

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

NICOLE MILARÉ GARAVELLO

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS
PROTEÍNAS QUINASES C (PKCs) NA
PROLIFERAÇÃO E AUTO-RENOVAÇÃO
DAS CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS MURINAS**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890
O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
8/07/2011

NICOLE MILARÉ GARAVELLO

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS PROTEÍNAS
QUINASES C (PKCs) NA PROLIFERAÇÃO E
AUTO-RENOVAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO
EMBRIONÁRIAS MURINAS**

*Dissertação de Mestrado
apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Prof^ª. Dra. Deborah Schechtman

São Paulo
2011

*Aos meus queridos e amados pais
Antonio Carlos e Regina, por sempre
me apoiarem incondicionalmente,
mesmo nos momentos mais
difíceis da minha vida.*

*Sem esse apoio fundamental
meus sonhos jamais se realizariam.*

AGRADECIMENTO(S)

A Deus, por ter me dado forças para continuar sempre em frente, e mesmo perante grandes dificuldades que por muitas vezes me fez pensar em desistir, não permitia que eu esmorecesse, mas que continuasse a lutar .

Aos meus queridos pais por todo sacrifício que sempre fizeram por mim, mesmo durante anos difíceis e conturbados vocês em seu infinito amor sempre acreditaram em mim e em meu talento. Vocês são o exemplo de pessoas dignas, honestas e batalhadoras que um dia quero ser. Muito obrigada por tudo. Amo Muito Vocês!

A minha orientadora Dra Deborah Schechtman por ter me acolhido em seu laboratório, por ter acreditado em mim, pela sua paciência em me ensinar, você é responsável por grande parte da minha caminhada até aqui.

A professora Dra Maria Júlia Manso Alves, professora Dra. Nathalie Cella e ao professor Dr. Walter Coli pelos incontáveis seminários, discussões de artigos e pelas incríveis trocas de experiências.

Ao professor Dr. Fábio Forti pela troca de experiência, conhecimentos e a oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao professor Dr. Robert Ivan Schumacher pela paciência e colaboração nos experimentos realizados juntos.

A Daria Mochly-Rosen pela doação dos peptídeos moduladores das PKCs para a realização desse trabalho.

Ao Erik, por todo amor, companheirismo, carinho, compreensão, amizade, por me apoiar em todos os momentos e pelas infindáveis horas discutindo protocolos, métodos e artigos. Obrigada por sempre caminharmos lado a lado!

Aos meus queridos amigos Talita e Hélio, por me ensinarem não somente os protocolos para o desenvolvimento deste trabalho, mas também por me ensinarem alguns protocolos da vida.

Aos meus amigos de laboratório (ou amigos de ex-laboratório) e amigos para a vida toda: Natasha, José Matheus, Denise, Ketna, Juliana, Rafael, Laura, Eliciane, Mariana D., Darlene, Marília, Bruno, Jussara, Halinne, Carlos (“Charles”), Leila, Fenny, Mariana L., Martina, Márcio, Vinicius, Renato, Viviana, Crislaine, Fábio (“Tux”) e aos meus eternos amigos do Mari’s lab, com os quais sempre pude contar em qualquer momento.

Aos queridos técnicos do laboratório Célia, Robetinho, Marinei e Maria Luiza, pela ajuda, pelo apoio e pela amizade eterna e verdadeira.

Ao Dr. Marcos Demasi pela sua infinita paciência em me ensinar os primeiros passos, você continua sendo um exemplo a ser seguido, como pesquisador e pessoa.

Ao meu irmão Bruno e a minha família, por sempre estar ao meu lado me apoiando, incentivando e compreendendo todas as minhas ausências.

As minhas queridas amigas Elisabeth, Marina, Mayara, Flávia, Aninha e Gabriela por me incentivarem e me apoiarem em todas as etapas da minha vida.

As minhas queridas amigas de faculdade Alessandra, Bruna, Estela, Fabiana, Manoela, Patrícia B., Patrícia S., Renata (eterno grupo D.I.V.A.), por continuarem ao meu lado me apoiando durante a pós-graduação.

Aos meus avós Ana, Leonor (em memória) e Lourenço (em memória), por serem meu exemplo de força, amor, integridade e generosidade. E pelas lembranças mais doces da minha infância.

Às agências FAPESP, CNPq e Capes, pelo suporte financeiro indispensável à realização deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

***“O valor das coisas
não está no tempo
em que elas duram,
mas na intensidade
com que acontecem.
Por isso existem
Momentos Inesquecíveis,
Coisas Inexplicáveis
e Pessoas Incomparáveis.”***

Fernando Pessoa

RESUMO

Garavello, N.M. **CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DAS PROTEÍNAS QUINASES C (PKCs) NA PROLIFERAÇÃO E AUTO-RENOVAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO EMBRIONÁRIAS MURINAS**, 2011, 106p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Células tronco embrionárias (CTE) são capazes de proliferar indefinidamente mantendo a sua pluripotência, isto é, a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares perante estímulos adequados. Esse potencial tem sido intensamente estudado, de modo a permitir a utilização dessas células em terapias de reposição celular. Trabalhos anteriores demonstraram que as proteínas kinases C (PKC) são importantes moduladores moleculares de cascatas de sinalização que levam ao processo de proliferação e auto-renovação das CTE. Porém o papel exato das diferentes isoenzimas das PKCs ainda não foi elucidado. Isso ocorre porque a família das PKCs é composta por pelo menos dez isoenzimas e apenas, recentemente, desenvolveram-se moduladores específicos para as diferentes isoenzimas, o que permitirá estudar o papel específico dessas quinases.

No presente trabalho verificamos que a ativação da PKC δ induziu a proliferação de CTE indiferenciadas sem induzir a diferenciação das mesmas. Para tentar elucidar as vias de sinalização mediadas pela PKC δ que levam à proliferação das CTE indiferenciadas realizamos estudos de fosfoproteômica o que possibilitou a identificação de potenciais alvos diretos e indiretos da PKC δ . Dentre os alvos identificados foram encontradas diversas proteínas relacionadas com proliferação, transcrição, tradução e resposta ao stress

(chaperonas), contribuindo para a hipótese de que a ativação da PKC δ leva à proliferação das CTE indiferenciadas.

Em diversos sistemas, a ativação da PKC δ leva à ativação da MAPK, em particular das ERK1/ 2, sendo essa via capaz de induzir a proliferação de diversas linhagens celulares. Identificamos diversas proteínas alvos da PKC δ , que interagem também com componentes da via das MAPKs. Desta forma, verificamos a influência da ativação da PKC δ na via das MAPKs. De fato, a ativação da PKC δ na linhagem de CTE murinas indiferenciadas, E14TG2a, ativou a MEK, ERK1/ 2 e o fator de transcrição ELK-1. Como estudos anteriores demonstraram que a inibição da ERK1/ 2 mantém CTE indiferenciadas e que a ativação desta via poderia levar à diferenciação de CTE, investigamos a cinética de ativação da ERK pela PKC δ . Demonstramos que a ativação da ERK pela PKC δ se dá de modo transiente e que apesar da PKC δ não translocar para o núcleo, sua ativação induz a fosforilação e translocação nuclear da ERK, que atuará na fosforilação do fator de transcrição ELK-1.

Desta forma, concluímos que a PKC δ induz a proliferação das CTE murinas indiferenciadas ativando transitoriamente a via das ERK1/ 2, que translocam para o núcleo fosforilando fatores de transcrição como a ELK1 e levando possivelmente ao aumento de proliferação dessas células. A ativação transiente das ERK1/ 2 pela PKC δ é importante para a auto-renovação das CTE.

Palavras-chaves: Proteína quinase C, Células tronco embrionárias, proliferação, auto-renovação, fosfoproteômica.

ABSTRACT

Garavello, N.M. **CHARACTERIZATION OF THE ROLE OF PROTEIN KINASES C (PKC) IN PROLIFERATION AND SELF-RENEWAL OF MURINE EMBRYONIC STEM CELLS**, 2011, 106p. Masters thesis – Pos-graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Embryonic stem cells (ESC) are able of proliferating indefinitely maintaining their pluripotency, which is the capability to differentiate in different cell types upon appropriate stimuli. Pluripotency has been intensely investigated in order to allow the use of these cells in cellular replacement therapies. Previous work has demonstrated that the serine/ threonine kinases, such as, Protein kinases C (PKC) are important modulators of signaling cascades that lead to the process of proliferation and self-renewal of ESC. However, the exact role of the different PKC isoenzymes still remains to be elucidated. Due to the fact that the PKC family is composed of at least ten different isoenzymes and only recently isoenzyme specific modulators have been developed, which now allows the elucidation of these kinases roles.

In the present work we verified that activation of PKC δ induced undifferentiated ESC have their proliferation rate increased. Trying to elucidate the signaling pathways mediated by PKC δ that lead to the proliferation increase we performed phosphoproteomic studies to identify potential PKC δ targets. Between the targets identified we found several proteins related with proliferation, protein transcription, translation and stress response

(chaperones). These targets contributed to the hypothesis that PKC δ activation leads to undifferentiated ESC proliferation.

In different cell lines, PKC δ activation leads to MAPK activation, through ERK1/ 2 activation, which are frequently involved with cellular proliferation. We also identified several targets of PKC δ that interact with several components of MAPK's signaling cascade. PKC δ activation in murine undifferentiated ESC line, E14TG2a, led to MEK, ERK1/ 2 and the transcription factor Elk-1 activation.

Some articles demonstrate that the inhibition of ERK1/2 are responsible to maintain ESC undifferentiated and that its activation could lead to ESC differentiation. Analysing the kinetics of ERK activation in the ESC by PKC δ , we show that ERK activation was transient and despite the fact that PKC δ does not translocate to the nucleus upon activation, but induces ERK activation and its nuclear translocation, where ERK could phosphorylate the transcription factor Elk-1.

In conclusion PKC δ induces undifferentiated murine ESC proliferation increase by a transient ERK activation and its nuclear translocation.

Keywords: Protein kinase C, Embryonic stem cell, proliferation, self-renewal, phosphoproteomics

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANGII – Angiotensina II (*Angiotensin II*)

Akt ou PKB – Proteína quinase B (*protein kinase B*)

BMP – Proteína Morfogenética óssea (*bone morphogenetic protein*)

CTE – Células Tronco Embrionárias (*Embryonic Stem Cells*)

DAG – Diacilglicerol (*Diacylglycerol*)

DOG – 1,2-dioctanoil glicerol (*1,2, dioctanoyl-sn-glycerol*)

DTT – Ditioneitol (*Dithiothreitol*)

EGF – Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*)

eIF4E – Fator 4E iniciador translacional Eucariótico (*Eukaryotic translation initiation factor 4E*)

ERK – Proteínas quinases reguladas por estímulos extracelulares (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

E2F1 – Fator de transcrição E2F1 (*Transcription factor E2F1*)

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblasto (*Fibroblast Growth Factor*)

FoxD – *Forkhead box D3*

GRB2 - Proteína 2 Ligada a Receptor de Fator de Crescimento (*Growth factor receptor-bound protein 2*)

GSK – Glicogênio Sintase Quinase (*Glycogen synthase kinase*)

Hsp27 – proteína de choque térmico (chaperona) pequena (*small heat shock protein*)

IL – Interleucina (*interleukin*)

JAK – Janus quinase (*Janus kinase*)

JNK - c-Jun N-terminal quinase (*c-Jun N-terminal kinases*)

LIF – Fator Inibitório de Leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor*)

LIFR – receptor do Fator Inibitório de Leucemia (*Leukemia Inhibitory Factor receptor*)

MAPK – Proteína-quinase Ativada por Mitógenos (*Mitogen Activated Protein kinase*)

MKP – Fosfatase MAP quinase (*MAP Kinase Phosphatase*)

MPF – Fator de promoção de fase M (*M-phase promoting factor*)

NF $\kappa\beta$ - Fator Nuclear kappa beta (*Nuclear factor $\kappa\beta$*)

NGF – Fator de Crescimento de nervo (*Nerve growth factor*)

NudC – Distribuição Nuclear gene C (*Nuclear Distribution gene C homolog*)

OCT – Fator de transcrição POU (*POU transcription factor*)

PBS – Tampão de fosfato-salina (*Phosphate buffered saline*)

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

PDGF – Fator de Crescimento derivado de plaquetas (*Platelet derived growth factor*)

PDK – Proteína quinase dependente de fosfoinosítido (3-phosphoinositide-dependent protein kinase)

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase (*Phosphoinositide 3-kinase*)

PKC – Proteínas quinases C (*Protein Kinase C*)

PKR – Proteína quinase dependente de RNA dupla fita (*dsRNA-dependent protein kinase*)

PMA – forbol-12-miristato-13-acetato (phorbol 12-myristate 13-acetate)

Rac – é uma subfamília da família Rho de GTPases, incluindo: Rac1, Rac2, Rac3 e RhoG.

RACKs – Receptores de Proteínas Kinase C ativadas (*Receptor for activated protein kinase C*)

RAF – é uma proteína serina/ treonina quinase conhecida como proto-oncogene, atua como transdutor de sinal na via das MAPK.

Ras – (abreviação de Rat Sarcoma) é uma subfamília de GTPases (small GTPases) envolvidas na transdução de sinais intracelulares.

REX – Proteína de endereçamento (*Hex Protein Docking Serve*)

RTK – Receptor de Tirosina Quinase (*Tyrosin Kinase Receptor*)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida para eletroforese - Dodecil Sulfato de Sódio (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SEEA-1 – *Stage Specific Embryonic Antigen-1*, marcador de células tronco pluripotentes

SMAD – Família do TGF-beta de transdução de sinal (*Signal transduction by the TGF-beta superfamily*)

SOS – Ativador da proteína Ras (*Ras Activator*)

SOX – Região SRY determinante do sexo – box 2 (*SRY - sex determining region Y - box 2*)

Src – tirosina quinase Src, é um proto-oncogene (*Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*)

STAT – Transdutores de Sinal e Ativadores da Transcrição (*Signal Transducer and Activator of Transcription*)

TBST – Tampão de Tris (*Tris Buffer Saline Tween20*)

TCA – Ácido Tricloroacético (*trichloroacetic acid*)

TCTP-1 – Proteína translacional de controle tumoral 1 (*Translationally controlled tumor protein 1*)

TGF β – Fator transformador de crescimento beta (*Transforming growth factor beta*)

TPA – 12-O-tetra-decanoil forbol 13-acetato (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Células Tronco Embrionárias (CTE).....	19
1.2. As Proteínas quinases C (PKCs).....	21
1.3. MAPKs e proliferação celular.....	26
1.4. PKCs na proliferação das CTE.....	29
1.5. O antagonismo funcional da PKC δ	30
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1. Peptídeos.....	35
3.2. Cultivo das CTE.....	36
3.3. Extração total de Proteínas.....	37
3.4. Fracionamento Celular.....	37
3.5. Western Blot.....	38
3.6. Ensaio de incorporação de [3 H] Timidina.....	40
3.7. Identificação de alvos diretos e indiretos da PKC δ por Gel bidimensional.....	41
3.7.1. Preparação de lisados para géis bidimensionais.....	41
3.7.2. Géis Bidimensionais.....	42
3.7.3. Detecção das proteínas.....	43
3.7.3.1. Coloração com corante fluorescente fosfo- específico.....	43

3.7.3.2. Coloração por Comassie Blue Coloidal.....	43
3.7.4. Análise dos géis.....	43
3.7.5. Excisão das Proteínas do gel e preparação para espectrometria de massa.....	45
3.8. Validação de Alvos da PKC δ	46
3.9. Microscopia Confocal de Fluorescência.....	46
3.10. Citometria de Fluxo.....	48
3.11. Análise de dados.....	48
3.11.1. Análise dos dados de espectrometria de massas.....	48
3.11.2. Previsão de sítios de fosforilação pela PKC.....	49
4. RESULTADOS.....	50
4.1. Caracterização das isoenzimas das PKCs nas CTE murinas E14TG2a.....	52
4.2. Ensaio de Proliferação Celular por Incorporação de [3 H] Timidina	52
4.3. Resultados do fosfoproteoma da PKC δ com 50nM do peptídeo ativador da PKC δ	55
4.4. Resultados do fosfoproteoma da PKC δ com 500nM do peptídeo ativador da PKC δ	67
4.5. Localização sub-celular da PKC δ e possíveis alvos diretos da PKC δ envolvidos em proliferação celular.....	73
4.6. Caracterização da Ativação da ERK 1/2.....	76
4.7. Cinética de Ativação da via das MAPKs pela PKC δ em CTE murinas indiferenciadas.....	78

5. DISCUSSÃO.....	86
6. CONCLUSÕES.....	97
7. REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO I.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células Tronco Embrionárias (CTE)

Células tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes derivadas da massa interna de blastocistos capazes de proliferar e se auto-renovarem, isto é, proliferar mantendo a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Chachques, Shafy *et al.*, 2002; Silva, Chambers *et al.*, 2006).

O uso das CTE em terapias que proporcionem a substituição do tecido lesionado por células diferenciadas é um grande desafio, para tanto, é necessário desvendar os mecanismos moleculares que regulam a manutenção das CTE no seu estado indiferenciado, bem como as vias de sinalização que levam à diferenciação das mesmas em tecidos específicos (Chachques, Shafy *et al.*, 2002).

Algumas vias de sinalização que regulam a manutenção das CTE murinas, no seu estado indiferenciado já foram descritas anteriormente (Silva, Chambers *et al.*, 2006). Dentre estas vias, destacamos:

1) A cascata do fator inibitório de leucemia (LIF), um fator solúvel que se liga ao receptor (*LIFR*) e ao receptor gp130, que se dimeriza com o LIFR, esse também pode se dimerizar com receptores para outras citocinas como, por exemplo, o receptor para a interleucina 6 (IL-6). A dimerização da gp130 com o LIFR e a concomitante ligação do LIF, leva à ativação da *Janus kinase* (JAK) e consequente à ativação do fator de transcrição STAT-3, cuja translocação e acúmulo no núcleo são capazes de promover a transcrição de genes que mantêm as CTE murinas em seu estado indiferenciado (Molofsky, Pardal *et al.*, 2004;

Boiani e Scholer, 2005); e ainda promove a ativação das *Mitogen-Activated Protein Kinases* [MAPK] (Boiani e Scholer, 2005). Essa ativação das MAPKs pela via do LIF é bastante contraditória, pois sabe-se que essa via, e em particular as *Extracelular Regulated Kinases 1/ 2* (ERK1/2 ou p44/p42) devem ser mantidas parcialmente inibidas para a manutenção do estado de pluripotência das CTE (Silva, Chambers *et al.*, 2006) de forma que o balanço de ativação das MAPKs deve ser precisamente regulado.

2) A via da proteína *Bone morphogenic protein 4* (BMP4) ativa as proteínas Smads 1/2/3/5 e 8, atuando independentemente da via do LIF, essas proteínas são responsáveis por reprimir os genes de diferenciação das CTE (Molofsky, Pardal *et al.*, 2004; Boiani e Scholer, 2005).

3) A família das proteínas Wnt também é uma via independente da via do LIF, atuando pelo receptor *Frizzled*. A ativação deste receptor inibe a proteína *Glycogen syntase kinase 3* (GSK-3) permitindo o acúmulo de β -catenina no núcleo, levando ao aumento da expressão de fatores de transcrição como o OCT-4, REX-1, FoxD3 e SOX-2, os quais inibem a diferenciação das CTE murinas (Molofsky, Pardal *et al.*, 2004; Boiani e Scholer, 2005; Kohn e Moon, 2005). Além disso, a inibição da GSK-3 inibe a via da ERK contribuindo para a manutenção do estado indiferenciado das CTE (Kohn e Moon, 2005).

Ainda, existem outros fatores responsáveis pela manutenção das CTE indiferenciadas. Dentre eles o Nanog, um fator de transcrição fundamental para as CTE murinas, cuja depleção por si só leva à diferenciação celular (Pan e Thomson, 2007). A regulação do Nanog ainda permanece obscura, entretanto, sítios de ligação para os fatores OCT-4 e SOX-2 foram identificados na região do promotor deste gene, sugerindo que esses fatores possam atuar em conjunto na

regulação do Nanog e conseqüentemente na manutenção da pluripotência das CTE (Pan e Thomson, 2007).

A manutenção das CTE murinas indiferenciadas *in vitro* só é possível na presença de alguns fatores como: a citocina LIF e soro, ou na ausência de soro a proteína BMP4 deve ser suplementada. O LIF e o soro/ BMP4 são capazes de manter as CTE murinas no seu estado indiferenciado. Durante a diferenciação das CTE murinas observa-se a ativação da cascata de sinalização das MAPKs, principalmente da ERK1/2, que pode ser ativada dentre outros fatores pelo *Fibroblast growth factor-4* [FGF-4] (Ying, Wray *et al.*, 2008). A inibição do receptor de FGF-4, da GSK3 e das ERK1/ 2 na presença de LIF demonstrou ser outra forma de manutenção do estado indiferenciado das CTE (Silva, Chambers *et al.*, 2006).

O balanço entre fatores de transcrição, interações proteína-receptor, proteína-proteína e célula-célula, juntamente com a cinética e intensidade de ativação e inativação de determinadas vias parecem ser essenciais para a determinação da pluripotência e diferenciação das CTE. Desta forma, embora conheçam-se alguns componentes chaves das vias de sinalização que mantêm as CTE indiferenciadas, ainda não estão claros os mecanismos de regulação destes componentes e a interação entre as diferentes vias existindo várias lacunas a serem preenchidas para um melhor entendimento deste processo.

1.2. As Proteínas quinases C (PKCs)

As Proteínas quinases C (PKC) compõem uma família de quinases que fosforilam os resíduos de aminoácidos serinas e treoninas. A ativação das

PKCs pode se dar através de receptores associados a proteína G via a ativação da fosfolipase C. A fosfolipase C cliva um fosfolípido de inositol, o Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂], localizado na região interna da membrana plasmática gerando dois produtos: o inositol 1,4,5 – trifosfato [IP₃] e diacilglicerol [DAG] (Alberts, Johnson *et. al.* 2004).

O IP₃ é uma molécula hidrossolúvel que se difunde rapidamente no citossol e ao se ligar aos canais de cálcio dependentes de IP₃ no retículo endoplasmático (RE) libera o cálcio armazenado no RE para o citoplasma da célula (Alberts, Johnson *et. al.* 2004).

O diacilglicerol (DAG) permanece na membrana, onde desempenha seu papel sinalizador atuando na ativação de serinas/treoninas-quinases, dependentes deste lipídio para a sua ativação, as PKCs. O efeito da ativação por diacilglicerol pode ser imitado pela adição de ésteres de forbol como o PMA e TPA (Alberts, Johnson *et. al.* 2004).

A família das PKCs é constituída de pelo menos dez isoenzimas, agrupadas em três subfamílias, de acordo com sua homologia e sensibilidade aos compostos que as ativam:

- 1) As isoenzimas "clássicas" (cPKCs) incluem as PKCs α , β I, β II, e γ são ativadas por cálcio, diacilglicerol (DAG) ou seu análogo o éster de forbol (PMA);
- 2) Composto a sub-família das PKCs "noveis" (nPKCs), encontramos as PKCs δ , ϵ , η , e θ que independem do cálcio para a sua ativação porém também são ativadas por DAG;
- 3) As PKCs "atípicas" (aPKCs), compostas por ζ e λ /i são independentes de cálcio e insensíveis a PMA/DAG por conterem um domínio C1 único (Figura 1),

podendo ser ativadas por diferentes lipídeos como, por exemplo, a ceramida (Ying, Wray *et al.*, 2008).

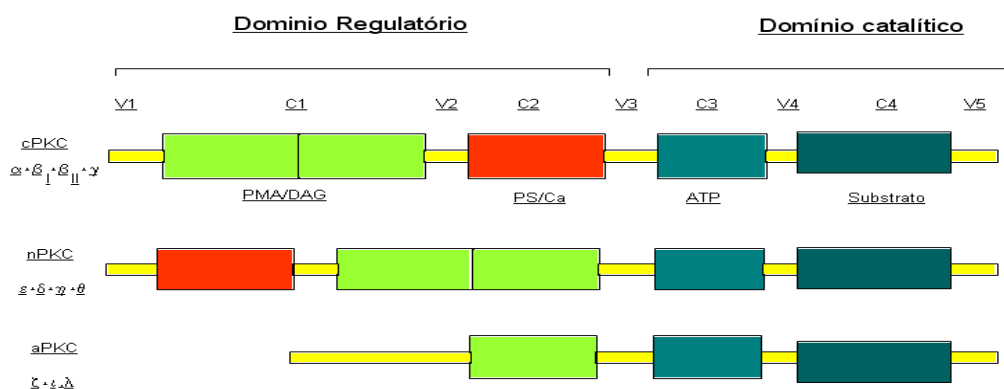


Figura 1: Esquema demonstrando a organização estrutural das sub-famílias das PKCs. A estrutura das diferentes isoenzimas das PKCs é composta por domínios conservados, representados por C e domínios variáveis, V. O domínio C1 duplo se liga ao DAG ou ao seu análogo o éster de forbol (PMA). Portanto, as aPKCs, que possuem apenas um domínio C1, não têm a capacidade de se ligar ao DAG. Os domínios C3 e C4 são sítios de ligação para o ATP e para substratos respectivamente. A estrutura gênica das c e nPKCs diferem na ordem dos domínios C1 e C2 porém isso não parece alterar a estrutura da proteína. No domínio C2 das cPKCs ocorre a ligação ao cálcio, as nPKCs apresentam um domínio estruturalmente semelhante ao C2 das cPKCs, o domínio V1, porém este domínio não tem a capacidade de se ligar ao cálcio. Os domínios C2/ V1 também ligam fosfatidilserina outro lipídio necessário para a ativação das c e nPKCs (Figura adaptada de Nishizuka *et. al.*, 1988).

Com exceção das isoenzimas β I e β II que são variantes de *splicing* do C-terminal de um único gene, diferentes genes codificam para as diferentes isoenzimas das PKCs.

As diferentes isoenzimas das PKCs estão envolvidas em diversas vias de sinalização intracelulares e cada isoenzima é expressa em uma grande variedade de tipos celulares, sendo que um mesmo tipo celular pode expressar múltiplas isoenzimas (Schechtman e Mochly-Rosen, 2001). As PKCs são proteínas quinases chaves de diversos processos fisiológicos incluindo: proliferação (Matsuura, Wada *et al.*, 2004), diferenciação (Klug, Soonpaa *et al.*, 1996), apoptose (Kraft, Anderson *et al.*, 1982; Nishizuka, 1988; Keranen, Dutil *et al.*, 1995), adesão celular, migração (Ron e Kazanietz, 1999), secreção (Sonnenburg, Gao *et al.*, 2001), e também estão envolvidas no

desenvolvimento de várias patologias como diversos tipos de cânceres (Cenni, Doppler *et al.*, 2002; Schechtman, Craske *et al.*, 2004).

