

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Papel da p21^{cip1/waf1} no desenvolvimento da
neuroretina aviária

Curitiba
Dezembro/ 2005

Ester Mayumi Ninomiya

Papel da p21^{cip1/waf1} no desenvolvimento da
neuroretina aviária

Monografia apresentada à Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Celular, sob a orientação da Dra. Maria Marx e co-orientação do Prof. MSc. Marco Antônio Ferreira Randi como requisito parcial para obtenção do Título em Bacharelado em Ciências Biológicas.

Curitiba
Dezembro/ 2005

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pela sua ajuda e apoio durante todo este intercâmbio.

Agradeço também ao Prof. Siqueira, responsável pelo intercâmbio UFPR - França.

Agradeço em especial minha orientadora, Maria Marx, por ter me acolhido em seu laboratório por quase seis meses. Obrigada por seus conselhos e ajuda.

Agradeço também todo o pessoal do laboratório: Samira, Dany, Amélie, Céline, Maryvonne e Georges. Obrigada por sua paciência e simpatia.

ABREVIACOES

BCIP: Bromo Cloro Indol Fosfato

CDK: Quinases dependentes de ciclinas

CKI: Inibidores de quinases dependentes de ciclinas

DMEM: Dubelco Modified Eagle Medium

E: Dia de desenvolvimento embrionário

hp21: p21 humano

NR: Neuroretina

PBS: Phosphate Buffered Saline

PH3: fosfohistona 3

RCAS: Replication Competent, Avian leukemia vírus LTP, Splice acceptor retrovirus

RPE: Retinal pigmented epithelium

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	6
A neuroretina	6
A p21 ^{cip1/waf1}	11
OBJETIVOS	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
RESULTADOS	21
Padrão de expressão de p21 durante o desenvolvimento da neuroretina de galinha	21
Efeitos da superexpressão de p21 sobre o desenvolvimento da neuroretina embrionária de galinha.....	23
DISCUSSÕES E PERSPECTIVAS	28
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

RESUMO

Para o estudo do papel da p21, utilizou-se a neuroretina de aves como modelo experimental, que é um tecido cuja anatomia, fisiologia e desenvolvimento são bem conhecidos. Primeiramente foi analisado o padrão de expressão de p21 durante diferentes fases de desenvolvimento de embriões de galinhas, através de experimentos de hibridização *in situ* e Western Blot. Os resultados mostraram que a expressão de p21 se dá relativamente tarde durante o desenvolvimento do embrião e que, na neuroretina, parece ser específico a uma determinada população celular. Para determinar os possíveis papéis de p21 na neuroretina, a proteína foi superexpressa e as implicações desta superexpressão foram analisadas. Através de experimentos de imunohistoquímica, mostrou-se que a superexpressão de p21 não modifica o número de células em mitose. Porém, através de experimentos de hibridização *in situ*, foi mostrado que esta superexpressão de p21 aumenta a expressão de QR1, sugerindo que a proteína desempenha um papel na diferenciação de células de Muller.

INTRODUÇÃO

Este trabalho foi realizado dentro do quadro de intercâmbios entre a UFPR e diferentes universidades da França. Foram realizados cinco meses de estágio na área de Biologia Celular no Instituto Curie, localizado na cidade de Orsay. Este estágio foi realizado em um laboratório de estudos sobre a Oncogênese e Desenvolvimento, sob a orientação da Dra. Maria Marx.

O trabalho feito faz parte de um projeto maior que visa melhor compreender o papel da proteína p21 no desenvolvimento da neuroretina aviária. Vale a pena salientar que os resultados aqui apresentados são preliminares e experimentos adicionais restam ser realizados.

A neuroretina (NR) embrionária de aves é um sistema experimental comumente utilizado a fim de estudar os mecanismos que estão implicados na proliferação e diferenciação de células que compõem o sistema nervoso. Estes mecanismos fazem intervir proteínas implicadas na indução, progressão e parada do ciclo celular. Este trabalho está incluso no quadro de um estudo que visa evidenciar o papel da p21^{cip1/waf1}, uma proteína inibidora do ciclo, no desenvolvimento e diferenciação da neuroretina embrionária de galinhas.

A neuroretina

A retina é uma estrutura simples composta por dois folhetos: a neuroretina (NR) e o epitélio pigmentar. A NR é uma unidade funcional do sistema nervoso central, de origem neuroectodérmica, que transforma o sinal luminoso em influxo nervoso e o transmite ao

cérebro. A NR madura é composta de seis tipos de neurônios, as células ganglionares, as células horizontais, amacrinas, bipolares e os fotorreceptores, cones e bastonetes. Ela contém também uma espécie de célula glial, a célula de Müller.

De um modo geral, a formação da neuroretina madura passa por três fases: uma fase precoce de proliferação dos precursores multipotentes neuroectodérmicos. Estes progenitores estão localizados na zona ventricular da retina, em contato com o futuro epitélio pigmentar. A fase seguinte consiste em uma fase de migração de células em diferenciação; após uma mitose terminal, as células deixam a zona proliferativa para então migrarem à direção interna e aí definirem sua posição definitiva. A última fase é a fase da diferenciação terminal. Esta última etapa se dá uma vez que as células determinadas tenham migrado à sua camada apropriada (ADLER, 2000).

A migração e a diferenciação de cada tipo celular segue uma ordem específica: as primeiras células a se diferenciar são as células ganglionares, seguidas das amacrinas, das células horizontais e dos fotorreceptores. Enfim as últimas a se diferenciar são as células de Müller e as células bipolares (Figura 1) (PRADA *et al.*, 1991).

Na galinha essa etapa de migração e diferenciação começa entre o segundo e o quinto dia de desenvolvimento e se sobrepõe até a eclosão. Esta diferenciação inicia-se no nível central da vesícula óptica e continua progressivamente até a periferia (PRADA *et al.*, 1991).

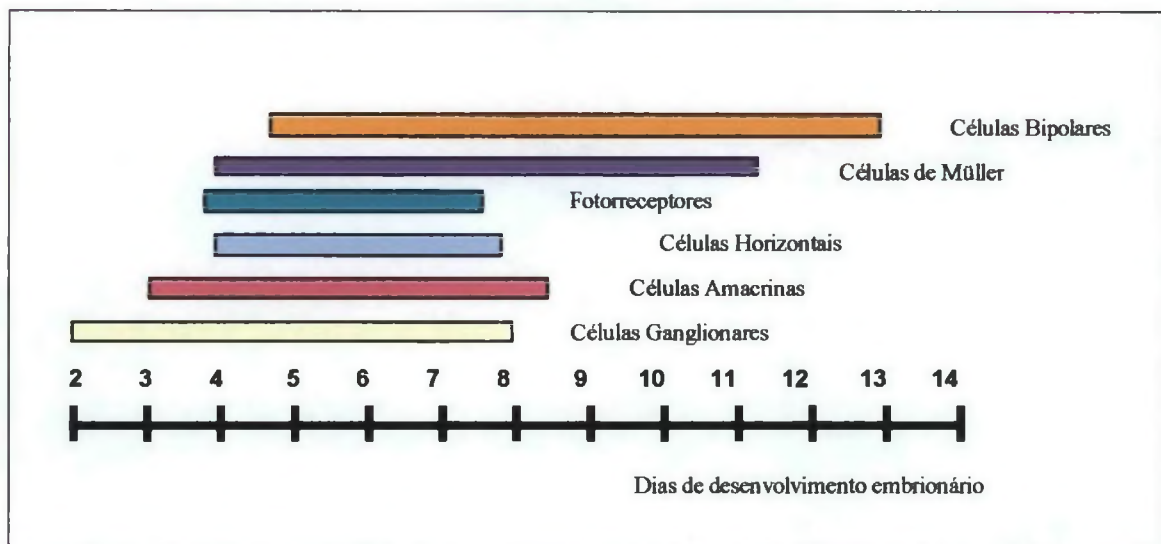


Figura 1: Cinética de diferenciação dos diferentes tipos celulares que compõem a neuroretina de galinha (Segundo PRADA *et al.*, 1991).

