UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

EDUARDO CARARO LOPES

**O papel da autofagia no estresse oncogênico
promovido por HRAS^{G12V} em queratinócitos
humanos imortalizados por E6E7**

Versão corrigida da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

30/03/2017

EDUARDO CARARO LOPES

**O papel da autofagia no estresse oncogênico
promovido por HRAS^{G12V} em queratinócitos
humanos imortalizados por E6E7**

*Versão corrigida da tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr Hugo Aguirre Armelin

Co-Orientador: Prof. Dr Enrique Mario Boccardo Pierulivo

São Paulo

2017

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada as duas Marinas de minha vida, a minha avó e minha esposa....

É um pouco difícil achar palavras para falar sobre ela, que certamente é a maior responsável por esta tese existir. Sem o apoio, amor e educação que minha avó me deu eu nunca chegaria tão longe. Ela é um exemplo de força, dedicação e perseverança, combinação que dificilmente não dá origem a bons frutos. Eu, humildemente, me considero um ótimo fruto desta mulher, não pela minha formação e crescimento profissional, mas sim porque tenho a admiração dela, o que de fato é o mais importante para mim. Não esqueço uma história, contada por ela mesma, que quero dividir aqui: Como ajudante de serviços gerais da delegacia geral do Estado de São Paulo minha avó fazia trabalhos de toda a natureza, desde servir cafezinho até serviços de “*office boy*” para alguns delegados. Foi em uma dessas saídas, para depositar um dinheiro na conta da filha (na ocasião estudante de graduação) de um delegado, que minha avó perguntou para ele: - Doutor a sua filha faz USP? Na defensiva, estranhando a pergunta da minha avó, ele respondeu: - Imagina Dona Marina, a senhora pensa que é fácil assim entrar na USP, só os melhores fazem faculdade lá e minha filha não conseguiu. Com a doçura de uma criança e com o orgulho de uma rainha minha avó disse: - O neto que eu criei faz! Vó meu maior presente é te ver orgulhosa e feliz pelo homem que me tornei, obrigado.

Por uma feliz coincidência a dona do meu coração e linda esposa também se chama Marina. Ela, antes de tudo, é uma mulher forte, corajosa e uma das pessoas mais inteligentes que eu já conheci, e olha que eu já jantei e bati um belo papo com um prêmio Nobel (não é uma hipérbole, de fato isso aconteceu). Nos momentos mais complicados da minha vida ela estava ao meu lado me dando força e me ensinando a ser uma pessoa ainda melhor, e quando isso não era necessário, sem julgamentos, me deu o ombro para chorar. Mama, não há futuro sem você, juntos formaremos uma bela família, obrigado por estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Aviso ao leitor

Esta primeira seção é o “meu momento”, tomarei a liberdade de agradecer a todos que tiveram participação importante neste trabalho e em minha vida e, como sou sortudo, sempre fui rodeado de muitas pessoas excepcionais que contribuíram para me tornar o profissional que sou hoje. Como não ficarei relendo está seção, pois apenas poucos homenageados e o professor Roger Chammas (leitor confesso das “anedotinhas” pré-tese) vão prestigiá-la, provavelmente você irá se deparar com alguns erros gramaticais e ortográficos; os encare como licença poética e/ou linguagem Roseana.

A minha Família

Gostaria de começar agradecendo a minha Tia Rose que sempre esteve ao meu lado me apoiando e dando força para eu alcançar meus objetivos e até me tirando de enrascadas como uma irmã mais velha super-protetora. Devo agradecê-la também por ter me dando um “irmão” o Victor, cara que eu admiro muito e me ensinou o valor da fraternidade.

Quero fazer um agradecimento especial aos meus sogros, Clovis e Elisa, que me acolheram como filho, me deram suporte, amor e a liberdade de cuidar, desde sempre com muita confiança, de uma de suas mais preciosas joias que se tornou minha esposa. Também me deram mais uma irmã (como se eu já não tivesse o bastante) a minha amorosa cunhadinha Mariana.

Não posso deixar de agradecer minha mãe, Rosemeire, que muito jovem se viu sozinha para criar um filho e resistiu bravamente enquanto pode. Hoje, por meio dela tenho dois irmãos batalhadores, a Larissa e o Vinícius que sempre vão morar em meu coração.

Dos melhores momentos que vivi com o meu pai Geraldo certamente sempre me vem à cabeça os finais de semana que íamos trabalhar juntos. Essas experiências me ensinaram o valor do trabalho e que não há dia nem hora para fazer acontecer. Tenho que agradecer também pela nova (e grande) família que ele

me deu com sua esposa Denise e meus irmãos Cauã, Leon, Luan e Jade que certamente foram responsáveis por tornar minha infância mais feliz.

Não a toa nesta seção também quero agradecer duas pessoas que a quase vinte anos sempre estiveram do meu lado: Diego Bitencourt e Fernanda Ponzeto, que de fato não são meus amigos e sim meus irmãos. O Diego tem uma força imensa, nunca mediu esforços para estar ao meu lado nos momentos difíceis, mesmo que ele estivesse passando por um momento igualmente ou mais delicado. A Fernanda é outro exemplo de dedicação e sucesso que não tem medo de recomeçar do zero para dar asas a seus sonhos e se tornou um grande exemplo para mim. Obrigado a ambos por terem me feito mais forte em todos esses anos.

Aos amigos de profissão e mestres

Eram muitas as diferenças. Eu um paulistano paroquial e ele um capivariano cosmopolita; eu um Vacariano e ele um Campolargo; e a mais profunda e perigosa de todas as diferenças: Eu Corinthians e ele Palestra. Não tinha como dar certo, mas deu! Mesmo discordando (às vezes) eu o segui como um líder. Não quero agradecer ao Professor Hugo por todo o tempo investido em minha formação, tampouco a paciência que ele teve com minhas deficiências acadêmicas e muito menos por todo esforço que ele fez para eu me sentir como peça importante em seu laboratório, pois corro o risco de ele falar, como sempre: “- Este é meu trabalho!” Quero agradecer ao professor pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório com profissionais incríveis que fizeram de mim um cientista. Essa oportunidade mudou minha vida! Encontrei, depois de ter passado por outros dois cursos de graduação, a minha vocação e não tenho dúvidas que isso passa pela vivência em seu laboratório. Sempre quando vejo alguém se questionando filosoficamente a respeito do nosso trabalho (para onde vai levar, o que vamos ganhar com isso, nunca vou ganhar um Nobel) eu penso: - Se eu conseguir dar a oportunidade para um jovem mudar sua vida, como o Professor Hugo me deu, tudo terá valido a pena!

Outro mestre, e hoje com muito orgulho posso chamar de amigo, que devo agradecer é o Professor Rui Murrieta. Este cara tem um coração imenso, me tratou como família quando pedi ajuda em momentos que pensava em desistir da graduação. No começo achava que não iria dar conta de trabalhar e estudar em uma universidade tão competitiva, mas com muita sabedoria e carinho ele me conduziu até fim, sempre ressaltando o meu potencial. Dentre outras questões ele me fez

refletir sobre os aspectos não práticos da ciência, principalmente em seu papel na ascensão social, do qual, ele insistia em dizer, que um dia eu me beneficiaria. Ele tinha razão!

Desejo aqui deixar meu agradecimento para a Professora Solange Serrano, também grande líder e brilhante pesquisadora que sempre deixou seu laboratório de portas abertas para que eu pudesse explorar minha curiosidade científica e aprender com seus alunos igualmente brilhantes.

Não poderia deixar de agradecer meu co-orientador Professor Enrique Boccardo que aceitou este desafio sem pestanejar e sempre esteve a disposição para que pudesse sanar minhas dúvidas. Outro importante mestre que abriu a porta de seu laboratório por várias vezes foi o Professor Carlos Menck, com quem tive muitas discussões esclarecedoras sobre ciência desde minha época de graduação.

Talvez a Dra Julianna Dias não tenha ideia do tamanho da contribuição que deu para minha formação, basicamente tudo que sei hoje passa pelo que ela me ensinou, seja botando a mão na massa ou simplesmente me conduzindo pelo grande exemplo de capacidade, perseverança e inteligência. Para mim ela é a personificação da dedicação à ciência! Obrigado pelo tempo que investiu em mim!

Agradeço muito também ao Dr Matheus Dias, cientista muito competente que me ajudou muito em meu projeto e minha formação. Todas as dúvidas que tive, ele foi sempre o primeiro a ser consultado. Nunca fiquei sem resposta seja ela prática ou filosófica. Valeu brother tamo junto!

Uma pessoa incrível que eu gostaria de agradecer é o Dr Marcelo Reis, este é um cara diferente, nunca vi ninguém com tamanho genuíno interesse em ajudar outras pessoas igual ao Marcellone. Ele participou desde os mais simples textos em inglês que produzi até esta tese de doutorado, sempre com opiniões cirúrgicas e inteligentes que dificilmente foram descartadas. Também agradeço (o agora Mano) Dr Vincent Noël que com o seu carisma e bom papo faz até programação parecer palatável. Acho que se ele não estivesse chegado ao laboratório eu ainda estaria estudando o verbo *to be*.

O nome desse cara é Marcelo Santos, mas poderia se chamar trabalho! Com ele tive valiosas lições que me ajudaram muito na interpretação de resultados. Ele, como excepcional microscopista, também me ajudou muito na geração de várias imagens lindas deste projeto, as quais foram fundamentais para esclarecer muitas dúvidas. Logo ouviremos a comunidade científica falar seu nome!

Um cara que ganhou minha imensa admiração e também gratidão é o Dr Alexandre Vessoni que foi muito importante na interpretação de resultados desta tese e, independente da distância, sempre esteve disponível para que eu pudesse tirar minhas dúvidas e debater a respeito de fenômenos que antes dele eram complexos demais para mim.

Outra pessoa também que está no *top* das mais inteligentes que conheço é a Cecília Fonseca, sempre muito solícita me ajudou muito com o seu vasto conhecimento teórico, além de levantar várias questões relevantes para o meu trabalho.

Por fim quero agradecer a todas instituições que tornaram esta tese uma realidade: Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo que me armou de conhecimento para eu desempenhar meu trabalho; ao Instituto Butantan que cedeu seu espaço para a realização deste projeto; e as CAPES, CNPq e ao CEPID-CeTICS da FAPESP que financiaram integralmente este projeto. Sem o apoio de todas essas instituições não só este projeto como toda a ciência do estado de São Paulo seria menos competitiva.

Muito obrigado a todos!

*"Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante."
(Augusto Branco)*

RESUMO

Lopes-Cararo, E. **O papel da autofagia no estresse oncogênico promovido por HRAS^{G12V} em queratinócitos humanos imortalizados por E6E7**. 2017. 153 páginas. Tese – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

RAS é a oncoproteína mutada mais encontrada em tumores sólidos, o que mostra seu grande potencial transformador. Não obstante, células que carregam essa mutação apresentam estresse oncogênico gerado por excessiva sinalização mitogênica, o que direciona preferencialmente as células portadoras para a morte em detrimento da transformação maligna. Basicamente a transformação direcionada pela proteína RAS mutada age sinergicamente com deficiência em supressores de tumor para evitar o destino celular preferencial frente ao estresse oncogênico. Este é o caso da interação observada entre HRAS^{G12V} e E6E7 de HPV, sendo que a infecção pelo vírus aparentemente é condição necessária em cânceres cervicais e muito presente em cânceres de cabeça e pescoço.

A sinergia entre HRAS^{G12V} e queratinócitos imortalizados por E6E7 desequilibra o balanço homeostático entre subsistemas pró-morte, devido ao estresse oncogênico, ou pró-sobrevivência, que garante viabilidade por meio de novos padrões de robustez celular. Em ambos os casos, o processo que gera uma célula transformada, ou as elimina pelo caminho, apresenta pistas de vulnerabilidades às quais os queratinócitos são expostos uma vez que carreguem tal combinação de fatores.

Apresentamos nesse trabalho os principais atores que compõem o estresse oncogênico deletério desencadeado pela atividade de HRAS^{G12V}: estresse mitogênico, replicativo e oxidativo; todos eles são responsáveis por provocar dano no DNA, que por sua vez promove parada no ciclo celular até que as células não possam mais suportar tamanha injúria, o que acaba levando-as maciçamente a morte.

Mostramos que a alta intensidade mitogênica gerada pela atividade de HRAS^{G12V} provoca um desequilíbrio metabólico que leva ao aumento de espécies oxidantes e ao estresse replicativo. Todavia, um tratamento exógeno com o antioxidante NAC restaurou parcialmente a proliferação celular assim como a sobrevivência, agindo como um amenizador do dano no DNA gerado pelas espécies oxidantes. Já uma suplementação com nucleosídeos exógenos restaurou fortemente a sobrevivência celular, sugerindo que o desequilíbrio metabólico pode estar agindo no *pool* de nucleotídeos, o que poderia ser uma das causas do estresse replicativo.

Como mecanismo intrínseco de sobrevivência, a autofagia se intensifica em resposta ao desequilíbrio sistêmico desencadeado pela atividade de HRAS^{G12V}. Por meio de sublinhagens defectivas para autofagia, mostramos que o processo retarda o aparecimento de espécies oxidantes, além de evitar sua elevação a níveis ainda mais drásticos, o que conseqüentemente ameniza o dano no DNA observado. Além disso, hipotetizamos que o processo poderia também estar contribuindo fortemente para a reciclagem de substratos básicos tais como nucleotídeos, assim acarretando em menor estresse replicativo.

Na literatura atual, debate-se a noção de que, dependendo do contexto celular, a autofagia poderia promover tanto morte celular como transformação maligna. Entretanto, nesta tese mostramos que, na interação entre queratinócitos, E6E7 e HRAS^{G12V}, a autofagia é um mecanismo pró-sobrevivência: se por um lado a demanda autofágica é recrutada além de sua capacidade de processamento, fazendo com que seu fluxo seja bloqueado, por outro a eliminação do sistema se torna demasiadamente deletério, direcionando as células expostas ao estresse oncogênico causado pela atividade de HRAS^{G12V} necessariamente à morte.

Palavras-Chave: Ras, Autofagia, Queratinócitos, E6E7, Estresse Oncogênico.

ABSTRACT

Lopes-Cararo, E. **The role of autophagy in the face of the oncogenic stress triggered by HRAS^{G12V} in human keratinocytes immortalized by E6E7.** 2017. 153 pages. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Mutated RAS is the oncoprotein most found in solid tumors, which shows its huge tumorigenic potential. Despite of that, mutated RAS triggers a strong oncogenic stress, which very often drives cells to death instead of malignant transformation. Basically, the success of the Ras malignant transformation driving activity depends on a synergy between that mutated protein and inhibition of tumor suppression genes. This is the case of the interaction between HRAS^{G12V} and E6E7 proteins of HPV: It seems that HPV infection is an initial necessary condition for cervical cancer development and is also very frequent in head and neck carcinomas.

The synergy between HRAS^{G12V} and E6E7, in pre-malignant keratinocytes, imbalances the homeostasis between pro-death subsystems, due oncogenic stress, and pro-survival subsystems that ensure new patterns of cellular robustness. In both cases, the process responsible for generating a malignant transformed cell or, more frequently, eliminating those cells carrying the combined characteristics, exposes the keratinocytes vulnerabilities.

We showed in this work that the main actors of deleterious oncogenic stress triggered by HRAS^{G12V} activity are: Mitogenic, replicative and oxidative stresses; all of them induce DNA damage, hence cell cycle arrests until the cell cannot resist such injury any further, which leads to massive cell death.

The intense mitogenic activity triggered by HRAS^{G12V} causes metabolic imbalance, which is responsible for an increase of oxidative species and replicative stress levels; the exogenous treatment with antioxidant NAC partially restored cell growth and cell survival, acting as a softener of the DNA damage caused by oxidative species. On the other hand, nucleoside supplementation strongly restored cell survival, suggesting that the aforementioned metabolic imbalance might be acting in the pool of nucleotides, hence it might be a possible cause of replicative stress.

As an intrinsic survival mechanism, the autophagy is intensified in response to systemic imbalance triggered by HRAS^{G12V} activity. Through the autophagy defective subline, we showed that that mechanism both delays the increase of oxidative species and avoids their elevation to catastrophic highlevels. Furthermore, autophagy could strongly contribute to the recycling of basic substrates such as nucleotides, which might be mitigating the replicative stress.

Nowadays, there is a debate on the role of autophagy promoting either malignant transformation or cell death depending on metabolic context. In this work, we showed an instance of the interaction between E6E7 and HRAS^{G12V} triggering autophagy pro-survival mechanisms and hence increasing general cell viability.

Key words: RAS, Autophagy, keratinocytes, E6E7, oncogenic stress.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1- INTRODUÇÃO	19
1.2 - Ciclo celular e Transformação maligna	20
1.3 - Câncer Cervical e HPV	24
1.4 - Queratinócitos	27
1.5 - A oncoproteína RAS	29
1.5.1 - RAS, isoformas e atividade	29
1.5.2- RAS, mutação e transformação maligna	33
1.6 – RAS, o seu próprio vilão: o papel da oncoproteína no desequilíbrio sistêmico ..	34
1.6.2 - Estresse Oncogênico	34
1.6.3- RAS, estresse replicativo e mitogênico.....	35
1.7 – Autofagia	39
1.7.2 - Maquinaria e Fluxo Autofágico.....	40
1.7.3 - Autofagia, RAS e Transformação maligna	43
2 – OBJETIVOS.....	46
2.1 – Objetivos Gerais.....	46
2.2 – Objetivos Específicos.....	46
3 - MATERIAIS E MÉTODOS:.....	47
3.1 - Culturas de células	47
3.1.2 - Sublinhagem parental: queratinócitos basais imortalizados por E6E7	47
3.1.4 - Sublinhagens constitutivas (SLCs): queratinócitos E6E7 que expressam a oncoproteína HRAS ^{G12V} constitutivamente.	49
3.1.5 - Sublinhagens constitutivas (SLKs): queratinócitos E6E7 que expressam a oncoproteína KRAS ^{G12V} constitutivamente.	49

3.1.6 - Sublinhagens induzíveis (SLis): queratinócitos E6E7 transduzidos com a construção ER:HRAS ^{G12V} , cuja forma ativada, ER:HRAS ^{G12V} -GTP, é induzida por 4-hidroxitamoxifeno (4OHT).....	49
3.1.7 - Sublinhagens defectivas para Autofagia (Δ ATG7): permitiram testar o papel do mecanismo frente à indução de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP	52
3.1.8 - A sublinhagem SLi3.2 tratada por longo tempo e de maneira sustentável com 5 e 10nM 4OHT deram origem a sublinhagens refratárias a alta concentrações de 4OHT (LTE.5 e LTE.10).....	54
3.2 - Produção dos RNAs guias para CRISPR/Cas9	54
3.3- Produção do sobrenadante retroviral pBabepuro.	55
3.4 - Produção de sobrenadante lentiviral LentiCRISPR	55
3.5 - Transdução	56
3.6 - Curvas de crescimento.	56
3.7 - Curvas de densidade máxima de saturação.	57
3.8 - Western Blot – SDS PAGE	57
3.8.1 - Quantificação de proteínas / Western Blot / SDS PAGE.	57
3.8.2 - Quantificação de Bandas de <i>Western Blot</i> na máquina UVITEC e programa <i>Alliance</i> [®]	58
3.9 - <i>Pull down</i> de RAS-GTP	62
3.9.1 - Separação de HRAS-GTP por ligação específica ao domínio ligante de Ras-GTP (RBD) de Raf1, comumente chamado “ <i>Ras-GTP pull down assay</i> ”	62
3.9.2 - Produção e purificação de GST-RBD (Glutathione-S-transferase – RAS-GTP <i>Biding Domain</i>)	64
3.10 - Reações moleculares com ácidos nucleicos.....	65
3.10.1 - Transcrição Reversa (RT).....	65
3.10.2 - PCR quantitativo	66
3.11 - Citometria de fluxo	66
3.11.2 - Ciclo celular	67
3.11.3 - Morte e sobrevivência celular	67

3.11.4 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (EO)	69
3.12 - Imunofluorescência	69
3.12.2 - Ensaio de exposição de simples fita de DNA (ssDNA assay)	70
3.12.3 - TUNEL	70
3.13 - Medição da concentração de lactato	71
3.14 - Análise estatística	72
4 - RESULTADOS	74
4.1 - Altos níveis de expressão de HRAS ^{G12V} em queratinócitos imortalizados por E6E7 geram estresse oncogênico de fenomenologia complexa	74
4.2 - As sublinhagens SLi1.3 e SLi3.2 permitem modular o fenômeno de estresse oncogênico causado por HRAS ^{G12V}	78
4.3 - Células SLi3.2 permitem evidenciar mecanismos moleculares homeostáticos conectando subsistemas de controle do estresse provocado por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP	85
4.4 - Altos níveis de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP em células SLi3.2, causam bloqueio da progressão G1→S e acúmulo da população em G2/M seguida de morte celular por necrose	88
4.5 - A resposta sistêmica das células SLi3.2 à indução sustentada de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP envolve estresse replicativo e quebra de dupla fita de DNA	91
4.6 - O progressivo estresse oxidativo é a principal resposta sistêmica à indução de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP	97
4.7 - A indução de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP intensifica a atividade autofágica contribuindo para a sobrevivência celular	104
4.8 - Autofagia promove aumento da viabilidade celular mediante ao estresse oncogênico causado por altos níveis de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP	109
4.9 - A autofagia conecta temporalmente estresse oxidativo e dano no DNA	115
5 - DISCUSSÃO	119
5.1 - HRAS ^{G12V} -GTP, Dr Jekyll e Mr Hyde da transformação maligna	119

5.2- O estresse oncogênico provocado por HRAS ^{G12V} -GTP é composto por estresses mitogênico, replicativo e oxidativo	125
5.2.2 - O estresse mitogênico e replicativo caracterizam parte dos bloqueios da transição G1→S e G2/M.	127
5.2.3- O estresse oxidativo provoca dano no DNA responsável pela queda de viabilidade celular.....	129
5.3 - A autofagia combate principalmente o estresse oxidativo causado por HRAS ^{G12V} -GTP	132
5.4 - O Papel da autofagia no estresse oncogênico desencadeado pela atividade de HRAS ^{G12V}	135
6 – CONCLUSÃO	139
7 - REFERÊNCIAS	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principais eventos envolvidos na progressão do ciclo celular e suas fases..	23
Figura 1.2. Queratinócitos.....	29
Figura 1.3. As principais vias efetoras de RAS.....	31
Figura 1.4. RAS, homologia, isoformas e mutações.....	32
Figura 1.5. RAS e seus moduladores.....	34
Figura 1.6 Geração de espécies reativas de oxigênio EO.....	38
Figura 1.7. Autofagia.....	43
Figura 3.1. A combinação de tratamento EGF mais extrato de pituitária bovina é a condição ideal para crescimento dos queratinócitos.....	49
Figura 3.2. Expressão induzível de ER:HRAS ^{G12V} nas SLis e esquema de ação do indutor 4OHT.....	52
Figura 3.3. Indução com 4-OHT também provoca aumento da expressão do mRNA de HRAS em queratinócitos transduzidos com E6E7 de HPV16.....	53

Figura 3.4. O complexo ER:HRAS ^{G12V} pode ser diferenciado da proteína endógena HRAS ^{WT} pela massa.....	54
Figura 3.5. O indutor 4OHT é inócuo em concentrações entre 5nM e 100nM tanto em células parentais como no controle ER:Ø.....	55
Figura 3.6. 40 µg de proteína total é a massa ideal para extrair dados com maior precisão no método de quantificação de bandas para <i>western blot</i> adotado nesta tese.....	61
Figura 3.7. As células mortas aparecem predominantemente na área de dupla marcação.....	69
Figura 3.8. O controle positivo para incorporação do análogo de timidina nos ensaios de BrdU nativo é realizado por meio da desnaturação do DNA com HC.....	72
Figura 4.1. Níveis constitutivamente altos de HRAS ^{G12V} selecionam negativamente queratinócitos imortalizados.....	76
Figura 4.2. Níveis baixos de HRAS ^{G12V} proporcionam aos queratinócitos características de células em estágio inicial de transformação.....	78
Figura 4.3. Queratinócitos transduzidos com KRAS ^{G12V} constitutivo apresentam morfologia homogeneia durante todo o período de seleção.....	79
Figura 4.4. A saturação da atividade de RAS, na forma de ER:HRAS ^{G12V} -GTP, é atingida muito antes que a saturação da indução da proteína total na forma de ER:HRAS ^{G12V}	82
Figura 4.5. A sublinhagem SLi3.2 induzida por 50 e 100nM de 4OHT atingem níveis de HRAS ^{G12V} próximos aos das culturas instáveis que originaram as SLcs.....	83
Figura 4.6. Baixa indução ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP permite proliferação celular sem aumentar a densidade de saturação.....	84
Figura 4.7. O aumento da indução de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP provoca vacuolização celular ilustrada pelo eixo SSC (<i>Side Scatter</i>) em gráficos de citometria de fluxo.....	85
Figura 4.8. Origem das sublinhagens LTE.5 e LTE.10.....	87
Figura 4.9. Processo de seleção da LTE.5 provoca redução no potencial de indução por adaptação ao indutor 4OHT, porem ganho proliferativo e maior densidade de saturação quando induzida com 50nM de 4OHT.....	88
Figura 4.10. Altos níveis de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP nas SLi3.2 bloqueiam a	90

progressão G1→S e causam acúmulo de população em G2/M.....

Figura 4.11. Altos níveis de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP causam morte celular progressiva, que é agravada no sexto dia de indução.....	91
Figura 4.12. A atividade mitogênica e de controladores sinalizam para a progressão do ciclo celular.....	92
Figura 4.13. Indução de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP gera progressiva exposição de trechos de simples fita de DNA.....	95
Figura 4.14. Altos níveis de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP causam dano no DNA.....	96
Figura 4.15. ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP provoca aumento de espécies reativas de oxigênio em dependência de dose.....	99
Figura 4.16. Antioxidante MnTBAP não protege os queratinócitos do estresse oxidativos provocado por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	100
Figura 4.17. Antioxidante NAC aumenta a viabilidade dos queratinócitos submetidos ao estresse sistêmico causado por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	102
Figura 4.18. Autofagia é ativada em resposta ao estresse oxidativo provocado por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	103
Figura 4.19. NAC ameniza a resposta de dano que expõe fitas simples DNA causado por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	104
Figura 4.20. A atividade autofágica é intensificada em resposta ao aumento da expressão de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	107
Figura 4.21. Autofagossomos não processados são parte importante do aumento de complexidade celular induzida por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	108
Figura 4.22. A autofagia não é intensificada para processar ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP induzido.....	109
Figura 4.23. Indução de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP provoca acúmulo de conteúdo autofágico devido sua intensa atividade, que sugere ser independente de mTORC.....	111
Figura 4.24. O bloqueio químico da autofagia com Cloroquina acelera e intensifica a citotoxicidade causada por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	112
Figura 4.25. Autofagia ameniza o estresse sistêmico causado por ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP em queratinócitos, aumentando sua viabilidade.....	114

Figura 4.26. Autofagia promove sobrevivência de queratinócitos por retardar e diminuir a geração de EO promovida pela indução de ER:HRAS ^{G12V} /ER:HRAS ^{G12V} -GTP.....	117
Figura 5.1. Resumo das sublinhagens geradas e seus destinos de acordo com o nível de expressão de HRAS ^{G12V}	121
Figura 5.2. A curva dose-resposta de 4OHT mostra padrões de expressão diferentes para cada uma das espécies de ER:HRAS ^{G12V} quando induzidas por diferentes [4OHT].....	123
Figura 5.3. O estresse oncogênico desencadeado por RAS ocorre a partir de certo limiar de ativação na forma ER:HRAS ^{G12V} -GTP que é amenizado pela retirada de estímulos mitogênicos.....	124
Figura 5.4. Esquema sugerindo modelo de como HRASG12V-GTP desencadeia os diferentes tipos de estresse que acarretam em morte celular, propondo a fase do ciclo em que eles são prevalentes.....	127
Figura 5.5. Tratamento com desoxinucleosídeos protege queratinócitos induzidos da morte, recuperando parcialmente sua proliferação.....	131
Figura 5.6. Como as espécies reativas de oxigênio, provocadas pela atividade de ER:HRASG12V, podem intensificar a autofagia.....	137
Figura 6.1. Caminho de queratinócitos imortalizados por E6E7 até seu destino final quando submetido a atividade de HRAS ^{G12V}	141

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Incidência de RAS, e suas diferentes isoformas, em câncer humano.....	27
Tabela 3.1. Lista de sublinhagens geradas para a realização dos experimentos.....	48
Tabela 3.2. Guias usados para gerar linhagens defectivas para autofagia.....	56
Tabela 3.3 Lista de anti-corpos utilizados na Tese.....	64
Tabela 3.4. Lista de <i>primers</i> utilizados nos experimentos de qPCR.....	67

1- INTRODUÇÃO

A tumorigênese envolve a aquisição de uma série de alterações genéticas e/ou epigenéticas que ao longo do tempo se acumulam podendo acarretar em transformação maligna. Algumas mutações, as mais frequentes nos diferentes tipos de tumores, são responsáveis por guiarem as células em direção a um fenótipo maligno, por isso sendo chamadas de “*driver mutations*”, ou simplesmente “*drivers*”. Este direcionamento ocorre pela instabilidade genética causada por estes “*drivers*” que aumentam a taxa global de mutações celulares (BECKMAN; LOEB, 2006).

A grande rede molecular de sinalização que controla a homeostase celular contém múltiplos subsistemas dedicados a contrabalançar situações de estresses específicos, como aqueles promovidos pelas diversas mutações. Na maior parte das vezes, a robustez de subsistemas anti-estresse é suficiente para reequilibrar a homeostase local e preservar a sobrevivência celular. Porém, em raras ocasiões um desequilíbrio homeostático localizado progride até uma situação limite, na qual a célula ou é eliminada por morte programada ou sobrevive em estado patológico com grande chance de evoluir para uma doença que comprometerá a saúde e a sobrevivência do organismo.

Os subsistemas homeostáticos celulares agem com autonomia para contrabalançar estresses específicos, mas seu desequilíbrio pode propagar para outros “compartimentos metabólicos” e eventualmente para desequilíbrios sistêmicos. Não obstante, a reação celular à propagação de desequilíbrios metabólicos ameaçadores é finamente orquestrada, um bom exemplo disso é o subsistema autofágico que atua exatamente na manutenção da homeostase celular.