Dentre os diversos estímulos extracelulares para a ativação das PKCs encontramos neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento (Mochly-Rosen e Gordon, 1998). A ativação das PKCs é acompanhada pela sua translocação, isto é, o movimento da fração solúvel (citossol) para a fração particular (membranar) da célula composta por membrana plasmática e membranas de diversas organelas (Kraft, Anderson *et al.*, 1982; Saito e Shirai, 2002).

A compartimentalização subcelular das PKCs pode variar para as diferentes isoenzimas perante um mesmo estímulo. Em cardiomiócitos o ácido araquidônico promove a translocação da PKC ϵ para o complexo de Golgi e da PKC ζ para o núcleo (Disatnik, Buraggi *et al.*, 1994; Disatnik, Jones *et al.*, 1995; Saito e Shirai, 2002).

Ainda, diferentes estímulos podem levar à translocação de uma mesma isoenzima da PKC para diferentes compartimentos subcelulares. O TNF- α em cardiomiócitos induz a translocação da PKC δ para o Complexo de Golgi ativando a cascata de apoptose; enquanto o PMA induz a translocação da PKC δ para a membrana plasmática, promovendo a parada do ciclo celular nas fases G2/M (Saito e Shirai, 2002). Muitas vezes as diferentes isoenzimas das PKCs podem exibir funções antagônicas. Tanto a inibição da PKC δ quanto a ativação da PKC ϵ em cardiomiócitos protegem da morte celular por isquemia.

Após ativação as diferentes isoenzimas da PKC translocam para compartimentos sub-celulares específicos (Kraft, Anderson *et al.*, 1982) e se ancoram a proteínas adaptadoras que são isoenzimas específicas. Tais

proteínas de ancoragem são denominadas de Receptor de Proteína quinase Ativadas [do inglês *Receptor for activated protein kinase C - RACK*]. As RACKs são proteínas adaptadoras que além de ancorarem as PKCs à fração membranar das células coordenam a interação das PKCs com seus substratos e outras proteínas de sinalização (Mochly-Rosen e Gordon, 1998).

Até recentemente (1997) não era possível determinar o papel específico das diferentes isoenzimas das PKCs, devido à sua natureza altamente conservada. A alta conservação do domínio catalítico das PKCs dificulta a especificidade de inibidores e ativadores convencionais desse sítio. Desta forma, baseando-se na interação das PKCs com as suas respectivas RACKs foram desenvolvidos moduladores específicos para as diferentes isoenzimas das PKCs.

Os moduladores das PKCs são peptídeos sintéticos constituídos de 6 a 10 resíduos de aminoácidos, que induzem ou inibem a interação de uma isoenzima específica da PKC com a sua RACK, de forma a ativar ou inibir a translocação desta isoenzima e, conseqüentemente, a atividade da mesma. Estes peptídeos moduladores são acoplados a um peptídeo carreador intracelular, como por exemplo, o peptídeo Tat [aminoácidos 47-57 da proteína Transativadora de Transcrição (Tat) do HIV] (Nagahara, Vocero-Akbani *et al.*, 1998) sendo internalizados por diferentes tipos celulares. Desta forma, tais moduladores podem ser utilizados para desvendar o papel das diferentes isoenzimas das PKCs em processos fisiológicos e fisiopatológicos (Kheifets e Mochly-Rosen, 2007) ou mesmo serem utilizados terapeuticamente (Bates, Bode *et al.*, 2008).

O desenvolvimento desses peptídeos ativadores e inibidores das diferentes isoenzimas das PKCs foram chaves para a determinação do papel das PKCs endógenas em diversos processos fisiopatológicos. Utilizando-se um peptídeo ativador da PKC δ foi possível determinar que esta isoenzima era responsável pelo dano causado pela isquemia e re-perfusão cardíaca e cerebral. Além disso, a inibição da PKC δ durante a isquemia cardíaca (Inagaki, Chen *et al.*, 2003) e cerebral (Bright e Mochly-Rosen, 2005) diminuiu a morte celular por apoptose. Inibindo-se a translocação da PKC δ para a mitocôndria bloqueou-se a ativação das cascatas de sinalização que levam à apoptose após um evento isquêmico (Murriel, Churchill *et al.*, 2004). Esse peptídeo inibidor da PKC δ está sendo utilizado em ensaios clínicos multicêntricos avaliando-se o seu papel protetor contra a morte celular após um evento de isquemia cardíaca (Bates, Bodes *et al.*, 2008).

1.3. MAPKs e proliferação celular

A via das MAPK (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos) são geralmente associadas com proliferação e crescimento celular. Na cascata das MAPKs um sinal extracelular é registrado por um receptor transmembrana, como por exemplo, receptores de fatores de crescimento, que ao serem ativados transmitem o sinal para proteínas efetoras a jusante (*downstream*) resultando frequentemente na ativação de fatores de transcrição específicos. (Krauss, Gerhard 2003).

A via das MAPK é organizada em módulos contendo pelo menos três tipos de proteínas quinases, que transmitem os sinais por eventos de

fosforilação sequencial de modo hierárquico. A ativação de receptores de fatores de crescimento, geralmente acoplados a tirosina quinases, levam à ativação da Raf quinase pela proteína Ras iniciando a cascata de sinalização das MAPK (Krauss, Gerhard 2003).

A ativação da Ras têm curta duração sendo revertidas por tirosinofosfatases específicas (enzimas que retiram o fosfato do resíduo de tirosina). A Ras desencadeia uma série de fosforilações (ativações) iniciando-se pela ativação da Raf uma *MAP-quinase-quinase-quinase* que por sua vez ativa a *MAP-quinase-quinase* ou MEK que irá ativar a *MAP-quinase* ou ERK, que quando ativa fosforila diversas proteínas na célula. A translocação da ERK para o núcleo leva a fosforilação e ativação de fatores de transcrição (Alberts, Johnson *et. al.* 2004) (Figura 2).

As MAPKs têm a característica bastante única, que consiste na necessidade de fosforilação de uma treonina e de uma tirosina, separadas por um único resíduo de aminoácido, para que sua ativação seja completa. Existem diversas MAP quinases-quinases e MAP quinases [p-38 e c-Jun N-terminal kinase (JNK)], que diferentemente das ERK 1/ 2 são frequentemente ativadas por diferentes estímulos, como por exemplo, o stress. As ERK1/ 2 são as MAPK frequentemente ativadas por fatores de crescimento, geralmente, elas estão envolvidas em processos de diferenciação e proliferação celular. As MAPK são inativadas pela retirada dos grupamentos fosfatos, pelas fosfatases.

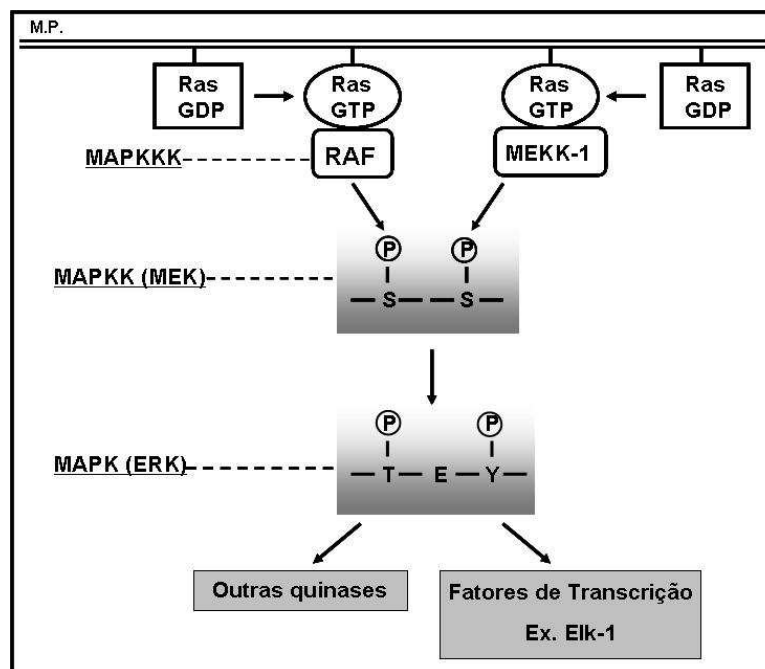


Figura 2: Via das MAPK. Representação da ativação seqüencial das MAPKs, iniciando pela ativação do receptor de membrana, seguido pela dupla fosforilação dos resíduos de aminoácidos. Imagem retirada e adaptada de Krauss, Gerhard 2003. Siglas: MAPKKK – MAP quinase quinase quinase (RAF), MAPKK – MAP quinase quinase (MEK), MAPK – MAP quinase (ERK), M.P. – membrana plasmática;

Existem ainda proteínas que modulam a atividade da RAF, como por exemplo, as proteínas 14-3-3, proteínas regulatórias que reconhecem resíduos de fosfoserina num determinado consenso. Estas proteínas geralmente estão envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, transcrição gênica, duplicação do DNA e remodelamento da cromatina (Krauss, Gerhard 2003).

A proteína 14-3-3 tem um papel importante na via das MAPKs, se ligando a resíduos de fosfoserina da Raf, estes resíduos podem ser fosforilados pelas quinases Src e ainda pelas PKCs (Krauss, Gerhard 2003). A ligação da 14-3-3 à Raf auxilia na manutenção da estabilidade de dímeros da Raf e na sua localização subcelular (Krauss, Gerhard 2003). A fosforilação da 14-3-3 pela PKC e a ativação da via das MAPKs é um importante elo entre as vias das PKCs e das MAPKs.

1.4. PKCs na proliferação das CTE

O conhecimento da modulação da proliferação das CTE é importante para sua utilização na terapia celular. Idealmente devemos manter as CTE com fatores que induzam a proliferação e auto-renovação das mesmas para depois diferenciar estas células em tipos celulares específicos.

Utilizando-se peptídeos moduladores específicos para determinadas isoenzimas das PKCs, Braun e Mochly-Rosen (2003) demonstraram que as isoenzimas das PKCs podem ter diferentes atividades no processo de proliferação dependendo do estímulo. Inibindo-se seletivamente a translocação da PKC δ observou-se um aumento na proliferação basal em culturas primárias de fibroblastos cardíacos neonatais. Porém a ativação desta mesma isoenzima não teve efeito na proliferação dos fibroblastos induzida por *Transforming growth factor beta* (TGF β). Em contraste um inibidor específico da PKC ζ foi capaz de inibir tanto a proliferação basal quanto a proliferação induzida por TGF β (Braun e Mochly-Rosen, 2003).

De fato, diversos estudos demonstram a participação das PKCs na proliferação das CTE murinas mediante a adição de diferentes ativadores gerais das PKCs, análogos do DAG, como: o 1,2-dioctanoil glicerol (DOG) e o forbol 12-O-tetra-decanoil forbol 13-acetato (TPA) e de fatores que ativam a via das c e nPKCs como, por exemplo: a insulina, o EGF, o soro, os ésteres de forbol (Ueda, Hirai *et al.*, 1996), ATP (Heo, Lee *et al.*, 2007), a glicose, a angiotensina II, Ca²⁺ (Heo, Lee *et al.*, 2007) e a epinefrina (Ueda, Hirai *et al.*, 1996). Desta forma, o papel das PKCs na proliferação de CTE está claro, entretanto, ainda não se elucidou quais das isoenzimas específicas das PKCs estão envolvidas

na proliferação das CTE perante estes e outros estímulos ou mesmo em condições basais. Em contraste, o inibidor geral das PKCs, o bisindolylmaleimide II (Bis II), diminuiu significativamente o número de CTE murinas (Quinlan, Faherty *et al.*, 2003).

Alguns estudos confirmam que as PKCs participam do processo de proliferação e auto-renovação mediante a ativação da ERK1/2 (via MAPKs). De fato, o éster de forbol, ativador das cPKCs e nPKCs, também ativa as ERK1/2, indicando uma relação próxima entre as vias da MAPK e das PKCs (Heo, Lee *et al.*, 2007). Porém, até o presente momento não foi estabelecido quais as isoenzimas específicas das PKCs participam dos processos de diferenciação e auto-renovação das CTE e como se dá a ativação da via das MAPKs.

Desta forma investigaremos quais as diferentes isoenzimas das PKCs que levam à proliferação das CTE e a sua possível interação e modo de ativação da via das MAPKs por essas isoenzimas.

1.5. O antagonismo funcional da PKC δ

A função da PKC δ pode variar bastante de acordo com o tipo celular em que está sendo expressa, os estímulos que levam à sua ativação, bem como a sua localização subcelular (Jackson e Foster, 2004). A PKC δ pode ter um efeito tanto pró quanto anti-apoptótico e ainda um efeito tanto pró quanto anti-proliferativo. Em algumas linhagens celulares a PKC δ inibe a progressão do ciclo celular o que pode ser compensado pela ativação da via das Src que leva à degradação da PKC δ (Zang, Lu *et al.*, 1997). A clivagem da PKC δ por caspases em um fragmento contendo apenas o domínio catalítico tem sido

associada com a promoção de apoptose em alguns tipos celulares (Emoto, Manome *et al.*, 1995).

Em linhagens de câncer de mama a PKC δ mostrou-se ter tanto um efeito pró quanto anti-apoptótico. O silenciamento da PKC δ na linhagem MDA-MB-231 levou a apoptose via a ativação da MEK1/2, visto que, sua inibição seletiva suprimiu a indução da apoptose induzida pela ausência da PKC δ . Porém a supressão da MEK1/2 não foi capaz de induzir a sobrevivência de outras linhagens celulares (MCF-7 ou MDA-MB-468). Na linhagem MDA-MB-231 a PKC δ induz a degradação da fosfatase MKP3 (fosfatase responsável por desfosforilar e inativar a ERK1/2), mantendo desta forma a ERK 1/2 ativa por mais tempo. A ativação persistente das ERK1/2 pode frequentemente levar à apoptose. A supressão da PKC δ levou a um aumento da atividade da ERK1/2, devido a um aumento na *Map kinase phosphatase-3* (MKP3), o que foi compensado pela depleção das MEK1/2 (Lonne, Masoumi *et al.*, 2009).

Foi demonstrado que o efeito apoptótico de etoposídeo (*etoposide*) em células de glioma é mediado pela PKC δ , sua ativação leva à ativação persistente da ERK1/2 e sua translocação para o núcleo. Desta forma, o silenciamento da PKC δ por RNAi demonstrou uma inibição da fosforilação da ERK 1/2. A inibição seletiva da MEK1 levou à diminuição do efeito apoptótico do etoposídeo, em contraste aos inibidores da p-38 e *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), os quais não tiveram este efeito. O etoposídeo atua por meio da ativação da PKC δ inibindo a fosfatase *MAP kinase phosphatase 1* [MKP1] (responsável por desfosforilar e inativar a ERK1/2 nesta linhagem) resultando na fosforilação persistente da ERK 1/2 direcionando essa célula para a apoptose (Lomonaco, Kahana *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos sugerem que a PKC δ pode induzir a proliferação. Em algumas linhagens de câncer e células transformadas a ativação da PKC δ induzida pelo *Insulin Growth Factor-1* (IGF-1) causou um aumento na proliferação celular (Li, Jiang *et al.*, 1998).

Outro estudo investigou o efeito do ATP na proliferação das CTE murinas, e a ativação de receptores de membrana plásmática do tipo P2X e P2Y pelo ATP, sugerindo que o ATP extracelular induziu a progressão do ciclo celular. O ATP induziu a proliferação das CTE murinas através da ativação das vias de sinalização dependentes da PKC, *Phosphoinositide kinase 3* (PI3K)/AKT e as ERK1/2. O ATP ativou as isoenzimas da PKC α , δ e ζ , porém o mecanismo de ação das PKCs ativadas pelo ATP ainda não foi elucidado (Heo, Lee *et al.*, 2007).

A atuação da PKC δ parece estar correlacionada com a atividade da via das ERK1/2. Interessantemente, a PKC δ ativa a via das MAPKs de diversas formas, estimulada por estrogênio ativa a proteína G, ativando Ras (Keshamouni, Mattingly *et al.*, 2002), a PKC δ pode ativar diretamente a Raf (Ueda, Hirai *et al.*, 1996); ou ainda quando estimulada pelo FGF ativar diretamente a MEK (Jackson, Schweppe *et al.*, 2001), essas diferentes formas de ativação podem gerar diferentes respostas (Jackson e Foster, 2004).

Assim como a PKC δ , conforme discutido anteriormente o nível de ativação da via das MAPKs parece ser importante para determinar se a CTE permanece ou não indiferenciada. Para que essa via atue de modos tão antagônicos num mesmo tipo celular é necessário existir um controle fino da sua via de ativação, e este balanço deve ser avaliado no contexto das CTE murinas e no contexto da ativação da PKC δ (Ebisuya, Kondoh *et al.*, 2005).

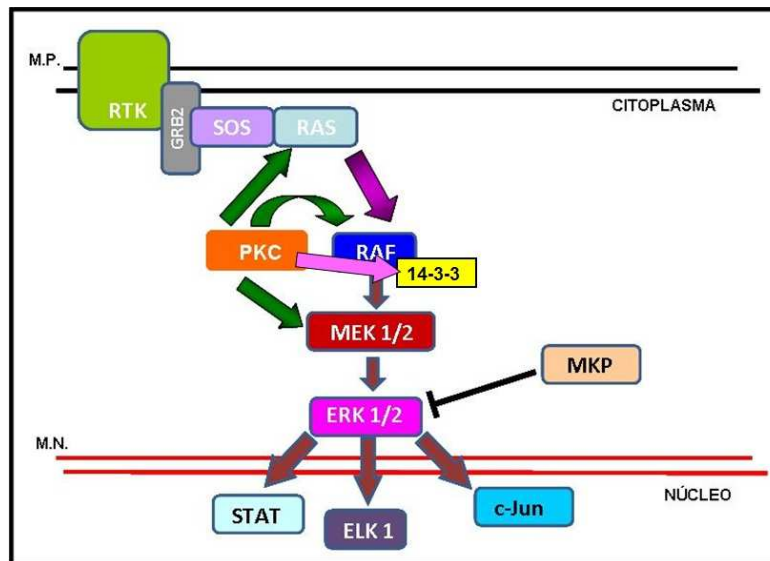


Figura 3: Vias de sinalização das MAPKs e das PKCs. Algumas siglas: RTK – Receptor de Tirosina Quinase; GRB2 - *Growth factor receptor-bound protein 2*; SOS – ativador de Ras; M.P. – membrana plasmática; M.N. – membrana nuclear. Outras siglas se encontram na lista de abreviaturas e siglas.

2. OBJETIVOS

Caracterizar quais as isoenzimas das PKCs poderiam estar envolvidas no processo de proliferação das CTE murinas indiferenciadas em condições basais (contendo LIF e soro fetal bovino), elucidando a via ou vias de sinalização ativadas por ela que levam à proliferação destas células.

Objetivos específicos

1. Utilizando moduladores específicos para as diferentes isoenzimas das PKCs caracterizar quais as isoenzimas das PKCs estão envolvidas na proliferação das CTE murinas indiferenciadas em condições basais de cultivo;
2. Identificar alvos diretos e indiretos da PKC δ utilizando abordagens de fosfoproteômica;
3. Caracterizar a cinética de ativação da via da ERK 1/2 induzida pela ativação da PKC δ .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Peptídeos Moduladores

Os peptídeos utilizados no presente trabalho foram uma doação da empresa KAI Pharmaceuticals®. Estes peptídeos são moduladores específicos das diferentes isoenzimas das PKCs acoplados a um peptídeo carreador Tat (C1, tabela 1), que corresponde à seqüência de resíduos de aminoácidos 47 a 57 (${}_{47}\text{YGRKKRRQRRR}_{57}$) da *Transactivator of transcription* (Tat) do HIV (Brasseur e Divita). Na tabela 1 temos uma relação dos peptídeos utilizados. O peptídeo carreador Tat ${}_{47-57}$ em todos os casos, com exceção do peptídeo inibidor das aPKCs, foi acoplado aos peptídeos das PKCs por uma ponte dissulfeto; de forma que duas cisteínas foram adicionadas uma ao C-terminal do peptídeo carreador e uma no N-terminal do peptídeo modulador (Chen, Hahn *et al.*, 2001). Além disso, o peptídeo inibidor da PKC δ foi uma doação da Profa. Dra. Daria Mochly-Rosen da Universidade de Stanford da Califórnia.

O inibidor do pseudo-substrato das aPKCs [(aminoácidos 113 a 125 das aPKCs) em fusão com o peptídeo Tat ${}_{47-57}$, contendo os aminoácidos GSG entre eles para uma maior flexibilidade do peptídeo (YGRKKRRQRRRGSGSIYRRGARRWRKLYRAN; Proteimax, SP, Brasil)], foi utilizado nos ensaios de incorporação de [${}^3\text{H}$] timidina.

Tabela 1: Peptídeos obtidos da KAI Pharmaceuticals. Os componentes de teste e o seu uso estão cobertos pelas patentes US 5,783,405, 6,165,977 e ou outras patentes dos USA ou internacionais pendentes.

Nº do produto	Código da KAI	Descrição	Peso Molecular (Da)
322796	KAD1-1	δ PKC Ativador	2684.21
321330	KAE1-1	ϵ PKC Ativador	2651.05
322799	KIE1-1	ϵ PKC Inibidor	2608.11
322967	KAC1-1	cPKC Ativador	2511.94
322968	KIC1-1	cPKC Inibidor	2853.27
322969	KIBI31-1	β IPKC Inibidor	2529.12
322970	KIBII31-1	β IIPKC Inibidor	2521.98
321328	C1	Carreador - Tat	1663

3.2. Cultivo das CTE

Foram utilizadas Células da linhagem de CTE murina E14TG2a, cedidas pelo Dr. Joshua Brickman (Center of Development in Stem Cell Biology, Institute for Stem Cell Research, School of Biological Sciences - University of Edinburgh). Estas células foram mantidas indiferenciadas (Morrison e Brickman, 2006) em meio Glasgow Modificado por Eagle (GMEM – Sigma-Aldrich), com 10^3 U/mL de LIF (ESGRO-LIF; Gibco), 15% v/v de soro fetal bovino (FBS, Hy-clone, Logan, UT, USA), 0.1 mM β -mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (NEAA), 50U/mL penicilina, e 50 μ g/mL streptomina, 2 mM L-glutamina (InvitrogenTM). O sub-cultivo das CTE foi feito a cada dois dias, ou quando as células atingissem 80-90% de confluência. As garrafas de cultura utilizadas para o cultivo das CTE foram previamente

gelatinizadas com 0,01% - 0,2% m/v de gelatina e estocadas a 4°C. Essa linhagem celular tem a vantagem de se manter indiferenciada mesmo sendo cultivada na ausência de fibroblastos embrionários murinos inativados (células *feeder*).

3.3. Extração total de Proteínas

Para a obtenção dos extratos de proteínas totais, as células foram lisadas com o tampão de lise [7M Uréia; 2 M Tiouréia; 50 mM DTT; 2% CHAPS; 0,4% Triton X-100; 0,1% Bromofenol Blue; inibidores de proteases (Sigma-Aldrich # P8340) e fosfatases (Phosphostop Inhibitor cocktail tablets, Roche, # n°04906845001) diluídos 1:300 e adicionados imediatamente antes do uso do tampão.

Os lisados de proteínas totais foram estocados à temperatura de - 80°C e sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.4. Fracionamento Celular

O método de fracionamento por velocidade de sedimentação diferenciada foi utilizado para se separar a fração solúvel da fração membrana das células. As células foram lisadas com o tampão de homogeneização [20mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mM EDTA, 10mM EGTA, 0.25M sucrose, e inibidores de proteases e fosfatases diluídos 1:300 e adicionados imediatamente antes do uso do tampão, (coquetéis inibidor de proteases; Sigma-Aldrich # P8340), inibidores de fosfatases de serina e treonina; Sigma # P2850) e inibidor de

fosfatases de tirosina (Sigma-Aldrich # P5726)] e ultracentrifugadas a 100.000g por 40 min. A fração solúvel (sobrenadante) foi coletada e armazenada até o seu uso, o precipitado (pellet) foi solubilizado em tampão DE [20mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 12mM β -mercaptoetanol, 10% glicerol, 1% Triton-X100 e inibidores de proteases conforme descrito anteriormente, pH 7.5] por 30 min. a 4°C e ultracentrifugados conforme descrito acima. As amostras Triton-X100 solúveis (sobrenadantes) possuem a maior parte das PKCs translocadas e junto com as demais frações foram estocadas à temperatura de - 80°C e sua concentração protéica determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.5. Western Blot

Aproximadamente 50 μ g de proteína total das amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio de 11% - 12% v/v [SDS-PAGE]. Em seguida as proteínas do gel de SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitro-celulose, com o auxílio de um aparato de transferência (fonte para transferência Power PackTM HC – BioRad – 250V, 3.0A, 300W) de acordo com o método de Towbin (Towbin, Staehelin *et al.*, 1979). A membrana contendo as proteínas foi bloqueada com tampão de bloqueio TBS-T (5% m/v de leite desnatado em solução de Tris-HCl 20mM, Tween20 0.05% v/v, pH7.4) por 2 horas a temperatura ambiente ou alternativamente por 16 horas à 4°C. A membrana foi incubada com o anticorpo primário, após o bloqueio, por 1 hora a temperatura ambiente ou alternativamente por 16 horas à 4°C sob agitação constante. Foram utilizados anticorpos específicos contra as diversas isoenzimas das PKCs (Santa Cruz

Biotechnology) na diluição de 0,2µg/µL; anticorpos anti p-MEK e MEK total (Sigma-Aldrich # M5795) na diluição de 1:10000. Anti Oct 3/4 (Santa Cruz Biotechnology, [C-10]: sc-5279) na diluição de 0,2µg/µL; Anti Nanog (Santa Cruz Biotechnology CA-USA, [M-149]:sc-33760) na diluição de 0,2µg/µL; Anti-PCNA (Sigma-Aldrich, #P8825) na diluição 1:3000; Anti fosfo-pERK1/2 e anti ERK1/2 total (Cell Signaling Technology, Inc, #9106 fosfo-pERK1/2; #4696 ERK1/2) na diluição de 1:1000; Anti 14-3-3 (InvitrogenTM, #51-0700) na diluição de 0,5 µg. Ao término desta incubação a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T, as lavagens foram de 10 a 30 min. cada e feitas à temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas por 1 hora com anticorpo secundário específico conjugados à peroxidase diluídos 1:1000 (Amersham Biosciences, NJ-USA) seguindo as recomendações do fabricante. A membrana foi lavada conforme descrito acima e a revelação por imunoluminescência de acordo com instruções do fabricante (Enhancer Chemiluminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Para a análise quantitativa, as auto-radiografias foram escaneadas e quantificadas utilizando-se o software **Image J** (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). A significância estatística foi determinada utilizando-se o teste T (Microsoft, Excel).