A NR madura de galinha é organizada em camadas nucleares externa e interna que contêm os corpos celulares e em camadas plexiformes externa e interna que contêm as conexões sinápticas. A camada nuclear externa é composta exclusivamente de fotorreceptores, a camada nuclear interna contém as células horizontais, bipolares, amacrinas e células de Müller, e a camada de células ganglionares é a mais interna e está em contato com o humor vítreo. Os axônios das células ganglionares convergem para formar o nervo óptico (Figura 2).

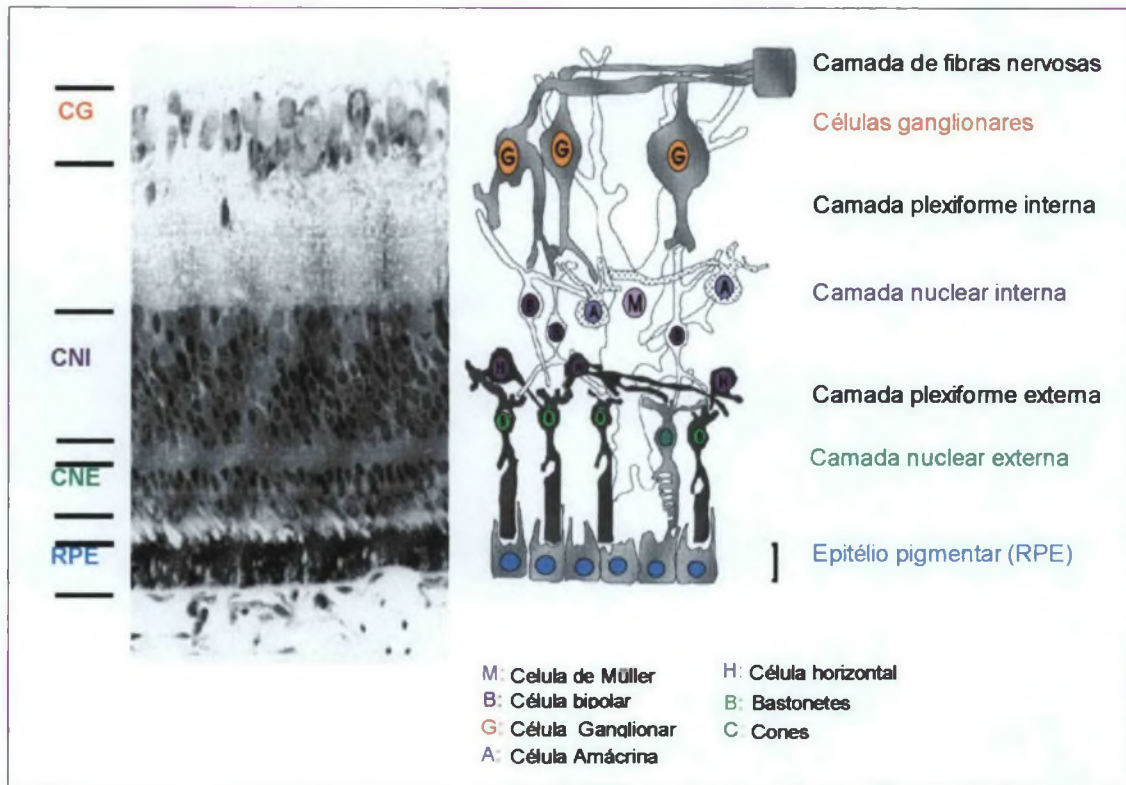


Figura 2: Estrutura da neuroretina madura de galinha. Corte da retina de um embrião de galinha de 14 dias, evidenciando as diferentes camadas celulares e representação esquemática dos diferentes tipos celulares que compõem a retina.

Cada tipo celular desempenha um papel específico na NR madura. O sinal luminoso atravessa todas as camadas da retina para ser absorvido pelos pigmentos contidos nos fotorreceptores, que convertem este sinal em influxo nervoso. O influxo é transmitido para os interneurônios bipolares e horizontais que o transmitem às células amácrinas. Enfim, o sinal converge em direção às células ganglionares em que os axônios formam o nervo óptico. As células de Müller atravessam todas as camadas da NR. Elas são responsáveis pela homeostase extracelular, protegendo assim os neurônios.

Desenvolvimento do olho

A neuroretina é um tecido estratificado de origem neuroectodérmica. Os olhos emergem a partir de uma evaginação do diencéfalo que faz com que o neuro epitélio e a ectoderme entrem em contato a fim de então induzir a formação da placa cristalina que mais tarde formará o cristalino. Esta evaginação recebe o nome de vesícula óptica. A invaginação desta vesícula origina a cúpula óptica cuja parte interna será a neuroretina e a parte externa, em contato com o mesênquima originará o epitélio pigmentar (Figura3) (MEY, 2000).

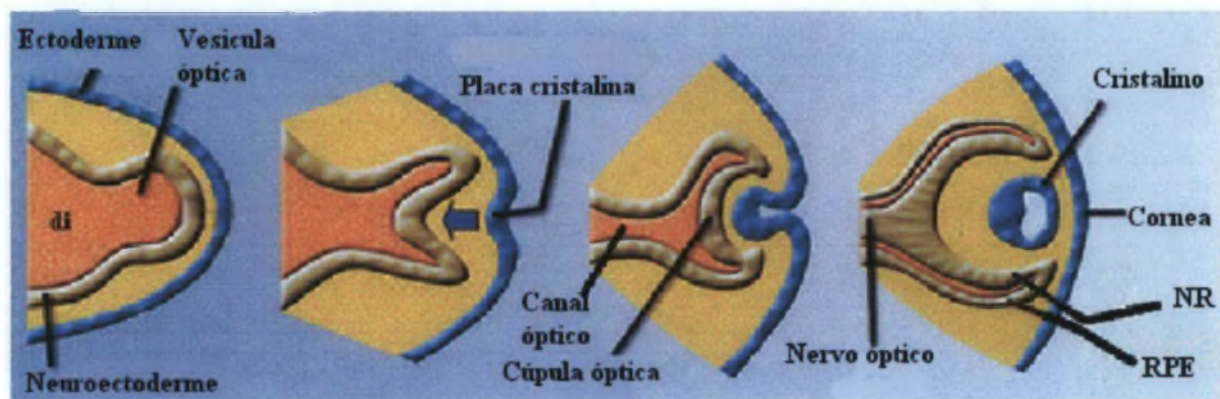


Figura 3: Desenvolvimento do olho de galinhas. As vesículas ópticas se evaginam a partir do diencéfalo (di), entrando em contato com a ectoderme e induzindo a placa cristalina. A vesícula óptica se invagina para dar origem à cúpula óptica, a qual mais tarde se diferencia em neuroretina (NR) e epitélio pigmentar (RPE). A placa cristalina dá origem ao cristalino.

