UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

(Bioquímica)

JULIANNA DIAS ZEIDLER

Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

10/10/2012

JULIANNA DIAS ZEIDLER

Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor

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

São Paulo

2012

Julianna Dias Zeidler

Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos que me incentivaram a ingressar no mundo científico:

meus mestres e meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Hugo Armelin, pesquisador que considero ter uma visão científica diferenciada, muito à frente do convencional. Para mim foi um privilégio ter como mentor um cientista com tamanha experiência, perspicácia e, vale ressaltar, humanidade, características estas compartilhadas em horas de boa prosa. Obrigada por ter acolhido em seu laboratório esta índia que veio de tão longe!

Aos meus amigos que se tornaram família nesses anos de doutoramento: Dr. Alexandre Dermargos, grande conselheiro para todas as horas (e assuntos possíveis), em especial pela orientação nos momentos ruins de bancada e pelas críticas construtivas na escrita desta tese; Dr. Matheus Dias, pelas valiosas contribuições no planejamento de experimentos, interpretação de resultados de citometria e por me proporcionar momentos de risadas durante as prolongadas horas de trabalho na sala de cultura; à minha chará Juliana Galvão, por ter me ensinado a ser menos ansiosa e executar os experimentos em sequencia organizada e hierárquica, lição que me valerá por toda a carreira acadêmica. Agradeço também pelo papo jogado fora, que quebram o gelo nas horas mais sisudas de trabalho; Ao meu ex-IC (escravo alforriado) Eduardo Lopes, agora doutorando, por toda ajuda nos experimentos, principalmente pelos mais entediantes. Às inteligentíssimas Cecília e Natany, por elevar o nível intelectual do laboratório e deixá-lo mais divertido. À Mariana Koga, que talvez não se dê conta disso, mas foi quem me ensinou as técnicas mais básicas desenvolvidas no laboratório, precursoras de tudo o que sei fazer hoje. Ao Prof. Dr Fábio Nakano, por ser sempre tão solícito aos pedidos mais desesperados de ajuda em cálculos matemáticos; Ao Gilson e à Jacqueline, que muito me ensinaram. À todos, pela agradável amizade que tornaram o ambiente de trabalho um lugar mais feliz.

Aos demais colegas do Instituto de Química e do CAT/Instituto Butantan, pelas mais diversas contribuições na execução deste trabalho.

Aos meus pais que me deram suporte moral, emocional e financeiro para minha formação acadêmica por completo e aos meus irmãos que me apoiaram nos momentos em que meus pais não estavam de acordo. Aos queridos amigos Angélica, Cau, Gabi, Lucy, Elder e Moisés pela convivência fraternal, companheirismo e amparo em momentos adversos.

Ao José Rodolfo, meu companheiro, pela presença mais que agradável, apoio constante e pelos valiosos “pitacos” que deu em todo o processo.

Agradeço ao professor Dr. Pablo Acosta, que com sua incrível didática e inteligência aguçada, foi responsável pelo meu intenso gosto pela área de bioquímica e biologia molecular. Sem sua ajuda também não teria conseguido vencer a tempo tamanha burocracia que se deu no processo de colação de grau, reconhecimento do curso de graduação e expedição do diploma.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado e à FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

“A neve e a tempestade matam as flores,
mas nada podem com as sementes.”
KHALIL GIBRAN

RESUMO

Zeidler, J.D. **Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor.** 2012. 136p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Um passo limitante no desenvolvimento de fármacos para terapias do câncer está na descoberta de vulnerabilidades específicas de células tumorais que sirvam à identificação de alvos moleculares apropriados à intervenção farmacológica. Esta é a motivação central desta tese, cuja abordagem experimental focaliza a ação oncogênica das proteínas Ras. Amplificação ou mutação ativadora nos proto-oncogenes ras estão entre as alterações genéticas mais frequentes em cânceres. Essas lesões genéticas aparecem na origem etiológica de múltiplas formas de fenótipos malignos. Mas, essas lesões oncogênicas também conferem susceptibilidades letais às células malignamente transformadas frente a determinados agentes que não interferem significativamente nas funções vitais de células normais. Nos últimos anos nosso laboratório vem estudando os mecanismos moleculares da ação antiproliferativa do fator de crescimento FGF2 (*Fibroblast Growth Factor2*) e do éster de forbol PMA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*) em linhagens de células murinas malignas dependentes de ras oncogênico. Nesta tese investigamos quanto de nossas observações anteriores com células murinas são aplicáveis a células humanas. Nesse sentido focalizamos a linhagem HaCaT de queratinócitos humanos imortalizados e seus subclones malignizados por expressão ectópica de H-RasV12; além disso, numa triagem inicial também examinamos treze linhagens celulares humanas derivadas de tumores naturais portadores de mutação ativadora em H-Ras, N-Ras ou K-Ras. Nossos resultados mostram que os queratinócitos da linhagem parental HaCaT expressam receptores de FGFs e respondem mitogenicamente tanto a FGF2 como a PMA; portanto, ambos FGF2 e PMA são benéficos aos queratinócitos HaCaT. Por outro lado, o FGF2 mostrou-se citotóxico para subclones HaCaT que expressam H-RasV12 induzível, mas sublinhagens HaCaT com expressão constitutiva de H-RasV12 mostraram-se resistentes à ação citotóxica de FGF2. Diferentemente de FGF2, PMA bloqueou a proliferação de sublinhagens clonais HaCaT-H-RasV12 em ambos substrato sólido e suspensão de agarose e, também, reduziu a estratificação dos queratinócitos HaCaT-H-RasV12 em culturas organotípicas. PMA foi citotóxico e não citostático, pois induziu morte apoptótica sem causar arresto em nenhuma fase específica do ciclo celular. Em HaCaT parental, PMA induziu aumento transitório dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS), mas nos queratinócitos HaCaT-H-RasV12, PMA causou aumentos mais altos e persistentes de ROS, o que promove forte estresse oxidativo, provavelmente responsável pela toxidez deste ester de forbol. Entre as treze linhagens celulares humanas malignas com H-Ras, N-Ras ou K-Ras mutados, onze foram vulneráveis à ação citotóxica de PMA; mas apenas uma delas, a linhagem de tumor urotelial UM-UC-3, foi sensível ao efeito anti-proliferativo de FGF2. Em conclusão, células malignas humanas com Ras mutado parecem superar rapidamente uma possível toxidez de FGF2, mas não ultrapassam a toxidez causada por PMA.

Palavras-chave: Ras, FGF2, PMA, citotoxidez, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Zeidler J.D. **Specific vulnerabilities of human malignant cells dependent on oncogenic Ras: FGF2 and PMA as tumor suppressors.** 2012. 136p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A challenge in drug development for cancer therapy is the discovering of molecular targets suitable for pharmacological interference. This challenge was the main motivation of the present thesis. Amplification or activating mutation in ras proto-oncogenes are among the most frequent genetic lesions in human cancer. Actually, mutated Ras onco-proteins are in the etiological roots of multiple malignant phenotypes; however these onco-proteins also cause specific lethal vulnerabilities even in robust malignant cells. Recently, our laboratory reported that malignant murine cell lines dependent on oncogenic Ras are prone to toxicity initiated by FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) and PMA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate), which are not harmful to normal cells. This cytotoxicity of FGF2 and PMA very likely follows different molecular mechanisms, which, however, are not yet completely understood. The aim of this thesis was to investigate whether these vulnerabilities found in murine malignant cells were also valid for human malignant cell lines dependent on oncogenic Ras. To this end the experimental approach was focused on the HaCaT cell line of immortalized human keratinocytes and its sublines transformed by H-RasV12 ectopic expression. In addition thirteen human cell lines derived from natural tumor carrying mutated H-Ras, N-Ras or K-Ras oncogenes were also screened. The results showed that HaCaT keratinocytes express FGF receptors and respond mitogenically to both FGF2 and PMA. On the other hand, FGF2 was cytotoxic to HaCaT subclones expressing inducible H-RasV12. But, HaCaT sublines constitutively expressing H-RasV12 were resistant to FGF2 toxicity. However, PMA was toxic to all HaCaT-H-RasV12 sublines, inhibiting proliferation in both solid substrate and agarose suspension cultures and, also reducing stratification in organotypic cultures. Furthermore, in HaCaT-H-RasV12 sublines, but not in the parental HaCaT line, PMA caused a persistently high increase in intracellular levels of reactive oxygen species (ROS) and concomitantly induced apoptosis. Moreover, eleven of the thirteen human tumor cell lines with mutated H-Ras, N-Ras or K-Ras, were growth inhibited by PMA, whereas only one of them was inhibited by FGF2, the urothelial tumor cell line UM-UC-3. In conclusion, human malignant cells driven by Ras oncogenes very likely rapidly overcome FGF2 toxicity, whereas they remain stably vulnerable to PMA cytotoxicity.

Keywords: Ras, FGF2, PMA, cytotoxicity, oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4OHT	4-Hidroxitamoxifeno
AKT/PKB	Proteína-quinase B
ATR	*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*
ATM	*Ataxia telangiectasia mutated*
BAD	*Bcl-2 associated death promoter*
BAX	*Bcl-2-associated X protein*
Bcl-2	*B-cell lymphoma 2*
BID	*BH3 interacting domain death agonist*
BIM	*Bcl-2 interacting mediator of cell death*
BrdU	Bromodeoxiuridina
CAK	*CDK-activating kinase*
CDC25	*Cell division cycle 25*
CDK	Quinase dependente de ciclina
CHK	*Checkpoint kinase*
CKI	Inibidor de CDK
DAG	Diacilglicerol
DAPI	*Diamidino-2-phenylindole*
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle medium*
DNA-PK	*DNA-dependent protein kinase*
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
DUSP	*Dual specificity phosphatase*
EGF	*Epidermal Growth Factor*
ERK	*Extracellular signal regulated kinase*
E2F	Fator de transcrição E2F
FACS	*Fluorescence-activated cell sorting*
FasL	*Fas ligand*
FGF	*Fibroblast Growth Factor*
FGFR	Receptor de FGF
FRS2	*FGFR substrate 2*
GAB1	*GRB2-associated binding protein 1*
GAP	*GPTase-activating protein*
G-CSF	*Granulocyte Colony Stimulating Factor*
GDP	Guanosina difosfato
GEF	*Guanine nucleotide exchange factor*
GM-CSF	*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*
GSK-3	*Glycogen synthase kinase 3*
GTP	Guanosina trifosfato
GRB2	Growth Factor Receptor Bound protein 2
HSPG	*heparan sulfate proteoglycan*
IL	Interleucina
IP_3	Inositol-1,4,5-trifosfato
KAP	*Kinase associated phosphatase*
KGF	*Keratinocyte growth factor*; FGF7
M-CSF	*Macrophage Colony Stimulating Factor*
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
MDM2	*Murine doble minute 2*
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nox	NADPH oxidase
Noxa	do latim, "danificar"
mTORC	*mTOR complex*
p53	Proteína 53
PAGE	*Polyacrylamide gel electrophoresis*
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBSA	Tampão fosfato sem íons cálcio e magnésio
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PDGF	*Platelet-Derived Growth Factor*
PDK1	*3-Phosphoinositide-dependent kinase1*
PH	*Pleckstrin homology domain*
PI	*Propidium Iodide*
Pirh2	E3-ubiquitina ligase de p53
PIP_2	*Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate*
PIP_3	*Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate*
PI3K	Fosfatidil Inositol-3 quinase
PKC	Proteína-quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA	*Phorbol-12-myristate-13-acetate*
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
pRb	Proteína retinoblastoma
PSFM	Fenilmetano sulfonil fluoreto
PUMA	*p53 upregulated modulator of apoptosis*
PP1/PP2	Phosphoprotein phosphatases
RACK	*Receptor for activated C-kinase*
Raf	*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*
Ras	*Rat sarcoma*
RHEB	*Ras homolog enriched in brain*
RIPA	*Radioimmunoprecipitation Buffer*
RKIP	*Raf kinase inhibitory protein*
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RSK2	*p90 Ribosomal protein S6 kinase 2*
SASP	*Senescence associated secretory phenotype*
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SOS	*Son of sevenless*
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBS	Solução tamponada de Tris
TBS-T	Solução tamponada de Tris com 0,1 % de *Tween-20*
TGF	*Transforming Growth Factor*
TNF	*Tumor Necrosis factor*
TSC2	*Tuberous Sclerosis Complex 2*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15

1.1 PRINCIPAIS VIAS ENVOLVIDAS EM DISPARO MITOGÊNICO 16

1.1.1 Via de ERK1/2 18

1.1.2 PI3K/AKT 20

1.1.3 PLCγ/PKC 22

1.2 CONTROLE DO CICLO CELULAR 24

1.3 A TRANSFORMAÇÃO MALIGNA 27

1.3.1 A proteína supressora de tumor p53 28

1.3.2 O oncogene Ras 30

1.4 MECANISMOS INTRÍNSECOS DE SUPRESSÃO DE TUMOR 33

1.4.1 Apoptose 35

1.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, SINALIZAÇÃO E CÂNCER 36

1.5.1 NADPH oxidases 40

1.6 FGFS 41

1.7 PMA 45

1.8 QUERATINÓCITOS E A LINHAGEM CELULAR HACAT 48

2 OBJETIVOS 52

2.1 OBJETIVOS GERAIS 52

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 52

3 MATERIAIS E MÉTODOS 54

3.1 TÉCNICAS DE CULTURA DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS 54

3.1.1 Subcultivo 54

3.1.2 Ensaio clonogênico 55

3.1.3 Curvas de crescimento 56

3.1.4 Ensaio clonogênico em suspensão de agarose 56

3.1.5 Transdução com vetor retroviral 57

3.1.6 Cultura organotípica de queratinócitos (raft culture) 58

3.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA 59

3.3 CITOMETRIA DE FLUXO 59

3.3.1 Incorporação de BrdU e ciclo celular 59

3.3.2 Marcação de células mitóticas 60

3.3.3 Ensaio de atividade de Caspases 3/7 61

3.3.4 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) 61

3.4 LISE CELULAR / SDS-PAGE / WESTERN BLOT 62

3.5 IMUNOPRECIPITAÇÃO 63

3.6 TÉCNICAS DE CLONAGEM 63

3.6.1 Preparação de bactérias competentes 63

3.6.2 Transformação de bactérias 64

3.7 PULL DOWN DE RAS-GTP 65

3.7.1 Produção e purificação de GST-RBD (Glutationa-S-transferase - Ras Biding Domain) 65

3.7.2 Precipitação de Ras-GTP *66*
3.8 Extração de ácidos nucléicos 66
3.8.1 Extração de RNA 66
3.8.2 Extração de DNA 67
3.9 Reações moleculares com ácidos nucléicos 68
3.9.1 Transcrição Reversa (RT) 68
3.9.2 Touchdown PCR 68
3.9.3 PCR quantitativo 69
3.10 Anticorpos 71
3.11 Análises estatísticas 71

4 RESULTADOS 72

4.1 Eixo de sinalização FGF/FGFR em queratinócitos humanos: expressão e respostas 72
4.1.1 Queratinócitos expressam FGFR2, FGFR3 e FGFR4, bem como FGF1 e FGF2 72
4.1.2 FGF1, FGF2 e KGF ativam a via de ERK e promovem proliferação de HaCaT em intensidades diferentes 75
4.1.3 Efeito de FGF2 em queratinócitos HaCaT transformados com o oncogene H-RasV12 79
4.2 Efeitos de PMA em queratinócitos expressando H-RasV12 84
4.2.1 Queratinócitos malignamente transformados com H-RasV12 têm proliferação inibida por PMA 84
4.2.2 A sensibilidade de HaCaT H-RasV12 a PMA é dependente de PKC 87
4.2.3 PMA inibe o crescimento de queratinócitos H-RasV12 em suspensão de agarose e sua capacidade de estratificação em cultura organotípica 88
4.2.5 Clone HaCaT H-Ras-V12 com baixos níveis de H-Ras-GTP não é sensível a PMA 100
4.2.6 PMA induz apoptose independente de p53 em HaCaT H-RasV12 100
4.2.7 PMA induz aumento temporário de ROS em HaCaT e aumento alto e persistente em subclones H-RasV12 103
4.3 Efeito de FGF2 e PMA em linhagens malignas humanas com mutação em Ras 106

5 DISCUSSÃO 109

5.1 FGFs e queratinócitos humanos 109
5.1.1 Expressão de FGFRs em queratinócitos humanos 109
5.1.2 Expressão de FGFs por queratinócitos humanos 110
5.2 Efeitos de FGF2 em queratinócitos malignamente transformados com H-RasV12 e em linhagens humanas derivadas de tumores com mutação em Ras 111
5.3 A susceptibilidade da linhagem UM-UC-3 à toxidez de FGF2 115
5.4 Papel de PKC na resposta de queratinócitos HaCaT a PMA 116
5.5 O papel de ROS na resposta de queratinócitos a PMA 118
5.6 PMA em tumores humanos com Ras mutado 122

6 CONCLUSÕES 122

7 REFERÊNCIAS 124

APÊNDICE 135

SÚMULA CURRICULAR 139

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 SINALIZAÇÃO MITOGÊNICA DISPARADA POR FGF/FGFR **17**

FIGURA 1.2 PRINCIPAIS EVENTOS DA PROGRESSÃO NO CICLO CELULAR **25**

FIGURA 1.3 REAÇÕES DE ROS PRIMÁRIOS EM RESÍDUOS DE CISTEÍNA..... **38**

FIGURA 1.4 DIFERENCIAÇÃO DE QUERATINÓCITOS EPIDERMAIS **49**

FIGURA 4.1 QUERATINÓCITOS EXPRESSAM FGFR2, FGFR3 E FGFR4, SENDO FGFR3 O MAIS EXPRESSO **73**

FIGURA 4.2 QUERATINÓCITOS HACAT EXPRESSAM FGF1 E FGF2, MAS NÃO KGF..... **74**

FIGURA 4.3 FGFS ENCONTRAM-SE LOCALIZADOS NO CITOPLASMA DE QUERATINÓCITOS **75**

FIGURA 4.4 ATIVAÇÃO DA VIA DE ERK POR DIFERENTES FGFS..... **76**

FIGURA 4.5 FGF1, FGF2 E KGF ESTIMULAM PROLIFERAÇÃO DE QUERATINÓCITOS HACAT EM INTENSIDADES DIFERENTES **77**

FIGURA 4.6 INIBIDOR DA ATIVIDADE QUINASE DE FGFRS REVERTE O EFEITO DE FGFS..... **78**

FIGURA 4.7 FGF2 É CITOTÓXICO EM QUERATINÓCITOS COM H-RASV12 TRANSIENTEMENTE ATIVADO. **80**

FIGURA 4.8 CLONES HACAT ER:RASV12 TORNAM-SE INSENSÍVEIS A FGF2 APÓS ALGUMAS PASSAGENS..... **81**

FIGURA 4.9 CLONES TRANSFECTADOS COM PBABE ER:RASV12 NÃO APRESENTAM A SEQUENCIA DO INSERTO NO GENOMA..... **81**

FIGURA 4.10 CLONES DE CÉLULAS HACAT COM EXPRESSÃO CONSTITUTIVA DE H-RASV12 SÃO INSENSÍVEIS A FGF2..... **83**

FIGURA 4.11 CLONES DE CÉLULAS HACAT EXPRESSANDO H-RASV12 CONSTITUTIVAMENTE SÃO SENSÍVEIS A PMA **85**

FIGURA 4.12 ASPECTO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS HACAT CONTENDO VETOR VAZIO E CLONE HACAT H-RASV12 (HARAS1.5) CULTIVADAS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE PMA POR CINCO DIAS.... **86**

FIGURA 4.13 CLONES HACAT H-RASV12 SÃO SENSÍVEIS A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE PMA **87**

FIGURA 4.14 INIBIDORES DE PKC REVERTEM A SENSIBILIDADE DE QUERATINÓCITOS H-RASV12 A PMA **89**

FIGURA 4.15 PMA INIBE O CRESCIMENTO EM SUSPENSÃO DE AGAROSE DE CLONES HACAT H-RASV12 ..... **91**

FIGURA 4.16 CULTURA ORGANOTÍPICA DE CÉLULAS HACAT **93**

FIGURA 4.17 PMA INIBE PROLIFERAÇÃO E INDUZ O ACÚMULO DE CLONES H-RASV12 EM SUB-G1 .. **94**

FIGURA 4.18 A SENSIBILIDADE DE CLONES H-RASV12 A PMA JÁ É PERCEPTÍVEL EM 24H DE TRATAMENTO **96**

FIGURA 4.19 PMA INIBE POPULAÇÃO DE CLONES H-RASV12 SINCRONIZADOS EM G_0 A ENTRAR EM S APÓS REESTÍMULO. **97**

FIGURA 4.20 PMA DIMINUI POPULAÇÃO DE CLONE H-RASV12 SINCRONIZADOS EM G_0 A ENTRAR EM MITOSE APÓS REESTÍMULO **99**

FIGURA 4.21 CLONE HACAT H-RASV12 QUE APRESENTA BAIXOS NÍVEIS DE H-RAS-GTP NÃO É SENSÍVEL A PMA **101**

FIGURA 4.22 PMA INDUZ APOPTOSE EM HACAT H-RASV12 ..... **102**

FIGURA 4.23 PMA INDUZ AUMENTO DE ROS EM HACAT **104**

FIGURA 4.24 LINHAGENS HUMANAS COM MUTAÇÃO EM RAS APRESENTAM DIFERENTES RESPOSTAS A FGF2 E PMA **107**

FIGURA 5.1 MECANISMOS HIPOTÉTICOS PARA SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA AOS EFEITOS TÓXICOS DE FGF2 EM CÉLULAS DEPENDENTES DE RAS **114**

FIGURA 5.2 PERSPECTIVA ESQUEMÁTICA DOS SUGERIDOS MECANISMOS DE AÇÃO DE PMA EM QUERATINÓCITOS HUMANOS NORMAIS E MALIGNAMENTE TRANSFORMADOS COM H-RASV12 .... **121**

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. ESTUDOS COM CÉLULAS TUMORAIS INIBIDAS POR FGF2 ..... **44**

TABELA 2. ESTUDOS COM CÉLULAS TUMORAIS INIBIDAS POR PMA **47**

TABELA 3. LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS ORIUNDAS DA ATCC COM OS RESPECTIVOS MEIOS DE CULTURA **55**

TABELA 4. SEQUENCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS USADOS NAS REAÇÕES DE PCR **70**

TABELA 5. VALORES DE *P* DA ANÁLISE ESTATÍSTICA POR *TWO-WAY* ANOVA NA INTERAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS DA CURVA DE CRESCIMENTO DA FIGURA 4.5 ..... **77**

TABELA 6. LINHAGENS TUMORAIS HUMANAS COM MUTAÇÃO EM RAS SELECIONADAS PARA TESTE DE SENSIBILIDADE A FGF2 E PMA **106**

1 INTRODUÇÃO

Tumores surgem quando os mecanismos normais de controle da proliferação são genética ou epigeneticamente alterados, comprometendo a regulação de vias de sinalização. Diversas vias são ativadas por Ras e lesão oncogênica que torna essa proteína constitutivamente ativa é muito comum em um grande número de cânceres (Downward 2003), contribuindo significativamente para vários aspectos do fenótipo maligno, mas também conferindo vulnerabilidades específicas a essas células (Costa et al 2008; Liu et al 1998; Shaw et al 2011). Tais vulnerabilidades são potenciais alvos estratégicos de terapias anticâncer, daí a importância de bem estabelecer a combinação de vias e efeitos celulares que conferem fragilidade especificamente às células tumorais frente a agentes terapêuticos. Nesse sentido, esta tese explora, em células humanas, os efeitos de dois compostos que em nosso laboratório vimos ser mitogênicos para células murinas imortalizadas, mas que inibem a proliferação de células especificamente no contexto maligno conferido por Ras oncogênico: FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), um clássico fator de crescimento, e PMA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate*), éster de forbol largamente usado como promotor de tumor em ensaios de carcinogênese *in vivo* (seções 1.6 e 1.7, respectivamente).

Com o intuito de explanar o contexto teórico da problemática proposta, será abordado como a sinalização mitogênica (seção 1.1) normalmente dispara e promove a progressão no ciclo celular (seção 1.2). Posteriormente serão explorados os defeitos nessas vias que contribuem para a progressão maligna (seção 1.3), com destaque no oncogene Ras. Em seguida, serão abordados os mecanismos intrínsecos de supressão de tumor de que as células dispõem (seção 1.4), com ênfase em apoptose, processo que vimos ter participação

no efeito citotóxico de PMA especificamente em queratinócitos transformados com Ras oncogênico (seção 4.2.6, em resultados).

Na seção 1.5 é exposto o papel muitas vezes negligenciado das espécies reativas em sinalização, promoção e supressão de tumor, as quais mostraram ter provável envolvimento na vulnerabilidade de queratinócitos HaCaT H-RasV12 a PMA. Em seguida é descrita a estrutura, sinalização e atividade biológica de FGF2 e PMA (seções 1.6 e 1.7, respectivamente) e, por fim, alguns aspectos da diferenciação, função e da resposta a sinais externos de queratinócitos epidermais; nessa ocasião é apresentada a linhagem de queratinócitos HaCaT, utilizada na maior parte dos experimentos desta tese (seção 1.8).

1.1 Principais vias envolvidas em disparo mitogênico

A sinalização iniciada por FGF/FGFR, esquematizada na figura 1.1, foi escolhida para ilustrar a multiplicidade de vias ativadas a partir de um estímulo e como os eventos de inibição/ativação cruzada entre elas (*cross-talks*) são importantes para que o mesmo processo celular, no caso proliferação, seja alcançado de forma controlada. A maior parte dos proto-oncogenes codificam componentes dessas vias, especialmente do eixo Ras-Raf-MEK-ERK. Embora satisfaça seus objetivos no contexto desta tese, é importante ressaltar que o mapa estático apresentado nessa figura é simplista e ignora a real complexidade da sinalização intracelular: as células em seu ambiente comumente recebem vários sinais simultaneamente que são coordenados em uma dinâmica espaço-temporal. O local/momento preciso em que componentes de uma via são ativados/expressos ou inativados para propagação ou terminação do sinal são elementos cruciais na tomada de decisões entre os diversos processos celulares (Kholodenko et al 2010).

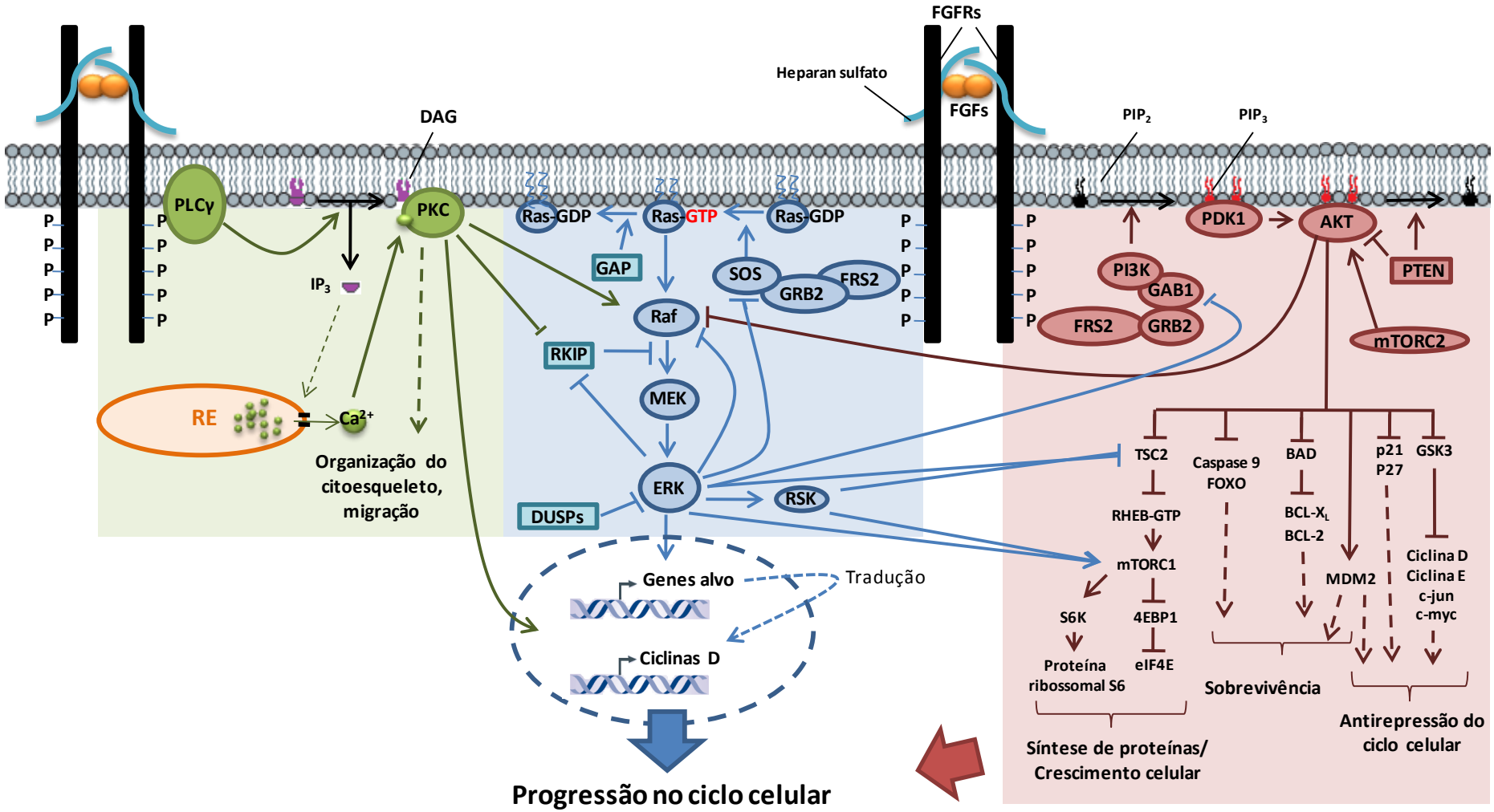


Figura 1.1 Sinalização mitogênica disparada por FGF/FGFR. O complexo formado por dois FGFs, duas cadeias de heparan-sulfato (presentes em heparan sulfato proteoglicanos inseridos na membrana – não mostrado) e dois FGFRs aproxima estreitamente seus domínios tirosina quinase levando a transfosforilação de tirosinas da região intracelular. Fosfo-tirosinas formam sítios de ancoragem para proteínas contendo domínio SH2. FRS2 (*FGFR substrate 2*) é fosforilada, criando novos sítios de ancoragem para outras proteínas adaptadoras, entre elas GRB2 (*Growth factor Receptor Bound protein 2*), a qual recruta SOS (*Son Of Sevenless*), uma GEF responsável pela ativação da via Ras/MAPK (em azul – seção 3.1.1); A via PI3K/AKT é ativada mediante GAB1 (*GRB2 Associated Binding protein 1*), em vermelho (seção 3.1.2). PLCγ liga-se diretamente a uma fosfotirosina C-terminal de FGFR, desencadeando a ativação de PKC (em verde – seção 3.1.3). Figura montada de acordo com as referências citadas no texto.

