelial cells. *Molec. Cell Biol.* 10: 4027-4034, 1990.

HSIEH, J-C; JURUTKA, P. W.; GALLIGAN, M. A.; TERPENING, C. M.; HAUSSLER, C. A.; SAMUELS, D. S.; SHIMIZU, N.; HAUSSLER, M. R. Human vitamin D receptor is selectively phosphorylated by protein kinase C on serine 51, a residue crucial to its trans-activation function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9315-9319, 1991

JURUTKA, P. W.; HSIEH, J-C; MACDONALD P. N.; TERPENING, C. M.; HAUSSLER C. A.; HAUSSLER, M. R.; WITFIELD, G. K. Phosphorylation of Serine 208 in the Human Vitamin D Receptor: The predominant amino acid phosphorylated by casein kinase II, *in vitro*, and identification as a significant phosphorylation site in intact cells. *J. Biol. Chem.* Vol 268 (9): 6791-6799, 1993a

JURUTKA, P. W.; TERPENING, C. M.; HAUSSLER, M. R. The 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ receptor is phosphorylated in response to 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ and 22-oxacalcitriol in rat osteoblast, and by casein kinase II *in vitro*. *Biochemistry.* 32: 8184-8192, 1993b.

JURUTKA, P. W.; HSIEH, J-C; HAUSSLER, M. R. Phosphorylation of the human 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor by cAMP-dependent protein kinase, *in vitro*, and in transfected COS-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1089-1096, 1993c.

KAMEI, Y. KAWADA, T. FUKUWATARI, T. ONO, T. KATO, S. SUGIMOTO, E. Cloning and sequencing of the gene encoding the mouse vitamin D receptor. *Gene* 152:281-282. 1995.

KAMPFER, S.; HELLBERT, K.; VILLUNGER, A.; DOPPLER, W.; BAIER, G.; GRUNICKE, H. H.; UBERALL, F. Transcriptional activation of c-fos by oncogenic Ha-Ras in mouse mammary epithelial cells requires the combined activities of PKC- λ , ζ , ϵ . *The EMBO Journal* 14:4046-4055, 1998.

KHARE, S.; TIEN, X-Y.; WILSON, D.; WALI, R. K.; BISSONNETTE, B. M.; SCAGLIONE-SEWELL, B.; SITRIN, M. D.; BRASITUS, T. A. The role of protein kinase-C in the activation of particulate guanylate cyclase by 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ in CaCo-2 cells. *Endocrinology* 135:277-283, 1994.

KREMER, R.; SEBAG, M.; CHAMPIGNY, C.; MEEROVITCH, K.; HENDY, G. N.; WHITE, J.; GOLTZMAN, D. Identification and characterization of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ – responsive repressor sequences in the rat parathyroid hormone – related peptide gene. *Jour. Biol. Chem.* 271: 16310-16316, 1996.

KRISHNAN, A. V.; FELDMAN, D. Activation of protein kinase-C inhibits vitamin D receptor gene expression. *Mol. Endocrinol.* 5:605-612, 1991.

KRISHNAN, A. V.; FELDMAN, D. Stimulation of Activation of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ receptor gene expression in cultured cells by serum and growth factors. *J. Bone Miner Res.* 6:1099-107, 1991.

LAZZARO, L. & MEHTA, R. G. Role of a novel vitamin D₃ analog on the growth and differentiation of normal and neoplastic mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 41:265, 1996.

LI, J. J. e SODEK, J. Cloning and characterization of the rat bone sialoprotein gene promoter. *Biochemical Journal* 289: 625-629, 1993.

LI, Y. C.; BERGWITZ, C.; JUPPNER, H. DEMAY, M. B. Cloning and characterization of the vitamin D receptor from *Xenopus laevis*. *Endocrinology.* 138:2347-2353, 1997.

LIU, M.; LEE, M-H; COHEN, M.; BOMMAKANTI, M.; FREEDMAN, L. P. Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D₃ leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937. *Genes Dev.* 10:142-153, 1996.

LOWY, D. R.; WILLUMSEM, B. M. Function and regulation of Ras. *Ann. Rev. Biochem.* 62: 851-891, 1993.

LU, Z.; HANSON, K.; DeLUCA, H. F. Cloning and origin of the two forms of chicken vitamin D receptor. *Arch. Biochem Biophys.* 339:99-106, 1997.

LU, Y.; YAMAGISHI, N.; YAGI, T.; TAKEBE, H. Mutated p21^{waf1/cip1/sdi1} lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene* 16:705-712, 1998.

MacDONALD, P. N.; HAUSSLER, C. A.; TERPENING, C. M.; GALLIGAN, M. A.; REEDER, M. C.; WHITFIELD, G. K.; HAUSSLER, M. R. Baculovirus-mediated expression of the human vitamin D receptor: functional characterization, vitamin D response element interactions, and evidence for a receptor auxiliary factor. *Jour. Biol. Chem.* 266: 18808-18813, 1991.