As membranas tiveram os anticorpos retirados com o tampão de *Stripping* [2% v/v SDS, 100 nM de β-mercaptoetanol e 50 nM de Tris pH 6,8 em água miliQ]. Foi adicionado volume de tampão de *Stripping* suficiente para cobrir as membranas, que foram encubadas à 50 °C por 30 min com agitação constante. As membranas foram lavadas exaustivamente com TBST (TBST com 0,01% v/v Tween) até completa eliminação do β-mercaptoetanol, em

seguida a membrana foi bloqueada e incubada com outros anticorpos como descrito acima.

3.6. Ensaio de incorporação de [³H] Timidina

O ensaio de incorporação de [³H] timidina foi realizado em placas de 24 poços previamente gelatinizadas com 0,01% - 0,02% v/v de gelatina onde as células foram cultivadas com um número inicial de 5×10^3 células por poço. De três a quatro horas após o plaqueamento (tempo necessário para as células aderirem) as células foram tratadas com os peptídeos moduladores das PKCs, e tratadas novamente por mais 3 vezes em períodos de 12 horas. Na última aplicação do peptídeo (40 horas após o plaqueamento) foi adicionada [³H] timidina a $1 \mu\text{Ci/mL}$ ([methyl - ³H] Tymidine, 42Ci/mmol, TRK. 418, Amersham International - UK). O período para a incorporação de [³H] timidina escolhido foi de 12 horas, visto que em testes preliminares não havia uma diferença na incorporação de [³H] timidina durante 4, 12 ou 24 horas, desta forma, totalizando 72 horas de tratamento das células com os moduladores. A incorporação da [³H] timidina foi determinada pelo método de cintilação líquida. Após o período de tratamento das células, estas foram lavadas com PBS 1X e em seguida incubadas em uma solução de TCA 15% v/v por 5 min. Após duas lavagens de 5 min com etanol puro, adicionou-se 250 μl de solução NaOH 250mM em cada poço incubando-se as células nesta solução por 10 min. As células foram lisadas por raspagem e a suspensão obtida diluída com água (1:5). A leitura foi realizada em líquido de cintilação utilizando-se um Cintilador líquido Beckman Instruments LS Analyser. Cada condição testada foi realizada

em triplicatas. No mínimo três experimentos independentes foram realizados, e ainda foram testadas diferentes concentrações dos moduladores das PKCs entre 50 nM a 500 nM. A incorporação de [³H] timidina das células tratadas com os peptídeos moduladores foi determinada em relação à incorporação de [³H] timidina em condições controle de manutenção das CTE murinas (15% v/v de soro fetal bovino), após ter sido subtraído pela leitura do branco (líquido de cintilação sozinho).

3.7. Identificação de alvos diretos e indiretos da PKC δ por Gel bidimensional

3.7.1. Preparação de lisados para géis bidimensionais

As CTE, E14TG2a com 70-80% confluência foram tratadas com 50 nM ou 500 nM de cada peptídeo (Tat e ativador da PKC δ – KAD) e incubadas a 37°C por 15 min a 37°C. Após o tratamento das CTE, estas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS) à 4°C e adicionou-se tampão de homogeneização para eletroforese bidimensional [7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS, 5mM acetato de magnésio, 17 μ g/mL PMSF, e inibidores de fosfatases (Sigma-Aldrich; # P2850 e # P5726) diluídos 1:300]. A lise celular mecânica foi realizada através do uso de um rodo também a 4°C, o lisado foi passado pelo menos 50 vezes por uma seringa de 1mL a 4°C. A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e as amostras aliqüotadas e congeladas a -80°C. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes com cada tratamento.

3.7.2. Géis Bidimensionais

Para os géis bidimensionais utilizamos o sistema IPG4 (GE Healthcare Life Sciences). E fitas de 14 cm com pH variando de 4-7 para os géis de identificação de proteínas alvos e para a excisão das proteínas selecionadas. Foram usadas fitas de 7cm com pH variando de 4-7 para a validação das proteínas identificadas (PCNA e 14-3-3).

Lisados celulares de amostras tratadas conforme discutido acima foram inicialmente separados por seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão e em seguida por peso molecular em gel de SDS-PAGE 11% v/v. Os protocolos utilizados são considerados padrões seguindo as instruções do fabricante (GE Healthcare Life Sciences). Onde as amostras foram reduzidas e aciladas por tributílo fosfina e iodoacetamida antes da eletrofocalização, que consiste em 10 horas de rehidratação e quatro etapas de eletro separação (a primeira de 500volts/h; a segunda etapa de 800volts/h; a terceira etapa de 11300volts/h, por fim, a quarta etapa de 10000volts/h; tendo um total de 39600V/h acumulados). Ao final da eletrofocalização o *strip* de IEF foi equilibrado em duas etapas de 15 min cada. Na primeira, a fita foi imersa em solução Tampão de Equilíbrio SDS contendo DTT (100 mg em 10 ml). Enquanto que, na segunda etapa, a fita foi imersa na mesma solução contendo desta vez, Iodoacetamida (250 mg por 10 ml). Após o equilíbrio das fitas elas foram transferidas para a segunda dimensão de separação, o gel-eletroforese SDS-PAGE 11% (Shapiro, Viñuela *et al.*, 1967).

3.7.3. Detecção das proteínas

3.7.3.1. Coloração com corante fluorescente fosfo-específico

Para esta coloração os géis bidimensionais foram fixados [em solução de 50% v/v metanol e 10% v/v ácido acético] por pelo menos 16 horas, lavados 3 vezes com H₂O deionizada por 30 minutos e corados com o Pro-Q Diamond® (Invitrogen™) por 120 minutos. Em seguida, os géis foram lavados 3 vezes em uma solução contendo 5% m/v de acetato de sódio 50mM (ph 4) e 20% v/v acetonitrila por 30 minutos, e 2 vezes com H₂O deionizada por no mínimo 5 minutos cada. Os géis foram digitalizados no aparelho Typhoon 9400 (GE Healthcare Life Sciences) no comprimento de onda entre 550 a 600 nm. Os géis foram digitalizados e analisados conforme descrito abaixo e posteriormente corados com Coomassie Colloidal Blue, para a análise comparativa em relação às proteínas totais. Para a coloração posterior com Coomassie Coloidal Blue os géis foram mantidos em solução de 7,5% v/v ácido acético.

3.7.3.2. Coloração por Coomassie Blue Coloidal

Os géis foram fixados por 30 minutos em solução de 40% v/v metanol e 10% v/v ácido acético e corados com solução de Coomassie Blue G-250 por 12 horas. Em seguida lavados com H₂O deionizada repetidas vezes para remover o excesso de corante, e desidratados em solução de 5% v/v glicerol, 20% v/v metanol por no mínimo 30 minutos.

3.7.4. Análise dos géis

As imagens adquiridas foram analisadas utilizando o programa ImageMaster 2-D Platinum 5.0 (GE Healthcare Life Sciences), no qual

avaliamos o número total de *spots* (proteína detectada após a eletrofocalização), a similaridade entre os géis pareados e porcentagem de volume (valor correspondente à normalização da saliência pela área do *spot* e a representatividade do mesmo no gel como um todo) dos *spots* pareados.

Para determinar diferenças na expressão de fosfoproteína, foram consideradas as alterações de volume normalizado dos *spots* com 5% de significância no teste estatístico de ANOVA (analysis of variance), utilizando como controle do experimento as células tratadas com Tat, e como tratamento as células tratadas com o ativador da PKC δ . Além desses *spots* diferencialmente expressos a 5% com ANOVA, visamos também os *spots* exclusivos de cada tratamento. Ao invés de se utilizar o valor de volume bruto para essa análise estatística, optamos conforme recomendação do fabricante, o uso do volume em porcentagem, também chamado de normalizado, o qual implica na normalização do *spot*, pois para calcular a porcentagem de volume, considera-se o volume total de todos os *spots* no gel. Assim, minimizam-se possíveis variações decorrentes da quantidade de proteína aplicada e do procedimento de coloração. Pelo programa também foram estimados os pontos isoelétricos e as massas moleculares de cada *spot* identificado, levando em consideração o padrão de migração horizontal na focalização isoelétrica e por se tratar de um gradiente linear de pH 4 até 7 em 14 cm, e padrões de massa molecular (Broad Range - Molecular Weight Marker, Bio-Rad) estimamos uma correlação com a migração vertical em centímetros.

3.7.5. Retirada das Proteínas do gel e preparação para espectrometria de massa

Para a retirada dos *spots* de interesse as proteínas foram resolvidas em três géis com aproximadamente 500µg de proteínas cada, os géis foram corados com Coomassie Colloidal Blue e os fosfo-spots selecionados (conforme descrito acima) foram recortados do gel, reduzidos e alquilados com DTT e iodoacetamida e, posteriormente digeridos com tripsina (Sequential Grade Modified Porcine Trypsin - Promega) durante 12 horas à 37°C. A reação de digestão foi inativada com solução de 50% v/v acetonitrila e 5% v/v ácido fórmico. Os peptídeos gerados foram eluídos do gel com duas lavagens de 15 minutos de solução de 50% v/v acetonitrila e 1% v/v ácido fórmico a 45°C sob sonicação, e, posteriormente, duas lavagens de 15 minutos em solução de 50% v/v metanol e 1% v/v ácido fórmico, a 45°C sob sonicação. A solução contendo os peptídeos foi submetida à secagem em um concentrador à temperatura ambiente por 2-3 horas. Após a secagem das amostras os peptídeos foram ressuspensos em solução de 1% v/v ácido fórmico, e enviados para análise por espectrometria de massa Q-TOF Ultima® acoplado ao sistema nanoAcquity® (Waters). Esta etapa do procedimento foi realizada no setor de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron e também foi realizado no laboratório do Prof^o Dr. Carlos Labate utilizando um espectrometro de massa ESI-Q-TOF, na USP-ESALQ.

3.8. Validação de Alvos da PKC δ

As CTE, E14TG2a ao atingirem 70-80% confluência eram tratadas com cada peptídeo (Tat₄₇₋₅₇ ou ativador da PKC δ – KAD) e incubadas a 37°C por 15 minutos. As células foram lisadas, as proteínas foram quantificadas, eletrofocalizadas, rehidratadas e resolvidas em gel de SDS-Page 11% conforme a seção 3.7 (acima). Entretanto, para a validação dos alvos utilizamos fitas de 7cm e pH 4-7 para a hidratação e focalização isoelétrica das proteínas.

Após a eletrofocalização (primeira dimensão) as proteínas foram resolvidas em geis de SDS-Page 11% (segunda dimensão), transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com um anticorpo específico total anti-14-3-3, com o qual conseguimos identificar diversas isoformas da mesma e também o anti-PCNA, seguindo os processos de Western blot como descrito acima. As proteínas foram analisadas quanto os seus deslocamento para o pH mais baixo, sugerindo a fosforilação das respectivas proteínas mediante os diferentes tratamentos.

3.9. Microscopia Confocal de Fluorescência

As CTE foram cultivadas em lamínulas redondas de 13 mm até que atingissem 70-80% de confluência, as células foram lavadas com PBS e fixadas imediatamente com 4% PFA por 10 minutos a temperatura ambiente, lavadas novamente duas vezes com PBS e guardadas com água destilada a 4°C até serem marcadas. As células fixadas foram bloqueadas com PBS

contendo 1% v/v soro normal de cabra e 0.1% v/v Triton-X 100 (para permeabilizar as células) e incubadas em atmosfera úmida a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução bloqueadora foi aspirada e as células incubadas com os anticorpos primários diluídos na solução bloqueadora por pelo menos 2 horas a temperatura ambiente, incubações mais extensas foram feitas a 4°C. Os anticorpos primários usados para o ensaio foram anti-PKC δ (Santa Cruz Biotechnology CA-USA), com diluições de 0,2 μ g/ μ L; anti p-ERK 1/2 e ERK 1/2 total (Cell Signaling Technology – Inc) na diluição de 1:1000; anti Oct 3/ 4 (Santa Cruz Biotechnology CA-USA, [C-10]:sc-5279) na diluição de 0,2 μ g/ μ L. Os anticorpos primários foram aspirados e as células lavadas com três lavagens de cinco minutos cada com PBS-0.1% Triton-X 100. Os anticorpos secundários conjugados a fluorocromos s [ex.; vermelho de Texas e/ou isothiocyanato de fluoresceína (FITC) (Molecular Probes)], foram diluídos (1:300) na solução de bloqueio e incubados no escuro à temperatura ambiente por 1 hora foram então adicionados. As células foram lavadas conforme descrito acima. As lâminas e lamínulas foram montadas em meio aquoso (1:1 v/v de glicerol em PBS contendo DAPI [4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride] na concentração de 20 μ g/mL] e as lamínulas foram seladas com esmalte incolor. A marcação foi detectada por microscopia confocal de fluorescência Carl Zeiss e as análises das imagens foram feitas no software Zeiss LSM Image Browser.

3.10. Citometria de Fluxo

Para a análise por citometria de fluxo as células foram tripsinizadas para a obtenção de células isoladas, a tripsina foi inativada com meio contendo soro. As células foram sedimentadas a 1.300 rpm a 4°C e lavadas com PBS/ 1% BSA duas vezes, fixadas com PFA 4% por 10 minutos a temperatura ambiente (25°C), permeabilizadas com PBS / 1% BSA / 1% Triton-X 100, bloqueadas com PBS / 1% BSA / 1% soro normal de cabra, novamente lavadas com PBS / 1% BSA duas vezes e incubadas por duas horas a temperatura ambiente com os anticorpos primários específicos para marcadores de indiferenciação das CTE, como o Nanog, SSEA1 e Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology) nas concentrações descritas acima. Após a incubação com os anticorpos primários, as células foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários conjugados a fluorocromos Alexa488 ou Alexa555 (Invitrogen) diluídos 1:500 protegidos da luz, as células foram lavadas e ressuspensas em 500µL de solução de bloqueio e a marcação analisada por citometria de fluxo. As análises foram realizadas utilizando-se o software WinMDI 2.9.

3.11. Análise de dados

3.11.1. Análise dos dados de espectrometria de massas

O programa MASCOT MS/MS Ion Search (www.matrixscience.com) foi utilizado para blast das seqüências contra os bancos de dado SwissProt and NCBI nr. Buscas de MS-MS/MS foram conduzidas com tolerância de massa a 50 ppm, MS/MS de 0.2 Da. Foram fixadas modificações de carbamidometilação

de cisteínas (modificação fixada) e oxidação de metionina (modificação variável). De acordo com a análise de variabilidade do MASCOT apenas consideramos peptídeos identificados cuja significância fosse de $p < 0.05$. A análise das funções das proteínas identificadas foi feita utilizando-se a informação disponível no Uniprot (<http://www.uniprot.org>)

3.11.2. Previsão de sítios de fosforilação pela PKC

Previsões de sítios de fosforilação pelas diferentes isoenzimas das PKCs foram feitas usando Scansite (<http://scansite.mit.edu/>) utilizando baixa estringência. A verificação da fosforilação destes sítios foi feita utilizando-se o banco de dados do Phosphosite (<http://www.phosphosite.org/>), onde a maioria dos sítios reportados foram detectados por espectrometria de massas.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das isoenzimas das PKCs nas CTE murinas E14TG2a

Primeiramente avaliamos a expressão das diferentes isoenzimas das PKCs nas CTE indiferenciada. A figura 4 demonstra o padrão de expressão das diferentes isoenzimas das PKCs na linhagem de CTE usada no presente trabalho, E14TG2a. Por Western blot detectamos as isoenzimas α , β I, β II, δ , ϵ , e ζ/λ , expressas nestas células, sendo também visualizadas formas de peso molecular menores da PKC β I representando formas provavelmente cataliticamente ativas, além da holoenzima que também foram encontradas (Costa-Junior, Garavello *et al.*).

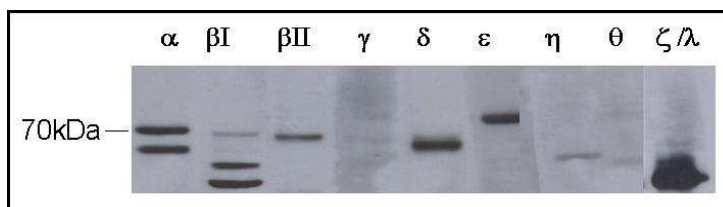


Figura 4: Expressão das diferentes isoenzimas das PKCs na linhagem E14Tg2A detectadas por Western blot: 50ug de lisado de CTE da linhagem E14Tg2A foram resolvidos em géis SDS-PAGE de 12% transferidos para membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpos específicos para as diferentes isoenzimas das PKCs.

Analizamos também se as condições de cultivo em que as células E14TG2a estavam sendo mantidas eram adequadas para a sua manutenção no estado indiferenciado. A análise de marcadores de indiferenciação foi feita por citometria de fluxo e imunofluorescência (Figura 5), sendo que ambos os métodos confirmaram a presença de marcadores de indiferenciação. Por imunofluorescência detectamos a expressão dos fatores de transcrição Nanog

e OCT 3/4 (ambos marcadores para CTE murinas indiferenciadas) presentes no núcleo da maioria das células (Figura 5B e C). Ainda a citometria de fluxo revelou que 85% das células estavam expressando o marcador de superfície SSEA1 (outro marcador para CTE murinas indiferenciadas), e que 94% das células estavam expressando o fator de transcrição OCT 3/4, e 91,4% expressavam o fator de transcrição NANOG.

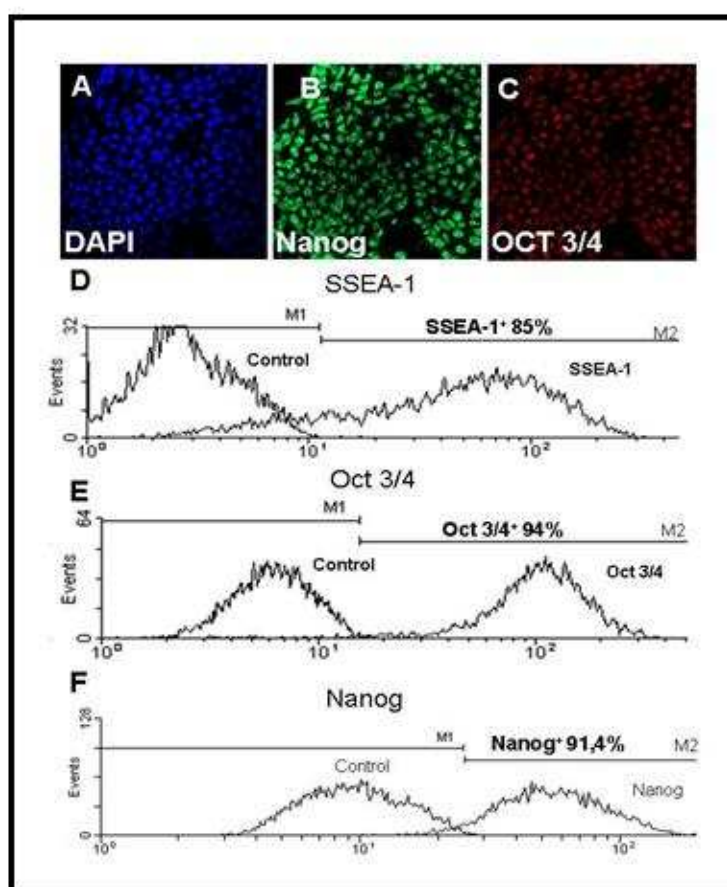


Figura 5: Expressão de marcadores de indiferenciação específicos de CTE na linhagem E14TG2A. (A) Marcação nuclear com DAPI; (B) Marcação por imunofluorescência de fatores de transcrição de CTE Nanog e (C) Oct-3/4. Histogramas de contagens celulares (número de eventos) versus intensidade de fluorescência de células marcadas com anticorpos para: (D) o marcador de superfície de CTE *Stage Specific Embryonic Antigen-1* (SSEA-1); (E) OCT 3/4 e (F) Nanog. Todas as padronizações foram feitas utilizando-se células marcadas apenas com o anticorpo secundário (controle). Foram realizados três experimentos independentes para cada condição.

4.2. Ensaio de Proliferação Celular por Incorporação de [³H] Timidina

As proteínas quinases C (PKC) atuam na proliferação, auto-renovação e diferenciação das células tronco embrionárias (CTE). Apesar de diversos estudos confirmarem a participação das PKCs nestes processos pela ativação da via das MAPK, ainda não se estabeleceu exatamente o papel desempenhado pelas diferentes isoenzimas das PKCs nesses processos. Para tanto, utilizamos tanto peptídeos inibidores quanto peptídeos ativadores das diferentes isoenzimas das PKCs identificadas na linhagem E14TG2a (Figura 4).

A proliferação celular foi determinada pelo método de incorporação de [³H] timidina. As células foram tratadas com moduladores específicos para as diferentes isoenzimas das PKCs (peptídeos ativadores ou inibidores das PKCs) por 72 horas (adicionando se peptídeos a cada 24 horas em diferentes concentrações). Comparamos a incorporação de [³H] timidina de células tratadas com os peptídeos moduladores com a incorporação das células na condição controle (células cultivadas com 15% soro fetal bovino na presença de LIF).

Nossos experimentos foram realizados nas condições em que aproximadamente 90% das CTE se mantêm indiferenciadas conforme demonstrado acima (Figura 5). Na presença de 2% de soro e LIF observamos uma diminuição na incorporação de [³H] timidina (Figuras 6 e 7) o que pode significar a ausência de fatores tróficos pela baixa quantidade de soro podendo levar a quiescência das células.

Inicialmente testamos peptídeos moduladores gerais para as isoenzimas contidas na subfamília das cPKCs (que abrange as isoenzimas

α , β I, β II e γ) verificando o efeito destes na incorporação de [3 H] timidina. Posteriormente testamos inibidores específicos da PKC β I; inibidor e ativador da PKC ϵ ; e o peptídeo inibidor das aPKCs ζ/λ [peptídeo pseudo-substrado das aPKCs] (Figura 6).

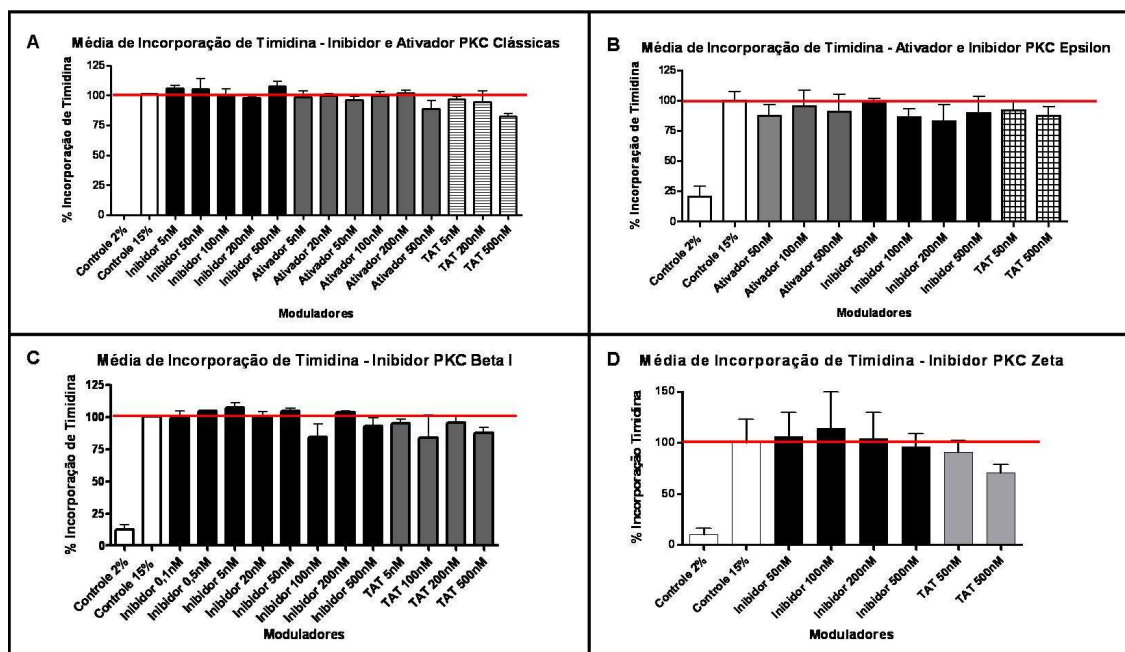


Figura 6: Efeito de diferentes concentrações dos moduladores das PKCs na proliferação de CTE E14TG2a determinada pelo ensaio de incorporação de [3 H] timidina. Células tronco embrionárias E14TG2a tratadas por 72 horas com os peptídeos moduladores das PKCs, adicionados a cada 24 horas seguido de um pulso de 1 μ Ci de metil [3 H] timidina nas últimas 12 horas do ensaio. A incorporação de [3 H] timidina foi determinada por cintilação líquida. Nos gráficos estão representadas as médias de três experimentos independentes e a normalização feita em relação às células controle (15% de soro). (A) Tratamento com ativador e inibidor das cPKCs (α , β I e β II); (B) Tratamento com ativador e inibidor da PKC ϵ ; (C) Tratamento com inibidor da PKC β I; (D) Tratamento com inibidor das aPKCs. Para a determinação da significância estatística foi utilizado ANOVA e como pós-teste o teste T, ambas as análises foram realizados utilizando-se o software GraphPad 4 (** $p < 0,01$).

Mediante a modulação da nPKC, a ativação da PKC δ foi a única isoenzima (nessas condições de cultivo) que levou a um aumento na incorporação de [3 H] timidina em diversas concentrações testadas, sendo que este aumento foi significativo ($p < 0,01$) na concentração de 50nM (Figura 6).

