

A expressão imunohistoquímica de JAK2 e STAT5 ocorre no estágio de alveolarização sacular e em massa, mas é suprimida em alvéolos bem formados

Immunohistochemical expression of JAK2 and STAT5 occur in saccular and bulk alveolarization stage but they are suppressed in well formed alveoli

Mariana Verona Camargo¹, Fernando Issamu Tabushi¹, Vanessa Valois de Souza¹, Jurandir Marcondes Ribas-Filho¹, Ronaldo Mafia Cuenca², Marcelo Budke Neukamp³, Allan Fernando Giovanini¹

RESUMO

Introdução: Janus quinase-2 (JAK2) é uma quinase acoplada a receptor hormonal que medeia a ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição-5 (STAT5) em células responsivas a hormônios, dentre elas o eixo hormônio do crescimento (GH)-fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1).

Objetivo: Como o IGF-1 é considerado uma citocina crucial associada ao desenvolvimento pulmonar pós-natal, e esse fator de crescimento pode ser induzido por JAK2/STAT5, a provável co-expressão imuno-histoquímica entre IGF-1, JAK2 e STAT5 durante a alveolarização pulmonar em modelos animais foi investigada.

Método: Necropsias pulmonares de ratas Wistar que foram eutanasiadas aos 2, 7, 12, 15 e 22 dias pós-natais foram coletadas e submetidas à análise histológica e observação imuno-histoquímica para anticorpos anti-IGF-1, JAK2 e STAT5. No segundo dia, observou-se que os aspectos histológicos dos pulmões demonstraram um padrão sacular. Durante este período, também foram observadas intensa imunopositividade para IGF-1, bem como positividade para JAK2 e STAT5 na face luminal das células na área sacular. Nos dias 7 e 12, as características histológicas pulmonares demonstraram um aspecto de alveolarização em massa.

Resultado: Durante esses períodos, os aspectos imuno-histoquímicos foram semelhantes aos do segundo dia; no entanto, quando os aspectos histológicos dos alvéolos possuíam características usuais e maduras, a positividade para IGF-1 permaneceu moderada a intensa, enquanto JAK2 e STAT5 diminuíram significativamente.

Conclusão: Os resultados sugerem que JAK2 e STAT5 são proteínas que podem atuar na alveologênese induzindo IGF-1, mas são suprimidas em alvéolos maduros.

PALAVRAS-CHAVE: Alveologênese. JAK2. STAT5. IGF-1. Desenvolvimento pulmonar.

Mensagem central

A alveolarização pós-natal requer alterações morfológicas e estruturais nas áreas pulmonares, cujos resultados finais são número crescente de alvéolos de menor tamanho, aumentando a área de superfície sobre a qual as trocas gasosas podem ocorrer. Essas mudanças ocorrem gradualmente, onde se formam vários sulcos baixos e salientes derivados do padrão sacular, indicando os contornos e estruturas dos futuros alvéolos no parênquima pulmonar, o que é denominado fase de «alveolarização em massa». Esses resultados sugerem que JAK2 e STAT5 por serem proteínas podem atuar na alveologênese induzindo IGF-1, mas são suprimidas em alvéolos maduros.

Perspectiva

Pode-se sugerir que JAK2 e STAT5 concomitantes ao IGF-1 podem ser uma nova via de alveolarização pulmonar, e os resultados aqui apresentados podem dar uma nova perspectiva para o tratamento pulmonar futuro quando ocorrerem deficiências na maturação deste órgão.

ABSTRACT

Introduction: Janus kinase-2 (JAK2) is a hormone receptor-coupled kinase that mediates the activation of the signal transducer and activator of transcription-5 (STAT5) in hormone-responsive cells, among them the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor 1 (IGF-1) axis.

Objective: As IGF-1 is considered a crucial cytokine associated with postnatal lung development, and this growth factor may be induced by JAK2/STAT5, the likely immunohistochemical co-expression among IGF-1, JAK2, and STAT5 during lung alveolarization in animal models was investigated.

Method: Pulmonary necropsies of Wistar rats that were euthanized at 2, 7, 12, 15 and 22 postnatal days were collected and submitted for histological analysis and immunohistochemistry observation for anti-IGF-1, JAK2, and STAT5 antibodies. On the second day, it was observed that the histological aspects of lungs demonstrated a saccular pattern. During this period, intense immunopositivity for IGF-1 as well as positivity for JAK2 and STAT5 in the luminal face of cells in the saccular area were also observed. On days 7 and 12, the lung histological features demonstrated an aspect of mass alveolarization.