MacDONALD, P. N.; DOWD, D. R.; NAKAJIMA, S.; GALLIGAN, M. A.; REEDER, M. C.; HAUSSLER, C. A.; OZATO, K.; HAUSSLER, M. R. Retinoid X receptors stimulate and 9-cis retinoic acid inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D₃ - activated expression of the rat osteocalcin gene. *Mol. Cell. Biol.* 13:5907-5917; 1993.

MCDONNELL, D. P.; MANGELSDORF, D. J.; PIKE, J. W.; HAUSSLER, M. R.; O'MALLEY, B. W. Molecular cloning of complementary DNA encoding the avian receptor for vitamin D. *Science.* 235:1214-1217. 1987.

MacLAUGHLIN, J. A.; ANDERSON R. R.; HOLICK, M. F. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D₃ and its photoisomers in human skin. *Science* 216: 1001-1003, 1982.

MANGELSDORF, D. J.; KOEFFLER, H. P.; DONALDSON, C. A.; PIKE, J. W.; HAUSSLER, M. R. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line HL-60: receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J. Cell. Biol.*, 98:391-398. 1984.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edição, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., 1989

MEZZETTI, G.; BARBIROLI, B.; OKA, T. 1,25-dihydroxycholecalciferol-dependent calcium uptake by mouse mammary gland in culture. *Endocrinology* 122: 2488-2493, 1987.

MIYAMOTO, K.; KESTERSON, R. A.; YAMAMOTO, H.; TAKETANI, Y.; NISHIWAKI, E.; TATSUMI, S.; MORITA, K.; TAKEDA, E., PIKE, J. W. Strutral Organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular Endocrilogy* 11:1165-1179, 1997.

NAKAJIMA, S.; HSIEH, J-C; MACDONALD, P. N.; GALLIGAN, M. A.; HAUSSLER C. A.; WHITFIELD, G. K.; HAUSSLER, M. R. The C-terminal region of the vitamin D receptors essential to form a complex with a receptor auxiliary factor requered for high affinity binding to the vitamin D responsive element. *Mol. Endocrinol.* 8: 159-172; 1994.

NARVAEZ, C.J.; VANWEELDEN, K.; BYRNE, I.; WELSH, J. Characterization of a vitamin D3-resistant MCF-7 cell line. *Endocrinlogy* 137: 400-409, 1996.

NEMERE, I.; DORMANEN, M. C.; HAMMOND, M. W.; OKAMURA, W. H.; NORMAN, A. W. Identification of a specific binding protein for the 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ in basal-lateral membranes of chick intestinal epithelium and relationship to transcaltachia. *J. Biol. Chem.* 269:23750-23756, 1994.

NEMERE, I.; FARACH-CARSON, M. C. Membrane receptors for steroid hormones: a case for especific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 248: 443-449, 1998.

NODA, M.; VOGEL, R. L.; CRAIG, A. M.; PRAHL, J.; DeLUCA, H. F.; DENHARDT, D. T. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (Spp-1 or osteopontin) gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 9995-9999, 1990.

NORMAN, A. W.; MYRTLE, J. F.; MIDGETT, R. J.; NOWICKI, H. G. 1,25-dihydroxycholecalciferol: Identification of the proposed active form of vitamin D₃ in the intestine. *Science* 173:51-54, 1971.

NORMAN, A. W.; ROTH, J.; ORCI, L. The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors and biological response (calcium binding protein). *Endocr. Rev.* 3:331-336, 1982.

OHYAMA, Y.; OZONO, K.; UCHIDA, M.; SHINKI, T.; KATO, S.; SUDA, T.; YAMAMOTO, O.; NOSHIRO, M.; KATO, Y. Identification of a vitamin D- responsive element in the 5'flanking region of the rat 25-hydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase gene. *Jour. Biol. Chem.* 269: 10545-10550, 1994.

OLSON, E. B. J.; KNUTSON, J. C.; BHATTACHARYYA, M. H.; DeLUCA, H. F. The effect of hepatectomy on the synthesis of 25-hydroxyvitamin D₃. *J. Clin. Invest.* 57: 1213-1220, 1976.

O'MALLEY, B. The steroid receptor superfamily: more excitement predicted for the future. *Mol Endocrinol.* 4:363-369, 1990.

OZONO, K.; LIAO, J.; KERNER, S. A.; PIKE, J. W. The vitamin D- responsive element in the human osteocalcin gene: association with a nuclear proto-oncogene enhancer. *Jour. Biol. Chem.* 265:21881-21888, 1990.

PAVLIN, D.; BEDALOV, A.; KRONENBERG, M. S.; KREAM, B. E.; ROWE, D. W.; SMITH, C. L.; PIKE, J. W.; LICHTLER, A. C. Analysis of regulatory regions in the COL1A1 gene responsible for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ mediated transcriptional repression in osteoblastic cells. *Jour.Cell. Biochemistry* 56: 490-501, 1994.

POLLS, H. A. P.; BEIKENHAGER, J. C.; FOEKENS, J. A.; VAN LEEUWEN, J. P. T. M. Vitamin D: a modular of cell proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37: 873-876, 1990.