Entretanto, os principais “*driver mutations*”, ocorrem em genes que possibilitam fuga dos sensores de resguardo, que disparam a reação celular mencionada anteriormente, e/ou adição em vias mitogênicas que são ativadas independentes de estímulos externos. A janela gerada entre a aquisição dos “*drivers*” e de novas mutações em uma célula pré-maligna pode mostrar os principais pontos de vulnerabilidade daquele tipo celular.

No câncer, mutações com ganho de função em oncogenes geram oncoproteínas potencialmente “*drivers*” de tumorigênese; por outro lado, mutações com perda de função em genes codificadores de supressores de tumor eliminam a ação destas proteínas e facilitam a atividade das oncoproteínas “*drivers*” de

tumorigênese. O aumento na razão oncoproteínas/supressores de tumor gera um estado crônico disfuncional de estresse oncogênico, cujo limite é morte celular programada ou transformação celular maligna. Um bom exemplo é o caso da oncoproteína RAS (*rat sarcoma*) que, quando mutada, apresenta um potencial mais deletério do que tumorigênico, mas ainda assim é a oncoproteína mais encontrada em tumores sólidos.

Para isso RAS possui muitas peculiaridades que são essencialmente ligadas as suas isoformas e diferentes tipos de mutações. Porém, ao mesmo tempo em que ocorre um crescimento exponencial de artigos mostrando a importância de KRAS (Kirsten RAS) nos mais diferentes tipos de tumores, é cada vez menos frequente a publicação de artigos que exploram o HRAS (Harvey RAS), isoforma cuja incidência global em câncer é menor (MALUMBRES; BARBACID, 2003). Este decrescente investimento em HRAS deixa em aberto uma série de perguntas, tais como: em que condições HRAS é uma oncoproteína mais tumorigênica do que as outras isoformas?

Esta pergunta se torna ainda mais importante porque uma parcela grande da população sofre com tumores que apresentam uma relação peculiar entre HRAS e transformação maligna, principalmente nos casos de câncer cervical, de cabeça e pescoço e trato urinário. O mais intrigante é que nos dois primeiros casos o tipo celular mais atingido são os queratinócitos e em ambos existe uma incidência muito grande de infecção por HPV (*Human Papillomavirus*) (LAWRENCE et al., 2015; LEONCINI et al., 2014), mostrando uma correlação muito forte entre queratinócitos-HRAS-HPV.

Partindo dessas considerações o foco desta tese de doutorado é separar os mecanismos que inibem a transformação celular daqueles que as promovem, nos quais o principal “*driver*” é o HRAS^{G12V} cuja expressão será imposta e controlada em queratinócitos humanos imortalizados por E6E7, proteínas de HPV16. Como mostraremos nos capítulos subsequentes, tal abordagem permitiu expor as vulnerabilidades e/ou adição a vias de resguardo, como a autofagia, frente ao estresse oncogênico causado pela oncoproteína.

1.2 - Ciclo celular e Transformação maligna

As células são a unidade básica funcional de “todos” os organismos vivos. Em um organismo complexo elas compõem os diversos órgãos e tecidos, já em

organismo unicelular ela é o todo. Em ambos os casos as células passam pelo mesmo fundamental e orquestrado processo proliferativo: O Ciclo Celular.

O ciclo celular pode ser dividido em cinco etapas (Figura 1.1): G1- fase de crescimento celular, na qual ocorre toda a preparação da duplicação do DNA e de conteúdo citoplasmático. Dentro de G1 pode ocorrer um desvio para G0 que é um estado de quiescência, reversível, sendo refúgio de células sem estímulo proliferativo; S- fase de síntese de material genético, durante a qual, todo o conteúdo de DNA é duplicado para ser dividido igualmente entre as células filhas; G2- segunda fase de preparação, mas agora para a divisão celular, também é uma importante fase de verificação da qualidade de replicação do DNA; M- Fase na qual ocorre a mitose propriamente dita.

A progressão no ciclo celular é criticamente controlada pelos pontos de verificação (*checkpoints*) que são distribuídos em suas diferentes fases (Figura 1.1). Os *checkpoints* impedem, por exemplo, que células sem reservas energéticas suficientes entrem em S, ou que células que carreguem dano no DNA progridam em qualquer fase do ciclo.

No caso das mutações, quando um dado ponto de verificação falha ao não identificar o problema, as células progridem no ciclo celular até o ponto de verificação subsequente carregando este “defeito”; na grande maioria das vezes, o problema será identificado por outros sistemas de resguardo, que por sua vez levarão essas células à morte. Por outro lado, quando a mutação carregada não é suficientemente deletéria e atribui vantagem de alguma natureza, ocorre um estado de instabilidade genética que gera mutações adicionais. No caso de um oncogene e/ou supressor de tumor, tal sucessão de eventos pode dar origem a uma população de células malignamente transformadas. Em um órgão ou tecido as células transformadas crescem indefinidamente, atrapalhando as funções fisiológicas das outras células e, no limite, gerando o famigerado câncer.

evasão do sistema imune; promoção de fatores pró-inflamatórios e instabilidade genômica (HANAHA; WEINBERG, 2011).

Dentro deste contexto, existem dois atores fundamentais na transformação maligna, já mencionados anteriormente: os supressores de tumor e os oncogenes. Os supressores de tumor ajudam a regular o ciclo celular equilibrando o estímulo mitogênico recebido para que as células não acelerem ou progridam no ciclo quando não há capacidade para tal. Muitos deles são verdadeiros vigilantes da integridade do ciclo, dirigindo células que apresentam sinalizações anômalas aos diversos tipos de morte, tais como a necrose e a apoptose. Genericamente, qualquer tipo de gene que impeça o avanço de uma célula normal a um estado transformado é um supressor de tumor; porém, por convenção essa nomenclatura só é dirigida a genes que, além da característica citadas, estão mutados e/ou anormalmente expressos nos diferentes tipos de câncer. Sendo assim, os supressores de tumor mais importantes são o TP53, PTEN e pRb, todos eles participando ativamente no bloqueio do ciclo celular quando necessário. Listamos na tabela 1.1 os supressores de tumor mais importantes, de acordo com a frequência de mutação em que eles são encontrados em tumores.

Os oncogenes por sua vez não são responsáveis por inibição do ciclo, muito pelo contrário, esses genes, quando mutados ou superexpressos, disparam sinalização de vias mitogênicas ou são efetores de vias de sobrevivência, e funcionam independentemente do estímulo à montante, forçando a progressão no ciclo. Dentre os oncogenes mais importantes nos diversos tipos de câncer estão PI3KCA, BRAF e o Ras.

Em células patológicas, o estado estacionário entre atividade de oncogenes e inatividade de supressores de tumor irá determinar o destino celular. Este balanço dificilmente é alcançado, gerando estresse oncogênico, recrutamento de subsistemas de sobrevivência e consequente morte. Todavia, esse estado pode ocorrer em alguns casos, deixando pistas de padrões de vulnerabilidades e/ou robustez que estão ligados essencialmente às mutações envolvidas e ao tipo celular. Neste contexto o câncer surge principalmente como uma doença de ciclo celular com padrões específicos para cada tipo de célula a que ele acomete, assim como para cada tipo de mutação que ele carrega. Por esta razão entender como algumas mutações interagem com outras em determinado tipo celular pode expor a diferença entre morte e progressão no ciclo de células malignas.

Tendo estes conceitos em mente o modelo experimental adotado nesta tese é uma linhagem de queratinócitos originada de um “pool” de prepúcios humanos imortalizada pelas oncoproteínas virais E6 e E7 de HPV16. Esta linhagem foi derivada dos queratinócitos da camada basal da epiderme, que proliferam constantemente através de uma divisão assimétrica pela qual uma célula filha continua proliferando enquanto a outra se destina a diferenciação terminal.

Os queratinócitos E6E7 mantêm a maior parte das características do tecido de origem, por exemplo, eles exigem um meio de cultura específico, e em cultura organotípica mimetizam a organização histológica da epiderme, e em monocamada proliferam de maneira linear lembrando a divisão assimétrica dos queratinócitos epidérmicos. Por outro lado, esta linhagem exibe uma disfunção no controle do ciclo celular decorrente do método adotado em sua imortalização, ou seja, as proteínas E6 e E7 inativam total ou parcialmente, respectivamente, os supressores de tumor p53 e pRb. Dessa forma é uma linhagem de queratinócitos parcialmente permissiva à ação transformadora de oncoproteínas. Por tudo isso, esta linhagem celular se prestou bem aos objetivos desta tese, cujo foco original era expor e caracterizar os mecanismos intrínsecos de resistência de queratinócitos imortalizados por E6 e E7 à ação transformadora da oncoproteína HRAS^{G12V}.

1.3 - Câncer Cervical e HPV

O câncer cervical é apontado como o terceiro tipo de câncer mais prevalente em mulheres no mundo, além de ser o quarto maior responsável por mortes ligadas à doença no gênero (JEMAL; DESANTIS; WARD, 2010; ARKIN et al., 2001). Durante a década de 1990 estudos epidemiológicos, com uso de tecnologias mais avançada de biologia molecular, começaram a mostrar por meio de dados confiáveis o que já se suspeitava desde a década de 1970: a infecção por HPV é o fator mais importante no desenvolvimento do câncer cervical. Atualmente são encontrados traços do DNA do vírus em uma proporção entre 70 e 90% das amostras de tecidos provenientes de lesões cancerosas e pré-malignas (WALBOOMERS et al., 1999). Em 2008 Harald Zur Hausen foi laureado prêmio Nobel pelo seu esforço em desvendar os mecanismos pelos quais o HPV é responsável por este processo (HAUSEN, 1996).

O HPV é um vírus oportunista que ataca queratinócitos basais tanto de superfícies cutâneas como de mucosas (MCMURRAY et al., 2001). O genoma de HPV é constituído por uma molécula de DNA circular dupla fita, compreendendo seis genes de expressão tardia, importantes na replicação e constituição do vírus, e dois de expressão imediata que especificamente interferem no controle do ciclo celular e da diferenciação de queratinócitos (VAN DOORLAER; BURK, 2010).

Foram descritos 130 tipos de HPV, identificados e classificados por sequenciamento de genoma. A maior parte deles causam lesões ou hiperplasias cutâneas benignas, compondo o chamado grupo de baixo risco; por outro lado, uma minoria, da qual são protótipos os HPVs 16 e 18 (ALONIO et al., 2003), é conhecida como grupo de alto risco por ser precursora de câncer cervical; dentro dessa minoria, HPVs 16 e 18 são encontrados em amostras desse tipo de câncer em uma proporção de 57% e 16%, respectivamente (CROSBIE et al., 2013). Ambos os tipos de HPV também são caracterizados pela alta atividade das proteínas E6 e E7, que são potencialmente carcinogênicas (LIZANO; BERUMEN; GARCIA-CARRANCO, 2009).

A atividade biológica das proteínas E6 e E7, codificadas pelos genes de expressão precoce de HPV, é largamente estudada, por ser responsável pela alteração do ciclo de vida dos queratinócitos basais, evitando sua diferenciação e promovendo proliferação indefinida. Este processo é caracterizado como um estado de imortalização celular que diferentemente de transformação celular precisa muito mais da influência de fatores de crescimento para induzir proliferação (DUENSING et al., 2000).

A proteína E6 se liga especificamente ao supressor de tumor p53, promovendo degradação mediada pela via de ubiquitina. Consequentemente p53 tem sua capacidade de induzir apoptose diminuída, provocando maior resistência a dano no DNA e outros tipos de estresse celular. A expressão de E6 de HPV16 também foi associada ao aumento da expressão de *hTERT*, um evento que dificulta o encurtamento dos telômeros dos queratinócitos basais dando a estes mais robustez frente a mecanismos de senescência (VELDMAN; HORIKAWA; BARRETT, 2001).

Tabela 1.1. Incidência de RAS, e suas diferentes isoformas, em câncer humano.

Genes mutados encontrados com maior frequência ^A				
Genes	Banco de dados			
	COSMIC		ICGC data portal	
	%			
TP53	29		30,7	
PI3KCA	11,7		14,2	
BRAF	19,5		11,6	
KRAS	21,1		10,2	
HRAS	3,1		1,9	
NRAS	5,6		4,1	
Pan RAS	29,8		16,2	
Tecido	Isoforma de RAS ^B			
	HRAS	KRAS	NRAS	Pan RAS
Cervical	8±2	7±1	2±1	16±4
Trato genital	1	8	3	12
Pênis	7	3	0	10
Testículo	4	4±1	3±1	9±2
Vulva	7	4	0	11
Cabeça e pescoço	20	2	0	22
Paratireóide	1	0	0	1
Glândula Salivar	15±2	3±1	0	18±3
Tireóide	4±1	2±1	7±1	13±1
Trato aerodigestivo	9±2	3±1	3	16±1
Trato urinário	11±1	5±1	1	17±3
Bexiga	9	4	0	13
Próstata	5±2	6±3	1	14±3
Pulmão	1	17±1	1	19±1
Pâncreas	0	59±2	2	60±2
Pele	6±1	3±1	18±2	27±1
Estômago	4	6	2	12

^AGenes mutados encontrados em maior frequência em câncer humano. Informações baseadas em dois bancos de dados mundiais de amostras de tecidos tumorais sequêciadas de pacientes: COSMIC e ICGC conforme Cox A. *et al.* 2014.

^BFrequencia das diferentes isoformas de RAS encontradas mutadas em diferentes tipos de câncer humano. Os números representam a média e o desvio padrão de quatro fontes de dados: Stephen et al. 2014; Karnoub et al. 2008; Pylayeva-Gupta et al. 2011 e o levantamento realizado no banco de dados COSMIC em fevereiro de 2017 (COSMIC fev 2017 <http://cancer.sanger.ac.uk>). Em vermelho tecidos com maior incidencia de HRAS mutado.

No caso da proteína E7 ocorre associação com outra proteína supressora de tumor, pRb (retinoblastoma). pRb é degradada liberando o fator de transcrição E2F

importante para a transição G1→S do ciclo celular. Uma vez expressa, E7 causa a desregulação do ciclo celular, permitindo a síntese de DNA inclusive de queratinócitos diferenciados que a priori haviam perdido essa capacidade (MCLAUGHLIN-DRUBIN; MÜNGER, 2009). A proteína E7 de HPV16 também tem sido ligada à duplicação de centrôssomos sem que ocorra mitose celular, um evento que é importante gerador de aberrações cromossômicas ligadas a infecção pelo vírus (DUENSING et al., 2000).

Estas características inativadoras de E6 e E7 sinergicamente causam a desregulação do ciclo celular e a imortalização de queratinócitos primários, gerando sublinhagens permanentes em cultura celular. Embora a expressão constitutiva de E6 e E7 não seja suficiente para causar transformação maligna em queratinócitos (KLAES et al., 1999), a expressão de ambas as proteínas contribuem diretamente para o surgimento de mutações adicionais que sinergicamente são responsáveis pelos primeiros estágios da transformação maligna.

1.4 - Queratinócitos

Os queratinócitos são as células mais importantes da epiderme, epitélio escamoso pluriestratificado dividido em quatro camadas: basal, espinosa, granulosa e córnea (Figura 1.2A). Ao longo dessas camadas as células sofrem diferenciação terminal induzida principalmente por Ca^{2+} . Também ocorre expressão diferencial de queratinas que vão interferir diretamente na função da camada correspondente (FUCHS, 1990).

As três camadas superiores são altamente especializadas e responsáveis pela linha de frente na defesa do tecido de revestimento, principalmente contra desidratação e invasão de organismos oportunistas. A manutenção das camadas superiores, já que essas são incapazes de proliferar, é realizada pela camada basal onde habitam queratinócitos não diferenciados com intenso potencial proliferativo (LIPPENS et al., 2005).

Figura 1.2. Queratinócitos: **A.** Cultura organotípica de queratinócitos de prepúcio de recém-nascido. A cultura tridimensional apresenta a organização das camadas de queratinócitos em diferentes estágios da diferenciação (imagem retirada de Fuchs 1990); **B.** Microscopia (40x) de cultura bidimensional de queratinócitos isoladas do mesmo tecido, porém imortalizadas por E6E7. Esta foto representa as células parentais que foram usadas nesta tese para dar origem a todas as sublinhagens.

Queratinócitos basais são largamente utilizados para experimentação *in vitro* justamente por permitirem a amplificação de gerações de culturas primárias, desde que sejam mantidos em meio de cultura com composição adequada em baixa concentração de Ca^{2+} e com adição de fatores de crescimento (*GFs*, *Growth Factors*) tais como fatores de crescimento de fibroblastos (*FGFs*, *Fibroblast Growth Factors*) e fatores de crescimento de epiderme (*EGFs*, *Epidermal Growth Factors*). Culturas deste tipo se mostraram muito eficientes para desvendar mecanismos moleculares importantes no desenvolvimento biológico do tecido, principalmente em se tratando do processo de diferenciação celular, controle do ciclo e da evolução de doenças como o câncer (FUSENIG; BOUKAMP, 1998).

Apesar de EGF ter condições de prolongar a vida útil de queratinócitos primários em cultura, aumentando o número de passagens máximas de 10 para 15, raramente ocorre imortalização espontânea, “regra” que é quebrada pelos poucos relatos na literatura de queratinócitos “espontaneamente” imortalizados como no caso da HaCaT (FUSENIG; BOUKAMP, 1998). Com o objetivo de prolongar a vida útil de queratinócitos basais em cultura, inúmeras estratégias moleculares são utilizadas; por exemplo, a super-expressão da telomerase humana (hTERT) e, principalmente, a imortalização por transdução de genes de HPV E6 e E7.

Desde a década de 1980, a interação entre E6E7 com outras oncoproteínas tem sido usada como modelo de estudo (DURST; GALLAHAN; JAY, 1989). Este processo começa com a introdução de E6E7 em queratinócitos primários basais que se tornam imortalizados; posteriormente, estas células são desafiadas por meio da introdução de oncoproteínas fortes como a RAS. Este modelo é amplamente aceito como uma estratégia que mimetiza *in vitro* a evolução do câncer cervical que ocorre *in vivo* (NARISAWA-SAITO et al., 2008, 2012).

1.5 - A oncoproteína RAS

1.5.1 - RAS, isoformas e atividade

Ras foi o membro fundador de uma super-família de cinco membros de pequenas GTPases monoméricas que controlam uma série de atividades celulares como: progressão no ciclo, sobrevivência, migração e morte. A subfamília RAS é composta por quatro isoformas: K- (KRAS4a e KRAS4b), NRAS (Neuroblastoma RAS) e HRAS responsáveis por conectar a transdução de sinal, provenientes de RTKS (receptores do tipo tirosina quinase por exemplo FGFRs e EGFRs) ou GPCRs (receptores acopladas a proteína G), a cascatas de proteínas quinases (exemplo: Raf/MEK/ERK ver figura 1.3 para as principais vias efetoras de RAS) (MCCUBREY et al., 2012).

As quatro isoformas de RAS compartilham mais de 90% de homologia, se distinguindo apenas em uma região chamada de hipervariável (HRV) (Figura 1.4A). Esta região se localiza no C-terminal e será responsável pela localização da proteína nas variadas membranas que habitam o citoplasma devido ao seu processamento

pós-traducional diferencial, que é fundamental para sua ativação (Figura 1.4B) (PRIOR; HANCOCK, 2001).

A localização do RAS é determinante para sua atividade, sendo que a mesma isoforma pode sinalizar diferencialmente vias efectoras, gerando destinos celulares distintos de acordo com a membrana a qual está ligado (HANCOCK, 2003). Por exemplo, KRAS ligado à membrana plasmática gera transformação celular, porém quando ancorado a membrana da mitocôndria promove apoptose (BIVONA et al., 2006). No caso de HRAS, que também pode se ligar tanto ao complexo de Golgi quanto ao retículo endoplasmático, ocorre transdução de sinal via RAS/Raf/ERK apenas quando está associado ao segundo compartimento, também gerando transformação (CHIU et al., 2002). Estes relatos mostram o caráter específico da atividade de RAS cujas isoformas são encontradas expressas em diferentes concentrações em tecidos e nos diferentes tipos de tumores.

Figura 1.4. RAS, homologia, isoformas e mutações: **A.** Estrutura linear de RAS apresentando em destaque região homóloga e a região C-Terminal de ligação a membrana, esta última que constitui o trecho hipervariável entre as isoformas da oncoproteína. Na região homóloga, destacamos em amarelo os três códons, 12, 13 e 61 constituintes do sítio catalítico de RAS, que são encontrados mutados em maior porcentagem nos mais diferentes tipos de câncer. Na região hipervariável, destacamos em verde os resíduos de Cisteína que são palmitoilados; notem que a isoformas KRAS4B, que não sofre tal processamento, não possui este resíduo. Também em destaque o peptídeo sinal, em C-terminal, de todas as isoformas que seguem o mesmo motivo, CAAX: cisteína, dois resíduos alifáticos e outro resíduo qualquer. A cisteína, colorida de vermelho, é farnesilada em sua cadeia lateral SH; **B.** Processamento de C-terminal das isoformas de RAS. Como primeiro passo do processamento de RAS a enzima

FTase (Farnesiltransferase) liga covalentemente um motivo farnesil pirofosfato (triângulo vermelho F) na cadeia lateral do resíduo de cisteína da proteína citoplasmática nascente. Este processo é acompanhado, no retículo endoplasmático, da clivagem proteolítica dos últimos três resíduos de amino ácido (AAX) catalisado pela enzima RCE1 (conversora de RAS 1), e da carboximetilação da cisteína, catalisada por ICMT1 (Isoprenil cisteína carboxilmetiltransferase). A partir de então a isoforma KRAS-4B pode se ligar às diversas membranas citoplasmáticas, podendo assim ser ativada, sem necessidade adicional de processamento. Nas outras isoformas (H- N- e KRAS-4A) a PTase (palmitoiltransferase) catalisa a ligação de um motivo palmitoil (P em verde) na mesma cisteína terminal, possibilitando então a ligação com as membranas celulares e só assim ser ativada.

Bioquimicamente, as proteínas do tipo RAS são GTPases (i.e., enzimas que catalisam a hidrólise de guanosina trifosfato - GTP), mas em redes de sinalização celular desempenham uma função de interruptor *on/off* por meio de uma alternância entre dois estados: ativo, quando ligado a GTP e inativo, quando ligado a GDP (guanosina difosfato). Duas classes importantes de proteínas estão funcionalmente ligadas ao RAS atuando como principais moduladoras de sua atividade: as GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) e as GAPs (*GTPase activating proteins*) (Figura 1.5).

As GEFs mais conhecidas são as da família RASGRPs (RAS *guanilyl releasing proteins* 1, 2, 3 e 4), RASGRFs (RAS *guanine nucleotide releasing factors* 1 e 2) e as SOSs (*Son of sevenless* 1 e 2) responsáveis por conectarem o estímulo proveniente das RTKs e GPRCs ao RAS por meio da GRB2 (*Receptor bound protein* 2). Basicamente, após a estimulação de vias à montante de RAS, as GEFs catalisam a troca de GDP por GTP no sítio de atividade de RAS, iniciando a propagação do sinal.

No caso das GAPs, com destaques para as da família RASA (Ras *GTPase activating protein* 1, 3 e 4) e principalmente a NF1 (*Neurofibromin*), a interação no sítio de atividade de RAS aumenta a atividade GTPase intrínseca da oncoproteína aumentando a velocidade de hidrólise do GTP em GDP em aproximadamente seis vezes, interrompendo a sinalização à jusante (VIGIL et al., 2010).

Figura 1.5. RAS e seus moduladores: Estrutura tridimensional da oncoproteína RAS (Karnoub e Weinberg 2008) em seu estado inativo (RAS-GDP), e ativo (RAS-GTP). Em azul estão listadas as principais GEFs e GAPs que controlam esse “interruptor” molecular.

1.5.2- RAS, mutação e transformação maligna

O fato de haver, em diferentes tipos de tumores e tecidos, prevalência de determinadas isoformas de RAS em detrimento das outras sugere uma sinalização diferencial promovida por essa oncoproteína. Na prática, existe uma forte dependência entre isoforma de RAS e o tipo celular que a carrega, o que justifica estudos como o desta tese de doutorado, que foca em uma versão mutada de uma das isoformas de RAS que é relevante no contexto biológico aqui abordado (KARNOUB; WEINBERG, 2008; OMEROVIC; LAUDE; PRIOR, 2008). RAS mutado é encontrado em uma taxa entre 10-60% nos diferentes tipos de câncer, sendo a

oncoproteína mutada mais abundante dentre os tumores sólidos (STEPHEN et al., 2014). Todavia HRAS aparece como a isoforma mutada mais abundante apenas em três desses tipos de câncer: cervical, trato urinário e carcinoma de cabeça e pescoço (Tabela 1.1).

No caso de câncer cervical, HRAS, aparece mutado em uma taxa entre 8-10%, enquanto KRAS não supera os 8%. Em carcinoma de bexiga humana a frequência de HRAS mutado varia entre 6-9%, já KRAS aparece mutado em uma proporção de 4%. Em câncer de cabeça e pescoço, especificamente para células escamosas (*Head and neck squamous cells carcinoma*), praticamente todos os relatos são de HRAS mutado contribuindo com uma proporção de 8% do total desses casos (COX et al., 2014; OXFORD; THEODORESCU, 2003).

As mutações em RAS com maior frequência em diferentes tipos de tumores estão ligadas aos códons 12, 13 e 61 que habitam o sítio catalítico da oncoproteína (Figura 1.4A). Essas mutações dificultam a hidrólise enzimática de GTP, promovendo ganho de função (i.e., acarretando em altos níveis de RAS ativo), independentemente de sinalização à montante (BOYKEVISCH et al., 2006; PYLAYEVA-GUPTA; GRABOCKA; BAR-SAGI, 2011).

Os diferentes tipos de mutações também aparecem em frequências variadas nos diferentes tipos de tumores, apresentando padrão específico de ativação. Por exemplo, em linhagens de células pulmonares transformadas, enquanto as mutações G12C e G12V ativam preferencialmente a via de RalGDS, a mutação do tipo G12D ativa preferencialmente as vias de Raf/MAPK e Raf/PI3K. (IHLE et al., 2012).

1.6 – RAS, o seu próprio vilão: o papel da oncoproteína no desequilíbrio sistêmico

1.6.2 - Estresse Oncogênico

Felizmente são muito raros os casos em que uma oncoproteína como RAS mutado provoca transformação maligna. As complexas e extensas alterações genéticas que as células, quando passam por processo de transformação, são submetidas forçam o rearranjo de vias proliferativas e de sobrevivência a fim de lidar com a nova configuração celular. Este processo impõe o chamado estresse oncogênico.

O estresse oncogênico é um termo geral para o conjunto de alterações provocadas pela atividade de uma oncoproteína; isso inclui alterações em subsistemas homeostáticos gerando uma nova condição de robustez. Tal estado é inevitável e possui um papel importante na seleção de células transformadas, mantendo condições ideais inclusive após a seleção. Todavia, este mesmo estresse expõe uma série de suscetibilidades que podem ser atacadas de forma conjunta, gerando letalidade sintética (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009).

Para isso, entender como uma oncoproteína gera estresse oncogênico, antes do estabelecimento de um fenótipo tumoral, torna-se uma ferramenta importante para a identificação de possíveis pontos de vulnerabilidade que devem ser superados para que de fato ocorra transformação maligna.

1.6.3- RAS, estresse replicativo e mitogênico

A forte atividade mitogênica desencadeada pela oncoproteína RAS alerta os vários subsistemas de salva-guarda celular, que por sua vez geram um efeito contrário ao da proliferação, bloqueando o ciclo celular em algum dos seus diversos *checkpoints*, no intuito de “corrigir” os problemas gerados pela super-ativação de vias.

Por muito tempo se considerou a atividade mitogênica de RAS a principal característica mutagênica da oncoproteína; porém, existem relatos na literatura que vão de encontro a esta hipótese. A alta atividade de RAS provoca estresse replicativo e mitogênico que alertam o sistema de resposta a dano no DNA (DDR, *DNA damage response*), provocando parada no ciclo seguido de morte ou senescência (BULAVIN et al., 2003). Aparentemente, as características transformantes mais relevantes ligadas a RAS incluem: estratégias de fuga de indução a morte; poder proliferativo mais brando evitando hiperatividade do eixo Raf/MEK/ERK e a instabilidade genética, que propiciam o surgimento de mutações aditivas. (COX; DER, 2003).

A atividade de RAS mutado também pode levar a super-ativação de vias de subsistemas de resguardo que causam adição, como é o caso do aumento da atividade autofágica em várias linhagens transformadas pela oncoproteína (este tema será discutido na seção 1.7). Esta relação mostra um círculo de dependência, expondo uma série de pontos de vulnerabilidades em células portadoras de RAS

mutado, onde o equilíbrio de fatores de pró-sobrevivência é mais importante que a indução proliferativa para gerar um fenótipo maligno mais robusto mediante ao estresse replicativo e mitogênico (HILLS; DIFFLEY, 2014; MARIO; MARTINS; KROEMER, 2011; WHITE, 2012).

1.6.4 - RAS e Estresse oxidativo

Contrariamente à crença mais comum, espécies oxidantes (EO ou mais genericamente ROS), não são das mais perigosas espécies químicas encontradas no metabolismo celular. São da mesma periculosidade vitaminas lipossolúveis, hormônios endócrinos, lípides mensageiros de sinalização, íon ferro, etc. Não por acaso, todas essas espécies químicas participam dos mecanismos de controle do metabolismo e da rede molecular de sinalização garantidores da robustez da regulação fisiológica. Dadas suas funções, não é surpreendente que essas espécies químicas ocorram em concentrações baixas que devem ser mantidas em intervalos de variação rigidamente controlados. Por conseguinte, os mecanismos homeostáticos envolvem múltiplos subsistemas moleculares incumbidos de manter essas espécies químicas potencialmente perigosas em níveis fisiologicamente ótimos. Por outro lado, quando EO, hormônios, lípides sinalizadores, etc. furam os mecanismos de controle e atingem níveis patológicos estressantes podem dar origem a “*drivers*” (GOUGH; COTTER, 2011).