Uma célula fará parte da neuroretina ou do epitélio pigmentar baseado em sua localização na cúpula óptica. Esta diferenciação da célula, em célula da neuroretina ou do epitélio pigmentar, depende ainda de sinais moleculares que são liberados pelo tecido ao redor. Já foi demonstrado que os fatores de crescimento Fgf são capazes de induzir a diferenciação de células da neuroretina, enquanto a diferenciação das células do epitélio

pigmentar está relacionada com a expressão do gene regulador *Mitf* (MEY, 2000). Todo o processo de desenvolvimento da neuroretina dura aproximadamente três semanas e está praticamente completo no momento do nascimento da ave.

A p21^{cip1/waf1}

O ciclo celular é regulado por um número muito importante de proteínas. Entre estas encontramos as diferentes ciclinas (Cyc) e as quinases dependentes de ciclinas (CDK), suas atividades são controladas pelos inibidores de CDK (CDKI).

Os CDKIs são divididos em duas grandes famílias: a família KIP/CIP composta pelas proteínas p21^{cip1/waf1} (p21), p27^{kip1/ick/pic2} (p27) et p57^{kip2} que inibem grande parte dos complexos ciclina/CDK e a família INK4 que é constituída pelas proteínas p16^{INK4a/MTS1/CDK4I} (p16), p15^{INK4b/MTS2}, p18^{INK4c/INK6A} e p19^{INK4d/MTS2} as quais inibem especificamente CDK4/6 (VIALARD *et al.*, 2001).

A p21 foi o primeiro inibidor de CDK identificado. Ela é uma proteína de 164 aminoácidos com duas regiões de ligação à ciclina (uma no lado N terminal, a outra no lado C terminal) e uma região de ligação ao CDK. O lado C terminal apresenta também um domínio de interação com o PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen, uma subunidade do DNA polimerase) e um sinal de localização nuclear NLS (Nuclear Localisation Signal), que permite sua migração ao núcleo (Figura 4) (DOTTO, 200).

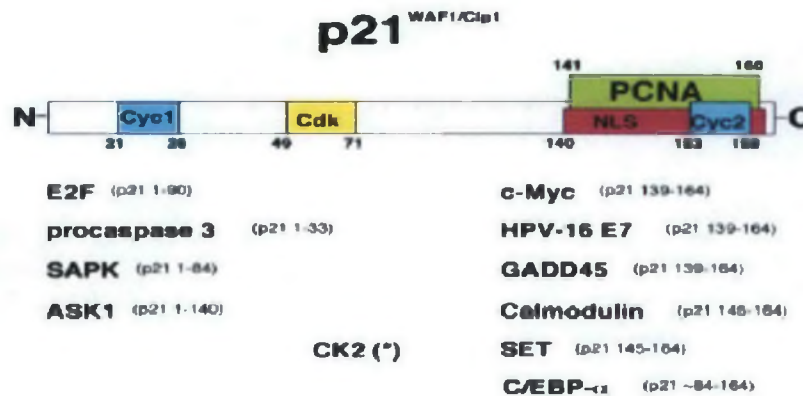


Figura 4: Estrutura e proteínas que se ligam à p21 (Segundo DOTTO, 2000).

Porém, a p21 também interage com outras proteínas que não estão ligadas ao ciclo celular, como a procaspase 3, Akt, ASK 1, JNK e Rho kinase (DOTTO, 2000). Isto sugere que a p21 desempenha diferentes funções e que estas funções dependem de sua localização subcelular.

Ao curso do ciclo celular p21 tem um papel duplo: ela pode interagir como um inibidor da atividade dos CDK, mas também como um modelador positivo da formação dos complexos ciclinas/CDK. Seu papel inibidor está baseado em sua capacidade de se ligar aos complexos ciclinas/CDK contendo o CDK2 e de bloquear sua atividade (HARPER *et al.*, 1993). Sua função de modulador positivo do ciclo está ligada ao fato que ela contribui à montagem de CDK4 e CDK6 com as ciclinas D. Isto estabiliza as ciclinas D, dirigindo o complexo ao núcleo e permitindo assim a progressão do ciclo celular (COQUERET, 2003). Portanto, p21 pode desempenhar papel tanto de regulador negativo e positivo do ciclo celular, em função das ciclinas à que está associada e da estequiometria das proteínas presentes na célula ao curso do ciclo celular (COQUERET, 2003).

A p21 possui também um papel inibidor da síntese de DNA ligando-se ao PCNA, uma subunidade do DNA polimerase, necessária à replicação do DNA. A ligação de p21 ao PCNA impede que este se ligue à fatores necessários à replicação do DNA (LUO *et al.*, 1995).

Ao contrário, a localização de p21 no citoplasma está principalmente ligada a inibição da apoptose e a diferenciação. A p21 é capaz de inibir a apoptose Fas-induzida, ligando-se à procaspase 3 e impedindo a clivagem protéica responsável de sua ativação (SUZUKI, 1999).

Ela intervém também na diferenciação de vários tipos celulares como os monócitos (ASADA *et al.*, 1999), os neurônios (TANAKA *et al.*, 2002) e os queratinócitos (RANGARAJAN *et al.*, 2001).

Regulação da expressão do gene de p21

A expressão de p21 é regulada por diversos fatores de transcrição. Esta expressão da proteína é notadamente induzida pela p53 em resposta à uma lesão ao DNA. Parte da p53 é capaz de reconhecer certos tipos de DNA mal pareado. Na presença de tais erros, a p53 é capaz de ativar a p21; os altos níveis de p21 inibem a atividade enzimática dos complexos ciclinas-CDKs, bloqueando a proliferação celular em G1 (GRIFFITHS, 2002). Porém, a regulação do gene pode ser independente de p53. A expressão pode ser regulada pelos fatores de transcrição da família STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) (GARTEL, 1999) e pela via de sinalização Notch (RANGARAJAN, 2001).

OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho é o estudo do papel da proteína p21 no desenvolvimento da NR aviária. Neste quadro, em um primeiro tempo, nós estudamos o padrão de expressão de p21 na NR em diferentes estágios de desenvolvimento. A análise dos resultados obtidos nos levou a questionar sobre o possível papel de p21 na diferenciação celular de uma população específica da NR.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo celular

Os fibroblastos de galinha (FEP) foram obtidos a partir de embriões desprovidos de vírus endógenos (linhagem “O-line”). As células foram mantidas em cultura em um meio DMEM (Gibco) com 8% de soro bovino, 2% de soro de galinha e adicionado antibióticos (penicilina 100u/mL, streptomina 100 mg/mL) e um antifúngico (fungizona 1 mg/mL), em uma atmosfera enriquecida em 5% de CO₂.

Produção e concentração do vírus

Os estoques de vírus RCAS que sintetizavam a p21 humana foram preparados como segue: as culturas de FEP foram transfectadas com o plasmídeo pRCAS/hp21 com a ajuda do reativo “Effectene” (Qiagen). Após três etapas de multiplicação de culturas, os vírus foram coletados a cada três horas de culturas confluentes mantidas em meio DMEM adicionado de 2% de soro bovino e concentrados por ultracentrifugação a 22.000 rpm em uma ultracentrifuga Beckman, rotor SW28. O precipitado contendo o vírus foi diluído em DMEM em concentrações de 600 a 1000 vezes superiores às concentrações iniciais. Os vírus foram conservados a -80°C.

Micro injeção

Foram utilizadas micropipetas em vidro estéril de diâmetro interno de 12 µm. Um orifício foi aberto na lateral dos ovos incubados horizontalmente. As vesículas ópticas de embriões de 10 a 12 horas foram injetadas com uma solução de vírus concentrado contendo

0,05% de “fast-green” (Sigma). O orifício foi fechado em seguida com fita adesiva transparente e os ovos foram colocados novamente na incubadora.

Fixação, inclusão e corte dos tecidos

Os embriões foram dissecados sob uma lupa, em PBS, e as cabeças foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 4% em PBS a 4°C durante uma noite. Após uma incubação em uma solução de “crioproteção” (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ 0,12 M, sucrose 15%, pH 7) a 4°C durante dois dias, elas foram incluídas em gelatina 7,5% em um tampão NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ 0,12 M, sucrose 15%, pH7. Os blocos foram congelados em isopentano à -65°C e conservados em -80°C. Cortes de 20 µm foram feitos à -25°C em um criostato (Leyca CM 3000) e dispostos sobre lâminas Superfrost Plus (Menzel Glaser). Os cortes foram conservados à -80°C.

Preparação da matriz

O plasmídeo contendo o inserto de interesse é linearizado com a ajuda de uma enzima de restrição, a 37°C durante duas horas. O plasmídeo linearizado é em seguida precipitado com 1/10 v/v COONa₂ 3M pH5 e 2,5 vol de etanol 100% a -80°C durante uma hora. O precipitado foi centrifugado durante 30 minutos a 15300 rpm, lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 15300 rpm durante 30 minutos. O etanol é descartado e o precipitado é suspenso em uma quantidade de água suficiente para obter uma concentração de 1 µg/µl. A linearização é testada em um gel de 1% de agarose.

Síntese de sondas RNA marcadas com digoxigenina

As sondas de RNA foram sintetizadas a partir de 1 µg de plasmídeo linearizado com a enzima de restrição adequada, em presença de 20 U de RNA polimerase de fagos T3 ou T7 (Roche), de “Dig labelling mix” contendo 1 mM de ATP, CTP, GTP, 0,65 mM de TTP, 0,35 mM de DIG-11-UTP (Roche) e 40 U de Rnasin (Promega). A solução foi incubada durante duas horas a 37°C. Após um tratamento com 2 U de Dnase RQ1 durante 15 minutos a 37°C, a reação é interrompida com 20 mM de EDTA. O RNA é precipitado e suspenso em 100 µL de água. A qualidade das sondas é testada por migração em gel de agarose 1% em tampão TBE.

Hibridização *in situ*

Cem µl de solução de hibridização (10 ng/mL de sonda RNA-Dig, 1X Sal (NaCl 200 mM, Tris HCl 45 mM, Tris Base 3 mM, NaH₂PO₄ 5mM, EDTA 5mM) 50% de formamido, 10% sulfato de dextran, 1 mg/mL de RNA de levedura, 1X solução Denhardt (0,2% BSA, 0,2% Ficoll, 0,2% PVP)) com a sonda diluída ao 1/100 é colocado sobre cada lâmina. Em seguida as lâminas são hibridizadas durante a noite a 65°C. Após a hibridização as lâminas são lavadas três vezes a 65°C em uma solução de lavagem (1X SSc pH 7, 50% formamido, 0,1% Tween 20). Em seguida duas outras lavagens de 30 minutos são realizadas em MABT (ácido maleico 100mM, NaCl 150 mM, Tween 0,1%, pH 7,5). Um bloqueio é feito em uma solução de MABT, 20% de soro de cabra durante pelo menos uma hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio as lâminas são incubadas durante a noite em uma solução de MABT, 2% soro de cabra, 0,01% de NaN₃ 5% e anticorpos anti DIG diluídos ao 1/4000. As lâminas são em seguida lavadas cinco vezes em MABT e duas vezes em NTMT (NaCl 100mM, MgCl₂ 50 mM, 0,1 Tris pH 9,5 1M, Tween 0,1%). A revelação para evidenciar o RNA de interesse é feita com uma solução NTMT contendo 4,5pg/mL de

NBT e 35 µg/mL de BCIP à 37°C durante tempos variáveis (até o momento em que as lâminas começam a mostrar uma coloração violeta). A revelação é interrompida em uma solução de PBS/Tween 0,1%, as lâminas são lavadas em água, desidratadas em banhos sucessivos de etanol de 70 a 100% e montadas em “Entelan” (Merck).

Imunohistoquímica

As lâminas são tratadas com uma solução de 90% metanol e 10% de DMSO durante vinte minutos, se há interesse em uma proteína nuclear. Após três lavagens em PBST (PBS Tween 0,2%) o bloqueio é realizado durante uma hora com PBST contendo 10% de soro de cabra (solução de bloqueio).

Esta solução é retirada e as lâminas são então incubadas durante a noite com anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio. A seguir uma solução de PBS/Tween 0,1% com 1% de soro de cabra, contendo os anticorpos secundários biotinizados, é sobreposta sobre as lâminas durante uma hora.

A fim de evidenciar o anticorpo secundário, o kit ABC (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) é utilizado. A solução preparada a partir deste kit contém a proteína avidina, a qual possui quatro regiões de ligação à biotina. As lâminas são incubadas durante 30 minutos com esta solução e em seguida lavadas com PBS/Tween.

Para revelar a localização da avidina, e assim a proteína de interesse, uma solução de DAB (3-3' diaminobenzidina (DAB) tetrahydrochloride tablets, Sigma) é preparada. Esta solução é aplicada sobre as lâminas durante dois minutos. A reação de DAB com a avidina resulta em um precipitado de coloração marrom. O anticorpo primário utilizado foi a anti fosfohistona 3, produzida no coelho e diluída ao 1/400 na solução de bloqueio. O

anticorpo secundário utilizado foi o anticoelho biotilado diluído ao 1/250 em PBST com soro de cabra 1%.