Result: During these periods, the immunohistochemical aspects were similar to the second day; however, when histological aspects of alveoli possessed usual and mature characteristics, the positivity for IGF-1 remained moderate to intense, while JAK2 and STAT5 decreased significantly.

Conclusion: The results suggest that JAK2 and STAT5 are proteins that may act in alveologenesis inducing IGF-1, but they are suppressed in mature alveoli.

KEYWORDS: Alveologenesis. JAK2. STAT5. IGF-1. Lung development.

¹Instituto Presbiteriano Mackenzie, São Paulo, SP, Brasil;

²Universidade de Brasília, DF, Brasil;

³Hospital Ruber Internacional, Serviço de Neurologia, Madrid, Espanha.

Conflito de interesse: Nenhum | Financiamento: Em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Finanças 001 | Recebido em: 29/07/2024 | Aceito em: 22/10/2024 | Correspondência: afgiovanini@gmail.com | Editor Associado: Luiz Fernando Kubrusly¹

Como citar:

Camargo MV, Tabushi FI, de Souza VV, Ribas-Filho JM, Cuenca RM, Neukamp MB, Giovanini AF. A expressão imuno-histoquímica de JAK2 e STAT5 ocorre no estágio de alveolarização sacular e em massa, mas é suprimida em alvéolos bem fo. *BioSCIENCE*. 2024;82:e071

INTRODUÇÃO

A alveolarização pós-natal requer alterações morfológicas e estruturais nas áreas pulmonares cujos resultados finais são um número crescente de alvéolos de menor tamanho, aumentando a área de superfície sobre a qual as trocas gasosas podem ocorrer.¹

Essas mudanças ocorrem gradualmente, onde o número de sulcos baixos e salientes derivados do padrão sacular são formados, indicando os contornos e estruturas dos futuros alvéolos no parênquima pulmonar, o que é denominado fase de “alveolarização em massa”.² O processo terminal de alveolarização tem sua aparência estrutural final no meio da segunda semana pós-natal em ratos, que ocorre de forma semelhante em cerca de 12-24 meses em humanos pós-natais.

De fato, os mecanismos envolvidos na alveolarização requerem sequência biológica de eventos envolvendo fatores de crescimento, hormônio e seu receptor. Dentre os eixos hormonais, a via do hormônio do crescimento (GH)-fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) parece ser fundamental, pois a deficiência de IGF-1 tem sido associada a uma diminuição na formação de alvéolos, função defeituosa para trocas gasosas e desenvolvimento de displasia broncopulmonar.³

As vias pelas quais o GH-IGF-1 induz a alveolarização permanecem obscuras,⁴ e melhor compreensão delas pode contribuir para uso da alveolarização ou indicar a necessidade de alternativa terapêutica, principalmente nos casos em que há necessidade de interromper a gravidez prematura sem o pré-tratamento oportuno do glicocorticoide materno.

Neste caso, levanta-se a hipótese de que, concomitante à expressão de IGF-1, a imunopresença de Janus quinase-2 (JAK2) e o transdutor de sinal e ativador da transcrição-5 (STAT5) poderiam indicar via para alterações histológicas da alveolarização pós-natal.

Essa hipótese parece ser provável, pois, análoga à esta hipótese, Wagner et al.⁵ e Cafarel et al.⁶ demonstraram organização da alveolarização ou falha da alveologênese no tecido mamário, respectivamente, quando JAK-2/STAT5 estava presente ou ausente.

O STAT5 é um fator de transcrição, que é translocado para o núcleo, contribuindo para a diferenciação celular e organização tecidual.⁷ Ele é induzido em resposta à presença de JAK2,⁸ que é ativado por tirosina quinase e estimulado por hormônios que apresentam estruturas moleculares semelhantes, incluindo prolactina, trombopoietina e eritropoietina, bem como GH para transcrição posterior de IGF-1.⁹

O presente estudo foi realizado para verificar a imunolocalização simultânea de IGF-1, JAK2 e STAT5 durante a alveolarização pulmonar em ratos recém-nascidos.