As principais espécies reativas de oxigênio são o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e alguns dos subprodutos das etapas que o oxidam, ao final do processo produzindo água (Figura 1.6A). Este superóxido é decorrente da redução do oxigênio triplete que pode ser enzimática, mediada por NOXs (NADPH oxidases), xantina oxidases, ou por elétrons vazados na cadeia de transporte da mitocôndria. O superóxido é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD), mas alternativamente pode gerar oxigênio singlete (1O_2). Por ultimo, o peróxido de hidrogênio é convertido em água pelas enzimas catalase e glutathione peroxidase. Qualquer problema na disponibilidade ou reciclagem destas duas ultimas enzimas pode acarretar na geração do radical hidroxila ($\bullet OH$) (Wulf, 2002). Já no caso das espécies reativas de nitrogênio a molécula mais importante é o óxido nítrico ($\bullet NO$) produzido por meio da redução da L-arginina por um processo catalisado pela óxido nítrico sintase (NOS, *Nitric Oxide Synthase*). O óxido nítrico é um importante regulador de uma série de vias celulares, porém pode reagir com

outras espécies de oxigênio formando cátion nitroso (NO^+), nitroxil (NO^-) e peróxido nítrico (ONOO^-), que são altamente tóxicos.

Figura 1.6 Geração de espécies oxidantes EO: **A.** Geração de EO. Metabolismo de EO que dá origem a uma série de moléculas responsáveis pela sinalização regulatória do sistema. Estas devem ser mantidas em baixa concentração; caso contrário, são responsáveis por desequilibrar os subsistemas conectados, dando origem ao estresse oxidativo. O superóxido pode ser formado por vazamento de elétrons da cadeia de transporte das mitocôndrias ou por vias enzimáticas. Após sua formação, a super-óxido desmutase rapidamente dá origem ao peróxido de hidrogênio; no entanto,

vias alternativas podem gerar outras espécies reativas como o oxigênio singlete. O peróxido de hidrogênio por sua vez é processado até a formação de água pela ação da catalase e glutathione (GSH) peroxidase, caso contrário também origina outras espécies reativas como a hidroxila. A glutathione oxidada (Glutathione dissulfeto GSSG) é restaurada pela ação da glutathione redutase com o auxílio do aceptor NADPH; **B.** Geração das espécies reativas de nitrogênio. A óxido-nítrico sintetase, usando a arginina geralmente proveniente do Ciclo da Ureia e o superóxido, dá origem ao segundo mensageiro óxido nítrico que não é tóxico, porém reações secundárias podem resultar no peróxido nítrico altamente danoso às estruturas proteicas tridimensionais. Destacado em azul mostramos vias pertencentes ao grande metabolismo (Ciclos da Ureia, Ácidos tri-carboxílicos e desvio para Glicólise), responsável pelo crescimento celular cujos substratos e produtos variam em concentrações muito maiores que os de EO.

Células transformadas, com muita frequência, apresentam uma geração excessiva de espécies oxidantes e muitos fatores contribuem para isso. No caso de RAS o interruptor metabólico que privilegia a via glicolítica em detrimento da via dos ácidos tricarboxílicos (efeito Warburg) pode causar o vazamento de elétrons da cadeia de transportes mitocondrial gerando o surgimento de espécies oxidantes (BENSINGER; CHRISTOFK, 2012; LOCK; DEBNATH, 2011). Tais mecanismos ajudam no processo de transformação celular induzindo a ativação do fator de transcrição HIF-1 (*Hipoxia factor 1*) que age diretamente na transcrição de genes importantes para nova configuração metabólica, além de promover angiogênese em um microambiente tumoral (DEWHIRST; CAO; MOELLER, 2008).

Uma vez que a geração de EO é inevitável, principalmente em células expostas a atividade de RAS mutado, o balanço entre uma dose que promove transformação e outra que gera demasiada citotoxicidade será o fator determinante do destino celular. Quando os mecanismos canônicos de eliminação dessas espécies estão disfuncionais ou são insuficientes, outros surgem para salvar a integridade das células, e um dos mais importantes é a autofagia (SCHERZ-SHOUVAL; ELAZAR, 2011).

1.7 – Autofagia

O termo geral autofagia compreende três diferentes formas de degradação mediada por lisossomos: autofagia mediada por chaperonas, onde não há participação de autofagossomos e são as próprias chaperonas as responsáveis por carregarem o conteúdo a ser degradado direto para o lisossomo (ARIAS; CUERVO, 2011); microautofagia, processo no qual a própria membrana do lisossomo engloba o conteúdo a ser degradado; e o mais importante, considerado como a via canônica da degradação mediada por lisossomo, a macroautofagia, processo altamente especializado cuja função é seletiva.

A macroautofagia pode carregar como prefixo uma “pista” do principal componente responsável por sua intensificação, por exemplo: a degradação de mitocôndria é chamada de mitofagia, de peroxissomo é a peroxifagia, de bactérias e vírus é nomeada de xenofagia e assim por diante (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011). Para facilitar o entendimento e a escrita desta tese consideraremos o nome autofagia como sinônimo de macroautofagia.

A autofagia é um mecanismo de pró-sobrevivência, responsável pela reciclagem e ou degradação de conteúdo que foram previamente ubiquitinados, promovendo assim homeostase celular mediante a uma série de tipos de estresses como: falta de nutrientes; degradação de proteínas mal dobradas e complexos proteicos; degradação de organelas danificadas e ou supérfluas; combate indireto de espécies oxidantes e consequentemente combate a dano no DNA; além de degradação de micronúcleos provenientes de processo anômalo de segregação de cromossomos em células que possuem o ciclo celular perturbado (MIZUSHIMA et al., 2008; RELLO-VARONA et al., 2012; SHINTANI; KLIONSKY, 2004; VESSONI et al., 2013).

A atividade autofágica se mantém baixa em sistemas equilibrados, porém aumenta rapidamente em períodos agudos de estresse metabólico. Todavia, autofagia não é apenas uma atividade celular terceirizada de “saneamento básico”. Pelo contrário, a autofagia é um sofisticado subsistema do controle sistêmico, da economia metabólica e do equilíbrio fisiológico da célula. Assim, o subsistema autofágico compreende estrutura e funções, cuja dinâmica é finamente orquestrada para coordenar as demandas celulares de metabolitos diversos e energia metabólica. Nesse sentido, a autofagia também contrabalança altos níveis de estresse que ameaçam a integridade celular, promovendo sobrevivência.

Apesar de não ser raro encontrar o termo “morte autofágica” ou morte programada do tipo II (KROEMER et al., 2009) são raros os casos onde a eliminação da atividade autofágica promove sobrevivência celular (LEVINE; KROEMER, 2008). Na grande maioria das vezes a morte é associada a autofagia, pois o estresse que gera a indução do mecanismo acaba que por bloquear o fluxo autofágico e ou sobrecarregar o sistema de reciclagem, acarretando em morte celular por vias diversas (GREEN; LEVINE, 2014; KLIONSKY et al., 2012).

1.7.2 - Maquinaria e Fluxo Autofágico

O fluxo autofágico pode ser dividido didaticamente em quatro etapas: 1 - Pré-iniciação e Iniciação (Figura 1.7A e B(I)). Etapa que conecta o estímulo disparador da autofagia até o fagóforo que é o primeiro componente autofagossômico; 2 - Alongamento e Nucleação que dão origem ao autofagossomo (Figura 1.7B(II)). Esta etapa envolve a elongação de membrana e o enclausuramento do conteúdo a ser degradado; 3 - Maturação e Fusão, sendo que a primeira é a etapa preparatória para a fusão com o lisossomo e a segunda é a fusão do autofagossomo com o lisossomo para formar o autofagolisossomo (Figura 1.7B(III)); 4 - Liberação, quando há liberação de todo o conteúdo que foi reciclado (amino ácidos, lipídeos, açúcares e etc) de volta ao citoplasma (Figura 1.7B(IV)) (RAVIKUMAR et al., 2010; REGGIORI; KLIONSKY, 2005; YORIMITSU; KLIONSKY, 2005).

A autofagia pode ser iniciada por mecanismos independentes de mTORC1 e do complexo de pré-iniciação, principalmente pela atividade direta de PI3K de classe III, PKA (proteína quinase dependente de cAMP) (STEPHAN et al., 2009), atividade de AMPK (proteína quinase ativada por AMP) e PLC (Fosfolipase C) (EGAN et al., 2010; LIANG et al., 2007)., além de existirem outros mecanismos independentes que estimulam ou inibem a autofagia agindo diretamente na atividade das ATGs e seus adaptadores (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; OHSUMI, 2011).

O complexo de alongamento e nucleação consiste em dois sistemas de conjugação análogos ao de ubiquitina para o disparo efetivo da autofagia (OHSUMI, 2001): o primeiro deles envolve a geração do complexo ATG5-ATG12-ATG16L1, que participam da etapa de alongamento do fagoforo, mas é desmontado após a formação do autofagossomo. Este tem a participação do ATG7, uma enzima E1 análoga a ubiquitina-conjugadora, e ATG10 que é uma enzima E2 outra análoga (Figura 1.7A(d)) (MIZUSHIMA *et al.*, 2003).

O segundo sistema envolve o processamento da proteína LC3 (*light chain protein 3*), fundamental na expansão da membrana do autofagossomo e enclausuramento do conteúdo a ser degradado. O primeiro passo ocorre com a clivagem do C-terminal do LC3 pela protease ATG4b, liberando a proteína LC3I no citoplasma. Em seguida, ATG7 e ATG3 são responsáveis por introduzirem o lipídeo fosfoetanolamina (PE) na estrutura da proteína, finalizando o processamento do agora então LC3II (Figura 1.7A(e)) (KABEYA et al., 2003). Note que em ambos os sistemas ATG7 desempenha um papel fundamental no processamento dos complexos que iniciam a autofagia, logo a sua ausência reduz o mecanismo a vias não canônicas de baixa relevância.

Algumas proteínas adaptadoras são responsáveis por carregarem o conteúdo a ser degradado até LC3II na membrana do autofagossomo em formação; a principal delas, no caso da autofagia seletiva, é a p62/SQSTM1 (sequestrassoma).

A p62 possui vários domínios regulatórios e de interação ao ligante, porém há de se destacar três deles: O domínio de ligação a LC3 (LIR), domínio de ligação a ubiquitina (UBA) e o domínio de ligação a KEAP1 (*Kelch like ECH-associated protein*) (domínio KIR) (KATSURAGI; ICHIMURA; KOMATSU, 2015). Os dois primeiros domínios conectam o fluxo autofágico por ligarem a membrana do fagóforo/autofagossomo ao conteúdo a ser degradado, já o último tem um papel bastante importante na indução da autofagia ativada por estresse oxidativo.

Os indicadores mais simples de fluxo autofágico que podem ser acompanhados por *western blot* são os níveis de LC3II e p62. Em um fluxo autofágico saudável o disparo da autofagia provoca aumento transiente de LC3II que volta para seus níveis basais depois de atender a demanda que iniciou o processo. O inverso é observado com p62, cuja concentração cai por ser degradado juntamente com o conteúdo interno do autofagolisossomo (MIZUSHIMA, 2004). Problemas no fluxo por bloqueio ou ativação acima da capacidade de processamento são facilmente caracterizados pelo acúmulo de ambas as proteínas (KLIONSKY et al., 2012).

Figura 1.7. Autofagia: A. . Principais vias efetoras do mecanismo autofágico. **a-** Principais vias que controlam a iniciação da autofagia; **b-** Formação do complexo de pré-iniciação; **c-** Complexo de iniciação (PI3KIII) e formação de PI3P; **d-** Formação do complexo de alongamento; **e-** Processamento de LC3; **B.** Fluxo autofágico em quatro passos. **I-** Depois da formação dos complexos de iniciação, alongamento e LC3II o conteúdo a ser processado (proteínas mal formadas e mitocôndrias, por exemplo), previamente ubiquitinado e ligado a um adaptador (p62), se liga ao fagoforo em formação, e ambos dão início ao fluxo autofágico, **II-** O segundo passo é o alongamento da membrana e enclausuramento do conteúdo a ser degradado que dá origem ao autofagossomo; **III-** Após a maturação do autofagossomo, a vesícula está pronta para se unir ao lisossomo formando o autofagolisossomo. **IV-** No último passo ocorre a liberação do conteúdo interno para o citoplasma acompanhado de reciclagem de LC3II externo a membrana por meio da atividade da ATG4a.

1.7.3 - Autofagia, RAS e Transformação maligna

Um dos consensos na literatura sobre autofagia dando suporte ao processo de transformação maligna é a contexto-dependência. A autofagia pode prevenir o surgimento de células transformadas principalmente combatendo a instabilidade genética. Essas instabilidades podem ser geradas pelo acúmulo de proteínas mal formadas e de organelas danificadas tais como as mitocôndrias, que por sua vez geram espécies oxidantes (MATHEW; WHITE, 2011). Por outro lado, células já transformadas por RAS dependem da autofagia para combater o estresse oncogênico, mantendo o metabolismo mitocondrial, o *pool* essencial de nucleotídeos e combatendo a excessiva geração de espécies oxidantes (GUO et al., 2016; SCHERZ-SHOUVAL; ELAZAR, 2011).

Outro ponto não explorado e pouco discutido na literatura é o momento em que a autofagia é importante. Sem dúvida a autofagia previne o surgimento de células transformadas por combater reações que gerem potenciais “*drivers*”. Todavia, assim que surge uma mutação, a autofagia é fundamental como mecanismo homeostático, já que invariavelmente essas células são expostas a novos desafios, padrão metabólico e fenotípico, que geram estresse adicional, e sem a ajuda da autofagia tais desafios poderiam se tornar intransponíveis.

Não por acaso, existe uma série de relatos em que linhagens de células tumorais são viciadas em autofagia, mostrando alta dependência do mecanismo frente a variados tipos de estresse, ao mesmo tempo em que possuem elevada atividade basal do mecanismo (YANG et al., 2011). Por exemplo, a autofagia pode amenizar a resposta a proteínas mal dobradas (UPR, *Unfolded Protein Response*)

que leva células transformadas por RAS a morte após aumento do estresse oxidativos (WU et al., 2010), além de suprimir a indução de morte sinalizada por p53 em linhagens transformadas de pulmão (STROHECKER et al., 2013).

Não restam muitas dúvidas a respeito do papel da autofagia suportando a tumorigênese dirigida por RAS; porém, esta dependência parece não fugir a especificidade da isoforma da oncoproteína. Um grande problema para provar esta hipótese de “isoforma-dependência” é que existem poucos artigos mostrando a relação entre HRAS mutado e autofagia, e os que são encontrados geralmente apontam para autofagia como mecanismo promotor de morte e não de sobrevivência (ELGENDY et al., 2011). Por outro lado, alguns resultados sugerem que células transformadas por HRAS são mais dependentes de autofagia do que as transformadas por outras isoformas (GUO et al., 2011).

Sumarizando, apesar de a autofagia agir como um mecanismo supressor de tumor em células normais, uma vez já instalada a mutação “*driver*”, principalmente no caso de RAS, a autofagia pode agir como uma via promotora de sobrevivência possibilitando as condições para progressão tumoral. Ajuda a sustentar esta hipótese o fato do *core* de genes fundamentais para autofagia estarem raramente disfuncionais nos mais diferentes tipos de câncer (AMARAVADI; KIMMELMAN; WHITE, 2016).

1.7.4 - EO, Autofagia e Transformação maligna

A autofagia é responsável por controlar os níveis de EO de várias formas como, por exemplo, degradando mitocôndrias supérfluas ou danificadas evitando que estas sejam responsáveis por gerarem mais espécies reativas. Também o recrutamento da maquinaria autofágica promovida por EO provoca o aumento da expressão de p62, que por si tem caráter similar a antioxidante. p62 se liga a KEAP1 em KIR, levando esta proteína à degradação e consequentemente liberando NRF2 (*NF-E2-related factor 2*), que antes estava ligado ao próprio KEAP1. NRF2 é um fator de transcrição que promove a expressão de várias proteínas antioxidantes, além do próprio p62 fechando um ciclo que ajuda no combate de EO (DURAN et al., 2008; JAIN et al., 2010).

Se por um lado a autofagia é um importante mecanismo de eliminação e combate ao EO, evitando dano celular, ela também pode ser crucial na transformação maligna controlando níveis adequados de espécies reativas

geradoras de instabilidade genética, ou até mesmo promovendo sobrevivência de células já transformadas (COOKE et al., 2003; VALKO et al., 2004). Mais do que sobrevivência, algumas das células podem se tornar dependentes de EO, como no caso da linhagem HCT116, (Câncer de cólon humano) que para se manter tumorigênica precisa de níveis adequados de EO, adequação esta que é promovida pela autofagia. (WEINBERG et al., 2010).

A literatura apresenta poucos resultados que mostram a relação entre dano no DNA e estresse oxidativo em queratinócitos basais imortalizados por E6E7 ou outro modelo de câncer cervical, tampouco apresenta informações sobre a influência da autofagia nesse processo. No caso de células expostas a atividade de RAS, a autofagia aparentemente pode se intensificar no início do processo de transformação, equilibrando a concentração de espécies oxidantes e consequentemente promovendo sobrevivência celular. Com esta tese de doutorado pretendemos elucidar algumas dessas relações, tentando traçar a dinâmica dos eventos que precedem a transformação celular mediada por HRAS^{G12V}.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivos Gerais

A baixa incidência de HRAS em diferentes tipos de tumores fez com que estudos sobre essa isoforma da proteína RAS tenham sido negligenciados ao longo dos anos. Porém, HRAS mutado aparece com maior frequência em três grupos de cânceres muito importantes: trato urinário, cabeça e pescoço e câncer cervical; nos dois últimos casos há uma correlação muito forte entre HRAS, queratinócitos e HPV.

A baixa frequência de tumores carregando HRAS mutado como agente transformador sugere que existem condições celulares/moleculares muito especiais para que um fenótipo maligno dirigido por HRAS mutado seja alcançado. Essas condições são atingidas em queratinócitos imortalizados por proteínas de HPV, todavia a transformação se mostra como um evento raro quando comparado com a taxa populacional de infecção pelo vírus.

O objetivo desta tese é apresentar os mecanismos pelos quais a transformação dirigida por HRAS^{G12V} exige condições especiais, expondo os pontos de vulnerabilidade que os queratinócitos imortalizados por E6E7 são expostos. Provocando um nível de estresse oncogênico deletério, por meio da indução de HRAS^{G12V}, pretende-se decompor os principais eventos responsáveis por diminuir ou aumentar a viabilidade desses queratinócitos.

2.2 – Objetivos Específicos

- ❖ Utilizando queratinócitos imortalizados por E6E7, construir um modelo de HRAS^{G12V}, cujo nível da atividade da oncoproteína na forma HRAS^{G12V}-GTP seja modulável a ponto de gerar estresse oncogênico controlado que possibilitaria a distinção dos mecanismos que dirigem as células à morte daqueles que podem ajudar na transformação maligna.
- ❖ Identificar quais são os principais tipos de estresses que compõem o estresse oncogênico desencadeado por HRAS^{G12V}-GTP que levam as células a morte. Além disso, faz parte deste objetivo a identificação de subsistemas de salvaguarda que podem auxiliar a transformação maligna, resultando em vias de atividade putativas e mecanística de ação desses subsistemas.
- ❖ Estabelecer o papel da autofagia neste contexto, investigando se tal subsistema é anti- ou pro-tumorigênico.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 - Culturas de células

Todas as sublinhagens geradas estão discriminadas na tabela 3.1, que contém as informações necessárias para fácil identificação ao longo desta tese de doutorado, como: Nomes, siglas e cores usadas para apresentar as linhagens em cada gráfico.

Tabela 3.1. Lista de sublinhagens geradas para a realização dos experimentos

Sublinhagem*	Célula de origem	nº da passagem da célula origem	Construção Transduzida
E6E7	Queratinócitos primários		x pLXSN-E6E7(HPV16)
SLc1	E6E7		16 pBabepuro-Hras ^{G12V}
SLc2	E6E7		17 pBabepuro-Hras ^{G12V}
SLc3	E6E7		19 pBabepuro-Hras ^{G12V}
SLK1	E6E7		16 pBabepuro-Kras ^{G12V}
SLK2	E6E7		17 pBabepuro-Kras ^{G12V}
EV	E6E7		16 pBabepuro-Φ
SLi1.3	E6E7		15 pBabepuro-ER:Hras ^{G12V}
SLi2	E6E7		16 pBabepuro-ER:Hras ^{G12V}
SLi3.2	E6E7		18 pBabepuro-ER:Hras ^{G12V}
SLΦ	E6E7		16 pBabepuro-ER:Φ
ΔATG7I	SLi3.2		7 LentiCRISPR-ATG7
Scrb I	SLi3.2		7 LentiCRISPR-Scrb
LTE5	SLi3.2	13	x
LTE10	SLi3.2	13	x

* As células foram pintadas com as cores que representam a sublinhagem e servem como referência para cada gráfico e esquemas presentes na tese.

3.1.2 - Sublinhagem parental: queratinócitos basais imortalizados por E6E7

Queratinócitos primários basais provenientes de um *pool* de prepúncios humanos foram imortalizados por meio de transdução com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 no laboratório do professor Enrique Boccardo (Instituto de Ciências Biomédicas, USP) para gerar a linhagem parental de queratinócitos humanos E6E7. Esta linhagem foi doada para este projeto de doutorado e serviu de ponto de partida para desenvolver as sublinhagens de queratinócitos que foram os modelos experimentais explorados neste trabalho.

Os queratinócitos E6E7 proliferam em cultura e podem sofrer diferenciação quando adequadamente estimulados. Eles mantem as propriedades do tecido de

origem até aproximadamente a quadragésima passagem e sobrevivem bem aos processos de modificação genéticas realizadas por meio da transdução com vetores virais.

Figura 3.1. A combinação de tratamento EGF mais extrato de pituitária bovina é a condição ideal para crescimento dos queratinócitos: Curva de crescimento para células parental sem suplementação alguma, tratadas com 5 ng/mL de EGF, 5 µL/mL de extrato de pituitária bovina e a combinação de ambos (Suplemento). Curvas e barras apresentam erro padrão das replicatas.

Para que não sofram diferenciação terminal espontânea os queratinócitos basais E6E7 devem ser mantidos em meio de cultura apropriado, KSFM (*Keratinocyte Serum-Free Medium*, Life™, Carlsbad, CA, EUA), e combinados com suplementação de extrato de pituitária bovina 5 µL/mL e EGF 5 ng/mL. Quando estas células são mantidas em longos períodos em soro fetal bovino e DMEM ocorre sua diferenciação, principalmente devido à alta concentração de Ca^{2+} , e não podem ser usados para manter as culturas.

A suplementação completa foi utilizada em toda experimentação, já que a combinação entre elas promove aumento sinérgico da proliferação celular (Figura 3.1).

Para subcultura, a monocamada celular foi lavada com PBS, tratada com tripsina e, após se destacarem da placa, foram rapidamente suspensas em PBS com 5% de SFB, centrifugadas a 800rpm por 5 min, lavadas e imediatamente ressuspensas em KSFM, plaqueadas em garrafas ou placas e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de ar com 5% de CO_2 .

3.1.4 - Sublinhagens constitutivas (SLCs): queratinócitos E6E7 que expressam a oncoproteína HRAS^{G12V} constitutivamente.

A linhagem parental E6E7 foi transduzida com o vetor pBabepuro-Hras^{G12V}, gerando sublinhagens que expressam constitutivamente a oncoproteína mutada HRAS^{G12V}. Paralelamente, sublinhagens controle foram obtidas através de transdução com o vetor vazio pBabepuro- $\emptyset$.

As culturas recém transduzidas entraram em intensa crise devido à expressão de HRAS^{G12V}, por este motivo acompanhamos sua evolução medindo níveis da oncoproteína e alterações morfológicas visíveis durante 30 dias. Após este período de instabilidade, culturas independentes espontaneamente deram origem a três sublinhagens constitutivas, respectivamente denominadas, SLc1, 2 e 3 que foram estocadas para experimentações posteriores. O detalhamento deste fenômeno aparece na seção de resultados.

3.1.5 - Sublinhagens constitutivas (SLKs): queratinócitos E6E7 que expressam a oncoproteína KRAS^{G12V} constitutivamente.

Da mesma forma que as SLcs usamos a linhagem parental E6E7 para agora transduzir o vetor pBabepuro-Kras^{G12V} gerando sublinhagens que expressam constitutivamente a proteína KRAS^{G12V}. Foram geradas duas sublinhagens independentes denominadas SLK1 e -2.

As culturas que deram a origem as sublinhagens SLKs não sofrem a crise inicial observadas nas culturas instáveis que deram origem as SLcs, porém também acompanhamos sua evolução e possíveis alterações morfológicas durante os mesmos 30 dias. Este processo foi documentado por meio de fotos que estão devidamente ilustradas na seção de resultados.

3.1.6 - Sublinhagens induzíveis (SLis): queratinócitos E6E7 transduzidos com a construção ER:HRAS^{G12V}, cuja forma ativada, ER:HRAS^{G12V}-GTP, é induzida por 4-hidroxitamoxifeno (4OHT).

Queratinócitos E6E7 transduzidos com o vetor induzível pBabepuro-ER:Hras^{G12V} ou seu controle, vetor vazio pBabepuro-ER: $\emptyset$, deram origem a três sublinhagens independentes SLi1.3, SLi2, SLi3.2, mais o seu controle ER: $\emptyset$.

O vetor codifica para uma construção envolvendo um receptor de estrógeno mutado, cuja afinidade é maior ao análogo 4-hidroxitamoxifeno (4-OHT) do que ao

próprio hormônio, covalentemente ligado à extremidade N-terminal da proteína HRAS^{G12V}. As células transduzidas expressam constitutivamente a proteína de fusão ER:HRAS^{G12V}, que fica bloqueada por chaperonas, que a leva à degradação. O desbloqueio do complexo por 4OHT (Figura 3.2A) libera ER:HRAS^{G12V} (Figura 3.2B) para ser ativado a ER:HRAS^{G12V}GTP, conforme descrito em Littlewood et al. (1995) e Reuter and Khavari (2005). As três sublinhagens induzíveis SLi1.3, SLi2 e SLi3.2 respondem a 4OHT segundo as curvas dose mostradas na Figura 3.2B.

Surpreendentemente, concentrações crescentes de 4OHT também promoveram aumento dos níveis do mRNA de HRAS (Figura 3.3); esta observação experimental contraria os resultados reportados anteriormente por outros autores (Littlewood et al, 1995 e Reuter and Khavari, 2005) e para qual, no momento, não há uma explicação mecanística.

Na figura 3.4 mostramos o produto de *western blot* para HRAS, em uma mesma chapa/membrana, da curva dose de 4OHT em SLi1.3 e pBabepuro-ER:Ø enfatizando a ausência de ER:HRAS^{G12V} na sublinhagem controle ER:Ø. Esta figura expõe dois fatos importantes: 1- É possível, com o uso do mesmo anticorpo para HRAS, diferenciar a construção ER:HRAS^{G12V} da proteína endógena HRAS^{WT}, pois devido a associação com ER a proteína mutada possui uma massa aproximada de 55KDa enquanto a massa de RAS endógeno é de 21KDa; 2- não há variação na concentração HRAS^{WT} em relação as diferentes concentrações do indutor 4OHT.

A linhagem parental E6E7, assim como o controle com o vetor vazio ER:Ø, foram desafiados com concentrações crescentes de 4OHT afim de determinar as concentrações do indutor que poderiam ser usados sem que houvesse qualquer interferência na proliferação dos queratinócitos (Figura 3.5). Em ambos os casos vimos que concentrações que variam entre 5nM e 100nM se apresentaram inócuas e puderam ser usados para realização dos experimentos.

Figura 3.2. Expressão induzível de ER:HRAS^{G12V} nas SLis e esquema de ação do indutor 4OHT: **A.** Esquema de desbloqueio da construção ER:HRAS^{G12V}. As células expressam o construto ER:HRAS^{G12V} constitutivamente, porém em uma forma bloqueada por chaperonas (HSPs) que são levadas preferencialmente a degradação. Assim que as células são tratadas com o 4OHT, um análogo de estrogênio, ocorre sua interação com a região de ligação a hormônio (HBD), desbloqueando o complexo e permitindo a ativação da oncoproteína na forma de ER:HRAS^{G12V}-GTP; **B.** Foram geradas três sublinhagens induzíveis independentes (SLis) que possuem variações na expressão de ER:HRAS^{G12V}, mas como um todo respondem ao indutor 4OHT em dependência de dose.

Figura 3.3. Indução com 4-OHT também provoca aumento da expressão do mRNA de HRAS em queratinócitos transduzidos com E6E7 de HPV16: qPCR para expressão de mRNA de HRAS, E6 e E7 de HPV16. **A.** As sublinhagens SLcs e SLi3.2, submetida a curva dose de 4-OHT, assim como seus controles E6E7 e EV tiveram os níveis de mRNA de Hras comparados entre si. Vimos que todas as sublinhagens possuem alta expressão de mRNA de Hras, porém essa quantidade é muito elevada a partir da indução de 10nM de 4OHT; **B e C.** qPCR para os genes E6 e E7 de HPV16, respectivamente, das sublinhagens geradas mostrando que a transdução dos oncogenes virais foi bem sucedida. Como controle negativo usamos queratinócitos primários (PHK), HaCaT e Hek293

3.1.7 - Sublinhagens defectivas para Autofagia (Δ ATG7): permitiram testar o papel do mecanismo frente à indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP

A autofagia se tornou um elemento chave em nosso projeto e precisava ser interrompida não apenas usando inibidores químicos, mas também por meio de intervenção genética. Como ressaltado na introdução, o gene ATG7 é fundamental para o funcionamento da autofagia participando de pontos cruciais da formação do autofagossomo, uma vez eliminado, as células são submetidas a mecanismos muito menos eficientes de reciclagem e degradação de seu conteúdo interno.

Usamos a técnica CRISPR/Cas9 para nocautear o gene ATG7 da sublinhagem SLi3.2 e geramos a sublinhagem Δ ATG7 assim como o seu controle

Scrb. Conforme descrito em resultados a técnica foi muito eficiente fornecendo uma sublinhagem ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP defectiva para autofagia.

Figura 3.4. O complexo ER:HRAS^{G12V} pode ser diferenciado da proteína endógena HRAS^{WT} pela massa: A. *Western Blot* para HRAS. Método clássico com chapas de raio-X mostram as diferentes massas das oncoproteínas mutada e a equivalente endógena. A esquerda curva dose de 4OHT para SLi1.3, já a direita o mesmo procedimento para seu controle ER:Ø mostrando a ausência da oncoproteína mutada; **B.** Equivalente com exposição de membrana no equipamento UVITEC para curva dose de 4OHT da sublinhagem SLi3.2 suplementada e não suplementada.