1.1.1 Via de ERK1/2

A via de ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase* 1/2) foi a primeira via de MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) a ser identificada. Receptores de fatores de crescimento, de citocinas e sinais originários de integrinas são capazes de ativá-la por meio de Ras ou Src quinase, recrutando quinases da família Raf (Raf-1, A-Raf, B-Raf) para ativar duas MEKs (Mitogen-activated protein kinase ERK Kinases), MEK1 e MEK2, as quais fosforilam duas ERKs, ERK1 e ERK2 (figura 1.1, em azul). Fosforiladas, ERK1/2 dimerizam e translocam para o núcleo onde regulam a atividade de fatores de transcrição como Elk, c-Fos, Ets e c-Jun. Esses genes de resposta primária induzem uma segunda onda de transcrição que envolve genes responsáveis pela transição $G_1 \rightarrow S$, acoplando o disparo da sinalização mitogênica à progressão no ciclo celular. ERKs também ativam alvos citoplasmáticos como a quinase ribossomal S6 (RSK) e proteínas do citoesqueleto. ERKs são a peças chave e central da via considerando-se que são poucos os substratos conhecidos para Raf (além de MEK) e não se conhecer outro substrato de MEK além de ERK (Shaul & Seger 2007).

Além de fosforilar múltiplos sítios inibitórios em Raf1, ERKs medeiam *feedback* negativo fosforilando SOS (*Son Of Sevenless*) e promovendo sua dissociação de Grb2 (*Growth factor Receptor Bound Protein 2*), o que foi visto ser importante para o comportamento oscilatório de sua atividade muitas vezes observado experimentalmente. Isso é reforçado pela alça de *feedback* positivo na qual ERK fosforila e inativa a proteína adaptadora RKIP (*Raf Kinase Inhibitory Protein*) (ver figura 1.1, em azul), a qual atua desfazendo a associação entre Raf1 e MEK (Shin et al 2009). PKC é capaz de fosforilar RKIP e liberá-la de Raf1, além de também promover fosforilações estimulatórias em resíduos de serina de Raf1 diretamente (Carroll & May 1994), o que evidencia a importância do *cross-talk* entre as duas vias

(Avraham & Yarden 2011). Por outro lado, AKT é capaz de inativar Raf1 via fosforilação da Ser259, seu principal sítio de inibição. Este sítio se encontra fosforilado em células quiescentes, mas é desfoforilado pelas fosfatases PP1 e PP2 (*Protein Phosphatases 1/2*) sob estímulo por fatores de crescimento (Avraham & Yarden 2011).

Hiperativação anormal de ERK normalmente induz aumento transcricional de $p21^{CIP1}$ resultando em parada no ciclo celular, um conhecido mecanismo supressor de tumor desencadeado por estresse oncogênico. Tumores que apresentam ERK constitutivamente ativado, como os com Ras ou B-Raf mutado, geralmente superam isso com a co-ativação da via PI3K/AKT. AKT ativado promove exportação de $p21^{CIP1}$ do núcleo para o citoplasma, onde é degradada via proteassoma (Chambard et al 2007). Esse é um dos vários exemplos de cooperação entre as vias de ERK e PI3K/AKT na tumorigênese. Além disso, o *cross-talk* entre elas ocorre em vários pontos (ver figura 1.1, em vermelho). Essas vias estão intimamente associadas, atuando e regulando conjuntamente no contexto normal.

Serina/Treonina (Ser/Thr) fosfatases, Tirosinas (Tyr) fosfatases e DUSPs (*Dual Specificity Phosphatases*) são responsáveis pela desfosforilação das quinases da via, passo importante para desensibilização e terminação do sinal. DUSPs são codificadas por genes de resposta imediata induzidas por ativação de ERK e constitui um mecanismo de *feedback* negativo transcricional (Avraham & Yarden 2011).

A Ras/Raf/MEK/ERK é o principal eixo de convergência de estímulos mitogênicos e onde se concentram importantes oncogenes. Mutações em Ras são umas das mais frequentes em cânceres (ver seção 1.3.2) e muitos outros tumores dependem de mutação ativadora em B-Raf, sendo que existem inibidores para esse oncogene em fase I e II de ensaios clínicos. Embora em menor frequência, também são encontrados tumores portando mutações pontuais em MEK e já existem drogas para essa quinase em teste (Wong 2009).

Além disso, as numerosas alças de *feedback* presentes nessa via têm implicações práticas na clínica e merecem atenção. Foi demonstrado recentemente que inibição de B-Raf leva a rápida ativação de EGFR, promovendo proliferação continuada do tumor. Essa inesperada alça de *feedback* proporcionou uma explicação lógica do porquê de cânceres de colon com mutação em B-Raf apresentarem pobre resposta a monoterapia com PLX4020 (inibidor de B-Raf), enquanto que em melanomas, que geralmente apresentam baixa expressão de EGFR, essa terapia é efetiva na maioria dos casos (Prahallad et al 2012).

1.1.2 PI3K/AKT

AKT foi originalmente identificado como o gene transformante do retrovírus AKT8, v-Akt. Posteriormente foi identificado seu homólogo humano, AKT1, o qual está implicado em crescimento celular (aumento em tamanho e massa proteica) e sobrevivência. Sua outra isoforma, AKT2, é altamente expressa em músculo e adipócitos e está associada à regulação da homeostase da glicose via insulina. A terceira isoforma, AKT3, tem distribuição mais restrita e é principalmente encontrada em testículo e cérebro. AKT é frequentemente referida como PKB (*Protein Kinase B*) por ser uma quinase relacionada à proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) (Hers et al 2011).

A atividade de AKT é induzida pela ativação de PI3K (*Phosphatidylinositol 3-Kinase*) em cascatas de sinalização mediadas por receptores de fatores de crescimento (ver figura 1.1, em vermelho). Disposta na membrana plasmática PI3K fosforila fostatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2) na porção 3'-OH do anel inositol para gerar o segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifostato (PIP_3). Esse fosfoinositídeo forma sítio de ancoragem para proteínas contendo domínio PH (*Plectrin Homology*), como AKT e PDK1 (*3-Phosphoinositide-*

Dependent protein Kinase 1), recrutando-as para a membrana. PDK1 fosforila AKT na Thr308, o que leva a mudança conformacional que permite sua ligação a substratos e aumenta sua taxa de catálise. AKT também é ativada por fosforilação na Ser473, a qual pode ser catalisada por várias outras quinases como PDK2, DNA-PK (*DNA-dependent Protein Kinase*) e mTORC2 (*mTOR Complex 2*) (Franke 2008; Vanhaesebroeck et al 2012).

Uma vez na membrana e duplamente fosforilada, AKT é capaz de ativar seus substratos-alvo (figura 1.1, em vermelho). A promoção do crescimento celular é predominantemente mediada pela via de mTORC1, regulador de tradução e biogênese de ribossomos. Sua ativação se dá pela fosforilação e consequente inibição de TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex*), uma GAP (proteína ativadora de GTPase) que inibe RHEB (*Ras Homolog Enriched in Brain*), forte ativador de mTORC1. Outras fosforilações inativadoras em proteínas pro-apoptóticas como caspase 9, fatores de transcrição FoxO (induz a transcrição das proteínas pro-apoptótica BIM e FasL) e BAD são responsáveis pelo papel de AKT na promoção de sobrevivência. Quanto à proliferação, além de atuar paralelamente à via de ERK promovendo crescimento e sobrevivência, AKT também atua diretamente na regulação do ciclo celular ao fosforilar os inibidores de CDKs (*Cyclin–Dependent Kinases*) $p21^{CIP1}$ e $p27^{KIP1}$ e promover sua translocação para o citoplasma, atenuando seus efeitos inibitórios na progressão do ciclo. A expressão de p21 também é inibida pela ativação de MDM2, inibidor de p53. GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), que promove fosforilação e consequente desestabilização de ciclinas D, E e dos fatores de transcrição c-jun e c-myc, é outro alvo de inativação por AKT. A fosfatase PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*), um modulador negativo da via PI3K/AKT que promove hidrólise de PIP_3, é uma proteína supressora de tumor, o que ressalta a importância dessa via na tumorigênese (Manning & Cantley 2007; Mendoza et al 2011).

1.1.3 PLCγ/PKC

Proteína-quinases C (PKC) são Ser/Thr proteína-quinases descobertas por Nishizuka e colaboradores (Takai et al 1977) e descrita por eles e outros pesquisadores no final da década de 70 e início de 80 pelo requerimento dos segundo mensageiros diacilglicerol (DAG) e Ca^{2+} para atividade. No entanto, estudos posteriores revelaram que PKC é uma grande família que inclui uma variedade de isoenzimas com atividades regulatórias muito diferentes. São classificadas em três subfamílias: PKCs clássicas, ativadas por Ca^{2+}, DAG e ésteres de forbol (cPKCs, subtipos α, βI, βII e γ); PKCs novas, não responsivas a Ca^{2+}, mas ativadas por DAG e ésteres de forbol (nPKCs, subtipos δ, ε, θ e η) e PKCs atípicas (aPKCs, subtipos ι e ζ), que são independentes de Ca^{2+}, DAG e requerem proteínas adaptadoras para sua atividade. PKCα, δ e ζ são amplamente expressas, enquanto as demais são tecido-específicas. A cadeia polipeptídica de membros dessa família apresenta domínios regulatórios N-terminais C1 e C2 (C=domínio conservado) e um domínio catalítico C-terminal. No domínio C1 existe uma sequência pseudosubstrato com função auto-inibitória que é capaz de ligar-se ao domínio catalítico, mantendo a enzima inativa na ausência de cofatores e ativadores (Griner & Kazanietz 2007; Rosse et al 2010).

Em consequência da estimulação de receptores de membrana, PLCγ (fosfolipase C gama) cliva o lipídeo de membrana fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PI-4,5-P_2) gerando o segundo mensageiro solúvel inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e DAG. IP_3 se liga a canais de cálcio na superfície de retículo endoplasmático, induzindo sua abertura e liberação de cálcio para o citoplasma. DAG liga ao domínio C1 de cPKCs e nPKCs, aumentando sua afinidade à membrana; no caso de cPKCs, a ligação de Ca^{2+} ao domínio C2 aumenta a afinidade de DAG ao domínio C1. A interação com lipídeos ácidos da membrana provê a energia necessária

para descolar o domínio pseudosubstrato do sítio ativo, ativando a quinase. PKC também sofre uma série de eventos de transfosforilação e autofosforilação em serinas e treoninas, as quais são requeridas para maturação, ativação e estabilidade. Além da translocação para a membrana, PKCs ativadas também são levadas a outras localidades sub-celulares específicas, o que é direcionado pela interação com proteínas de ancoragem tais como as RACKs (*Receptors for Activated C Kinase*) (Griner & Kazanietz 2007; Rosse et al 2010).

Apesar de originalmente terem sido consideradas como quinases pro-mitogênicas, seu papel depende da isoenzima envolvida e do tipo celular. Várias delas apresentam efeito anti-proliferativo como o caso de PKCα em células intestinais, pancreáticas e mamárias, além de agir como supressor de tumor no intestino. Por outro lado, a mesma isoenzima também foi visto ativar vias de sobrevivência e estimular proliferação em outros estudos. PKCδ é geralmente considerada como sendo pro-apoptótica. Sob (Griner & Kazanietz 2007; Reyland 2009) estímulo apoptótico, PKCδ pode translocar para a mitocôndria levando a liberação de citocromo c, clivagem de caspase 3 e geração de um fragmento catalítico constitutivamente ativo que leva a fosforilação de substratos nucleares. Também já foi observada secreção autócrina de fatores morte com ativação de via apoptótica extrínseca dependente da ativação de PKCδ via estímulo por ésteres de forbol. Opostamente, em vários tipos celulares, PKCε promove sobrevivência pelo aumento da ativação da via AKT e aumento de expressão dessa isoforma em cânceres tem sido associado à resistência a quimioterápicos. PKCβII é um importante mediador de angiogênese induzida por VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), além de estimular proliferação de células endoteliais. Isso ilustra as implicações dessas proteína-quinases em quase todos os aspectos da carcinogênese, tanto positivamente quanto negativamente. Mutações em PKCs são raras, mas expressão alterada

de isoenzimas, como superexpressão de PKCε e níveis reduzidos de PKCα e PKCδ, é observada em vários tipos de cânceres (Griner & Kazanietz 2007; Reyland 2009).

Apesar de PKC representar um alvo interessante para o desenvolvimento de terapias anticâncer, agentes terapêuticos direcionados a essas proteínas atualmente em teste estão sendo descartados em fase II e III de ensaios clínicos. Muitas dessas falhas foram atribuídas a não especificidade desses inibidores quanto à isoenzima e à complexidade de papéis das diferentes isoenzimas em diferentes contextos celulares. Potenciais agentes terapêuticos estão em desenvolvimento de forma a superar essas limitações (Mackay & Twelves 2007).

1.2 Controle do ciclo celular

Os elementos chave no controle do ciclo celular incluem CDKs (*Cyclin-Dependent protein Kinases*), ciclinas, e os inibidores de CDKs, as CKIs (*Cyclin-dependent protein Kinases Inhibitors*). Estes são componentes de um sistema oscilatório que perfazem funções específicas em cada fase. CDKs são serina treonina proteína-quinases ativadas pela associação a ciclinas, suas subunidades ativadoras, e por fosforilação. Mamíferos apresentam onze isoformas de CDKs, sendo que apenas cinco delas (CDK1, 2, 3, 4 e 6) intervêm diretamente no processo. Enquanto que a concentração intracelular de CDKs é constante, a concentração de ciclinas varia ao longo do ciclo, dessa forma ativando CDKs diferencialmente em momento preciso (figura 1.2). Elas também exercem funções independentes de CDKs, como interação direta com fatores de transcrição. Sua atuação é regulada por indução gênica, degradação via ubiquitinação, fosforilação (que as direciona para proteólise) e distribuição subcelular. CKIs se ligam ao complexo ciclina-CDK

reversivelmente, inibindo sua atividade. Essas proteínas pertencem a duas grandes famílias: a família CIP/KIP (p21, p27 e p57) e INK4 (p15, p16, p18 e p19). Os membros da família CIP/KIP se ligam principalmente aos complexos com CDK2, enquanto que os da família INK4 agem preferencialmente em complexos de CDK4 e 6 (Malumbres & Barbacid 2001; Obaya & Sedivy 2002).

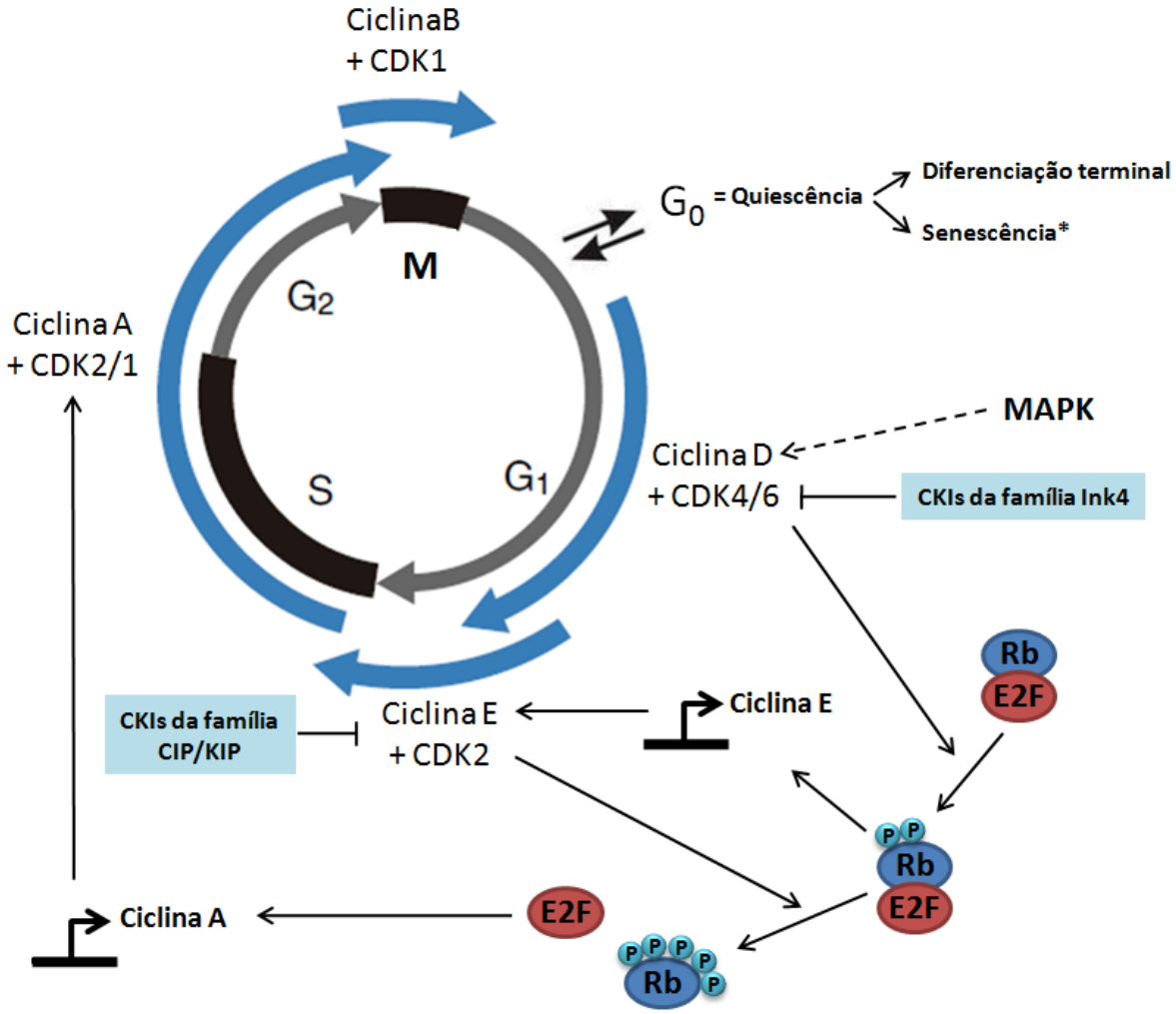


Figura 1.2 Principais eventos da progressão no ciclo celular. Sinais mitogênicos levam a expressão de ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3), as quais se ligam e ativam CDK4 e CDK6 durante G_1. Esse complexo promove a inativação parcial de proteínas da família pRb (pRb, p107, p130) por fosforilação, permitindo a expressão de ciclinas E (E1 e E2) mediada pelo fator de transcrição E2F. Ciclinas E interagem e ativam CDK2, cuja atividade é requerida para entrada em S e iniciação da replicação do DNA. CDK2/ciclina E promove fosforilações adicionais em proteínas pRb, inativando-as por completo. Isso permite a indução de genes responsivos a E2F que orientam a transição G_1/S e promovem o controle da replicação do DNA, tais como ciclina A, que interage e ativa CDK2 durante S e G_2. No final da intérfase, CDK1 é ativada por ciclinas A, facilitando a entrada em mitose. Essas ciclinas são degradadas e formam-se complexos CDK1/ciclina B, responsável por dirigir as células pela mitose. *Senescência é caracterizada por arresto irreversível no ciclo celular. Figura modificada de Matsumoto e Nakayama (2012).

Como ilustrado na figura 1.1 e 1.2, sob estímulo mitogênico genes de resposta imediata (fatores de transcrição) são primariamente induzidos pela via Ras/Raf/MEK/ERK. Isso gera uma segunda onda de transcrição de genes de resposta tardia, tais como ciclinas D, cuja estabilidade depende da inibição de GSK-3β (*Glycogen Synthase Kinase 3 beta*) mediada pela via PI3K/AKT. A ativação da via PI3K/AKT também promove aumento da taxa de síntese proteica e crescimento celular, requisito para passagem pelo ponto de restrição em G_1, após o qual células se comprometem irreversivelmente com a divisão celular, o que coincide com a fosforilação e inativação de proteínas da família Rb (*Retinoblastoma protein*) (Malumbres & Barbacid 2001).

A interação entre ciclinas e CDKs não é suficiente para sua completa ativação. Para isso, são requeridas fosforilações em resíduos conservados de treonina em CDKs. CAK (*CDK-Activating Kinase*), complexo formado por CDK7/ciclina H, é a quinase responsável por tais fosforilações e sua atuação é antagonizada pelas fosfatases KAP (*Kinase Associated Phosphatase*). Por outro lado, as quinases Wee1 e Myt1 promovem fosforilações inibitórias em tirosinas da região N-terminal das CDKs, antagonizadas por fosfatases da família CDC25 (*Cell Division Cycle 25*). Estas são substratos diretos de ciclinas/CDKs: ciclina E/CDK2 fosforila e ativa CDC25A na transição G_1/S, cuja atividade é necessária para a própria ativação do complexo ciclina E/CDK2, criando uma alça de *feedback* positivo; CDC25C também está envolvida em uma alça regulatória semelhante envolvendo ciclina B/CDK1 e a quinase Plk na entrada em mitose (Obaya & Sedivy 2002).

A proteólise de componentes do ciclo celular é o mecanismo regulatório que garante a irreversibilidade e direcionamento dos eventos, marca característica e essencial para o controle do processo. Dois complexos E3 ubiquitina ligases são responsáveis por marcar proteínas para degradação proteassômica em momentos precisos: *SKP-Cullin-F-box* (SCF),

que atua no final de G_1, em S e início de G_2; e *Anaphase-Promoting Complex* (APC), que atua no final de G_2 e é responsável pela transição para mitose. Seus alvos incluem ciclinas, CKIs, E2F, fosfatases CDC25, entre outros (Obaya & Sedivy 2002).

Pontos de checagem (*checkpoints*) detectam possíveis defeitos durante a síntese de DNA (*checkpoint* de replicação) e segregação cromossômica (*checkpoint* de montagem do fuso mitótico). Sua ativação promove arresto no ciclo permitindo o reparo desses defeitos. Além disso, insultos genotóxicos ativam *checkpoints* de dano no DNA, mediados pelas proteínas ATM/ATR que fosforilam CHK1 e CHK2 (*Checkpoint Kinase 1/2*). Em G_1 e em S, CHK1/2 ativam p53, levando à transcrição da CKI $p21^{CIP1}$, que inibe o complexo ciclina E/CDK2, resultando em parada no ciclo celular. CHK1/2 também modulam negativamente fosfatases CDC25, levando a uma rápida inibição do complexo ciclina/CDK correspondente. Se o reparo do defeito não tem sucesso, células podem entrar em senescência ou sofrer apoptose (Kastan & Bartek 2004; Malumbres & Barbacid 2009).

1.3 A transformação maligna

O termo tumorigênese ou carcinogênese se refere ao processo pelo qual alterações genéticas acumulam em células normais permitindo seu crescimento descontrolado. Os múltiplos passos ou estágios da carcinogênese correspondem a vários fenótipos pré-neoplásicos e neoplásicos clínicos que inclui hiperplasia, displasia, anaplasia ou desdiferenciação e metástase. Todo o processo geralmente tem origem de uma célula "iniciada" espontaneamente ou por um carcinógeno. A subpopulação resultante precisa ainda adquirir um conjunto de características para tornarem-se malignas: sinalização proliferativa sustentada, evasão dos supressores de crescimento, ativação da invasão e

metástase, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, resistência a morte celular, reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição imunológica. Estas são as conhecidas marcas do câncer (*hallmarks of cancer*) propostas por Hanahan e Weinberg com o intuito de racionalizar todo o complexo fenômeno da transformação maligna e criar um quadro lógico para entender a diversidade das neoplasias. Tumores não devem ser considerados meramente uma massa de células cancerígenas, mas são tecidos complexos compostos de vários tipos celulares que interagem entre si. Células normais também participam ativamente da tumorigênese, constituindo o estroma associado ao tumor e contribuindo em alguns aspectos do câncer (Duesberg & Li 2003; Hanahan & Weinberg 2011).

Os genes mutados ou alterados epigeneticamente em cânceres podem tanto ser oncogenes, cuja ativação leva a ganho de função de vias de sinalização ligadas a tumorigênese, quanto podem ser genes supressores de tumor, que quando não alterados desempenham função regulatória negativa nas vias mitogênicas e controle do ciclo celular. A seguir está apresentada a principal proteína supressora de tumor em mamíferos, p53, e um dos principais oncogenes em cânceres, Ras.

1.3.1 A proteína supressora de tumor p53

Mutações em p53 ou perturbações em sua rede regulatória são o tipo mais frequente de alterações em cânceres humanos, presentes em mais da metade deles. Denominada como “guardiã celular” ou “guardiã do genoma”, p53 é ativada por diversos tipos de insultos celulares como dano no DNA, estresse oncogênico e estresse oxidativo e dispara uma série de sinais que levam à parada da proliferação, reparo do DNA, senescência, apoptose,

diferenciação, autofagia ou também, mais recentemente reportado, necrose (Menendez et al 2009; Vaseva et al 2012). A família de p53 inclui também as proteínas p63 e p73, as quais compartilham a estrutura global que inclui domínio de transativação N-terminal, domínio de ligação ao DNA na região central e domínio de oligomerização C-terminal. Proteínas da família de p53 funcionam primariamente como fatores de transcrição tetraméricos, embora desempenhem também funções independentes de transcrição (Stiewe 2007).

Desde sua descoberta em 1979 (Chang et al 1979; DeLeo et al 1979; Linzer & Levine 1979), inúmeros mecanismos de regulação foram descritos para p53. Ela é primariamente reprimida por proteólise mediada por MDM2 (*Murine double minute 2*), uma E3-ubiquitina ligase de alta especificidade. MDMX, proteína estruturalmente relacionada a MDM2, reprime a transcrição induzida por p53, mas não induz sua degradação. Ambas formam um complexo e reprimem sua função. A liberação de p53 desse complexo requer acetilação em lisinas específicas ou fosforilação em determinados sítios. Para ativação de promotores, p53 recruta e interage com inúmeros cofatores, o que muitas vezes também requer modificações pós-traducionais como fosforilação, acetilação, metilação, sumoilação e nedilação. A combinação exata entre essas modificações e a interação com cofatores é o que define o destino das células. Seus principais alvos transcricionais incluem alguns de seus repressores tais como MDM2 e Pirh2 (mecanismo regulatório por *feedback* negativo), a CKI p21 e proteínas pro-apoptóticas PUMA, BAX, NOXA e outras, cuja transcrição requer todos seus coativadores e modificações pós-traducionais tendo em vista a irreversibilidade da apoptose (Kruse & Gu 2009).

A maioria das mutações em p53 presentes em tumores humanos é do tipo *missense* com alteração em um único aminoácido e ocorre predominantemente em resíduos do domínio de ligação ao DNA, afetando sua habilidade de interação sequência-específica. Os

efeitos de mutações em p53 não se limitam apenas à perda de sua função supressora de tumor, mas pode ocorrer também ganho de função. Muitos mutantes são capazes de ligar e inativar p63 e p73, proteínas que epistaticamente poderiam recapitular seus efeitos biológicos normais. Eles podem atuar também como dominantes negativos, inativando p53 selvagem codificado pelo alelo não mutado. Dessa forma, essa proteína supressora de tumor pode adquirir mutações que lhes confere atuação ativa, em vez de apenas ter um papel passivo como mutantes inertes (Oren & Rotter 2010).

1.3.2 O oncogene Ras

A descoberta do oncogene Ras veio com observações da propriedade transformante dos retrovírus de sarcoma murino de Harvey e Kirsten no final da década de 70 e início da década de 80. Essa propriedade foi atribuída a um conjunto de genes denominados *ras* (*rat sarcoma*). Homólogos celulares desses oncogenes virais foram posteriormente descobertos no genoma de rato, de camundongo e humano, sendo o gene associado ao sarcoma vírus de Harvey denominado H-ras e o associado ao sarcoma vírus de Kirsten denominado K-ras. O terceiro membro da família, N-Ras, foi posteriormente descoberto em linhagens de neuroblastomas e leucemias (Karnoub & Weinberg 2008). Hoje a superfamília de Ras abrange muitas outras proteínas, sendo todas pequenas GTPases regulatórias monoméricas (de 20-40 KDa), divididas em cinco famílias com base na sequencia e similaridade funcional: as Ras/Rap, Rho/Rac, Rab, Ran e Arf/Sar. Essas proteínas regulam processos celulares como crescimento, diferenciação, morfogênese, rearranjos do citoesqueleto, adesão, motilidade e tráfego de vesículas (Rojas et al 2012).

Na família de Ras estão inclusas GTPases como Rab, R-Ras, Ral e Rheb, além das proteínas Ras propriamente ditas, os membros fundadores. Estas são codificadas por três genes ubiquamente expressos e altamente relacionados, H-RAS, K-RAS e N-RAS, dando origem a quatro diferentes isoformas; o gene para K-RAS dá origem a duas delas por *splicing* alternativo: K-Ras4A e K-Ras4B. Essas proteínas são comumente mutadas em cânceres humanos, sendo tais mutações presentes em cerca de 30% de todos os tumores sólidos. De acordo com o banco de dados COSMIC (*Catalog of Somatic Mutations in Cancer*) (Forbes et al 2011) K-Ras é o mais frequentemente mutado (22%), seguido por N-Ras (8%) e por H-Ras (3%). *In vitro* é bem conhecido que o oncogene Ras induz senescência de células primárias por meio da ativação das vias supressoras de tumor p53/p21^{CIP1} e/ou p16^{INK4A}/Rb. A transformação maligna requer uma iniciação prévia, que inclui inativação dessas vias (Karnoub & Weinberg 2008).

Ras são proteínas transdutoras de sinais, sendo as vias de MAPK, PI3K e as proteínas Ral seus principais alvos *downstream*. Elas sofrem ciclos de ativação e inativação dirigidos principalmente pela taxa de câmbio GDP/GTP e pela taxa de hidrólise de GTP. Sua regulação se dá por fatores de troca de nucleotídeos guanina (GEFs- *Guanine nucleotide Exchange Factors*), os quais promovem dissociação de GDP e ligação a GTP, e proteínas ativadoras de GTPases (GAPs – *GTPases-Activating Proteins*), as quais aceleram a hidrólise de GTP mediada por Ras. As mutações que tipicamente ocorrem em cânceres, no códon 12, 13 ou 61, favorecem a estabilização da forma ligada a GTP, o que consequentemente leva a produção de um *pool* de proteínas Ras constitutivamente ativas que transmitem um sinal dominante (Prior et al 2012; Pylayeva-Gupta et al 2011). Um número crescente de evidências sugere que diferentes mutações nesses alelos afetam sua oncogenicidade. Estudos realizados em animais, cultura de células e amostras humanas sugerem que a presença de Cys no alelo 12

está associada a uma baixa atividade transformante, enquanto que a presença de Val e Asp está associada a propriedades oncogênicas mais agressivas (Miller & Miller 2011). Além disso, existe um padrão de incidência de ativação/mutação de Ras que predomina em determinados tipos de câncer: mutações em H-RAS são associadas a tumores de pele e de cabeça e pescoço; mutações em K-RAS são frequentemente encontrados em tumores coloretais, carcinoma de pulmão e carcinomas pancreáticos; mutações em N-RAS são mais comuns em malignidades hematopoiéticas (Pylayeva-Gupta et al 2011).