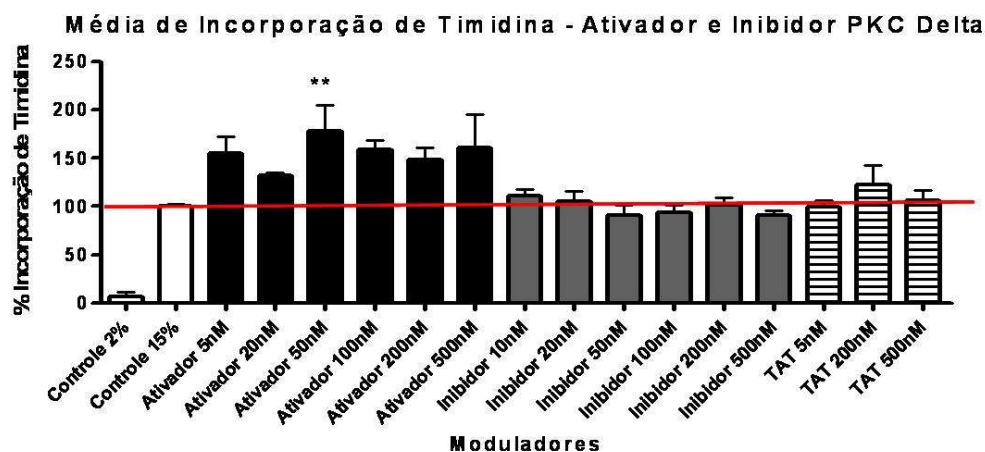


Figura 7: Efeito de diferentes concentrações dos moduladores da PKC δ na proliferação celular determinada por incorporação de [3 H] timidina. Células tronco embrionárias E14TG2a tratadas por 72 horas com peptídeo ativador ou inibidor da PKC δ , adicionados a cada 24 horas seguido de um pulso de 1 μ Ci de metil [3 H] timidina nas últimas 12 horas do ensaio. A incorporação de [3 H] timidina foi determinada por cintilação líquida. Nos gráficos estão representadas as médias de três experimentos independentes. Para a determinação da significância estatística foi utilizado ANOVA e como pós-teste o teste T, ambas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad 4 (** $p < 0,01$).

Não foi possível observar uma diminuição na proliferação celular mediante a adição do inibidor específico da PKC δ , possivelmente pelo fato de que para a manutenção destas células no seu estado indiferenciado elas são mantidas com 15% de soro, e essa condição já mantém constantemente a PKC δ ativada.

Além disso, os inibidores utilizados no nosso estudo impedem a translocação da PKC δ , o que no caso das CTE indiferenciadas uma porcentagem significativa desta isoenzima já se encontraria translocadas e ativas. A ativação com o análogo do DAG (PMA), contudo, induziu a translocação de quase toda PKC δ encontrada na fração solúvel da célula para a membrana (Figura 8). Desta forma, para observarmos um efeito inibidotório sobre a PKC δ outras metodologias como, por exemplo, RNAi deveriam ser testadas.

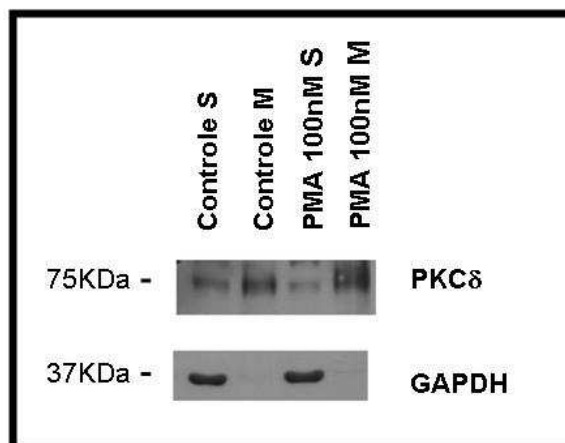


Figura 8: Ativação da PKC δ na CTE, E14TG2a mediante tratamento com 100 nM de PMA. Lisados celulares nas condições controle ou tratados com 100 nM de PMA por 15 minutos, foram fracionados em fração solúvel (S) e membranar (M), 50 μ g de proteína das frações citoplasmáticas e membranares foram resolvidas em gel SDS-PAGE 10%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelados com anticorpos específicos para a PKC δ . Figura representativa de uma média de três experimentos independentes.

Perante estes resultados este trabalho se concentrou na ativação da PKC δ com o objetivo de compreendermos melhor seu efeito na proliferação das CTE murinas indiferenciadas. Ainda, para identificar as vias mediadas pela ativação da PKC δ partimos para um estudo de fosfoproteômica, na tentativa de identificar possíveis alvos diretos e indiretos desta isoenzima que poderá nos auxiliar na elucidação da função desta isoenzima no processo de proliferação das CTE indiferenciadas.

4.3. Resultados do fosfoproteoma da PKC δ com 50nM do peptídeo ativador da PKC δ

As CTE, E14TG2a ao atingirem 70-80% confluência foram tratadas com 50nM de cada peptídeo (Tat₄₇₋₅₇ ou ativador da PKC δ – KAD) e incubadas a 37°C por 15 minutos. Após o tratamento das CTE os lisados foram obtidos conforme descrito em Materiais e Métodos. Foram realizados três experimentos

independentes com ambos os tratamentos (Tat₄₇₋₅₇ e Ativador da PKC δ). A IEF e a resolução das proteínas nos géis de SDS-Page dos três experimentos foram realizadas conjuntamente também para evitar discrepâncias que pudessem interferir nos resultados.

Após a coloração com o corante fosfoespecífico ProQ-Dimond® os mesmos géis 2D também foram corados com Coomassie Blue (corante para proteínas totais) para a análise desses géis e ainda para a visualização dos *spots* necessária para a retirada dos mesmos. Os *spots* selecionados, que apresentavam uma fosforilação de pelo menos 1.5 vezes maior que o controle na presença do ativador da PKC δ ou ainda *spots* cuja fosforilação foi significativamente maior na presença do ativador da PKC δ quando comparados ao controle foram seccionados, submetidos à digestão trípica e identificados por espectrometria de massa.

Uma média de 396 e 470 *spots* foram detectados nos géis em que as células foram tratadas com 50nM do peptídeo carreador TAT₄₇₋₅₇, quando coradas com ProQ Diamond® e Coomassie Coloidal, respectivamente. Nos géis em que as células foram tratadas com o ativador da PKC δ (50nM) o número de *spots* observados foi de 453 referentes a proteínas fosforiladas e 476 referente a proteínas totais.

Com o objetivo de determinar possíveis alvos da PKC δ selecionamos 29 *spots* cuja fosforilação aumentou pelo menos 1,5 vezes em relação ao controle (Tat₄₇₋₅₇) e/ou valor de $p < 0,05$ pelo teste estatístico de ANOVA [calculados pelo *software*, Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Sciences)] (Tabela 2).

Foram identificadas 34 proteínas dos 28 *spots* retirados, isso se deu pelo fato de que em alguns casos um único *spot* continha mais de uma proteína. Para a identificação das proteínas consideramos apenas aquelas com uma “pontuação” (*score*) superior a 70, e que apresentaram, no mínimo, quatro seqüências peptídicas alinhadas com a seqüência protéica, conforme sugerido pelo programa Mascot Daemon (Matrix Science USA) enumerados na figura 9 e tabela 2.

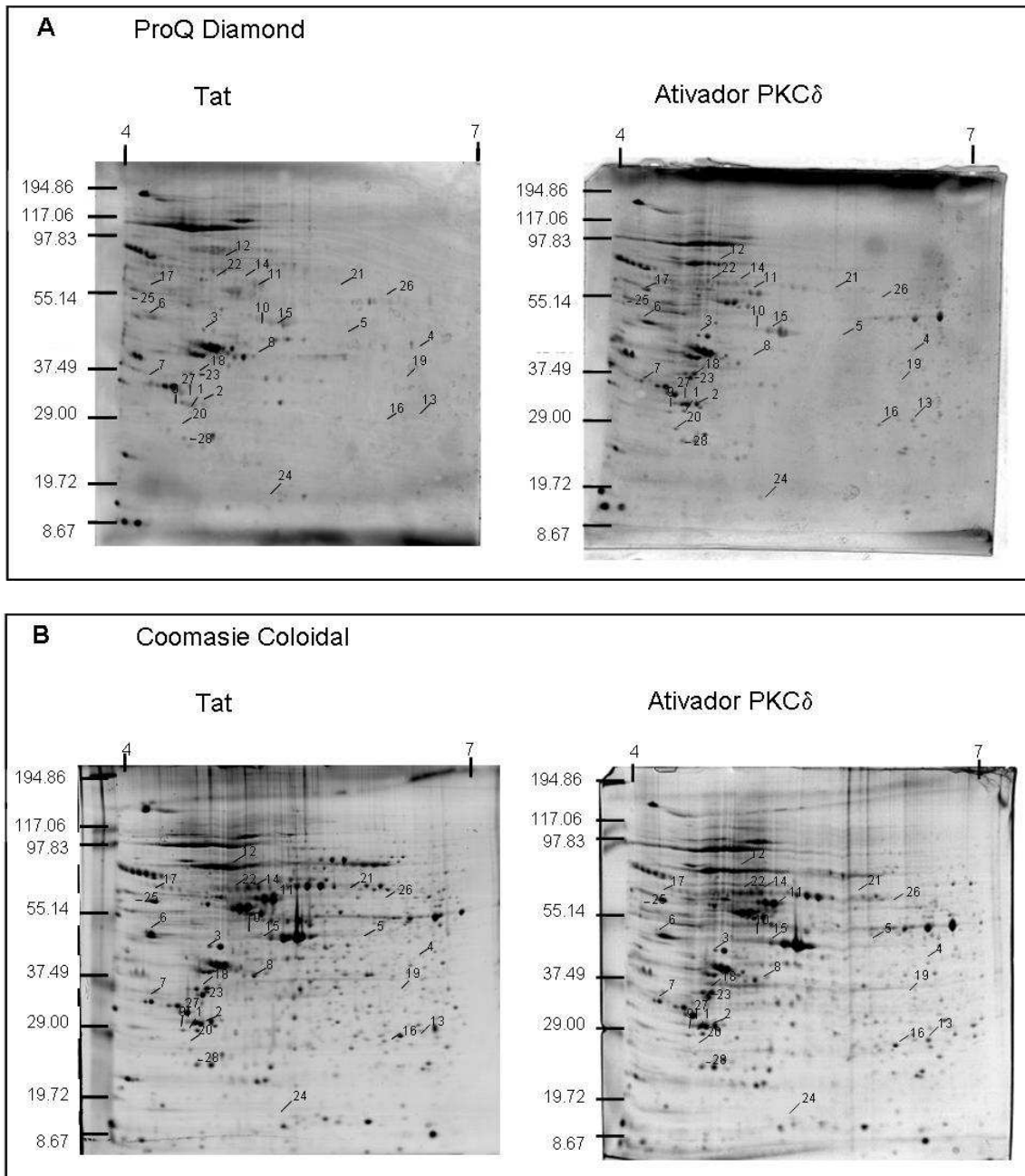


Figura 9: Localização das proteínas moduladas por 50n M do ativador da PKCδ identificadas por espectrometria de massa. Imagem dos géis 2D-PAGE das proteínas extraídas das CTE, E14TG2a, utilizando fitas IPG de 13 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7 não linear, resolvidas em gel SDS-PAGE 11%. (A) Spots fosforilados detectados pelo corante fosfo-específico Pro-Q Diamond® (Invitrogen™); (B) Spots totais detectados pela coloração com Coomassie Blue G250. Os spots selecionados foram seccionados, submetidos à digestão triptica e identificados por espectrometria de massa. Nas figuras acima, encontram-se assinalados a posição dos spots identificados com a mesma numeração da Tabela 2. Foram realizados três experimentos independentes para cada tratamento.

Tabela 2: Identificação das proteínas moduladas pelo tratamento mediante adição de 50nM do ativador da PKCδ

Spot	Proteína	Uniprot	Seq (%)	Pept.	Score	Teórico		Experimental		Vol (Norm.)			ANOVA	Localização	Função
						M.W. (KDa)	pI	M.W. (KDa)	pI	TAT ₄₇₋₅₇	KAD 50nM	Razão			
1	14-3-3 protein	1433B_MOUSE	27%	9	274	28,19	4,78	29,45	4,90	0,36	0,78	2,2	0,38	C e N	Proliferação celular
1	tyrosine 3-monooxygenase/gamma polypeptide	TY3H_MOUSE	48%	19	751	28,46	4,80	29,45	4,90	0,36	0,78	2,2	0,38	C	REDOX
3	Beta-actin-like protein 2	ACTBL_MOUSE	11%	4	94	42,32	5,30	60,94	4,91	0,58	0,93	1,6	0,16	C	Citoesqueleto
3	Actin, gamma-enteric smooth muscle	ACTH_MOUSE	27%	11	361	41,34	5,56	60,94	4,91	0,58	0,93	1,6	0,16	C	Citoesqueleto
4	Putative adenosylhomocysteinase 2	SAHH2_MOUSE	20%	8	303	48,17	6,08	56,51	6,76	0	0,56	5,1	0,02	C	Processos Metabólicos
4	TAR DNA binding protein	Q6VYI4_MOUSE	23%	11	414	44,92	6,26	56,51	6,76	0	0,56	5,1	0,02	N	Transcrição
4	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2_MOUSE	12%	3	102	30,93	7,68	56,51	6,76	0	0,56	5,1	0,02	N	Splicing
5	Anexina A7	ANXA7_MOUSE	34%	18	486	50,16	5,91	64,50	6,25	0,14	0,43	3,1	0,34	C	Proliferação celular
6	Calreticulin precursor (CRP56)	CALR_MOUSE	16%	7	84	48,14	4,33	64,51	4,29		4,1		0,01	C	Proliferação celular
7	clathrin, light polypeptide A isoform a	Q6PFA2_MOUSE	19%	6	190	23,68	4,43	55,23	5,34		1		0,007	C	Transporte de proteína
8	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	IF2A_MOUSE	33%	6	275	36,37	5,02	55,23	5,34		1		0,01	C e N	Tradução
10	Clathrin light polypeptide, Clta, mCG_16456	Q6PFA2_MOUSE	25%	7	203	34,37	6,56	63,69	5,34		1,86		0,02	C	Transporte de proteína
11	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH60_MOUSE	23%	7	599	61,07	5,91	79,24	5,56		0,45		0,03	C	Chaperona
11	10 kDa heat shock protein, mitochondrial	CH10_MOUSE	4%	7	74	57,07	10,24	79,24	5,56		0,45		0,03	C	Chaperona
11	Splicing factor 3a, subunit 3	SF3A3_MOUSE	20%	7	289	59,15	5,23	79,24	5,56		0,45		0,03	N	Splicing
12	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_MOUSE	26%	19	580	71,02	5,37	88,66	5,32	0,32	0,63	2,0	0,26	C	Chaperona
13	Heat-shock protein beta-1 (HspB1)	HSPB1_MOUSE	20%	5	242	23,06	6,12	27,53	6,22		3,78		0,03	C e N	Chaperona
14	kappa B motif binding phosphoprotein	NFKB2_MOUSE	45%	21	672	51,30	5,19	84,53	5,74	0,117	0,86	7,4	0,37	C e N	Proliferação celular
15	nuclear distribution gene C homolog	NUDC_MOUSE	31%	10	293	38,33	5,17	64,88	5,42	0,117	0,86	7,4	0,37	C e N	Proliferação celular
15	Beta actin/ Actin, cytoplasmic 1	ACTB_MOUSE	20%	6	137	39,45	5,78	64,88	5,42	0,117	0,86	7,4	0,37	C	Citoesqueleto
16	Peroxiredoxin-6 (Prdx6)	PRDX6_MOUSE	30%	6	186	24,97	5,71	26,70	6,22		3,41		0,01	C	REDOX
17	Plasminogen activator inhibitor 1 (Serpin1)	PAIRB_MOUSE	7%	3	138	44,80	8,60	64,51	4,29		4,1		0,01	C e N	Tradução
18	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	PCNA_MOUSE	66%	23	645	29,11	4,66	45,88	4,90	0,21	0,7	3,3	0,4	N	Proliferação celular
19	proteasome 26S subunit	PRS4_MOUSE	23%	9	202	33,21	5,94	49,69	6,66	0,21	0,7	3,3	0,42	C e N	Proteólise
20	Proteasome subunit alpha type-5	PSA5_MOUSE	46%	13	535	26,57	4,74	30,91	4,83	0,15	0	2,7	0,03	C e N	Proteólise
21	Protein disulfide isomerase A3 (Pdia3)	PDIA3_MOUSE	45%	28	1000	57,10	5,78	76,38	4,92	0,55	0,91	1,7	0,33	C	REDOX
23	40S ribosomal protein S3	RS3_MOUSE	14%	3	88	26,83	9,68	38,51	4,86		1		0,01	C	Tradução
23	similar: Tropomyosin alpha-3 chain (Tpm3)	TPM3_MOUSE	64%	32	1180	29,23	4,75	38,51	4,86		1		0,01	C	Citoesqueleto
24	Small ubiquitin-related modifier 2 (SUMO-2)	SUMO2_MOUSE	29%	3	72	10,92	5,32	9,34	5,26		0,26		0,02	N	Sumoylação
25	Hsc70-interacting protein	F10A1_MOUSE	26%	10	302	41,80	5,19	68,33	4,33		0,93		0,012	C	Chaperona
25	Y box binding protein	YBOX1_MOUSE	21%	4	117	35,82	9,98	68,33	4,33		0,93		0,012	C e N	Transcrição
26	T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta)	TCPB_MOUSE	16%	9	76	57,78	5,97	68,33	4,33		3,32		0,01	C e N	Chaperona
28	Translationally-controlled tumor protein (TCTP1)	TCTP_MOUSE	41%	14	346	19,56	4,76	27,21	4,83		0,42		0,03	C	Proliferação celular

C – Citoplasma e N- Núcleo; Em **CINZA** ressaltamos as proteínas que foram descritas participantes de processos de proliferação celular. Proteínas marcadas em **NEGRITO** foram identificadas em ambos os fosfoproteomas (50 e 500nM) discutidos abaixo.

A tabela 2 representa a lista das proteínas identificadas, os valores da razão compreendem a divisão entre os valores normalizados do ativador da PKC δ em relação ao peptídeo carreador Tat₄₇₋₅₇. A normalização dos *spots* é freqüentemente utilizada como ferramenta quantitativa na análise do proteoma, foram consideradas as alterações de volume normalizado dos *spots* com 5% de significância no teste estatístico de ANOVA, sendo feita a partir do módulo do valor do *spot* subtraído pela tendência central, o qual foi dividido pela dispersão [todos os cálculos e normalizações foram feitos pelo Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções do manual do programa]. Ainda encontramos algumas proteínas exclusivamente expressas após o tratamento com o ativador da PKC δ .

Das proteínas identificadas como sendo moduladas pela PKC δ , 53% destas se localizam no citoplasma da célula, 18% são exclusivamente nucleares e 29% atuam tanto no citoplasma como no núcleo (Figura 10). Destaque para a maior parte das proteínas identificadas no citoplasma.

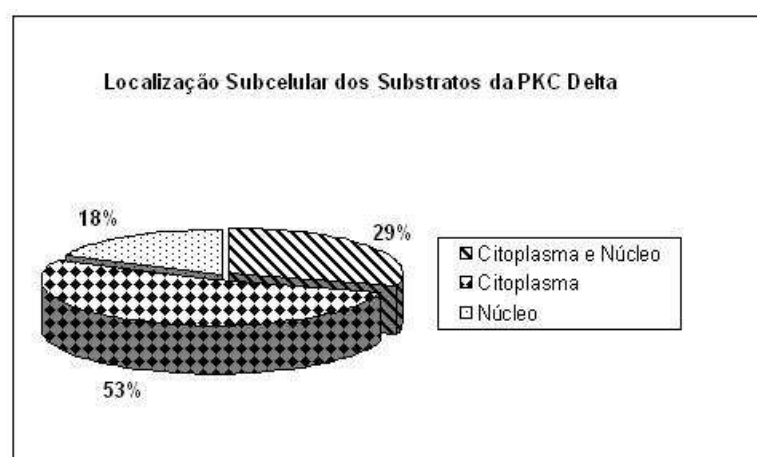


Figura 10: Representação gráfica da localização subcelular dos substratos diretos ou indiretos da PKC δ . Cálculo realizado a partir dos dados da tabela 2.

Com relação à função dos possíveis substratos da PKC δ destacaram-se proteínas envolvidas na proliferação celular (18%); síntese de proteínas (21%); resposta ao stress (chaperonas e processos de oxido-redução – 25%); estrutura celular (citoesqueleto – 15%); transporte de proteínas e proteólise [21%] (Figura 11).

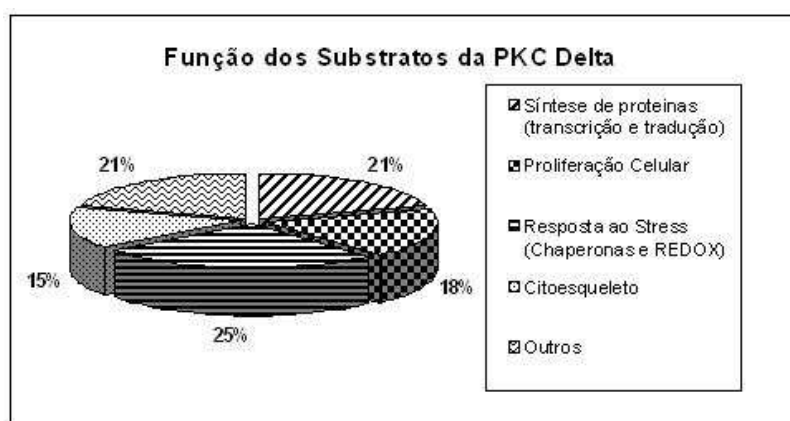


Figura 11: Representação gráfica da função dos substratos diretos ou indiretos da PKC δ . Cálculo realizado a partir dos dados da tabela 2.

Dentre os alvos da PKC δ identificados destacamos as proteínas: 14-3-3, Anexina-7, proteína NudC (Distribuição Nuclear homóloga gene C), Fator Nuclear kappa beta (NF κ β), *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), *Translationally controlled tumor protein 1* (TCTP-1), envolvidas com a proliferação celular corroborando com os resultados obtidos com os ensaios de incorporação de [3 H] timidina (Figura 7).

A fosforilação da proteína 14-3-3, mediante a ativação da PKC δ aumentou aproximadamente 2,7 vezes em relação ao controle (TAT₄₇₋₅₇). Para validarmos que a ativação da PKC δ causa um aumento na fosforilação da 14-3-3 realizamos experimentos de Western blot verificando um deslocamento (*shift*) da proteína no gel para o pH mais baixo, característica da inserção de

grupo fosfato na 14-3-3 em lisados de células tratadas com o peptídeo ativador da PKC δ (KAD-50nM) comparados ao lisado das células tratadas com 50nM do peptídeo da Tat₄₇₋₅₇ (Figura 12).

Foi possível observar o aumento da fosforilação da 14-3-3 após o tratamento com 50nM do peptídeo ativador da PKC δ em relação ao controle (Tat₄₇₋₅₇) pela análise quantitativa dos *spots* representada no gráfico (Figura 12B). Ainda pela técnica de Western blot, observamos aumento da fosforilação da 14-3-3 (Figura 12C) visto pelo deslocamento do *spot* para o pH mais ácido.

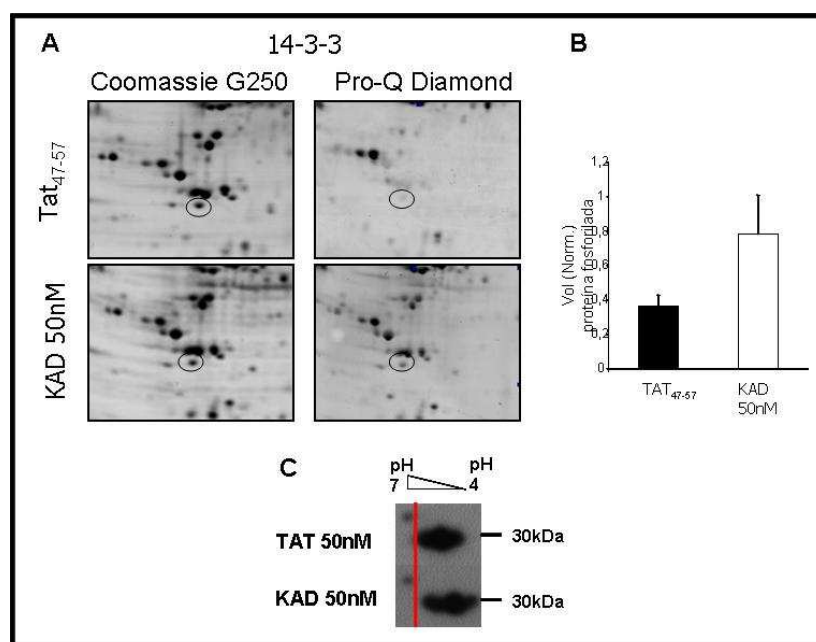


Figura 12: Aumento da fosforilação da 14-3-3 mediante a ativação da PKC δ (50nM). As células foram tratadas com 50nM do peptídeo TAT₄₇₋₅₇ e do ativador da PKC δ (KAD 50nM) por 15 min. Os géis 2D (11%) foram corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (A) ou transferidos para membranas de nitrocelulose e realizado o Western blot para 14-3-3 (C). As regiões selecionadas dos géis 2D que contêm os *Spots* diferencialmente fosforilados (circulado) foram identificados como 14-3-3 e estão indicados em ambos géis corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (A). Análise quantitativa da média normalizada de três experimentos independentes comparando a porcentagem do volume de proteína fosforilada entre as amostras tratadas com Tat₄₇₋₅₇ e o ativador da PKC δ (KAD), a análise do volume dos *spots* selecionados representando as proteínas fosforiladas e a normalização foi feita conforme descrita na seção de materiais e métodos (B). Western blot dos géis 2D para a proteína 14-3-3, a linha vermelha revela o deslocamento da proteína para o polo negativo e de pH menor após o tratamento com o ativador da PKC δ [KAD 50nM] em relação ao controle [Tat₄₇₋₅₇ 47-57] (C).

A anexina A7 é um membro da família das anexinas, esta proteína tem como característica de se ligar a outras proteínas e também contém um sítio de

ligação ao cálcio e fosfolipídios. A ativação da PKC δ levou ao aumento da fosforilação da anexina A7. Esta foi quantificada pela análise do volume do *spot* fosforilado comparando-se lisados de células tratadas na presença do ativador da PKC δ (KAD-50nM) e o controle 50nM - Tat₄₇₋₅₇ (Figura 13).