Figura 3.5. O indutor 4OHT é inócuo em concentrações entre 5nM e 100nM tanto em células parentais como no controle ER:Ø: **A.** Curva de crescimento para células parental tratadas com diferentes concentrações de 4OHT. Observamos que apenas a concentração de 150nM de provoca citotoxicidade; **B.** Curva de crescimento em sublinhagem ER:Ø, controle das SLis, mostra que em nenhuma das concentrações de 4OHT testadas houve diferença na proliferação celular. Curvas e barras apresentam erro padrão das replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***), corrigido por Bonferroni.

3.1.8 - A sublinhagem SLi3.2 tratada por longo tempo e de maneira sustentável com 5 e 10nM 4OHT deram origem a sublinhagens refratárias a alta concentrações de 4OHT (LTE.5 e LTE.10).

A sublinhagem induzível SLi3.2 foi mantida por seis meses em diferentes concentrações de 4OHT e as únicas concentrações que permitiram selecionar sublinhagens viáveis foram 5 e 10nM. Porém, as sublinhagens resultantes (LTE.5 e LTE.10) mostraram-se pouco sensíveis à atividade do indutor (ver dados e interpretações em Resultados).

3.2 - Produção dos RNAs guias para CRISPR/Cas9

Os RNAs guias específicos para os genes alvos, assim como o controle *Scrb*, foram desenhados com o uso da ferramenta *CRISPR designed tool* (<http://crispr.mit.edu/>) conforme discriminados em tabela 3.2.

Posteriormente esses RNAs guias sintéticos foram clonados em LentiCRISPR v2 (Addgene #12260) seguindo protocolo de Sanjana, Shalem, and Zhang 2014. O

desenho dos RNAs guias para CRISPR, bem como a produção dos vetores lentivirais LentiCRISPR-ATG7I, LentiCRISPR-ATG7II e LentiCRISPR-Scrb nocautes foram realizados por Mattheus Henrique Dias, pós-doutorando de nosso laboratório.

Tabela 3.2. Guias usados para gerar linhagens defectivas para autofagia

Gene Alvo	Sequência 5'-3'
ATG7I	CTTGAAAGACTCGAGTGTGT
ATG7II	CTCTTGTAATAACCATCTGT
Scrb	GCACTACCAGAGCTAACTCA

3.3- Produção do sobrenadante retroviral pBabepuro.

Células empacotadoras de retrovírus Phoenix-Ampho (ϕ NX), existentes no laboratório e anteriormente cedidas pelo Prof. Garry Nolan (Stanford University), foram plaqueadas a ~ 50% da confluência em placa p60 e meio 10% SFB-DMEM e incubadas a 37 °C e 5% CO₂. No dia seguinte, as células, foram transfectadas com os vetores retrovirais pBabepuro-ER:Hras^{G12V}, pBabepuro-ER:Ø, pBabepuro-Hras^{G12V}, pBabepuro-Ø (desenvolvidos em nosso laboratório pela Dra Julianna Zeidler) e pBabepuro- Kras^{G12V} (addgene #46746) com *Lipofectamine*® 3000 (*Invitrogen*®), seguindo o protocolo do fabricante; estes procedimentos foram seguidos em todas as transfecções deste trabalho.

Após seis horas, o meio de cultura foi trocado por meio fresco, seguindo-se mais incubações de 24, 48 ou 72 horas e coleta do sobrenadante retroviral mantidos em tubos Falcon a 4 °C. Depois da última coleta, o total do meio contendo o sobrenadante retroviral foi filtrado em filtro *Millipore*® de 22 µm, alíquotado (1mL) e armazenado a -80 °C.

3.4 - Produção de sobrenadante lentivíral LentiCRISPR

Células HEK293T foram usadas como empacotadoras de lentivirus. Mas, diferentemente das células empacotadoras de retrovírus Phoenix-Ampho (ϕ NX), células HEK293T não possuem a função constitutiva de empacotamento de vírus; por essa razão precisam ser programadas por transfecção com os plasmídios psPAX2 (Addgene #12260) e pCMV-VSV-G (Addgene #8454) a cada vez que forem utilizadas para desempenhar a função de empacotamento viral.

As células HEK293T foram plaqueadas em garrafas médias a aproximadamente 50% de confluência e incubadas até atingir cerca de 70% de

confluência; neste ponto foram transfectadas com os vetores LentiCRISPR-ATG7I, LentiCRISPR-ATG7II e LentiCRISPR-Scrb, mais os plasmídios psPAX e pCMV-VSV-G para garantir a produção das proteínas de empacotamento dos lentivirus.

Após seis horas de incubação, o meio de transfecção foi trocado por DMEM-10% SFB e 1% de BSA. A coleta do sobrenadante foi realizada após 48h da transfecção, filtrado em filtro Millipore de 22 µm e imediatamente usado para transdução.

3.5 - Transdução

Uma vez gerado o sobrenadantes virais que carregavam os vetores retrovirais (pBabepuro e LentiCRISPR-) a transdução foi realizada da mesma forma para dar origem às diferentes sublinhagens descritas acima.

No dia anterior à transdução, os queratinócitos foram plaqueadas em p60 ou em garrafas médias (*Corning®*), a uma confluência de aproximadamente 50%. No dia da transdução, o meio KSFM foi descartado e 1 mL ou 10mL de sobrenadante viral, previamente aquecido a 37 °C, foram adicionados, respectivamente, às placas e garrafas. Em seguida, foi adicionado polibreno, na concentração final de 4 µg/mL. As placas e garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 6 h. Após este período, o meio de cultura foi trocado por KSFM fresco. Depois de 48 h foram adicionados 2,5 µg/mL de puomicina para a seleção das células transduzidas.

Como estes queratinócitos não formam colônias a partir de células isoladas e tão pouco crescem em baixa densidade, realizamos transduções em culturas de alta densidade celular e selecionamos sublinhagens transduzidas policlonais. Dessa forma todas as sublinhagens geneticamente modificadas obtidas neste trabalho são policlonais, mas cada uma foi gerada por processos totalmente independentes.

3.6 - Curvas de crescimento.

Inicialmente foram plaqueadas $3,5 \times 10^3$ células/cm² por poço em placas *Corning®* de seis poços. Após alguns experimentos, percebemos que a fase *lag* era suprimida quando plaqueamos inóculos de 7×10^3 células/cm² por poço. O número inicial de células é observado facilmente nos gráficos de cada experimento sendo

que suas replicatas biológicas foram iniciadas com o mesmo número de células para evitar discrepâncias.

Foram iniciados os tratamentos após 48h do plaqueamento e coletado uma amostra para contagem de células para determinar o número inicial de células no tempo zero. Posteriormente as células foram coletadas a cada dois dias ou a cada 24 h conforme indicado nos experimentos realizados. Depois as células foram lavadas, suspensas em tripsina, diluídas em PBS e fixada com 3,7% de formaldeído, obtendo 1 ml como volume final. Após a coleta de todos os pontos foram realizadas as contagens em contador de partículas (*Beckam Counter Z2®*).

3.7 - Curvas de densidade máxima de saturação.

Foram plaqueadas em placas (*Corning®*) de seis ou doze poços entre 10 e 20×10^3 células/cm² por poço das sublinhagens a serem avaliadas: vetor vazio (EV) ou controle não induzido (SLi3.2). Após pelo menos dezoito dias de crescimento, com um mínimo de seis coletas nesse intervalo, contamos o número de células para cada ponto produzindo um gráfico (Figuras 4.2B e 4.6B). Por meio deste gráfico foi possível determinar a densidade máxima de saturação de cada sublinhagem assim como o dia aproximado que esta densidade seria alcançada.

As sublinhagens foram plaqueadas com a mesma concentração inicial da curva de densidade máxima de saturação e acompanhadas pelos períodos indicados. O início das comparações e ou indução foram realizados no dia em que presumivelmente as densidades máximas dos controles seriam alcançadas.

Os números indicados nos gráficos são referentes a duas replicadas biológicas independentes contendo triplicatas técnicas para cada uma das condições.

As células não foram plaqueadas diretamente na concentração máxima de saturação por não resistirem tal estresse e morrem em uma taxa elevada, além disso a quantidade de células iniciais inviabilizaria o experimento.

3.8 - Western Blot – SDS PAGE

3.8.1 - Quantificação de proteínas / Western Blot / SDS PAGE.

Foram plaqueadas células em placas P60/P100/P150 (*Corning®*) em meio completo por período de tempo a ser determinado de acordo com o experimento.

Após o tempo necessário as células foram lavadas (1x PBS, 37 °C) e lisadas com o tampão de lise RIPA (*Sigma-Aldrich*®) mais inibidores *Halt*™ *Protease Inhibitor Cocktail* (*Thermo-Fisher*®). Os lisados foram raspados e centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos a 2 °C (microcentrífuga *Eppendorf*®), o sobrenadante foi aliquoteado e guardado em freezer a -24 °C. Uma alíquota foi reservada para dosagem de proteínas, a qual foi feita com o *Precision Red*™ (*Cytoskeleton*®). Uma vez quantificadas, as amostras foram aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE 10-15%). A eletroforese ocorreu a 40 mA até que as amostras entrem no gel de separação e 60 mA até que a frente de corrida alcançasse o final do gel.

As proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose *Hybond-C extra*™ (*BD Biosciences*®), bloqueada em TBS-T com 5% de leite integral solúvel por três horas, lavadas para se retirar o excesso e imersa na solução do anticorpo primário (dez a doze horas 4 °C em TBS-T e Albumina 5%). Em seguida, a membrana foi lavada com TBS-T de cinco em cinco minutos por uma hora e depois submetidas a encubação com secundário covalentemente conjugado à HRP (uma hora temperatura ambiente em TBS-T) conforme tabela 3 de anti-corpos. Posteriormente lavamos a membrana quatro vezes com TBS-T, e por ultimo a membrana foi primeiro embebida na solução dos reagentes do kit *SuperSignal*™ (*Thermo-Fisher*®), contendo os substratos da HRP mais “*enhancers*”, e imediatamente exposta ao equipamento *UVITEC*® para detecção e quantificação da quimioluminescência através do programa de aquisição de imagens *Alliance*®.

3.8.2 - Quantificação de Bandas de *Western Blot* na máquina UVITEC e programa *Alliance*®.

A detecção e quantificação de bandas de *western blot* numa membrana de nitrocelulose se fazem através de um anticorpo mono específico, dito anticorpo primário, que identifica a banda proteica alvo de interesse, seguido por um anticorpo secundário que reconhece o primário. Para detectar e medir o imuno-complexo “banda-anticorpos”, o anticorpo secundário carrega covalentemente conjugada a enzima, “*Horseradish Peroxydase*-HRP”. Portanto, a quantificação da proteína alvo se resume à medida da atividade enzimática de HRP com vasto excesso dos substratos luminol e H₂O₂, resultando numa reação quimioluminescente pseudo de primeira ordem, na qual a quantidade de luz quimioluminescente liberada é

diretamente proporcional à quantidade de HRP e ao tempo de reação. Na prática a mistura de reação inclui substâncias sensoras (“*enhancers*”) que aumentam a intensidade da luz quimioluminescente; no comércio existem ótimos kits de “*Enhanced Chemiluminescence-ECL*” oferecidos por múltiplos fornecedores.

Os *quanta* de luz quimioluminescente liberados pela reação catalisada pela HRP podem ser detectados por um filme de raios X (analógico) ou uma câmera de CCD (digital), como por exemplo, na máquina *UVITEC* utilizada nesta tese (Figura 3.6A). Mas, em ambos os casos há uma limitação a ser contornada, o detector pode ficar saturado pela quantidade de luz produzida pela reação, gerando medidas grosseiramente subestimadas. Portanto, é necessário estabelecer procedimentos adequados e padrões de referência tendo em conta esta limitação.

A figura 3.6D mostra o resultado de um *western* para estabelecer uma curva de dose para uma solução padrão da proteína FGF2 purificada, que poderia servir de referência para medidas absolutas desta proteína. A câmera de CCD mede a luz quimioluminescente em pixels que o programa *Alliance* transforma em unidades arbitrárias de volume indicadas no eixo dos y, que deveria crescer linearmente com a massa de FGF2 mostradas no eixo dos x. Mas, na figura 3.6D os dois últimos pontos da curva estão relativamente muito baixos, provavelmente por saturação do detector. Esta distorção, possivelmente, seria resolvida com um tempo de reação superior ao utilizado neste experimento. Não obstante, a curva da figura 3.6D ainda pode servir de padrão de referência no intervalo linear definido pelos quatro pontos da curva de dose de FGF2.

Nesta tese havia necessidade de quantificar por *western* principalmente concentrações das proteínas: HRAS selvagem, os mutantes HRAS^{G12V} e HRAS^{G12V}-GTP e as construções ER:HRAS^{G12V} e ER:HRAS^{G12V}-GTP. Na falta de preparações purificadas destas proteínas que pudessem servir de padrões para medidas absolutas, nos restringimos a fazer estimativas de valores relativos de todas estas formas de HRAS, onde a principal referência foi a concentração do HRAS endógeno e de ER:HRAS^{G12V} dos controles não induzidos em cada uma das múltiplas sublinhagens celulares e condições experimentais exploradas neste trabalho.

Figura 3.6. 40 µg de proteína total é a massa ideal para extrair dados com maior precisão no método de quantificação de bandas para *western blot* adotado nesta tese: **A.** Apresentação ilustrativa do gráfico em 3D gerado pelo programa *Alliance*® no momento da exposição das membranas para *western blot* de ER:HRAS^{G12V}. Barra de cores apresenta valores em Volume. Uma vez atingido valores indicados em vermelho o aparelho interrompeu a exposição da membrana; **B.** Diferentes concentrações de proteína total da SLi3.2 induzida com 50nM de 4OHT foram submetidas a *western blot* para ER:HRAS^{G12V}; **C.** O mesmo foi realizado para GAPDH, proteína usada como controle de carregamento em todos os ensaios de *western* realizados nesta tese; **D.** Comparação do método para proteína recombinante FGF2. As barras em vermelho apresentam a região de maior linearidade das curvas. Para determinar concentração ideal de proteína total consideremos intervalo linear máximo entre as curvas de ER:HRAS^{G12V} e GAPDH.

Adicionalmente é preciso ter em mente uma complicação inerente ao material estudado no qual essas quantificações foram efetuadas. As medidas sempre foram feitas em misturas complexas de proteínas como são os extratos de toda a massa proteica celular que contem milhares dessas espécies, cujas concentrações variam em um intervalo de muitas ordens de grandeza. As dificuldades encontradas para fazer *western blot* quantitativo nestas circunstâncias experimentais são bem ilustradas nas figuras 3.6B e 3.6C.

A figura 3.6B mostra uma curva de dose de proteína celular total, obtida em condições pré-estabelecidas de uma sublinhagem definida de queratinócitos, ao longo da qual se fez estimativas da concentração de ER:HRAS^{G12V}; é notório que apenas os quatro primeiros pontos se alinham num segmento de reta, indicando que naquele intervalo de massas de proteína celular (10 a 60µg) e no tempo de reação adotado só é aceitável estimar quantidades relativas de proteínas específicas cuja abundância na célula seja semelhante à da ER:HRAS^{G12V}. Em concordância com esta interpretação, a figura 3.6C mostra para a proteína GAPDH pontos que tendem a uma curva assintótica em vez de um segmento de reta, para o mesmo intervalo de massas do extrato proteico da figura 3.6B; estes resultados implicam em medidas de quimiluminescência progressivamente subestimadas devido a saturação do detector.

A incongruência entre as duas proteínas provavelmente se explica pela abundância relativa de GAPDH na célula que pode estar até três ordens de grandeza acima da abundância de ER:HRAS^{G12V}. Esta dificuldade do processo analítico pode ser resolvida adotando-se tempos de reação ou intervalos de massa proteica celular diferentes para, respectivamente, ER:HRAS^{G12V} e GAPDH, fazendo-se os ajustes necessários nos cálculos finais das concentrações relativas de ambas as proteínas. No entanto, a exploração de múltiplos intervalos de massa celular para proteínas diferentes pode ser, na prática, inviável.

Diante disso a solução de bom senso foi adotar as condições do ensaio analítico mais apropriado para HRAS, uma vez que as principais proteínas de interesse neste trabalho possuem abundâncias relativas próximas a oncoproteína. Logo, adotamos as condições de ensaio mostradas na Figura 3.6B, ou seja, 40µg de proteína celular e tempos de reação que geram níveis de quimiluminescência apropriados à saturação do detector de CCD.

3.9 - Pull down de RAS-GTP

3.9.1 - Separação de HRAS-GTP por ligação específica ao domínio ligante de Ras-GTP (RBD) de Raf1, comumente chamado “*Ras-GTP pull down assay*”

Há bons anticorpos comerciais específicos para as três formas de Ras, H-RAS, K-RAS e N-RAS, que servem muito bem para medida de RAS total por *western blot*. Por outro lado, *western blot* não é o método adequado para quantificação de KRAS-GTP, HRAS-GTP ou NRAS-GTP, pois nas condições desnaturantes de SDS-PAGE, GTP (ou GDP) se dissocia da proteína RAS, que, durante a eletroforese, migrará no gel independentemente do nucleotídeo com o qual estava associado, seja GTP ou GDP.

A solução mais adotada para resolver esse problema de bioquímica analítica consiste na separação de HRAS-GTP do extrato celular por ligação específica ao domínio ligante de Ras-GTP da quinase Raf1 (RBD). Na prática, RBD é usado na forma de uma proteína de fusão com glutathione-S-transferase, GST-RBD. Além disso, o reagente GST-RBD é imobilizado à superfície de microesferas de sefarose, através de uma ligação de alta afinidade entre GST e glutathione, a qual está covalentemente ligada ao polissacarídeo constituinte das microesferas. Portanto, uma reação de afinidade vai ocorrer na superfície das microesferas de sefarose que está repleta de RBD segurado por um “braço” de glutathione-GST e livre para “quelar” especificamente RAS-GTP. Desta maneira a fração de RAS-GTP é isolada da de RAS-GDP e pode depois ser quantificada por *western blot* convencional.

Este método de duas etapas envolvendo primeiro uma reação de afinidade entre RBD e RAS-GTP seguido por *western blot* com anticorpo específico para RAS foi adotado neste trabalho. Os procedimentos das diversas fases do processo estão detalhados nos parágrafos seguintes.

O primeiro passo é lavar uma alíquota da preparação de sefarose-GST-RBD por três vezes com tampão de lise RIPA mais inibidores (PSFM a 1 mM, 1 mg/mL de aprotinina, 1 mg/mL de pepstatina A, leupeptina a 10 mg/mL e DTT a 1 mM) intercalando com centrifugação de 2.000 rpm por quatro minutos.

A seguir, essa preparação de micro esferas de sefarose com largo excesso de Glutathione-GST-RBD é incubada com 200 µg de proteína do lizado celular por duas horas a 4°C em agitador circular (*Glas-Col®*), usando rotação baixa. Após este período todo o RAS-GTP presente nas amostras está ligado às micro esferas.

Tabela 3.3 Lista de anti-corpos utilizados na Tese.

Anti-corpo	Código	Farbicante	Método
Akt	#9272	Cell Signaling®	WB
Anti-BrdU	ab6326	Abcam®	IF
Anti-SQSTM1 / p62	ab56416	Abcam®	WB-IF
ATG7/APG7	sc-8668	Santa Cruz®	WB
BECN1	sc-11427	Santa Cruz®	WB
c-Myc	sc-41	Santa Cruz®	WB
DUSP1	ab195261	Abcam®	WB
DUSP6	ab54940	Abcam®	WB
GAPDH	sc-47724	Santa Cruz®	WB
γH2A.X (S139)	ab2893	Abcam®	WB
Goat anti rabbit conjugado a peroxidase	474-1506	KPL	WB
Goat anti-mouse conjugado a peroxidase	041-806	KPL	WB
Goat anti-Mouse IgG conjugado a Alexa Fluor Plus 488	A32723	ThermoFisher®	IF
Goat anti-Rabbit IgG conjugado a Alexa Fluor 568	A11011	ThermoFisher®	IF
Histone H2A.X	ab11175	Abcam®	WB
HRAS	sc-520	Santa Cruz®	WB-PD-IF
KRAS	sc-30	Santa Cruz®	WB
LC3	#3868	Cell Signaling®	WB-IF
p16	sc-1661	Santa Cruz®	WB
p19	sc-1063	Santa Cruz®	WB
p21	sc-6246	Santa Cruz®	WB
p27	sc-528	Santa Cruz®	WB
p38 MAP Kinase	#9212	Cell Signaling®	WB
p44/42 MAPK (Erk1/2)	#4695	Cell Signaling®	WB
Phospho-Akt (Ser473)	#9271	Cell Signaling®	WB
Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182)	#9211	Cell Signaling®	WB
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)	#9101	Cell Signaling®	WB
Phospho-p53 (ser15)	#9285	Cell Signaling®	WB
Phospho-S6 Ribosomal (Ser240/244)	#2215	Cell Signaling®	WB
Rabbit anti goat conjugado a peroxidase	141-306	KPL	WB
S6 Ribosomal	#2317	Cell Signaling®	WB

WB- Western Blot ; IF- Imunofluorescência; PD- Pull Down

A fim de extrair tudo que não é sefarose-GST-RBD-RAS-GTP lavamos as amostras gentilmente por oito vezes com tampão PBS mais inibidores com ciclos de centrifugação de três minutos a 6000rpm.

Depois da ultima etapa de lavagem enxugamos o excesso de tampão com papel filtro e o sedimento de micro esferas é ressuspenso em alíquotas de 50µL de tampão redutor que são fervidas a 100°C por 5 minutos. Esta ultima etapa é responsável por extrair todas as proteínas das microesferas restando solúveis no sobrenadante GST-RBD, RAS e GTP. Centrifugamos a suspensão a baixa velocidade para sedimentar as micro esferas de sefarose e recolhemos cuidadosamente todo o sobrenadante de cada amostra que corresponde ao total da fração de ER:HRAS^{G12V}-GTP contida em 200µg de proteína celular.

Todo o sobrenadante obtido na última etapa foi fracionado por SDS-PAGE e submetido a *western blot* com anticorpo monoespecífico anti-HRAS que depois de todo este procedimento permitirá estimar a fração de HRAS-GTP de cada amostra.

Mas, é importante salientar que no western final comparou-se a fração de ER:HRAS^{G12V} total contido em 40µg de proteína celular com a fração de ER:HRAS^{G12V}-GTP, extraída de 200µg de proteína celular. Logo, o valor estimado de ER:HRAS^{G12V}-GTP foi dividido por cinco para poder ser comparado com o valor estimado de ER:HRAS^{G12V} total da mesma amostra de lisado celular. Desta maneira, foi quantificada a razão $R = \text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}\text{-GTP} / 5 \times \text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}$ na condição experimental correspondente, razão esta que necessariamente está contida no intervalo $0 < R < 1$.

3.9.2 - Produção e purificação de GST-RBD (Glutathione-S-transferase – RAS-GTP Biding Domain)

Bactérias BL-21 competentes foram transformadas com o plasmídeo pGEX-GST-RBD e plaqueadas em LB-ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina (LB/amp). Uma colônia foi coletada e cultivada em 200mL de LB com 100 µg/mL de ampicilina (LB/Amp) por dezesseis horas a 37 °C sob agitação. Esses 200 mL foram diluídos em dois litros de LB/Amp, incubados a 37 °C sob agitação até atingir a densidade óptica de 0,84 (600 nm), o que levou cerca de uma a duas horas.

Para indução da proteína de fusão foi adicionado IPTG a 0,5 mM nos dois litros de meio com bactérias, sendo incubado por mais duas horas a 37 °C sob

agitação. A suspensão de bactérias foi centrifugada a 8.000 rpm por dez minutos a 4 °C. O sedimento de bactérias foi posto em gelo e ressuspendido com 20 mL de tampão de lise (50 mM de Tris pH 7.5, 1% de triton X-100, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 10 µg/mL de leupeptina e aprotinina). As bactérias foram então lizadas com auxílio de sonificador (dez sonicações de um minuto, com intervalo de um minuto, com o tubo imerso em gelo). A suspensão resultante foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante coletado e congelado a -80°C com 10% de glicerol ou imediatamente usado para purificação da proteína RAS-GTP. Mas, para ser de fato usada em reação de afinidade para captura de RAS-GTP, GST-RBD é associada também por ligação de alta afinidade a micro esferas de glutathiona-Sepharose-4B.

Meio mililitro de microesferas de *Glutathiona-Sepharose* 4B (*Amersham Biosciences*®) previamente lavados por três vezes com PBS gelado, foram incubados com 12 mL do extrato de bactérias, obtido no procedimento anterior, por uma hora e meia a 4°C sob rotação. O tubo foi centrifugado por três minutos a 3.000 rpm e os *beads* foram transferidos para *ependorf* de 1,5 mL e resuspendido com 1 mL de tampão de lavagem (50 mM de Tris pH 7.5, 0,5% de Triton X-100, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 1 µg/mL de leupeptina e aprotinina), lavados por seis vezes e ressuspendidos em 5 mL do mesmo tampão na presença de glicerol a 10%. Cem microlitros dessa suspensão contendo a proteína de fusão, GST-RBD, fortemente associada à superfície das microesferas de sefarose, foram aliquotados em tubos *ependorf* e armazenados a -80°C até o momento do uso.

3.10 - Reações moleculares com ácidos nucleicos

3.10.1 - Transcrição Reversa (RT)

O RNA extraído foi quantificado e tratado com DNaseI por dez minutos a 37°C e a enzima é inativada a 75°C por cinco minutos. Em seguida, 1 µL de dNTP a 10 mM e 1 µL de *random primers* a 300 nM foi adicionado ao tubo contendo a concentração desejada de RNA (cerca de 4 µg), incubado por 65°C por cinco minutos e imediatamente posto em gelo. A reação de transcrição reversa é realizada com a adição de tampão da enzima, 5 mM de MgCl₂, 0,1 M de DTT e 5 U da transcriptase reversa *SuperScriptII™* (*Invitrogen*®) no volume final de 20 µL, sendo incubado a 25 °C por dez minutos, 50 °C por 50 minutos e 85 °C por cinco minutos

em termociclador. O cDNA resultante é imediatamente submetido a reação de PCR ou congelado a -20 °C até o uso.

Tabela 3.4. Lista de *primers* utilizados nos experimentos de qPCR.

Primers	Sequência 5'-3'
Hras	F:TCAGGACCTCGCCGCAA R:ATCTCACGCACCAACGTGTAG
E6/HPV16	F:GAACAGCAATACAACAAACCGT R:AGGACACAGTGGCTTTTGAC
E7/HPV16	F:TTTGCAACCAGAGACAAGCTGAT R:TTCATCCTCCTCCTCTGAGCTG
RPL19	F:TGGGCTGATCATCCGCAAGCC R:CCCATGTGCCTGCCCTTCCG
F: <i>Foward</i> e R: <i>Reverse</i>	

3.10.2 - PCR quantitativo

Primers para PCR quantitativo foram desenhados pelo programa *Pickprimers* do NIH de forma que todos amplificam produto de 90 pb (Tabela 4). Os dados de expressão de RNAm foram normalizados pela expressão de RPL19. Para cada reação de PCR, foi adicionado o mix do kit *SYBR® GREEN PCR Master Mix* (10 µL, *Applied Biosystems™*), alíquotas das reações de transcrição reversa (50 ng de RNA da RT), soluções de oligonucleotídeos *primers foward* e *reverse* (2,5 µL de cada, 300 nM).

As amplificações por meio de PCR foram realizadas em ciclos de reações de desnaturação (95 °C, 15 segundos), de anelamento e de polimerização (60 °C, 60 segundos) em um termociclador apropriado (*StepOne Plus*, *Applied Biosystems*) e os dados foram coletados pelo programa *StepOne* (*Applied Biosystems*). Para cada reação foi determinada a eficiência dos *primers* no programa *LinRegPCR* (versão 12.17). Para quantificação relativa dos dados obtidos, foi utilizado o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001).

3.11 - Citometria de fluxo

Para os experimentos de citometria de fluxo, as células foram plaqueadas em placas *Corning®* de seis poços, cultivadas e tratadas em períodos determinados

pelos experimentos. Todas as amostras foram lidas no equipamento *Attune NxT Blue-Red* (Thermo Fisher®) e analisadas pelo programa *FlowJo*®.

3.11.2 - Ciclo celular

Decorrido o devido tempo de tratamento, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS, as células foram liberadas por tripsinização, lavadas com PBS+ 5% de SFB para inativar a tripsina e, finalmente, lavadas com PBS puro. O sedimento celular foi fixado em etanol 75% com 25% de PBS gelado. As células uma vez fixadas foram mantidas a 4 °C por pelo menos doze horas auxiliando o processo de permeabilização.

Para a marcação de DNA total, as células fixadas foram lavadas duas vezes com PBS e então ressuspensas em uma solução 100 µg/mL de iodeto de propídio (PI) contendo 50 µg/ml de RNase A (*Invitrogen*®). As amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz, só então lidas no citômetro.

Nos casos de dupla marcação, o conteúdo de DNA total foi determinado por PI e a replicação de DNA por pulso de 1h de incorporação de EdU (5-ethinil-2'deoxiuridina) a 50 µM. O processo de fixação e marcação com anti-EdU seguiu estritamente os procedimentos indicados pelo protocolo do fabricante do produto *Click-iT*® AlexaFluor 647 (Thermo Fisher®), posteriormente prosseguimos com a marcação usando PI conforme indicado acima.

Os dados de marcação simples com PI foram analisados usando o método pragmático de Watson (WATSON; CHAMBERS; SMITH, 1987), já as amostras contendo dupla marcação (PI e EdU) tiveram suas populações separadas manualmente. Em todos os casos o programa *FlowJo*® foi utilizado.

3.11.3 - Morte e sobrevivência celular

A sobrevivência celular foi determinada pela ausência de marcação de dois reagentes: Anexina V e PI. Uma das ultima funções perdidas pelas células que estão passando por um estágio de estresse é o controle da permeabilidade de membrana sendo que ambos os reagentes alcançam o interior das células somente quando existe um processo de morte instalado.

Este processo pode passar ou não por apoptose, sendo que um dos marcadores deste tipo de morte é a exposição de fosfatidilserina na camada externa

da membrana plasmática. A anexina V, por possuir alta afinidade ao lipídio e quando conjugada a um fluoróforo, é usada como ferramenta para distinguir células saudáveis das não saudáveis, se ligando a fosfatidilserina da membrana celular.