A estrutura geral das proteínas Ras consiste de um núcleo hidrofóbico de seis folhas beta e cinco alfa hélices interconectadas por dez *loops*. Cinco deles estão intimamente envolvidos na afinidade a GTP e em sua hidrólise. Dentre outros aminoácidos, Gln61 está presente em um desses *loops* e sabidamente estabiliza o estado de transição da hidrólise de GTP a GDP, além de participar da orientação do ataque nucleofílico no fosfato-γ de GTP. Dessa forma, mutações nesse resíduo reduzem a taxa intrínseca de hidrólise de GTP. Já mutações nos resíduos 12 e 13 impedem a formação de ligações de *van der Waals* entre Ras e GAP, além de interferir com a orientação correta do resíduo Gln61 (Karnoub & Weinberg 2008; Pylayeva-Gupta et al 2011).

As quatro isoformas de Ras são mais de 90% idênticas nos primeiros 168-169 aminoácidos (domínio G), mas são altamente divergentes nos 20 aminoácidos C-terminais, conhecidos como HVR (*HiperVariable Region*). Para sua ancoragem à membrana, proteínas Ras sofrem farnesilação e palmitoilação na HVR, o que é requisito para sua atividade. Além disso, essas proteínas sofrem diversas outras modificações pós-traducionais como fosforilação, nitrosilação, ubiquitinação e isomerização peptidil-prolil. Em conjunto elas são requeridas para o tráfego e localização de Ras dentro da célula e algumas até mesmo afetam a taxa de troca GTP/GDP. Apesar de já se passarem três décadas desde a descoberta de Ras

como um oncogene, até hoje não foram desenvolvidos agentes terapêuticos efetivos direcionados a Ras. As vias de modificações pós-traducionais são atualmente um dos alvos terapêuticos mais promissores nesse sentido (Ahearn et al 2012; Downward 2003).

1.4 Mecanismos intrínsecos de supressão de tumor

O surgimento de células com mutações potencialmente perigosas e/ou proliferação celular aberrante pode acionar mecanismos celulares de defesa como indução de morte celular por apoptose ou autofagia. Programas que levam a parada no ciclo celular como senescência ou até mesmo diferenciação podem também ser acionados com esse mesmo intuito. Aliás, suportado por várias evidências, a habilidade de contornar essas vias é considerada a principal barreira que o câncer precisa superar.

Autofagia é primariamente um processo celular de sobrevivência no qual organelas são degradadas em lisossomos para reciclagem de aminoácidos e energia, ativado em resposta a privação de nutrientes ou outros estresses. Quando totalmente executado, pode resultar em morte celular. Esse processo tem sido largamente relacionado ao câncer, sendo estimulado por supressores de tumor e inibido por proto-oncogenes. Além disso, defeitos em alguns de seus mediadores celulares são associados ao desenvolvimento de neoplasias. Enquanto que antagonicamente a indução de autofagia representa também um mecanismo de sobrevivência de determinados tumores a agentes anticâncer, sua indução excessiva potencialmente resulta na eliminação dessas células (Chen & Karantza-Wadsworth 2009; Dikic et al 2010).

A marca característica da senescência é a parada irreversível no ciclo celular geralmente disparada em resposta a estímulos oncogênicos. Células senescentes geralmente

adotam uma morfologia alargada e exibem atividade de beta-galactosidase associada à senescência (SA-β-Gal). Além disso, muitas vezes passam a expressar a CKI $p16^{INK4a}$, a qual orquestra a formação de heterocromatina associada à senescência (SAHF) que por sua vez silencia genes requeridos na progressão do ciclo celular. Células senescentes adquirem também um fenótipo secretório (SASP – *Senescence Associated Secretory Phenotype*), liberando citocinas, fatores de crescimento e proteases. Essa característica confere à elas função de comunicar dano celular e disfunções aos tecidos circundantes, além de participação nos processos de reparo e regeneração. SASP também está associada a diversas características do envelhecimento do organismo (Rodier & Campisi 2011). Além disso, muitos agentes quimioterápicos já foram reportados induzindo senescência em tumores, estando associado ao sucesso no tratamento. O desenvolvimento de drogas direcionadas a indução de senescência em vez de morte celular pode oferecer uma alternativa de menor toxidez (Collado & Serrano 2010).

O processo de diferenciação remove as células se sua atividade proliferativa, mas as mesmas ainda se mantêm íntegras e funcionais. Dessa forma elas podem assumir uma função mais especializada sem ter que gastar energia no dispendioso processo de divisão celular. Além de seu papel essencial na constituição de tecidos e órgãos, o programa de diferenciação pode também ser acionado para prevenir a proliferação de células danificadas e manter a estabilidade genômica do organismo. Embora pouco referido, este é um relevante mecanismo supressor de tumor durante o desenvolvimento e provavelmente opera também no organismo adulto. Há terapias que fazem uso de agentes que induzem diferenciação em tumores, por exemplo, o tratamento de leucemia promielocítica aguda com o uso de retinóides. Inibidores de histona deacetilases e agonistas de PPARγ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*) também têm se mostrado efetivos em induzir

diferenciação (e consequentemente parada no ciclo celular) em tumores sólidos (Cruz & Matushansky 2012; Stiewe 2007).

1.4.1 Apoptose

O termo apoptose, do grego, significa “queda de folhas” é um programa de morte celular de múltiplas vias e passos, responsável pelo controle do número de células durante o desenvolvimento e também no organismo adulto. Em média, o corpo humano adulto gera aproximadamente 60 bilhões de células por dia; um número igual precisa morrer por apoptose para a manutenção da homeostase. Esse tipo de morte celular é também um dos principais mecanismos de defesa anticâncer (Cotter 2009).

Dano no DNA, defeitos na sinalização e outros estresses intracelulares são capazes de induzir via apoptótica mitocondrial. Esta é conhecida como via intrínseca e é a mais frequentemente usada pelas células. Caracteristicamente, há participação de proteínas pro-apoptóticas da família BCL-2, como BAD, BID, BAX e BIM, bem como permeabilização da mitocôndria com consequente liberação de citocromo c para o citoplasma, o qual se associa com Apaf1 e caspase 9 para formar o apoptosoma. Já as vias extrínsecas são ativadas por proteínas sinalizadoras (os “ligantes morte”) por meio de receptor de membrana e são principalmente usadas durante o desenvolvimento embrionário e pelo sistema imune.

Embora exista apoptose independente de caspases, estas proteases desempenham papel central na maioria dos casos. As caspases iniciadoras (caspase 8 na via extrínseca e caspase 9 na intrínseca) são as primeiras a serem ativadas após estímulo apoptótico e são responsáveis pela clivagem e consequentemente ativação das caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), as quais por sua vez clivam os “substratos morte”: a lâmina nuclear, o que leva a

condensação da cromatina e encolhimento do núcleo; inibidor da DNase CAD; ICAD (outro fator de fragmentação do DNA); substratos que levam a liberação de endonucleases; proteínas citoplasmáticas como actina, plectrina, Rho quinase 1 (ROCK1) e gelsolina, responsáveis pela fragmentação celular e formação de corpos apoptóticos (Igney & Krammer 2002).

A ativação dos substratos morte leva às mudanças morfológicas típicas de células apoptóticas, como encolhimento da célula, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e celular. Dentre as alterações bioquímicas, muitas delas usadas como marcadores de apoptose, estão a fragmentação do DNA, externalização do lipídeo de membrana fosfatidilserina da face interna para a externa (sinal de reconhecimento para células fagocíticas engolfarem as apoptóticas), atividade de caspases, a detecção de quebras únicas no DNA e perda de potencial de membrana mitocondrial (Galluzzi et al 2012; Perl et al 2005).

1.5 Espécies reativas de oxigênio, sinalização e câncer

Espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) historicamente têm sido consideradas agentes patológicos que podem reagir e danificar macromoléculas biológicas como o DNA, proteínas e lipídeos. No entanto, um crescente número de relatos tem demonstrado que a produção endógena desses agentes redox é finamente regulada e que constitui importante mecanismo sinalizador. Flutuações transientes de espécies reativas têm função regulatória, enquanto que quando presentes em níveis altos e sustentados podem resultar em estresse oxidativo. O aumento de ROS suscita um amplo espectro de respostas, desde proliferação, migração, parada do crescimento, senescência ou morte. O

destino vai depender do tipo celular, da magnitude da dose e de sua duração (Halliwell 2007; Martindale & Holbrook 2002). Há muito tempo já é conhecida a importância da geração de ROS em organelas especializadas como fagossomos (usados para matar patógenos) em células especializadas do sistema imune, e peroxissomos, onde ocorrem reações de oxidação catabólica. Mais recentemente foi demonstrado o incrível papel da sinalização redox em processos fisiológicos como o ciclo circadiano, atuando há bilhões de anos nos mais diversos organismos (Dickinson & Chang 2011; Edgar et al 2012).

Superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singleto ($^1O_2$), peróxidos lipídicos (ROOH), ozônio (O_3) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) são umas das principais espécies reativas de oxigênio em sistemas vivos. As células fazem uso de sistemas naturais para combater o acúmulo dessas espécies reativas, incluindo moléculas não enzimáticas como glutationa, vitaminas A, C, D, E e flavonóides, bem como enzimas superóxido dismutases (SOD – *Superoxide dismutases*), catalases, peroxiredoxinas (Prx), tioredoxinas (Trx) e glutationa peroxidases (GPx). A função destas como participantes ativos da sinalização redox é um tema emergente. Como exemplo, a proteína ASK1 (*Apoptosis Signal-regulated Kinase 1*) normalmente encontra-se ligada a Trx por meio de pontes dissulfeto, mas sob estresse oxidativo, Trx é oxidada e subsequentemente dissociada de ASK1. Na forma livre, ASK1 pode induzir seus efetores *downstream* tais como JNK e p38-MAPK, requeridos para morte celular. No mesmo sentido, Prxs podem ligar e modular a atividade de diversas proteínas como receptor de andrógeno, c-Abl, JNK e PTEN, além de participarem na modulação do ciclo circadiano (Dickinson & Chang 2011; Finkel 2011; Martindale & Holbrook 2002).

Fisiologicamente, ROS podem ser geradas na mitocôndria pela imperfeição do fluxo de elétrons da cadeia de transporte de elétrons, resultando na geração ocasional de H_2O_2 e

$O_2^{\bullet-}$. No retículo endoplasmático as glicoproteínas Ero1, que iniciam a formação de pontes dissulfeto para enovelamento de proteínas, utilizam O_2 como aceptor de elétrons, gerando um equivalente de H_2O_2 para cada ponte dissulfeto catalisada. Em membranas celulares, as NADPH oxidases (Nox) e as Duox (Dual oxidases) constituem uma das principais fontes de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 fisiológico. Outras fontes de produção de ROS incluem enzimas intracelulares como xantina oxidase, ciclooxigenases, citocromo p450 e lipoxigenases, que produzem oxidantes como parte de sua função enzimática normal (Dickinson & Chang 2011; Finkel 2011).

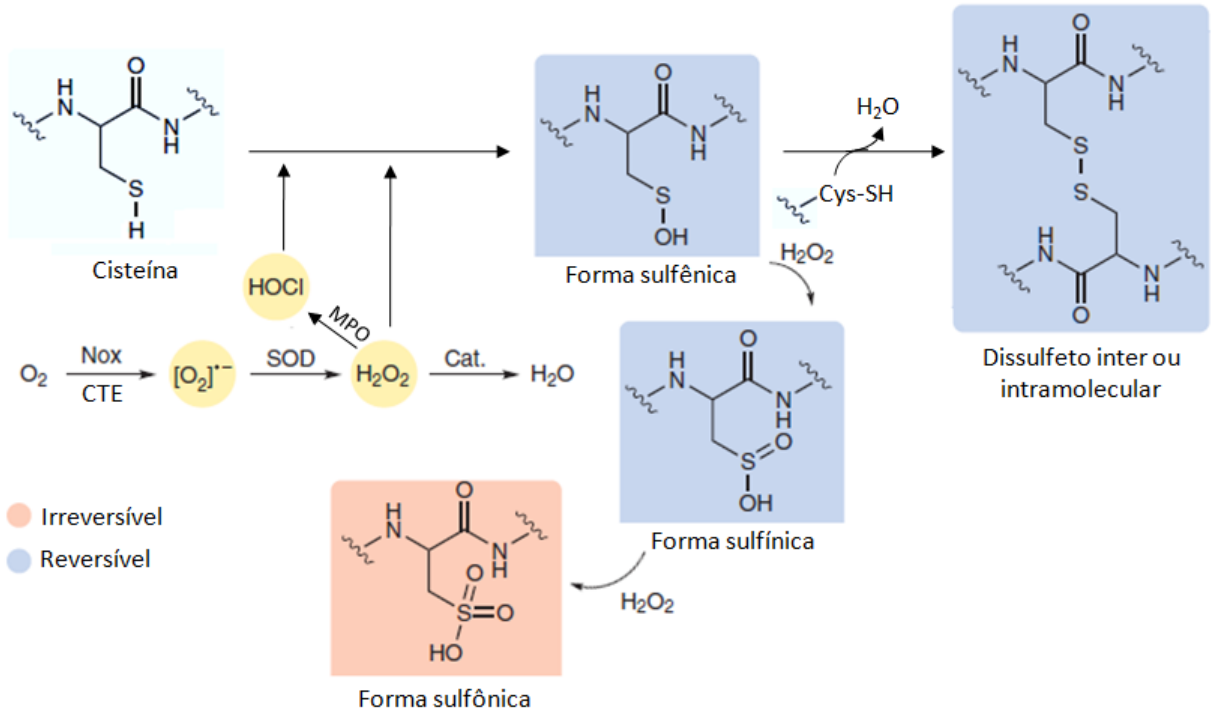


Figura 1.3 Reações de ROS primários em resíduos de cisteína. Redução de um elétron de oxigênio molecular, tanto na cadeia de transporte de elétrons (CTE) ou via NADPH oxidases (Nox), gera superóxido ($[O_2]^{\bullet-}$), o qual é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD) ou por dismutação espontânea em solução aquosa. A enzima mieloperoxidase (MPO) pode converter H_2O_2 a ácido hipocloroso (HOCl), altamente reativo. Tióis de resíduos de cisteína em proteínas podem ser oxidados via ataque nucleofílico de H_2O_2 ou HOCl, levando à geração de forma sulfênica (RSOH), à formação de ligação dissulfeto intra- ou intermolecular ou de espécies sulfínicas (RSO_2H); sob grande estresse oxidativo pode haver também geração de espécies sulfônicas (RSO_3H). Para os produtos de oxidação em azul sabidamente existem vias que revertem sua modificação redox, enquanto que o produto em vermelho é irreversivelmente modificado. Figura modificada de Dickinson e Chang (2012).

Quando geradas em níveis mais altos, espécies reativas de oxigênio podem promover modificações pós-traducionais em proteínas redox-sensíveis, sendo a principal delas a oxidação de grupos tiol de cisteínas (figura 1.3) (Finkel 2011).

O papel de oxidantes na sinalização celular começou com observações, na década de 90, de que produção de H_2O_2 era essencial para a sinalização mitogênica normal, o que foi posteriormente atribuído à inibição de fosfatases como PTEN e PTB-1 (moduladoras negativas de vias mitogências) por oxidação de determinados resíduos de cisteína. Outras moléculas sinalizadoras são também alvos diretos de espécies reativas. Além disso, a localização subcelular de fatores de transcrição como Nrf2 e FoxO, os quais ativam a expressão de vários genes antioxidantes, é alterada de acordo com o estado redox da célula. (Dickinson & Chang 2011).

O desequilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes pode levar a estados patológicos como o câncer. Níveis aumentados de ROS ativam vias de proliferação e sobrevivência como ERK/MAPK e PI3K-AKT e níveis muito aumentados podem promover oxidação de cisteínas críticas em p53, inibindo sua atividade transcricional. Aumento no potencial metastático de tumores já foi observado pela modulação de proteínas como ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Protein-1*), metaloproteases e proteínas sinalizadoras como Rac-1. ROS também podem induzir a produção de fatores angiogênicos e inflamatórios e favorecer quimioresistência, aumentando os níveis de antioxidantes pela ativação transcricional de Nrf2. De fato, alguns tumores malignos *in vivo* apresentam estado oxidativo mais elevados do que células normais (Halliwell 2007; Mates et al 2008).

Por outro lado, a administração de antioxidantes em pacientes com câncer é controverso. Em estudo clínico com câncer de cabeça e pescoço, após tratamento radioterápico tumores tenderam a reincidir com administração de β-caroteno e α-tocoferol

(Bairati et al 2005). Em outros testes clínicos, a administração de antioxidantes em fumantes aumentou o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão (Albanes et al 1996; Omenn et al 1996). Muitos dos agentes quimioterápicos correntemente em uso causam estresse oxidativo nos tumores, o que parece contribuir tanto para seus efeitos anticâncer quanto para alguns efeitos colaterais. Quando melhor entendermos os mecanismos de ação de espécies reativas em sistemas biológicos, a determinação do *status* oxidativo dos tumores poderá guiar na escolha do tratamento mais adequado em cada caso (Halliwell 2007).

1.5.1 NADPH oxidases

NADPH oxidases (Nox) são classicamente conhecidas como importantes produtores de ROS na eliminação fagocítica de patógenos durante a resposta imune. A descoberta de uma vasta gama de isoformas em praticamente todo tipo celular sugeriram que essas enzimas tinham papéis mais gerais. Hoje se sabe que desempenham importantes funções fisiológicas em mamíferos modulando vias se sinalização redox-sensíveis, mas que estão também associadas a doenças como aterosclerose, hipertensão, artrite, Alzheimer, síndromes respiratórias e câncer (Jiang et al 2011).

O domínio catalítico das NADPH oxidases (Nox) são glicoproteínas integradas à membrana que possuem na metade N-terminal seis α-hélices transmembranares coordenadas por dois grupos heme e, na metade C-terminal, domínio citoplasmático com sítios de ligação a NAD(P)H e FAD. Atualmente em mamíferos são conhecidos sete membros dessa família: Nox1-5 e as oxidases duais (*Dual oxidases*) Duox1 e 2. As Nox 1, 2, 3 e 5 produzem $O_2^{\bullet -}$ a partir de oxigênio molecular juntamente com a oxidação de NAD(P)H, enquanto que Nox4 e as Duox produzem H_2O_2 (Jiang et al 2011; Takeya & Sumimoto 2006).

O esqueleto do complexo NADPH oxidase de fagócitos é formado pelo citocromo p558, que consiste em duas subunidades de Nox2 ($gp91^{phox}$) e pela proteína de membrana $p22^{phox}$. Sob ativação, uma subunidade organizadora, a $p47^{phox}$, e uma ativadora, a $p67^{phox}$, bem como a pequena GTPase Rac1, translocam para a membrana a ativam o citocromo p558. Nox1 também forma complexo com $p22^{phox}$, mas torna-se ativo na presença da subunidade organizadora Noxo1 (isoforma de $p47^{phox}$) e da ativadora Noxa1 (isoforma de $p67^{phox}$). Nox3 complexa com $p22^{phox}$, mas é capaz de produzir $O_2^{\bullet -}$ sem subunidade organizadora ou ativadora, embora sua atividade possa ser aumentada na presença de $p47^{phox}$ e Noxo1. Nox5 é ativada por Ca^{2+} e ativação de Nox4 ainda é pouco conhecida. Em células fagocíticas, bem como em alguns outros tipos celulares, PKC medeia fosforilação de $p47^{phox}$, essencial para ativação de NADPH oxidase. O sistema Nox pode também ser regulado transcricionalmente sob diversos estímulos (Jiang et al 2011; Takeya & Sumimoto 2006).

1.6 FGFs

FGFs (*Fibroblast Growth Factors* - FGFs) são fatores de crescimento de ação intrácrina, parácrina, autócrina e/ou endócrina que apresentam uma grande diversidade de atividades biológicas de suma importância no desenvolvimento embrionário e metabolismo, além de patologias como o câncer. A família de FGFs possui 22 membros agrupados em sete subfamílias, todos compartilhando um núcleo homólogo de 120-130 aminoácidos organizados em 12 folhas beta antiparalelas, flanqueadas por amino e carboxiterminais divergentes, os quais geralmente conferem as diferenças biológicas entre eles. Quatro membros, FGF11-14, são incapazes de ligar receptores transmembrana, mas desempenham

ação intrácrina, regulando intracelularmente a função de canais de sódio voltagem dependentes. FGF19, FGF21 e FGF23 funcionam endocrinamente regulando a homeostase de ácido biliar, colesterol, glicose, vitamina D e fosfato. FGFs de ação parácrina têm um sítio de ligação a heparan sulfato glicosaminoglicano (HSGAG); FGFs endócrinos apresentam cristas nesse mesmo sítio que reduz estericamente a ligação a HSGAG e isso lhes permite circular sistemicamente. (Beenken & Mohammadi 2009; Itoh & Ornitz 2011).

Dezoito membros da família de FGFs são capazes de ligar e ativar quatro receptores tirosina quinase altamente conservados, os FGFRs (*Fibroblast Growth Factor Receptors*). Existe ainda um quinto receptor relacionado, o FGFR5, também conhecido como FGFRL1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor Like 1*), o qual não apresenta domínio tirosina quinase intracelular e parece desempenhar apenas função regulatória negativa sobre os demais receptores. FGFR1-FGFR4 contêm três domínios semelhantes a imunoglobulinas (DI, DII e DIII) na porção extracelular, com uma região ácida entre os domínios I e II (*acid box*). O domínio I e o *acid box* têm importante papel na autoinibição do receptor. Já os domínios II e III consistem no sítio de ligação ao ligante. DIII dos receptores FGFR1-3 pode sofrer *splicing* alternativo gerando isoformas com diferentes especificidades de ligação: IIIb ou IIIc. As primeiras são predominantes em células de origem epitelial e as últimas em células mesenquimais. Em seguida há o domínio transmembranar e o domínio tirosina quinase intracelular que transmite o sinal para o interior da célula (Wesche et al 2011).

FGFs ligam a polissacarídeos carregados negativamente via interação eletrostática e por outros mecanismos ainda não conhecidos. Heparan sulfato proteoglicanos (HSPG) inseridos na membrana protegem FGFs de degradação e também medeiam a ligação FGF-FGFR. A sinalização disparada por essa via está esquematizada na figura 1.1. Outras proteínas como RSK2 (p90 *Ribosomal protein S6 Kinase 2*), STATS (*Signal Transducers and*

Activators of Transcription) e Src podem também ser diretamente ativadas por FGFRs (Turner & Grose 2010; Wesche et al 2011).

FGF2 foi originalmente isolado de extrato de pituitária e identificado como mitógeno (Armelin 1973). FGF2 age paracrinamente e está envolvido em uma diversidade de efeitos biológicos como cicatrização de feridas, angiogênese, hematopoiese e neuroproteção. Existe também uma série de evidências da participação de FGF2 no desenvolvimento de tumores. Ele já foi encontrado superexpresso em melanomas, câncer de próstata, câncer de mama, sendo até mesmo detectado no plasma de alguns pacientes com câncer. A secreção parácrina de FGF2 por células tumorais pode estimular células endoteliais e induzir angiogênese. FGF2 também foi relacionado à resistência a quimioterapia por regular positivamente vias anti-apoptóticas e de sobrevivência (Turner & Grose 2010). Apesar de contra-intuitivo, FGF2 já foi também relatado inibindo o crescimento de linhagens de células tumorais, induzindo morte, senescência ou até mesmo diferenciação (tabela 1). Seu mecanismo supressor de tumor nesses casos, se bem estabelecido, pode resultar na identificação de alvos terapêuticos interessantes e talvez nunca antes descritos.

Em nosso laboratório, foi demonstrado que FGF2 inibe irreversivelmente a proliferação de células de camundongo malignas dependentes de Ras, enquanto que antagonicamente estimula a proliferação de células murinas imortalizadas (Costa et al 2008). O efeito antiproliferativo de FGF2 foi observado tanto na linhagem de células malignas Y1 (Yasumura et al 1966), derivada de carcinoma adrenocortical de camundongo, que exibem um fenótipo maligno dependente da amplificação do proto-oncogene K-Ras; e também em células B61 (Kovary et al 1989), fibroblastos murinos 3T3 transfectados com H-RasV12. Nessas células, o estresse promovido por FGF2 mostrou ser dependente da atividade de RhoA, de Src e da atividade tirosina quinase de FGFR, mais especificamente FGFR1 (Costa et

al 2008; Salotti 2009). Interessantemente, a seleção de clones de Y1 resistentes a FGF2 resultaram em raras sublinhagens caracterizadas pela perda da superexpressão de K-Ras, baixa tumorigenicidade e dependência de FGF2 para crescimento (Matos 2007). Isso sugere que FGF2 dispara um robusto mecanismo supressor de tumor em células malignas murinas dependentes de Ras.

Tabela 1. Estudos com células tumorais inibidas por FGF2.

Linhagens	Origem	Constatações gerais	Referência
CG-1	Carcinoma nasofaríngeo humano	FGF2 exógeno, bem como FGF2 autosecretado, provoca inibição dose dependente da proliferação de CG-1 via FGFR1.	Chen *et al*. (1995)
MCF-7	Carcinoma de mama humano (metástase pleural)	FGF2 estimula a proliferação de MCF-7, enquanto que inibe o crescimento de MCF-7 transfectadas com v-H-ras, efeito associado à ativação sustentada de MAPK.	Liu *et al*. (1998)
MDA-MB-134	Carcinoma ductal de mama humano	MDA-MB-134 expressa altos níveis de mRNA de FGFR1 e FGFR4 e seu crescimento é inibido por FGF1 ou FGF2. OBS: nessa linhagem já foi descrita mutação ativadora em K-Ras (Prosperi et al 1990).	McLeskey *et al*. (1994)
SK-N-MC	Neuroepitelioma humano	FGF2 atrasa a progressão no ciclo celular em G2 por prevenir a fosforilação de CDC25C e consequente ativação de CDC2; seus efeitos são similares a ativação de *checkpoint* de dano no DNA.	Smits *et al*. (2000)
Várias linhagens	Tumores humanos da família sarcoma de Ewing	FGF diminui a proliferação de células de sarcoma de Ewing, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, induzindo apoptose e necrose.	Sturla *et al*. (2000)
HSY	Adenocarcinoma salivar humano	Restauração da expressão de FGFR2 IIIb diminui os níveis de fosforilação de FRS2 sob estímulo com FGFs, promovendo diferenciação e apoptose de células HSY.	Zhang *et al*. (2001)
Várias linhagens	Tumores humanos da família sarcoma de Ewing	FGF2 induz apoptose de forma caspase-dependente e p53-independente dessas células, provavelmente via modulação positiva de receptor morte.	Westwood *et al*. (2002)
SK-GMS	Tumor de Askin humano	FGF2 inibe o crescimento, induz diferenciação neuronal e apoptose de células SK-GMS, com redução de expressão de Bcl-2 e ativação de caspase-3; Há participação das vias ERK1/2 e JNK no fenômeno.	Kim *et al*. (2004)
RCS	Condrosarcoma de rato	FGF2 promove parada de crescimento se células RCS em G_1 com envolvimento da via FGFR/Ras/ERK; sob seu estímulo ocorre também indução transcricional de ciclina D1, acúmulo de p21 (CIP1) e de p27 (KIP1).	Krejci *et al.* (2004)
Y1	Tumor de adrenocortex de camundongo	FGF2 promove transição $G_1 \rightarrow S$, mas induz um bloqueio irreversível de células Y1 no ciclo celular, efeito dependente de Ras e de RhoA.	Costa *et al*. (2008)

Quanto aos efeitos no ciclo celular, ao mesmo tempo que FGF2 estimula a progressão $G_0/G_1 \rightarrow S$, ele também induz atraso na fase S e bloqueio irreversível na fase G_2 do ciclo de células Y1. Embora promova arresto em G_2, observamos que FGF2 induz o crescimento celular em termos de massa e volume, aumentando os níveis de proteínas/célula. Além disso, por espectrometria de massa foi visto que FGF2 induz aumento de expressão de proteínas relacionadas à síntese protéica e de estresse proteotóxico. Em conjunto esses resultados sugerem que FGF2 ataca especificamente células malignas murinas dependentes de Ras ao afetar a homeostase de proteínas e induzir estresse proteotóxico (Dias 2012).

1.7 PMA

O éster de forbol PMA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate*), também conhecido como TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*), é um diterpeno originalmente isolado do óleo da semente da planta *Croton tiglium* (família Euphorbiaceae), sendo de grande interesse em pesquisa por sua atividade promotora de tumor em modelo de carcinogênese em pele de camundongos (Goel et al 2007; Griner & Kazanietz 2007).

Promotores de tumor não são carcinogênicos por si, mas promovem rápido crescimento de tumores quando administrados cronicamente à pele de um animal previamente tratada com um composto mutagênico (iniciador). O iniciador altera irreversivelmente as células tratadas enquanto o efeito do promotor é reversível. O promotor permite e aumenta o desenvolvimento de tumores benignos ou papilomas por expansão clonal das células iniciadas, que podem posteriormente progredir para carcinomas (Goel et al 2007; Griner & Kazanietz 2007).

A propriedade promotora de tumor ou cocarcinogênica de óleo da semente de cróton já é conhecida desde o início da década de 40, junto com o estabelecimento dos primeiros protocolos de modelo de carcinogênese *in vivo* (Goel et al 2007). Em 1977, Nishizuka e colaboradores fizeram as primeiras descrições da proteína quinase C (PKC) (Takai et al 1977), o que hoje é considerado um marco na pesquisa em transdução de sinais. Aproximadamente no mesmo período, muitos pesquisadores investiam esforços em desvendar os mecanismos moleculares da promoção de tumor induzida por PMA, até que foram descritas as características cinéticas de um receptor celular para esse composto (Delclos et al 1980; Driedger & Blumberg 1980), que posteriormente foi reconhecido como sendo PKC (Castagna et al 1982; Nishizuka 1984). Esta foi a primeira evidência sólida do envolvimento de uma proteína quinase em carcinogênese (Griner & Kazanietz 2007). Com o avanço das investigações, foi sugerido que ésteres de forbol apresentam ação pleiotrópica, agindo como promotor de tumor em células iniciadas e induzindo ou inibindo diferenciação em determinadas populações (Jetten 1989; Lotem & Sachs 1979).

Além de PKC, várias outras proteínas com domínio C1 (ver seção 1.1.3) apresentam os requerimentos estruturais para ligação a ésteres de forbol e DAG, como proteína quinase D, GEFs do tipo RasGRPs (*Ras Guanyl nucleotide-Releasing Proteins*), quimerinas, diacilglicerol quinases (DGKs) e Munc13, proteínas que participam de vias mitogênicas, de motilidade, sobrevivência e diferenciação. Dessa forma muito cuidado deve ser tomado na hora de interpretar efeitos não dependentes de PKC disparados por ésteres de forbol (Griner & Kazanietz 2007).