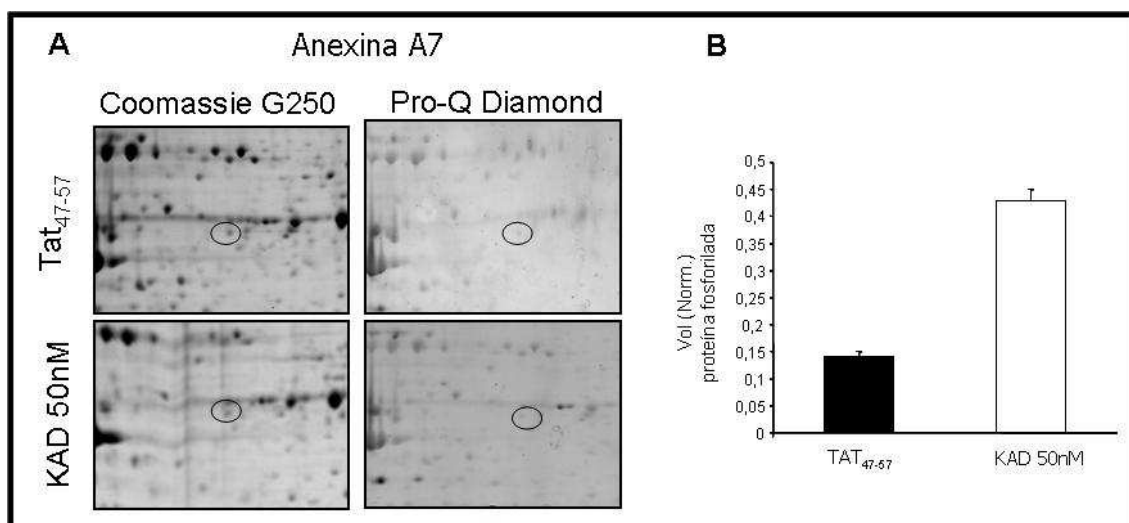


Figura 13: Aumento da fosforilação da Anexina A7 mediante a ativação da PKC δ (50nM). As células foram tratadas com 50nM do peptídeo TAT₄₇₋₅₇ e do ativador da PKC δ (KAD 50nM) por 15 min. Os géis 2D (11%) foram corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250. As regiões selecionadas dos géis 2D que contém os *Spots* diferencialmente fosforilados (circulado) foram identificados como Anexina A7 e estão indicados em ambos géis corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (A). Análise quantitativa da média normalizada dos três experimentos independentes comparando a porcentagem do volume de proteína fosforilada entre as amostras tratadas com Tat₄₇₋₅₇ e o ativador da PKC δ (KAD), a análise do volume dos *spots* selecionados representando as proteínas fosforiladas e a normalização feita conforme descrita na seção de materiais e métodos (B).

Nossos dados também demonstram que a NudC (*Nuclear distribution protein C homolog*) teve um aumento de fosforilação após o tratamento com 50nM do ativador da PKC δ (Figura 14).

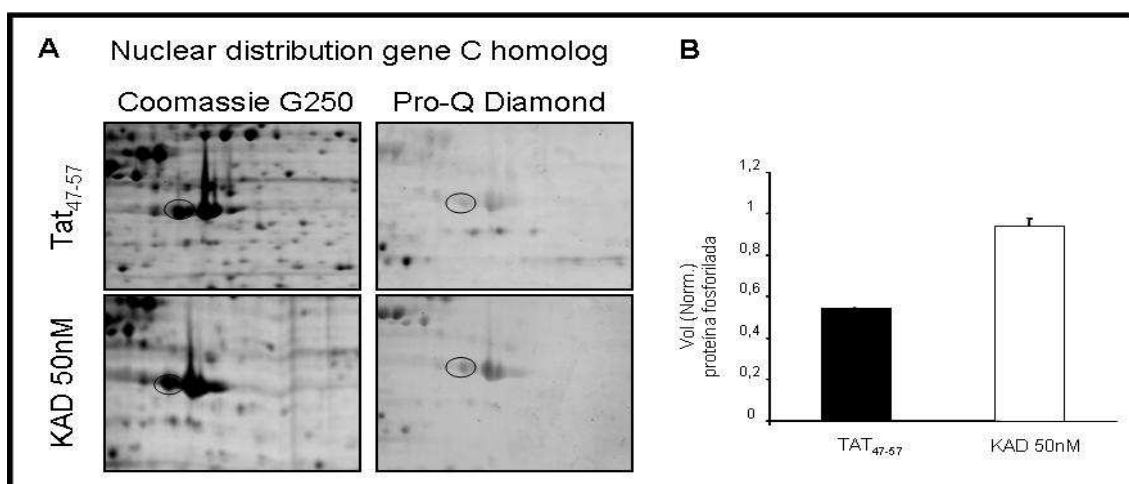


Figura 14: Aumento da fosforilação da NudC mediante a ativação da PKC δ (50nM). As células foram tratadas com 50nM do peptídeo TAT₄₇₋₅₇ e do ativador da PKC δ (KAD 50nM) por 15 min. Os géis 2D (11%) foram corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250. As regiões selecionadas dos géis 2D que contém os *Spots* diferencialmente fosforilados (circulado) foram identificados como NudC e estão indicados em ambos géis corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (**A**). Análise quantitativa da média normalizada dos três experimentos independentes comparando a porcentagem do volume de proteína fosforilada entre as amostras tratadas com Tat₄₇₋₅₇ e o ativador da PKC δ (KAD), a análise do volume dos *spots* selecionados representando as proteínas fosforiladas e a normalização feita conforme descrita na seção de materiais e métodos (**B**).

Como pode ser observada, na Figura 15 a ativação da PKC δ levou ao aumento de fosforilação do *Nuclear Factor kappa beta* (NF κ β).

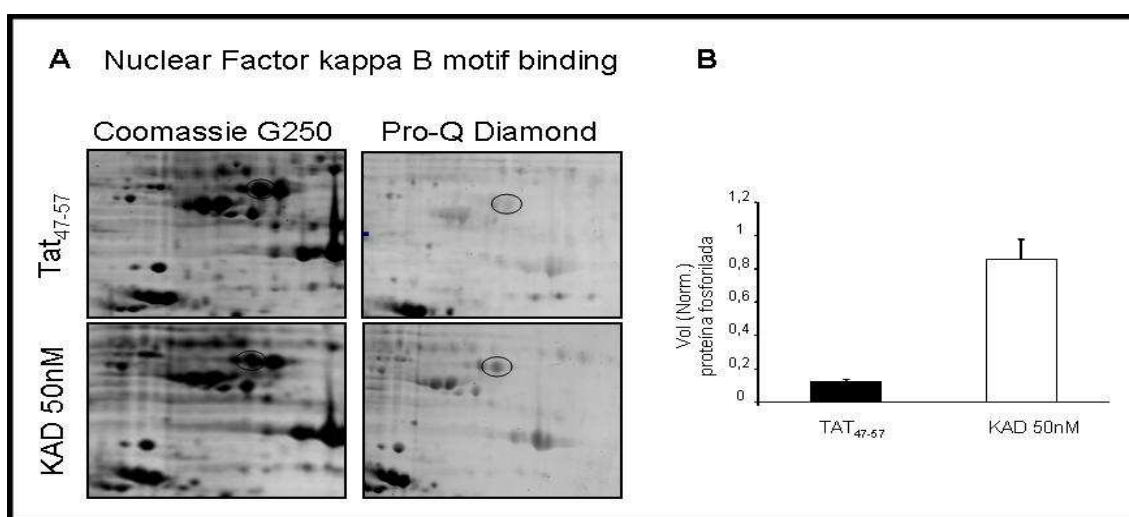


Figura 15: Aumento da fosforilação do fator NF κ β mediante a ativação da PKC δ (50nM). As células foram tratadas com 50nM do peptídeo TAT₄₇₋₅₇ e do ativador da PKC δ (KAD 50nM) por 15 min. Os géis 2D (11%) foram corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250. As regiões selecionadas dos géis 2D que contém os *Spots* diferencialmente fosforilados (circulado) foram identificados como NF κ β e estão indicados em ambos géis corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (**A**). Análise quantitativa da média normalizada dos três experimentos independentes comparando a porcentagem do volume de proteína fosforilada entre as amostras tratadas com Tat₄₇₋₅₇ e o ativador da PKC δ (KAD), a análise do volume dos *spots* selecionados representando as proteínas fosforiladas e a normalização feita conforme descrita na seção de materiais e métodos (**B**).

A fosforilação da proteína *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) mediante o tratamento com 50nM do ativador da PKC δ apresentou um aumento relativo de 3,3 vezes em relação às células tratadas com o peptídeo carreador controle Tat₄₇₋₅₇ 50nM (Figura 16A e B).

Além da quantificação do volume de fosforilação dos spots mediante os tratamentos com 50nM do ativador da PKC δ em relação ao controle (Tat₄₇₋₅₇) representados no gráfico (Figura 16B) validamos a fosforilação do PCNA pela técnica de Western blot, a qual permitiu identificar um aumento da fosforilação desta proteína (Figura 16C) visto pelo deslocamento (*shift*) do *spot* para o pH mais ácido.

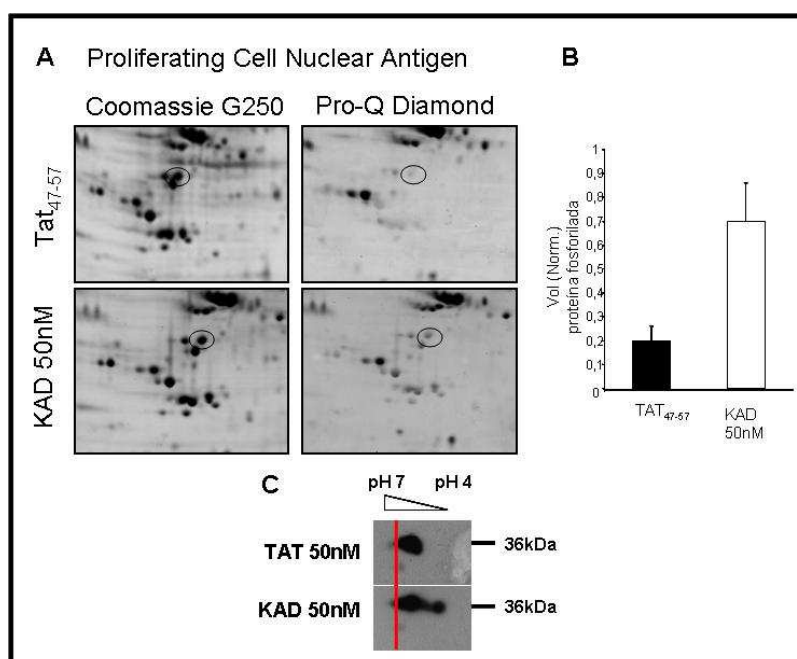


Figura 16: Aumento da fosforilação da PCNA mediante a ativação da PKC δ (50nM). As células foram tratadas com 50nM do peptídeo TAT₄₇₋₅₇ e do ativador da PKC δ (KAD 50nM) por 15 min. Os géis 2D (11%) foram corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (A) ou transferidos para membranas de nitrocelulose e realizado o Western blot para PCNA (C). As regiões selecionadas dos géis 2D que contém os Spots diferencialmente fosforilados (circulado) foram identificados como PCNA e estão indicados em ambos géis corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (A). Análise quantitativa da média normalizada dos três experimentos independentes comparando a porcentagem do volume de proteína fosforilada entre as amostras tratadas com Tat₄₇₋₅₇ e o ativador da PKC δ (KAD), a análise do volume dos spots selecionados representando as proteínas fosforiladas e a normalização feita conforme descrita na seção de materiais e métodos (B). Western blot dos géis 2D para a proteína PCNA, a linha vermelha revela o deslocamento da proteína para o polo negativo e de pH menor após o tratamento com o ativador da PKC δ (KAD 50nM) em relação ao controle (Tat₄₇₋₅₇) (C).

A *Translationally controlled tumor protein 1* (TCTP1) é uma proteína que é quase exclusivamente fosforilada nas CTE murinas indiferenciadas após o tratamento com 50nM do ativador da PKC δ (Figura 17), apresentando um aumento na porcentagem do volume de fosforilação de TCTP significativo (* $p < 0,03$).

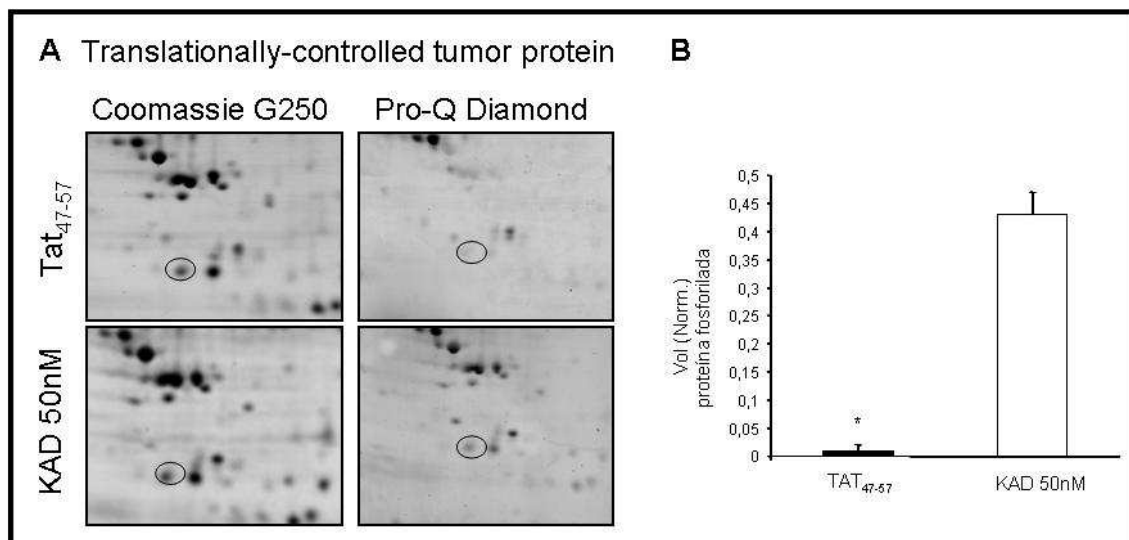


Figura 17: Aumento da fosforilação da TCTP1 mediante a ativação da PKC δ (50nM). As células foram tratadas com 50nM do peptídeo TAT₄₇₋₅₇ e do ativador da PKC δ (KAD 50nM) por 15 min. Os géis 2D (11%) foram corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250. As regiões selecionadas dos géis 2D que contém os *Spots* diferencialmente fosforilados (circulado) foram identificadas como TCTP1 e estão indicados em ambos géis corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (**A**). Análise quantitativa da média normalizada dos três experimentos independentes comparando a porcentagem do volume de proteína fosforilada entre as amostras tratadas com Tat₄₇₋₅₇ e o ativador da PKC δ (KAD), a análise do volume dos *spots* selecionados representando as proteínas fosforiladas e a normalização feita conforme descrita na seção de materiais e métodos (**B**). Significância estatística * $p < 0,03$.

Repetimos a mesma abordagem de fosfoproteômica, porém aumentamos a concentração do peptídeo ativador da PKC δ para 500nM, além disso selecionamos apenas os *spots* cuja diferença de fosforilação foi significativa em relação ao controle (lisado de células tratadas com Tat₄₇₋₅₇). Acreditamos que desta forma seríamos capazes de confirmar alguns substratos identificados e ainda obter outros alvos. Foram realizados três experimentos independentes para cada tratamento (Tat₄₇₋₅₇ - 500nM e ativador da PKC δ - 500nM).

4.4. Resultados do fosfoproteoma da PKC δ com 500nM do peptídeo ativador da PKC δ

Estes experimentos foram feitos em triplicatas e suas análises feitas conforme descrito anteriormente. Uma média de 408 e 503 *spots* foram detectados nos géis pelo tratamento das CTE E14TG2a tratadas com o peptídeo carreador - Tat₄₇₋₅₇ (500nM) e o ativador da PKC δ (KAD 500nM), quando coradas com ProQ Diamond® e Coomassie Coloidal, respectivamente (Figura 18).

Para a identificação de alvos da PKC δ selecionamos *spots* que apresentavam um aumento de pelo menos 1,5 vezes na fosforilação em relação ao controle (Tat₄₇₋₅₇) e valor de $p < 0,05$ pelo teste estatístico de ANOVA. Dos quais identificamos 16 proteínas dos 25 *spots* selecionados e retirados dos géis.

A tabela 3 representa a lista das proteínas identificadas, os valores da razão dos volumes normalizados do *spot* entre o peptídeo ativador da PKC δ (500nM) e o peptídeo carreador Tat₄₇₋₅₇ (500nM). Ainda, foi possível observar que algumas proteínas foram fosforiladas exclusivamente após o tratamento com o ativador da PKC δ (Tabela 3). Os valores de ANOVA foram calculados pelo *software*, Image Master 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare Life Sciences). Utilizando programa Mascot das proteínas identificadas por espectrometria de massa foram analisadas aquelas cujo *score* era superior a 100 e apresentaram, no mínimo, duas seqüências peptídicas alinhadas com a seqüência protéica.

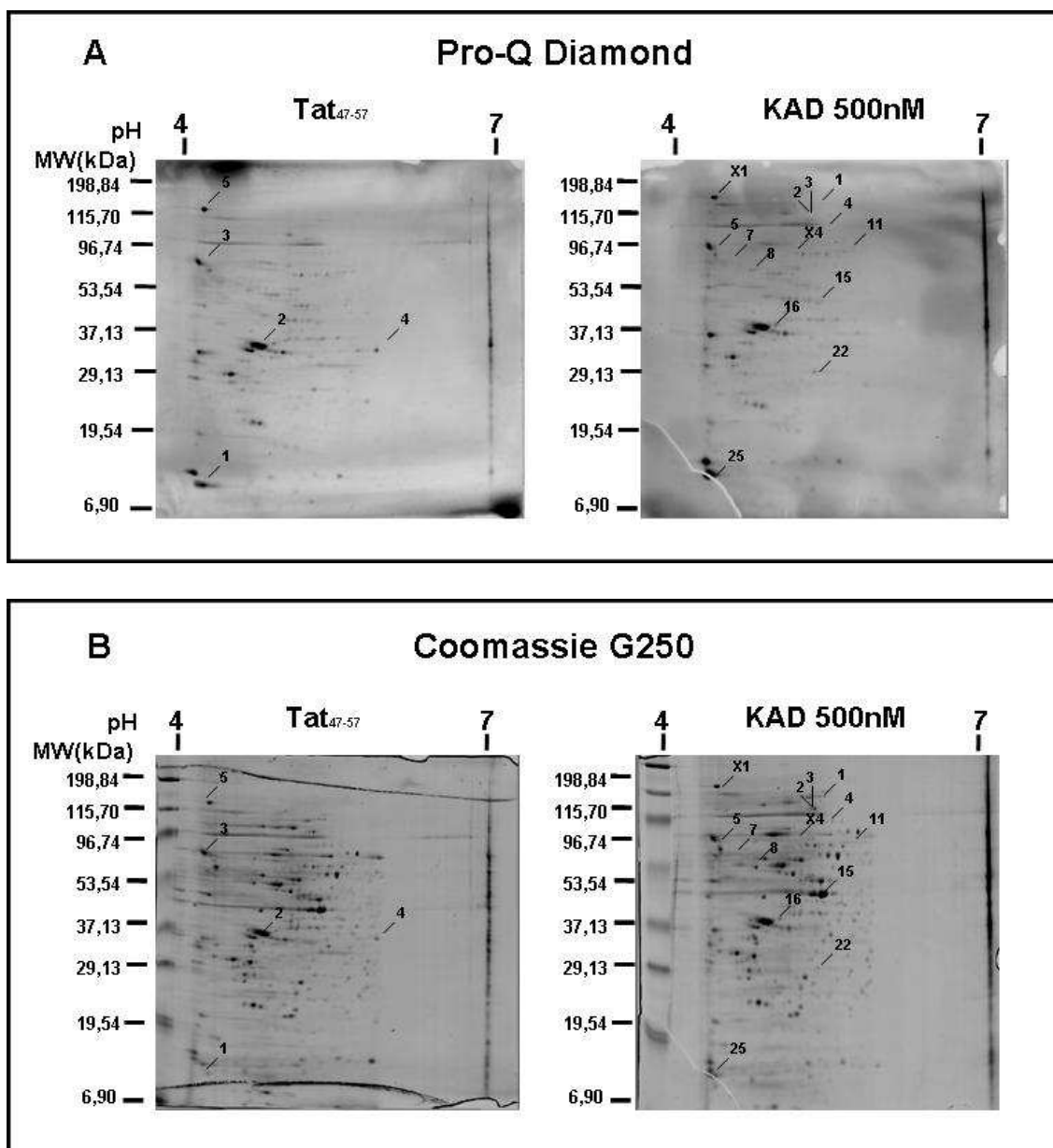


Figura 18: Localização das proteínas moduladas por 500nM do ativador da PKC δ identificadas por espectrometria de massa. Imagem dos géis 2D-PAGE das proteínas extraídas das CTE, E14TG2a, utilizando fitas IPG de 13 cm com gradiente de pH imobilizado de 4-7 não linear, resolvidas em gel SDS-PAGE 11%. (A) Spots fosforilados detectados pelo corante fosfo-específico Pro-Q Diamond® (Invitrogen™); (B) Spots totais detectados pela coloração com Coomassie Blue G250. Os spots selecionados foram seccionados, submetidos à digestão trípica e identificados por espectrometria de massa. Nas figuras acima, encontram-se assinalados a posição dos spots identificados com a mesma numeração da Tabela 3.

Tabela 3: Identificação das proteínas moduladas pelo tratamento com 500nM do ativador da PKC δ

Spot	Proteína	Uniprot	Seq (%)	Pept.	Score	Teórico		Experimental		Vol (Norm.)		Razão	ANOVA	Localização	Função
						M.W. (KDa)	pI	M.W. (KDa)	pI	TAT ₄₇₋₅₇	KAD				
X DELTA 01	Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	NASP_MOUSE	9	4	242	84,19	4,35	137,19	4,54	0,00	0,58	-	-	C e N	Proliferação Celular
X DELTA 04	heat shock protein 8	Q3TEK2_MOUSE	14	12	488	71,04	5,28	82,92	5,75	0,00	0,16	-	-	C	Chaperona
DE 01	Caprin-1	CAPR1_MOUSE	3	2	106	78,29	5,14	125,72	5,82	0,05	0,12	0,43	0,01	C	Proliferação Celular
DE 02	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_MOUSE	15	9	569	89,95	5,14	103,28	5,53	0,08	0,44	0,18	0,01	C e N	Transporte celular
DE 03	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	TERA_MOUSE	7	8	504	89,95	5,14	103,28	5,53	0,09	0,40	0,22	0,00	C e N	Transporte celular
DE TAT 04	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	DC112_MOUSE	8	4	190	68,75	5,16	90,85	5,59	0,02	0,12	0,22	0,03	C	Transporte celular
DE DELTA 04	14-3-3 protein beta/alpha	1433B_MOUSE	3	3	102	28,18	4,77	90,85	5,59	0,02	0,12	0,22	0,03	C	Proliferação/ Apoptose
	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSP7C_MOUSE	7	4	151	71,06	5,37	83,53	4,54	0,14	0,65	0,22	0,01	C	Chaperona
DE 05	78 kDa glucose-regulated protein	GRP78_MOUSE	6	3	124	72,49	5,37	83,53	4,54	0,14	0,65	0,22	0,01	C	Chaperona
DE 07	Tubulin beta-5 chain	TBB5_MOUSE	48	27	1468	50,10	4,78	72,60	5,29	0,14	0,56	0,25	0,03	C	Estrutural
DE 08	Protein disulfide-isomerase	PDIA1_MOUSE	14	6	230	57,51	4,79	67,68	4,95	0,12	0,37	0,33	0,02	C	Chaperona
DE 11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK_MOUSE	19	11	459	51,23	5,39	86,06	6,01	0,03	0,15	0,21	0,00	N	Splicing
DE 15	Actin, cytoplasmic 1 (Beta actin)	ACTB_MOUSE	37	23	1050	42,05	5,29	52,84	5,56	0,46	0,18	2,53	0,03	C	Estrutural
DE 16	Elongation factor 1-delta	EF1D_MOUSE	29	9	761	31,39	4,91	43,03	5,21	0,36	1,06	0,34	0,01	N	Biosíntese de proteína
DE 22	60S acidic ribosomal protein P2	RLA2_MOUSE	46	5	271	11,64	4,42	1,17	4,60	0,59	8,66	0,07	0,03	C	Síntese protéica
DE 25	40S ribosomal protein S25	RS25_MOUSE	16	4	202	13,79	10,12	1,17	4,60	0,59	8,66	0,07	0,03	C	Síntese protéica

C – Citoplasma e N- Núcleo; Em **CINZA** ressaltamos as proteínas que foram descritas participantes de processos de proliferação celular. Proteínas escritas em **NEGRITO** foram identificadas em ambos os fosfoproteomas (50 e 500nM);

X – proteína exclusiva de cada tratamento e **DE** PKC δ comparada com o controle (Tat₄₇₋₅₇);

Das proteínas identificadas como sendo moduladas pela ativação da PKC δ na concentração de 500nM, 61% destas se localizam exclusivamente no citoplasma da célula, 14% delas são exclusivamente nucleares e 25% se localizam tanto no citoplasma como no núcleo. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com o peptídeo ativador da PKC δ – 50nM discutidos acima. A figura 19 mostra a comparação entre a localização sub-celular dos alvos diretos ou indiretos da PKC δ identificados em ambos fosfoproteomas mediante adição de 50 e 500nM.