Figura 3.7. As células mortas aparecem predominantemente na área de dupla marcação: Citometria de fluxo para marcação com Anexina V e PI. Exemplo ilustrativo do perfil da distribuição de células marcadas após o décimo dia de indução por 50 nM de 4OHT. Quadro inferior esquerdo evidencia células sobreviventes (duplo negativo para as marcações indicadas).

Adicionalmente o PI é usado como um marcador de necrose, tipo de morte que leva diretamente ao estágio de perda de permeabilidade de membrana sem que haja exposição de marcadores de superfície.

Quando observamos predominantemente marcação dupla, como indicado na figura 3.7, interpretamos que as células já perderam integridade de membrana sem que houvesse exposição de fosfatidilserina na superfície externa, assim produzindo um estado de necrose sem passar por apoptose necessariamente.

Após o período indicado para cada experimento as células foram tripsinizadas, lavadas e incubadas por trinta minutos com 100 μ L da solução de 1 μ g/mL de PI com 5 μ L de Anexina V conjugada com *Alexa Fluor 488* conforme protocolo do fabricante *Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa®* (Thermo Fisher®).

3.11.4 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (EO)

As espécies reativas de oxigênio globais foram medida pela incubação por uma hora com 50 μ M do reagente Carboxi-H₂DCFDA (6-Carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoriceína diacetato) que é oxidado intracelularmente originando a forma fluorescente a DCF (*Thermo Fisher*®). Após este período de incubação as células são tripsinizadas e lidas em citômetro de fluxo conforme especificações do fabricante.

O superóxido mitocondrial foi medido por meio da incubação de uma hora com o reagente MitoSOX™ (*Invitrogen*®) que possui afinidade específica a organela e gera fluorescência vermelha assim que oxidado.

Em ambos os casos a distribuição das populações tratadas e não tratadas foram comparadas usando o método estatístico de *Kolmogorov-Sminorf* (K-S estatística) capaz de determinar a porcentagem de deslocamento, no eixo de fluorescência, de uma população em relação a outra.

3.12 - Imunofluorescência

Células foram plaqueadas em lamínulas dispostas no fundo de placas de seis poços até atingirem a confluência indicada para a realização de cada experimento. Após a realização dos tratamentos indicados, conforme exigência experimental, as lamínulas foram fixadas em paraformaldeído 1% por 20 minutos e depois mantidas em PBS (4-8°C) por pelo menos 24h. As células foram permeabilizadas em 0,2% de TritonX-100 por dez minutos. As lamínulas foram então lavadas três vezes em PBS (KCl 2,7 mM; NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ anidro 8 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; CaCl₂•2H₂O 0,68 mM; MgCl₂•6H₂O 0,49 mM – solução com pH 7,2) e depois incubadas com o respectivo anticorpo primário (diluído em PBS conforme melhor resultado de titulação previamente realizada) por três horas.

Posteriormente as lamínulas foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado com AlexaFluor 488/568 por três horas. As lamínulas foram então lavadas uma vez em PBS, incubadas por cinco minutos com 5 μ g/ml de DAPI - *VECTASHIELD*® *Mounting Medium* (*Vector Labs*™), lavadas três vezes em PBS e finalmente montadas em lâminas para visualização no microscópio de imunofluorescência *Olympus*™ BXS1 e analisadas usando o programa *Olympus-Cell F*®.

3.12.2 - Ensaio de exposição de simples fita de DNA (*ssDNA assay*)

Um método bastante utilizado para observar traços de fita simples de DNA expostas devido a estresse replicativo e/ou mecanismos de correção a dano no DNA que expõe simples fita é a detecção de BrdU (Bromodeoxiuridina) incorporado em DNA, numa preparação com DNA mantido nativo. O BrdU é incorporado no lugar da timidina, todavia para acessar todo o BrdU incorporado por meio do seu anti-corpo, o DNA deve ser desnaturado, caso contrário as células expõe apenas BrdU incorporado em raros segmentos de fita simples de DNA livremente expostas ao acesso por anti-BrdU que dão origem a pequenos traços de focos de fluorescência. Observamos que em SLi3.2 raramente o número de focos excede 15, que estão localizados em sua grande maioria em células na fase S em trechos de simples fita encontrados nas forquilhas de replicação de DNA.

Inicialmente foram plaqueadas 4×10^3 células/cm² em placas *multi well* de seis poços contendo em seu interior uma lamínula. 48 horas após o plaqueamento as células foram encubadas por 24h com 50µM de BrdU. Após a incubação com BrdU foi iniciada a indução com 4OHT conforme discriminado nos resultados. Como controle da incorporação de BrdU, para cada amostra, uma lamínula foi mantida para total desnaturação do DNA com 2 M de HCl, dando acesso ao anti-BrdU a todo o DNA marcado com BrdU (Figura 3.8).

Para cada ponto avaliado realizamos a fixação, permeabilização e marcação conforme o protocolo geral de imunofluorescência descrito acima.

3.12.3 - TUNEL

Para a detecção de quebra de dupla fita de DNA (DSB) usamos a técnica de TUNEL (deoxinucleotidil transferase mediada por dUTP-Fluoreceína terminalmente marcada) acessada por meio do *kit Apoptosis Detection System Fluorescein* (*Promega*®). Para cada amostra avaliada realizamos a fixação e permeabilização conforme descrito acima. A marcação foi realizada conforme o protocolo geral do fabricante.

3.13 - Medição da concentração de lactato

Células foram plaqueadas em placas de seis poços como nas curvas de crescimento. Após o período indicado (tempo zero, depois a cada dois dias) coletamos 300 μL do meio de cultura condicionado da placa e centrifugamos a 14.000 rpm por 30 minutos a 2 °C (microcentrífuga *Eppendorf*®) usando microtubos do tipo “centricon” (*Vivaspin 500 GE Healthcare*®) com *cut-off* de 10 KDa para extrair qualquer traço de lactado desidrogenase que o meio condicionado poderia conter. Posteriormente condicionamos as amostras em -80 °C até que todas fossem recolhidas para medição de lactato.

Figura 3.8. O controle positivo para incorporação do análogo de timidina nos ensaios de BrdU nativo é realizado por meio da desnaturação do DNA com HCl: Todas as condições

experimentais avaliadas foram plaqueadas em duplicidade para que pudéssemos assegurar a incorporação do BrDu independente do tratamento **A.** Lamínula tratada com 2 M de HCL **B.** Lamínula onde foram avaliadas as condições experimentais. Montagem a direita aumentada 6x.

Adicionalmente, para cada ponto e replicata, foram coletadas as células, fixadas e contadas, como em curvas de crescimento, com o intuito de normalizar a concentração de lactato no meio pelo número de células presentes.

Após a preparação das amostras medimos a concentração de lactato no meio condicionado de todos os pontos coletados de uma só vez, seguindo restritamente o protocolo indicado em *Lactate Assay Kit (Sigma-Aldrich®)*.

3.14 - Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados com pelo menos duas replicatas técnicas e outras duas biológicas. Os gráficos apresentam a média das replicatas biológicas e as barras de erros representam o erro padrão de todas replicatas técnicas.

Para os gráficos onde consideramos múltiplos parâmetros de comparação (por exemplo, número de célula x tempo comparando diferentes tratamentos e ou sublinhagem) o método estatístico aplicado foi *Two Way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni. No entanto para comparações de uma única variável em relação ao tratamento e ou sublinhagem usamos *One Way ANOVA* também com pós-teste de Bonferroni.

Consideramos valores significativos aqueles com um *p value* menor que 5% ($p < 0,05$), porem indicamos também valores menores que 1% ($p < 0,01$) e menores que 0,1% ($p < 0,001$). Respectivamente tal valores são plotados nos gráficos com um, dois ou três símbolos (*/#, **/## e ***/###) Usamos * para comparações gerais ou comparação de células induzidas com 4OHT em relação a outras combinações de tratamentos, já # é usado para comparar o controle não induzido com células induzidas com 4OHT e/ou outros tratamentos.

Como já mencionado acima, as curvas relativas a população apresentando EO foram quantificados usando o método estatístico de *Kolmogorov-Sminorf* (K-S estatística) que determina a distância de uma população em relação a outra expressa em porcentagem de deslocamento. Posteriormente plotados em gráficos

de barras a porcentagem de deslocamento obtida e submetemos a nova estatística que aponta a significância destes números em relação ao controle.

Com o objetivo de facilitar a avaliação do leitor, em cada gráfico, apontamos o método estatístico e as referências simbólicas aplicadas em cada experimento. Para facilitar a plotagem dos gráficos e as análises estatísticas realizadas usamos o programa *GraphPad Prism 5*.

4 - RESULTADOS

4.1 - Altos níveis de expressão de HRAS^{G12V} em queratinócitos imortalizados por E6E7 geram estresse oncogênico de fenomenologia complexa

Os relatos da literatura sobre transformação por HRAS^{G12V} de queratinócitos imortalizados por E6E7 invariavelmente envolvem abordagens experimentais que amenizam os efeitos citotóxicos da oncoproteína tais como, por exemplo: 1- co-transdução/transfecção de HRAS^{G12V} com outros oncogenes, como o cMyc e genes anti-apoptóticos como Bcl2 que limitam a indução apoptótica (NARISAWA-SAITO et al., 2012); 2- seleção em meio contendo soro fetal bovino sabidamente inadequado para cultivo de queratinócitos (NARISAWA-SAITO et al., 2008); 3- manutenção das culturas por elevado número de passagens, com o propósito de selecionar sublinhagens clonais mais robustas, originárias randomicamente pela instabilidade genômica provocada por HRAS^{G12V} e E6E7 (FUSENIG; BOUKAMP, 1998). Todavia, a complexa fenomenologia disparada por essas abordagens dificulta a identificação dos mecanismos moleculares subjacentes à transformação que supostamente são iniciados por HRAS^{G12V}.

Após essa curadoria da literatura pertinente resolvemos iniciar este projeto explorando, a partir de queratinócitos imortalizados por E6E7, a seleção espontânea de sublinhagens que expressassem constitutivamente HRAS^{G12V}. Transduções independentes permitiram o isolamento progressivo de três sublinhagens policlonais expressando constitutivamente o pBabepuro-HRAS^{G12V}, denominadas SLc 1, 2 e 3; além destas uma sublinhagem controle foi obtida através de transdução com o vetor vazio. pBabepuro-Ø, chamada sublinhagem EV (Figura 4.1).

As três culturas de queratinócitos independentemente transduzidas progrediram por fases evolutivas muito semelhantes. Quatro dias após transdução os queratinócitos apresentaram muitos vacúolos e altíssimos níveis de HRAS^{G12V} detectados por *western blot*, quando comparados com queratinócitos transduzidos com o vetor vazio. Neste estágio o aspecto das culturas indicava população heterogênea de queratinócitos em avançado estado de estresse, sugerindo que pouquíssimas células poderiam sobreviver para originar sublinhagens estáveis. Trinta dias depois deste estágio inicial de crise (estresse oncogênico), apenas células saudáveis e morfológicamente iguais às parentais sobreviveram, porém mostrando expressão de HRAS^{G12V} em níveis drasticamente inferiores à média do

estágio inicial. Diferentemente das estratégias empregadas nos outros artigos, nós acompanhamos a evolução das culturas mostrando que as células que restavam e, portanto, constituíam as sublinhagens modelos para este e os outros trabalhos, são aquelas que expressam níveis de HRAS^{G12V} muito inferiores daqueles observados nos primeiros dias após à transdução. Provavelmente as células que constituem as sublinhagens estáveis são aquelas que foram infectadas por poucas cópias da oncoproteína fazendo com que elas escapassem do estresse oncogênico deletério promovido por sua atividade.

Figura 4.1. Níveis constitutivamente altos de HRAS^{G12V} selecionam negativamente queratinócitos imortalizados: Queratinócitos imortalizados por E6E7 foram transduzidos com os vetores pBabepuro-HRAS^{G12V} (SLc1, 2 e 3) e pBabepuro- Φ (EV). *Western blot* para HRAS mostra que os níveis da oncoproteína encontrados na população após trinta dias da transdução são drasticamente menores do que os observados nas culturas instáveis de quatro dias após a transdução. P-ERK foi usado como controle da atividade de HRAS e GAPDH como controle de carregamento proteico. Abaixo das bandas de *western blot* mostramos a quantificação da densidade conforme descrito em materiais e métodos normalizado pelo controle EV. À direita microscopias representativas do fenótipo observado no período (Sublinhagem SLc1 aumentada 200 vezes).

É importante destacar que não foi possível selecionar sublinhagens clonais, pois a partir de células isoladas em densidades muito baixas (100-300 células/cm²) estes queratinócitos não desenvolvem colônias mesmo quando transduzidos com HRAS^{G12V}. Por conseguinte, as sublinhagens SLc1, -2 e -3 foram isoladas a partir de aglomerados de queratinócitos sobreviventes, originários das três transduções independentes.

As sublinhagens SLc1,-2 e -3 são estáveis exibindo as seguintes características: a) expressão moderada do HRAS^{G12V}, levando a níveis de HRAS (mutado e WT endógeno) geralmente maiores quando comparados aos do controle EV (Figura 4.1); b) taxas de crescimento significativamente maiores que EV (Figura 4.2A); c) densidades de saturação muito superiores às do controle EV (Figuras 4.2B e 2C). Surpreendentemente quando realizamos o mesmo procedimento, porém introduzindo KRAS^{G12V} no lugar de HRAS^{G12V}, não observamos nenhum período de transição/ adaptação ao novo estímulo oncogênico (Figura 4.3); as sublinhagens SLKs possuem a mesma morfologia, sem indícios de estresse e de variações na expressão da oncoproteína, do começo ao fim do período avaliado. Para entender como KRAS^{G12V} interage com os queratinócitos imortalizados se faz necessário a elaboração de modelos mais sofisticados; entretanto, a comparação entre as duas isoformas de RAS, dentro do contexto aqui explorado, certamente é um campo bastante prolífico no qual pretendemos investir; acreditamos que tais dados mostrem que o estresse sistêmico imposto por RAS, em queratinócitos imortalizados, é isoforma dependente.

Da análise da evolução das três culturas de queratinócitos E6E7 imediatamente após as transduções de HRAS^{G12V} e das características das sublinhagens estáveis isoladas, concluímos que: altos níveis de expressão de HRAS^{G12V} causam enorme estresse oncogênico levando à inviabilização da maior parte dos queratinócitos; da crise oncogênica emergem queratinócitos viáveis com níveis de HRAS^{G12V} relativamente baixos a partir dos quais são progressivamente selecionadas sublinhagens estáveis com traços fenotípicos de transformação; a complexa fenomenologia do período de estresse oncogênico pós-transdução de HRAS^{G12V} torna esta abordagem muito desfavorável para estudar os mecanismos moleculares subjacentes ao processo de sobrevivência e seleção de linhagens transformadas estáveis, exigindo a busca de abordagens alternativas mais favoráveis, como a apresentada a diante.

Figura 4.2. Níveis baixos de HRAS^{G12V} proporcionam aos queratinócitos características de células em estágio inicial de transformação: A. Curva de crescimento comparando potencial proliferativo entre as sublinhagens SLcs e seu controle EV; **B.** O controle EV foi mantido em cultura durante 20 dias no intuito de determinar sua densidade máxima de saturação. O ponto vermelho indica quando a densidade média máxima do período é alcançada (2×10^5 Células/cm²); **C.** As SLcs e EV foram plaqueadas em uma densidade inicial de 5×10^4 células/cm². Após dez dias foi iniciada a coleta de cinco pontos até o vigésimo dia. Curvas e barras apresentam erro padrão das replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***), submetidas a pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.3. Queratinócitos transduzidos com KRAS^{G12V} constitutivo apresentam morfologia homogênea durante todo o período de seleção: Queratinócitos imortalizados por E6E7 foram transduzidos com os vetores pBabepuro-KRAS^{G12V} (SLK1 e 2) e pBabepuro-Φ (EV). **A.** Curva de crescimento comparando potencial proliferativo entre as sublinhagens SLKs e seu controle EV; **B.** *Western blot* para KRAS das sublinhagens SLK1 e 2 após 30 dias da indução; **C.** Microscopias representativas da morfologia observada no período de seleção da Sublinhagem SLK1 (aumentada 200x). Curvas apresentam erro padrão das replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***), submetidas a pós-teste de Bonferroni.

4.2 - As sublinhagens SLi1.3 e SLi3.2 permitem modular o fenômeno de estresse oncogênico causado por HRAS^{G12V}

Dadas as conclusões obtidas a partir das sublinhagens constitutivas SLcs optamos por utilizar uma forma induzível de HRAS^{G12V} para estudar os mecanismos moleculares do estresse oncogênico promovido por esta oncoproteína nos queratinócitos E6E7. Escolhemos o gene quimérico ER:HRAS^{G12V} inserido num vetor viral de expressão constitutiva, cujo produto é a proteína de fusão ER:HRAS^{G12V} que pode ser ativada de forma modulada por indução com o análogo

de estrogênio 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) (Figura 3.2A). O racional desta abordagem é modular o nível de atividade de HRAS^{G12V} com o objetivo de identificar e separar, entre a miríade de mecanismos moleculares subjacentes ao fenômeno, aqueles que bloqueiam o ciclo celular daqueles que ajudam a promover transformação de queratinócitos E6E7 por essa oncoproteína.

Como apresentado em Materiais e Métodos foram obtidas três sublinhagens induzíveis independentes, dos quais exploramos duas delas, SLi1.3 e SLi3.2, nas mais diversas condições experimentais. As sublinhagens SLi1.3 e SLi3.2, de queratinócitos ER:HRAS^{G12V}, foram comparadas entre si com o objetivo de determinar qual seria o melhor modelo para modular a atividade de ER:HRAS^{G12V} na forma de níveis de concentração de ER:HRAS^{G12V}-GTP.

Na figura 4.4 mostramos que em ambas as sublinhagens a curva da concentração de ER:HRAS^{G12V}-GTP não acompanha a curva de indução da proteína total, sugerindo que há um limite na ativação de ER:HRAS^{G12V} independentemente dos níveis de indução atingidos por 4OHT. Os níveis máximos de ER:HRAS^{G12V}-GTP foram alcançadas com 50nM de 4OHT, concentração que foi adotada como padrão para estudar experimentalmente o estresse oncogênico deletério promovido por HRAS^{G12V}. Com 50nM de 4OHT, observamos níveis de ER-HRAS^{G12V} semelhantes aos níveis mais altos de HRAS^{G12V} detectados nas culturas em estresse oncogênico que originaram as SLcs (Figuras 4.5A e B), inclusive a marcante ativação de ERK à jusante, na forma de P-ERK (Figura 4.5C).

Exploramos em maior intensidade o estresse oncogênico causado por HRAS^{G12V} por meio da sublinhagem SLi3.2, pois esta apresenta melhor relação dose resposta ao 4OHT e quase nenhum vazamento de ER:HRAS^{G12V} quando não induzida (Figuras 4.4 e 3.2B).

As curvas de crescimento da sublinhagem SLi3.2 mostram possíveis destinos celulares diferentes de acordo com a concentração do indutor (Figura 4.6A). 5nM de 4OHT permite proliferação celular mesmo que inferior ao do controle, além de ser a única concentração do indutor que não provoca morte celular em ensaios de densidade máxima de saturação (Figura 4.6C).

As células tratadas com as concentrações 20, 50 e 100nM de 4OHT mostraram proliferação muito baixa até o sexto dia de indução quando começaram a cair rapidamente. Em densidades máximas de saturação claramente as induções mais altas de 4OHT causaram morte celular, depois de seis dias de indução. Esses

resultados mostram que em nenhuma condição avaliada os altos níveis de HRAS^{G12V} são capazes de trazer vantagens a queratinócitos imortalizados; pelo contrário, o destino dessas células parece ser o mesmo das células transduzidas com o vetor constitutivo de HRAS^{G12V} em seus primeiros dias após a transdução.

Também observamos um processo de vacuolização celular diretamente proporcional ao aumento da concentração do indutor (Figura 4.7A), sendo que as células induzidas com as maiores concentrações de 4OHT apresentam um fenótipo similar aos das culturas em crise que deram origem as SLcs que ainda carregavam altos níveis de HRAS^{G12V}.

A vacuolização causada por HRAS^{G12V} é traduzida em dados de citometria de fluxo por meio do eixo SSC (*Side Scatter*) que expressa a complexidade intracelular. A população de células não tratadas apresentou uma maior homogeneidade de tamanho e complexidade; no entanto, com aumento da concentração de 4OHT a população se torna mais heterogênea migrando para a parte superior do gráfico (Figuras 4.7A e B).

As SLi3.2 mais vacuolizadas sumiram da população após seis dias de indução (Figura 4.7C) assim como ocorreu com as culturas que originaram as células constitutivas SLcs, porém em um período entre o quarto e o trigésimo dia da transdução. No mesmo período de seis dias há um crescimento substancial da população apresentando DNA fragmentado, um forte indicio de morte celular, correlacionando aumento de vacuolização com morte (Figura 4.7D).

Figura 4.4. A saturação da atividade de RAS, na forma de ER:HRAS^{G12V}-GTP, é atingida muito antes que a saturação da indução da proteína total na forma de ER:HRAS^{G12V}: *Ras-GTP pull down assay* acompanhado de *Western blot*. Conjunto de curvas dose resposta a 4OHT (dois experimentos independentes para cada sublinhagem) em duas sublinhagens induzíveis SLi1.3 e SLi3.2, mostram que o aumento da atividade de RAS não depende apenas da indução de ER:HRAS^{G12V}. Tal resultado nos mostra que não há necessidade de usarmos induções superiores a 50nM de 4OHT já que a atividade máxima da oncoproteína foi alcançada nesta concentração. Este resultado também sugere que existe um excedente de ER:HRAS^{G12V} que pode ser ativado por estimulação de GEFs por meio da adição de fatores de crescimento.

Figura 4.5. A sublinhagem SLi3.2 induzida por 50 e 100nM de 4OHT atinge níveis de HRAS^{G12V} próximos aos das culturas instáveis que originaram as SLcs: **A.** *Western blot*. Os níveis da oncoproteína expressa nas culturas que deram origem as SLcs (após o quarto dia da transdução), foram comparadas com os níveis de EV, E6E7 e curva dose de 4OHT realizada em SLi3.2 induzida por 72h. O procedimento foi realizado em membrana única; **B.** Quantificação normalizada pelo controle não induzido da SLi3.2 do *western blot* da figura A mostrando os níveis elevados de HRAS; **C.** Curva dose da linhagem SLi3.2, 48h de indução, mostrando o limite de ativação de ER:HRAS^{G12V} na forma de ER:HRAS^{G12V}-GTP. P-ERK e P-Akt1 mostram atividade de HRAS à jusante e c-Myc sua degradação em dependência de dose de RAS. GAPDH foi usado como controle de carregamento. Números abaixo das bandas mostram quantificação normalizada pelo controle não induzido. Já o símbolo σ indica o desvio padrão dos controles de proteína total (ERK-Total e Akt 1-Total) e controle de carregamento (GAPDH).

Figura 4.6. Baixa indução ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP permite proliferação celular sem aumentar a densidade de saturação: **A.** Curva de crescimento da SLi3.2 em diferentes concentrações do indutor 4OHT; **B.** A SLi3.2 foi mantida em cultura durante 20 dias sem indução (azul escuro) no intuito de determinar sua densidade máxima de saturação. A densidade média máxima do período foi alcançada em $1,5 \times 10^5$ Células/cm². Em azul claro apresentamos a curva controle (células não induzidas) do gráfico A; **C.** A SLi3.2 foi plaqueada em uma densidade inicial de 10^4 células/cm². Após doze dias foram iniciadas as induções com diferentes concentrações de 4OHT e coletados cinco pontos até o vigésimo dia. Curvas e barras apresentam erro padrão das replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*/#); $p < 0,01$ (**/##); $p < 0,001$ (***/###), submetidas a pós-teste de Bonferroni. # foi usado para comparar o controle com a população induzida, já * foi usado para as demais comparações.

Figura 4.7. O aumento da indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP provoca vacuolização celular ilustrada pelo eixo SSC (*Side Scatter*) em gráficos de citometria de fluxo: A.

Citometria de fluxo acompanhada de microscopia (200x). SLi3.2 foi submetida a indução variável por seis dias, posteriormente foram tiradas fotos representativas da população, coletadas e lidas em citômetro de fluxo; **B.** Complexidade de SLi3.2 induzida por 50nM de 4OHT acompanhada por dez dias; **C.** Gráficos de número de células versus complexidade celular, para células controle e induzidas por 4OHT, enfatizam a queda da população mais complexa no décimo dia de indução em comparação ao sexto dia; **D.** Marcação com iodeto de propídio (PI) apresenta crescimento significativo da população SubG1 a partir do quinto dia de indução, sugerindo que as células mais complexas são as aquelas que estão sendo levadas a morte. Curvas e barras carregam o erro amostral. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (#); $p < 0,01$ (##); $p < 0,001$ (###), submetidas a pós-teste de Bonferroni.

4.3 - Células SLi3.2 permitem evidenciar mecanismos moleculares homeostáticos conectando subsistemas de controle do estresse provocado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP

Curvas de crescimento com doses crescentes de 4OHT sugeriram diferentes destinos para as células SLi3.2 em função dos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP alcançados pela ação do indutor (Figura 4.6). Estas observações nos motivaram a explorar a resposta sistêmica das células SLi3.2 a concentrações crescentes de 4OHT com a expectativa de poder identificar mecanismos moleculares subjacentes ao estresse oncogênico causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP.

Para esse fim, iniciamos um experimento de indução sustentada das SLi3.2 com 5, 10, 20, 50 e 100nM de 4OHT, com meio de cultura trocado por meio fresco periodicamente a cada dois dias (Figura 4.7). Após três semanas de experimento apenas as garrafas tratadas com 5 e 10nM do indutor continham células viáveis; garrafas com 20nM de 4OHT ainda mostravam poucas células arredondadas e refringentes, mas notoriamente inviáveis.

As células tratadas com 4OHT 5 e 10nM cresceram lentamente e foram sistematicamente ressemeadas para o inóculo inicial quando atingiam aproximadamente 70% de confluência. Após seis meses e treze passagens as células tratadas com 5 e 10nM de 4OHT originaram as sublinhagens LTE.5 e LTE.10 (*long term exposition*). Ensaios de *western blot* comparativos destas sublinhagens demonstraram que LTE.5 e LTE.10 tinham reduzida resposta a 4OHT. Portanto, as sublinhagens LTE.5 e LTE.10 tinham se adaptado a 4OHT e eram completamente diferentes da parental SLi3.2 (Figura 4.9A), porém muito semelhantes entre si. Além disso, curvas de crescimento a partir de inóculo muito baixo (Figura 4.9B) ou

partindo de densidades muito altas (Figura 4.9C) confirmaram a resposta de estresse reduzida das células LTE.5 a concentrações altas de 4OHT. No entanto, a concentração de 50nM de 4OHT provocou um aumento na densidade de saturação, sendo que depois da adaptação ao 4OHT, a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP atingida, trouxe vantagens a LTE.5, sugerindo que esta sublinhagem pudesse se comportar como uma célula em fase inicial de processo de transformação.

Figura 4.8. Origem das sublinhagens LTE.5 e LTE.10: Apenas 5nM e 10nM de indução com 4OHT são capazes de gerar queratinócitos imortalizados viáveis a partir de SLi3.2. Dividimos SLi3.2 em cinco garrafas de cultivos onde cada uma foi induzida com uma concentração de uso do indutor 4OHT. Após os períodos indicados na figura somente as concentrações mais baixas do indutor, consequentemente de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, foram capazes de gerar células viáveis que puderam ser usadas para realização de outros experimentos.

Destas observações até aqui levantadas, principalmente curva dose resposta, ausência de vazamento, estabilidade do sistema quando não induzido, estresse e destinos celulares dependentes da dose do indutor, etc. concluímos que o estoque preservado da sublinhagem SLi3.2 se prestava à análise experimental dos mecanismos moleculares subjacentes ao estresse oncogênico causado por indução da ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP em queratinócitos E6E7.

Figura 4.9. Processo de seleção da LTE.5 provoca redução no potencial de indução por adaptação ao indutor 4OHT, porém traz ganho proliferativo e maior densidade de saturação quando induzida com 50nM de 4OHT: **A.** *Western blot* de HRAS. Curva dose resposta comparativo entre SLI3.2, LTE.5 e LTE.10 aponta que depois de seis meses de indução com 4OHT são selecionadas células com menor potencial de indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP; por LTE.5 e LTE.10 serem semelhantes entre si, no que se refere a indução de ER:HRAS^{G12V}, os experimentos adicionais foram realizados só com a primeira sublinhagem **B.** Curva de crescimento da sublinhagem LTE.5 mostra que diferentemente da célula que lhe deu origem (SLI3.2) qualquer nível de indução permite proliferação celular; **C.** A LTE.5 foi plaqueada em uma densidade inicial de de 10⁴ células/cm². Após doze dias foram iniciadas as induções com diferentes concentrações de 4OHT e coletados cinco pontos até o vigésimo dia. Também diferentemente de SLI3.2 50nM de 4OHT em LTE.5 provoca aumento de densidade de saturação. Curvas e barras apresentam erro padrão das

replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (#); $p < 0,01$ (##); $p < 0,001$ (###), submetidas a pós-teste de Bonferroni.

4.4 - Altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP em células SLi3.2, causam bloqueio da progressão G1→S e acúmulo da população em G2/M seguida de morte celular por necrose

Fixamos a concentração de 4OHT em 50nM para indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP e acompanhamos os parâmetros do ciclo celular e crescimento populacional das células SLi3.2.

Após 24h de indução ocorreu uma drástica queda na população em fase S passando de 20% para < 5% (Figuras 4.10A e 4.10C) resultado do bloqueio na transição G1→S; consequentemente, a proliferação celular entrou em rápida estagnação (Figura 4.10B). Paralelamente, a população em G2/M aumentou até o sexto dia, indicando que também houve bloqueio em tal fase do ciclo. No oitavo dia, ocorreu queda em G2/M (Figuras 4.10C e D), principalmente devido a morte celular indicada pelo aumento da fração SubG1 (ver Figura 4.7D) e, também, por ensaio de Anexina V versus PI (Figura 4.11).