São numerosos e diversos os relatos de ésteres de forbol inibindo células tumorais. Os primeiros deles datam do final da década de 70 e início da década de 80 em células leucêmicas mielóides e de câncer de mama (Huberman & Callaham 1979; Lotem & Sachs

1979; Osborne et al 1981). Esses estudos observam uma relação direta entre tal inibição e a atividade promotora de tumor de diferentes ésteres de forbol. Em seguida, um número crescente de estudos vem descrevendo efeitos inibitórios (diferenciação, apoptose, senescência) de ésteres de forbol em células tumorais de vários tipos (tabela 2).

Tabela 2. Estudos com células tumorais inibidas por PMA.

Linhagens	Origem	Constatações gerais	Referência
HL-60	Leucemia promielocítica humana	Ésteres de forbol com atividade promotora de tumor inibem crescimento e induzem diferenciação mielóide de células HL-60.	Huberman e Callaham (1979)
MCF7, BT20, SKBR3, MDA-MB-231, MDA-MB-453	Câncer de mama humano	PMA induz apoptose independente de p53, com aumento de expressão de p21 (CIP1) e Bax. Tal toxidez de PMA se mostrou mais acentuada em linhagens com maior habilidade metastática.	Li *et al.* (1998)
DanG, AsPc, Panc1, Capan2	Câncer de pâncreas	Sob estímulo com PMA, PKC alfa é ativada, desencadeando parada permanente em G_1 por indução de p21, inibição de CDK2 e hipofosforilação de pRb.	Detjen *et al.* (2000)
LNCap	Câncer de próstata	Aumento sustentado de atividade de JNK e ativação de caspases são requeridos para apoptose induzida por PMA em células LNCap.	Engedal *et al.* (2002)
BGC-823	Câncer gástrico humano	Via PKC, PMA promove aumento de expressão transcricional de Nur77, bem como sua translocação para a mitocôndria com conseqüente liberação de citocromo c e iniciação de apoptose em células BGC-823.	Wu *et al*. (2002)
D04, D08, MM127, MM455	Melanoma humano	PMA e PEP005, outro éster de forbol, induzem senescência via ativação de PKC e de MAPK, com aumento de expressão de p21 (CIP1), desfosforilação de pRb e silenciamento transcricional de E2F-1; a susceptibilidade a esses ésteres de forbol requer presença de mutação ativadora em NRAS ou BRAF e baixos níveis de HREV107, um inibidor de MAPK.	Cozzi *et al*. (2006)
H358 e H441	Câncer de pulmão	Tratamento com PMA em células no início de G_1 impede a progressão em S e induz parada em G_1 mediada por PKC delta, aumento de p21, hipofosforilação de Rb e modulação negativa de ciclina A; células tratadas no final de G_1 ou em S sofrem parada permanente em G2/M, seguido de senescência, efeito mediado por PKC alfa também via aumento de expressão de p21.	Nakagawa *et al.* (2005) Oliva *et al*. (2008)

Em nosso laboratório, observamos que PMA tem efeito citotóxico em células Y1 e B61, linhagens murinas malignas dependentes de Ras, descritas na seção anterior (1.6). Por outro lado, esse éster de forbol não afeta a viabilidade de células murinas imortalizadas. Além disso, o efeito citotóxico de PMA foi visto ser dependente da atividade de PKC (Matos 2007). Os esforços em detalhar os mecanismos moleculares envolvidos nesses efeitos são de grande relevância, principalmente considerando que PMA esteve em fase I de teste clínico para cânceres hematológicos (Han et al 1998; Schaar et al 2006; Strair et al 2002).

1.8 Queratinócitos e a linhagem celular HaCaT

A epiderme, camada mais externa da pele, é constituída na maior parte por queratinócitos, que formam um epitélio escamoso estratificado (figura 1.4). Queratinócitos da camada basal são capazes de proliferar, expressam queratinas 5 e 14 (K5 e K14) e apresentam expressão polarizada de integrina α6β4. Queratinócitos suprabasais não mais proliferam, mas ainda são metabolicamente ativos. As células da camada espinhosa, que possuem esse nome por apresentar numerosos desmossomos, possuem um padrão diferente de expressão de queratinas: agora há o predomínio das queratinas K1 e K10, as quais formam filamentos de citoesqueleto que se agregam em finos feixes, os tonofilamentos. Além disso, células dessa camada depositam proteínas de envelope, como involucrina, na superfície interna da membrana plasmática. A camada subsequente, a granular, contém células com numerosos grânulos lipídicos que são liberados no espaço intercelular. Elas investem na síntese de proteínas como filagrina, uma proteína básica rica em histidina envolvida na fusão dos tonofilamentos para formar largos cabos macrofibrilares, além de expressar loricrina, o principal componente proteico do envelope

cornificado. Por último, a camada córnea é composta de queratinócitos terminalmente diferenciados, que são agora meramente esqueletos celulares, compondo uma barreira insolúvel que eficientemente que protege a pele contra desidratação e ataque de microorganismos (Fuchs 1990).

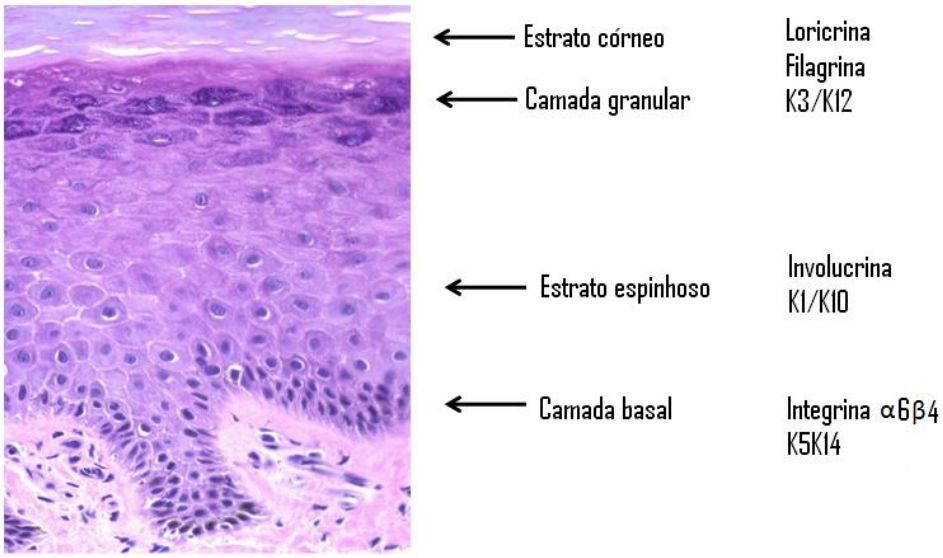


Figura 1.4 Diferenciação de queratinócitos epidermais. Imagem histológica do glossário *online* de dermatologia da Universidade da Califórnia (UCSF).
(http://missinglink.ucsf.edu/lm/DermatologyGlossary/epidermis.html)

Queratinócitos também desempenham papel ativo na defesa imunológica do corpo. Uma vez sofrida injúria na epiderme, queratinócitos se tornam "ativados" e passam a sintetizar fatores de crescimento e citocinas como TNFα (*Tumor Necrosis factor alpha*), TGFα (*Transforming Growth Factor alpha*), IL-1 (*Interleukin-1*), IL-3 (*Interleukin-3*), IL-6 (*Interleukin-6*), IL-8 (*Interleukin-8*), G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*), GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*) e M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*), que produzem efeitos de quimiotaxia em leucócitos, efeitos parácrinos em linfócitos, fibroblastos e células endoteliais e efeitos autócrinos (Tomic-Canic et al 1998).

Entre os fatores de crescimento, queratinócitos sabidamente respondem a EGF (*Epidermal Growth Factor*) proliferando, degradando componentes da matriz extracelular e tornando-se migratórios. Queratinócitos são também responsivos a outros fatores de crescimento como FGFs, PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), IGF (*Insulin-like Growth Factor*), NGF (*Nerve Growth Factor*), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) e TGF-β (*Transforming Growth Factor Beta*), responsáveis pelo intricado balanço entre proliferação e diferenciação da epiderme (Fuchs & Raghavan 2002; Hashimoto 2000). Dentre os FGFs, FGF7, também conhecido como KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) foi descrito pela primeira vez por Rubin *et al*. (1989) como um fator de crescimento específico de células epiteliais e hoje ele é considerado um dos mais potentes estimuladores de queratinócitos. Anos depois foi descoberto um novo membro da família de FGF, o FGF10 (ou KGF2) cuja especificidade e atividade mitogênica assemelha-se ao FGF7 (Emoto et al 1997; Yamasaki et al 1996).

A linhagem de queratinócitos HaCaT, utilizada na maior parte dos experimentos desta tese, tem origem de células da periferia distante de um melanoma da costa de um homem adulto. Trata-se de uma linhagem imortalizada espontaneamente, com alto poder proliferativo, que não desenvolvem tumores *in vivo* e não crescem em suspensão de agarose. Foram inicialmente isoladas e mantidas em meio de cultura com baixas concentrações de cálcio (0.2 mM) e altas temperaturas, daí seu nome, *Human adult skin keratinocytes propagated under low* Ca^{2+} *conditions and elevated Temperature* (HaCaT). Nas primeiras passagens essas células ainda mantinham-se sensíveis a alterações das condições de cultura originais, mas após cerca de 10 passagens desenvolveram independência tanto de alterações na concentração de cálcio quanto de temperatura, sendo desde então cultivadas em meio com altas concentrações de cálcio (1.4 mM) (Boukamp et al 1988). Essa linhagem é considerada um bom modelo para estudos de queratinócitos de pele por manter muita de

sua capacidade de diferenciação *in vivo*, como observado em transplantes subcutâneos em camundongos atímicos *nude* (Breitkreutz et al 1998), quanto em ensaios feitos em monocamada de células *in vitro* (Deyrieux & Wilson 2007; Micallef et al 2009). Em cultura organotípica, HaCaT chega a desenvolver *rafts* com alto grau de diferenciação, mas apresenta deficiências na formação de estrato córneo (Schoop et al 1999). Por ser de facilmente transduzida com vetor retroviral e expressar Ras oncogênico ectopicamente sem sofrer senescência, essa linhagem mostrou-se bastante adequada para os objetivos desta tese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Nos últimos anos nosso laboratório relatou que linhagens celulares murinas malignas dependentes de Ras oncogênico (K-Ras e H-Ras) são vulneráveis à ação citotóxica de ambos FGF2 e PMA, por mecanismos moleculares diferentes, mas ainda não totalmente esclarecidos. O objetivo geral desta tese foi verificar se estes efeitos citotóxicos de FGF2 e PMA também ocorrem em linhagens celulares humanas, cujo fenótipo maligno é dependente de Ras oncogênico.

2.2 Objetivos específicos

- A partir da linhagem HaCaT de queratinócitos humanos imortalizados, desenvolver sublinhagens malignas de queratinócitos por transformação celular com H-Ras oncogênico através de transdução com vetor retroviral contendo construções de expressão induzível (ER:HRasV12) e também de expressão constitutiva. Constatar se a susceptibilidade à toxidez de FGF2 e PMA condicionada por superativação de Ras se estende também a células humanas;
- Testar a linhagem parental HaCaT e suas sublinhagens transformadas por H-RasV12 para respostas a FGF2 e PMA, determinando os mecanismos celulares (proliferação, progressão/parada no ciclo, morte) e moleculares (vias de sinalização diferencialmente ativadas) envolvidos nesses fenômenos.

- Testar a toxicidade de FGF2 e PMA em treze linhagens celulares derivadas de tumores humanos naturais que carregam mutações ativadoras em H-Ras, N-Ras e K-Ras, certificadas pela ATCC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Técnicas de cultura de células eucarióticas

3.1.1 Subcultivo

A linhagem de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizada HaCaT (Boukamp, 1988), gentilmente cedida pela pesquisadora Dra Luisa Lina Villa (na época a serviço do Instituto Ludwig), a linhagem humana HEK293 (Graham et al 1977), B61, fibroblastos de camundongo 3T3 transfectados com H-RasV12 (Kovary et al 1989), A31 (Aaronson & Todaro 1968) e células empacotadoras anfotróficas Φnix foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) em 10% de soro fetal bovino (SFB) e com os antibióticos sulfato de estreptomicina (100 mg/L) e ampicilina (25 mg/L). Para subcultura, células HaCaT foram lavadas com PBSA-EDTA (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 anidro; KH_2PO_4 1,5 mM; 0,68 mM EDTA – solução com pH 7,2) enquanto que as demais foram lavadas em PBSA (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na_2HPO_4 anidro; KH_2PO_4 1,5 mM – solução com pH 7,2), tratadas com tripsina e, após se destacarem da placa, ressuspendidas em DMEM com 10% de SFB para então serem distribuídas em garrafas ou placas, as quais foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2. Da mesma forma se procedeu com as linhagens tumorais humanas obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection* – Manassas, VA, EUA), sendo que para cada célula foi usado o meio de cultura próprio, indicado na tabela 3. Para carenciamento e sicronização na fase G_0 do ciclo celular, as células foram incubadas com meio sem soro por 48h.

Queratinócitos primários humanos de prepúcio de recém-nascidos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV (células E6E7), cedidos pela pesquisadora Luisa Lina Villa, foram cultivadas em meio KSFM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com extrato de pituitária bovina e EGF. Para subcultura as células foram lavadas com PBSA-EDTA, tratadas com tripsina e, após se destacarem da placa, ressuspendidas em DMEM com 10% de SFB, centrifugadas em velocidade branda por 5 min e então ressuspendidas em KSFM para depois serem distribuídas em garrafas ou placas, as quais são mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2.

Tabela 3. Linhagens tumorais humanas oriundas da ATCC com os respectivos meios de cultura.

Linhagem	Meio de cultura
Calu-1	McCoy's 5a Modified; 10% SFB
Capan-1	Iscove's Modified Dulbecco's Medium; 20%SFB
UM-UC-3	Eagle's Minimum Essential Medium (MEM); 10% SFB
HCT-15	RPMI-1640; 10%SFB
Hs 578T	DMEM; 0.01 mg/ml bovine insulin; 10%SFB
NCI-H1915	RPMI-1640; 10%SFB
HTB-4	McCoy's 5a Medium Modified
RL95-2	DMEM:F12; 0.005 mg/ml insulin; 10% SFB
NCI-H1299	RPMI-1640; 10%SFB
HT-1197	MEM; 10% SFB
SK-MEL-2	MEM; 10% SFB
CHP-212	MEM:F12; 10% SFB
Hep G2	MEM; 10% SFB

3.1.2 Ensaio clonogênico

Para ensaio clonogênico, foram plaqueadas cerca de 200 células por cm^2 em placa de 35mm (Corning Inc., Corning, NY, EUA) ou em placa de 6 poços em meio completo na presença de tratamentos na concentração adequada para cada experimento. O meio é renovado a cada 2 ou 3 dias, na presença ou ausência de tratamento, conforme indicado,

até o momento da fixação. Após a formação de colônias visíveis (10 a 15 dias), as células foram fixadas em formaldeído 3,7% por 15 min e coradas em violeta genciana (0,1%) por 5 min.

3.1.3 Curvas de crescimento

Para curva de crescimento foram plaqueadas cerca de 20.000 a 50.000 células por cm^2 em placas de 35 mm ou placas multipoços de seis, doze ou vinte e quatro poços (Corning Inc., Corning, NY, EUA), conforme indicado, sendo que os estímulos foram feitos de acordo com cada experimento. As células foram fixadas diariamente ou a cada 2 a 3 dias: lavadas em PBSA-EDTA, tratadas com 300 µl de tripsina por cerca de 5 minutos e posteriormente foi adicionado 600 µl de PBSA-EDTA e 100 µl de formaldeído a 37%. O número de células por ml foi determinado por contagem em contador de partículas (Z2 counter Beckman Coulter®). O meio com tratamentos, dependendo do experimento, foi trocado diariamente ou a cada 2 a 3 dias até finalizar a coleta de todos os pontos.

3.1.4 Ensaio clonogênico em suspensão de agarose

Em placas de 24 poços foi distribuída, em cada poço, 0,5 ml de uma solução de agarose na concentração final de 0,6% preparada com DMEM com 10 % de SFB, sendo deixada a temperatura ambiente até solidificação. Em seguida foi adicionado 1 ml de suspensão de células (10.000 células por poço em cada tratamento), ressuspendidas em agarose na concentração final de 0,3% preparada em DMEM com 10% de SFB. As placas foram deixadas por cerca de 1h a temperatura ambiente para solidificação da agarose e

posteriormente incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO_2. No dia seguinte foi adicionado 0,5 ml de meio de cultura com os devidos tratamentos, nos respectivos poços. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera com 5% de CO_2 por cerca de 2 meses ou até as colônias se tornarem visíveis a olho nu, sendo o meio de cultura trocado a cada 2 ou 3 dias. Após esse período as colônias foram fixadas em formaldeído 3,7%. Foram escolhidos cinco pontos aleatórios em cada poço e as colônias foram contadas por toda a profundidade da agarose.

3.1.5 Transdução com vetor retroviral

Para produção de vetor retroviral, a linhagem de células empacotadoras anfotróficas Φnix foi transfectada com pBaBepuro H-RasV12 com Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O sobrenadante de cultura de células empacotadoras Φnix após 6h, 24h e 72h da transfecção foi coletado e misturado, sendo diluído 1:2 em meio fresco, adicionado polibreno para concentração final de 8 µg/ml e usado para a transdução das células-alvo. Estas foram expostas ao meio de transdução por 6h, sendo este então trocado por meio fresco. As células transduzidas foram incubadas por mais 24h para só então ser adicionado o antibiótico de seleção puromicina a 1 µg/ml ou geneticina (600 µg/ml). As células foram mantidas nessas condições até formarem colônias (cerca de 7 dias) e estas foram transferidas para poços de placa de 96 poços com auxílio de anel de clonagem. Após confluírem, as células foram passadas para garrafa de cultura pequena, sendo cultivadas até ficarem próximas de confluir. Parte das células foi congelada e outra parte usada para repiques e ensaios.

3.1.6 Cultura organotípica de queratinócitos (*raft culture*)

Para preparação do equivalente dérmico, foi misturado meio Ham's F12 dez vezes concentrado em 10% do volume final, tampão de reconstituição (2,2% $NaHCO_3$, 0,05 M NaOH, 200 mM HEPES) em 10%, suspensão de fibroblastos A31 a $1,33x10^5$ células/ml em soro fetal bovino 5% e colágeno tipo I de cauda de rato (BD Biosciences - Franklin Lakes, New Jersey, EUA) no restante do volume. Rapidamente (para evitar a solidificação do colágeno), foram distribuídos 0,75 ml dessa preparação em poços de placa de 24 poços. As placas foram deixadas a temperatura ambiente por 1h e posteriormente foi adicionado meio RCM (*Raft Culture Medium*), o qual é composto de DMEM:F12 3:1, 10% SFB, 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 0,5 µg/ml de apo-transferrina, 0,5 ng/ml de EGF, 5 µg/ml de insulina e 0,1 nM de toxina colérica. Após 4h em estufa, o meio foi removido, sendo adicionado 1 ml de suspensão com $5x10^5$ queratinócitos/ml por cima do equivalente dérmico.

No dia seguinte, o meio de cultura foi removido e, com auxílio de espátula, descolou-se o colágeno das bordas do poço, adicionando 1 ml de RCM e incubando a cultura em estufa a 37ºC por algumas horas até que o colágeno tenha retraído. O *raft* foi então transferido para grades de aço inoxidável previamente dispostas em poços de placa de seis poços. Os mesmos foram preenchidos com RCM de forma que apenas o equivalente dérmico tenha contato com o meio, deixando a superfície com queratinócitos em contato com o ar. Dessa forma os rafts foram incubados em estufa a 37ºC por nove dias, trocando-se o meio com devidos tratamentos em dias alternados.

3.2 Imunofluorescência

Células foram distribuídas sobre lamínulas em placa de 12 poços. No dia seguinte foram fixadas em formaldeído 3,7% por 10 minutos e depois mantidas em etanol a 70% (4-8°C) por pelo menos 24h. As células foram permeabilizadas em 0,1% de TritonX-100 por 5 minutos. As lamínulas foram então lavadas três vezes em PBS (KCl 2,7 mM; NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 anidro 8 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; $CaCl_2.2H_2O$ 0,68 mM; $MgCl.6H_2O$ 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 1 a 2h em câmara úmida. Posteriormente as lamínulas foram lavadas três vezes em PBS e incubadas com anticorpo secundário ligado a rodamina por 30 minutos em câmara úmida. As lamínulas foram então lavadas uma vez em PBS, incubadas com 5 µg/ml de DAPI por 5 minutos, lavadas três vezes em PBS e finalmente montadas em lâminas para visualização no microscópio de imunofluorescência Olympus BXS1.

3.3 Citometria de fluxo

3.3.1 Incorporação de BrdU e ciclo celular

Nos ensaios de incorporação de BrdU, depois de adicionados os devidos tratamentos para cada condição, as células foram incubadas com 50 µM de BrdU (bromo-deoxiuridina) pelo período determinado para cada experimento, conforme indicado. Estas foram destacadas da placa com auxílio de tripsina e lavadas uma vez com PBS. Para desnaturação do DNA, elas foram ressuspendidas em solução de HCl 2M e 0,5% de Tween-20 preparado

na hora, incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos sob leve agitação e protegido da luz. Cada amostra foi lavada uma vez em PBS, centrifugada e neutralizada em uma solução de tetraborato de sódio ($Na_2B_4O_7$) 0,1 M pH 8,5. Foi feita mais uma lavagem em PBS, sendo as células ressuspensas em 100 µl de solução contendo anticorpo anti-BrdU conjugado a Alexa488 na diluição de 1:100 em PBS. Cada amostra foi incubada por 1h (protegida da luz) e lavada uma vez em PBS.

Para marcação de DNA total, as células foram ressuspendidas em solução contendo 50 µg/ml de iodeto de propídio (PI) e RNaseA a 100 µg/ml e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente para serem realizadas as leituras em citômetro de fluxo FACSAria (BD Biosciences - Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o programa Cyflogic versão 1.2.1.

3.3.2 Marcação de células mitóticas

Após sincronizadas em G_0 e estimuladas conforme indicado no experimento, as células foram fixadas em etanol a 70% por pelo menos 24h a 4°C, lavadas 3 x em TBS (10 mM Tris base pH 8,0; 150 mM NaCl 0,1%) e permeabilizadas em 0,1% de TritonX-100 por 5 minutos. Foram posteriormente lavadas 3 x em TBS, ressuspendidas em 400 µl de BSA (*Bovine Serum Albumine* – albumina sérica) a 1% em TBS e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente para bloqueio de antígenos inespecíficos. Posteriormente as amostras foram lavadas uma vez com TBS, incubadas por 1h com 0,02 µg/ml do anticorpo para histona-H3 fosforilada diluído em TBS. As amostras foram novamente lavadas 3 x em TBS, incubadas com anticorpo secundário conjugado a alexa488, diluído em TBS a 1:500 por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas 3 x em TBS e submetidas a citometria de fluxo

FACSAria (BD Biosciences - Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o programa Cyflogic versão 1.2.1.

3.3.3 Ensaio de atividade de Caspases 3/7

Para identificação de células positivas para atividade das caspases efetoras 3/7, o reagente CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen) foi incubado por 30 minutos, na concentração final de 2 µM, em meio de cultura de células previamente tratadas nas condições indicadas para cada experimento. Posteriormente as células foram destacadas das placas com auxílio de tripsina, lavadas uma vez com PBSA, fixadas com paraformaldeído na concentração final de 1% por dez minutos e submetidas a citometria de fluxo no citômetro FACSAria (BD Biosciences - Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o programa Cyflogic versão 1.2.1.

3.3.4 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Para detecção de ROS foi utilizado o kit *Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection* (Molecular Probes), seguindo-se os procedimentos sugeridos pelo protocolo do fabricante. As amostras foram posteriormente submetidas a citometria de fluxo utilizando-se o citômetro FACSAria (BD Biosciences - Franklin Lakes, New Jersey, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o programa Cyflogic versão 1.2.1.

3.4 Lise celular / SDS-PAGE / Western blot

Células foram distribuídas em placas de 100 mm (Corning Inc., Corning, NY, EUA) em meio completo e estas foram deixadas crescer até atingirem a confluência desejada. Quando necessário as células foram carenciadas por 48h, sendo os tratamentos iniciados no tempo 0h e, após o período necessário, as células foram lavadas 2 x em PBSA gelado e lisadas com o tampão de lise RIPA mais inibidores de proteases: PSFM (1 mM), aprotinina (1 mg/ml), pepstatina A (1 ml/ml) e leupeptina (10 mg/ml), DTT (1 mM), ortovanadato de sódio (1 mM) e fluoreto de sódio (5 mM). As células foram raspadas das placas e centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante aliquotado e guardado em freezer a -20°C. Uma alíquota foi reservada para dosagem de proteína com o reagente de Bradford. Uma vez quantificadas, cerca de 100 µg de proteína foi aplicado em gel de SDS-poliacrilamida (10-15%) diretamente ou submetido previamente a imunoprecipitação e corrido em eletroforese a 60 V por 16 h. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C extra), a membrana foi bloqueada por 1h em leite desnatado a 5% e posteriormente submetida a ligação com anticorpo primário (1:1000 em TBS a temperatura ambiente ou a 4°C) por pelo menos 1h (o tempo ideal varia com o anticorpo), lavadas três vezes de 10 minutos em TBS-T (10 mM Tris base pH 8,0; 150 mM NaCl 0,1%; 0,1 % Tween-20) sob agitação, incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1: 2000, 1h em TBS-T a temperatura ambiente), lavadas mais três vezes de 10 minutos em TBS-T sob agitação e posteriormente reveladas com o kit ECL plus (GE Healthcare – Life Sciences) utilizando filmes para raio X (Kodak).

A quantificação densitométrica das bandas foi realizada com auxílio do *software* ImageJ 1.45s. Para cada amostra foi subtraído o sinal *background* (coloração do filme).

3.5 Imunoprecipitação

As imunoprecipitações foram feitas com proteína A ligada a *beads* magnéticos (*Protein A Dynabeads* – Invitrogen). Estes foram ressuspendidos por rotação por cinco minutos e 50 µl transferidos para tubo eppendorf de 1,5 ml que foram colocados em suporte magnético (*DynaMag* – Invitrogen) para permitir a separação dos *beads* da solução. O *pellet* foi então lavado uma vez em PBS e foi adicionado 1-10 µg do devido anticorpo diluído em 200 µl de TBS-T e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos, sob rotação. Os tubos foram transferidos para o suporte magnético para formação do *pellet*, o sobrenadante foi removido e os *beads* ressuspendidos em 200 µl de TBS-T. O *pellet* foi novamente formado com auxílio do suporte magnético, o sobrenadante foi removido e então foi adicionada a amostra (lisado de células) contendo 500 µg de proteínas totais, a qual foi deixada incubando sob rotação por 10 minutos a temperatura ambiente. Os *beads* foram separados com auxílio do suporte magnético e lavados três vezes em PBS para então serem ressuspendidos em 100 µl de PBS, transferidos para novo tubo, novamente separados da solução e ressuspendidos em 50 µl de tampão de amostra. Dessa forma foram fervidos por 5 minutos e aplicados em gel de poliacrilamida para depois prosseguir com *western blot*.

3.6 Técnicas de clonagem

3.6.1 Preparação de bactérias competentes

Bactérias de interesse foram plaqueadas em LB Agar contendo 10 mM de $MgCl_2$ e incubadas a 37°C por 16 a 24h. Uma colônia foi isolada e cultivada em 3-4 ml de meio LB a

37°C sob agitação (250 rpm) em agitador (*shaker*) por 2h. Foi adicionado 50 ml de meio LB pré-aquecido a 37°C e as bactérias foram incubadas por mais 2 a 3h até atingirem densidade óptica (550 nm) de 0,5 a 0,6. Os tubos contendo as bactérias foram então colocados em gelo, sendo adicionado 0,5 ml de $MgCl_2$ 1M e mantidos em repouso por 15 minutos. Posteriormente foram centrifugados a 3.000 rpm por 12 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspendidas em 10 ml de solução RFI (KCl 100 mM; $MnCl.4H_2O$ 50 mM; CH_3COOK 30 mM; $CaCl.2H_2O$ 10 mM; glicerol 15% - solução com pH 7,0), incubadas no gelo por 5 minutos e novamente centrifugadas a 3.000 rpm por 12 minutos a 4°C. Com o mesmo procedimento as bactérias foram ressuspendidas em 2ml de solução RFII (Na-MOPS 10 mM; KCl 10 mM; $CaCl.2H_2O$ 75 mM; glicerol 15% - solução com pH 7,0), aliquotadas em tubos *eppendorf* (50 µl cada) e congeladas a -80°C até o uso.

3.6.2 Transformação de bactérias

Cepas das bactérias DH5α competentes para transformação foram descongeladas e mantidas em gelo. Cerca de 50 ng de DNA plasmidial foram deixados em contato com as bactérias por 30 minutos para posteriormente serem submetidas a choque térmico a 42°C por 40 segundos em banho maria. Imediatamente as bactérias foram deixadas em gelo por cinco minutos e posteriormente mantidas em 1 ml de meio LB a 37°C por uma hora. O DNA plasmidial foi extraído com kits da Qiagen (miniprep, midiprep ou maxprep), conforme instruções do fabricante.

3.7 *Pull down* de Ras-GTP

3.7.1 Produção e purificação de GST-RBD (Glutationa-S-transferase - *Ras 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 200 ml de LB com 100 µg/ml de ampicilina (LB/Amp) por 16h a 37°C sob agitação. Esses 200 ml foram diluídos em 2L de LB/Amp, incubados a 37°C sob agitação até atingir a densidade óptica de 0,84 (600 nm), o que levou cerca de 1 a 2h. Para indução da proteína de fusão foi adicionado IPTG a 0,5 mM nos 2L de meio com bactérias, sendo incubado por mais 2h a 37°C sob agitação. A suspensão de bactérias foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 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 $MgCl_2$, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml de leupeptina e aprotinina). As bactérias foram então lisadas com auxílio de sonicador (10 sonicações de 1 minuto, com intervalo de 1 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 de fusão.

Meio mililitro de *beads* Glutationa-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) previamente lavados por 3 x com PBS gelado, foi incubado com 12 ml do extrato de bactérias, obtido no procedimento anterior, por 1,5h a 4°C sob rotação. O tubo foi centrifugado por 3 minutos a 3.000 rpm e os *beads* foram transferidos para *eppendorf* de 1,5ml e resuspendido com 1ml de tampão de lavagem (50 mM de Tris ph 7.5, 0,5 % de Triton

X-100, 150 mM de NaCl, 5mM de $MgCl_2$, 1 mM de PMSF, 1 µg/ml de leupeptina e aprotinina), lavados por 6x e ressuspendidos em 5ml do mesmo tampão na presença de glicerol a 10%. Cem microlitros dessa suspensão contendo a proteína de fusão e *beads* foram aliquotados em tubos *eppendorf* e armazenados a -80°C até o momento do uso.