MÉTODO

A aprovação ética foi feita pelo Comitê de Cuidados com os Animais da instituição (protocolo #266-2015). Todas as diretrizes internacionais e institucionais aplicáveis do comitê para o cuidado e uso de animais foram seguidas.

Foram utilizadas 10 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Holtzman) com idade entre 2-3 meses e peso aproximado de 240-260 g. Os animais foram mantidos sob temperatura

(22 ± 2°C) e umidade (55% ± 5%) controladas, com ciclo claro/escuro de 12 h/12 h e alimentação e água disponíveis ad libitum. Usando um cotonete embebido em solução salina (pH 7,0), examinaram-se os ciclos reprodutivos por meio de citologia oncocítica vaginal coletada de todas as ratas.

Aquelas em período estral foram acasaladas durante a noite com ratos machos. Os esfregaços vaginais citológicos foram coletados na manhã seguinte e corados com o método de Shorr para verificar a presença de espermatozoides por meio de microscópio óptico. Considerou-se o primeiro dia de gestação quando a detecção de espermatozoides na vagina estava presente.

Cada animal recém-nascido foi monitorado até o dia da eutanásia, que ocorreu aleatoriamente no 2º, 7º, 12º, 15º e 22º dia após o nascimento (n = 15 para o grupo em cada período de tempo). Todas as eutanásias foram realizadas por breve exposição ao isoflurano.

Após, o tórax dos recém-nascidos foi aberto, e os pulmões removidos e imersos por 48 h em temperatura ambiente em solução fixadora de formaldeído a 4% (preparada a partir de paraformaldeído) que foi tamponada a pH 7,2 com fosfato de sódio 0,1 M. Os espécimes foram seccionados longitudinalmente e cada fragmento cirúrgico foi desidratado em concentrações graduadas de etanol, limpo em xileno e embebido em parafina. De cada espécime, foram obtidos cortes seriados de 3 µm de espessura de acordo com o plano de corte longitudinal estabelecido.

Processamento de imunohistoquímica

As lâminas foram desparafinadas, hidratadas e submetidas à recuperação do antígeno em tampão citrato de sódio 10 mM (pH 6,0) e submetidas a 3 ciclos de micro-ondas de 5 min. As seções foram incubadas durante a noite a 4 °C com anticorpo primário anti IGF-1 (200 mg/ml, Santa Cruz Biotechnology Inc.: sc 74116, CA, EUA) com fator de diluição de 1:200, anti-JAK2 (0,5 mg/ml, Abcam, Cambridge, Reino Unido, ab 39636) com fator de diluição de 1:1100 e STAT-5 (0,5 mg/ml, Abcam, Cambridge, Reino Unido, ab 230670) com fator de diluição de 1:1000. Posteriormente, os cortes foram incubados em 1 kit de anticorpos secundários contendo substrato de fosfatase alcalina por 30 min à temperatura ambiente e revelados com substrato cromogênico Fast Red por 15 min. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris. Essa abordagem técnica foi realizada em triplicata. Controle negativo foi obtido da mesma forma, mas com solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH 7,4 como anticorpo primário.

Análise de imagem

As imagens foram captadas por câmera digital (Samsung, Coreia do Sul) conectada a microscópio óptico com ampliação original de ×100. As contas foram feitas usando o software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>). Consideramos a presença ou ausência de positividade independente de sua expressão na membrana, citoplasma ou núcleo. As células (positivas e negativas) foram contadas e marcadas manualmente. Após a tabulação dos dados, transformamos os dados em proporção de células positivas/100 células para facilitar a interpretação dos resultados.

Análise estatística

Cada parâmetro imunoistoquímico foi avaliado separadamente. A análise de Shapiro-Wilk foi utilizada para determinar a normalidade, seguida do teste não paramétrico de Kruskal Wallis para verificar as diferenças estatísticas. $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADO

Imunopositividade intensa para IGF-1 foi detectada em todos os períodos analisados e seus dados são demonstrados na Figura 1A. No 2º dia pós-nascimento, a imunopresença de IGF-1 foi difusa. No entanto, a imunopositividade (cor vermelha) foi prevalente nas células ao redor do saco terminal (Figura D), nas células luminais que constituíam estrutura alveolar (Figuras E a F) e nos alvéolos maduros (Figuras G a H). Simultaneamente, observou-se imunopresença de JAK2 (Figuras I a K) e STAT5 (Figura N a P) nas células luminais apenas nos dias 2, 7 e 12. No entanto, a presença de JAK2 (Figuras L e M) e STAT5 (Figuras Q e R) diminuiu substancialmente no 15º e 22º dia (dados quantitativos nas Figuras B e C)