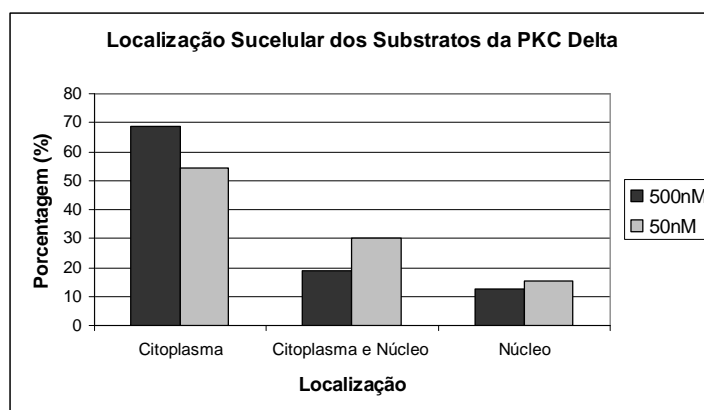


Figura 19: Representação gráfica da comparação entre as localizações subcelulares dos possíveis alvos da PKC δ mediante adição de 50nM ou 500nM de peptídeo. Média realizada a partir dos spots analisados das Tabelas 2 e 3.

Com relação à classificação funcional das proteínas alvos encontradas no fosfoproteoma da PKC δ - 500nM, 33% das proteínas estão envolvidas na transcrição e tradução; 11% com resposta ao stress (chaperonas e REDOX); 14% envolvidas com função de suporte/ sustentação e motilidade celular (relacionadas com o citoesqueleto); 11% relacionadas com transporte celular; 18% das proteínas envolvidas com proliferação celular e 6% delas envolvidas com os outros processos celulares (Tabela 3).

Na figura 20 está uma representação da comparação entre a função dos substratos encontrados em ambos fosfoproteomas (50 e 500nM).

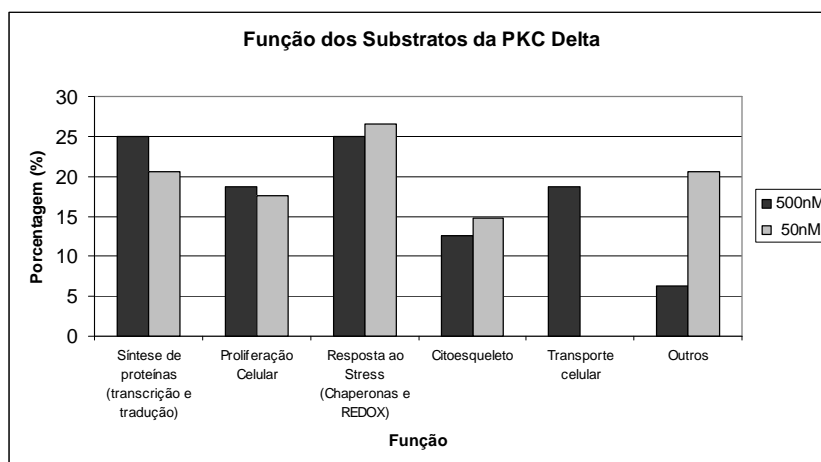


Figura 20: Representação gráfica da comparação entre as funções dos substratos diretos ou indiretos identificados pela ativação da PKC δ com 50nM ou 500nM de peptídeo. Média realizada a partir dos *spots* analisados das Tabelas 2 e 3.

Devido ao perfil semelhante de algumas proteínas identificadas nos distintos fosfoproteomas sugere uma maior confiabilidade a metodologia empregada neste trabalho e aos experimentos realizados, mesmo levando-se em consideração algumas limitações dessa técnica e mesmo considerando o fato de que apenas algumas proteínas foram encontradas em ambos os proteomas, porém ressaltamos que no proteoma com 500nM selecionamos apenas os *spots* cujo aumento na fosforilação após a ativação com o peptídeo ativador da PKC δ era significativamente maior em relação ao controle.

Algumas proteínas encontradas em ambos fosfoproteomas foram destacadas em **negrito** nas Tabelas 2 e 3, dentre elas a proteína 14-3-3, a Heat shock cognate 71 kDa protein (HSP7C) e Actina citoplasmática 1 (ou Beta-actina).

Proteínas do citoesqueleto e chaperonas (proteínas de choque térmico) são comumente encontradas em estudos de fosfoproteômica, desta forma

focamos nas proteínas diretamente relacionadas ou descritas estarem envolvidas com proliferação celular (conforme discutido acima), visto que temos outros dados como a incorporação de [³H] timidina que indicam a participação da PKC δ no processo de proliferação das CTE indiferenciadas. Interessantemente algumas proteínas de choque térmico como a Hspa8 também tem um papel na proliferação celular (Richardson, Alekseev *et al.*, 2006).

A Hspa8 (Heat shock protein 8) e a NASP (Nuclear autoantigenic sperm protein) foram exclusivamente fosforiladas após o tratamento com 500nM do ativador da PKC δ .

Abaixo descrevemos algumas proteínas identificadas no fosfoproteoma mediante a adição de 500nM de peptídeo da PKC δ , que estão relacionadas com proliferação celular, com exceção da 14-3-3 que já foi discutida acima.

A Hspa8 é uma chaperona envolvida no enovelamento de proteínas. Ela é um ligante de histona H1 necessária para o desenvolvimento normal e progressão do ciclo celular. A proteína NASP transporta a histona H1 para o interior do núcleo. Deficiência em NASP não permite que o DNA seja replicado e que o ciclo celular proceda normalmente. Esta proteína também desempenha papel fundamental na remodelação da cromatina durante o ciclo celular (Richardson, Alekseev *et al.*, 2006).

Perante a ativação da PKC δ com 500nM do peptídeo (KAD-500nM) observamos um aumento na fosforilação da proteína *Cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1* (Caprin-1) de pelo menos 2 vezes em relação ao controle Tat₄₇₋₅₇ (Figura 21).

A Caprin-1 é expressa constitutivamente e foi demonstrado que se co-localiza com a proteína *Ras-GAP SH3-domain binding protein-1* (G3BP-1) e em grânulos de citoplasma associados à microtúbulos. Em neurônios essa proteína está envolvida com o transporte e tradução de mRNA e de diversas proteínas de plasticidade sináptica (Solomon, Xu *et al.*, 2007). Entretanto em outras linhagens celulares está envolvida com proliferação celular ou migração (Krauss, Gerhard 2003).

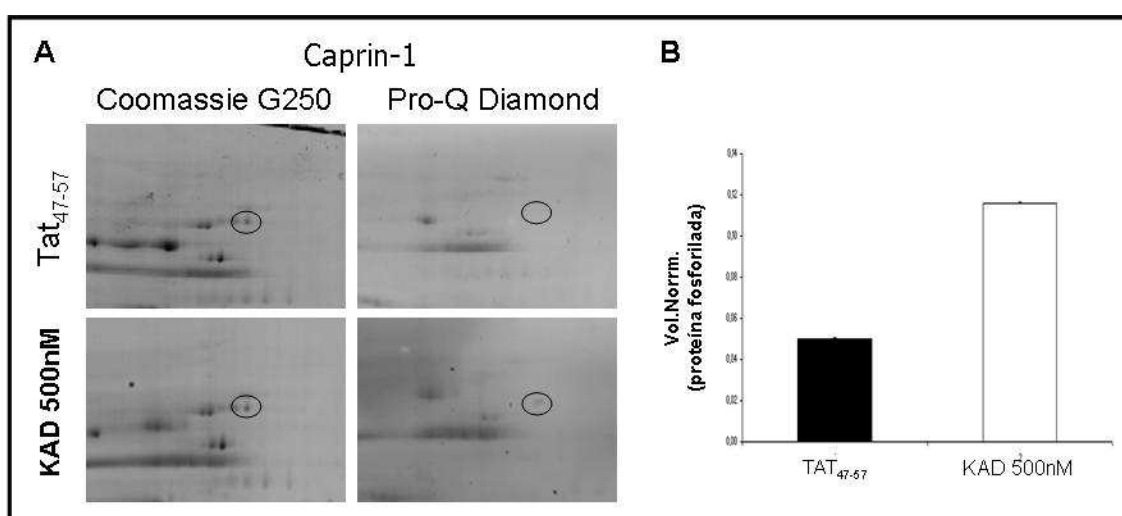


Figura 21: Aumento da fosforilação da Caprin-1 mediante a ativação da PKC δ (50nM). As células foram tratadas com 50nM do peptídeo TAT₄₇₋₅₇ e do ativador da PKC δ (KAD 50nM) por 15 min. Os géis 2D foram corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250. As regiões selecionadas dos géis 2D que contém os *Spots* diferencialmente fosforilados (circulado) foram identificados como Caprin-1 e estão indicados em ambos géis corados com Pro-Q Diamond® e Coomassie Blue G250 (A). Análise quantitativa da média normalizada dos três experimentos independentes comparando a porcentagem do volume de proteína fosforilada entre as amostras tratadas com Tat₄₇₋₅₇ e o ativador da PKC δ (KAD), a análise do volume dos *spots* selecionados representando as proteínas fosforiladas e a normalização feita conforme descrita na seção de materiais e métodos (B).

4.5. Localização sub-celular da PKC δ e possíveis alvos diretos da PKC δ envolvidos em proliferação celular

Caracterizamos por microscopia confocal a localização subcelular da PKC δ antes e após a sua ativação pelo peptídeo ativador KAD - 50nM (por 15 minutos a 37°C) nas CTE murinas indiferenciadas. Embora uma grande parte da PKC δ encontre-se ativa conforme vimos por Western blot (Figura 8), nas

células em condições normais de cultivo (controle) a PKC δ se localiza dispersa, e observamos a translocação da mesma em algumas células para a membrana após a sua ativação como peptídeo ativador da PKC δ . Desta forma, alvos diretos desta isoenzima seriam proteínas que se localizam no citoplasma e/ou membrana (Figura 22).

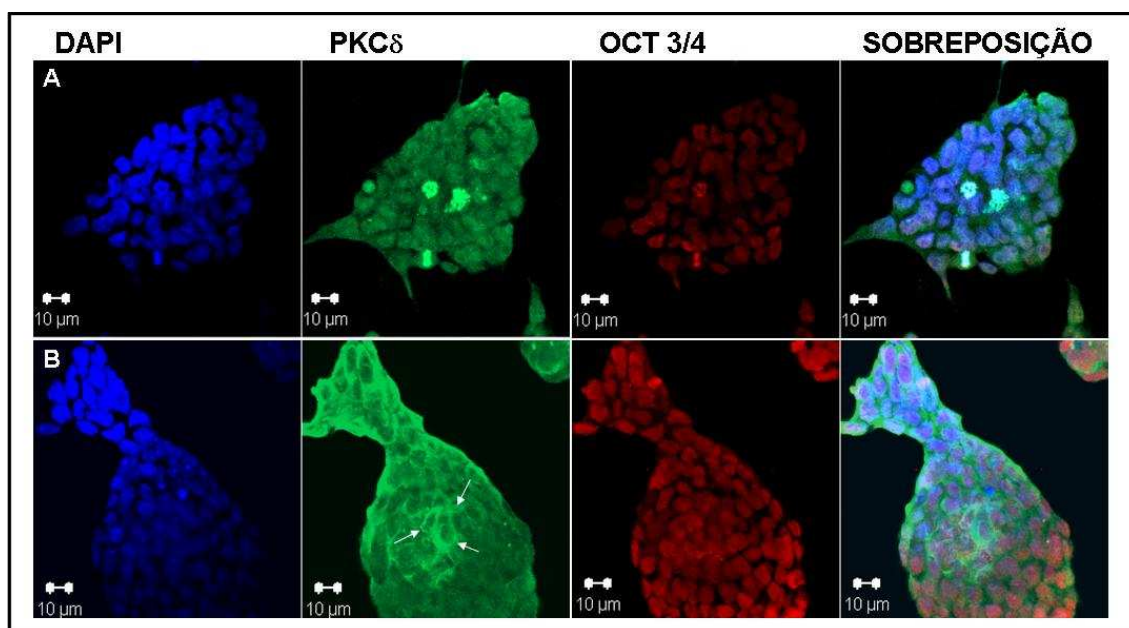


Figura 22: Localização sub-celular da PKC δ e do OCT3/4 com e sem adição do ativador da PKC δ na CTE, E14TG2a, determinada por microscopia confocal. Células fixadas com 4% de paraformaldeído, permeabilizadas e adicionados anticorpos específicos. Os núcleos foram marcados com DAPI em azul, a PKC δ está marcada em verde e o OCT3/4 (marcador de indiferenciação) está marcado em vermelho. **(A)** controle (condição normal de cultivo das CTE); **(B)** Ativador de PKC δ – células fixadas após 15 minutos da adição de 50 nM ativador. Setas brancas demonstram a concentração da PKC δ na membrana (junções das células).

Desta forma utilizando o programa MASCOT MS/MS Ion Search e o banco de dado Phosphosite onde verificamos se as proteínas citoplasmáticas, descritas na literatura como tendo um papel na proliferação celular, e cuja fosforilação aumentou na presença do peptídeo ativador da PKC δ , tem sítios putativos de fosforilação pela PKC δ (Tabela 4) e se estes sítios potencialmente fosforiláveis já foram identificados como alvos sendo de fato fosforilados.

Tabela 4: Sítios de fosforilação preditos das proteínas identificadas em ambos fosfoproteomas (50nM e 500nM) como alvos da PKC δ

Proteínas	Sítios de fosforilação preditos	Sequências	Isoenzimas das PKC preditas	Sítios Validados
p14-3-3	S60	VVGARRS SWRVISSI	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	Sim
	S177	LGLALNFSV FYYEIL	PKC ζ	
	S192	NSPEKACSLAKTAFD	PKC $\alpha/\delta/\alpha/\beta/\gamma$	
	T196	KACSLAKTAFDEAIA	PKCδ	Sim
Annexin A7	S25	PPAGQESSFPTAGQY	PKC α	
	S240	STYYDAWSLRKAMQG	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	S403	FAERLYYSMKGAGTD	PKCδ	
	T443	MYQKTLSTMIASDTS	PKC α	
Calreticulin	S44	WVESKHKSDFGKFVL	PKC ζ	
	T96	QTLVWQFTVKHEQNI	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	T173	DEFTHLYTLIVRPDN	PKC ζ	
	T325	LWQVKSGTIFDNFLI	PKC $\alpha/\delta/\zeta$	
NFKB2	S70	GGLPGASSEKGRKTY	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	T76	SSEKGRKTYPTVKIC	PKC α	
	T79	KGRKTYPTVKICNYE	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	S204	FLRASDGSFSLPLKP	PKCδ	
	S239	RMDKTAGSVRGGDEV	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	S318	RKRGGDVSDSKQFTY	PKC ζ	
	T345	KRRKALPTFSQPFGG	PKC $\alpha/\delta/\zeta$	
	S382	SLGFFSSSLAYNPYQ	PKC α	
	T806	GLRSLVDTYRKTPSP	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	S816	KTPSPSGSLLRSYKL	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
NudC	S34	ELVNTFFSFLRRKTD	PKC ζ	
	T40	FSFLRRKTDFFIGGE	PKCδ	
	T79	EKRARQETERREKAE	PKC $\alpha/\beta/\gamma/\zeta$	
	S136	EAQLKNGSLDSPGKQ	PKCδ	
	T178	PNYRWQTQLAELDLA	PKC α	
	S191	LAVPFRVSRFLKGD	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
TCTP1	S82	NHHLQETSFTKEAYK	PKC α	
NASP	S71	NAFQEAASLLGKKYG	PKC ζ	
	S94	AFFFYGKSLLELARM	PKC ζ	
	S163	AKKAEGKSLTKPETD	PKC δ/ζ	
	T206	EPTSKQLTESSEEA	PKC α	
	T287	RAAEKQGLMKVVEI	PKC $\delta/\zeta/\alpha/\beta/\gamma/\zeta$	
	T434	TKVAQKATEKAPEDK	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	S483	AEETPNESVLEKKS	PKC ζ	Sim
	S489	ESVLEKKSLOENEEE	PKC α	Sim
	S617	QMKEAEGSFTEYEKE	PKC α	
	T659	AELALKATLVESSTS	PKCδ	
	S664	AELALKATLVESSTS	PKCδ	
	T761	ESQTAEGTVESAATI	PKC α	
Caprin-1	S10	SATSHSGSGSKSSGP	PKCδ	Sim
	S113	FAKELQRSFMALSQD	PKC δ/ζ	Sim
	T124	LSQDIQTIKKTARR	PKC $\delta/\alpha/\beta/\gamma/\zeta$	
	T227	EKPVCGTTYKALKEI	PKC $\alpha/\beta/\gamma$	
	S374	PYNFIQDSMLDFENQ	PKC α/ζ	

Em **NEGRITO e sublinhado** destacamos a PKC δ e os peptídeos que foram preditos serem fosforilados por esta isoenzima.

Nomes completos das proteínas citadas na tabela: 14-3-3 (isoformas α , β , γ , σ , ζ), Annexin A7, Calreticulin precursor (CRP55), kappa B motif binding phosphoprotein (NFKB2), Nuclear Distribution gene C homolog (NudC), Translationally-Controlled Tumor Protein (TCTP1), Nuclear Autoantigenic Sperm Protein (NASP) e Cytoplasmic activation and proliferation-associated protein 1 (Caprin-1).

4.6. Caracterização da Ativação da ERK 1/2

Conforme discutido anteriormente algumas isoenzimas das PKCs podem ativar a via das MAPKs, direcionando particularmente para a ativação das ERK1/2, que estão intimamente envolvidas no processo de proliferação celular. Como no ensaio de incorporação de timidina demonstramos o envolvimento da PKC δ na proliferação celular, decidimos caracterizar a ativação da ERK 1/2 nas CTE indiferenciadas mediante a ativação da PKC δ .

Para tanto, realizamos ensaios de microscopia confocal e ensaios de Western blot descritos mais adiante. Utilizando um anticorpo que reconhece a ERK fosforilada/ ativa (p-ERK1/2) observamos que estas proteínas se encontram exclusivamente no núcleo das CTE indiferenciadas, as quais se encontram parcialmente ativadas pelos fatores de crescimento contidos no soro (Figura 23).

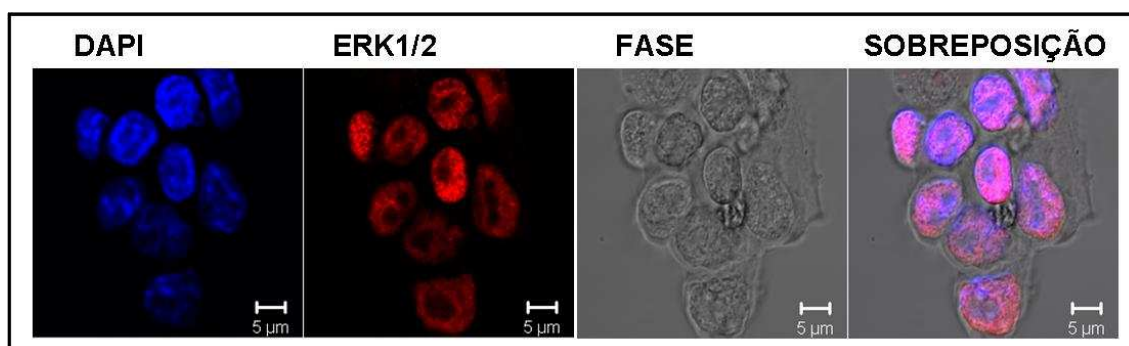


Figura 23: Localização sub-celular da p-ERK 1/2 em condições normais de cultivo da CTE (15% soro), E14TG2a, determinada por microscopia confocal. Células fixadas com 4% de paraformaldeído, permeabilizadas e reveladas com anticorpos específicos. Os núcleos foram marcados com DAPI em azul, a p-ERK 1/2 está marcada em vermelho. Barra indicativa do aumento.

Desta forma, decidimos investigar o perfil de ativação das ERK1/2 perante a ativação da PKC δ . Frequentemente as ERK 1/2 inativas se localizam no citoplasma das células, ancoradas a microtúbulos do citoesqueleto ou à

própria MEK (Rubinfeld, Hanoch *et al.*, 1999). Na figura 24A podemos observar o que as ERK 1/2 se localizam tanto no citoplasma como no núcleo nas CTE murinas indiferenciadas em condições basais de cultivo (15% v/v soro fetal bovino e LIF). Como foi observado na figura 23 A p-ERK1/2 (proteína ativa) se localiza exclusivamente no núcleo, podemos concluir que a ERK 1/2 presente no citoplasma representa a proteína inativa.

Caracterizamos, então, por imunofluorescência confocal a localização sub-celular das ERK1/2 mediante a ativação da PKC δ nas CTE murinas indiferenciadas, E14TG2a. Para tanto, as CTE foram tratadas com o ativador da PKC δ por 15 minutos a 37°C na concentração de 50nM. Uma vez ativada, geralmente, as ERK1/2 fosforiladas e ativas (p-ERK1/2) translocam para o núcleo da célula. Muitos fatores podem levar á ativação das ERK 1/2, dentre eles concentrações de cálcio intracelular (Chuderland e Seger, 2008) e fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino.

Testamos desta forma se a ativação da PKC δ ativava as ERK1/2 e aonde esta proteína ativa se localizava. Nossos dados indicam que a PKC δ está envolvida na ativação/ fosforilação das ERK 1/2 (Figura 24B), pois foi observada uma redução da ERK 1/2 inativa no citoplasma representando a translocação das ERK 1/2 para o núcleo mediante a sua ativação da PKC δ em relação ao controle sem tratamento.

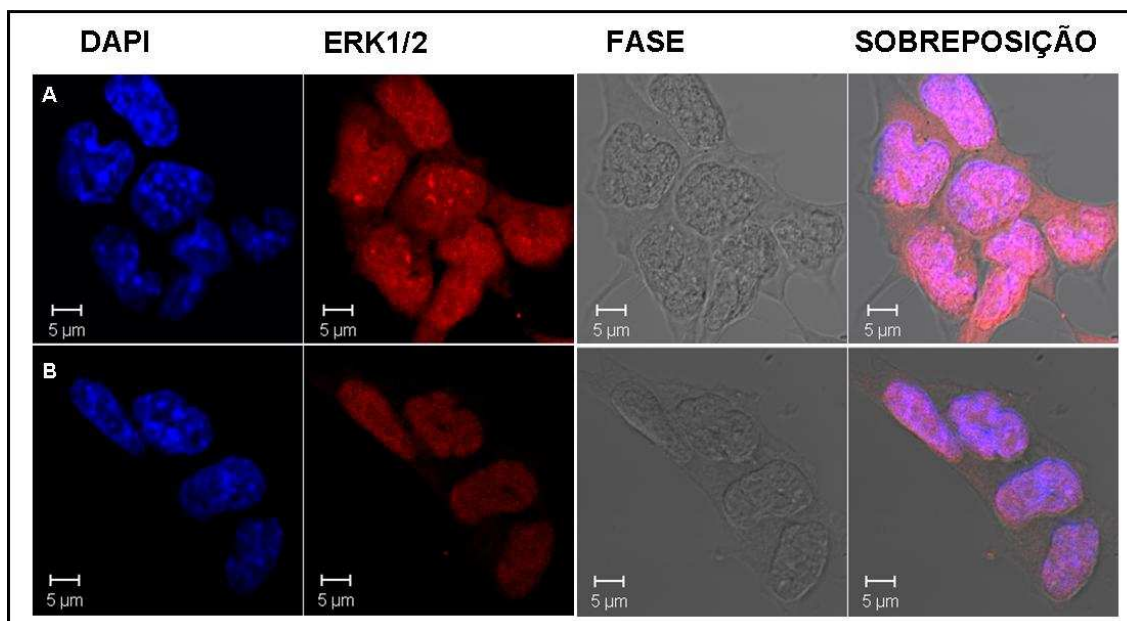


Figura 24: Localização sub-celular da ERK 1/2 com e sem ativação da PKC δ nas CTE, E14TG2a, determinada por microscopia confocal. Células fixadas com 4% de paraformaldeído, permeabilizadas e reveladas com anticorpos específicos. Os núcleos foram marcados com DAPI em azul, a ERK 1/2 está marcada em vermelho (A e B fotos tiradas com um aumento de 60X). **(A)** Foto na condição controle (de manutenção normal de cultivo 15% soro) das CTE, **(B)** Imagem após adição de 50nM do ativador da PKC δ .

4.7. Cinética de Ativação da via das MAPKs pela PKC δ em CTE murinas indiferenciadas

A duração, intensidade e compartimentalização da ativação das ERK 1/2 são fundamentais na determinação do destino da célula (proliferação, diferenciação, senescência ou morte). Como a ativação da PKC δ leva à proliferação das CTE murinas indiferenciadas investigamos qual seria a cinética da ativação das ERK1/2 induzida por essa isoenzima.

Para a obtenção de todos os lisados analisados foram utilizadas CTE E14TG2a com, aproximadamente, 80% de confluência. A atividade da ERK foi avaliada entre 15 minutos e 48 horas após a adição de 50nM do ativador da PKC δ . Passadas 24 horas da ativação da PKC δ , esta foi ativada novamente

para análise 48 horas após a ativação inicial, os outros tempos foram avaliados mediante a adição de uma dose única de peptídeos (KAD ou Tat₄₇₋₅₇).

Ainda, todos os experimentos tiveram a mesma membrana incubada, tanto com o anticorpo anti-ERK 1/2 total quanto com anti-p-ERK 1/2 (ERK ativada). Desta forma qualquer variação que pudesse haver de quantificação de proteína poderia ser corrigida durante a quantificação e normalização das bandas do Western blot pelo software **Image J**. A ativação das ERK1/ 2 (p44 e p42) foi determinada com anticorpos anti fosfo-ERK1/2, e a normalização feita pela ERK 1/2 total (Figura 25).

Em relação à ativação da ERK1 (p44) foi possível observar um aumento da fosforilação após a ativação da PKC δ nos tempos de 15min, 30 min e 1 hora; Em 1 hora de ativação observamos um aumento de 4X na ERK1 comparada ao nível basal da ERK1 em condições normais de soro. A ativação da ERK 1/2 até uma hora ainda é considerada inicial e não tardia de acordo com alguns trabalhos.

Em 3 e 6 horas após a ativação da PKC δ os níveis de ERK1 retornaram aos níveis basais permanecendo semelhantes ao controle (TAT₄₇₋₅₇). Porém, em 12 e 24 horas os níveis de fosforilação da ERK1 aumentaram discretamente, voltando a cair atingindo o nível basal em 48 horas após a ativação. Apesar de haver um leve aumento na fosforilação mais tardia das ERK 1/2, em 12 e 24 horas, podem não estar relacionadas com a ativação e resposta inicial modulada pela PKC δ .