3.7.2 Precipitação de Ras-GTP

Uma alíquota de preparação de GST-RBD com *beads* de glutationa-sepharose foi centrifugada (2.000 rpm por 4 minutos) e lavada seis vezes com tampão de lise RIPA mais inibidores (PSFM a 1 mM, 1 mg/ml de aprotinina, 1 ml/ml de pepstatina A, leupeptina a 10 mg/ml e DTT a 1 mM). A seguir, essa preparação foi incubada com 600 µg de lisado protéico de células por 1 hora a 4°C, centrifugada e lavada três vezes com tampão "RIPA" mais inibidores, sendo os beads ressuspendidos em tampão de amostra de proteínas. Estas foram fracionadas em gel de 10-15% de SDS-poliacrilamida e submetidas a *western blot* para Ras.

3.8 Extração de ácidos nucléicos

3.8.1 Extração de RNA

Células foram distribuídas em placas de 60 mm (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e, após atingirem a confluência desejada, a extração de RNA foi feita com o reagente TRIZOL (Invitrogen) segundo protocolo sugerido pelo fabricante. Após remoção do meio de cultura da placa, foram despejados 800 µl de TRIZOL sobre toda sua superfície. Com auxílio de um *cell scraper* (Corning Inc., Corning, NY, EUA), as células foram raspadas da placa para se

misturarem ao reagente, o homogenato foi transferido para tubo *eppendorf* de 1,5 ml e incubado por três minutos a temperatura ambiente a fim de permitir a dissociação completa dos complexos de ribonucleoproteínas. Em seguida foi adicionado 200 µl de clorofórmio, o qual foi homogeneizado vigorosamente e deixado em repouso por cinco minutos. A mistura foi então centrifugada por quinze minutos a 14.000 rpm. A fase orgânica contendo RNA foi removida com cuidado e transferida para novo tubo *eppendorf* de 1,5 ml. Foi então adicionado 500 µl de isopropanol, o qual foi homogeneizado e a mistura foi incubada por dez minutos à temperatura ambiente para permitir precipitação do RNA. Posteriormente a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por dez minutos, o sobrenadante foi centrifugado e o precipitado foi lavado com etanol 70% para remoção de sais e outras impurezas do RNA. Posteriormente o etanol foi removido e o tubo foi deixado aberto por cinco minutos a temperatura ambiente para remoção do etanol residual e em seguida o RNA foi dissociado em água ultrapura e usado para reação de transcrição reversa ou congelado a -80°C até seu uso.

3.8.2 Extração de DNA

O meio de cultura de uma placa de 60 mm de diâmetro (Corning Inc., Corning, NY, EUA) contendo células foi removido, sendo adicionado 1 ml do reagente DNAzol (Invitrogen). As células foram raspadas da placa para se misturarem ao reagente e o homogenato foi transferido para tubo *eppendorf* de 1,5 ml. Este foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 g a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. A este foi adicionado 0,5 ml de etanol absoluto, misturado por inversão e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. O DNA, que se torna visível como um precipitado turvo, é então transferido para um novo tubo com

auxílio de ponteira e lavado 2 x com 1 ml de etanol 75%. O precipitado é secado ao ar por 5 segundos após remoção do etanol e dissolvido em 8 mM de NaOH. O pH da solução contendo DNA é neutralizado pela adição de 1M de HEPES na quantidade sugerida pelo protocolo do reagente para cada volume de solução de DNA obtido.

3.9 Reações moleculares com ácidos nucléicos

3.9.1 Transcrição Reversa (RT)

O RNA extraído é quantificado e tratado com DNAseI por 10 min a 37°C e a enzima é inativada a 75°C por 5 min. Em seguida, 1 µl de dNTP a 10 mM e 1 µl de *random primers* a 300 nM é adicionado ao tubo contendo a concentração desejada de RNA (cerca de 4 µg), incubado por 65°C por 5 minutos e imediatamente posto em gelo. A reação de transcrição reversa é realizada com a adição de 1x de tampão da enzima, 5 mM de $MgCl_2$, 0,1M de DTT e 5U da transcriptase reversa SuperScriptIII (Invitrogen) no volume final de 20 µl, sendo incubado a 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 minutos em termociclador. O cDNA resultante é imediatamente submetido a reação de PCR ou congelado a -20°C até o uso.

3.9.2 *Touchdown* PCR

Para reação de PCR foram utilizados de 50 a 100 ng de DNA genômico ou cDNA, 2,5 U de TaqDNA polimerase recombinante (Invitrogen), 1x de tampão da enzima, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 200 nM de oligonucleotídeos *primer foward* e de *primer reverse* (tabela 4). As

amostras foram então incubadas a 94°C por 30 segundos, submetidas a dois ciclos de 94°C por 30 segundos, 63 °C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A temperatura de anelamento foi reduzida a 1°C a cada par de ciclos até atingir 59°C, quando então foram submetidas a 3 ciclos com temperatura de anelamento de 58°C, quatro ciclos com temperatura de anelamento de 57°C, cinco ciclos com temperatura de anelamento de 56°C, seis ciclos com temperatura de anelamento de 55°C, três ciclos com temperatura de anelamento de 54°C, dois ciclos com temperatura de anelamento de 53°C, dois ciclos com temperatura de anelamento de 52°C, dois ciclos com temperatura de anelamento de 51°C e trinta ciclos com temperatura de anelamento de 50°C. Os produtos de PCR foram então analisados por eletroforese em gel de agarose e documentados com transiluminador e aparato de fotodocumentação apropriado.

A técnica de *touchdown* PCR permite amplificação eficiente e específica sem a necessidade de padronizar a melhor temperatura de anelamento para cada par de oligonucleotídeos.

3.9.3 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 para a expressão de RPL19 (*Ribosomal protein 19*). 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 através de PCR foram realizadas em ciclos de reações de desnaturação (95 °C, 15 seg), de

anelamento e de polimerização (60 °C, 60 seg) 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).

Tabela 4. Sequencia dos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR.

Primers	Sequencia	Tamanho do produto
FGFR1 (PCRq)	F: 5'-AGCTTTCTCCTGTCGGTTTGG-3'	90 pb
	R: 5'-TGCTGTAGCCCTGAGGACAA-3'	
FGFR2 (PCRq)	F: 5'-CACATAAACGGCAGTGTTAAAACAT-3'	90 pb
	R: 5'-TCCCTGCTCAGTGTAGCTAGGTT-3'	
FGFR3 (PCRq)	F: 5'- TGGCTCAGGGTGGTCTCTTC -3'	90 pb
	R: 5'-GTCGCTGGGTTAACAAAATCG-3'	
FGFR4 (PCRq)	F: 5'-TGTGTCCTGATGGCCCAAAT-3'	90 pb
	R: 5'-CAGCCAGGCTCAGCCAAA-3'	
FGFR5 (PCRq)	F: 5'-CCTACCTCAATAAGCTGCTCATCA-3'	90 pb
	R: 5'-AAGCTGTAGCCCATGGTGTTG-3'	
RPL19 (PCRq)	F: 5'-TGGGCTGATCATCCGCAAGCC-3'	90 pb
	R: 5'- CCCATGTGCCTGCCCTTCCG-3'	
FGF1	F: 5'- GGCACAGTGGATGGGACAAG -3'	507 pb
	R: 5'- AGGCTCTGCAAAGAAGTGAAC -3'	
FGF2	F: 5'- ATAGAATTCGTCGTGGAAGCACCGGATGGG-3'	188 pb
	R: 5'- ATACAGCTGGAGGTGGAAGGGTCTCCCGC-3'	
KGF	F: 5'- ATAGAATTCGCTTCCAATGAGGTCAGCAAAGGT-3'	206 pb
	R: 5'- ATACAGCTGTCTGCCTGGTGCAACTTGAGCC -3'	
GAPDH	F: 5'-GGAAACTGTGGCGTGATG-3'	270 pb
	R: 5'-AGACCACCTGGTGCTCAGTG-3'	
NEO	F: 5' - ATTGCACGCAGGTTCTCC - 3'	400 pb
	R: 5' - ATGTTTCGCTTGGTGGTC - 3'	
Psi-plus-pack	F: 5' - GTCCGATTGTCTAGTGTCTATG - 3'	450 pb
	R: 5' - CATCTACCGACTGGTTGTG - 3'	
ER:Ras	R: 5' - ATGATTGGTCTCGTCTGG - 3'	743 pb
	R: 5' - TCGTATTCGTCCACAAAG - 3'	
FGFR1	F: 5' - AGGAGGATCGAGCTCACTGT - 3'	527 pb
	R: 5' - GGAGCTACGGGGTTTGGTTT - 3'	
FGFR2	F: 5' - TCCGTGGTCGGAGGAGACGTAGA- 3'	432 pb
	R: 5' - CTGGAAGTCTGGCTTCTTGGTCG - 3'	
FGFR3	F: 5' - TCCGACGGCACACCCTACGTTAC - 3'	412 pb
	R: 5' - CTGGTGTGTTGGAGCTCATGGAC - 3'	
FGFR4	F: 5' - TTCGGACACACCCCCAGCGCATG - 3'	230 pb
	R: 5' - CTGGGTGTATGTGCCGCGGTCCG - 3'	

F= oligonucleotídeo *foward*; **R**= oligonucleotídeo *reverse*; **PCRq** = PCR quantitativo; **RPL19** = Proteína Ribossomal 19; **GAPDH** = Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; **pb**= pares de bases.

3.10 Anticorpos

- Santa Cruz Biotechnology: FGF-1 (sc-1884), FGF-2 (sc-79), FGF-7 (sc-7882), FGFR1, FGFR2 (sc-122), FGFR3 (sc-123), FGFR4 (sc-9006), H-Ras (sc-520), p21 (SC-481), p53 (sc-6243).
- Cell Signaling: ERK1/2 (#9102), fosfo-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (#9101L).
- KPL: *Goat anti rabbit* conjugado a peroxidase (474-1506), *Goat anti-mouse* conjugado a peroxidase (04-18-06), *Goat anti-rabbit* conjugado a rodamina.
- Invitrogen: Anti BrdU conjugado a *Alexafluor*®488 (B35130), *Goat anti mouse* conjugado a *Alexafluor*®488 (A11001).
- Millipore: fosfo-histona H3 Ser 10 (05-806).

3.11 Análises estatísticas

As curvas de crescimento foram analisadas por *two-way* ANOVA e pós-teste de *Bonferroni*. Os gráficos de barras contendo apenas duas condições foram analisados por teste-t; quando contendo mais de duas comparações, foi utilizado *one-way* ANOVA e pós-teste de *Bonferroni*.

4 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em três seções. A seção 4.1 mostra a expressão de FGFs e FGFRs em queratinócitos, bem como sua resposta mitogênica a FGFs adicionados ao meio de cultura. Além disso, esta seção também relata o estudo da ação potencialmente citotóxica de FGF2 em queratinócitos experimentalmente transformados com H-RasV12.

A seção 4.2. descreve a ação citotóxica de PMA específica para queratinócitos HaCaT transformados com H-RasV12, efeito este não observado na linhagem parental.

Por último, a seção 4.3 apresenta os resultados da investigação da possível ação citotóxica de PMA e FGF2 em 13 linhagens celulares malignas humanas da coleção da ATCC, portadoras de mutações conhecidas em HRAS, KRAS e NRAS, que foram originalmente derivadas de tumores histologicamente bem caracterizados.

4.1 Eixo de sinalização FGF/FGFR em queratinócitos humanos: expressão e respostas

4.1.1 Queratinócitos expressam FGFR2, FGFR3 e FGFR4, bem como FGF1 e FGF2

Para verificar a expressão dos diferentes FGFRs, RNA de células HaCaT e E6E7 em fase exponencial de crescimento foi extraído e submetido a RT-PCR. Na figura 4.1 A, o resultado de uma eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com iniciadores específicos para cada transcrito, mostra a expressão dos receptores FGFR2, FGFR3 e FGFR4, mas não de FGFR1, que não foi detectado (não mostrado). Na figura 4.1 B, dados de PCR quantitativo

mostrou uma maior expressão de FGFR3, sendo cinco vezes maior que FGFR2 em células HaCaT e quinze vezes maior em E6E7. Não há diferença significativa entre a expressão de FGFR2 e FGFR4 em ambas as células. Na ocasião também foi testada a expressão de FGFR1, o qual novamente não foi detectado.

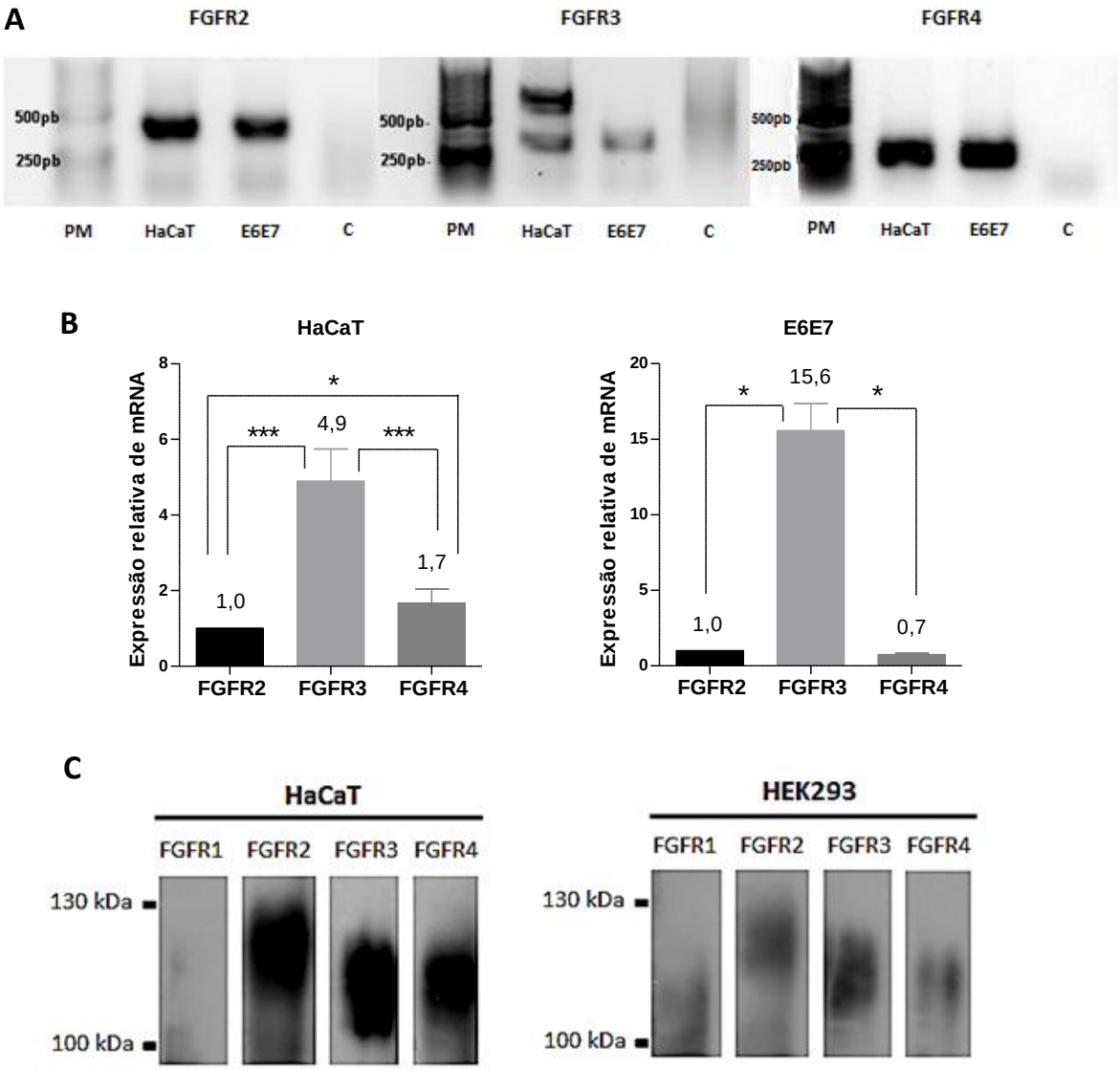


Figura 4.1. Queratinócitos expressam FGFR2, FGFR3 e FGFR4, sendo FGFR3 o mais expresso. A) Reação de PCR para os três FGFRs realizadas com cDNA de células HaCaT e E6E7. Legenda: PM = padrão de massa molecular; HaCaT= reação com cDNA de HaCaT; E6E7 = reação com cDNA de E6E7; C= controle (reação sem cDNA); B) PCR quantitativo com amostra de cDNA de HaCaT e E6E7, sendo que os valores foram representados como expressão relativa à de FGFR2 e derivam da média de três experimentos independentes (cada um realizado em triplicata); Para PCR quantitativo, o gene de referência utilizado foi RPL19. Os asteriscos indicam comparações significantes (* para p<0,05; ** para p <0,01; *** para p<0,001); C) *Western blot* precedido de imunoprecipitação com lisado protéico de células HaCaT e HEK293 (controle positivo) respectivamente. Massa molecular dos receptores: FGFR1, 110 kDa; FGFR2, 120 kDa; FGFR3: 97 – 125 kDa; FGFR4: 95-125 kDa; as variações de tamanho são devido à presença ou não de modificações pós-traducionais.

Os produtos de PCR das bandas do gel de agarose foram purificados e submetidos à sequenciamento. Os resultados confirmaram que as bandas visualizadas no gel são de fato dos respectivos receptores (ver apêndice). Com o intuito de detectar a expressão proteica dos receptores, foi feita imunoprecipitação de FGFR1-4 seguida de *western blot* a partir de lisado proteico de HaCaT; lisado de HEK293 foi usado como controle positivo (figura 4.1 C). Estes resultados mostram que os transcritos dos receptores são traduzidos em proteína.

Por RT-PCR, com iniciadores específicos para FGF1, FGF2 e, para controle negativo, KGF (FGF7; normalmente não é expresso por células de origem epitelial – Rubin et al., 1995), em HaCaT e E6E7 foi possível verificar a expressão de transcritos de FGF1 e FGF2 (figura 4.2 A), sendo que não houve amplificação alguma de cDNA de KGF. Em HaCaT, por meio de *western blot*, foi possível detectar a expressão de FGF1 e de FGF2, enquanto que novamente não foi observada expressão de KGF (figura 4.2 B).

Imunofluorescência com queratinócitos HaCaT utilizando anticorpos específicos para FGF1, FGF2 e KGF permitiu vizualizar a presença de FGF1 e FGF2, mas não de KGF, no citoplasma de células HaCaT (figura 4.3). Como já é bem caracterizada a expressão de KGF em fibroblastos, células da linhagem de camundongo A31 foram usadas como controle positivo.

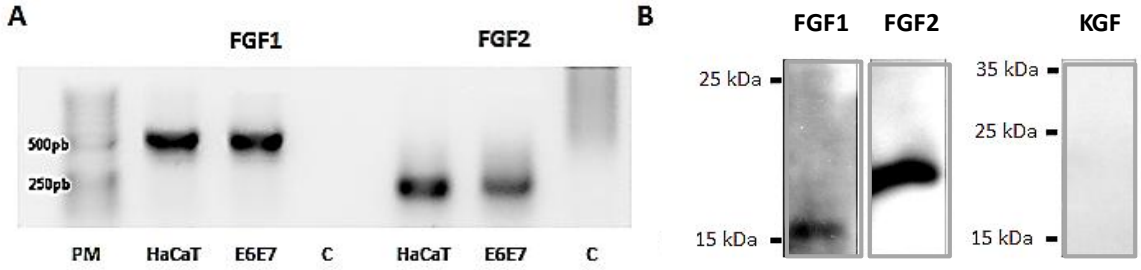


Figura 4.2. Queratinócitos HaCaT expressam FGF1 e FGF2, mas não KGF. A) PCR com cDNA de HaCaT, confirmando a expressão de mRNA de FGF1 e FGF2; PM = padrão de massa molecular; HaCaT= reação com cDNA de HaCaT; E6E7 = reação com cDNA de E6E7; C= controle (reação sem cDNA); B) *Western blot* para FGF1, FGF2 e KGF, mostrando a expressão protéica dos dois primeiros fatores de crescimento em células HaCaT, sendo que os três *western blots* foram feitos com o mesmo lisado protéico. Massa molecular dos FGFs: FGF1, 15,5 kDa; FGF2, 18 kDa, 22 kDa, 24 kDa (diferentes isoformas); KGF, 28 kDa.

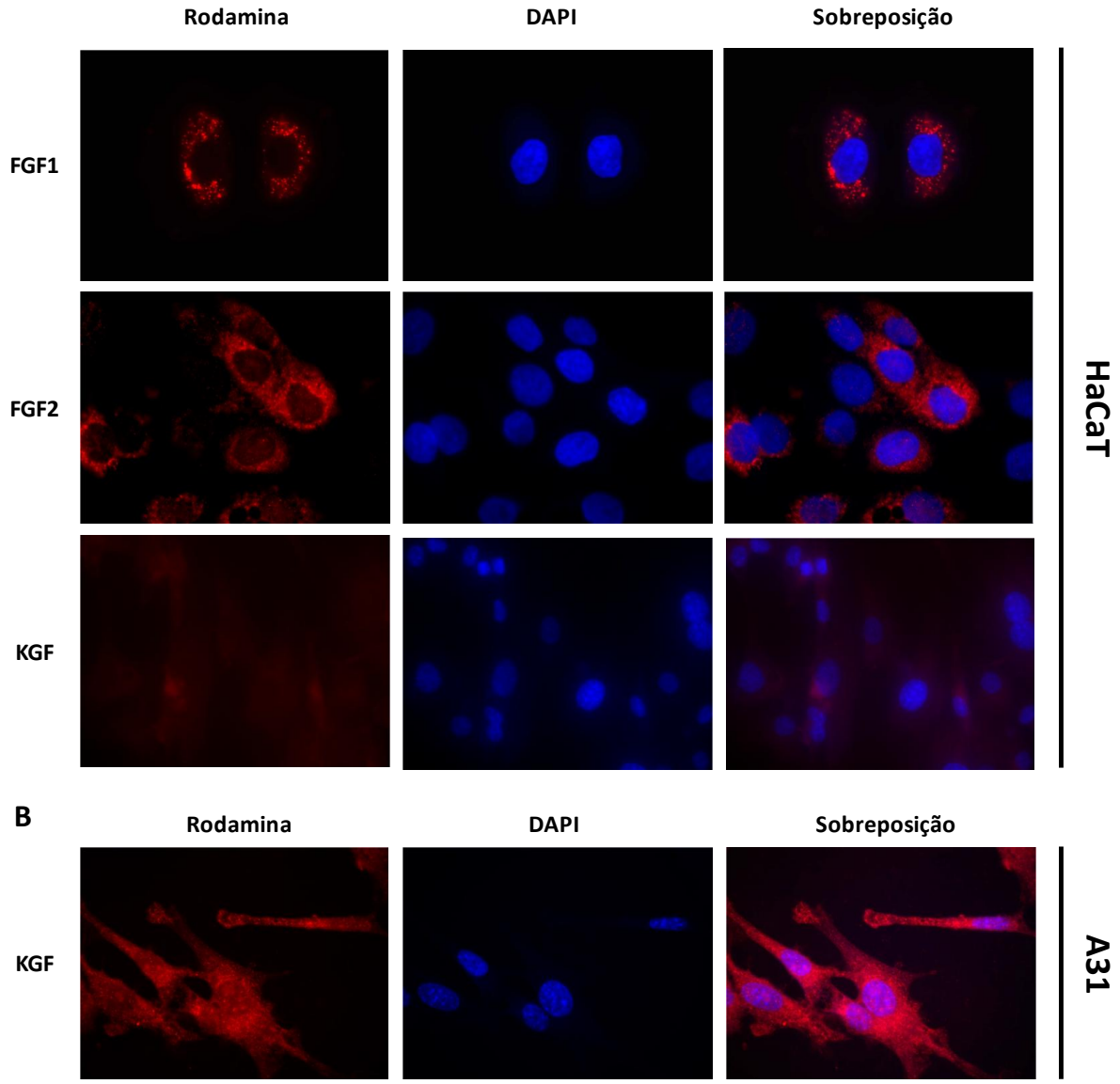


Figura 4.3. FGFs encontram-se localizados no citoplasma de queratinócitos. A) Imunofluorescência com queratinócitos HaCaT utilizando anticorpos para FGF1, FGF2 e KGF, conforme indicado no lado esquerdo das imagens; B) Imunofluorescência com fibroblastos A31 utilizando anticorpo para KGF (controle positivo); O núcleo foi marcado com DAPI e o secundário utilizado é ligado ao fluoróforo rodamina (indicado acima das imagens); as imagens da coluna à direita representam a sobreposição da marcação com rodamina e DAPI.

4.1.2 FGF1, FGF2 e KGF ativam a via de ERK e promovem proliferação de HaCaT em intensidades diferentes

Células previamente carenciadas por 48h foram estimuladas por FGF1, FGF2 e KGF em meio livre de soro. Os níveis de fosforilação de ERK 1 e 2 em diferentes tempos após o estímulo foram acompanhados por *western blot* (figura 4.4). Como referência, foi verificado

os níveis totais dessas proteínas. Dentro de cinco minutos de tratamento todos os FGFs testados foram capazes de ativar a via de ERK e a quantificação das bandas foi realizada levando em conta a razão da intensidade de fosforilação de ERK em relação ao total de ERK.

Curvas de crescimento foram feitas com células HaCaT tratadas com FGF1, FGF2 e KGF (FGF7) na ausência de soro, sendo os tratamentos renovados diariamente (figura 4.5). A condição em que soro foi adicionado serviu como controle positivo (estimula fortemente a proliferação de células).

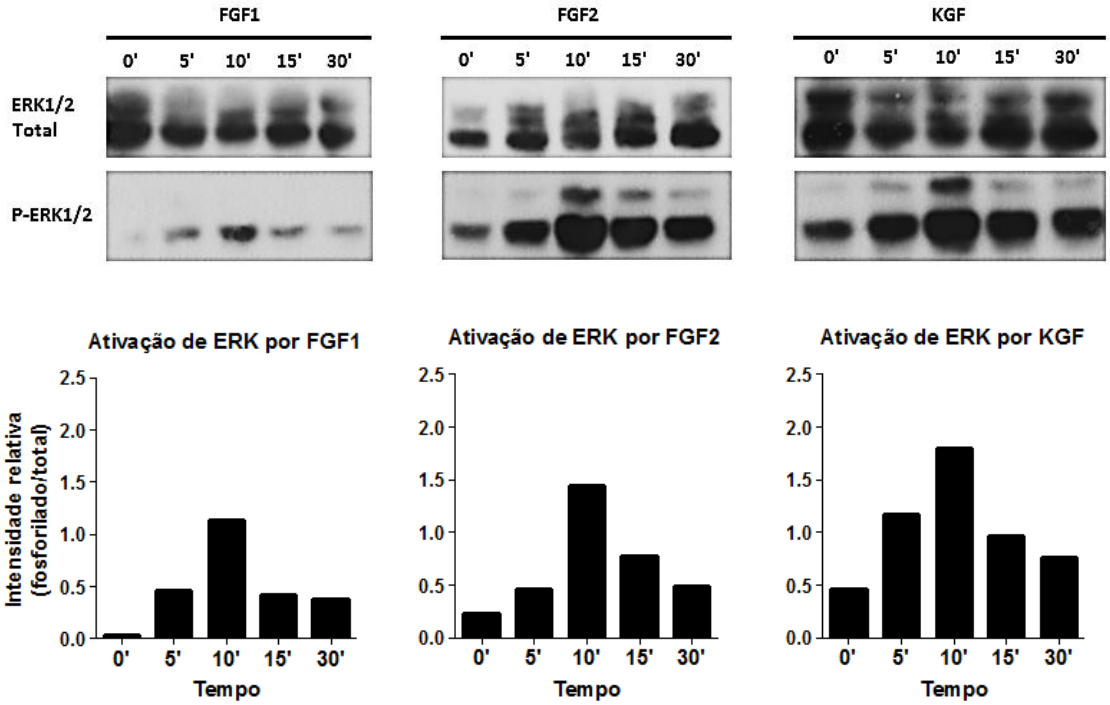


Figura 4.4. Ativação da via de ERK por diferentes FGFs. *Western blot* para ERK 1 e 2 total e ERK 1 e 2 fosforilados (P-ERK1/2) em células HaCaT previamente carenciadas por 48h em meio livre de soro; Os tratamentos foram mantidos pelos tempos indicados até as células serem submetidas à lise; FGF1, FGF2 e KGF foram usados a 10 ng/ml; Os gráficos de barras abaixo das imagens são as medidas relativas das intensidades das bandas da proteína fosforilada dividido pela intensidade das bandas da proteína total de cada amostra; esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.

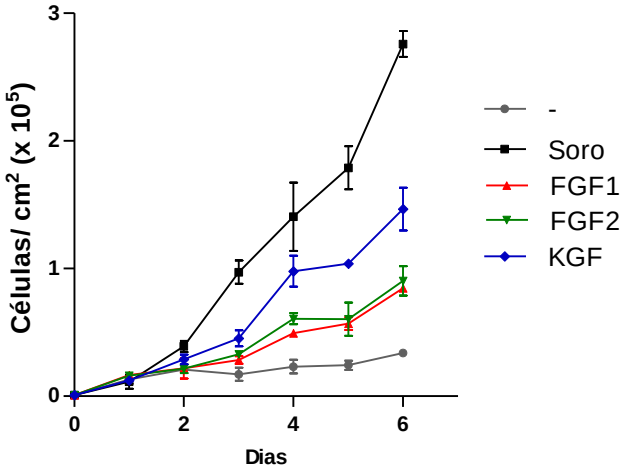


Figura 4.5. FGF1, FGF2 e KGF estimulam proliferação de queratinócitos HaCaT em intensidades diferentes. Curva de crescimento com células HaCaT em 10% de soro fetal bovino, 10 ng/ml de FGF1, 10 ng/ml de FGF2, 10 ng/ml de KGF e controle sem tratamentos (-); Neste ensaio foram plaqueadas cerca de 10.000 células por poço em placas de doze poços (*Corning*) e os tratamentos foram adicionados em meio totalmente livre de soro, exceto quando indicado. O meio com os tratamentos foram renovados diariamente. Os valores estão representados como média ± d.p. n=3.

Foram observadas diferenças altamente significativas entre as curvas controle (-, que indica condição não tratada) e as curvas com os demais tratamentos (tabela 5). Ao comparar a curva controle (não tratada) com as demais foi possível constatar que apenas a partir do sétimo dia a curva com FGF1 mostrou-se significativamente diferente (p>0,001), sendo a com FGF2 significativamente diferente a partir do sexto dia, a com KGF a partir do quarto dia e a com soro a partir do terceiro dia.