Preparação de extratos celulares e quantificação de proteínas

Os extratos celulares são obtidos a partir de culturas subconfluentes. Após uma lavagem com PBS, as células são coletadas, raspando-as sobre gelo em 1mL (para placas petri de 10 cm) ou 300 µL (para placas petri de 6 cm) de tampão de lise RIPAE (PBS 1X, 1% TritonX-100, 1% SDS, 5mM EDTA, 1% aprotinin, 10 µg/mL desoxicolate de sódio) ao qual é adicionado os inibidores de proteases e fosfatases (0,5 mM DTT, 1 mM AEBSF, 10µg/mL leupetin, 1 mM Na₃VO₄). Após uma incubação de 10 minutos em gelo, o lisado é centrifugado durante 30 minutos a 15000 rpm. O sobrenadante corresponde ao extrato protéico, ele é conservado à -80°C.

A estimativa da quantidade de proteínas se efetua por dosagem colorimétrica com o reativo Bradford (Biorad) em comparação a uma gama padrão de BSA. A absorbância das amostras é medida a 595 nm.

Eletroforese sobre gel de poliacrilamida-SDS/ Transferência/ Western Blot

As amostras são depositadas sobre gel de poliacrilamida pH 8,8 (8%, 10% ou 12% de acordo com o tamanho da proteína estudada). Sobre o gel de separação um gel de concentração de 5% de acrilamida pH 6,8 é montado (gel stacking). A migração é realizada em um tampão BAC (25 mM Tris Base, 192 mM de glicina, 3,5 mM SDS). As proteínas são transferidas sobre uma membrana de celulose por eletro transferência em um tampão de transferência (20 mM Tris Base, 150 mM glicina, 20% metanol). A membrana é saturada , à temperatura ambiente durante uma hora, sob agitação, em uma solução de TBS 1X (20

mM Tris – HCl pH 7,6, 0,9% NaCl)/Tween 20 0,2% contendo 5% de leite em pó (solução de bloqueio). Ela é a seguir incubada com o anticorpo primário, diluída na solução de bloqueio (anti p21 galinha diluído ao 1/2000, anti p21 humano diluído ao 1/2500), à 4°C sob agitação durante uma noite. A membrana é em seguida lavada em TBS 1X/ Tween 20 0,2% e incubada durante uma hora com o anticorpo secundário dirigido contra as imunoglobulinas de coelho ou camundongo ligada à peroxidase diluída na solução de bloqueio (anti coelho diluído ao 1/2000, anti camundongo diluído ao 1/1000). Após quatro lavagens, a membrana é revelada através uma reação de quimio luminescência e é exposta contra um filme durante diferentes tempos.

RESULTADOS

Padrão de expressão de p21 durante o desenvolvimento da neuroretina de galinha

Em um primeiro tempo, foi estudado o padrão de expressão de p21 em diferentes estágios do desenvolvimento. Para isso primeiramente analisamos a expressão do RNA mensageiro de p21 através de experimentos de hibridização *in situ* realizados sobre cortes histológicos de cabeça de embriões de galinha sacrificados no sétimo dia embrionário (E7), nono (E9) e décimo segundo dia (E12). Foi possível observar que os transcritos de p21 não são detectados no sétimo dia de desenvolvimento (resultados não apresentados). Ao nono dia, o RNAm de p21 é fortemente expresso em uma população celular situada na parte central da camada nuclear interna (Figura 5, A e B). Ao décimo segundo dia, p21 é ainda expressa na camada nuclear interna, mas a quantidade de transcritos parece ser mais significativa (Figura 5, C e D). Este resultado indica que p21 é expressa ao curso dos estágios tardios do desenvolvimento da NR. Ele indica também que sua expressão é restrita a uma população celular específica.

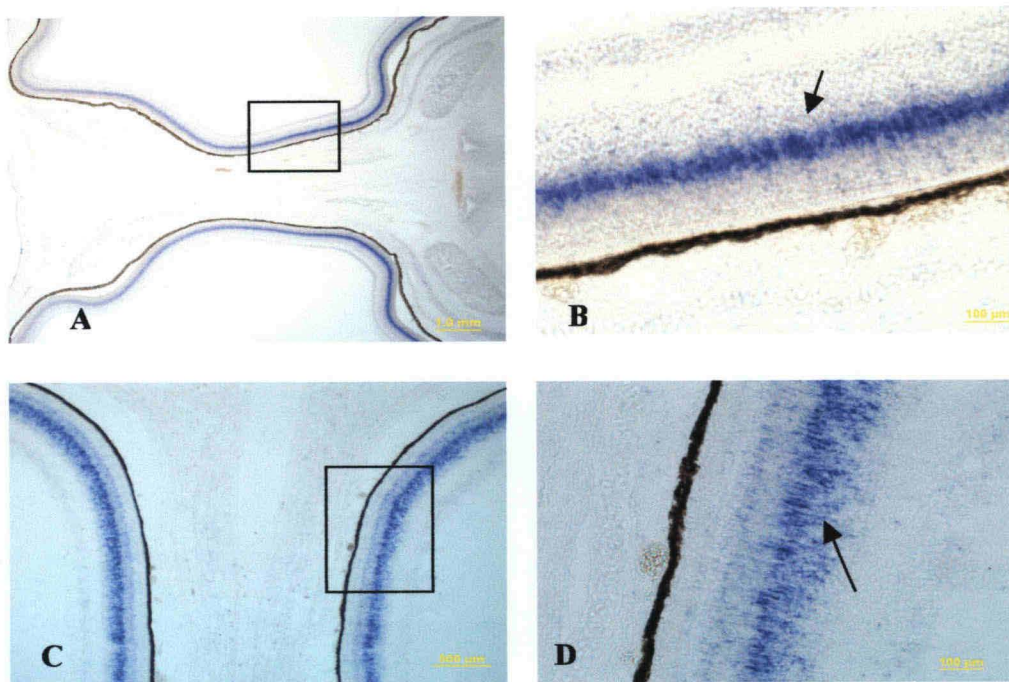


Figura 5: Padrão de expressão do RNA m de p21 no nono (A,B) e décimo segundo dia de desenvolvimento (C,D). As fotos foram tiradas em aumentos de x4 (A e C) e de x20 (B e D). Os retângulos em A e C indicam as regiões em aumento em B e D respectivamente. As flechas indicam regiões que expressam o RNAm de p21.

Para confirmar o padrão de expressão de p21 ao nível da proteína, a proteína p21 foi procurada em diferentes estados de desenvolvimento da NR. Para tal, realizamos um Western Blot sobre lises protéicas preparadas a partir da NR dissecada no sexto (E6), oitavo (E8), décimo primeiro (E11) e décimo terceiro (E13) dia de desenvolvimento (Figura 6). Observamos que no sexto dia de desenvolvimento há baixa quantidade da proteína. Ao contrário, a partir do oitavo dia a quantidade de p21 aumenta fortemente. Esta quantidade permanece estável em todos os estágios analisados. Este resultado confirma o resultado obtido através da hibridização *in situ*, ou seja, que p21 é preferencialmente expresso ao curso dos estágios tardios do desenvolvimento.