PONCHON, G.; KENNAN, A. L.; DeLUCA, H. F. "Activation" of vitamin D by liver. *J. clin. Invest.* 48: 2032-2037, 1969.

RAY, R. Molecular recognition in Vitamin D-Binding protein. *P.S.E.B.M.* 212: 305-312. 1996.

RHODES, S. J.; CHEN, R.; DiMATTIA, G. E.; SCULLY, K. M.; KALLA, K. A.; LIN, S-C.; YU, V. C. ROSENFELD, M. G. A tissue-specific enhancer confers Pit-1-dependent morphogen inducibility and autoregulation on the *pit-1* gene. *Genes e Dev.* 7,913-932, 1993.

ROSEN, E. D.; BENINGHOF, E. G.; KOENIG, R. J. Dimerization interfaces of thyroid hormone, retinoid acid, vitamin D, and retinoid X receptor. *Jour. Biol. Chem.* 268: 11534-11541; 1993.

SATOH, T.; NAKAFURU, M.; KAZIRO, Y. Function of Ras as a molecular switch in signal transduction. *Jour. Biol. Chem.* 267: 24149-24152, 1992.

SEBAG, M.; HENDERSON, J.; RHIM, J.; KREMER, R. Relative resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in a keratinocyte model of tumor progression. *Jour. Biol. Chem.* 267: 12162-12167, 1992.

SLATER, S.J.; KELLY, M. B.; TADDEO, F. J.; LARKIN, J. D.; YEAGER, M. D.; McLANE, J. A.; HO, C.; STUBBS, C. D. Direct activation of protein kinase C by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Jour. Biol. Chem.* 270:6639-6643, 1995.

SOLOMON, C.; SEBAG, M.; WHITE, J. H.; RHIM, J.; KREMER, R. Disruption of vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimer formation following ras transforming of human keratinocytes. *Jour. Biol. Chem.*, 273:17573-17578, 1998.

SZPIRER, S.; SZPIRER, C.; RIVIERE, M.; LEVAN, G.; MARYEN, P.; CASSIMAN, J. J.; WIESE, R.; DeLUCA, H. F. The SP1 transcription factor gene (SP1) and the 1,25 dihydroxyvitamin D receptor gene (VDR) are colocalized on human chromosomal arm 12q and rat chromosome 7. *Genomics* 11:168-173, 1991.

TAKESHITA, A.; IMAI, K.; KATO, S.; KITANO, S.; HANAZAWA, S. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ synergism toward transforming growth factor- β -induced AP-1 transcriptional activity in mouse osteoblastic cells via its nuclear receptor. *Journ. Biol.Chem.*, 273:14738-14744, 1998

TAVERNA, D.; GORNER, B.; HYNES, N. Epidermal growth factor receptor, platelet-derived growth factor receptor, and c-erbB-2 receptor activation all promote growth but have distinctive effects upon mouse mammary epithelial cell differentiation. *Cell Growth & Diff.* 2: 145-154, 1991.

- TERPENING, C. M., HAUSSLER, C. A.; JURUTKA, P. W.; GALLIGAN, M. A.; KOMM, B. S.; HAUSSLER, M. R. Vitamin D-mediated modifications in protein-DNA interactions at two promoter elements of the osteocalcin gene. *Mol Endocrinol* 5:373-385, 1991.
- TOWER, T.L.; LUISI, B.F.; ASIANOV, A.; FEEDMAN, L. P. DNA target selectivity by vitamin D₃ receptor: mechanism of dimer binding to an asymmetric repeat element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6310-6314, 1993.
- UMESSOMO, K.; MURAKAMI, K.K.; THOMPSON, C.C. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors. *Cell* 65:1255-66, 1991.
- VANDEWALLE, B.; HORNEZ, L.; WATTEZ, N.; REVILLION, F.; LEFEBVRE, J. Vitamin D₃ derivatives and breast-tumor cell growth: effect on intracellular Calcium and apoptosis. *Int. J. Cancer* 61:601-811, 1995.
- VINDELOV, L. L.; CHRISTENSEN, I. J. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 11: 753-770, 1990.
- WU, J. D.; HSUEH, H-C.; HUANG, W. T.; LIU, H-S.; LEUNG, H. W. C.; HO, Y-R.; LIN, M-T.; LAI, M-D. The inducible lactose operator-repressor system is functional in the whole animal. *DNA and Cell Biology*, 16:17-22, 1997.
- WU, Y.; CRAIG, T. A.; LUTZ, W.H.; KUMAR, R. Identification of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ response elements in the human transforming growth factor β 2 gene. *Biochemistry* 38:2654-2660, 1999.
- ZHUANG, S-H; SCHWARTZ, G. G.; CAMERON, D.; BURNSTEIN, K. L. Vitamin D receptor content and transcriptional activity do not fully predict antiproliferative effects of vitamin D in human prostatic cancer cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 126:83-90, 1997.
- ZHUANG, S-H; and BURNSTEIN, K. L. Antiproliferative effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human prostate cancer line LNCaP involves reduction of cyclin-dependent kinase 2 activity and persistent G1 accumulation. *Endocrinology* 139:1197-1207, 1998.