Tabela 5. Valores de *p* da análise estatística por *two-way* ANOVA na interação entre os tratamentos da curva de crescimento da figura 4.5.

	FGF1	FGF2	KGF	Soro
-	P = 0,0080	P <0,0001	P < 0,0001	P < 0,0001
FGF1	-	P = 0,1105	P = 0,0020	P = 0,0006
FGF2	-	-	P = 0,0011	P = 0,0006
KGF	-	-	-	P = 0,0027

As curvas com FGF1 e FGF2 não apresentaram diferença significativa entre si, indicando que esses fatores de crescimento induzem proliferação de queratinócitos HaCaT em intensidade similar. A curva das células tratadas com KGF é acentuada e mostrou-se muito significante quando comparada com as curvas de FGF1 e FGF2 e com as demais. Em suma, a partir das curvas de crescimento (figura 4.5) é possível dizer que todos os FGFs testados estimulam a proliferação de queratinócitos HaCaT, sendo que FGF1 e FGF2 o fazem em menor intensidade do que KGF.

Em células HaCaT previamente tratadas com inibidor da atividade tirosina quinase de FGFRs é observada inibição dose-dependente da fosforilação de ERK quando as mesmas são estimuladas com FGF2 (figura 4.6 A). Na presença de 400 nM desse inibidor (PD173074) o aumento de proliferação de HaCaT estimuladas por FGF1, FGF2 e KGF tende a ser abolido (figura 4.6 B). Portanto, é possível inferir que essas células expressam FGFRs funcionais.

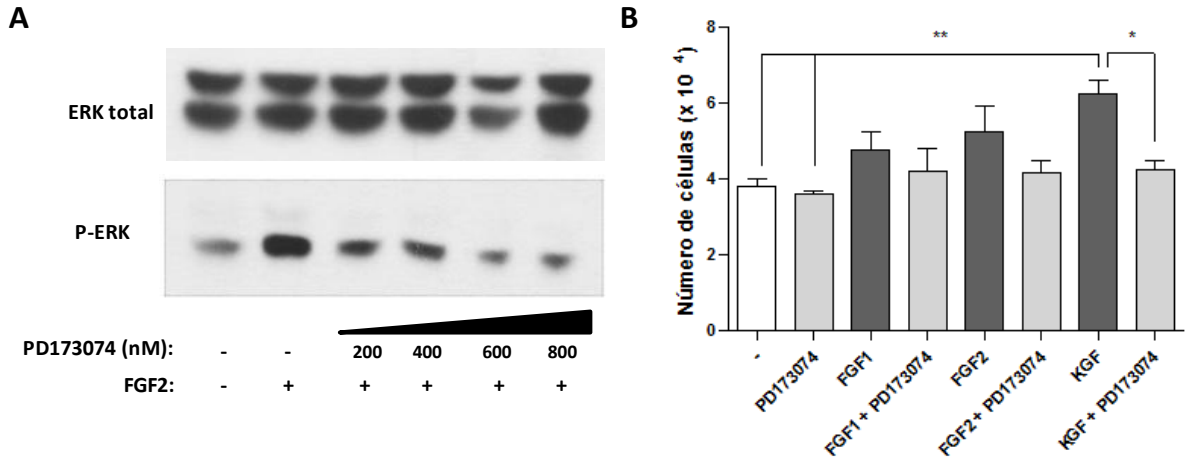


Figura 4.6. Inibidor da atividade quinase de FGFRs reverte o efeito de FGFs. A) *Western blot* para ERK total e fosforilado com células HaCaT previamente carenciadas por 48h, tratadas por uma hora com o inibidor PD173074 nas concentrações indicadas e posteriormente estimuladas por quinze minutos com FGF2; B) Número de células HaCaT após tratamento sustentado por quatro dias com 400 nM de PD173074; Foram plaqueadas cerca de 10.000 células por poço em placa de 12 poços, sendo o meio com os tratamentos renovados diariamente; Os valores dos gráficos de barras estão representados como média ± d.p. n=2; os asteriscos (*) indicam as comparações significantes (* para $p<0,05$ e ** para $p<0,01$).

4.1.3 Efeito de FGF2 em queratinócitos HaCaT transformados com o oncogene H-RasV12

Células HaCaT foram transduzidas com o vetor retroviral pBaBe contendo a sequência ER:RasV12, que consiste no domínio de ligação ao ligante do receptor de estrógeno (ER) fusionado a H-RasV12. Essa construção permite que H-Ras esteja ativo apenas na presença de 4OHT (4-hidroxi-tamoxifeno), um agonista de receptor de estrógeno.

No total, vinte e cinco clones transduzidos com a construção ER:RasV12 foram selecionados e testados por meio de ensaio clonogênico na presença de FGF2 a 10 ng/ml, 4OHT a 200 nM e ambos os tratamentos por 48h. Desses clones, oito se mostraram sensíveis a FGF2 apenas na presença de 4OHT, ou seja, com H-RasV12 ativo. Resultado semelhante se obteve também com população policlonal. A figura 4.7 documenta o resultado do ensaio clonogênico realizado em população policlonal, bem como o de alguns clones.

Após algumas passagens em cultura, foram repetidos os ensaios clonogênicos nessas mesmas condições, mas os clones que se mostraram anteriormente sensíveis a FGF2 na presença de 4OHT parecem ter perdido essa característica, como pode ser exemplificado na figura 4.8 A. Em nenhum desses clones foi possível detectar a expressão da proteína de fusão ER:RasV12 por meio de *western blot* para H-Ras (exemplificado pela figura 4.8 B). O que esses resultados parecem sugerir é que a proteína de fusão deixa de ser expressa pelas células, o que pode ocorrer por inibição da transcrição ou por perda do transgene que codifica para a proteína de fusão. Para verificar se a construção de fato está presente no núcleo dos clones ER:RasV12, foi extraído DNA genômico dessas células e o mesmo foi testado por PCR para sequencias presentes no plasmídeo do vetor retroviral: o inserto ER:Ras, o gene de resistência a neomicina e a seqüência *psi*, a qual é necessária para empacotamento do plasmídeo.

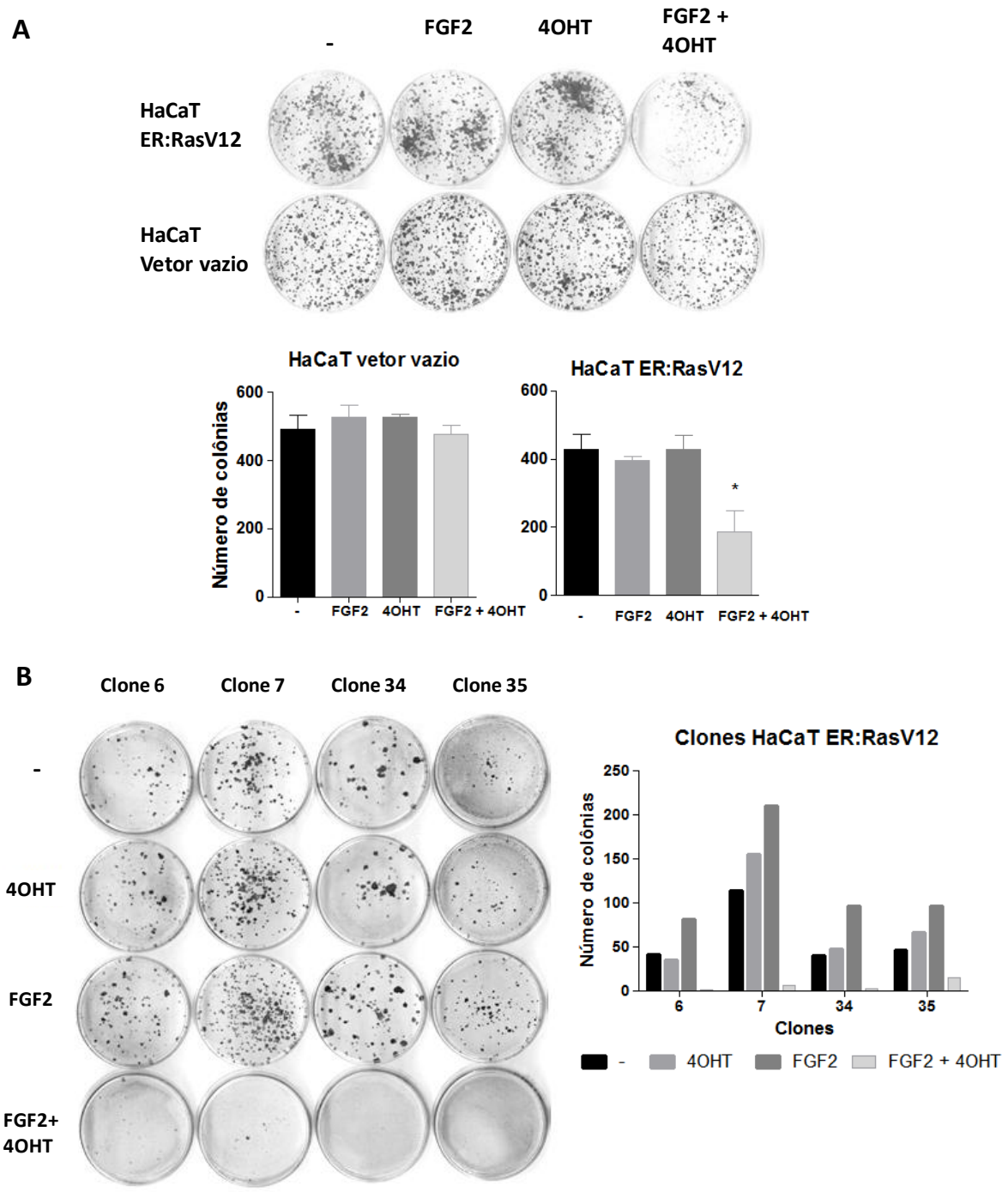


Figura 4.7. FGF2 é citotóxico em queratinócitos com H-RasV12 transientemente ativado. Ensaios clonogênicos com células HaCaT transduzidas com ER:RasV12. A) População policlonal; B) Ensaio com clones. Nestes ensaios as células foram plaqueadas juntamente com os respectivos tratamentos (200 nM de 4OHT, 10 ng/ml FGF2 ou ambos nas mesmas concentrações, conforme indicado) por 48h, sendo que após esse período as células foram mantidas em meio sem tratamentos até o momento da fixação. Ao lado das figuras constam os gráficos indicando a quantificação do número de colônias. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre a condição não tratada (-) e o tratamento com FGF2 e 4OHT.

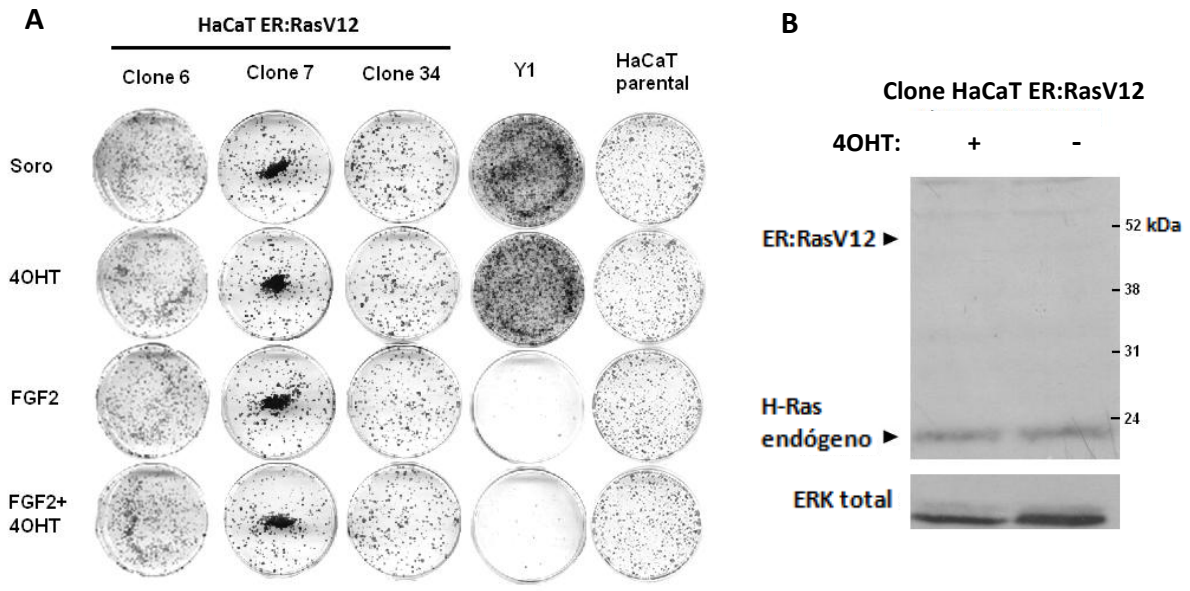


Figura 4.8. Clones HaCaT ER:RasV12 tornam-se insensíveis a FGF2 após algumas passagens. A) Repetição do ensaio clonogênico com clones ER:RasV12 anteriormente sensíveis a FGF2 na presença de 4OHT após decorridas algumas passagens da transdução com vetor retroviral; B) *Western blot* com anticorpo para H-Ras de um clone ER:RasV12 anteriormente sensível a FGF2, mostrando a ausência de expressão da proteína de fusão ER:RasV12, que possui cerca de 50 kDa.

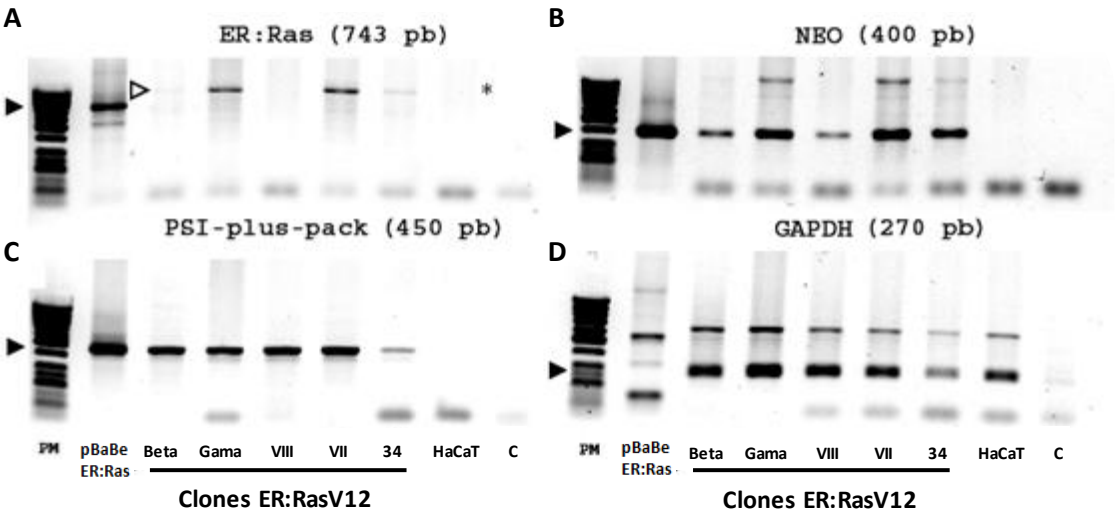


Figura 4.9. Clones transfectados com pBaBe ER:RasV12 não apresentam a sequência do inserto no genoma. PCR de DNA genômico de clones HaCaT ER:RasV12. Como controle positivo foi usado o próprio vetor pBaBe ER:Ras e, como controles negativos, foram usados DNA genômico da célula parental (HaCaT) e controle sem DNA (C); Os clones beta e gama, III e VII e 34 são resultantes de três infecções independentes feitos em períodos diferentes; Acima das imagens dos géis está indicado o produto amplificado; as setas indicam o tamanho esperado do *amplicon* resultante da reação com os respectivos pares de oligonucleotídios; A) PCR com oligonucleotídeos para a sequencia ER:Ras; B) PCR com oligonucleotídeos para o marcador de seleção (resistência a neomicina); C) PCR com oligonucleotídeos para a sequencia que promove empacotamento do vetor retroviral (*PSI-plus-pack*); PCR com oligonucleotídeos para Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH); PM= padrão de massa molecular.

Na figura 4.9 pode-se observar que no DNA genômico dos clones ER:RasV12 foi possível detectar tanto o gene de resistência a neomicina quanto a sequencia *psi*, mas não ER:RasV12. Pode ser que com o tempo a sequência ER:RasV12 seja removida ou sofra recombinação, o que impede sua expressão. Isso pode ocorrer pelo fato de duas fortes pressões seletivas operarem nesses clones: pressão positiva para manter o marcador genético (as células são sempre mantidas na presença do antibiótico de seleção) e pressão negativa para livrar-se da construção ER:Ras, cuja expressão pode ser desfavorável para viabilidade dessas células.

Considerando que a construção ER:Ras não tem estabilidade em HaCaT, essa linhagem foi então transduzida com pBaBe contendo apenas a sequência H-RasV12 para seleção de clones com expressão constitutiva dessa proteína. Esses clones foram então testados quanto à sensibilidade a FGF2 por meio de curvas de crescimento (figura 4.10). As curvas com clones H-RasV12 não mostraram diferenças significativas entre si. Desses resultados pode-se constatar que células em que H-Ras encontra-se constitutivamente ativo não são vulneráveis a FGF2. Para confirmar a expressão de H-RasV12, os níveis de H-Ras-GTP desses clones foram medidos (figura 4.11 B).

Resultados de nosso laboratório (dados da doutoranda Juliana Galvão) apontam que HEK293, outra linhagem de células humanas imortalizadas, comportam-se semelhantemente a HaCaT: clones ER:Ras são vulneráveis a FGF2 na presença de 4OHT, enquanto que clones com expressão constitutiva de H-RasV12 são insensíveis a esse fator de crescimento. Pode ser que exista um mecanismo imediato de supressão de tumor em células humanas que impeça que um mitógeno, como o FGF2, estimule células normais/imortalizadas quando as mesmas já possuem uma via mitogênica altamente ativa, sendo que para a transformação maligna (no caso dos clones H-RasV12) tal mecanismo tenha que ser superado.

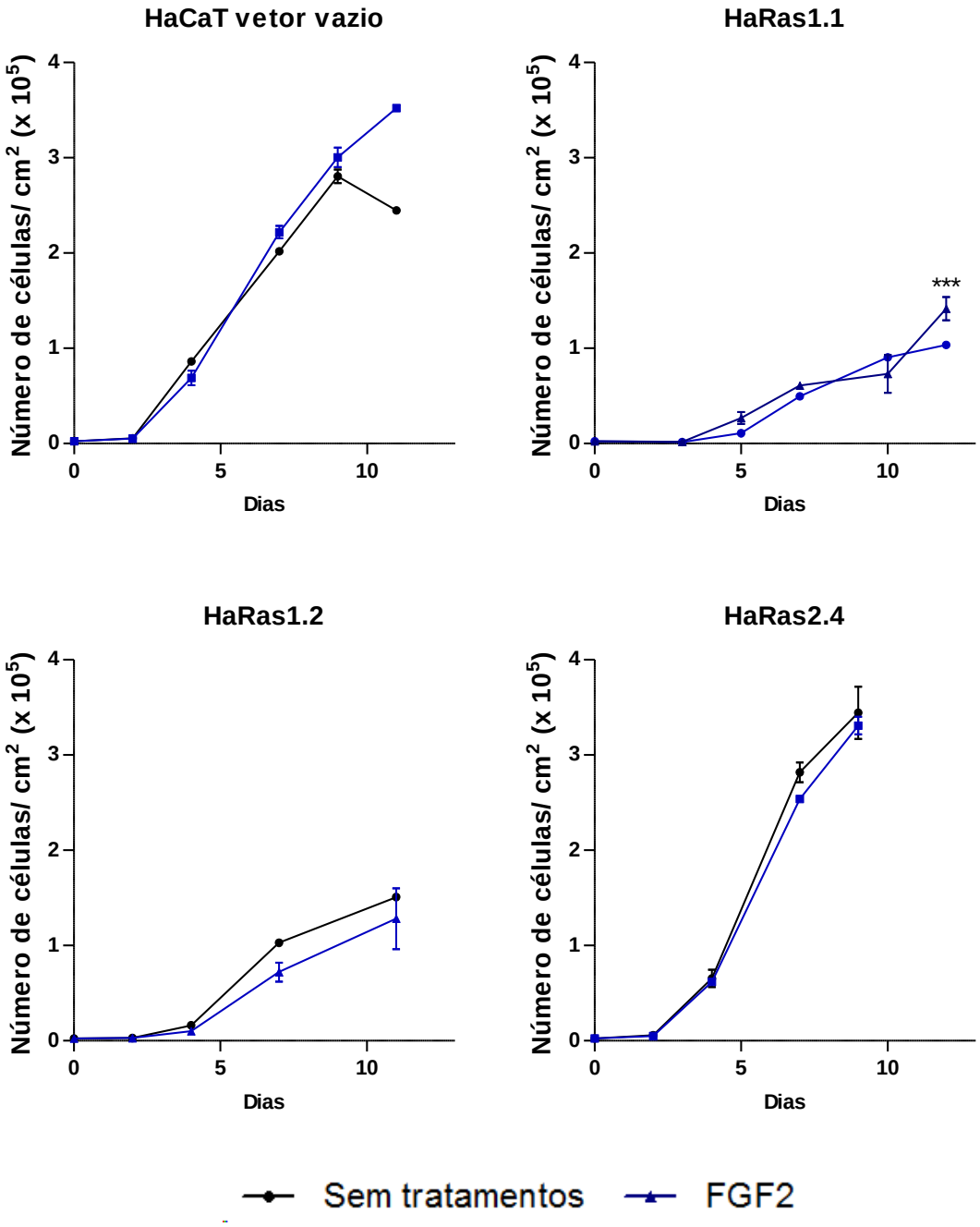


Figura 4.10. Clones de células HaCaT com expressão constitutiva de H-RasV12 são insensíveis a FGF2. Curvas de crescimento com HaCaT transduzida com vetor pBaBepuro sem inserto (HaCaT vetor vazio) e clones expressando H-RasV12 constitutivamente (HaRas1.1, HaRas1.2 e HaRas2.4). Neste ensaio foram plaqueadas cerca de 10.000 células por poço em placa de 12 poços, sendo o tratamento adicionado em meio completo, ou seja, contendo 10% de soro fetal bovino, e renovado a cada dois ou três dias; Os valores estão representados como média ± d.p. n=2.

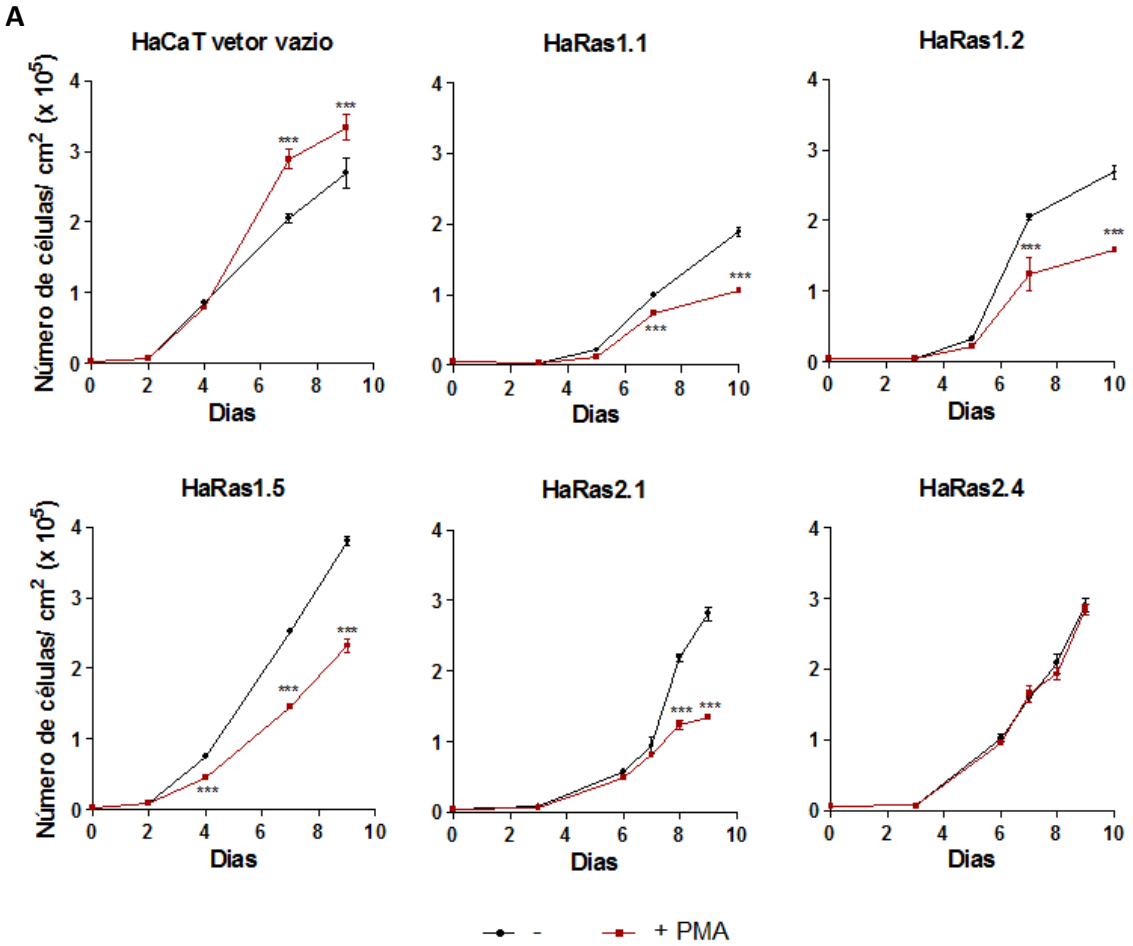
4.2 Efeitos de PMA em queratinócitos expressando H-RasV12

4.2.1 Queratinócitos malignamente transformados com H-RasV12 têm proliferação inibida por PMA

Clones de queratinócitos da linhagem HaCaT transduzidos com vetor retroviral pBaBe cujo inserto promove a expressão constitutiva do oncogene H-RasV12 foram testados quanto ao efeito de PMA por meio de curvas de crescimento, mostradas na figura 4.11. É possível observar que, enquanto células contendo apenas o vetor vazio são estimuladas mitogenicamente por PMA, clones H-RasV12 apresentam certa sensibilidade a esse composto. A diferença entre as curvas tratadas com PMA e controles (não tratados) foi significante (p<0,01) tanto nas células contendo vetor vazio quanto nos clones H-RasV12 testados. O clone HaRas2.4 foi exceção: a diferença entre as curvas não foi significante. Verificando os níveis de H-Ras-GTP em relação aos de H-Ras total, pode-se constatar que os mesmos variam de clone para clone (figura 4.11 B). É importante destacar que o clone HaRas2.4, o qual não é sensível a PMA, apresenta baixos níveis de H-Ras-GTP.

A morfologia das células tratadas com PMA por cinco dias, bem como o das não tratadas, está apresentada na figura 4.12. Enquanto que o aspecto das células contendo vetor vazio parece ser o mesmo entre as condições, é possível observar mudança morfológica do clone H-RasV12 submetido ao tratamento com PMA.

Para curva dose-resposta, clones HaCaT H-RasV12 foram cultivados com diferentes concentrações de PMA por cinco dias, sendo o número de células contado após esse período (figura 4.13).



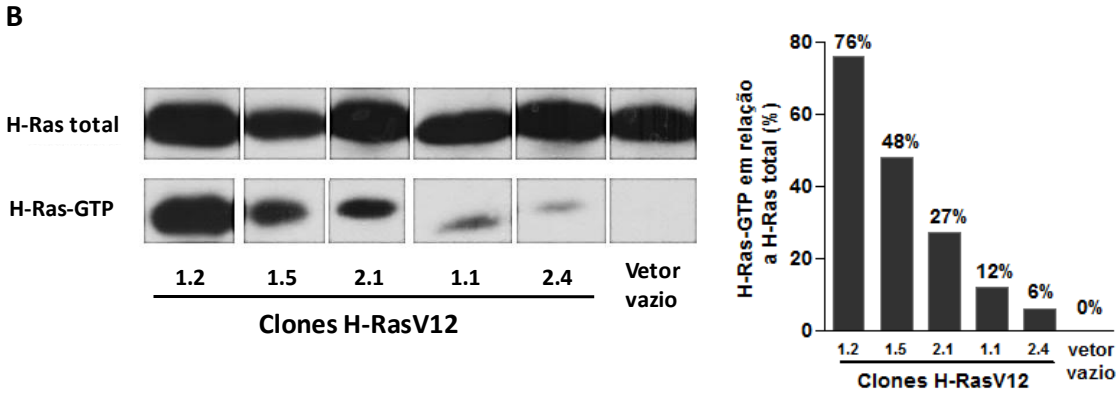


Figura 4.11. Clones de células HaCaT expressando H-RasV12 constitutivamente são sensíveis a PMA. A) Curvas de crescimento com HaCaT transduzidas com vetor pBaBe sem inserto (HaCaT vetor vazio) e clones transfectados com pBaBe H-RasV12 (HaRas1.1, HaRas1.2, HaRas1.5, HaRas2.1 e HaRas2.4) na presença e ausência de PMA a 10 ng/ml. Foram plaqueadas cerca de 10.000 células por poço em placa de 12 poços, sendo o tratamento adicionado em meio completo e renovado a cada dois ou três dias; os asteriscos indicam os pontos das curvas tratadas com PMA cuja diferença com o controle sem tratamento foi considerada significante (*** para p<0,001) B) *Pull down* de H-Ras-GTP seguido de *western blot* para H-Ras de extrato proteico dos mesmos clones e controle vetor vazio, evidenciando a presença de H-Ras ativo; as células foram lisadas após as culturas atingirem confluência; Abaixo está apresentada a relação aproximada dos níveis de H-Ras-GTP em relação a H-Ras total, em porcentagem, obtida por densitometria de bandas de mesmo filme.