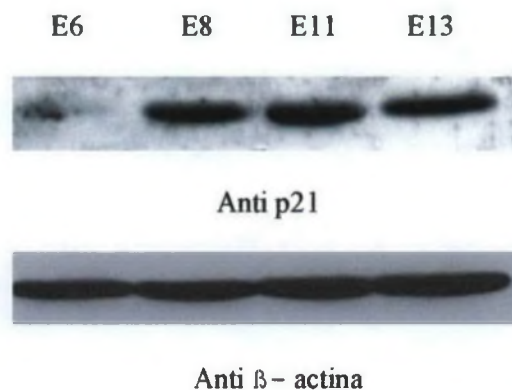


Figura 6: p21 é expresso ao curso dos estágios tardios do desenvolvimento da neuroretina. Análise por Western Blot da p21 endógena. Foram testados 300 µg de proteínas obtidas da dissecação da NR de embriões de seis (E6), oito (E8), onze (E11) e treze (E13) dias de desenvolvimento. A quantidade de proteínas testada foi normalizada verificando-se a quantidade de β-actina.

Efeitos da superexpressão de p21 sobre o desenvolvimento da neuroretina embrionária de galinha

Para estudar o possível papel de p21 no desenvolvimento da NR aviária, foram realizadas experiências de superexpressão na vesícula óptica de embriões de galinha. A ferramenta utilizada para esses experimentos é o retrovírus RCAS que sintetiza a p21 humana (RCAS/hp21).

Primeiramente foi verificado se o vírus realmente é capaz de expressar essa proteína. Como mencionado anteriormente em “Materiais e Métodos”, o vírus foi produzido por transfecção, sobre fibroblastos embrionários de galinha. A seguir novas culturas de fibroblastos foram infectadas com o vírus produzido pelos fibroblastos transfectados; uma lise protéica foi obtida a partir dessas culturas e a presença de p21 humana foi verificada através de Western Blot, utilizando-se um anticorpo específico para a p21 humana. Foi observado que p21 está presente tanto em lises de células transfectadas como infectadas pelo vírus produzido (Figura 7).

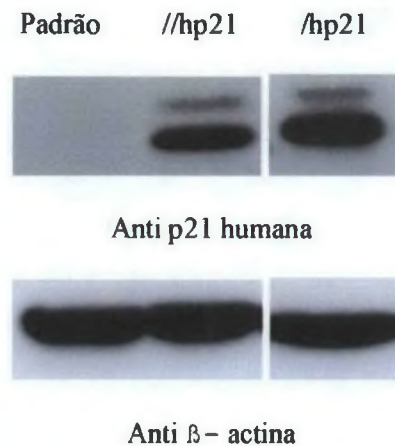


Figura 7: O vírus RCAS/hp21 sintetiza a p21 humana. Foram testados 150 μ g de proteínas obtidas a partir de lise celular de células não transfectadas (padrão), de células transfectadas por RCAS (//hp21) e de células infectadas pelo RCAS produzido (/hp21) para a presença de p21 humano com a ajuda de um anticorpo específico. As quantidades de proteínas foram normalizadas verificando-se a quantidade de β -actina.

Em seguida o retrovirus concentrado foi injetado na vesícula óptica de embriões de galinha de um dia e meio de desenvolvimento. O órgão de interesse foi coletado de embriões sobreviventes no sexto e oitavo dia de desenvolvimento. A observação dos olhos sob uma lupa binocular não mostrou fenótipos particulares em comparação com os olhos de embriões normais. Assim as cabeças foram processadas e analisadas através de coloração histológica e hibridização *in situ*.

Primeiramente o RNA de p21 expresso pelo vírus RCAS foi evidenciado por hibridização *in situ*. Foi observado que na NR de seis dias (Figura 8 A) e oito dias (Figura 8 B) o transgene (hp21) é bem expresso, a coloração azul indicando as regiões de expressão do RNAm de interesse. Foi também observado que a NR é infectada de maneira irregular. Porém nas regiões infectadas não foi possível detectar modificação morfológica.

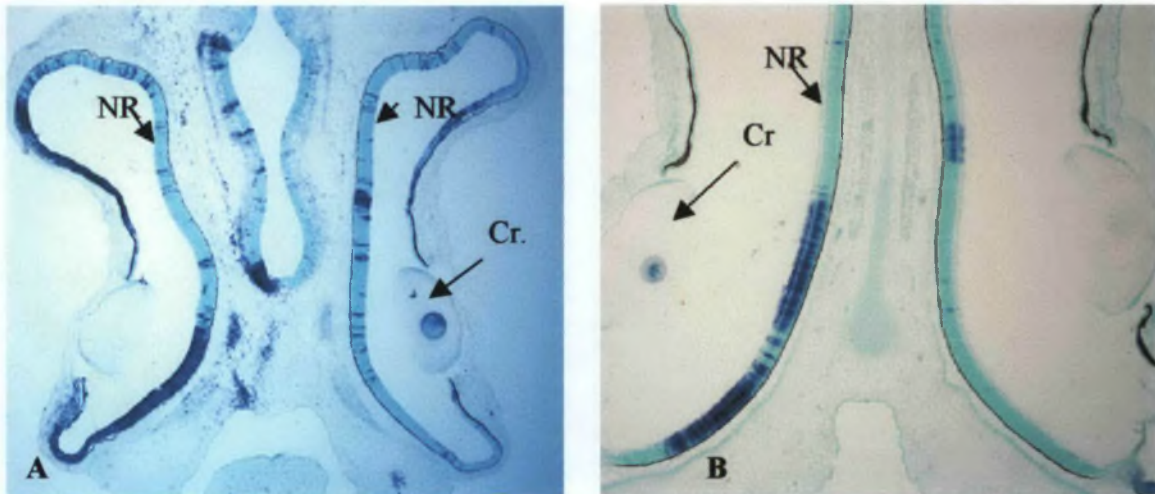


Figura 8: Regiões da NR infectadas pelo RCAS/hp21. A hibridização *in situ* foi realizada sobre cortes de cabeças de embriões de seis (A) e oito dias de desenvolvimento (B). A neuroretina (NR) e o cristalino (Cr) estão indicados. As fotos foram tiradas em aumento de x4.

Como explicado anteriormente, uma função importante da p21 é bloquear o ciclo celular. Portanto foi verificado se a superexpressão de p21 modificaria o número de células em proliferação na NR. Para tal, experimentos de imunohistoquímica foram realizados sobre cortes de NR normais e infectadas pelo vírus RCAS/hp21, obtidas no sexto dia de desenvolvimento embrionário. Neste estágio um número significativo de células ainda está se proliferando. Foram analisadas células positivas para a fosfohistona 3 (PH3), um marcador de células em mitose. Foi observado que na NR normal a maioria das células positivas para a PH3 estão localizadas na região mais externa da NR, esta que está em contato com o epitélio pigmentar (Figura 9 A). Foi também observado que nas NRs infectadas o número de células positivas para a PH3 não é modificado em comparação com as NRs normais, nas regiões positivas para a expressão do transgene (Figura 9 C). Este experimento de imunohistoquímica foi realizado sobre duas séries de lâminas controle e

duas séries de lâminas com cortes com uma superexpressão de p21. Este resultado sugere que a superexpressão de p21 não ocasiona uma saída prematura do ciclo, de células da NR.