Quando focados no IGF-1, esses resultados corroboraram estudos anteriores que relacionaram o IGF-1 ao crescimento pulmonar e à organização celular¹⁰ e à catálise celular para promover estrutura cribriforme, que coincide com o desenvolvimento dos alvéolos.¹¹ Aqui, acrescenta-se a informação de que alterações na

morfologia pulmonar para formação de pré-alvéolos requerem a presença de JAK2 e STAT5, o que não ocorre após a maturação dos alvéolos, mesmo na presença de IGF-1 (Figura).

DISCUSSÃO

O espectro de processos fisiológicos regulados por JAK2 e STAT5 é vasto,¹² incluindo crescimento, regulação dos canais iônicos, hematopoiese e lactação.¹³ Todas essas vias parecem ser reguladas por ações hormonais que possuem semelhanças químicas estruturais, como prolactina,⁶ eritroína, trombopoetina,¹⁴ ou mesmo por vias do GH-IGF-1.¹⁵

Comumente, o GH é produzido em pulsos e suas ações são mediadas por meio do receptor do hormônio do crescimento (GHR), um JAK2 associado ao receptor.¹⁶ A interação GH-GHR desencadeia mudanças conformacionais nos dímeros da superfície celular que são capazes de promover um JAK2 ativo, que por sua vez, promove a ativação do STAT5 a jusante.⁹ A fosforilação de tirosina, dependente de GH de STAT5, permite a translocação nuclear eficaz e a regulação específica da sequência de DNA de genes importantes nas ações do GH, especialmente o IGF-1, que atua nas formas parácrina e autócrina.

Durante o processo de alveologênese, a presença de mRNA de GH foi detectada por Beyea, Olson e Harvey¹⁷ na maioria das células mesenquimais e epiteliais de