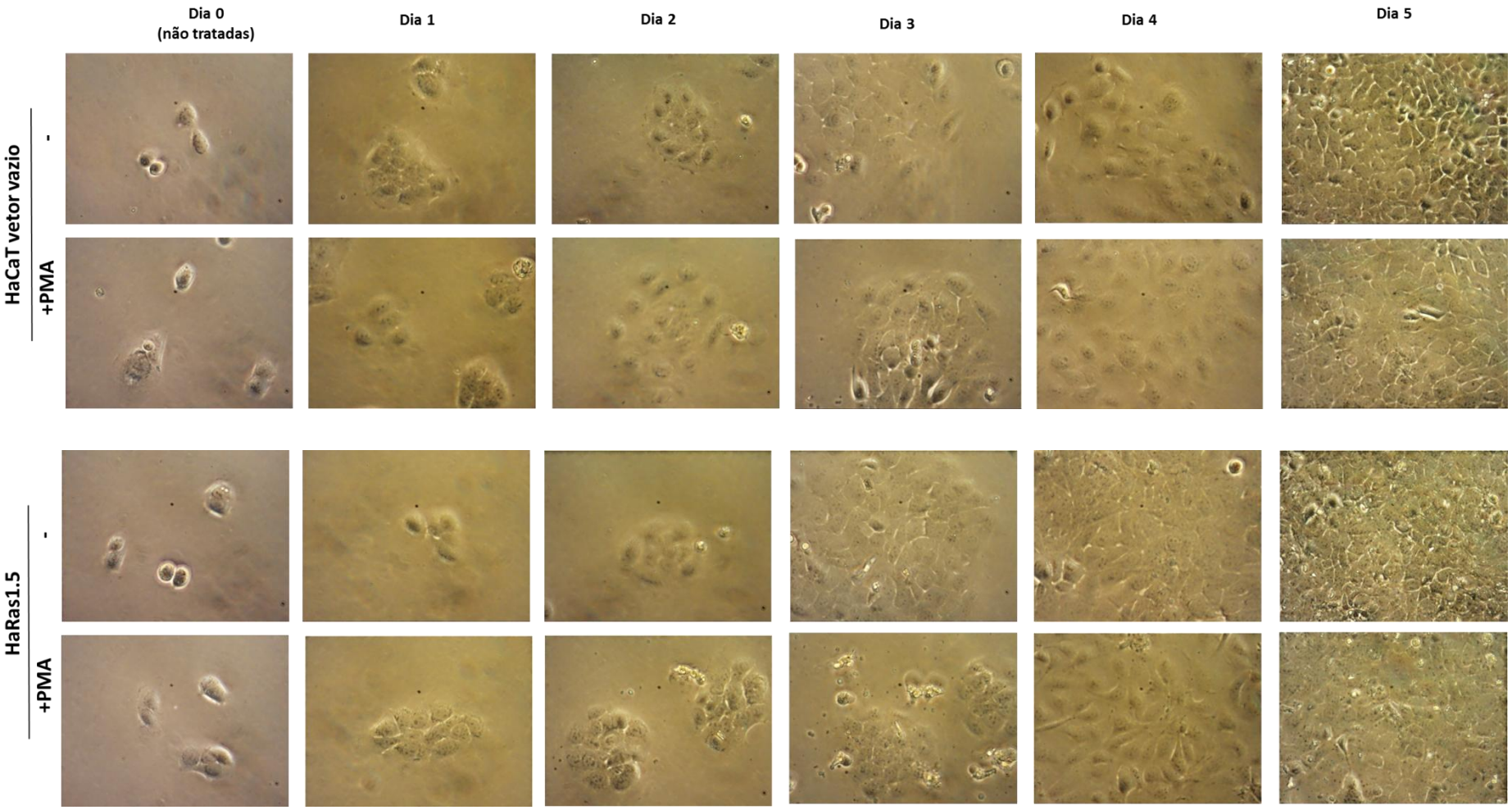


Figura 4.12. Aspecto morfológico das células HaCaT contendo vetor vazio e clone HaCaT H-RasV12 (HaRas1.5) cultivadas na presença e ausência de PMA por cinco dias. Foram plaqueadas cerca de 50.000 células por poço em placa de seis poços e, no dia seguinte (tempo 0), foi adicionado PMA a 10 ng/ml apenas nas placas da condição tratada. As imagens estão em aumento de 200 X.

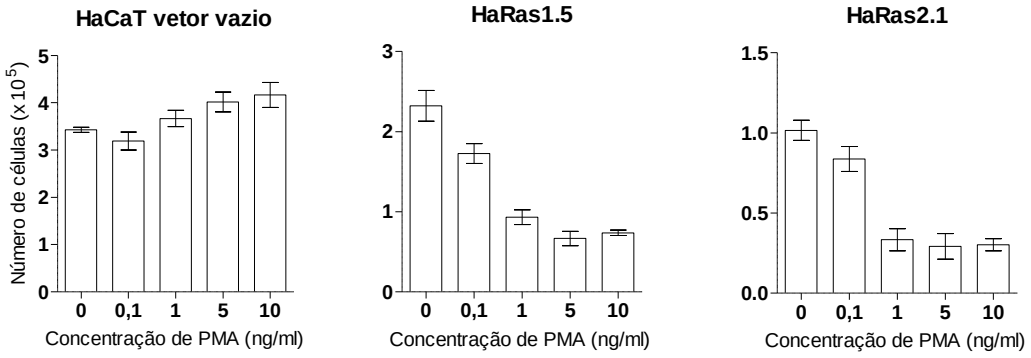


Figura 4.13. Clones HaCaT H-RasV12 são sensíveis a baixas concentrações de PMA. Curva dose-resposta de HaCaT transduzida com pBaBepuro sem inserto (HaCaT vetor vazio) e clones HaRas1.5 e HaRas2.1. Foram plaqueadas cerca de 10.000 células em placas de 12 poços, sendo o meio com os tratamentos sustentados por cinco dias e renovados após dois dias do plaqueamento. Os asteriscos indicam comparações significantes (* para p<0,05; ** para p <0,01; *** para p<0,001) entre a condição não tratada e as tratadas com as respectivas concentrações de PMA.

De acordo com os resultados expostos na figura 4.13, a partir de 1 ng/ml (1,62 nM) de PMA clones HaCaT H-RasV12 já apresentam inibição da proliferação, efeito semelhante com concentrações 10 X maiores do composto. PMA parece estimular a proliferação de células contendo apenas o vetor vazio, apesar desse aumento só ser estatisticamente significante (p<0,05) a 10 ng/ml. Ao constatar que HaCaT H-RasV12 são sensíveis a concentrações tão baixas quanto 1,6 nM de PMA e que concentrações maiores desse composto não aumentam sua sensibilidade, tais indícios sugerem que ele estaria agindo por meio de interação a um ligante intracelular cuja saturação já seja atingida a essa concentração. Como é bem conhecido que PMA é um agonista de PKCs, é bem provável que seja por meio dessas proteína-quinases que seu efeito seja promovido.

4.2.2 A sensibilidade de HaCaT H-RasV12 a PMA é dependente de PKC

A ativação de PKC foi confirmada indiretamente por meio de fosforilação de ERK em 15 minutos após adição de PMA, tanto em células HaCaT vetor vazio quanto em clone H-

RasV12, ambas previamente carenciadas por 48h (figura 4.14 A). Com o intuito de verificar se a sensibilidade de clones HaCaT H-RasV12 ao efeito antiproliferativo PMA é dependente da ativação de PKC, foram feitos ensaios clonogênicos e curvas de crescimento na presença de PMA e/ou os inibidores de PKC Gö6983 e bisindolilmaleimida I (figura 4.14 B, C e D).

Na presença de PMA o número de colônias formadas em ensaio clonogênico com HaRas1.5 e HaRas2.1 foi consideravelmente reduzido quando comparado com o controle não-tratado (figura 4.14 B e C). As curvas de crescimento dos clones HaCaT H-RasV12 tratados apenas com PMA e tratados com PMA mais inibidores de PKC (Gö6983 e bisindolilmaleimida I) foram todas significativamente diferentes ($p < 0,05$) e claramente é possível observar a reversão de seu efeito. Esses resultados sugerem que a inibição da proliferação de HaCaT H-RasV12 por PMA é dependente da ativação de PKC. Interessantemente, a inibição sustentada de PKC, que pode ser observada nas curvas de crescimento do vetor vazio com ambos inibidores, resulta em aumento na proliferação dessas células.

4.2.3 PMA inibe o crescimento de queratinócitos H-RasV12 em suspensão de agarose e sua capacidade de estratificação em cultura organotípica

O grau de crescimento independente de ancoragem é uma forma de predizer o potencial tumoral e metastático *in vivo*. Uma maneira de se avaliar isso é submetendo células a ensaio clonogênico em suspensão de agarose (Li et al 1989). Clones HaCaT H-RasV12 foram testados por meio desse ensaio na presença e ausência de PMA para avaliar dois aspectos: a) se eles são capazes de crescer em suspensão de agarose; b) se PMA inibe o desenvolvimento de colônias em número e/ou tamanho.

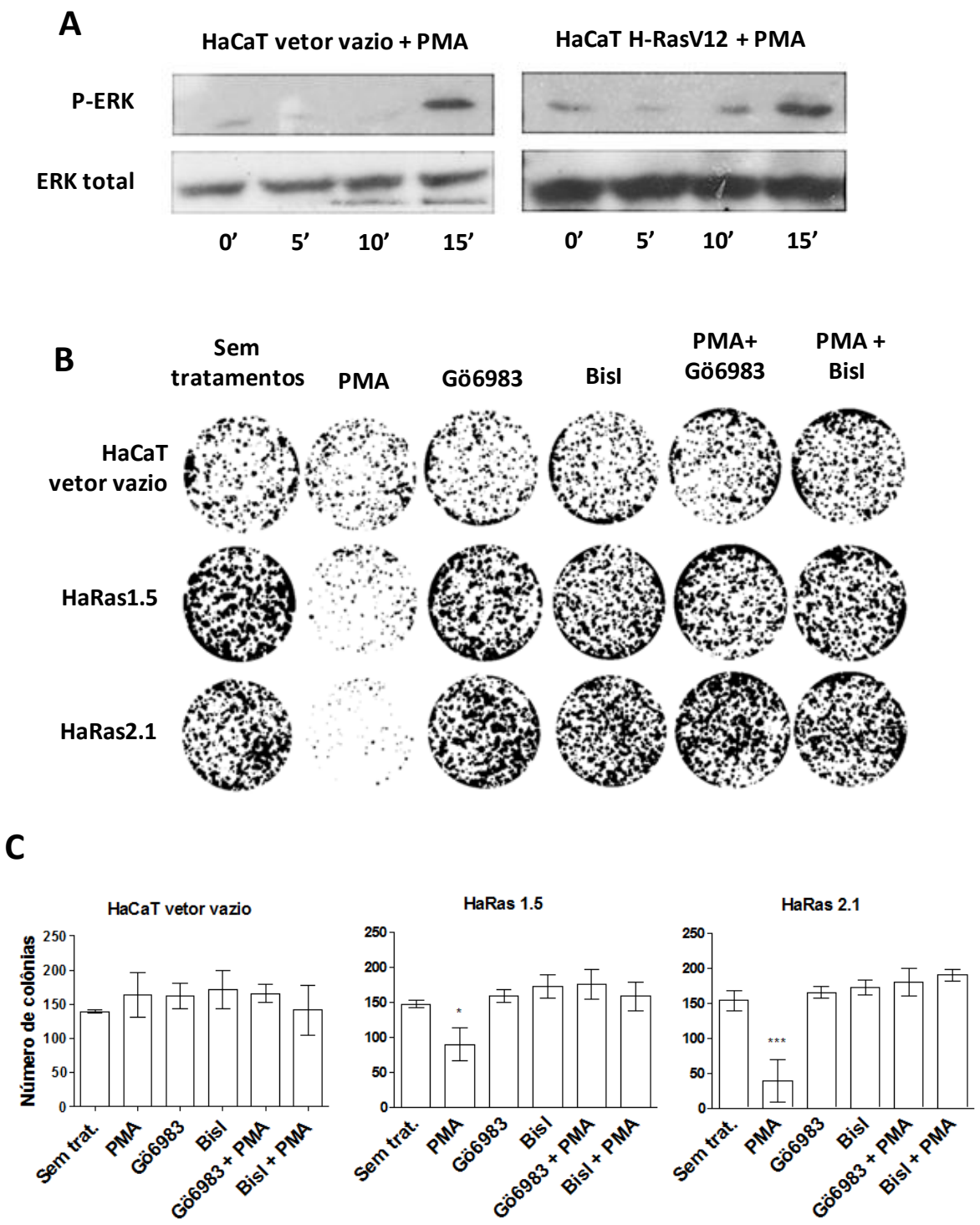


Figura 4.14. Continua na próxima página.

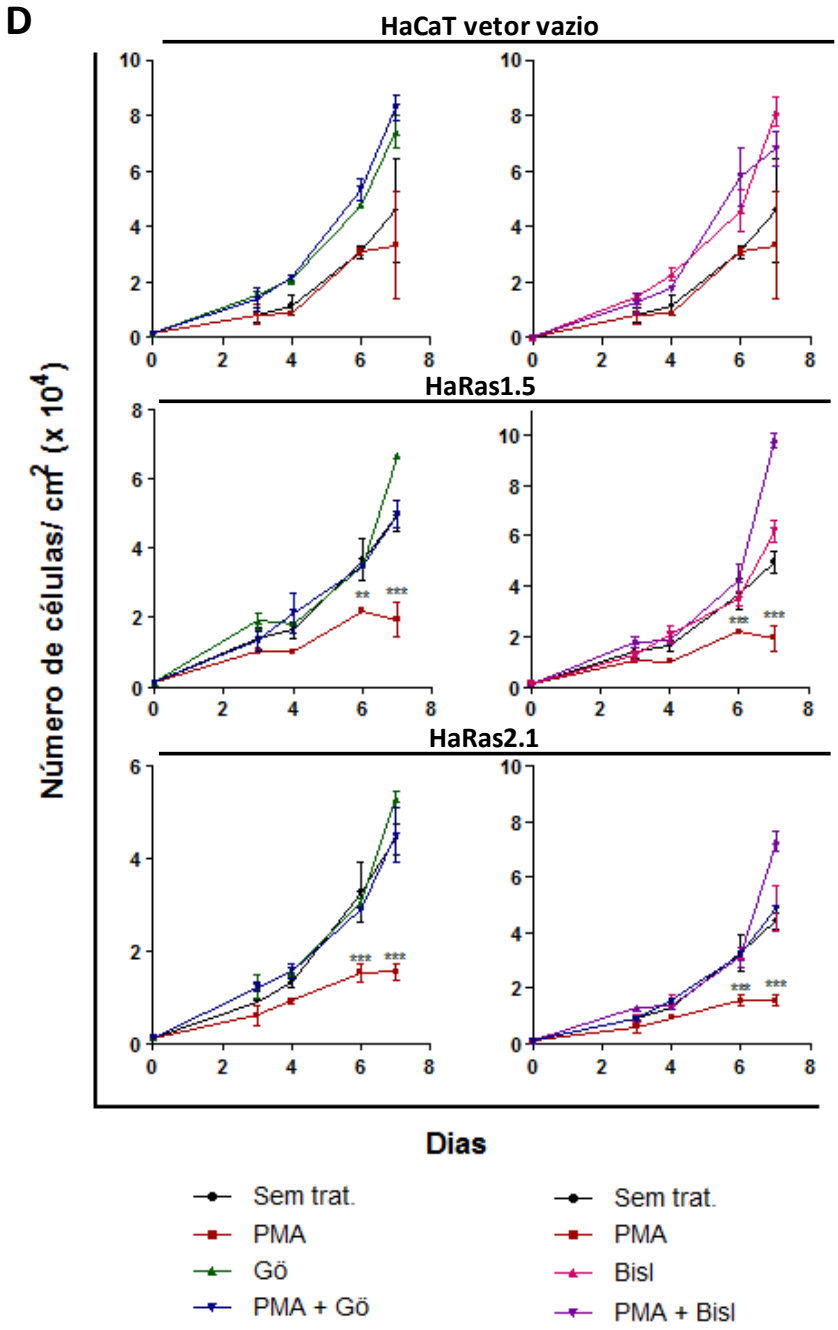


Figura 4.14. **Inibidores de PKC revertem a sensibilidade de queratinócitos H-RasV12 a PMA.** A) *Western blot* mostrando a ativação de ERK1/2 após 15 minutos de tratamento com 10 ng/ml de PMA em células previamente carenciadas por 48h; B) Ensaio clonogênico com HaCaT contendo vetor vazio e clones H-RasV12 (HaRas1.5 e HaRas2.1) com tratamento sustentado contendo 10 ng/ml de PMA e/ou inibidores de PKC (Gö6983 e Bisindolilmaleimida I - BisI, ambos a 1µM); C) Gráfico de barras mostrando a quantificação das colônias do ensaio clonogênico mostrado em B, sendo os valores representados como média ± d.p., n=2; Os asteriscos indicam comparações significantes (* para p<0,05; ** para p <0,01; *** para p<0,001) entre a condição não tratada e os respectivos tratamentos; D) Curvas de crescimento com HaCaT vetor vazio e clones H-RasV12 na presença e ausência de PMA a 10 ng/ml e/ou os inibidores de PKC indicados, sendo cada ponto da curva representado como média ± d.p., n=2; foram plaqueadas cerca de 10.000 células por poço em placas de 12 poços e o meio com os tratamentos foram renovados a cada dois ou três dias; os asteriscos indicam os pontos das curvas tratadas com PMA cuja diferença com o controle sem tratamento foi considerada significante (* para p<0,05; ** para p <0,01; *** para p<0,001); Gö = Gö6983; BisI = Bisindolilmaleimida I.

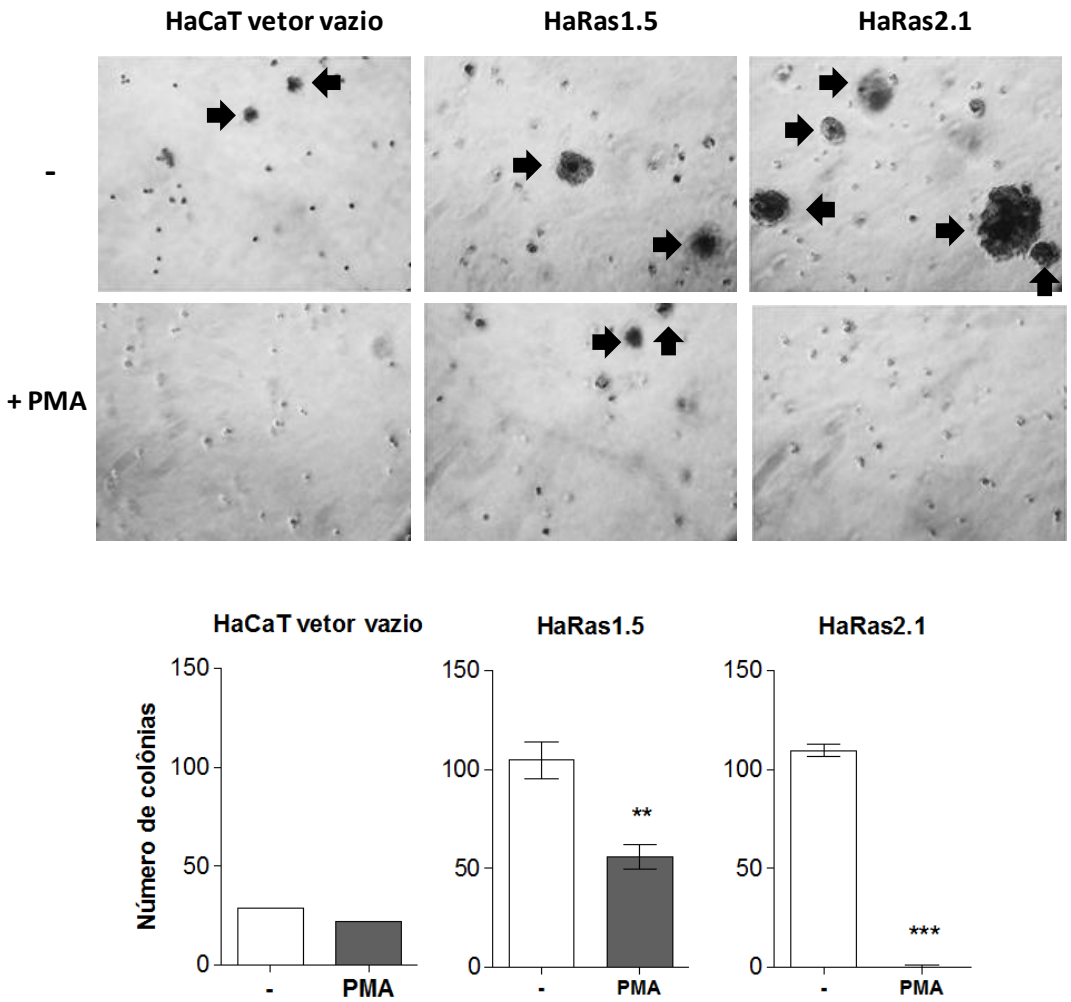


Figura 4.15. PMA inibe o crescimento em suspensão de agarose de clones HaCaT H-RasV12. Ensaio clonogênico em suspensão de agarose com HaCaT vetor vazio e clones H-RasV12 após cultivadas por 30 dias na presença e ausência de 10 ng/ml de PMA. Acima, micrografias das culturas para ilustrar o aspecto e tamanho das colônias formadas em cada condição, conforme indicado (aumento de 200X); as setas indicam o que foi considerado colônia nos campos mostrados, para exemplificar; Abaixo, enumeração das colônias contadas em cinco pontos diferentes por toda profundidade da agarose. Para este ensaio foram plaqueadas 10.000 células por poço em placas de 24 poços, sendo os valores representados como média ± d.p., n=3. Os asteriscos indicam comparações significantes (** para p <0,01; *** para p<0,001) entre a condição não tratada e tratada com PMA, analisado por teste-t.

Como mostrado na figura 4.15, na ausência de PMA os clones H-RasV12 desenvolvem colônias grandes e numerosas, enquanto que em sua presença poucas ou nenhuma colônia se formou. No caso do clone HaRas1.5, as colônias que conseguiram crescer na presença de PMA foram menores do que as formadas em sua ausência. No controle vetor vazio, ocorreram apenas pequenos aglomerados celulares pouco freqüentes que foram considerados colônias, conforme mostrado na micrografia da figura 4.15.

A técnica de cultura organotípica permite que queratinócitos diferenciem e estratifiquem em camadas semelhantes ao de uma epiderme normal. Apesar da linhagem de queratinócitos HaCaT não desenvolver todos os traços fenotípicos de uma epiderme diferenciada em cultura organotípica (Schoop et al 1999), ela tem a vantagem de permitir a expressão de oncogenes como H-RasV12 sem sofrer senescência, motivo de terem sido usadas aqui. HaCaT vetor vazio e clone H-RasV12 foram mantidas por nove dias sobre equivalente dérmico de colágeno e fibroblastos nas condições descritas na seção 3.1.6 de materiais e métodos para formação de *rafts* (figura 4.16). As células controle (vetor vazio) estratificaram em algumas poucas camadas tanto na presença quanto na ausência de PMA. Já o clone H-RasV12 apresentou um padrão hiperplásico quando comparado ao vetor vazio, o qual foi inibido no tratamento com PMA.

Tanto os resultados com ensaio clonogênico em suspensão de agarose quanto os com cultura organotípica podem servir como prenúncio da eficácia de PMA em ensaios *in vivo*. Analisando apenas os resultados das curvas de crescimento, poderíamos pensar que esse composto não teria muita aplicabilidade para uso terapêutico, pois nessas células não se observa o tão esperado efeito “tudo ou nada”. No entanto, os resultados apresentados nesta seção, ao contrário disso, mostram o quão relevante poderia ser o uso desse composto, pelo menos a princípio, em neoplasias semelhantes ao aqui testado, ou seja, de origem epitelial e com mutação em Ras. Isso incentivou o avanço das demais investigações para melhor caracterizar o fenômeno observado.

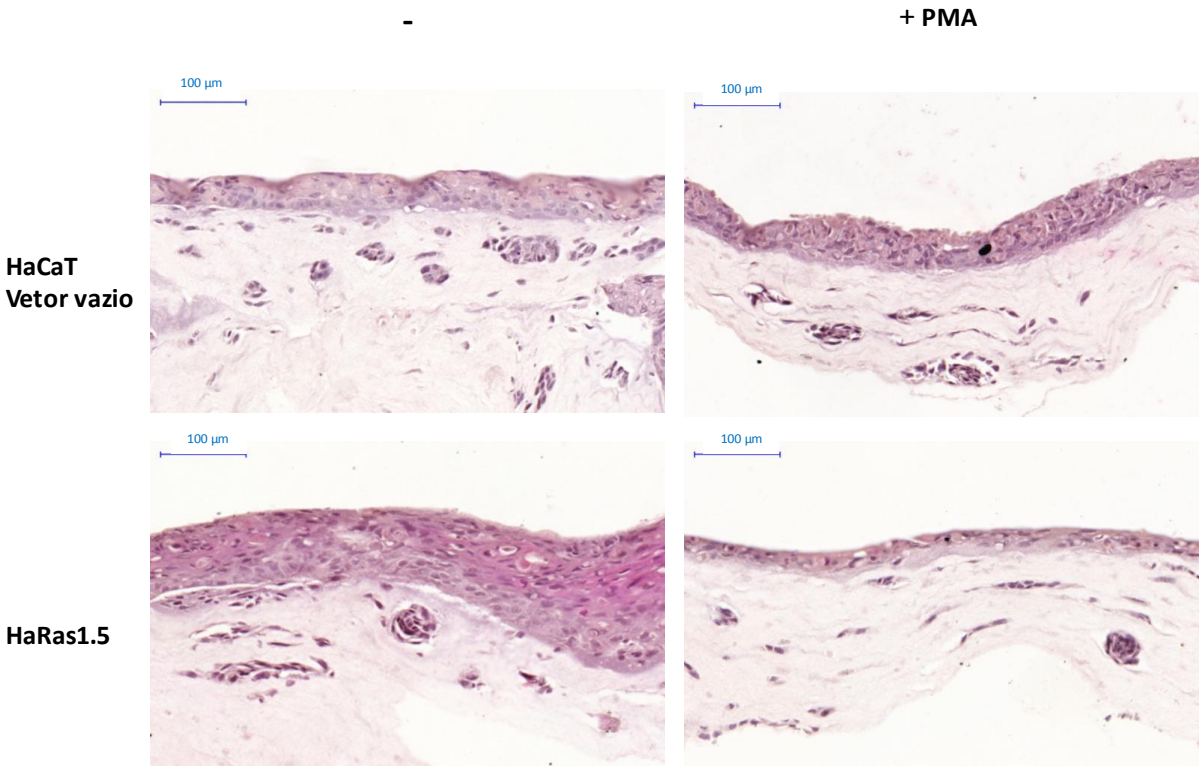


Figura 4.16. Cultura organotípica de células HaCaT. Células vetor vazio e clone H-RasV12 (HaRas1.5) foram cultivadas por 9 dias na presença e ausência de PMA; as imagens são representativas de dois *rafts* independentes para cada condição. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

4.2.4 PMA estimula a progressão do ciclo celular em HaCaT mas inibe clones H-RasV12

Para determinar se PMA promove alguma alteração na progressão do ciclo celular em HaCaT e subclones H-RasV12, foi realizado ensaio de incorporação de BrdU bem como marcação de DNA total dessas células após cinco dias na presença e ausência de PMA (figura 4.17). Bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo de timidina, foi adicionado trinta minutos antes da fixação das células. Os resultados apresentados indicam que PMA de fato reduz a porcentagem de células H-RasV12 em fase S, enquanto que aumenta consideravelmente a população com conteúdo de DNA menor do que G_1, indicativo de morte.

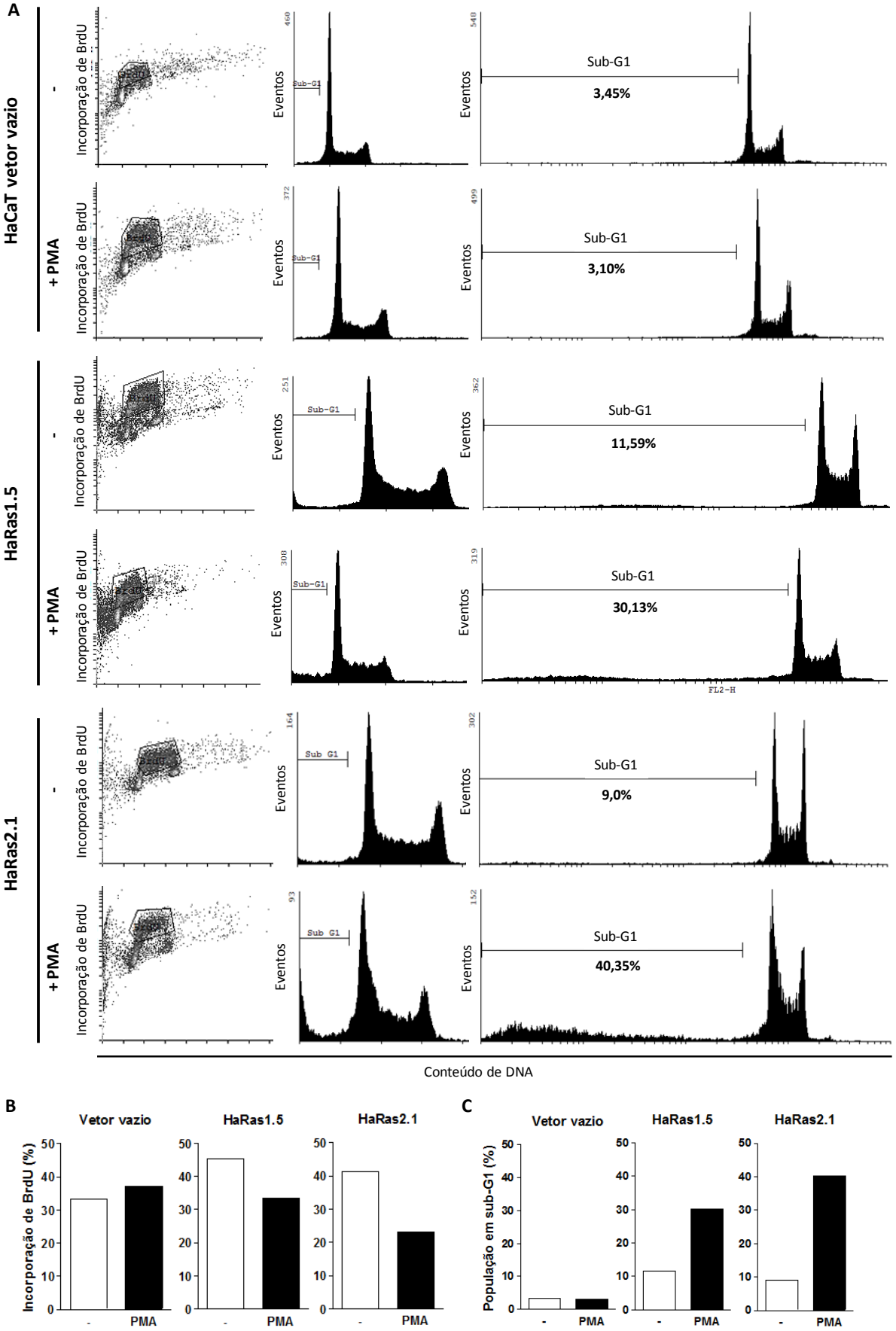

A
HaCaT vetor vazio
-
+ PMA
HaRas1.5
-
+ PMA
HaRas2.1
-
+ PMA
Incorporação de BrdU
Eventos
Sub-G1
3,45%
3,10%
11,59%
30,13%
9,0%
40,35%
Conteúdo de DNA
B
Vetor vazio
HaRas1.5
HaRas2.1
Incorporação de BrdU (%)
C
População em sub-G1 (%)
PMA

Figura 4.17. PMA inibe proliferação e induz o acúmulo de clones H-RasV12 em sub-G1. Citometria de fluxo com células HaCaT transduzidas com vetor vazio e clones H-RasV12 na presença de 10 ng/ml de PMA por cinco dias, sendo BrdU adicionado 30 minutos antes da fixação; o meio de cultura com os tratamentos foi trocado uma única vez durante o ensaio, no terceiro dia após o tratamento; A) Gráficos de densidade (gráficos da esquerda) representando incorporação de BrdU (eixo y) e conteúdo de DNA (eixo x, marcação com iodeto de propídio); ao lado estão representados histogramas de conteúdo de DNA em escala linear (gráficos do centro) e logarítmica (gráficos da direita); B) Quantificação dos gráficos de densidade como porcentagem de células que incorporaram BrdU; C) Quantificação da população Sub-G1 mostrada nos histogramas, expresso em porcentagem; Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.