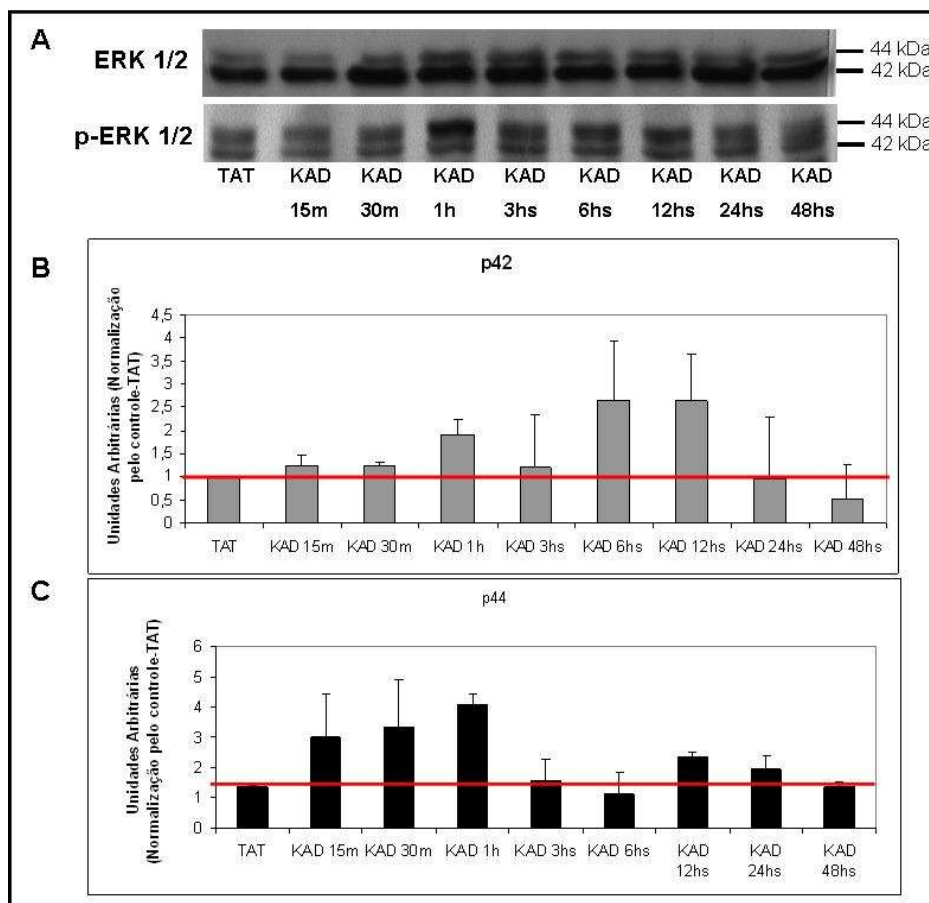


Figura 25: Cinética de Fosforilação da ERK1/2 induzida por adição do ativador da PKC δ (50nM) em diferentes tempos de incubação. (A) Gel representativo de 50 μ g de lisados resolvidos em gel de SDS-PAGE 12%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelados com anticorpo específico para a forma fosforilada da ERK1/2 (p-ERK 1/2) e não-fosforilada da ERK1/2. **(B)** Normalização realizada a partir da proteína total para a quantificação da expressão da forma fosforilada da ERK1 (p44). Média de três experimentos independentes; **(C)** Normalização realizada a partir da proteína total para a quantificação da expressão da forma fosforilada da ERK2 (p42). Média de dois experimentos independentes.

Em relação à fosforilação da ERK2 (p42) os tempos de 15min, 30min demonstraram um aumento muito pequeno de fosforilação. O nível de fosforilação da ERK2 aumentou um pouco com 1 hora de ativação, caindo bastante em 3 horas de tratamento; com 6 e 12 horas os níveis de fosforilação da ERK 2 atingiram os níveis mais altos; em 24 horas de tratamento a fosforilação atingiu o nível basal, caindo abaixo do nível basal após 48horas de ativação.

Novamente, esta ativação mais tardia da ERK2, a partir de 3 horas, não pode ser diretamente relacionado com a ativação da PKC δ , podendo ter outros fatores participando de sua ativação.

Portanto, os resultados da cinética de ativação das ERK 1/2 sugerem que as ERK1/2 apresentam uma ativação transiente, isto é, a duração da sua ativação não permanece por muito tempo, tanto para ERK1 evidenciando uma ativação inicial como para ERK2 evidenciando uma ativação mais tardia.

Avaliamos, ainda, a cinética de ativação da MEK, visto que esta proteína é responsável pela ativação das ERK1/ 2, mediada pela ativação da PKC δ (Figura 26), com anticorpo anti fosfo-MEK (p-MEK) que reconhece a MEK ativa.

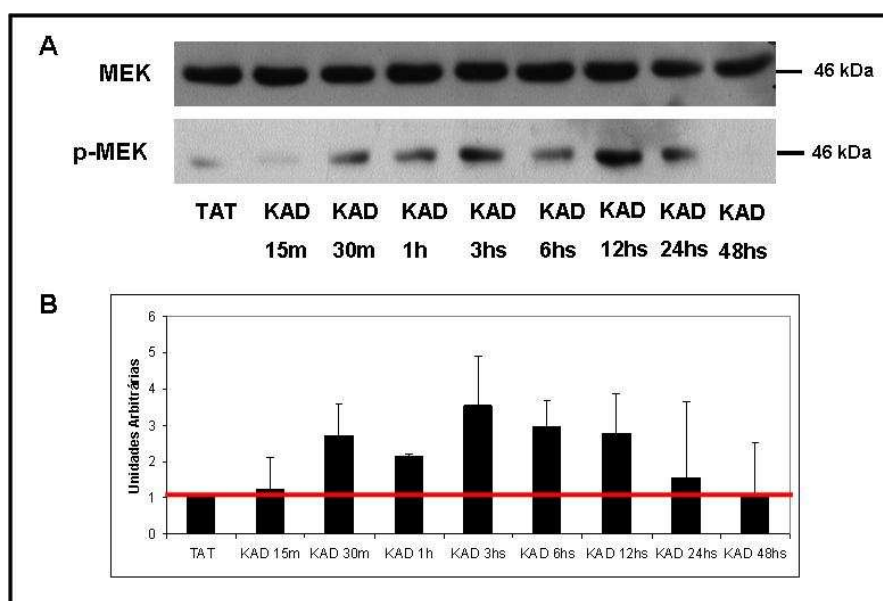


Figura 26: Cinética de Fosforilação da MEK induzida por adição do ativador da PKC δ (50nM) em diferentes tempos de incubação. (A) Figura de 50 μ g de lisado resolvidos em gel de SDS-PAGE 12%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelados com anticorpo específico para a forma fosforilada da MEK (p- MEK) e não-fosforilada da MEK; Géis representativos. **(B)** Normalização realizada a partir da proteína total para a quantificação da expressão da forma fosforilada da MEK Média de dois experimentos independentes.

Dados de dois experimentos independentes sugerem que a cinética de ativação da MEK difere da ERK1/2 sendo esta um pouco mais sustentada após a ativação da PKC δ . A ativação da MEK parece ser mantida até 12 horas após

a ativação da PKC δ , caindo aos níveis basais em 24 e 48 horas. Entretanto, mais experimentos seriam necessários para a confirmação do padrão de ativação da MEK pela PKC δ .

Para nos certificarmos de que a ativação da ERK 1/2 pela PKC δ estaria modulando apenas a proliferação celular e não alteraria a indiferenciação das CTE, tratamos a E14TG2a (em condições basais que as mantêm indiferenciadas - LIF e 15% de soro) com 50nM do peptídeo ativador da PKC δ em comparação com 50 nM de peptídeo TAT₄₇₋₅₇ por 6 dias, os peptídeos foram adicionados a cada 24 horas. Avaliamos a expressão do marcador de indiferenciação OCT3/4 ao longo da cinética de tratamento (Figura 27), quantidades iguais de proteína dos diferentes lisados de CTE foram recolhidos em diferentes tempos após o tratamento das células com os peptídeos.



Figura 27: Expressão da OCT 3/4 mediante diferentes dias de ativação da PKC δ ou da Tat₄₇₋₅₇ (controle) nas CTE E14TG2A. Figura de 50 μ g de lisado resolvidos em gel de SDS-PAGE 12%, transferidos para membrana de nitrocelulose e revelados com anticorpo específico para OCT 3/4.

Os resultados acima sugerem que a ativação das ERK 1/2 pela PKC δ não levou à diferenciação das CTE, pois a expressão de OCT 3/4 permaneceu inalterada todos os dias tanto em comparação com o Tat₄₇₋₅₇ quanto em comparação ao controle da E14TG2a (em condições basais de cultivo, soro 15% e LIF). Deste modo evidenciando que a participação da PKC δ na ativação da ERK está relacionada apenas com a proliferação das CTE.

Mediante a ativação da via das MAPKs ocorre a fosforilação das ERK1/2 pela MEK, com conseqüente dimerização e translocação das ERK1/2 para o

núcleo, no núcleo estas proteínas fosforilam diversos fatores de transcrição, dentre eles c-Myc, Elk-1 e c-Jun (membro da família de fatores de transcrição AP1 - *activating protein 1*), estes por sua vez levam à transcrição de outros fatores, estimulando a proliferação celular (Li, Theus *et al.*, 2006). Como, por exemplo, a transcrição da ciclina D, induzida pela ativação das ERK1/2 promove a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Kim, Cho *et al.*, 2007).

Visando identificar os fatores de transcrição ativados pela PKC δ a jusante (down-stream) da ERK1/ 2, verificamos a ativação/ fosforilação dos fatores de transcrição c-Jun e Elk-1 perante a ativação da PKC δ – 500nM. Como controle positivo ativamos as cPKCs e nPKCs com o PMA (Figura 28).

A ativação das c e nPKCs por PMA levou à ativação de c-Jun aumentando sua fosforilação, entretanto, os moduladores específicos da PKC δ , tanto ativador como inibidor, não afetaram a ativação/ fosforilação de c-Jun. Sendo assim, a ativação de c-Jun não pode ser atribuída à modulação da PKC δ .

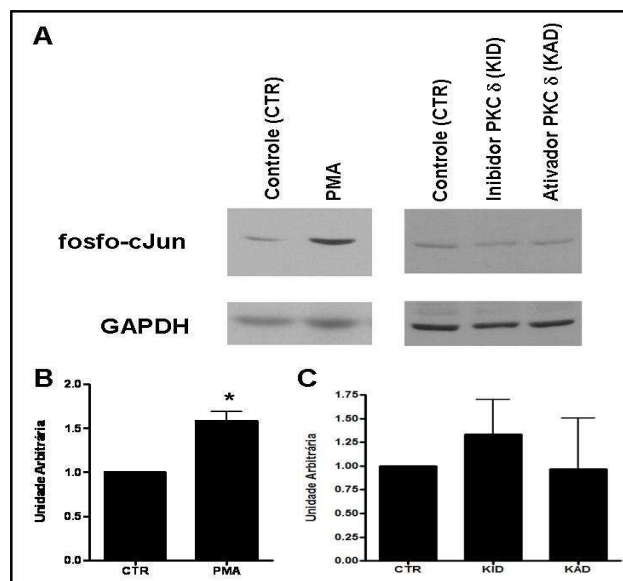


Figura 28: Fosforilação de c-Jun modulada por PMA e pelos moduladores específicos da PKC δ na linhagem E14TG2a. (A) Western blot após tratamento com PMA (ativação das cPKC e nPKC), ativador (KAD) e inibidor (KID) da PKC δ por 15 minutos (B e C). Normalização realizada a partir do GAPDH para quantificação da expressão de c-Jun, (B) representa adição de PMA e (C) representa adição dos moduladores da PKC δ . Média de três experimentos independentes. Para as análises quantitativas a significância estatística determinada pelo teste T (* $p < 0,05$).

Analizamos também a fosforilação de outro fator de transcrição a Elk-1, outro alvo da ERK1/2 no núcleo (Figura 29). Observamos um aumento significativo na fosforilação da Elk-1 (p-Elk-1) mediante a ativação da PKC δ (500 nM), por outro lado, a adição do inibidor desta isoenzima não teve efeito na ativação/ fosforilação desta proteína. Este fato pode ser atribuído aos fatores contidos no soro que induziriam uma ativação parcial da Elk-1. Entretanto, toda e qualquer ativação mediante a adição dos moduladores é comparada as células mantidas em níveis basais de soro (15% v/v soro) para a manutenção das CTE indiferenciadas.

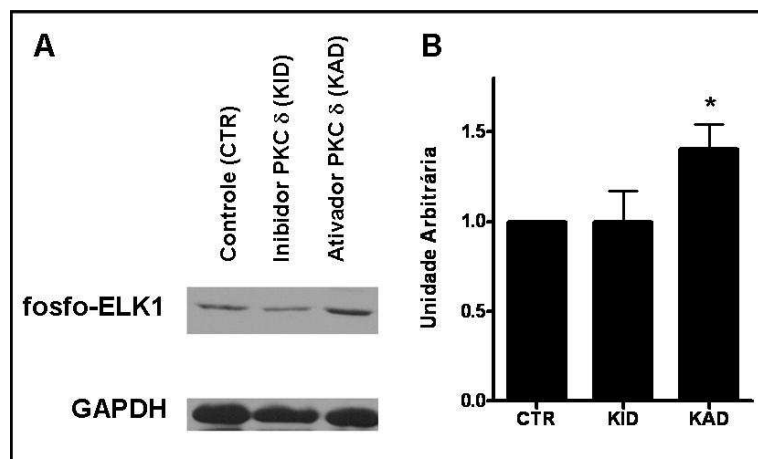


Figura 29: Fosforilação da Elk-1 modulada pela ativação da PKC δ na linhagem E14TG2a. (A) Western blot após tratamento com 500nM dos moduladores da PKC δ – ativador (KAD) e inibidor (KID) por 15 minutos. (B). Normalização realizada a partir do GAPDH para quantificação da expressão da fosfo-Elk-1. Média de três experimentos independentes. Para as análises quantitativas a significância estatística determinada pelo teste T (* $p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

As proteínas quinases C (PKC) atuam na proliferação, auto-renovação e diferenciação das células tronco embrionárias (CTE). Apesar de diversos estudos confirmarem a participação ativa das PKCs nestes processos, ainda não se estabeleceu exatamente o papel desempenhado pelas diferentes isoenzimas das PKCs. No presente trabalho observamos que somente a ativação da PKC δ foi capaz de levar ao aumento de proliferação das CTE murinas indiferenciadas avaliadas pela incorporação de [3 H] timidina.

Nossos experimentos foram feitos em condições em que aproximadamente 90% das CTE se mantinham indiferenciadas, na presença de 15% de soro e LIF. Não observamos uma diminuição na proliferação celular inibindo-se a PKC δ , possivelmente pelo fato de estarmos trabalhando com concentrações elevadas de soro, o que verificamos ser necessário para a preservação das mesmas no seu estado indiferenciado. Constatamos também que nossas condições de cultivo das CTE por si só já ativam as PKCs. No futuro o mesmo efeito deve ser verificado na ausência de soro e presença de fatores que mantenham as CTE indiferenciadas, por exemplo LIF e BMP4.

Existem alguns estudos na literatura que descrevem a participação das PKCs na proliferação das CTE. Trabalhos usaram CTE murinas para demonstrar a importância da fosfolipase C e da PKC na proliferação das CTE. Demonstrando que ativadores globais das PKCs, um análogo do DAG 1,2-dioctanoil glicerol (DOG) bem como o éster de forbol 12-O-tetra-decanoil forbol 13-acetato (TPA) induziam a proliferação das CTE. Por outro lado, o inibidor

global da PKC, bisindolylmaleimide II (Bis II), diminuiu significativamente o número das CTE (Quinlan, Faherty *et al.*, 2003).

Ressaltamos que o nosso estudo é o primeiro a caracterizar especificamente quais isoformas das PKCs estariam envolvidas na proliferação das CTE murinas mantidas em condições de cultivo que as mantêm indiferenciadas. Além disso, muitos dos estudos anteriores avaliaram a proliferação na ausência de soro, o que por si só pode alterar algumas características das CTE levando a diferenciação das mesmas, outro fator que difere os outros estudos anteriores do presente.

Utilizando técnicas de fosfoproteômica identificamos substratos diretos e indiretos da PKC δ . Estes experimentos foram realizados em duas concentrações diferentes do peptídeo ativador da PKC δ , 50 e 500 nM. Funcionalmente, destacaram-se proteínas envolvidas na proliferação celular; síntese proteica; resposta ao stress (chaperonas e proteínas envolvidas em processos de óxido-redução); estrutura celular (citoesqueleto); transporte de proteínas e proteólise, entre outras.

Os dados de fosfoproteômica do nosso grupo, associados aos dados de incorporação de [3 H] timidina sustentam a hipótese de que a PKC δ esteja envolvida no processo de proliferação das CTE murinas indiferenciadas. Além disso, observamos semelhanças entre dois estudos de fosfoproteômica independentes, embora proteínas diferentes tenham sido detectadas. Comparando-se a localização das proteínas identificadas como sendo moduladas pela ativação da PKC δ nas concentrações de 50 nM e com 500 nM, respectivamente: 55% e 68% destas proteínas se localizam exclusivamente no citoplasma da célula; 13% e 15% delas são exclusivamente nucleares; 30% e

19% se localizam tanto no citoplasma como no núcleo. Resultados dos estudos de fosfoproteômica com diferentes concentrações de moduladores apresentaram grandes semelhanças, tanto em relação à função das proteínas identificadas quanto em relação à localização sub-celular das mesmas.

Além disso, três proteínas foram encontradas em ambos os fosfoproteomas (50 nM e 500 nM): 14-3-3, β -actina (Actina citoplasmática 1) e *Heat shock cognate 71 kDa protein*.

É interessante notar que diversos estudos com a PKC δ demonstram diferentes funções com relação à indução da proliferação. Apesar de alguns deles demonstrarem que esta isoenzima pode suprimir a proliferação celular, geralmente, em células transformadas ou linhagens tumorais a PKC δ tem se demonstrando capaz de induzir a proliferação via a modulação das ERK1/2 (Jackson e Foster, 2004).

Vimos que parte da PKC δ encontra-se ativa nas condições de cultivo basais (15% v/v soro e LIF) e dispersa no citoplasma e membrana. E após a ativação da mesma encontramos uma maior concentração de PKC δ ativa na membrana. Desta forma, apesar de encontrarmos alguns alvos nucleares no nosso estudo de proteômica acreditamos que estes alvos sejam alvos indiretos da PKC δ conseqüentes da ativação e translocação nuclear das ERK1/2 ou ainda outros alvos que transitam entre citoplasma e núcleo.

A ativação da PKC δ levou ao aumento da proliferação das CTE indiferenciadas, após a ativação desta isoenzima ela irá se localizar na membrana das CTE. Descrevemos, desta forma, potenciais alvos diretos da PKC δ , que em estudos futuros devem ser validados e avaliados funcionalmente.

Buscamos proteínas que no nosso estudo de fosfoproteômica tinham como características: 1) localização subcelular citoplasmáticas e/ou membranas; 2) participação no processo de proliferação; 3) continham sequências *consensus* para a fosforilação por PKC. Destacamos as proteínas: 14-3-3, Anexina A7, *Nuclear factor* $\kappa\beta$ (NF $\kappa\beta$), *Nuclear Distribution gene C homolog* (NudC), Translationally-Controlled Tumor Protein (TCTP1), *Nuclear Autoantigenic Sperm Protein* (NASP) e *Cytoplasmic activation and proliferation-associated protein 1* (Caprin-1) que seguem estes critérios.

As proteínas 14-3-3 foram as primeiras proteínas a serem identificadas como proteínas que se ligam a fosfoserinas e fosfotreoninas em um determinado consenso. Estas proteínas possuem um papel crítico na sinalização celular que controla a progressão do ciclo celular, alterações transcricionais e morte celular programada. Esta família de proteínas é responsável por manter a especificidade de algumas vias de sinalização, funcionando como uma proteína adaptadora interagindo com várias proteínas.

As proteínas 14-3-3 já foram descritas como substrato de algumas isoenzimas das PKCs podendo ser um alvo direto da PKC δ . Demonstrou-se que as isoformas α , β , δ , γ e θ das PKCs podem ser responsáveis pela fosforilação da 14-3-3 induzida por *Platelet derived growth factor* [PDGF] (Autieri e Carbone, 1999; De Camilli, Chen *et al.*, 2002; Gerke e Moss, 2002).

A fosforilação da 14-3-3 parece ser importante para inibir sua dimerização, sendo que sua conformação monomérica ou dimérica determina a ligação desta proteína aos seus diferentes alvos. Ainda a ligação da 14-3-3 aos diferentes alvos pode determinar sua localização sub-celular e sua participação

em processos distintos como, por exemplo, proliferação ou indução de apoptose (Woodcock, Murphy *et al.*, 2003).

A 14-3-3 interage com a Raf-1 como descrito anteriormente, ativando a via das MAPK (Autieri e Carbone, 1999). Durante o ciclo celular a vimentina e a keratina são fosforiladas seqüestrando a 14-3-3 e impedindo a ativação da Raf-1, e conseqüentemente a ativação da via das MAPK. A associação da 14-3-3 com a Cdc25 fica inibida, permitindo, a translocação nuclear da Cdc25 (Zhu, Nozell *et al.*, 2001) e a ativação do fator MPF (*M-phase promoting factor*) que permite a progressão do ciclo celular (Toyoshima-Morimoto, Taniguchi *et al.*, 2002). Desta forma, acreditamos que a ativação da PKC δ , tanto 50nM como 500nM pode levar ao seqüestro da 14-3-3 do núcleo e a progressão do ciclo celular.

Nossos resultados demonstraram por fosfoproteômica a fosforilação da 14-3-3 modulada pela ativação PKC δ evidenciando o deslocamento da 14-3-3 para um pH mais baixo. Contudo, a inativação da Raf-1 também teria como consequência a inibição da via das MAPKs o que poderia explicar o caráter transitório de ativação desta via mediante a ativação da PKC δ .

As anexinas já foram descritas como alvos de serinas e treoninas kinases, dentre elas as PKCs. Encontrada na membrana plasmática, a Anexina A7 está envolvida na mediação de sinais de Ca²⁺/GTP durante a exocitose ou fusão de membranas. Assim como outros membros da sua família ela pode estar envolvida com a inibição da atividade da fosfolipase A2 (Clemen, Herr *et al.*, 2001).

Em alguns modelos de câncer como, por exemplo, de próstata a Anexina A7 foi descrita como tendo um efeito de supressor de tumor podendo

regular a expressão do fator de transcrição E2F1 (*Transcription factor E2F1*), a ativação da ERK5 e o balanço entre apoptose e proliferação (Torosyan, Simakova *et al.*, 2009).

A proteína NudC é altamente conservada em diferentes espécies (Riera e Lazo, 2009), ela está envolvida na manutenção do movimento nuclear, e faz parte de um complexo associado à dineína e dinactina. Os genes dessa família geralmente atuam na divisão, migração e proliferação celular. A NudC é fosforilada em resíduos de serina (Ser-275 e Ser-327) pela *Polo-like kinase 1* durante a fase M do ciclo celular, sendo responsável por formar corretamente os fusos mitóticos e por separar a cromatina durante a fase de mitose (Zhou, Zimmerman *et al.*, 2006).

A expressão e fosforilação da NudC em mamíferos está aumentada durante a mitose, sua depleção por RNAi em células HeLa inibiu o crescimento celular e induziu a parada do ciclo celular levando estas células à morte (Zhou, Zimmerman *et al.*, 2006). A NudC ainda possui um domínio semelhante ao de co-chaperonas, sendo capaz de inibir a agregação de várias proteínas alvos, atuando dessa forma como uma chaperona (Zheng, Cierpicki *et al.*).

O NF κ B é um fator de transcrição envolvido em diversos processos celulares, dentre eles: inflamação, diferenciação, crescimento celular, tumorigênese e apoptose. A atividade do NF κ B é controlada por modificações pós-translacionais, bem como sua compartimentalização sub-celular (Rivas, Carnevale *et al.*, 2008).

O fator NF κ B pode ainda se ligar a co-fatores ou co-repressores. Quando inativo o NF κ B permanece no citoplasma ligado ao seu inibidor, I-kappa-B, e ao ser fosforilado pela kinases I-kappa-B (IKKs) é ativado desligando-se do seu

inibidor e translocando para o núcleo, onde irá ativar a JNK (Rivas, Carnevale *et al.*, 2008).

As PKCs são moduladoras do fator NF κ B, em células T murinas (Krappmann, Patke *et al.*, 2001), confirmando a confiabilidade dos ensaios realizados no presente trabalho.

Em resposta ao estress oxidativo a Proteína quinase D (PKD) participa da ativação do NF κ B levando ao aumento de sobrevivência celular, sendo que uma das fosforilações para a ativação da PKD é mediada pela PKC δ (Storz, Doppler *et al.*, 2004). Sabe-se ainda que ativações de algumas isoenzimas das PKCs em alguns sistemas podem levar à ativação/ translocação nuclear do NF κ B (Sanz, Sanchez *et al.*, 1999).

Também foi demonstrado que existe um sinergismo entre as vias da ERK e da NF κ B e em alguns casos a inibição da via da ERK pode reprimir a ativação do NF κ B (Rivas, Carnevale *et al.*, 2008).

A proteína TCTP-1 é altamente expressa em eucariotos e também muito conservada, ela é regulada tanto de modo transcripcionalmente como translacionalmente. Foi primeiramente identificada e relacionada com o crescimento de tumor em ascites de camundongos. A síntese de TCTP-1 é regulada por cálcio, por *eIF4E* e por *dsRNA-dependent protein kinase* [PKR] (Yang, Yang *et al.*, 2005). Também tem atividade antiapoptótica, quando fosforilada pela *Polo like kinase 1* durante a divisão celular (Cucchi, Gianellini *et al.*).

Caprin-1 é uma fosfoproteína citoplasmática altamente conservada. Clones nulos para essa proteína tiveram sua taxa de proliferação bastante reduzida, ocasionada pelo aumento da fase G1 do ciclo celular, entretanto, sua

ausência não afetou a ativação das vias PI3K e MAPK (Wang, David *et al.*, 2005). Apesar de já terem sido detectados sítios de fosforilação desta proteína a função das fosforilações ainda não foram investigadas.