Este cenário sugeriu que as células bloquearam o ciclo celular mobilizando mecanismos de sobrevivência, os quais, no entanto, não foram suficientes para impedir o surto de morte celular após o sexto dia. Estes mecanismos, que passam pelo bloqueio da transição G1→S, não parecem seguir vias canônicas uma vez que p16, p19 e p27 estão menos expressos e p21 inalterado na presença de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP (Figura 4.12B), mostrando um padrão coerente com a sinalização mitogênica traçada por P-ERK em um claro sinal de “prossiga”, o que de fato não está ocorrendo devido a um aparente estresse mitogênico (Figura 4.12C).

Notamos também que tratamento das células com o inibidor geral de caspases, ZVAD-FMK, não contribuiu para a sobrevivência, permitindo-nos descartar morte celular por apoptose. Por outro lado, coerentemente, o padrão de marcação Anexina V versus PI e baixa atividade de p53 destas sublinhagens implicam em morte celular por necrose (Figura 4.11C).

Figura 4.10. Altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP bloqueiam a progressão G1→S e causam acúmulo de população em G2/M: **A.** Citometria de fluxo EdU, pulso de 1h, versus PI. *Density plot* do perfil bidimensional do ciclo celular de SLi3.2 mostra um drástico bloqueio da transição G1→S após 24h de indução com 50nM de 4OHT (setas vermelhas). **B.** Curva de crescimento evidencia estagnação da proliferação celular em células induzidas. **C.** Quantificações das citometrias de fluxo realizadas para SLi3.2, induzidas com 50nM de 4OHT e não induzida por período de dez dias, mostrando bloqueio da transição G1→S e bloqueio da população na fase G2/M; **D.** Perfil unidimensional (PI) da população quantificada em C. Curvas apresentam erro padrão das replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***), submetidas a pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.11. Altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP causam morte celular progressiva, que é agravada no sexto dia de indução: **A.** Citometria de fluxo Anexina V versus PI. Exemplo ilustrativo do perfil da distribuição de células marcadas após o sexto e oitavo dias de indução por 50nM de 4OHT combinado ou não com 25µM do inibidor de caspases ZVAD-FMK. Consideramos como células sobreviventes aquelas que habitam o quadrante inferior à esquerda por não estarem marcadas com os reagentes descritos (duplo negativo). Ausência de marcação única para Anexina V, grande porcentagem de duplo positivo e marcação com PI mostram um padrão de morte por necrose; **B.** Quantificação de experimento apresentado em A mostra que em nenhum dos dias medidos o ZVAD-FMK foi capaz de promover sobrevivência nas células induzidas. Curvas e barras apresentam erro padrão das replicatas A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***), submetidas a pós-teste de Bonferroni.; **C.** *Western blot* para atividade de p53 (P-p53). Comparação entre sublinhagens usadas na tese (E6E7, SLI3.2 induzida por 24h com 50nM de 4OHT e não induzida) e controles positivos (HaCaT e HEK293 células não infectadas por E6E7) tradas por 30 segundos com luz UV (Ultra violeta).

Figura 4.12. A atividade mitogênica e de controladores sinalizam para a progressão do ciclo celular: **A.** Western blot. Controle de indução e atividade de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP 50nM de 4OHT, por 48 e 96h para o conjunto de ensaios de western blot de atividade mitogênica, autofágica (a diante figura 4.23) e painel de Ps; **B.** Enquanto p21 parece não sofrer alteração mediante a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, p16, p19 e p27 estão menos expressos; **C.** P-ERK se apresenta coerente com os westerns anteriores sinalizando atividade proliferativa. Números abaixo das bandas mostram quantificação normalizada pelos respectivos controles não induzidos em 48 e 96h, já o símbolo σ indica o desvio padrão dos controles de proteína total (ERK-Total) e controle de carregamento proteico (GAPDH).

4.5 - A resposta sistêmica das células SLi3.2 à indução sustentada de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP envolve estresse replicativo e quebra de dupla fita de DNA

Tratamos a sublinhagem SLi3.2 por 24 horas com BrdU, posteriormente substituímos o meio de cultura por meio fresco com e sem 50nM de 4OHT. A partir das células tratadas previamente com BrdU foram coletados cinco pontos conforme indicado na figura 4.13.

Após 24h de indução ocorre um acúmulo significativo da população apresentando entre 10 e 50 *foci* (segmento de simples fita de DNA conforme detalhado em materiais e métodos). Este percentual cresce até o quarto dia da indução, e se manteve o mesmo até o último dia avaliado. No mesmo quarto dia foi observado um aumento da população passando a apresentar mais de 50 *foci* por núcleo; a partir de então, mais da metade da população expôs uma quantidade muito elevada de *foci* por núcleo (Figuras 4.13A e B).

A presença de muitos *foci* por núcleo, disseminada na população, é uma evidência de estresse replicativo e/ou, em menor escala, recrutamento de vias de correção a dano no DNA, as DDR (*DNA damage response*), que expõem simples fitas; estes fenômenos são causados pela intensa atividade mitogênica de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, gerando exposição de simples fita de DNA.

A dinâmica dos acontecimentos expõe o paradoxo gerado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP no controle do ciclo celular. Ao mesmo tempo em que vias mitogênicas estão ativadas (P-ERK) e vias que freiam o ciclo celular estão inibidas (p19, p16 e p27) ou inalteradas (p21) não há progresso em S (estresse mitogênico). Provavelmente os mesmos fenômenos que estão causando o bloqueio do ciclo também estão causando dano no DNA e morte celular.

Por outro lado nota-se que células, submetidas à indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP e que já estavam em S ou no final de G1, prosseguem até o fim da fase de síntese adentrando em G2/M. Todavia também observamos bloqueio em G2/M, sugerindo que durante o processo ocorreu dano no DNA recém-sintetizado. De fato, ensaios de TUNEL mostraram que induções superiores a 20nM de 4OHT causam dano no DNA que se acentua no quinto dia de indução (Figuras 4.14A e C), mesmo período e concentrações de indutor em que ocorrem os seguintes fenômenos já relatados: aumento substância da população subG1 (Figura 4.7D), morte celular (Figura 4.11) e início da queda da população antes acumulada em G2/M (Figura 4.10C), além da incapacidade da SLi3.2 gerar células viáveis quando induzida com doses iguais ou maiores que 20nM de 4OHT por longos períodos (Figura 4.8).

Figura 4.13. Indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP gera progressiva exposição de trechos de simples fita de DNA: **A.** Ensaio de BrdU nativo. Microscopia de fluorescência mostrando a cinética de exposição de simples fita de DNA (ssDNA em verde) quando SLi3.2 expressa altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. O quadro azul apresenta população controle, enquanto o quadro cinza população induzida com 50nM de 4OHT no período de oito dias. As imagens grandes mostram perfil da população por meio de seus núcleos marcados em azul (DAPI) e BrdU marcado em verde (Alexa 488). Já as imagens com aumento maior (10x) ilustram a exposição de simples fita dentro dos núcleos em forma de *foci*. Os quadros em vermelhos ressaltam a resolução da imagem mostrando que é possível quantificar os *foci* observados; **B.** Quantificação de *foci* por núcleo marcado. Conforme descrito no texto; separamos a população em três fenótipos por número de *foci* encontrados no núcleo onde as barras apresentam porcentagem da população marcada: barra lisa menos de dez *foci* por núcleo; barra riscada entre dez e cinquenta *foci* por núcleo; barra quadriculada mais de cinquenta *foci* por núcleo. Foram contadas aproximadamente cinquenta células ($n \approx 50$) por dia por condição. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (#); $p < 0,01$ (##); $p < 0,001$ (###), submetidas a pós-teste de Bonferroni.

Figura 4.14. Altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP causam dano no DNA: Ensaio de TUNEL em sublinhagem SLI3.2 e pBabeER:φ tratadas com 4OHT por cinco dias. **A.** Painel ilustrativo da SLI3.2 induzida com concentrações variáveis de 4OHT e seu controle não induzido. Traços de DNA danificado (DSD apontados por setas na coluna ampliada) são marcados com Alexia488 dentro de núcleos marcados com DAPI em microscopias de fluorescência (160x). **B.** Os painéis abaixo mostram os controles do experimento com amostras tratadas e não tratadas com DNase assim como pBabeER:φ que foi tratado com 50nM 4OHT como controle do indutor. **C.** Quantificação do fenômeno ilustrado em figuras acima enfatiza elevada porcentagem de células marcadas na população induzida a partir de 20nM de 4OHT. Foram contadas aproximadamente n=100 células por

condição. A significância foi estabelecida por meio de *One Way ANOVA* $p < 0,001(###)$, depois submetidas a pós-teste de Bonferroni.

Tais dados apontam para um problema sistêmico causado pela alta atividade de ER:HRAS^{G12V} que atua em três frentes: estresse mitogênico que causa a maior parte do bloqueio na transição G1→S, além de estresse replicativo e oxidativo (discutido adiante) que também geram bloqueio generalizado do ciclo e são as maiores fontes de dano ao DNA, podendo ser a causa da morte celular, principalmente daquelas células que antes estavam bloqueadas em G2/M.

4.6 - O progressivo estresse oxidativo é a principal resposta sistêmica à indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP

Um dos fenômenos largamente relatados em células expostas a atividade de RAS mutado é o estresse oxidativo. Tal processo ocorre pelas mudanças de padrões e exigências metabólicas impostos pela alta atividade mitogênica da oncoproteína, além de ser um dos maiores causadores de instabilidade genômica que hora gera adaptação, mas na grande maioria das vezes causa morte celular decorrente do excessivo dano ao DNA (VALKO et al., 2004). As SLis, quando expostas a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, apresentam vários indícios de que o principal ator responsável pelo estresse sistêmico que estava levando-as a morte é o estresse oxidativo.

Usando um marcador geral para espécies oxidantes intracelulares DCF (2',7'-diclorofluoriceína) avaliamos o estado oxidativo dos queratinócitos submetidos a diferentes concentrações do indutor 4OHT (Figura 4.15A). Observamos que ocorre um claro deslocamento da população induzida para a região de maior fluorescência de DCF. Este resultado indica que ocorre aumento de espécie oxidantes dependente da dose de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. Por meio da indução de 50nM de 4OHT também medimos a geração específica de superóxido mitocondrial que apesar de menos intensa e mais tardia, se mostrou responsiva a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP (Figura 4.15B).

Figura 4.15. ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP provoca aumento de espécies reativas de oxigênio em dependência de dose: A. Níveis de EO por fluorescência de DCF em citometria de fluxo. No primeiro quadro a sublinhagem SLi3.2 foi tratada com diversas doses de 4OHT (tons de cinza) por seis dias e comparadas com controle não induzido (azul). No quadro abaixo em destaque população tratada com 50nM de 4OHT. A quantificação foi realizada por *Kolmogorov-Smirnov Test* (*K-S test*; # seta em vermelho) que mostra o deslocamento das populações tratadas em relação ao controle. As distâncias das distribuições são adquiridas em porcentagem de deslocamento em relação ao controle não induzido. O símbolo σ se refere ao desvio padrão entre as replicatas; **B.** Citometria de flux para *MytoSox* reagente específico para medir superóxido mitocondrial, que apontou um aumento pequeno, mas progressivo da SLi3.2 tratada com 50nM de 4OHT. *K-S test* aponta para as diferenças de deslocamento da população tratada em relação ao controle nos quarto (#) e oitavo dias (## setas em vermelho), enquanto que o σ foi usado para indicar desvio padrão das replicatas.

Como o estado oxidativo dos queratinócitos se mostrou decorrente do estresse causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, submetemos a sublinhagem SLi3.2 a tratamentos com MnTBAP, que mimetiza a ação de superóxido dismutase, e ao NAC (N-acetil-L-cisteína), um antioxidante genérico, esperando amenizar os efeitos do estresse oxidativo e observar se parâmetros de viabilidade celular são restaurados (Figura 4.16).

Figura 4.16. Antioxidante MnTBAP não protege os queratinócitos do estresse oxidativos provocado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: **A.** Curva de crescimento. A SLi3.2 foi submetida aos tratamentos de 4OHT (50nM), MnTBAP (10 μ M, um análogo de superóxido redutase) e a combinação entre eles (MnTBAP+4OHT). **B.** Citometria de fluxo Anexina V versus PI. Exemplo ilustrativo do perfil da distribuição de células marcadas após o sexto dia de indução. À esquerda quantificação do período avaliado comparando entre si os controles (Controle e MnTBAP) e células induzidas (4OHT e MnTBAP+4OHT). Apesar de haver uma aparente diferença de sobrevivência nas células induzidas e tratadas com MnTBAP, de acordo com os métodos estatísticos empregados, não houve significância estatística nos testes realizados. As barras e curvas apresentam erro amostral das replicatas.

O tratamento com 10 μ M MnTBAP, quantidade máxima possível sem causar citotoxicidade, não se mostrou promissor, pois em nenhuma das condições avaliadas observamos proteção celular. Este resultado sugere que não há participação do superóxido como um ator importante no processo oxidativo desencadeado pela

atividade de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. O aumento de superóxido mitocondrial observado pode ser decorrente do acúmulo de danos na organela, que em longo prazo, contribui para morte celular, mas nos primeiros dias de atividade de ER:HRAS^{G12V} possui uma contribuição marginal ao processo. Provavelmente subsistemas de resguardo da saúde mitocondrial, como é o caso da autofagia, estão atuando para reciclar a organela, evitando a geração ainda maior de espécies reativas.

No caso de NAC o antioxidante se mostrou capaz de promover proliferação da SLi3.2 até o quarto dia de indução e pelo menos manter o número alcançado de células até o sexto de atividade de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP (Figura 4.17A). De fato, avaliando parâmetros de sobrevivência celular, NAC promove proteção parcial contra morte da SLi3.2 induzida até o oitavo dia, período posterior ao estabelecimento da crise sistêmica gerada por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. Outro dado que corrobora esta proteção é que a porcentagem da população induzida apresentando DNA fragmentado (SubG1) é muito menor na presença de NAC, inclusive com uma diferença visual importante nos gráficos de citometria (Figuras 4.17B e C).

Parâmetros de ciclo celular mostram que NAC desacelera o ciclo das células induzidas e/ou combate o dano gerado pela indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, o que fica evidente na diminuição do acúmulo da população G2/M. Adicionalmente o antioxidante permite células induzidas entrarem na fase S mostrando que o bloqueio na transição G1→S foi parcialmente rompido. Tal fato pode estar relacionado a redução de P-p38, em células induzidas e tratadas com NAC (Figura 4.18), cuja atividade está vinculado ao bloqueio do ciclo celular por meio de inibição de ciclina D1 (LAVOIE et al., 1996) e de c-Jun (HUI et al., 2007).

Outro indicador que aponta para o NAC como um amenizador dos efeitos deletérios causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP é a queda, depois de 48h de indução, do indicador de dano no DNA γ H₂AX (Figura 4.18), que também pode ser sinalizada em resposta a fosforilação de p38 (LU et al., 2008), sugerindo que a sinalização de dano no DNA e bloqueio no ciclo celular estão conectados, sendo que o NAC combate diretamente o gerador desse estresse. Adicionalmente NAC está ajudando a fluência do ciclo celular reduzindo as espécies oxidantes globais e consequentemente a quantidade de fita simples expostas (Figura 4.19), um forte

indicador de que o estresse oxidativo também tem seu papel no dano do DNA disparado pela resposta sistêmica promovida por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP.

Figura 4.17. Antioxidante NAC aumenta a viabilidade dos queratinócitos submetidos ao estresse sistêmico causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: **A.** Curva de crescimento. A SLI3.2 foi submetida aos tratamentos de 4OHT (50nM), NAC (5mM) e a combinação entre eles (NAC+). **B.** Citometria de fluxo marcação de PI. Gráficos ilustrativo da população subG1, após o oitavo dia de indução, mostra (setas vermelhas) que NAC diminui consideravelmente a porcentagem de células induzidas com DNA fragmentado. À direita quantificação de todo o período de indução. **C.** Citometria de fluxo Anexina V versus PI. Exemplo ilustrativo do perfil da distribuição de células marcadas após o sexto dia de indução. Ao lado quantificação do período avaliado comparando controles entre si (Controle e NAC) e células induzidas entre si (4OHT e NAC+). **D.** Ciclo celular por

citometria de fluxo (PI). Quantificação do perfil do ciclo (ilustração abaixo) mostra que NAC permite que células induzidas entrem em S, além de amenizar até o sexto dia o bloqueio em G2/M causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) submetidas a pós-teste de Bonferroni. Foram comparadas apenas células induzidas tratadas (NAC+ verde escuro) e não tratadas com NAC (4OHT cinza).

Figura 4.18. Autophagia é ativada em resposta ao estresse oxidativo provocado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: Western Blot. A SLi3.2 foi submetida aos tratamentos de 4OHT (50nM), NAC (5mM) e a combinação entres eles por 48h. A diminuição de LC3II quando a indução é combinada com NAC, sugere que a autophagia está sendo ativada em resposta ao estresse oxidativo. Ainda fica evidente a proteção que o antioxidante causa contra quebras de dupla fita de DNA, apontada pela diminuição nos níveis de γH2AX após a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. HRAS foi usado como controle de indução assim como P-ERK de sua atividade a jusante. GAPDH foi usado como controle de carregamento. Números abaixo das bandas mostram quantificação normalizada pelo controle não induzido. Já o símbolo σ indica o desvio padrão dos controles de proteína total (ERK-Total, p38-Total e H2AX) e controle de carregamento.

Figura 4.19. NAC ameniza a resposta de dano que expõe fitas simples DNA causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: A. Ensaio de BrdU nativo. Microscopia de fluorescência mostrando a cinética de exposição de simples fita de DNA (ssDNA em verde) quando SLI3.2 expressa altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. O quadro azul (Controle) e verde (NAC 5nM) são

representativos como controle do quarto e sexto dias de experimento. Abaixo quadro cinza (50nM de 4OHT) e verde escuro (NAC+4OHT). As imagens grandes mostram perfil da população por meio de seus núcleos marcados em azul (DAPI) e BrdU marcado em verde (Alexa 488). Já as imagens com aumento maior (10x) ilustram a exposição de simples fita dentro dos núcleos em forma de *foci*. Os quadros em vermelhos ressaltam a resolução da imagem mostrando que é possível quantificar os *foci* observados e que tanto no quarto quanto no sexto dia as células induzidas e tratadas com NAC apresentam menor quantidade de *foci* por núcleo; **B.** Quantificação de *foci* por núcleo marcado. Conforme descrito no texto separamos a população em três fenótipos por número de *foci* encontrados no núcleo onde as barras apresentam porcentagem da população marcada: barra lisa menos de dez *foci* por núcleo; barra riscada entre dez e cinquenta *foci* por núcleo; barra quadriculada mais de cinquenta *foci* por núcleo. Foram contadas aproximadamente cinquenta células (n=50) por dia e por condição.

Tais dados permitem dizer que NAC não apenas protege os queratinócitos da morte, mas também permite, até certo ponto, progressão no ciclo celular, amenizando o dano no DNA causado pela resposta complexa ao estresse iniciada pela indução sustentada de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP.

4.7 - A indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP intensifica a atividade autofágica contribuindo para a sobrevivência celular.

O forte estresse oncogênico promovido pela indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP havia nos mostrados até aqui três pontos alvos de vulnerabilidade dos queratinócitos: os estresses replicativo, mitogênico e oxidativo. A dinâmica de eventos apresenta um comportamento de “luta” contra tais estresses antes que as células fossem levadas de fato a morte; tal período é um típico fenômeno observado em células que, em fase de estresse sistêmico/metabólico, recrutam subsistemas de resguardo para amenizar os efeitos deletérios pelos quais estão passando. Um potencial subsistema de resguardo recrutado frente a estes tipos de estresse é a autofagia. Aliado a isto, como ressaltado anteriormente, observamos uma progressiva vacuolização celular provocada pelos altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP fenômeno característico de intensificação do fluxo autofágico (Figura 4.7A).

Mediante a tais indícios decidimos avaliar, por meio da cinética de indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, se há intensificação da atividade autofágica promovida pela oncoproteína (Figura 4.20). Após 24h de indução a sublinhagem SLi3.2 atinge o nível máximo de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP que se mantem

alto até o final do período medido, mesmo sem que haja reposição do indutor. Logo após 48h de indução ocorre o aumento de LC3II, indicador de atividade autofágica, que também se mantem em patamares altos até o final do período (Figura 4.20A).

Comparando as cinéticas de indução na sublinhagem SLi3.2 e seu controle pBabepuro-ER:Ø (Figura 4.20B) fica claro que o período que não houve reposição do meio de cultura, assim como o uso do indutor 4OHT, não são os responsáveis por intensificar a atividade autofágica, mostrando que de fato é o aumento da atividade de ER:HRAS^{G12V} o responsável pelo processo.

Para que não restassem dúvidas a respeito do papel da autofagia na resposta sistêmica ao estresse sofrido pelos queratinócitos expressando ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, ensaios de imunofluorescência mostram tanto o aumento de LC3 quanto de p62, assim como a co-localização entre ambas as proteínas permeando os vacúolos intracelulares depois de quatro e seis dias de indução (Figura 4.21). Tais resultados deixam claro que os autofagossomos são atores importantes no processo de vacuolização celular e consequente aumento da complexidade observado anteriormente. Também é importante ressaltar que a autofagia não é induzida em resposta a alta concentração de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP com objetivo de degrada-lo, pois não há co-localização entre o HRAS e p62 (Figura 4.22), uma das proteínas adaptadoras que carregam o conteúdo a ser degradado até LC3II.

Figura 4.20. A atividade autofágica é intensificada em resposta ao aumento da expressão de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: Cinética de indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP A. *Western blot* para HRAS mostra pico de expressão após 24h da indução com 50nM de 4OHT em SLi3.2 seguido de aumento da atividade autofágica medido por LC3II. Ao lado quantificação das bandas apresentadas (Setas em vermelho apontam o momento relatado). **B.** A sublinhagem pBabeER:Φ foi submetida ao mesmo processo a fim de avaliar atividade autofágica sem que houvesse indução de ER:HRAS^{G12V}. Gráfico ao lado mostra quantificação de bandas enfatizando que não há atividade autofágica sem que haja atividade do oncogene mutado. P-ERK mostra atividade de HRAS à jusante e GAPDH foi usado como controle de carregamento. Números abaixo das bandas mostram quantificação normalizada pelo controle não tratado. Já o símbolo σ indica o desvio padrão dos controles de proteína total (ERK-Total) e controle de carregamento.

Figura 4.21. Autofagossomos não processados são parte importante do aumento de complexidade celular induzida por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: Imunofluorescência. SLi3.2 induzida por quatro e seis dias com 50nM de 4OHT (40x). Marcação para LC3 (Verde Alexa488) e p62 (vermelho Alexa647) ilustra o aumento da atividade autofágica de células induzidas. Essas imagens também expõem o acúmulo de p62 ao longo do tempo um processo que quando acompanhada do aumento de LC3II é característica de problemas no fluxo autofágico. Imagens ampliadas e mescladas mostram nítida co-localização entre LC3 e p62 (tons de laranja e amarelo) permeando os vacúolos intracelulares.

Figura 4.22. A autofagia não é intensificada para processar ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP induzido: Imunofluorescência. SLi3.2 induzida por quatro dias com 50nM 4OHT(160x). Não observamos a ocorrência significativa de co-localização entre HRAS (verde Alexa488) e p62 (vermelho Alexa647) mostrando que o aumento da atividade autofágica é em decorrência dos problemas sistêmicos gerados pela alta ativação de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP e não pela alta concentração da proteína.

Em um fluxo autofágico saudável a proteína p62 é degradada juntamente com o conteúdo a ser reciclado, no entanto o aumento dos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP causa acúmulo de p62, mostrando que adicionalmente a alta atividade autofágica (aumento de LC3II) ocorre um acúmulo do seu conteúdo por problema no fluxo, que pode ser gerado por incapacidade de processamento ou bloqueio (Figura 4.23). Quando tratamos as células induzidas com Cloroquina (CQ), um típico inibidor de autofagia, ocorre um aumento tanto de LC3II como de p62 em comparação aos controles, sugerindo que ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP não só promove intensificação da atividade autofágica como também incapacidade de processamento integral do fluxo (Figura 4.24A) (KLIONSKY et al., 2012; MIZUSHIMA, 2004; MIZUSHIMA; YOSHIMORI, 2016).

Outro ponto importante é que, aparentemente, a atividade autofágica ocorre independente da inibição de mTORC, já que após quarenta e oito horas de indução observamos um aumento significativo na fosforilação de S6 (indicador de atividade de mTORC) além da maior atividade de Akt1 (Figuras 4.5C e 4.23B), um importante efetor da via mostrando que mTORC está sendo ativado pela indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP.

4.8 - Autofagia promove aumento da viabilidade celular mediante ao estresse oncogênico causado por altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP

Apesar de entendermos que o acúmulo de autofagossomos, assim como o problema no fluxo autofágico, ser danoso as células expressando altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP sabemos que a autofagia poderia ser o principal subsistema de resguardo celular a ser intensificado para combater o estresse gerado pela atividade da oncoproteína (SHINTANI; KLIONSKY, 2004).

No intuito de entender o papel da autofagia em queratinócitos imortalizados por E6E7 expressando ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP nos interrompemos o fluxo autofágico com um clássico inibidor da ligação lisossomo-autofagossomo: a Cloroquina (Figura 4.24).

Figura 4.23. Indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP provoca acúmulo de conteúdo autofágico devido sua intensa atividade, que sugere ser independente de mTORC: **A.** *Western blot*. Controle de indução e atividade de ER:HRAS^{G12V}, 50nM de 4OHT, por 48 e 96h para o conjunto de *westerns* de atividade autofágica (repetição da figura 4.12 para simples visualização); **B.** Conjunto de *western* de atividade autofágica mostrando que ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP estimula autofagia (aumento de LC3II) em níveis tais que ocorre acúmulo do conteúdo autofágico (p62). Esta atividade aparenta ser independente de mTORC, mostrado por meio da fosforilação de S6 e aumento da atividade de Akt1 um de seus efetores. Números abaixo das bandas mostram quantificação normalizada pelos controles não induzidos em 48 e 96h. Já o símbolo σ indica o desvio padrão dos controles de proteína total (Akt1-Total) e controle de carregamento proteico (GAPDH).

Figura 4.24. O bloqueio químico da autofagia com Cloroquina acelera e intensifica a citotoxicidade causada por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: **A.** Western blot. Conjunto das proteínas HRAS, LC3 e p62 mostrando ação conjunta da indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP e o inibidor de autofagia Cloroquina (CQ). A combinação dos tratamentos provoca aumento sinérgico de LC3II e p62 confirmando que ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP é responsável por acelerar o fluxo autofágico acima da capacidade de processamento celular, causa do acúmulo de autofagossomos. **B.** Curva de crescimento evidencia redução da população induzida com 50nM de 4OHT (cinza) principalmente quando combinada com CQ (rosa quadriculada) no quarto dia da indução. **C.** Citometria de fluxo de marcação com PI. Quantificação de população SubG1 sugere que a indução combinada com CQ acelera e intensifica população com DNA fragmentado; **D.** Citometria de fluxo marcação com PI. Quantificação do ciclo celular da SLi3.2 tratadas conforme indicada no período de dois e quatro dias. Barras apresentam erro padrão das replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (#); $p < 0,01$ (##); $p < 0,001$ (###) em relação ao controle não induzido e $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) em relação às células tratadas com 50nM de 4OHT, submetidas a pós-teste de Bonferroni.

Nos primeiros dois dias de indução há redução no número de células induzidas e tratadas com cloroquina quando comparadas ao controle, no entanto essas diferenças não são significativas comparando com as outras condições. Já a partir do quarto dia a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, combinado com cloroquina, apresentou uma extrema citotoxicidade, mesmo quando comparado com a população apenas induzida (Figura 4.24B).

Dados de ciclo celular no mesmo período também mostram que a cloroquina não protege as células induzidas do acúmulo observado em G2/M, assim como do bloqueio da transição G1→S. Ao contrário de proteção, observamos no quarto dia, um aumento de 100% na população SubG1 em células induzidas e tratadas com cloroquina em relação as células apenas induzidas, evidenciando que a cloroquina causa uma citotoxicidade sinérgica quando combinada com a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP (Figuras 4.24C e D).

Um ponto importante nesses resultados é que o tratamento apenas com a cloroquina não apresenta toxidez aparente até o quarto dia, porém retarda a proliferação, assim tratamentos prolongados com o inibidor acabam sendo desaconselháveis.

Para resolver o problema do tratamento prolongado com um inibidor de autofagia, assim como do viés que a adição de um inibidor químico pode causar, realizamos uma abordagem molecular que inibe a autofagia por meio do nocaute de importantes genes da maquinaria autofágica. A técnica utilizada foi a CRISPR/Cas9 usando guias para ATG5 e ATG7 (*Autophagic Related Genes*).

Transduzimos a SLi3.2 com quatro guias diferentes, dois para cada gene. Após os testes adequados obtivemos uma sublinhagem mostrando que o nocaute de ATG7 foi realizado com maior sucesso, não apenas em nível de concentração proteica, mas também de atividade autofágica relacionada (Figura 4.25A).

Figura 4.25. Autofagia ameniza o estresse sistêmico causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP em queratinócitos, aumentando sua viabilidade: A. Western blot. Atividade autofágica das sublinhagens Scrb e Δ ATG7 geradas por CRISPR/Cas9. Cinética de

indução de ER:HRAS^{G12V} com 50nM de 4OHT para ambas as sublinhagens. Western para ATG7 mostra o completo desaparecimento da proteína em Δ ATG7 acarretando no não processamento de LC3I em LC3II quando induzida e, consequente, acúmulo de p62. HRAS foi usado como controle de indução assim como P-ERK de sua atividade a jusante. GAPDH foi usado como controle de carregamento. Números abaixo das bandas mostram quantificação normalizada pelo controle não induzido da sublinhagem Scrb. Já o símbolo σ indica o desvio padrão dos controles de proteína total (ERK-Total) e controle de carregamento. **B.** Curvas de crescimento. As sublinhagens Scrb (Preto) e Δ ATG7 (Laranja) foram submetidas a tratamento com diferentes concentrações de 4OHT (+) conforme período indicado. Em todas as concentrações do indutor Δ ATG7 se mostra mais sensível que Scrb. A significância é indicada ponto a ponto comparando apenas as populações induzidas. **C.** Citometria de fluxo de marcação para Anexina V e PI. Exemplo ilustrativo do perfil da distribuição de células marcadas, Scrb e Δ ATG7, após o quarto dia de indução. Abaixo quantificação do ensaio de citometria mostra que Δ ATG7 (barra laranja quadriculada) sobrevivem menos que Scrb (barra preta quadriculada) desde o quarto dia de indução. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ ***), submetidas a pós-teste de Bonferroni.