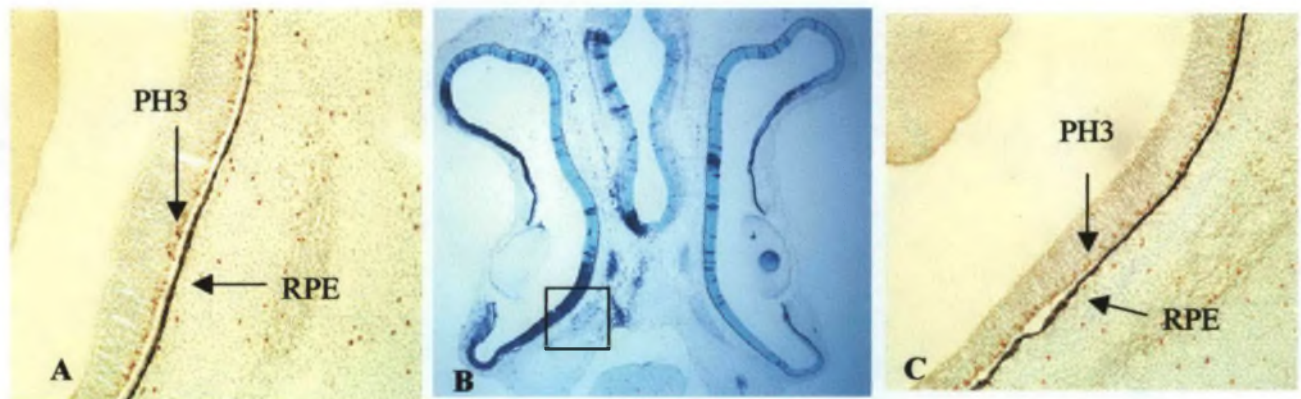


Figura 9: Células em mitose na retina de embriões de seis dias de desenvolvimento. (A) Expressão de PH3 na retina normal. (B) Retina infectada pelo RCAS/hp21. O transgene, em azul, é evidenciado por hibridização *in situ*. (C) Expressão de PH3 na retina infectada, presente em B. O retângulo em B mostra a região aumentada em C. O aumento das fotos é de x10 para A e C e de x4 para a foto B.

A análise do padrão de expressão de p21 mostrou a presença de transcritos em uma população celular situada na parte central da camada nuclear interna. Esta posição é similar a de células de Müller. Nos questionamos se a superexpressão de p21 não interferiria na diferenciação destas células. Para responder esta pergunta foi analisada a expressão do gene QR1. QR1 é um gene que se expressa de maneira específica em células de Müller pós mitóticas em curso de diferenciação (GUERMAH *et al.*, 1991; CASADO *et al.*, 1996). No oitavo dia de desenvolvimento, QR1 é expresso unicamente na parte dorsal e central da NR (Figura 10 A). A hibridização *in situ* apresentada na figura 10 mostra um forte aumento da expressão de QR1 nas regiões da NR infectadas por RCAS/hp21 (Figura 10 B), situadas na parte dorsal e central (Figura 10 C). Não foi observado um aumento nas regiões infectadas onde QR1 não é ainda expresso. Este experimento foi realizado sobre quatro séries de lâminas, de cortes seriados de quatro cabeças de embriões.

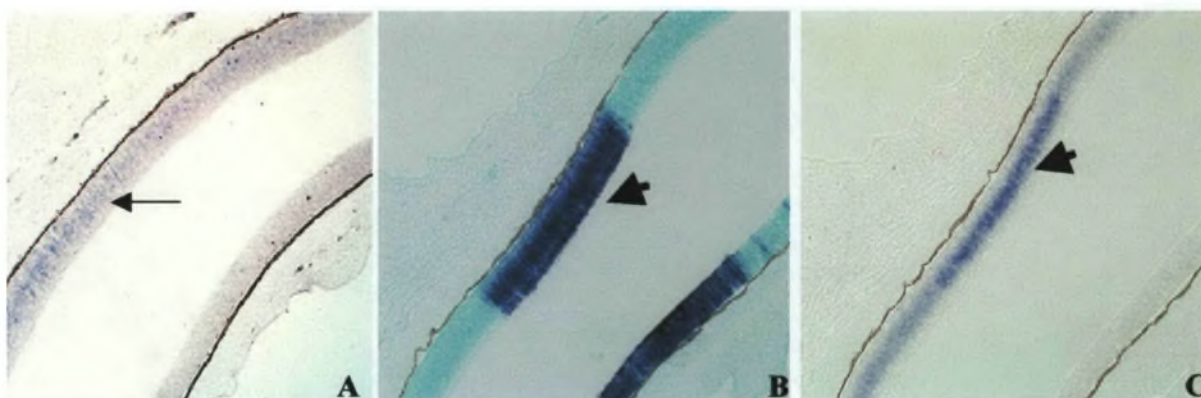


Figura 10: A superexpressão de p21 na NR de galinha ativa a expressão de QR1. (A) Expressão de QR1 em uma retina normal. (B) Superexpressão de p21 na NR de embriões de oito dias. (C) Expressão de QR1 na NR infectada, apresentada em B. A flecha indica as células que exprimem QR1 na retina normal. As flechas em negrito indicam as regiões de superexpressão. O aumento das fotos é de x20.

Estes resultados preliminares sugerem que p21 é um regulador positivo da expressão de QR1. Eles sugerem também que a superexpressão de p21 acelera a diferenciação das células de Müller. Portanto, a p21 expressa no curso do desenvolvimento da NR estaria implicada na diferenciação de células de Müller.

DISCUSSÕES E PERSPECTIVAS

No decorrer deste trabalho, foi estudado o papel da proteína p21 no curso do desenvolvimento da NR. Em um primeiro tempo foi mostrado que p21 é expressa nos estágios de desenvolvimento que coincidem com a saída definitiva do ciclo celular de todas as células que compõem a NR. Esta expressão é limitada a uma população celular particular, localizada na camada nuclear interna. A localização destas células sugeria que se tratava das células de Müller. Neste caso, p21 poderia estar implicada na diferenciação deste tipo celular particular.

Para verificar esta hipótese foram realizados experimentos de superexpressão de p21 na NR de embriões de galinha e analisado o provável papel desta proteína na eventual saída do ciclo das células que compõem a NR e no efeito potencial sobre a diferenciação das células de Müller. Foi mostrado que o número de células em mitose não é modificado pela superexpressão de p21, permitindo mostrar que neste tecido, p21 não participa na regulação do ciclo. Este resultado é um tanto contraditório. Trabalho semelhante realizado por OHNUMA *et al.*, com a proteína p27; uma proteína da mesma família de p21; na retina de *Xenopus*, mostra que a superexpressão de p27 resulta em uma parada prematura do ciclo celular das células que compõem a retina.