Outras proteínas encontradas nos nossos estudos de proteômica podem ainda ter uma participação na regulação dos processos que levam à proliferação das CTE mediante a ativação da PKC δ . Várias chaperonas, proteínas de choque térmico, foram identificadas. A fosforilação da HSP27 (*small heat shock protein*) em uma linhagem de carcinoma hepático pela PKC δ levando à ativação da via da p38 já foi descrita. A interação da PKC δ pode potencialmente fosforilar outras proteínas de choque térmico que podem inclusive ter um papel na proliferação celular como a HSPa8 (Takai, Matsushima-Nishiwaki *et al.*, 2007) o que deverá ser investigado no futuro.

Sabe-se que a ativação das MAPKs leva à proliferação celular em diversas linhagens (Lomonaco, Kahana *et al.*, 2008) e apesar da integração das vias de sinalização das MAPKs e das PKCs serem intensamente estudadas, muitas questões ainda permanecem obscuras.

Ativadores das cPKC e nPKCs como ésteres de forbol (PMA ou TPA) levam à ativação da via das MAPKs (Ueda, Hirai *et al.*, 1996). Em células COS 1 e NIH 3T3 observou-se que a PKC α ativa a RAF, que por sua vez ativa a Ras, levando à ativação da MEK e ERK 1/2. Ainda, nessas linhagens a PKC δ também ativa diretamente a Raf. Recentemente, na linhagem C6 de glioma, observou-se que a ativação da PKC δ mantém a ERK 1/2 ativa (Heo e Han, 2006).

Dados da literatura, somados aos nossos resultados de ensaio de proliferação, nos motivaram a investigar a interação das vias da MAPK com a

PKC δ . Nossos dados indicam que a PKC δ está envolvida na ativação da ERK1/2, uma vez que após a ativação desta isoenzima observamos por microscopia confocal a translocação da ERK 1/ 2 para o núcleo.

Entretanto como a ativação da ERK1/2 leva à diferenciação celular de CTE investigamos esta aparente dicotomia. Alguns estudos indicam que a intensidade de ativação, a duração da ativação e localização sub-celular da ativação das ERK1/2 são de fundamental importância para se determinar as conseqüências fisiológicas mediadas pelas ERK1/2, sejam elas, proliferação, diferenciação, apoptose ou sobrevivência (Ebisuya *et. al.*, 2005).

Células PC12 (células derivadas de tumores neuroendócrinos) ao serem tratadas com o *Nerve growth factor* (NGF) estimulam a ativação sustentada das ERK1/2 levando à sua diferenciação, por outro lado o *Fibroblast Growth Factor* (EGF) estimula a ativação transiente das ERK1/2 levando a sua proliferação (Traverse, Seedorf *et al.*, 1994).

Foi relatado que a ativação das ERK1/2 sustentada em fibroblastos ocorre por um *feedback* positivo entre a sinalização das ERK1/2 e das PKCs. As PKCs estimulam a ativação das ERK1/2 pela ativação da Raf. Por sua vez as ERK1/2 ativa a fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) e o ácido aracdônico produzido pela cPLA2 ativa as PKCs. Todavia, a inibição da sinalização das PKCs não afetou a ativação inicial das ERK1/2, entretanto, bloqueou o efeito sustentado da ERK (Bhalla e Iyengar, 1999).

Ainda a magnitude da atividade das ERK1/2 também é fundamental para sua função, podendo levar a efeitos diferentes e opostos no mesmo tipo celular. Estudos demonstraram que uma forte ativação das ERK1/2 pode causar parada do ciclo celular e até mesmo resistência à apoptose. Níveis

moderados da ativação das ERK1/2 induzem a expressão das Ciclinas D1 e E levando ao acúmulo de *Cyclin dependent kinases* (CDKs) resultando na proliferação celular (Ebisuya, Kondoh *et al.*, 2005).

Outro aspecto responsável pela especificidade das ERK1/2 é sua compartimentalização celular. No citoplasma ela se mantém ligada às proteínas MEK ou MKP que atuam como âncora, das quais ela se desliga translocando para o núcleo aonde irá fosforilar seus substratos nucleares. A translocação das ERK1/2 para o núcleo é necessária para o processo de proliferação em fibroblastos ou para o processo de diferenciação em células PC12 (Ebisuya, Kondoh *et al.*, 2005).

Entretanto, nem sempre as ERK1/2 ativadas se localizam no núcleo. Há agonistas da proteína G-acoplada a receptores que ativam a ERK sem induzir sua translocação para o núcleo ou sua resposta transcripcional. Em fibroblastos de pele humanos (HFFs), a ERK estimulada por EGF permanece no citoplasma na maior parte do tempo, entretanto a ativação das ERK1/2 por PMA leva à translocação da ERK para o núcleo sugerindo que a ativação das ERK1/2 via as c e nPKCs levam à translocação nuclear da mesma. A localização das ERK1/2 no núcleo em geral está associada com a regulação da proliferação celular, porém no citoplasma está envolvida com outros processos como a diferenciação celular (Ebisuya, Kondoh *et al.*, 2005).

Baseado na literatura e em nossos resultados de cinética mediante a ativação da PKC δ em diferentes tempos observamos que esta isoenzima foi capaz de induzir a ativação da ERK1/2 de modo transiente ocasionando sua translocação para o núcleo. Este efeito teve relação direta com a indução da proliferação das CTE murinas indiferenciadas.

Conforme discutido acima a ERK1/2 ativa no núcleo, frequentemente está associada com seu efeito proliferativo mediado pela ativação de diversos fatores de transcrição nucleares, como a Elk-1, Fos, c-Jun entre outros fatores. De fato, observamos que a ativação da PKC δ induziu a ativação do fator de transcrição Elk-1.

Em células neoplásicas as expressões de várias isoformas das PKCs estão aumentadas, as quais contribuem para a progressão do tumor. A PKC η está envolvida na proliferação celular de glioblastomas, nestas células esta isoenzima induziu a proliferação celular ativando a Elk-1 via a ativação das ERK1/2 (Sharrocks, Brown *et al.*, 1997).

A Elk-1 leva à proliferação celular pela ativação de fatores transcripcionais, como o c-Fos (SRF) e a família de fatores de transcrição ETs (Uht, Amos *et al.*, 2007). Nossos dados sugerem que o aumento da proliferação celular pela PKC δ poderia estar sendo mediada pela ativação da Elk-1 via ERK1/2.

6. CONCLUSÃO

Durante o desenvolvimento deste trabalho foi possível determinar o papel das diferentes isoenzimas da PKC na proliferação das CTE murinas indiferenciadas, dentre elas apenas a ativação da PKC δ apresentou efeito significativo no aumento da proliferação celular.

Investigamos também algumas proteínas que estão sabidamente relacionadas com proliferação celular, entre elas: MEK, ERK1/ 2, c-Jun e a Elk-1, quanto ao seu padrão de fosforilação mediante a modulação da PKC δ .

A ativação da PKC δ teve efeito no aumento de fosforilação da MEK, da ERK e da Elk-1. O inibidor desta isoenzima não reduziu a fosforilação de nenhuma dessas proteínas e também não inibiu o crescimento celular das CTE indiferenciadas. E apesar do PMA (ativador geral das cPKCs e das nPKCs) ter levado ao aumento da fosforilação de c-Jun, esta ativação não é mediada pela PKC δ .

Nossos dados indicam que a modulação da fosforilação das ERK 1/2 pela PKC δ ocorre de forma transiente levando a sua translocação (compartimentalização) para o núcleo. Fato coerente com dados da literatura, visto que, a ativação sustentada das ERK1/2 levaria a diferenciação destas células. Este trabalho demonstra pela primeira vez que a cinética de ativação das ERK 1/2 está sendo mediada pela ativação de uma via endógena (PKC δ), a qual estaria levando ao aumento de proliferação.

Para uma análise mais completa e aprofundada da atuação do ativador da PKC δ decidimos utilizar a técnica de fosfoproteômica e espectrometria de massa, as quais nos permitiram identificar diversos alvos desta isoenzima.

Algumas dessas proteínas já haviam sido descritas como alvos das PKCs na literatura reforçando a robustez e reprodutibilidade do sistema escolhido, mesmo em face de limitações de cada técnica.

Os ensaios de fosfoproteômica foram realizados utilizando-se duas concentrações do ativador da PKC δ , 50 e 500nM. Ambos fosfoproteomas foram capazes de identificar diversas proteínas relacionadas com proliferação, ciclo celular, transcrição, tradução e resposta ao stress (chaperonas), contribuindo para a confirmação do papel desta isoenzima na indução da proliferação nas CTE indiferenciadas.

Concluimos que a ativação da PKC δ leva à proliferação de CTE indiferenciadas levando a translocação nuclear das ERK1/2, nas quais são ativadas transitoriamente. Outras proteínas como a 14-3-3 também são fosforiladas neste processo o que pode contribuir tanto para a ativação inicial da via da ERK1/2 como para a inibição posterior da via da ERK, de forma que a sua ativação seja transiente. Ainda a ativação do fator de transcrição Elk-1 pode estar relacionado com o aumento da proliferação induzido pela ativação da PKC δ .

Futuros estudos realizados em determinados pontos da cinética de ativação da ERK poderão determinar quais são as proteínas envolvidas em cada parte do processo de ativação/ inativação da ERK.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. e Walter, P. Biologia Molecular da Célula, 4ª edição, Artmed, 2004.

Autieri, M. V. e C. J. Carbone. 14-3-3 Gamma interacts with and is phosphorylated by multiple protein kinase C isoforms in PDGF-stimulated human vascular smooth muscle cells. DNA Cell Biol, v.18, n.7, Jul, p.555-64. 1999.

Bates, E., C. Bode, *et al.* Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. Circulation, v.117, n.7, Feb 19, p.886-96. 2008.

Bhalla, U. S. e R. Iyengar. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. Science, v.283, n.5400, Jan 15, p.381-7. 1999.

Boiani, M. e H. R. Scholer. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.11, Nov, p.872-84. 2005.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

Brasseur, R. e G. Divita. Happy birthday cell penetrating peptides: already 20 years. Biochim Biophys Acta, v.1798, n.12, Dec, p.2177-81.

Braun, M. U. e D. Mochly-Rosen. Opposing effects of delta- and zeta-protein kinase C isozymes on cardiac fibroblast proliferation: use of isozyme-selective inhibitors. J Mol Cell Cardiol, v.35, n.8, Aug, p.895-903. 2003.

Bright, R. e D. Mochly-Rosen. The role of protein kinase C in cerebral ischemic and reperfusion injury. Stroke, v.36, n.12, Dec, p.2781-90. 2005.

Cenni, V., H. Doppler, *et al.* Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. Biochem J, v.363, n.Pt 3, May 1, p.537-45. 2002.

Chachques, J. C., A. Shafy, *et al.* From dynamic to cellular cardiomyoplasty. J Card Surg, v.17, n.3, May-Jun, p.194-200. 2002.

Chen, L., H. Hahn, *et al.* Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.20, Sep 25, p.11114-9. 2001.

Chuderland, D. e R. Seger. Calcium regulates ERK signaling by modulating its protein-protein interactions. Commun Integr Biol, v.1, n.1, p.4-5. 2008.

Clemen, C. S., C. Herr, *et al.* Annexin VII: an astroglial protein exhibiting a Ca²⁺-dependent subcellular distribution. Neuroreport, v.12, n.6, May 8, p.1139-44. 2001.

Costa-Junior, H. M., N. M. Garavello, *et al.* Phosphoproteomics profiling suggests a role for nuclear beta1PKC in transcription processes of undifferentiated murine embryonic stem cells. J Proteome Res, v.9, n.12, Dec 3, p.6191-206.

Cucchi, U., L. M. Gianellini, *et al.* Phosphorylation of TCTP as a marker for polo-like kinase-1 activity in vivo. Anticancer Res, v.30, n.12, Dec, p.4973-85.

De Camilli, P., H. Chen, *et al.* The ENTH domain. FEBS Lett, v.513, n.1, Feb 20, p.11-8. 2002.

Disatnik, M. H., G. Buraggi, *et al.* Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. Exp Cell Res, v.210, n.2, Feb, p.287-97. 1994.

Disatnik, M. H., S. N. Jones, *et al.* Stimulus-dependent subcellular localization of activated protein kinase C; a study with acidic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta 1 in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol, v.27, n.11, Nov, p.2473-81. 1995.

Ebisuya, M., K. Kondoh, *et al.* The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. J Cell Sci, v.118, n.Pt 14, Jul 15, p.2997-3002. 2005.

Emoto, Y., Y. Manome, *et al.* Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. Embo J, v.14, n.24, Dec 15, p.6148-56. 1995.

Gerke, V. e S. E. Moss. Annexins: from structure to function. Physiol Rev, v.82, n.2, Apr, p.331-71. 2002.

Heo, J. S. e H. J. Han. ATP stimulates mouse embryonic stem cell proliferation via protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Stem Cells, v.24, n.12, Dec, p.2637-48. 2006.

Heo, J. S., M. Y. Lee, *et al.* Sonic hedgehog stimulates mouse embryonic stem cell proliferation by cooperation of Ca²⁺/protein kinase C and epidermal growth factor receptor as well as Gli1 activation. Stem Cells, v.25, n.12, Dec, p.3069-80. 2007.

Inagaki, K., L. Chen, *et al.* Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. Circulation, v.108, n.19, Nov 11, p.2304-7. 2003.

Jackson, D. N. e D. A. Foster. The enigmatic protein kinase Cdelta: complex roles in cell proliferation and survival. Faseb J, v.18, n.6, Apr, p.627-36. 2004.

Jackson, T. A., R. E. Schweppe, *et al.* Fibroblast growth factor activation of the rat PRL promoter is mediated by PKCdelta. Mol Endocrinol, v.15, n.9, Sep, p.1517-28. 2001.

Keranen, L. M., E. M. Dutil, *et al.* Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. Curr Biol, v.5, n.12, Dec 1, p.1394-1403. 1995.

Keshamouni, V. G., R. R. Mattingly, *et al.* Mechanism of 17-beta-estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC-delta. J Biol Chem, v.277, n.25, Jun 21, p.22558-65. 2002.

Kheifets, V. e D. Mochly-Rosen. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. Pharmacol Res, v.55, n.6, Jun, p.467-76. 2007.

Kim, H. S., J. W. Cho, *et al.* Activation of MEK-ERK by heregulin-beta1 promotes the development of cardiomyocytes derived from ES cells. Biochem Biophys Res Commun, v.361, n.3, Sep 28, p.732-8. 2007.

Klug, M. G., M. H. Soonpaa, *et al.* Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. J Clin Invest, v.98, n.1, Jul 1, p.216-24. 1996.

Kohn, A. D. e R. T. Moon. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. Cell Calcium, v.38, n.3-4, Sep-Oct, p.439-46. 2005.

Kraft, A. S., W. B. Anderson, *et al.* Decrease in cytosolic calcium/phospholipid-dependent protein kinase activity following phorbol ester treatment of EL4 thymoma cells. J Biol Chem, v.257, n.22, Nov 25, p.13193-6. 1982.

Krappmann, D., A. Patke, *et al.* B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's. Mol Cell Biol, v.21, n.19, Oct, p.6640-50. 2001.

Krauss G. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 3ª Edição Completa e Revisada. Editora WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003.

Li, W., Y. X. Jiang, *et al.* Protein kinase C-delta is an important signaling molecule in insulin-like growth factor I receptor-mediated cell transformation. Mol Cell Biol, v.18, n.10, Oct, p.5888-98. 1998.

Li, Z., M. H. Theus, *et al.* Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells. Dev Growth Differ, v.48, n.8, Oct, p.513-23. 2006.

Lomonaco, S. L., S. Kahana, *et al.* Phosphorylation of protein kinase Cdelta on distinct tyrosine residues induces sustained activation of Erk1/2 via down-

regulation of MKP-1: role in the apoptotic effect of etoposide. J Biol Chem, v.283, n.25, Jun 20, p.17731-9. 2008.

Lonne, G. K., K. C. Masoumi, *et al.* Protein kinase Cdelta supports survival of MDA-MB-231 breast cancer cells by suppressing the ERK1/2 pathway. J Biol Chem, v.284, n.48, Nov 27, p.33456-65. 2009.

Matsuura, K., H. Wada, *et al.* Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. J Cell Biol, v.167, n.2, Oct 25, p.351-63. 2004.

Mochly-Rosen, D. e A. S. Gordon. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. Faseb J, v.12, n.1, Jan, p.35-42. 1998.

Molofsky, A. V., R. Pardal, *et al.* Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. Curr Opin Cell Biol, v.16, n.6, Dec, p.700-7. 2004.

Morrison, G. M. e J. M. Brickman. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. Development, v.133, n.10, May, p.2011-22. 2006.

Murriel, C. L., E. Churchill, *et al.* Protein kinase Cdelta activation induces apoptosis in response to cardiac ischemia and reperfusion damage: a mechanism involving BAD and the mitochondria. J Biol Chem, v.279, n.46, Nov 12, p.47985-91. 2004.

Nagahara, H., A. M. Vocero-Akbani, *et al.* Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. Nat Med, v.4, n.12, Dec, p.1449-52. 1998.

Newton, Alexandra C., Protein Kinase C Protocols - Methods in Molecular Biology, vol. 233. Editora Humam Press Inc., Totowa, NJ, 2003.

Nishizuka, Y. The heterogeneity and differential expression of multiple species of the protein kinase C family. Biofactors, v.1, n.1, Jan, p.17-20. 1988.

Pan, G. e J. A. Thomson. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. Cell Res, v.17, n.1, Jan, p.42-9. 2007.

Quinlan, L. R., S. Faherty, *et al.* Phospholipase C and protein kinase C involvement in mouse embryonic stem-cell proliferation and apoptosis. Reproduction, v.126, n.1, Jul, p.121-31. 2003.

Richardson, R. T., O. M. Alekseev, *et al.* Nuclear autoantigenic sperm protein (NASP), a linker histone chaperone that is required for cell proliferation. J Biol Chem, v.281, n.30, Jul 28, p.21526-34. 2006.

Riera, J. e P. S. Lazo. The mammalian NudC-like genes: a family with functions other than regulating nuclear distribution. Cell Mol Life Sci, v.66, n.14, Jul, p.2383-90. 2009.

Rivas, M. A., R. P. Carnevale, *et al.* TNF alpha acting on TNFR1 promotes breast cancer growth via p42/P44 MAPK, JNK, Akt and NF-kappa B-dependent pathways. Exp Cell Res, v.314, n.3, Feb 1, p.509-29. 2008.

Ron, D. e M. G. Kazanietz. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. Faseb J, v.13, n.13, Oct, p.1658-76. 1999.

Rubinfeld, H., T. Hanoch, *et al.* Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. J Biol Chem, v.274, n.43, Oct 22, p.30349-52. 1999.

Saito, N. e Y. Shirai. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. J Biochem, v.132, n.5, Nov, p.683-7. 2002.

Sanz, L., P. Sanchez, *et al.* The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. Embo J, v.18, n.11, Jun 1, p.3044-53. 1999.

Schechtman, D., M. L. Craske, *et al.* A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation. J Biol Chem, v.279, n.16, Apr 16, p.15831-40. 2004.

Schechtman, D. e D. Mochly-Rosen. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. Oncogene, v.20, n.44, Oct 1, p.6339-47. 2001.

Sharrocks, A. D., A. L. Brown, *et al.* The ETS-domain transcription factor family. Int J Biochem Cell Biol, v.29, n.12, Dec, p.1371-87. 1997.

Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun. 28 (5): 815–820. 1967.

Silva, J., I. Chambers, *et al.* Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. Nature, v.441, n.7096, Jun 22, p.997-1001. 2006.

Solomon, S., Y. Xu, *et al.* Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs. Mol Cell Biol, v.27, n.6, Mar, p.2324-42. 2007.

Sonnenburg, E. D., T. Gao, *et al.* The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase. J Biol Chem, v.276, n.48, Nov 30, p.45289-97. 2001.

Storz, P., H. Doppler, *et al.* Protein kinase Cdelta selectively regulates protein kinase D-dependent activation of NF-kappaB in oxidative stress signaling. Mol Cell Biol, v.24, n.7, Apr, p.2614-26. 2004.

Takai, S., R. Matsushima-Nishiwaki, *et al.* Protein kinase C delta regulates the phosphorylation of heat shock protein 27 in human hepatocellular carcinoma. Life Sci, v.81, n.7, Jul 26, p.585-91. 2007.

Torosyan, Y., O. Simakova, *et al.* Annexin-A7 protects normal prostate cells and induces distinct patterns of RB-associated cytotoxicity in androgen-sensitive and -resistant prostate cancer cells. Int J Cancer, v.125, n.11, Dec 1, p.2528-39. 2009.

Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, Sep, p.4350-4. 1979.

Toyoshima-Morimoto, F., E. Taniguchi, *et al.* Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. EMBO Rep, v.3, n.4, Apr, p.341-8. 2002.

Traverse, S., K. Seedorf, *et al.* EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. Curr Biol, v.4, n.8, Aug 1, p.694-701. 1994.

Ueda, Y., S. Hirai, *et al.* Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. J Biol Chem, v.271, n.38, Sep 20, p.23512-9. 1996.

Uht, R. M., S. Amos, *et al.* The protein kinase C-eta isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1 pathway. Oncogene, v.26, n.20, May 3, p.2885-93. 2007.

Wang, B., M. D. David, *et al.* Absence of caprin-1 results in defects in cellular proliferation. J Immunol, v.175, n.7, Oct 1, p.4274-82. 2005.

Woodcock, J. M., J. Murphy, *et al.* The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface. J Biol Chem, v.278, n.38, Sep 19, p.36323-7. 2003.

Yang, Y., F. Yang, *et al.* An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. Oncogene, v.24, n.30, Jul 14, p.4778-88. 2005.

Ying, Q. L., J. Wray, *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. Nature, v.453, n.7194, May 22, p.519-23. 2008.

Zang, Q., Z. Lu, *et al.* Association between v-Src and protein kinase C delta in v-Src-transformed fibroblasts. J Biol Chem, v.272, n.20, May 16, p.13275-80. 1997.

Zheng, M., T. Cierpicki, *et al.* Structural Features and Chaperone Activity of the NudC Protein Family. J Mol Biol, v.409, n.5, Jun 24, p.722-41.

Zhou, T., W. Zimmerman, *et al.* A mammalian NudC-like protein essential for dynein stability and cell viability. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.24, Jun 13, p.9039-44. 2006.

Zhu, J., S. Nozell, *et al.* p73 cooperates with DNA damage agents to induce apoptosis in MCF7 cells in a p53-dependent manner. Oncogene, v.20, n.30, Jul 5, p.4050-7. 2001.

NICOLE MILARÉ GARAVELLO

Rua Professor Marcondes Domingues, 334	Brasileira
02245-010 – São Paulo- SP	24/07/1983
Tels: (011) 8066-7891	Solteira
(011) 2951-2941 recados com Regina	E-mail: nigaravello@gmail.com

Objetivo

Atuar na área de Pesquisa Clínica

Experiência Profissional

- **ECLA - Contract Research Organization Brazil**

Junho de 2011 até o momento

Estagiária

Preparação de dossiês regulatórios relativos a estudos clínicos para apreciação do sistema CEP/CONEP e para instâncias regulatórias (ANVISA). Contato com diferentes Projetos de pesquisa Clínica.

- **Universidade de São Paulo USP - Instituto de Química**

Março de 2009 até Agosto de 2011

Laboratório de Bioquímica de Parasitas e Sinalização Celular

Mestre em Bioquímica

Projeto desenvolvido: “Caracterização do papel das PKCs na Proliferação e Auto-renovação de células tronco embrionárias murinas”.

- **Universidade de São Paulo USP - Instituto de Química**

Fevereiro de 2010

Monitoria

Aulas teóricas e práticas ministradas sobre Imunofluorescência indireta por microscopia confocal com duração de 80 horas.

- **Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo FMUSP - Instituto do Coração (InCor)**

Fevereiro de 2008 até fevereiro de 2009

Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

Estagiária

Cultivo de diversas linhagens celulares *in vitro*; Manipulação de animais de experimentação para obtenção de células (cardiomiócitos e fibroblastos) para cultura primária.

- **Universidade de São Paulo USP - Instituto de Química**

Janeiro de 2007 até fevereiro de 2008

Laboratório de Biologia Celular e Molecular

Iniciação Científica bolsista CNPq

Projeto desenvolvido: “Produção de Fator VIII Humano na forma Recombinante através de Transfecção Estável Sequencial em células de mamífero.”

- **Universidade Estadual Paulista – UNESP**

Abril de 2006

Coordenação de Evento Científico - I Encontro Paulista de Clonagem Animal

Formação Acadêmica

USP – SP – Universidade de São Paulo

Mestrado em Bioquímica, concluído em Agosto de 2011

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Bacharelado em Biotecnologia, término 2008

Síntese de Qualificações

- Quatro anos de experiência em laboratórios de pesquisa científica, em laboratórios de biologia celular e molecular utilizando diversas técnicas aplicadas em pesquisa básica
 - Elaboração de artigos científicos publicados em revistas nacionais e internacionais
 - Conhecimentos sólidos de Metodologia Científica
 - Elaboração e revisão de projetos e relatórios científicos
 - Coordenação e elaboração de eventos científicos
 - Conhecimentos de Boas Práticas Clínicas
 - Conhecimentos das instâncias regulatórias e governamentais financiadoras envolvidas em projetos de pesquisa
 - Conhecimentos no preparo de projetos e documentos relativos a estudos clínicos para apreciação do sistema CEP/CONEP

Idiomas

- Inglês fluente

Informática

- Word, Excel, PowerPoint
- Programas de análise estatística (Prisma), de edição de imagens de imunofluorescência (LSM Image Browser), de análise de dados de Citometria de Fluxo (WinMDI)

Produção Científica

Costa-Junior, H M; **GARAVELLO, N M**; Duarte, M L, Berti, D A; Glaser, T; Andrade, A; Labate, C A; Ferreira, A T S; Perales, J E A; Xavier-Neto, J; Krieger, J E e Schechtman D. “Phosphoproteomics profiling suggests a role for nuclear PKC Beta I in transcription processes of undifferentiated murine embryonic stem cells”. Journal of Proteome Research, abril de 2010

Principais Cursos e Eventos extracurriculares

- Curso de Regulamentação do Transporte Biológico por Via Aérea, segundo Normas da IATA – setembro de 2011
- **Formação em Pesquisa Clínica - Invitare** – de fevereiro a junho de 2011
- **Inglês para Profissionais em Pesquisa Clínica** – de fevereiro a julho de 2011
- XII Encontro Nacional de Profissionais em Pesquisa Clínica – SBPPC
- Proteomics Methods and Approaches for protein Identification and Quantitation – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Meu currículo completo e atualizado pode ser visualizado em

<http://lattes.cnpq.br/6249294138965280>