Juntamente com a sublinhagem Δ ATG7 geramos seu controle Scrb que possui autofagia funcional, ambos a partir da sublinhagem SLi3.2. O ATG7 atua no processamento do LC3I em LC3II e sua ausência provoca uma grande deficiência autofágica, já que a fase de nucleação e alongamento fica prejudicada e muito poucos autofagossomos são formados.

Curvas de crescimento realizadas com quatro doses diferentes de 4OHT mostram que a sublinhagem Δ ATG7, comparado com seu controle Scrb, possui um maior decréscimo populacional em todas as concentrações de indutor testadas, expondo uma maior sensibilidade a atividade de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP inclusive a doses permissivas a proliferação como 5nM de 4OHT (Figura 4.25B). Não apenas a proliferação das células defectivas a autofagia é prejudicada, mas também sua sobrevivência quando comparada com células que possuem o mecanismo funcional (Figura 19 C).

O conjunto de dados até aqui apresentados mostram que apesar da morte celular estar associada a intensa atividade autofágica, o mecanismo é ativado em resposta ao estresse causado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP e desde o início da atividade do oncogene trabalha na promoção de viabilidade celular mediante ao conjunto de diferentes tipos de estresse.

4.9 - A autofagia conecta temporalmente estresse oxidativo e dano no DNA

Observamos na figura 4.18 que o tratamento com NAC interrompe a indução autofágica provocada por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP após 48h de indução. Também, a sublinhagem Δ ATG7 apresentou uma sinalização basal de dano no DNA superior ao de seu controle Scrb, que se intensifica ao passar do tempo de indução (Figura 4.25A γ H₂AX). Todos esses dados sugerem uma rede complexa de eventos desencadeados por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, porém que parece interconectar os eventos principais observados até aqui: Estresse oxidativo, estresse replicativo, estresse mitogênico, dano no DNA e autofagia. Com o objetivo de entender o papel da autofagia no estresse oxidativo avaliamos como Δ ATG7 e Scrb induzidos com 50nM de 4OHT se comportam em relação ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

Observamos que antes de 48h de indução não ocorre aumento nos indicadores de estresse oxidativos usados (DCF e MytosoX, dados não mostrados), porém a partir deste período, no caso do DCF, conseguíamos acompanhar a intensificação do processo por deslocamento da população induzida, que atinge seu máximo após 96h de indução.

A sublinhagem Scrb se comporta exatamente da forma descrita sendo que após 48h a população expressando ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP migra para região de maior fluorescência começando com 20% (*K-S test*) de deslocamento em relação ao controle não induzido. Este deslocamento se intensifica alcançando 45% de deslocamento após 96h de indução (Figuras 4.26A e B, painéis à esquerda). Fica claro também, até este período, que o antioxidante consegue reduzir o deslocamento da população induzida em 25% confirmando que a maior viabilidade observada em células induzidas tratadas NAC é de fato em decorrência da redução de espécies oxidantes.

Figura 4.26. Autofagia promove sobrevivência de queratinócitos por retardar e diminuir a geração de EO promovida pela indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP: A. Níveis de EO por fluorescência de DCF em citometria de fluxo. Por dois e quatro dias as sublinhagens Scrb e Δ ATG7 foram tratadas com 4OHT (50nM), NAC(5mM) e a combinação entre eles (NAC+). A

população induzida (curvas em cinza) de células defectivas para autofagia (Δ ATG7) atinge rapidamente um nível alto de EO. Este nível também se mostra mais elevado inclusive na combinação da indução e tratamento com o antioxidante. **B.** Quantificação dos gráficos em A. Usamos *Kolmogorov-Smirnov Test* como método para quantificar o deslocamento das populações tratadas em relação ao controle. As distâncias das distribuições são adquiridas em porcentagem de deslocamento em relação ao controle que foi normalizada em relação ao mesmo parâmetro. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (#); $p < 0,01$ (##); $p < 0,001$ (###) em relação ao controle não induzido e $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) células tratadas com 50nM de 4OHT, corrigido por Bonferroni. **C.** Curvas de crescimento em paralelo ao experimento realizado comparando ambas as sublinhagens Δ ATG7 e Scrb em todas as condições: Controle, 4OHT (50nM), NAC (5mM) e NAC+ (NAC+4OHT). A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) e submetidas a pós-teste de Bonferroni.

O mesmo não ocorre em células defectivas para autofagia Δ ATG7, muito pelo contrário, observamos um pico de deslocamento de 62% na população induzida já nas primeiras 48h. Após 96h ocorre uma pequena diminuição (52% de deslocamento), porém os níveis oxidativos continuam mais alto do que Scrb no mesmo período (Figuras 4.26A e B, painéis à direita). Esta pequena queda pode ser associada à morte celular prematura provocada pelo estresse sistêmico iniciado por ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP em células defectivas para autofagia. Também observamos esta queda na própria curva de crescimento que mostra uma redução significativa da população Δ ATG7 em comparação a Scrb com dois dias de indução (Figura 4.26C).

Curiosamente, nas primeiras 48h de indução, Δ ATG7 tratadas com NAC também tem seu estado oxidativo reduzido, diferindo apenas na intensidade em relação a Scrb (deslocamento de 40% e 20% respectivamente). Neste mesmo período o número de células também é maior em comparação com as células apenas induzidas (Figura 4.26C ultimo quadro), mostrando que no período NAC é capaz de proteger até mesmo as células defectivas para autofagia. Todavia, após 96h de indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP a sublinhagem Δ ATG7 tratada com NAC, mesmo tendo seus níveis oxidativos diminuídos em relação as células só induzidas, são levadas a morte. Provavelmente este processo está ocorrendo porque as células com autofagia defectivas são muito mais sensíveis ao estresse oxidativo, além do fato da indução estar causando uma série de outros tipos de estresse que diminuem a viabilidade celular neste cenário.

Estes resultados além de expor o quanto deletério é o estresse oxidativo dentro do desequilíbrio sistêmico causado por altos níveis ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP deixam claro que a autofagia tem um papel muito importante em manter o equilíbrio oxidativo nos queratinócitos, diminuindo tanto a intensidade do acúmulo de espécies oxidantes como o seu rápido crescimento, importantes fontes de geração a dano no DNA.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - HRAS^{G12V}-GTP, Dr Jekyll e Mr Hyde da transformação maligna

A maior barreira para a transformação maligna promovida por HRAS^{G12V}-GTP em queratinócitos é sua própria atividade, já que existe um limite máximo de HRAS^{G12V}-GTP tolerado pelas células. Este limite, quando ultrapassado, gera estresse sistêmico intolerável, mesmo que a célula tenha deficiências na atividade de supressores de tumor. É importante frisar que esta tese lidou apenas com o HRAS^{G12V}-GTP, mas, muito provavelmente, a mesma conclusão deve ser válida para HRAS^{WT}-GTP.

Evidências experimentais obtidas por meio de nossos modelos, constitutivos e induzíveis, sustentam esta hipótese. Não é possível traçar um paralelo entre os eventos que levaram a seleção das sublinhagens estáveis (SLcs e LTEs) e os eventos que medimos cuidadosamente nas sublinhagens induzíveis, todavia, no que tange exclusivamente aos níveis de HRAS^{G12V}-GTP os destinos celulares são os mesmos: células que expressam baixos níveis da oncoproteína, portanto possuem baixa atividade, são susceptíveis a transformação, já células que expressam altos níveis são eliminadas da população (Figura 5.1).

O controle do destino celular depende da concentração da proteína HRAS^{G12V} na forma ativada HRAS^{G12V}-GTP que transmite sinais de receptores transmembranares à montante para vias de sinalização à jusante. Esta atividade é finamente controlada e não está ligada apenas a disponibilidade de HRAS^{G12V} total, mas também a fatores estimuladores como as GEFs. Este fato pode ser apreciado analisando o conjunto de dados coletados por “*specific binding assays*” e reunidos nas curvas dose-reposta da figura 5.2.

Neste trabalho foi fundamental determinar quantitativamente os níveis intracelulares de [HRAS^{G12V}] e [HRAS^{G12V}-GTP] e sua dinâmica de variação; as limitações inerentes ao método analítico adotado para esse fim estão descritas e discutidas em Materiais e Métodos para que se tenha uma ideia clara da precisão das medidas; embora seja óbvio, é oportuno insistir que todas as medidas de [HRAS^{G12V}] e [HRAS^{G12V}-GTP] são médias de uma vasta população de milhões de células.

Figura 5.1. Resumo das sublinhagens geradas e seus destinos de acordo com o nível de expressão de HRAS^{G12V}: Neste esquema resumimos a dinâmica das diferentes sublinhagens geradas sugerindo seus destinos celulares de acordo com o nível de HRAS^{G12V}-GTP medido. Em destaque modulo que foi amplamente explorado nesta tese.

Como era de se esperar, a curva da [ER:HRAS^{G12V}] em função da [4OHT] é uma função logarítmica que evidencia um platô superior entre 20 e 200nM de 4OHT e uma DE_{50%} (Dose Efetiva 50%) entre 10 e 20nM de 4OHT (Figura 5.2). Por outro lado, [ER:HRAS^{G12V}-GTP] em função de [4OHT] insinua uma sigmoide com DE_{50%} por volta de 25nM e um platô que sugere um limite superior entre 30 e 200nM de 4OHT (Figura 5.2). É importante destacar que os protocolos destes ensaios analíticos foram desenhados para atingir os estados estacionários de ambas as

reações em função de [4OHT]. Por outro lado, apesar da grande dispersão das medidas obtidas nos múltiplos ensaios que originaram o gráfico da figura 5.2, parece válido fazer as seguintes estimativas: o total da proteína ER:HRAS^{G12V} evidenciado pelo platô da figura 5.2 deve compreender aproximadamente 67% de ER:HRAS^{G12V}-GDP + 33% de ER:HRAS^{G12V}-GTP; esta razão foi derivada a partir dos platôs da figura 5.2 e da premissa razoável de que no estado estacionário todo ER:HRAS^{G12V} está na forma GDP ou GTP. Indo mais além, parece também seguro tirar duas conclusões importantes desses resultados: a primeira é que as duas curvas dose-resposta da figura 5.2 não são paralelas, demonstrando que a indução da proteína ER:HRAS^{G12V} e sua ativação a ER:HRAS^{G12V}-GTP são reações aparentemente independentes; em segundo lugar, a ativação de ER:HRAS^{G12V}-GDP a ER:HRAS^{G12V}-GTP não é limitada nem por ER:HRAS^{G12V}-GDP, que aparece em excesso, e provavelmente nem por GTP, cuja concentração intracelular é da ordem de mM; por conseguinte, os níveis de [ER:HRAS^{G12V}-GTP] estão limitados pela atividade das GEFs expressas nestas células. Surpreendentemente, esta última inferência contradiz a crença sustentada por décadas de que a mutação “oncogênica” G12V torna a HRas-GTPase, praticamente, inativa e refratária à ativação por GAPs, condição que manteria [ER:HRAS^{G12V}-GTP] em níveis estacionários altos e predominantes. A presente interpretação deste conjunto de resultados de bioquímica analítica é corroborada pelas curvas dose-resposta da figura 5.3.

No experimento da figura 5.3A os queratinócitos da sublinhagem SLi3.2 foram cultivados em meio nutritivo sem e com a suplementação de extrato pituitário mais EGF e submetidos a concentrações crescentes de 4OHT e, em seguida, os níveis estacionários de ER:HRAS^{G12V} e ER:HRAS^{G12V}-GTP foram determinados. As curvas dose-resposta da figura 5.3A mostram que em meio de cultura suplementado a 5nM de 4OHT, ER:HRAS^{G12V}-GTP atinge 80% do total de ER:HRAS^{G12V}, mas a 50nM de 4OHT o nível de ER:HRAS^{G12V}-GTP aumentou 3 vezes, porém não chegou a 20% do total de ER:HRAS^{G12V} que aumentou relativamente muito mais; estes resultados são compatíveis com a estimulação de SOS pelos fatores de crescimento do suplemento através da estimulação de receptores de tirosina quinase (ver o esquema da figura 5.3B) elevando os níveis de ER:HRAS^{G12V}-GTP sem, no entanto, ultrapassar um teto limite, embora permaneça sobrando um excesso de ER:HRAS^{G12V}, provavelmente na forma de ER:HRAS^{G12V}-GDP.

Por outro lado, entre as células mantidas no meio sem suplementação e submetidas a 5nM de 4OHT os níveis de ER:HRAS^{G12V}-GTP representaram <1% do total de ER:HRAS^{G12V}, enquanto que as mesmas submetidas a 50nM de 4OHT exibiram níveis de ER:HRAS^{G12V}-GTP cerca de 10% do total de ER:HRAS^{G12V}, indicando que na ausência da suplementação de fatores de crescimento os níveis de ER:HRAS^{G12V}-GTP sobem de maneira não linear em função dos níveis crescentes de ER:HRAS^{G12V}.

Figura 5.2. A curva dose resposta de 4OHT mostra padrões de expressão diferentes para cada uma das espécies de ER:HRAS^{G12V} quando induzidas por diferentes [4OHT]: *Western blot*. Distribuição do conjunto de curvas dose resposta a 4OHT em sublinhagem induzível SLi1.3. Foram realizadas duas replicatas biológicas e duas técnicas para cada espécie de ER:HRAS^{G12V} (total e GTP). Usando algoritmo para ajuste robusto do programa *GraphPad* determinamos a função que mais se adequa a distribuição obtida (linhas pontilhadas). Cada ponto é equivalente a quantificação de banda de *western* normalizada pelo controle não induzido. A direita um dos exemplos das curvas doses de onde foram extraídos os dados.

Figura 5.3. O estresse oncogênico desencadeado por RAS ocorre a partir de certo limiar de ativação na forma ER:HRAS^{G12V}-GTP que é amenizado pela retirada de estímulos

mitogênicos: **A.** *Western blot.* Conjunto de curvas dose resposta a 4OHT em duas condições diferentes, células suplementadas e não suplementadas na sublinhagem induzível SLi3.2. Os westerns são comparáveis entre si e expõe o excedente de ER:HRAS^{G12V} com potencial de ser ativado na forma de ER:HRAS^{G12V}-GTP (Δ). Δ foi determinado por meio da razão entre as médias das quantificações obtidas pelas induções de 50 e 100nM de 4OHT das espécies ER:HRAS^{G12V} e ER:HRAS^{G12V}-GTP; **B.** Proposta mecanística do desbloqueio, e indução de mensageiro, de ER:HRAS^{G12V} seguido da sua ativação na forma de ER:HRAS^{G12V}-GTP. **C.** Curva de crescimento da sublinhagem SLi1.3 tratadas e não tratadas com 50nM de 4OHT e combinadas ou não com suplementação. Esta curva deixa claro que o estresse sistêmico observado depende da combinação entre indução de ER:HRAS^{G12V} e sinalização mitogênica para gerar altos níveis de ER:HRAS^{G12V}-GTP; **D.** Curva de crescimento da sublinhagem SLi3.2 não suplementada induzida com diversas concentrações de 4OHT. Em nenhuma das concentrações do indutor observamos citotoxicidade.

No contexto destes resultados é importante enfatizar que 50nM de 4OHT na ausência de fatores de crescimento suplementares promove sobrevivência e um modesto aumento de proliferação dos queratinócitos SLi3.2 e SLi1.3, conforme demonstram as curvas de crescimento das figuras. 5.3C e 5.3D; em fragante contraste com estas observações, 50nM de 4OHT mais suplementação com fatores de crescimento geram um insuperável estresse oncogênico que leva a morte celular generalizada na população de queratinócitos (ver figura 5.3C e outros dados experimentais documentados na seção de resultados).

Por último, cabe destacar que estes dados analíticos permitem fazer uma estimativa de dois níveis de concentração de ER:HRAS^{G12V}-GTP que definem um intervalo abaixo do qual as células da sublinhagem SLi3.2 vão sobreviver ao estresse oncogênico com chances de chegar a um fenótipo maligno e acima do qual vão ser eliminadas por morte programada. O cálculo das concentrações que delimitam este intervalo crítico pode ser feito da seguinte maneira: As duas curvas dose-resposta para ER:HRAS^{G12V}-GTP em função de 4OHT mostradas nos dois gráficos da figura 5.3A podem ser paralelamente comparadas num só gráfico pois pertencem ao mesmo ensaio analítico. Essas curvas mostram dois platôs paralelos um de concentrações relativas superiores de ER:HRAS^{G12V}-GTP e outro de inferiores ambos delimitados por, respectivamente, 50nM e 100nM de 4OHT; essas duas concentrações relativas definem o intervalo de morte ou sobrevivência celular; para se ter uma ideia das concentrações absolutas de ER:HRAS^{G12V}-GTP que definem esse intervalo crítico recorreremos a outros resultados experimentais desta tese e mais dados comumente usados na literatura corrente; as curvas dose-

resposta para células SLi3.2 e SLi1.3 da figura 4.4 comparam concentrações relativas de ER:HRAS^{G12V}-GTP com concentrações relativas de HRAS^{WT} endógeno e indicam que são muito próximas; por outro lado, os valores absolutos experimentais da concentração de HRAS^{WT} endógenos são comumente fixados ao redor de 1nM, se adotarmos esse valor para a concentração estacionária superior de ER:HRAS^{G12V}-GTP das células SLi3.2 podemos sugerir que o intervalo crítico de HRAS^{G12V} que define sobrevivência ou morte celular é de 0,3 a 1nM. Naturalmente, estes valores absolutos de concentração, embora baseados em dados experimentais, carregam uma incerteza que não podemos estimar com rigor. Mas, este exercício de cálculo parece válido e sustentável para enfatizar que o intervalo crítico de concentração de HRAS oncogênico é estreito. Consideramos que esta conclusão original, juntamente com o papel da autofagia neste contexto, são as mais importantes contribuições científicas desta tese.

5.2- O estresse oncogênico provocado por HRAS^{G12V}-GTP é composto por estresses mitogênico, replicativo e oxidativo

Mediante aos resultados apresentados sugerimos que o estresse oncogênico causado por altos níveis de HRAS^{G12V}-GTP é caracterizado principalmente por três eventos: os estresses mitogênico, replicativo e o estresse oxidativo.

Separadamente cada um deles pode gerar ativação de *checkpoints* em fases diferentes do ciclo celular provocando o bloqueio da transição G1→S e o bloqueio em G2/M. Todavia, possuem efeitos sinérgicos responsáveis pela drástica queda de viabilidade observada em células que expressam altos níveis da oncoproteína. A autofagia pode conecta-los com uma única finalidade que é aumentar a robustez do sistema frente ao conjunto de efeitos deletérios disparados, apesar de haver poucos indícios que suportem sua ação nos estresses mitogênico e replicativo além do seu papel no desequilíbrio metabólico (Figura 5.4).

Figura 5.4. Esquema sugerindo modelo de como HRAS^{G12V}-GTP desencadeia os diferentes tipos de estresse que acarretam em morte celular, propondo a fase do ciclo em que eles são prevalentes: A. Cinética do ciclo celular (Modificada de figura 4.10 C) propondo em quais fases do ciclo está ocorrendo cada fenômeno medido. **B.** As linhas tracejadas apresentam eventos observados sem que haja proposta mecanística cabível dentro do conjunto de dados apresentado, todos os outros são discutidos nas seções 5.2.2 e 5.2.3.

Baseado em nossos resultados e com vasto suporte da literatura, sugerimos as conexões entre os eventos e as principais vias de sinalização envolvidas no estresse oncogênico causado por altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP elaborando hipóteses sobre a origem dos bloqueios da transição G1→S e em G2/M. Todo este cenário será discutido nas duas seções seguintes e está resumido na figura 5.4.

5.2.2 - O estresse mitogênico e replicativo caracterizam parte dos bloqueios da transição G1→S e G2/M.

A via Raf/MEK/ERK está sendo fortemente ativada por ER:HRAS^{G12V}-GTP, que aliada a inibição das proteínas p16 e p19, estão promovendo sinal de progressão no ciclo celular (Figuras 4.5C, 4.12B e 4.12C), entretanto não há progressão e sim bloqueio. Quando apesar das vias moleculares estarem sinalizando proliferação celular, porém ocorre bloqueio no ciclo, temos um fenômeno característico de estresse mitogênico; as células não possuem condições satisfatórias de progressão devido a alta demanda metabólica impulsionada pelo estresse. Os perfis de ciclo celular mostram uma espécie de bloqueio em G1 (Figura 5.4A), porém sugerimos que o estresse mitogênico está causando bloqueio na transição G1→S. O fato de observarmos este aparente bloqueio em G1 ocorre porque os métodos utilizados não permitem diferenciar células bloqueadas na transição G1→S daquelas que poderiam estar bloqueadas em fim de G1 e/ou começo de S.

Esta forte atividade mitogênica promovida por ER:HRAS^{G12V}-GTP em células em final de G1 e que já haviam atravessado a barreira G1→S (as primeiras 24h de indução Figura 5.4A) também pode provocar o disparo de uma série de origens de replicação sem que haja condições para tanto. Uma hipótese é que o desequilíbrio entre a quantidade de origens disparadas e a quantidade de substrato disponível,

principalmente nucleotídeos e esqueleto de carbono, são os principais gargalos para o progresso das células que estão em S, fato que explicaria parte da progressiva exposição de simples fita de DNA, dano e do bloqueio em G2/M.

Outro ponto relevante, que pode contribuir para o estresse replicativo como um todo, é que queratinócitos submetidos à expressão de E6E7 podem sofrer com mudanças na programação de origens de replicação dormentes causada pelo estresse replicativo crônico proveniente da atividade dos oncogenes virais. Esta reprogramação provoca descontrole na sinalização do ciclo celular, permitindo que ocorra demasiado licenciamento de origens dormentes; coerentemente com nossos resultados, Bester *et al.* mostrou que este fenômeno está associado principalmente a diminuição no *pool* de nucleotídeos (BESTER et al., 2011).

Para testar a hipótese ligada a deficiência de substratos específicos, gerada devido a um provável desequilíbrio metabólico, tratamos os queratinócitos com uma mistura de desoxinucleosídeos. Observamos a quase total restauração da sobrevivência celular, porém apenas um pequeno ganho proliferativo (Figura 5.5A e B), sugerindo mecanismos adicionais que bloqueiam a transição G1→S; por exemplo, o estresse mitogênico e o estresse oxidativo que compõe o todo do estresse oncogênico disparado. Esta recuperação maciça da sobrevivência, promovida pela suplementação exógena de desoxinucleosídeos, pode estar corrigindo a deficiência gerada no *pool* de nucleotídeos, fornecendo substratos para a replicação e para vias de correção a dano no DNA. Entretanto tal suplementação não pode fazer nada pelo estresse mitogênico que manteve as células bloqueadas na transição G1→S, após 48h de indução, sendo causa da baixa proliferação observada.

Outro resultado que pode dar suporte a hipótese da diminuição no *pool* de nucleotídeos é a drástica queda de c-Myc observada em células expostas a atividade de ER:HRAS^{G12V} (Figuras 4.5C e 4.12A). A expressão de c-Myc é muito importante na regulação do *pool* por ser responsável pela transcrição de várias enzimas que participam do metabolismo de nucleotídeo (LIU et al., 2008; MANNAVA et al., 2008). Além disso, problemas no tamanho *pool* em células transformadas por RAS causa parada na proliferação celular que pode ser revertida pela reciclagem autofágica de substratos celulares normalizando um possível desequilíbrio metabólico, processo que ligaria o estresse replicativo com o aumento da atividade autofágica observado em nosso modelo (GUO et al., 2016).

Resumindo, sugerimos que a alta atividade ER:HRAS^{G12V} provoca estresse mitogênico crônico responsável por parte do bloqueio observado na transição G1→S a partir das 48h de indução. A população que havia atravessado essa barreira nas primeiras 24h de indução, portanto que conseguiram adentrar em S, sofreu com disparo de origens de replicação acima da capacidade do *pool* de nucleotídeos e/ou esqueleto de carbono. Este processo estaria causando exposição progressiva de simples fita de DNA em grande parte das células que posteriormente ficaram bloqueadas em G2/M. Como o estímulo mitogênico foi mantido, a demanda por substratos é aumentada, ocorrendo dano no DNA (Figura 4.14) e consequente morte celular revertida por tratamento exógeno de desoxinucleosídeos. A quantidade de origens de replicação pode ter sido ampliada pela excessiva sinalização mitogênica, além do licenciamento anacrônico das origens dormentes, em consequência da instabilidade genômica crônica provocada por E6E7. Já a deficiência no *pool* decorreria do próprio excessivo disparo de forquilhas de replicação, desequilíbrio metabólico e/ou queda na expressão de c-Myc, sendo que a autofagia estaria atuando para suprir, por meio da reciclagem de conteúdos internos, a demanda de substratos básicos.

5.2.3- O estresse oxidativo provoca dano no DNA responsável pela queda de viabilidade celular

O acúmulo de espécies oxidantes além de gerar uma série de problemas ligados ao equilíbrio de vias de sinalização baseadas em redox e no dobramento tridimensional de proteínas, pode causar danos ao DNA. Várias espécies oxidantes podem interagir com pirimidinas e purinas assim como com esqueleto de desoxirribose do DNA, formando mais de 20 produtos diferentes (Timina glicol e 8-oxi-Guanina, os mais comuns) que causam desarranjo na estrutura do material genético e consequente dano (VALKO et al., 2004).

Danos na molécula de DNA são fontes de instabilidade genômica que tanto pode levar a mutações como também a morte celular. Para evitar a ocorrência de ambos, existem muitos mecanismos de reparo responsáveis por corrigir a região lesionada. No caso de dano no DNA decorrente de espécies reativas de oxigênio os principais mecanismos de correção são: reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e reparo de bases mal pareadas (*mismatch*

repair - MMS). Em todos os casos ocorre reconhecimento da região danificada por uma maquinaria específica que extrai o trecho de DNA, gerando regiões de simples fita, e o substitui por um novo trecho com base na fita complementar não danificada (BRIERLEY; MARTIN, 2013).

Figura 5.5. Tratamento com desoxinucleosídeos protege queratinócitos induzidos da morte, recuperando parcialmente sua proliferação: A sublinhagem SLi3.2 foi plaqueada em baixa densidade (10^3 cm^2) para estender ao máximo o tempo de ensaio. Depois de 48h foram tratadas com 2mM de desoxinucleosídeos (Desoxiadenosina, Desoxiguanosina, Timidina e Desoxicitidina) e combinadas ou não com indução de 50nM de 4OHT. As células foram mantidas por seis dias. **A.** Citometria de fluxo Anexina V versus PI. Quantificação do ensaio de morte mostra porcentagem de células vivas, de acordo com o tratamento. A direita exemplo ilustrativo do perfil da

distribuição dessas células; **B.** As mesmas células foram contadas e comparadas entre si; **C.** Concentração de lactato de SLi3.2 controle e induzida com 50nM de 4OHT. Curva de concentração de lactato presente no meio de cultura dividido pelo número de células no período indicado. Barras apresentam erro padrão das replicatas. A significância foi estabelecida por meio de *Two Way ANOVA* $p < 0,05$ (#); $p < 0,01$ (##); $p < 0,001$ (###) em relação ao controle não induzido e $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**); $p < 0,001$ (***) em relação as células tratadas com 50nM de 4OHT, submetidas a pós-teste de Bonferroni.

A indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP provoca progressivo acúmulo de espécies oxidantes acarretando em estresse oxidativo; quando este estresse é combatido, por tratamento com o antioxidante NAC, observamos um aumento geral da viabilidade celular (Figuras 4.15 e 4.17). Acreditamos que a principal fonte de inviabilidade é o estresse oxidativo e o consequente dano no DNA por ele causado, que por sua vez, também é responsável por parte do acúmulo de células em G2/M, bloqueio parcial da transição G1→S e morte.

As células que estão bloqueadas em G2/M são aquelas que sofreram os efeitos dos altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP durante a síntese de DNA e provavelmente em início de G2, sugerindo que, além do estresse replicativo, as espécies reativas de oxigênio também causaram dano no DNA nos períodos destacados (Figura 5.4 A). Quando tratamos as células induzidas com NAC observamos uma queda considerável no acúmulo da população em G2/M assim como de um importante indicador de dano no DNA: a fosforilação da histona H₂AX (Figura 4.17D e 4.18). Outro ponto relevante é a redução da exposição de simples fitas em células induzidas e tratadas com NAC (Figura 4.19), mostrando que o estresse oxidativo também provoca tal condição. No caso, essa exposição de simples fita, poderia ser decorrente dos mecanismos de reparos a dano no DNA que expõe trechos da molécula não pareada que estão, quando as células são tratadas com um antioxidante, menos ativos em consequência da queda na geração de dano.

O conjunto dos resultados sugere que o aumento de espécies oxidantes induzido pela atividade de ER:HRAS^{G12V} está causando dano no DNA. Este dano pode ocorrer em G1, mas é observado principalmente durante as fases S e G2 quando o DNA esta mais exposto, sendo que posteriormente essas células progridem no ciclo até serem bloqueadas em G2/M para que o dano seja corrigido por uma das vias canônicas (NER, BER e MMS) que por sua vez são responsáveis pela exposição de simples fita. Uma vez que essas células sejam tratadas com o

antioxidante ocorre uma redução no dano, como apontado por $\gamma\text{H}_2\text{AX}$, e consequentemente, há menor recrutamento da maquinaria de reparo acarretando na diminuição de simples fitas expostas e no aumento da sobrevivência celular.

Mostramos também que uma parcela da população induzida, quando tratada com NAC, consegue progredir no ciclo, atravessando a barreira $\text{G1} \rightarrow \text{S}$ antes imposta por $\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}/\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}\text{-GTP}$ (Figura 4.17D). Tal fato sugere que o mecanismo responsável por este progresso é decorrente da interrupção de sinalização de estresse dirigida por p38 que também está ligada a sinalização de dano ao DNA (Figura 4.18). p38, quando fosforilado, inibe o complexo ciclina/CDK responsável pela entrada em S, dessa forma células tratadas com NAC, que apresentam baixos níveis de P-p38, poderiam progredir no ciclo e serem a fonte da proliferação observada na curva de crescimento (Figura 4.17A). Como discutido anteriormente a outra parcela da população estaria bloqueada em decorrência do estresse mitogênico e por esta razão não observamos um nível proliferativo superior.