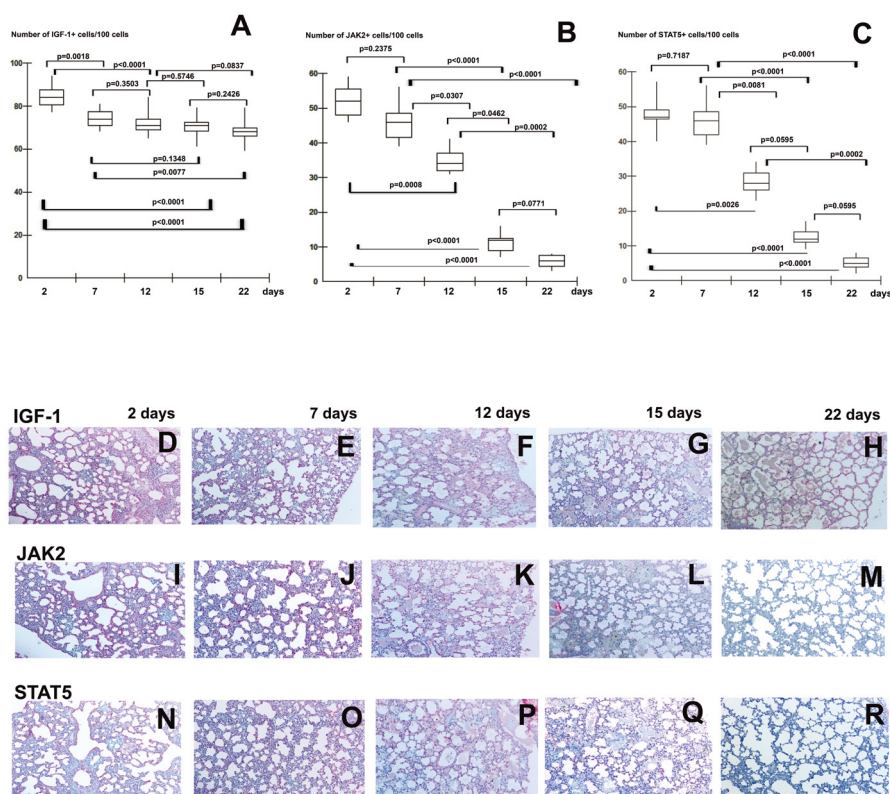


FIGURA — A, B e C demonstram o número de células positivas para respectivamente IGF-1, JAK2 e STAT5 em todos os períodos analisados. As micrografias D a H revelam a presença imunoistoquímica de IGF-1 em 2, 7, 12, 15 e 22 dias de análise. Verifica-se a presença intensa (cor vermelha) em todo o período analisado. Micrografia I a M - mostram a presença imunoistoquímica de JAK2 nos espécimes. Verificar a presença moderada a intensa para JAK2 especialmente em células luminais de período de tempo mais precoce (I e J) do pulmão, denominada fase de alveolarização secular e em massa. Assim que o tempo passa ocorre o processo de alveolarização e diminuição da imunolocalização de JAK2 (K até M). Micrografias N a R - revelam a presença imunoistoquímica de STAT5 para cada período de tempo. Demonstra-se imunopositividade para STAT5 em células luminais do pulmão, na fase de alveolarização sacular e em massa também no período de tempo prematuro (N e O), enquanto diminuem assim que ocorre o processo de alveolarização

pulmões de ratos neonatais entre 4-14 dias pós-natais. No entanto, a imunopresença para JAK2 e STAT5 restrita ao epitélio luminal no 2º dia até o 12º dia de desenvolvimento pós-natal, como observado aqui, e sugere que a via JAK2/STAT5 é necessária na organização dos pré-alvéolos e denota os locos e o período de ação do GH, enquanto as células mesenquimais parecem ser fonte parácrina de produção de GH para as células epiteliais luminais.

Apoiando nossa hipótese, Wagner et al.⁵ demonstraram a importância da presença de JAK2 e STAT5 na alveologênese mamária em ratos induzida por prolactina, mas mesmo sob ação hormonal, a alveologênese foi suprimida em ratos knockout para JAK2.

Vale ressaltar que a positividade para JAK2 e STAT5 diminuiu de forma robusta, assim que ocorreu a morfologia terminal da alveolarização (15º ao 22º dia), tornando-se restrita apenas em algumas células alveolares com aspecto histológico de pneumócitos tipo II.

A imunolocalização reduzida em alvéolos maduros parece necessária porque a resolução dessa ação direta do GH contribui para a inibição da visceromegalia. Esse efeito inibitório pode ser atribuído à supressão de JAK2, pois a falta da proteína JAK2 favorece a endocitose e a ubiquitinação do GHR.¹⁸ Além disso, JAK2 também é indutor de trombogênese e hematopoiese e a supressão de JAK2/STAT5 parece contribuir para a homeostase pulmonar, pois o caráter hematológico recentemente atribuído ao pulmão não deve se sobrepor à função das trocas gasosas.¹⁹

Além disso, a imunolocalização precoce de JAK2 e STAT5 aqui apresentada fornece novas evidências para explicação plausível do porque o pulmão é órgão no qual ocorre hematopoiese extramedular em alguns casos de eritroblastose fetal ou mielofibrose,²⁰ ou mesmo explicar a presença de JAK2 em linhagens de alguns tipos de adenocarcinoma pulmonar agressivo,²¹ que, a partir deste momento, pode ser atribuído à desdiferenciação celular das células que formam estruturas semelhantes a alvéolos.

CONCLUSÃO

Este processo pode ser sugerido como uma nova via de alveolarização pulmonar com participação de JAK2 e STAT5 concomitantes ao IGF-1, e resultados aqui apresentados podem dar nova perspectiva para o futuro tratamento pulmonar quando ocorrerem deficiências na maturação desse órgão.