Foi decidido então analisar o fato de que p21 estaria provavelmente implicada na diferenciação das células de Müller. De fato, o aumento da expressão do gene QR1 nas regiões de superexpressão de p21 reforça esta hipótese. Já foi mostrado que QR1 é normalmente expresso nas células de Müller pós-mitóticas em diferenciação. Esta hipótese é suportada por trabalhos anteriores que mostram que proteínas inibidoras do ciclo celular

estão implicadas na diferenciação de diferentes células da neuroretina. Assim, foi mostrado que a superexpressão de p27 induz a diferenciação de células de Müller na NR de *Xenopus* (OHNUMA *et al.*, 1999). Também a p57, uma outra proteína inibidora do ciclo, parece ter um papel na diferenciação das células amacrinadas da NR de camundongos (DYER and CEPKO, 2000).

Porém o aumento da expressão de QR1 não significa que p21 induz uma diferenciação precoce das células de Müller. É possível que a superexpressão de p21 estimule a transcrição de QR1 sem influenciar sobre o programa de diferenciação das células de Müller. A análise da expressão de outros marcadores das células de Müller como a vimentina ou a GFAP seria necessária para verificar se p21 intervém na diferenciação de células gliais.

Ainda não podemos excluir que este efeito não seja consequência direta da superexpressão de p21. Poderia ser que p21 ative a expressão de fatores secretados ou de fatores de transcrição, que por sua vez estimulariam a expressão de QR1. Esta hipótese explicaria o fato observado da expressão de QR1 não se restringir apenas às áreas de superexpressão de p21. Para verificar esta hipótese, é necessária a análise da expressão de fatores de crescimento como Fgf8 e Shh (Sonic Hedgehog) e do fator de transcrição Pax 6 que são expressos neste estágio na NR (MEY, 2000).

Como explicado anteriormente, os resultados obtidos com este trabalho são preliminares. Restam diversos experimentos a serem realizados neste projeto. Uma perspectiva interessante seria o estudo da p21 na diferenciação das células de Müller utilizando-se não apenas experimentos *in ovo*, mas também experimentos utilizando-se o cultivo celular. Outra perspectiva seria estudar o papel da p21 no citoplasma utilizando-se uma forma mutante da proteína que é incapaz de migrar ao núcleo.

CONCLUSÃO

A proteína p21 é uma molécula de estrutura relativamente simples, porém o estudo de suas funções tem se mostrado bastante complexo, tendo em vista as diversas interações e vias regulatórias a serem consideradas. Existe uma ampla bibliografia com relação à p21 e seu papel no desenvolvimento de cânceres, porém a bibliografia de p21 com relação ao processo de diferenciação celular é mais limitado.

Este trabalho foi realizado visando a melhor compreensão do papel da proteína no desenvolvimento e diferenciação de um tecido do embrião aviário. Embora ainda reste muito a ser feito com relação a este projeto, os resultados obtidos até agora são bastante encorajadores.

Com este trabalho concluímos que a proteína p21 é expressa relativamente tarde no decorrer do desenvolvimento da neuroretina embrionária de galinha e que esta expressão parece ser específica às células de Müller. Concluímos também que a superexpressão de p21 não parece ter um efeito sobre o número de células em mitose da neuroretina, mas que porém, esta superexpressão da proteína aumenta a expressão de QR1, sugerindo que p21 desempenha um papel na diferenciação de células de Müller.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, R. A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. *Progress in Retinal and Eye Research* 19, 2000, p. 529-557.
- ASADA, M.; YAMADA, T.; ICHJO, H.; DELIA, D.; MIYAZONO, K.; FUKUMURO, K. e MIZUTANI, S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J* 18, 1999, p. 1223-1234.
- CASADO, F.J.; POUPONNOT, C.; JEANNY, J.C.; LECOQ, O.; CALOTHY, G. e PIERANI, A. QR1, a retina-specific gene, encodes an extracellular matrix protein exclusively expressed during neural retina differentiation. *Mech Dev* 54, 1996, p.237-250.
- COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in Cell Biology* 13, 2003, p. 65-70.
- DOTTO, G.P. p21 (WAF1/Cip1): more than a break to cell cycle? *Biochemistry and Biophysics Acta* 1417, 2000, p.43-56.
- DYER, M.A e CEPKO, C.L. p57 (Kip2) regulates progenitor cell proliferation and amacrine interneuron development in the mouse retina. *Development* 127, 2000, p. 3593-3605.
- GARTEL, A.L. e TYNER, A.L. Transcriptional regulation of the p21 (WAF1/CIP1) gene. *Exp Cell Res* 246, 1999, p.280-289.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.F.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C. e GELBART, W.M. **Introdução à genética.** 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2002.
- GUERMAH, M.; CRISANTI, P.; LAUGIER, D.; DEZELEE, P.; BIDOU, L.; PESSAC, B. e CALOTHY, G. Transcription of a quail gene expressed in embryonic retinal cells is shut off sharply at hatching. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1991, p. 4503-4507.
- HARPER, J.; ADAMI, G.; WEI, N.; KEYOMARSI, K. e ELLEDGE, S. The p21 Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 1993, p. 805-816.
- LUO, Y.; HURWITZ, J. e MASSAGUE, J. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21 Cip1. *Nature* 375, 1995, p. 159-161.
- MEY, J. e THANOS, S. Development of the visual system of the chick I- Cell differentiation and histogenesis. *Brain Research reviews* 32, 2000, p. 343-379.
- OHNUMA, S.; PHILPOTT, A.; WANG, K.; HOLT, C.E. e HARRIS, W.A. p27Xicl, a Cdk inhibitor promotes the determination of glial cells in Xenopus retina. *Cell* 99, 1999, p.499-510.

- PRADA, C.; PUGA, J.; PEREZ-MENDEZ, L.; LOPEZ, R. e RAMIREZ, G. Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur J Neurosci* 3, 1991, p.559-569.
- RANGARAJAN, A.; TALORA, C.; OKUYAMA, R.; NICOLAS, M.; MAMMUCARI, C.; OH, H.; ASTER, J. C.; KRISHNA, S; METZGER, D.; CHAMBON, P.; et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* 20, 2001, p. 3427-3436.
- SUZUKI, A.; TSUTOMI, Y.; YAMAMOTO, N.; SHIBUTANI, T. e AKAHANE, K. Mitochondrial regulation of cell death: mitochondria are essential for procaspase 3 – p21 complex formation to resist Fas-mediated cell death. *Mol Cell Biol* 19, 1999, p. 3842-3847.
- TANAKA, H.; YAMASHITA, T.; ASADA, M.; MIZUTANI, S.; YOSHIKAWA, H. e TOHYAMA, M. Cytoplasmic p21 (Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J Cell Biol* 158, 2002, p. 321-329.
- VIALARD, J. F.; LACOMBE, F.; BELLOC, F.; PELLEGRIN, J. L. e REIFFERS, J. Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology. *Cancer Radiother* 5, 2001, p. 109-129.