Deste modo concluímos que o estresse oxidativo, causado pelo desequilíbrio metabólico decorrente da atividade de $\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}$, também é responsável por dano no DNA que está ligado a dois efeitos: 1- provocar queda na proliferação celular bloqueando parcialmente a progressão $\text{G1} \rightarrow \text{S}$ por meio da fosforilação de p38; 2 - Em células que já haviam atravessado a transição $\text{G1} \rightarrow \text{S}$ no pico de atividade de $\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}$, acúmulo em G2/M para a correção do dano por meio de mecanismos de reparo que expõe simples fita de DNA. Ambos em conjunto geram um efeito de queda de viabilidade celular, que é parcialmente resgatada quando há o combate das espécies oxidantes utilizando o antioxidante NAC.

5.3 - A autofagia combate principalmente o estresse oxidativo causado por $\text{HRAS}^{\text{G12V}}\text{-GTP}$

O conjunto dos experimentos realizados sugere uma dinâmica de eventos que se inicia no pico da indução $\text{HRAS}^{\text{G12V}}/\text{HRAS}^{\text{G12V}}\text{-GTP}$ e ocorre até a morte celular. Logo nos primeiros minutos da indução de $\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}/\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}\text{-GTP}$, LC3II aumenta quando comparado ao tempo zero, indicando um processo inicial de atividade autofágica. Este processo se estende a níveis constantes até 24h depois da indução quando ocorre o pico de expressão de $\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}/\text{ER:HRAS}^{\text{G12V}}\text{-GTP}$. Após 48h da indução ocorre um abrupto incremento na atividade autofágica

indicando um processo de estresse disparador da autofagia. Independente da reposição do indutor, os níveis altos de atividade autofágica se mantêm estáveis até às 96h depois da indução (Figura 4.20). Paralelamente após as mesmas 48h de indução, foi observado o começo do acúmulo de espécies oxidantes. Este acúmulo é progressivo, todavia seus maiores níveis são alcançados após quatro dias de exposição a ER:HRAS^{G12V}-GTP. Esta cinética correlaciona muito bem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio com o aumento da atividade autofágica. Além da própria cinética, fica nítida a interferência do antioxidante NAC na atividade autofágica (Figura 4.18), sugerindo que autofagia é consequência do estresse oxidativo causado por altos níveis de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP.

Não obstante, a autofagia não consegue impedir as reações deletérias desencadeadas pelo aumento de EO que acabam levando às células a morte, uma vez que a alta atividade de ER:HRAS^{G12V} seja mantida. Então, qual é papel da autofagia mediante ao aparecimento dessas espécies reativas de oxigênio? O experimento mostrado na figura 4.26 apresenta uma boa explicação. Em células cuja autofagia é funcional (Scrb) observamos um crescimento progressivo de EO que atinge seu nível máximo no quarto dia após a indução, justamente quando se iniciam a exposição de simples fita de DNA (Figuras 4.13), acúmulo de p62 (Figuras 4.21 e 4.23B) e morte (Figura 4.11). Porém, em células defectivas para autofagia (Δ ATG7), o nível máximo de EO é atingido já em 48h de indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP exacerbando todos os efeitos mencionados anteriormente como o indicador de dano no DNA γ H2AX, acúmulo de p62 (Figura 4.25A) e queda de viabilidade celular (Figura 4.25B e C). Além disso, o próprio nível máximo de EO é maior nas células deficientes em autofagia do que naquelas que possuem o mecanismo funcional, se tornando um aditivo para o efeito citotóxico de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP. Nesse contexto acreditamos que a autofagia é um mecanismo pró-sobrevivência aumentando a viabilidade celular mediante ao estresse oncogênico, além de ampliar a janela de tempo em que a instabilidade genômica pode agir para ajudar a completa transformação maligna aumentando a robustez do novo fenótipo.

Entendendo que a atividade autofágica é uma consequência direta do estresse oxidativo a segunda pergunta é: como as EO intensificam a atividade autofágica? Para esta pergunta apresentamos duas hipóteses, mediante indicadores indiretos, que podem estar ocorrendo paralelamente: 1- A primeira delas é do efeito

similar a antioxidante que p62 possui quando acoplado a atividade de Nrf2 (JAIN et al., 2010); 2- Atividade de HIF1 (Fator de hipóxia induzível) promovendo atividade de PI3K de classe III (SCHERZ-SHOUVAL; ELAZAR, 2011) juntamente com desvio para glicólise oxidativa, importante fonte de desequilíbrio metabólico, que pode atrapalhar outras vias promotoras da recomposição de agentes antioxidantes celulares como a glutatona.

No primeiro caso deve ser ressaltado que o acúmulo de p62 em nenhuma circunstância é benéfico para as células, muito pelo contrário, este processo indica problemas no fluxo autofágico que invariavelmente acarretam em perda da viabilidade celular, além do excesso de p62 ser citotóxico por si. O benefício da molécula está em seu aumento transiente quando pode realizar suas diversas funções e posteriormente ser degradado pela própria autofagia. Neste contexto acreditamos que o recrutamento da maquinaria autofágica, decorre do estresse oxidativo que estabiliza Nrf2, promovendo a transcrição de uma série de antioxidantes celulares além do próprio p62. Este processo acarreta em aumento da transcrição de p62 que se liga por sua porção KIR a Keap1, carregando esta proteína a degradação autofágica, estabilizando ainda mais moléculas de Nrf2 para promover transcrição. A liberação de mais Nrf2 mantém um circuito de retroalimentação positiva até que as espécies oxidantes sejam combatidas (Figura 5.6).

A segunda hipótese pode ser explorada a partir da observação de que a indução de ER:HRAS^{G12V}/ ER:HRAS^{G12V}-GTP provoca aumento na concentração de lactato no meio de cultura, que se acentua a partir do quarto dia de indução (Figura 5.5C). Este processo é um indicativo de forte atividade glicolítica que pode ser resultado do novo padrão metabólico imposto pela alta atividade de RAS. Em uma série de linhagens tumorais e amostras de tumores transformados por RAS esta mudança de padrão metabólico passa pela ativação de HIF1 (PYLAYEVA-GUPTA; GRABOCKA; BAR-SAGI, 2011), não apenas promovendo a transcrição de diversas moléculas que atuam no estabelecimento do novo padrão, mas também em decorrência do aumento de espécies reativas de oxigênio causado pela própria oncoproteína (MCCUBREY et al., 2012). Uma vez em altas concentrações, HIF1 promove a transcrição de duas moléculas, BNIP3 e NIX, que sequestram Bcl2 acarretando em sua degradação. O sequestro de Bcl2 provoca a liberação de Beclina que então se associa a outras proteínas formando o complexo de iniciação

da autofagia (PI3KclII) permitindo a ativação do processo. Outro ponto relevante, que pode adicionar estímulo autofágico, é que se houver um desvio para via glicolítica de fato em detrimento de outras vias metabólicas, e não apenas um aumento da glicólise, várias fontes de substratos essenciais, principalmente de esqueleto de carbono, poderiam estar prejudicadas. Um exemplo seria a deficiência na via das pentoses fosfato que além de prejudicar o fornecimento de nucleotídeos, acarretaria na deficiência de NADPH, importante fonte de glutathione reduzida (Figura 1.6 conversão GSSG→GSH).

Tanto a liberação de Nrf2 quanto o desvio metabólico acoplado ao aumento de atividade de HIF1 podem ocorrer ao mesmo tempo e serem somatórios, provocando uma intensa resposta autofágica, além de serem uma fonte de iniciação do mecanismo independente da via de mTORC, que por sua vez não está respondendo como tal (Figura 4.23 B).

5.4 - O Papel da autofagia no estresse oncogênico desencadeado pela atividade de HRAS^{G12V}

Não há dúvidas que a atividade autofagia se intensifica para combater os diversos sinais de estresses desencadeados por HRAS^{G12V}-GTP, assim ela é um mecanismo de resguardo atuando como mais uma fonte de robustez do sistema. Não obstante, a atividade sustentada da oncoproteína causou danos cumulativos, e conseqüentemente, uma demanda crescente da autofagia que por si possui uma capacidade de fluxo limitada.

Problema no fluxo autofágico também é um agente estressor, podendo ajudar a acelerar a morte celular. O fluxo pode estar comprometido de duas formas: Por bloqueio de uma de suas etapas ou por elevada demanda sem capacidade de processamento. No caso das células submetidas a atividade sustentada de ER:HRAS^{G12V}/ ER:HRAS^{G12V}-GTP possuímos alguns indícios de que é o segundo fenômeno que está presente.

O primeiro indício é a dinâmica dos acontecimentos ligados ao estresse oxidativo. Como discutido anteriormente, uma das principais causas da iniciação autofágica são as espécies oxidantes, crescentes e cumulativas, demandando cada vez mais a ação do processo para combatê-las. Esta crescente demanda acarretou no surgimento de um grande número de autofagossomos, sem que as células

Figura 5.6. Como as espécies oxidantes (EO), provocadas pela atividade de ER:HRAS^{G12V}, podem intensificar a autofagia: Sugerimos duas hipóteses, não exclusivas, para a intensificação da autofagia provocada por espécies reativas de oxigênio. Para mais detalhes vide o texto.

O segundo, e mais contundente, é a combinação da indução com a cloroquina (Figura 4.24A). A cloroquina é um agente que bloqueia a ligação do lisossomo no autofagossomo maduro, ou seja, um processo tardio da autofagia. A figura 4.24A mostra que a combinação de cloroquina com a indução de ER:HRAS^{G12V} provoca um acúmulo de LC3II e p62 muito maior do que suas partes separadamente, indicando uma forte sinergia entre os processos. Se a atividade de ER:HRAS^{G12V} estivesse bloqueando o fluxo antes ou depois do ponto de atuação da cloroquina a combinação do tratamento no máximo seria somatória e não sinérgica (KLIONSKY DJ, et al., 2016; MIZUSHIMA; YOSHIMORI, 2016). Mediante a estes resultados podemos inferir que a atividade de ER:HRAS^{G12V} intensifica a autofagia e quando combinada com o bloqueio da cloroquina aumenta a presença de autofagossomos não processados.

O comprometimento do fluxo autofágico atrapalha o fornecimento basal de substratos reciclados intensificando o desequilíbrio metabólico. Também acarreta em deficiência no combate a proteínas mal dobradas e organelas danificadas como mitocôndrias, importantes geradoras de espécies oxidantes. Tanto o acúmulo de conteúdo autofágico, como a não disponibilidade basal do mecanismo, para a realização de outras funções, são agentes estressores importantes.

Assim, concluímos que a indução de ER:HRAS^{G12V}/ER:HRAS^{G12V}-GTP, por conta do estresse oxidativo, causa uma demanda crescente da autofagia que no início combate o estresse aumentando a viabilidade celular, porém com o passar do tempo, a demanda ultrapassa a capacidade de processamento autofágico causando o acúmulo de autofagossomos e contribuindo para o estresse generalizado que se instala na célula. Todavia deve-se ressaltar que neste caso não existe a chamada “Morte autofágica” e sim “Morte associada a autofagia”, quando a causa da morte é o estímulo que impulsionou a necessidade autofágica e não o processo em si. Dessa forma quando interrompemos a indução do estressor (HRAS^{G12V}-GTP) as células se restabelecem e a autofagia cessa, já quando mantemos o estressor e subtraímos a autofagia, as células são levadas a morte antes e em maior

intensidade do que aquelas que possuem autofagia funcional, como observado nos experimentos utilizando a linhagem Δ ATG7.

6 – CONCLUSÃO

Robustez celular é a capacidade de uma célula em manter suas funções vitais frente a diferentes tipos de perturbações, internas ou externas. A robustez é ampliada quanto maiores forem os meios (diferentes vias) para se atingir o mesmo fim, assim quase sempre uma série de redundâncias é observada partindo de uma mesma sinalização. Uma célula transformada possui um regime de robustez diferente de sua equivalente normal, por estar submetida a novos estímulos além de ter passado por um processo de seleção (KITANO, 2004). Por esta razão, seus pontos de vulnerabilidade também variam e um mecanismo que antes ajudava na prevenção de transformação pode se transformar em um aliado da célula transformada; um exemplo é o caso da autofagia, que mostramos ser uma importante fonte de atenuação do estresse oncogênico desencadeada por HRAS^{G12V}-GTP.

Por anos nosso laboratório vem trabalhando no processo de identificar pontos de vulnerabilidade no ciclo celular de células transformadas. Mostramos que FGF2, um mitógeno clássico, é capaz de bloquear o ciclo de células de camundongo malignamente transformadas, em uma ação que é completamente dependente da atividade de RAS (COSTA et al., 2008). A partir de então nosso foco foi a procura de padrões similares em células humanas, com a adição de outros perturbadores do ciclo tal como PMA (Julianna Dias, 2012; Juliana Galvão, 2014 teses de doutorado). Por meio do conjunto de dados desses trabalhos percebemos que as perturbações causadas por agentes externos (PMA e FGF2) dependiam essencialmente dos níveis de RAS ativo, proteína que atua como um *hub* ao receber e distribuir diferentes sinais, gerando diferentes destinos celulares.

Acreditamos que neste sentido o RAS pode ser o *core* de uma arquitetura molecular do tipo *bow tie*, onde pequenas oscilações de sua atividade são responsáveis por progressão do ciclo celular, porém grandes oscilações levam a fenótipos aberrantes tais como transformação e morte (KAWAKAMI et al., 2016). Sendo correta esta hipótese, a intervenção direta do próprio *core*, com um estímulo mínimo e não deturpador da robustez celular como são FGF2 e PMA, poderia nos trazer respostas mais gerais a respeito de pontos de vulnerabilidades e mecanismos

amplamente afetados pela atividade de RAS. Neste cenário surgiram os modelos de RAS induzível que exploramos largamente nesta tese de doutorado.

Figura 6.1. Caminho de queratinócitos imortalizados por E6E7 até seu destino final quando submetido a atividade de $HRAS^{G12V}$: **A.** Modelo da Ampulheta Bipartida. Propomos que o caminho de uma célula submetida a pressão seletiva de um oncone mutado funcione como uma ampulheta bipartida onde o destino mais comum é sua morte. Não obstante, a cooperação com outros oncogenes, supressores de tumores, e amenizadores de estresse oncogênico podem e devem ampliar a janela de tempo para que a instabilidade genômica possa agir e dar origem a um evento raro: A Transformação Maligna (TM); **B.** Com o nosso modelo mostramos que os principais eventos que interferem na viabilidade celular de queratinócitos imortalizados por E6E7 submetidos a atividade de $HRAS^{G12V}$, impedindo sua transformação maligna, são o Estresse replicativo e Estresse Oxidativo; **C.** A Autofagia é intensificada como um amenizador desses efeitos deletérios, ampliando a viabilidade e tempo de vida dessas células, permitindo assim que a instabilidade genômica gerada possibilite o surgimento de novas mutações que aumentam consideravelmente a possibilidade da transformação maligna ocorrer.

Por uma analogia simples imaginemos uma estrutura do tipo ampulheta de duas câmaras, na qual a inferior é bipartida, com cada parte representando diferentes destinos celulares: transformação e morte. Imaginemos ainda que a partir do gargalo o acesso para a parte de morte é muito mais largo do que para a parte de transformação (Figura 6 A). Os grãos de areia representam as células e o gargalo são os desafios pelos quais as células precisam passar para atingir um dos dois

destinos. O RAS mutado seria a gravidade que impulsiona todas as células para seu destino final (Figura 6 B). Com este trabalho mostramos que o diâmetro do gargalo é regulado por dois fenômenos: enquanto que estresses replicativo, mitogênico e oxidativo reduzem o diâmetro do gargalo, levando menos células a atingir o destino transformação em um dado instante de tempo, a autofagia é um amenizador do estresse generalizado, ou seja, incrementa o seu diâmetro, aumentando a possibilidade de que pelo menos uma célula atinja o destino transformação frente a atividade de HRAS^{G12V} (Figura 6 C).

7 - REFERÊNCIAS

- ALONIO, L. V. et al. Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, n. 3, p. 263–269, 2003.
- AMARAVADI, R.; KIMMELMAN, A. C.; WHITE, E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. **Genes and Development**, v. 30, n. 17, p. 1913–1930, 2016.
- ARIAS, E.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 2, p. 184–189, 2011.
- ARKIN, D. M. P. et al. MINI REVIEW ESTIMATING THE WORLD CANCER BURDEN : GLOBOCAN 2000. v. 156, n. July, p. 153–156, 2001.
- BECKMAN, R. A.; LOEB, L. A. Efficiency of carcinogenesis with and without a mutator mutation. v. 103, n. 38, p. 14140–14145, 2006.
- BENSINGER, S. J.; CHRISTOFK, H. R. New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 4, p. 352–361, 2012.
- BESTER, A. C. et al. Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 435–446, 2011.
- BIVONA, T. G. et al. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. **Molecular Cell**, v. 21, n. 4, p. 481–493, 2006.
- BOYKEVISCH, S. et al. Regulation of Ras Signaling Dynamics by Sos-Mediated Positive Feedback. **Current Biology**, v. 16, n. 21, p. 2173–2179, 2006.
- BRIERLEY, D. J.; MARTIN, S. A. Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 18, p. 2420–8, 2013.
- BULAVIN, D. V et al. Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 11, p. 3859–71, 2003.
- CHIU, V. K. et al. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. **Nature cell biology**, v. 4, n. 5, p. 343–350, 2002.
- COOKE, M. S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 10, p. 1195–1214, 2003.
- COX, A. D. et al. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 13, n. 11, p. 828–51, 2014.
- COSTA, É. T. et al. Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. **Cancer Research**, v. 68, n. 15, p. 6215–6223, 2008.
- COX, A. D.; DER, C. J. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 8999–9006, 2003.
- CROSBIE, E. J. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p.

889–899, 2013.

DEWHIRST, M. W.; CAO, Y.; MOELLER, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 6, p. 425–37, 2008.

DUENSING, S. et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. v. 97, n. 18, 2000.

DURAN, A. et al. The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF- κ B Mediator in Tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 13, n. 4, p. 343–354, 2008.

DURST, M.; GALLAHAN, D. A. N.; JAY, G. Glucocorticoid-Enhanced Neoplastic Transformation of Human Keratinocytes by Human Papillomavirus Type 16 and an Activated ras Oncogene. v. 1, p. 0–4, 1989.

EGAN, D. F. et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. **Science**, v. 331, n. 2011, p. 456–461, 2010.

ELGENDY, M. et al. Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival. **Molecular Cell**, v. 42, n. 1, p. 23–35, 2011.

FENG, Z. et al. Preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 20, p. 1527–1536, 2002.

FUCHS, E. Epidermal Differentiation - the Bare Essentials. **Journal of Cell Biology**, v. 111, n. 6, p. 2807–2814, 1990.

FUSENIG, N. E.; BOUKAMP, P. Multiple Stages and Genetic Alterations in Immortalization , Malignant Transformation , and Tumor Progression of Human Skin Keratinocytes. v. 158, n. July, p. 144–158, 1998.

GOUGH, D. R.; COTTER, T. G. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. **Cell death & disease**, v. 2, n. 10, p. e213, 2011.

GREEN, D. R.; LEVINE, B. To be or not to be? How selective autophagy and cell death govern cell fate. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 65–75, 2014.

GUO, J. Y. et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. **Genes and Development**, v. 25, n. 5, p. 460–470, 2011.

GUO, J. Y. et al. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. **Genes and Development**, v. 30, n. 15, p. 1704–1717, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation**Cell, 2011.

HANCOCK, J. F. Ras proteins: different signals from different locations. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 5, p. 373–84, 2003.

HAUSEN, H. ZUR. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996.

HILLS, S. A.; DIFFLEY, J. F. X. DNA replication and oncogene-induced replicative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R435–R444, 2014.

HUI, L. et al. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. **Nature genetics**, v. 39, n. 6, p. 741–9, 2007.

IHLE, N. T. et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: Implications for signaling and clinical outcome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 3, p. 228–239, 2012.

JAIN, A. et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 29, p. 22576–22591, 2010.

JEMAL, A.; DESANTIS, C.; WARD, E. M. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. p. 1893–1908, 2010.

JULIANA GALVÃO DA SILVA, V. Efeito dual de FGF2 e PMA em células HEK 293 transformadas por HRAS^{G12V} **Tese de Doutorado**. 2014.

JULIANNA DIAS ZEIDLER Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico : FGF2 e PMA como supressores de tumor **Tese de Doutorado** . 2012.

KABEYA, Y. et al. Erratum: LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing (EMBO Journal (2000) 19 (5720-5728)). **EMBO Journal**, v. 22, n. 17, p. 4577, 2003.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Ras oncogenes: split personalities. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 7, p. 517–531, 2008.

KATSURAGI, Y.; ICHIMURA, Y.; KOMATSU, M. p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor. **FEBS Journal**, p. n/a-n/a, 2015.

KAWAKAMI, E. et al. Network analyses based on comprehensive molecular interaction maps reveal robust control structures in yeast stress response pathways. **npj Systems Biology and Applications**, v. 2, n. October 2015, p. 15018, 2016.

KITANO, H. Biological robustness. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. November, p. 826–837, 2004.

KLAES, R. et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. **Cancer Research**, v. 59, n. 24, p. 6132–6136, 1999.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, v. 8, n. 4, p. 445–544, 2012.

KLIONSKY DJ, ABDELMOHSEN K, ABE A, ABEDIN MJ, ABELIOVICH H, ACEVEDO AROZENA A, ADACHI H, ADAMS CM, ADAMS PD, ADELI K, ADIHETTY PJ, ADLER SG, AGAM G, AGARWAL R, AGHI MK, AGNELLO M, AGOSTINIS P, AGUILAR PV, AGUIRRE-GHISO J, AIROLDI EM, AIT-SI-ALI S, AKEMAT, Z. S. Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

LAMPSON, B. L. et al. Rare codons regulate KRas oncogenesis. **Current Biology**, v. 23, n. 1, p. 70–75, 2013.

LAWRENCE, M. S. M. S. et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 517, n. 7536, p. 576–582, 2015.

LAVOIE, J. N. et al. Cell Biology and Metabolism : Cyclin D1 Expression Is Regulated Positively by the p42 / p44 MAPK and Negatively by the p38 / HOG MAPK Pathway Cyclin D1 Expression Is Regulated Positively by the p42 / p44 MAPK and Negatively by the p38 / HOG MAPK Pathway *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20608–20616, 1996.

LEONCINI, E. et al. Adult height and head and neck cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium. **Head and Neck**, v. 36, n. 10, p. 1391, 2014.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. **Cell**, v. 132, n. 1, p. 27–42, 2008.

LIANG, J. et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. **Nature cell biology**, v. 9, n. 2, p. 218–224, 2007.

LIPPENS, S. et al. Death penalty for keratinocytes : apoptosis versus cornification. p. 1497–1508, 2005.

LITTLEWOOD, T. D. et al. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. v. 23, n. 27, p. 1686–1690, 1995.

LIU, Y. C. et al. Global regulation of nucleotide biosynthetic genes by c-myc. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, 2008.

LIZANO, M.; BERUMEN, J.; GARC??A-CARRANC??, A. HPV-related Carcinogenesis: Basic Concepts, Viral Types and Variants. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 6, p. 428–434, 2009.

LOCK, R.; DEBNATH, J. Ras, autophagy and glycolysis. **Cell Cycle**, v. 10, n. 10, p. 1516–1517, 2011.

LU, C. et al. Serum starvation induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via p38 MAPK pathway. **FEBS Letters**, v. 582, n. 18, p. 2703–2708, 2008.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823–837, 2009.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 459–465, 2003.

MANNAVA, S. et al. Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. **Cell Cycle**, v. 7, n. 15, p. 2392–2400, 2008.

MARIO, G.; MARTINS, I.; KROEMER, G. Autophagy in Ras-Induced Malignant Transformation: Fatal or Vital? **Molecular Cell**, v. 42, n. 1, p. 1–3, 2011.

MATHEW, R.; WHITE, E. Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: Friend by day, foe by night. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 21, n. 1, p. 113–119, 2011.

MCCUBREY, J. A. et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how

mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance. **Oncotarget**, v. 3, n. 10, p. 1068–111, 2012.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 335–344, 2009.

MCMURRAY, H. R. et al. Biology of human papillomaviruses. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 1, p. 15–33, 2001.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. v. 8627, n. December, 2016.

MIZUSHIMA, N. et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 9, p. 1679–1688, 2003.

MIZUSHIMA, N. Methods for monitoring autophagy. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2491–2502, 2004.

MIZUSHIMA, N. et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1069–1075, 2008.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 107–132, 2011.

NARISAWA-SAITO, M. et al. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. **Cancer Research**, v. 68, n. 14, p. 5699–5705, 2008.

NARISAWA-SAITO, M. et al. A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 4, p. 910–917, 2012.

OHSUMI, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 3, p. 211–216, 2001.

OMEROVIC, J.; LAUDE, A. J.; PRIOR, I. A. Europe PMC Funders Group Ras proteins : paradigms for compartmentalised and isoform specific signalling. v. 64, p. 2575–2589, 2008.

OXFORD, G.; THEODORESCU, D. Review Article: The Role of Ras Superfamily Proteins in Bladder Cancer Progression. **The Journal of Urology**, v. 170, n. 5, p. 1987–1993, 2003.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PRIOR, I. A.; HANCOCK, J. F. Compartmentalization of Ras proteins. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 9, p. 1603–1608, 2001.

PRIOR, I. A.; LEWIS, P. D.; MATTOS, C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. **Cancer Research**, v. 72, n. 10, p. 2457–2467, 2012.

PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–74, 2011.

RAVIKUMAR, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 90, n. 4, p. 1383–435, 2010.

REGGIORI, F.; KLIONSKY, D. J. Autophagosomes: Biogenesis from scratch? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 4, p. 415–422, 2005.

RELLO-VARONA, S. et al. Autophagic removal of micronuclei. **Cell Cycle**, v. 11, n. 1, p. 170–176, 2012.

REUTER, J. A.; KHAVARI, P. A. Use of Conditionally Active Ras Fusion Proteins to Study Epidermal Growth, Differentiation, and Neoplasia. **Methods in Enzymology**, v. 407, n. 5, p. 691–702, 2005.

SANJANA, N. E.; SHALEM, O.; ZHANG, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. **Nature Methods**, v. 11, n. 8, p. 783–784, 2014.

SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 1, p. 30–38, 2011.

SHINTANI, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5698, p. 990–5, 2004.

STEPHAN, J. S. et al. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 40, p. 17049–17054, 2009.

STEPHEN, A. G. et al. Dragging ras back in the ring. **Cancer Cell**, v. 25, n. 3, p. 272–281, 2014.

STROHECKER, A. M. et al. Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. **Cancer discovery**, v. 3, n. 11, p. 1272–85, 2013.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, n. 1/2, p. 37–56, 2004.

VAN DOORLAER, K.; BURK, R. Evolution of humana papillomavirus carcinogenicity. **Advances in Virus Research**, v. 77, p. 41–62, 2010.

VELDMAN, T. I. M.; HORIKAWA, I.; BARRETT, J. C. Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. v. 75, n. 9, p. 4467–4472, 2001.

VESSONI, A. T. et al. Autophagy and genomic integrity. **Cell death and differentiation**, v. 20, n. 11, p. 1444–54, 2013.

VIGIL, D. et al. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 12, p. 842–57, 2010.

W., D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999.

WATSON, J. V; CHAMBERS, S. H.; SMITH, P. J. With a Definable G1 Peak. v. 8, p. 1–8, 1987

WEINBERG, F. et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated

tumorigenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 19, p. 8788–93, 2010.

WHITE, E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 6, p. 401–10, 2012.

WU, R.-F. et al. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 14, p. 3553–3568, 2010.

YANG, S. et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. **Genes and Development**, v. 25, n. 7, p. 717–729, 2011.

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D. J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. **Cell death and differentiation**, v. 12 Suppl 2, p. 1542–52, 2005.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Eduardo Cararo Lopes

Nascido em 05 de maio de 1985 em São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: edu.llopes@gmail.com

EDUCAÇÃO

- Ensino Médio: Escola Estadual Prof. Antônio José Leite. São Paulo, SP, 2002.
- Graduação: Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo - USP. São Paulo, SP. 2012
- Pós-graduação: Candidato ao título de doutorado em Bioquímica junto ao Laboratório Especial de Ciclo Celular (LECC), Instituto Butantan; pelo programa de pós-graduação do Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo.
Ingresso em 2012 e previsão de conclusão em 2017.

OCUPAÇÃO

- Aluno de doutorado pelo departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
Bolsista CAPES. Vigência 08/2012 a 07/2016

ARTIGOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

- Zeidler, J.D.; Dias, M.H.; Galvão, J.; Pavanelli, J.C.; **Cararo-Lopes, E.**; Fonseca, C.S.; Laurindo, F.R.M.; Armelin, H.A. PMA/PKC signaling axis selectively triggers oxidative stress in H-RasV12 transformed human keratinocytes. PLoS ONE. (Under Revision) Manuscript # PONE-D-15-19175.

- Julianna Dias Zeidler, Lorena Siqueira, Ana Salles, **Eduardo Cararo-Lopes**, Matheus H. S. Dias, Ana San'Anna, Juan Pérez, Luisa A. Ketzer, Antônio Galina, Andrea da Poian. Unravelling Mitochondrial Oxidation of Specific Exogenous/Endogenous Substrates: Insights on the Crabtree Effect. JBC Manuscript # JBC/2017/786582.

PARTICIPAÇÕES SELECIONADAS EM CONGRESSOS

- Lopes E, Marcelo S. Silva; Cecília S. Fonseca; Marcelo S. Reis; Alexandre Vessoni; Menck, C.F.M; Boccardo E, Armelin HA. High [HRasG12V-GTP] levels lead immortalized keratinocytes to death through autophagic flux impairment. In: 81st Symposium: Cancer at Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL), 2016, Cold Spring Harbor, NY United States.
- Lopes E, Boccardo E, Armelin HA. Acute of [HRasG12V-GTP] in E6E7-immortalized keratinocytes do not promote transformation. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 2015, Foz do Iguaçu, PR Brazil.
- Lopes E, Boccardo E, Armelin HA. Acute exposition and high levels of [HRasG12V-GTP] in E6E7-immortalized keratinocytes do not promote transformation. In: Gordon Research Conference in Cell Growth and Proliferation, 2015, West Dover, VT United States.
- Lopes E, Zeidler JD, Armelin HA. FGFs/FGFRs in human keratinocytes. In: 10th International congress on Cell Biology, 2012 Rio de Janeiro, RJ Brazil.

“Veni, vidi, vici!”