Contribuição dos autores

Conceituação: Mariana Verona Camargo

Curadoria de dados: Fernando Tabushi

Metodologia: Vanessa Valois de Souza I

Administração do projeto: Jurandir Marccondes Ribas-Filho

Supervisão: Allan Fernando Giovannini

Escrita: Todos os autores

Escrita: Todos os autores

REFERÊNCIAS

- Souëf PNL. Growth and development of the lung. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1(2):127-31. <https://doi.org/10.1097/01.all.0000010996.62723.d7>
- Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate*. 2006;89(4):313-22. <https://doi.org/10.1159/000092868>
- Bourbon J, Boucherat O, Chailley-Heu B, Delacourt C. Control mechanisms of lung alveolar development and their disorders in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Res*. 2005;57(5 Pt 2):38R-46R. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000159630.35883>
- Wang Z, Li W, Guo Q, Wang Y, Ma L, Zhang X. Insulin-Like Growth Factor-1 Signaling in Lung Development and Inflammatory Lung Diseases. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6057589. <https://doi.org/10.1155/2018/6057589>
- Wagner KU, Krempler A, Triplett AA, Qi Y, George NM, Zhu J, et al. Impaired alveologenesis and maintenance of secretory mammary epithelial cells in Jak2 conditional knockout mice. *Mol Cell Biol*. 2004;24(12):5510-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.12.5510-5520.2004>
- Caffarel MM, Zaragoza R, Pensa S, Li J, Green AR, Watson CJ. Constitutive activation of JAK2 in mammary epithelium elevates Stat5 signalling, promotes alveologenesis and resistance to cell death, and contributes to tumorigenesis. *Cell Death Differ*. 2012;19(3):511-22. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.122>
- Wingelhofer B, Neubauer HA, Valent P, Han X, Constantinescu SN, Gunning PT, et al. Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer. *Leukemia*. 2018;32(8):1713-26. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0117-x>
- Able AA, Burrell JA, Stephens JM. STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity. *Biology (Basel)*. 2017;6(1):20. <https://doi.org/10.3390/biology6010020>
- Deng L, Jiang J, Frank SJ. Growth hormone-induced JAK2 signaling and GH receptor down-regulation: role of GH receptor intracellular domain tyrosine residues. *Endocrinology*. 2012;153(5):2311-22. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1452>
- Hellström A, Ley D, Hansen-Pupp I, Hallberg B, Löfqvist C, van Marter L, et al. Insulin-like growth factor 1 has multisystem effects on foetal and preterm infant development. *Acta Paediatr*. 2016;105(6):576-86. <https://doi.org/10.1111/apa.13350>
- Li J, Masood A, Yi M, Lau M, Belcastro R, Ivanovska J, et al. The IGF-1/IGF-R1 pathway regulates postnatal lung growth and is a nonspecific regulator of alveologenesis in the neonatal rat. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304(9):L626-37. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00198.2012>
- Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 8):1281-3. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963>
- Sopjani M, Konjufca V, Rinnerthaler M, Rexhepaj R, Dërmaku-Sopjani M. The Relevance of JAK2 in the Regulation of Cellular Transport. *Curr Med Chem*. 2016;23(6):578-88. <https://doi.org/10.2174/0929867323666151207111707>
- Lu WJ, Lin KC, Huang SY, Thomas PA, Wu YH, Wu HC, et al. Role of a Janus kinase 2-dependent signaling pathway in platelet activation. *Thromb Res*. 2014;133(6):1088-96. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2014.03.042>
- Gan Y, Buckels A, Liu Y, Zhang Y, Paterson AJ, Jiang J, et al. Human GH receptor-IGF-1 receptor interaction: implications for GH signaling. *Mol Endocrinol*. 2014;28(11):1841-54. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1174>
- Guevara-Aguirre J, Guevara A, Palacios I, Pérez M, Prócel P, Terán E. GH and GHR signaling in human disease. *Growth Horm IGF Res*. 2018;38:34-38. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2017.12.006>
- Beyea JA, Olson DM, Harvey S. Growth hormone (GH) action in the developing lung: changes in lung proteins after adenoviral GH overexpression. *Dev Dyn*. 2005;234(2):404-12. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20538>
- Puttersj, da Silva-Almeida AC, van Kerkhofp, van Rossum AG, Gracani A, Strous GJ. Jak2 is a negative regulator of ubiquitin-dependent endocytosis of the growth hormone receptor. *PLoS One*. 2011;6(2):e14676. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014676>
- Lefrançois E, Ortiz-Muñoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*. 2017;544(7648):105-109. <https://doi.org/10.1038/nature21706>
- Bowling MR, Cauthen CG, Perry CD, Patel NP, Bergman S, Link KM, et al. Pulmonary extramedullary hematopoiesis. *J Thorac Imaging*. 2008;23(2):138-41. <https://doi.org/10.1097/RTI.0b013e31815b89aa>
- Xu Y, Jin J, Xu J, Shao YW, Fan Y. JAK2 variations and functions in lung adenocarcinoma. *Tumour Biol*. 2017;39(6):1010428317711140. <https://doi.org/10.1177/1010428317711140>