As células vetor vazio, em oposição, apresentaram um ligeiro aumento na incorporação de BrdU, enquanto que a porcentagem da população sub-G_1 não foi alterada (figura 4.17). Ambos os clones, mesmo na condição não tratada, apresentam população sub-G_1 aumentada quando comparado às células vetor vazio, o que poderia ser consequência do estresse oncogênico causado pela expressão de H-RasV12.

A fim de verificar se PMA promove aumento de população com DNA fragmentado (sub-G_1) quando sustentado por períodos mais curtos, o conteúdo de DNA total foi verificado em células tratadas ou não com PMA por 24h, 48h e 72h. Como evidenciado na figura 4.18, a partir de 24h há um aumento gradual de HaCaT H-RasV12 em sub-G_1, enquanto não se observam alterações nas células vetor vazio.

Com o intuito de saber se PMA é capaz de estimular clones H-RasV12 a entrar em fase S antes de desencadear seu efeito tóxico, HaCaT vetor vazio e clones H-RasV12 foram previamente carenciadas em meio sem soro por 48h para mantê-las quiescentes (sincronizadas em fase G_0) e posteriormente reestimuladas com PMA na ausência e presença de soro fetal bovino por 16h, juntamente com BrdU. Nas células vetor vazio PMA foi capaz de estimular incorporação de BrdU tanto quando o reestímulo foi feito na presença ou ausência de soro (figura 4.19 A). Já nos clones HaRasV12, a porcentagem da população que entrou em S foi reduzida com PMA. A despeito do controle vetor vazio, nos clones H-RasV12,

PMA aumentou em cerca de uma vez e meia a porcentagem da população sub-G_1 (figura 4.19 B), enquanto que a distribuição em G_1 e G_2 se manteve.

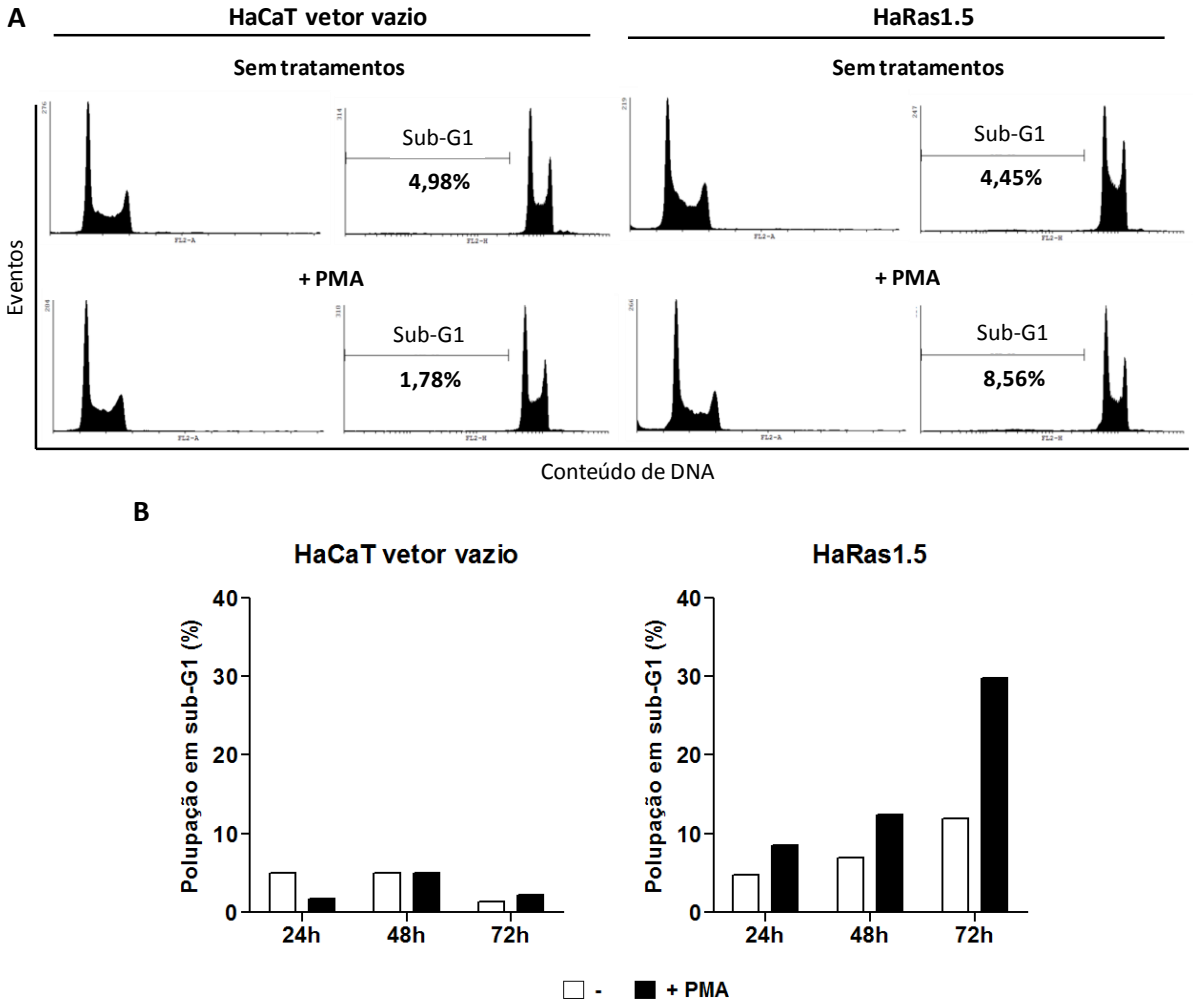


Figura 4.18. A sensibilidade de clones H-RasV12 a PMA já é perceptível em 24h de tratamento. Citometria de fluxo com células HaCaT transduzidas com vetor vazio e clones H-RasV12 na presença de 10 ng/ml de PMA; A) Histogramas de conteúdo de DNA total por célula, detectado por marcação com iodeto de propídio, em HaCaT vetor vazio e clone H-RasV12 após 24h de tratamento, evidenciando um aumento da população sub-G_1 no clone quando tratado com PMA; B) Porcentagem da população sub-G_1 em HaCaT vetor vazio e clone H-RasV12 na presença e ausência de PMA por 24h, 48h e 72h.

Foi avaliada também a capacidade de entrada em mitose na presença de PMA por meio de marcação de fosfo-histona H3. As células foram carenciadas por 48h na ausência de soro e reestimuladas por 27h. Para contabilizar toda a população que alcançou mitose, foi adicionado colchicina nas seis horas que antecederam o fim do estímulo (figura 4.20).

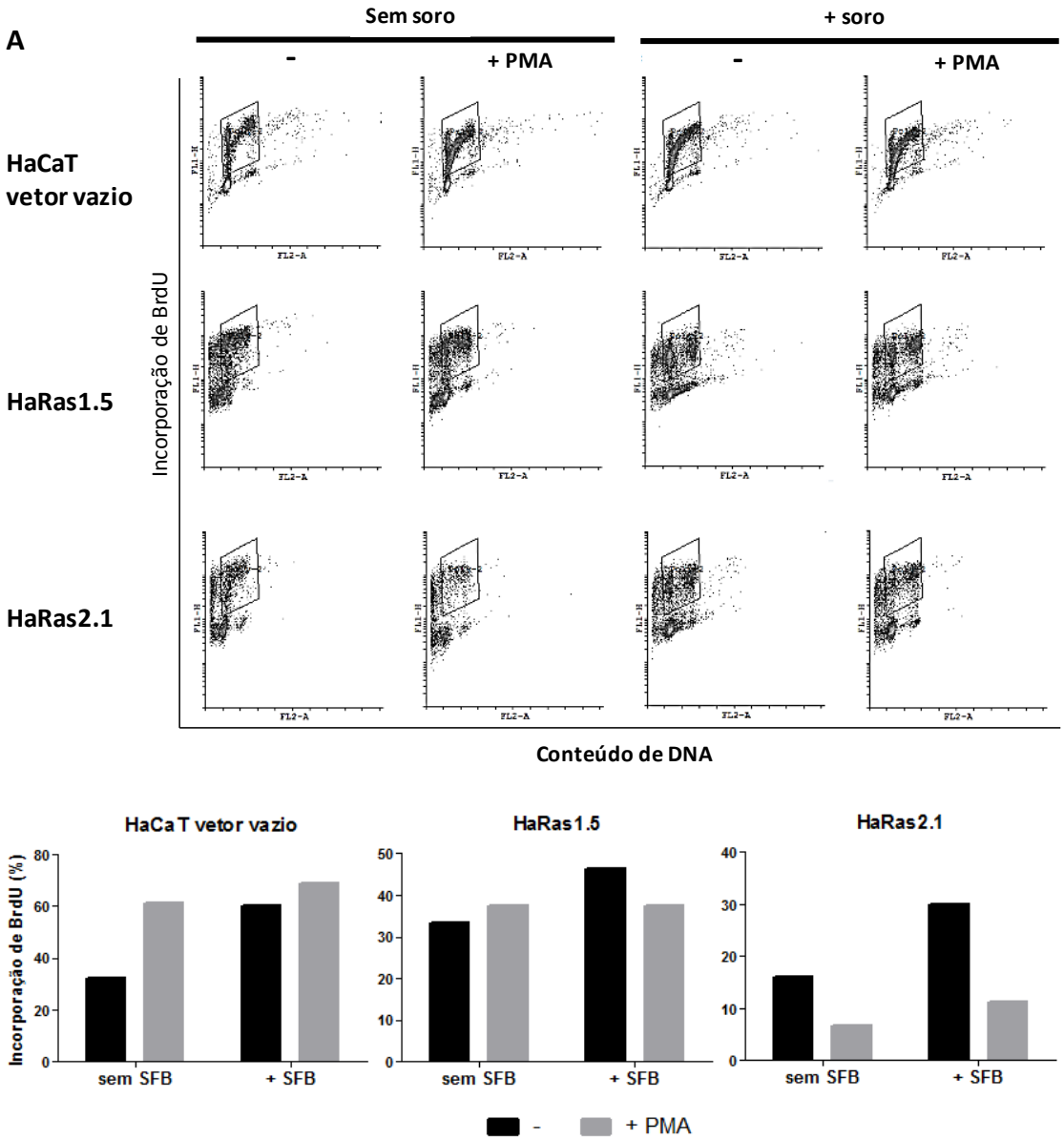


Figura 4.19. Continua na próxima página.

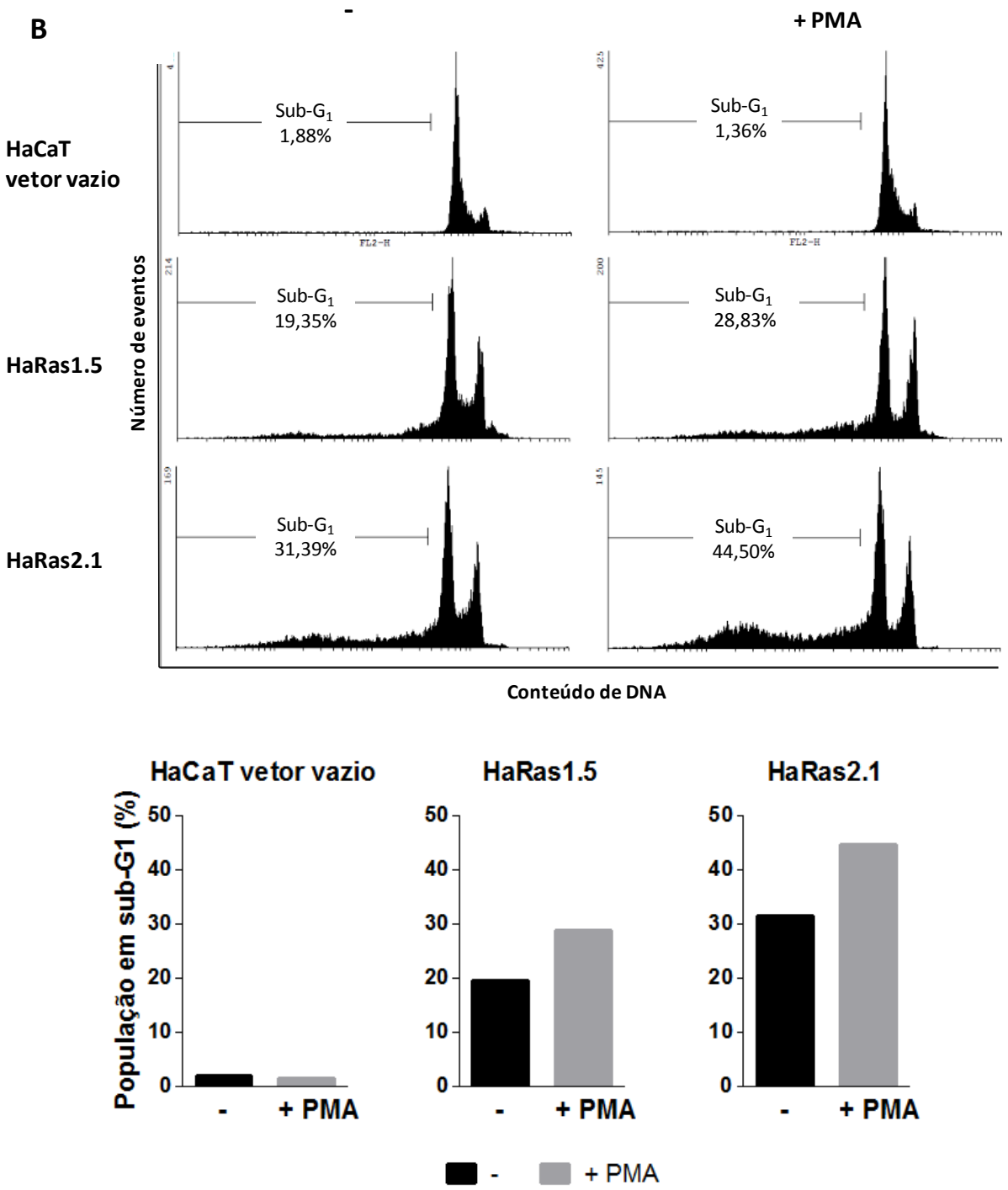


Figura 4.19. PMA inibe população de clones H-RasV12 sincronizados em G_0 a entrar em S após reestímulo. Citometria de fluxo com células HaCaT transduzidas com vetor vazio e clones H-RasV12 previamente sincronizados em G_0 por meio de carenciamento por 48h em meio livre de soro; as células foram reestimuladas com e sem PMA (10 ng/ml), na presença ou ausência de soro fetal bovino (SFB), conforme indicado, e mantidas na presença de BrdU por 16h. A) Gráficos de densidade representando incorporação de BrdU e conteúdo de DNA total pela marcação com iodeto de propídio; abaixo estão apresentados os gráficos contendo a quantificação das células positivas para incorporação de BrdU em cada condição; B) Histograma de conteúdo de DNA (marcação com PI) dos ensaios de reestímulo na presença de soro fetal bovino apresentados em A; abaixo estão apresentados os gráficos contendo a quantificação da população sub-G_1 em cada condição.

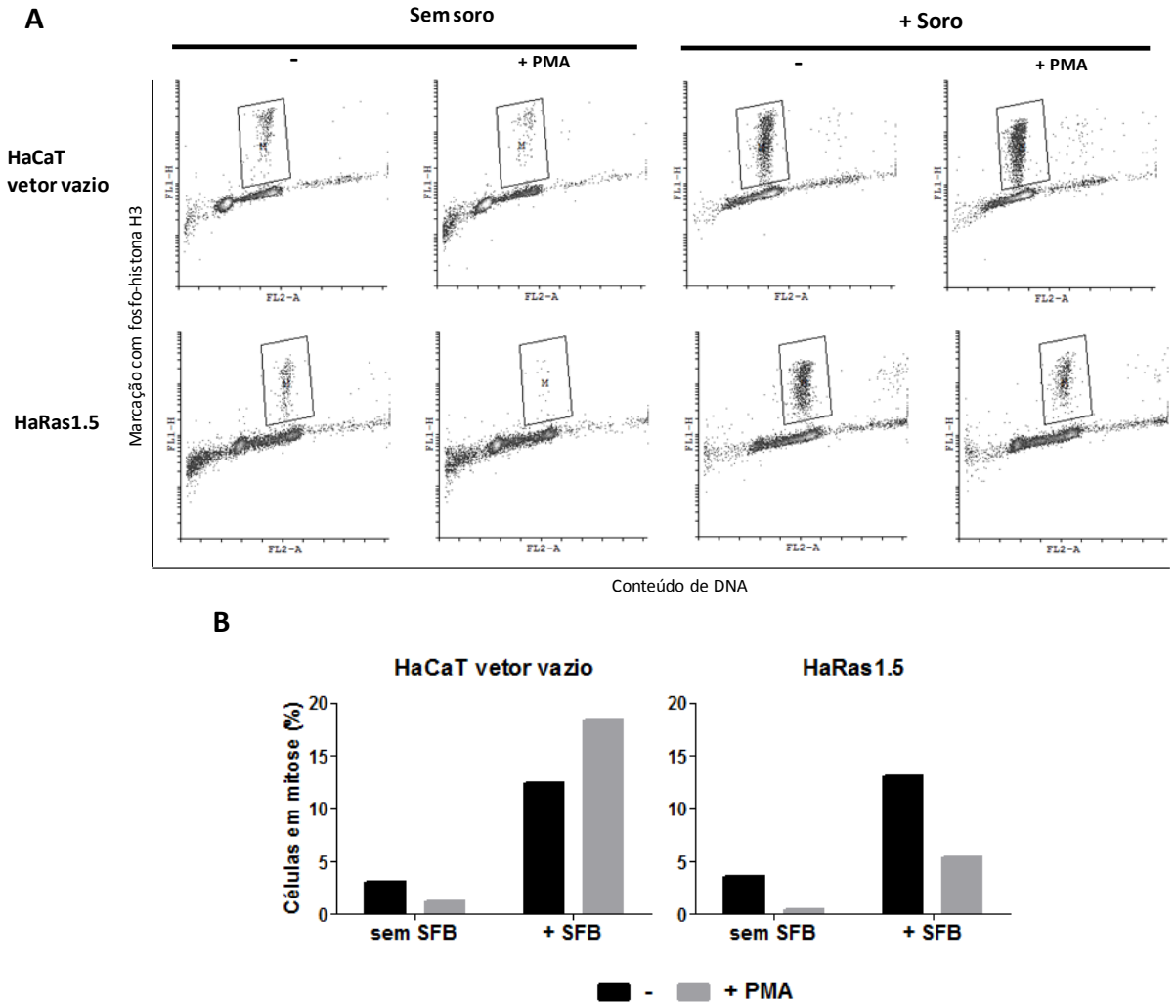


Figura 4.20. PMA diminui população de clone H-RasV12 sincronizados em G_0 a entrar em mitose após reestímulo. Citometria de fluxo com células HaCaT transduzidas com vetor vazio e clone H-RasV12 (HaRas1.5) previamente sincronizadas em G_0 por meio de carenciamento por 48h em meio livre de soro. Posteriormente as células foram estimuladas com PMA, quando indicado, na presença e ausência de soro fetal bovino (SFB) por 27h, sendo mantidas com 1 µg/ml de colchicina por seis horas antes da fixação para bloquear as células em mitose. A) Gráficos de densidade representando conteúdo de DNA e marcação de fosfo-histona H3; B) Porcentagem de células que entraram em mitose nas condições indicadas.

Os resultados apresentados na figura 4.20 mostram que HaCaT vetor vazio foram estimuladas a entrar em mitose na presença de PMA e soro, enquanto que HaCaT H-RasV12 foram inibidas. Em conjunto esses dados sugerem que PMA estimula células HaCaT parentais a proliferar, enquanto tem efeito tóxico em clones H-RasV12. Essa toxidez afeta as células precocemente e seu efeito parece não arrestá-las em nenhuma fase do ciclo celular, mas sim induzi-las à morte.

4.2.5 Clone HaCaT H-Ras-V12 com baixos níveis de H-Ras-GTP não é sensível a PMA

Uma observação interessante que merece destaque é a resposta de um clone de HaCaT transfectado com H-RasV12, nomeado como HaRas2.4. Na curva de crescimento da figura 4.11 (A) ele não apresentou sensibilidade a PMA, enquanto que seus níveis de H-Ras-GTP parecem ser muito baixos (figura 4.11 B). Quando refeitas, tanto a curva de crescimento quanto a quantificação específica de Ras-GTP se repete (figura 4.21 A e B). Analisando a incorporação de BrdU e conteúdo de DNA por célula após tratamento com PMA sustentado por cinco dias, não foram observadas diferenças em relação ao controle não tratado (figura 4.21 C e D). Esse conjunto de resultados pode indicar que exista um limiar de Ras ativo que condicione vulnerabilidade a PMA.

4.2.6 PMA induz apoptose independente de p53 em HaCaT H-RasV12

O aparecimento de células com DNA fragmentado, que foi observado nos ensaios apresentados nas figuras 4.17 e 4.18, é indicativo de morte celular. Utilizando substrato de caspases efetoras (CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent - Invitrogen), células HaCaT vetor vazio e HaCaT H-RasV12 foram tratadas com PMA por 24h e submetidas ao ensaio. Esses resultados (figura 4.22 A, B e C) mostram que PMA induz um aumento considerável na porcentagem de células H-RasV12 em apoptose, enquanto que células HaCaT vetor vazio não sofrem alteração.

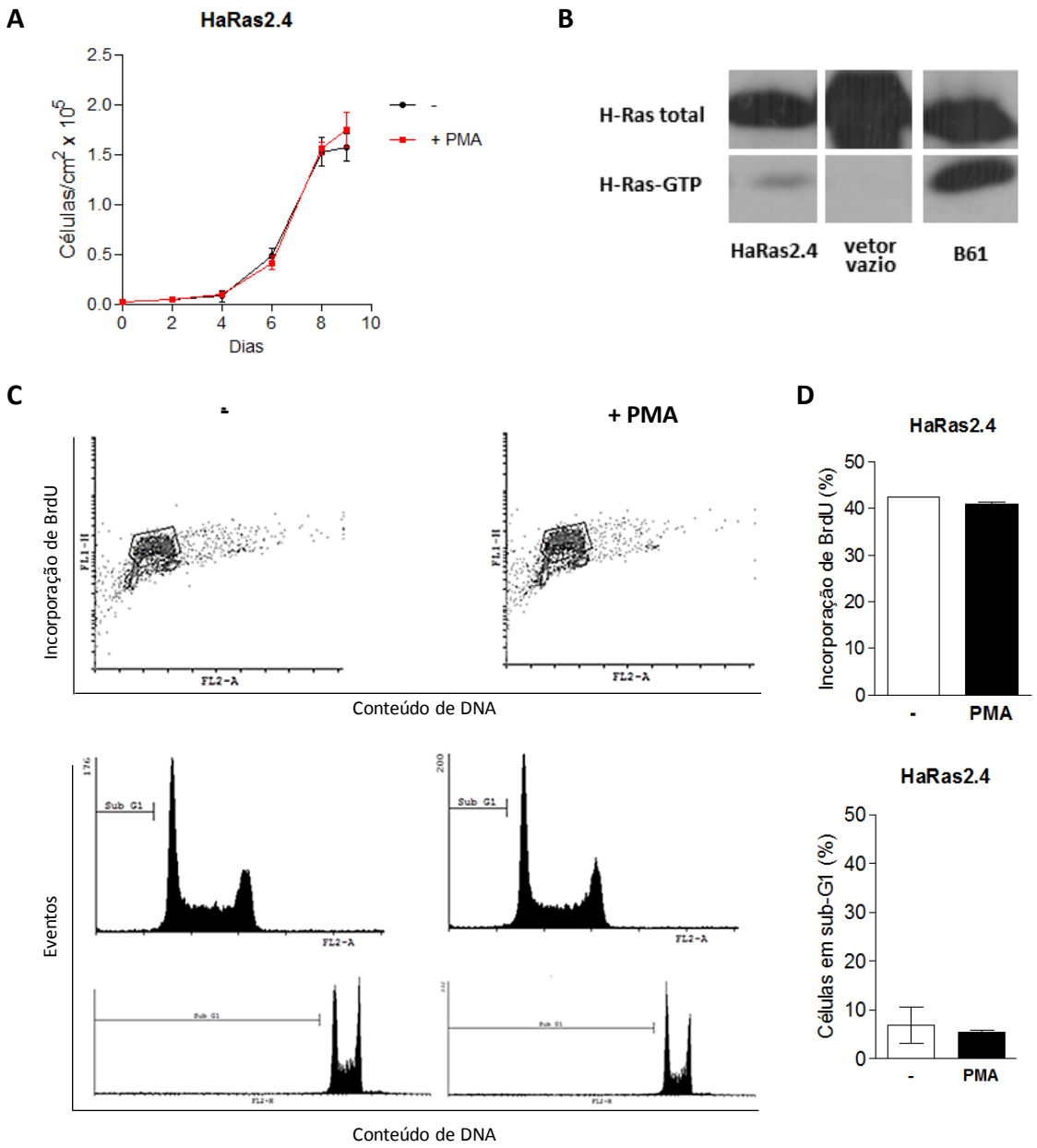


Figura 4.21. Clone HaCaT H-RasV12 que apresenta baixos níveis de H-Ras-GTP não é sensível a PMA. A) Curva de crescimento do clone HaRas2.4 na presença ou ausência de PMA; B) *Pull down* de H-Ras-GTP, evidenciando os baixos níveis de H-Ras ativo do clone HaRas2.4, a despeito do controle, células B61 (fibroblastos de camundongo 3T3 transfectados com H-RasV12); as células foram lisadas após as culturas atingirem confluência; C) Citometria de fluxo com HaRas2.4 na presença de 10 ng/ml de PMA por cinco dias, sendo BrdU adicionado 30 minutos antes da fixação; Acima, gráficos de densidade de incorporação de BrdU e conteúdo de DNA (marcação com iodeto de propídio); abaixo, histogramas de conteúdo de DNA em escala linear e logarítmica (respectivamente, de cima para baixo); D) Gráficos de barras contendo a porcentagem das células que incorporaram BrdU e da população sub-G_1 no momento da fixação; os valores estão representados como média ± d.p., n=2.

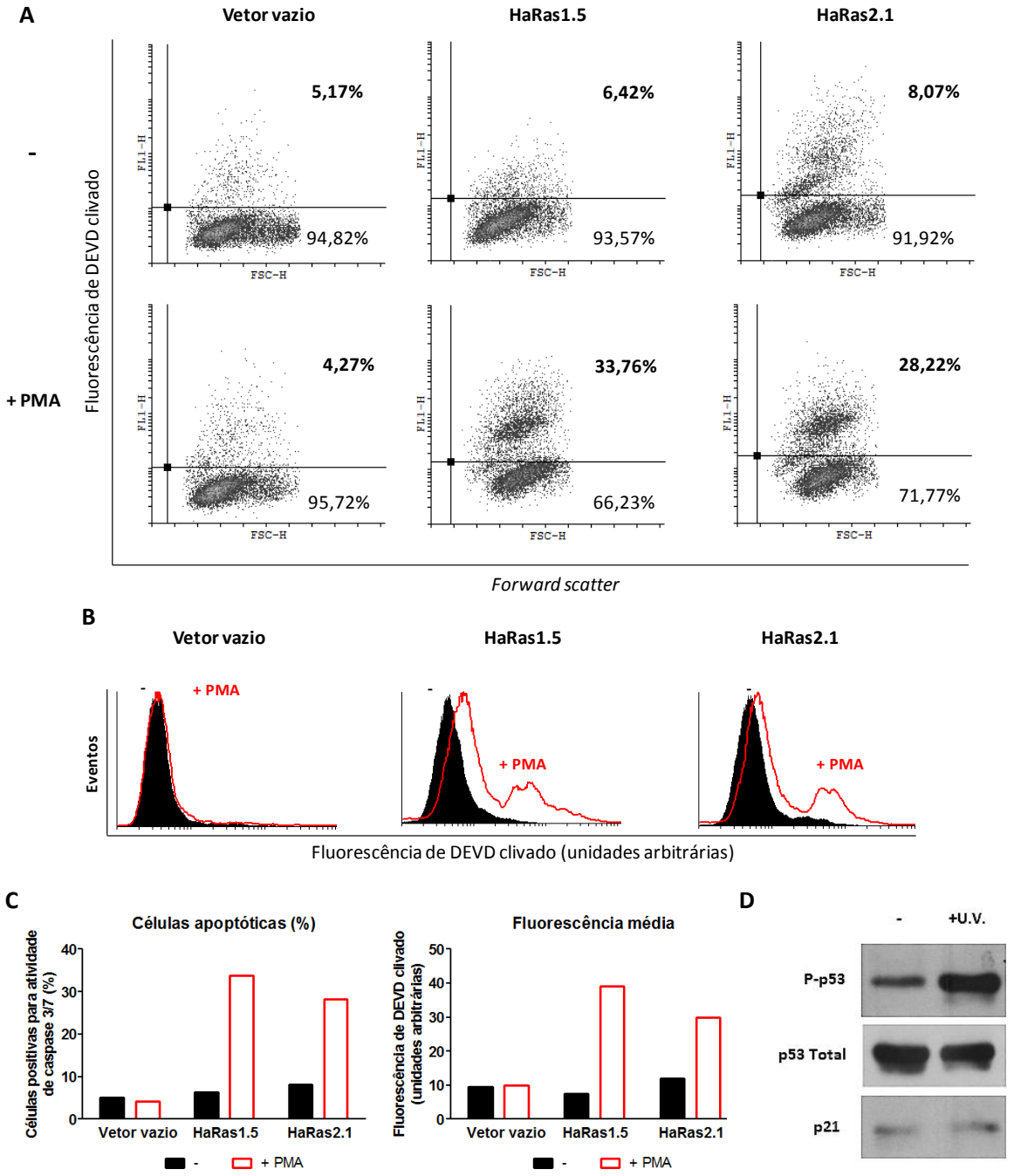


Figura 4.22. PMA induz apoptose em HaCaT H-RasV12. Células HaCaT vetor vazio e clone H-RasV12 foram mantidas na presença de PMA por 24h antes da fixação e testadas para atividade de caspase-3/7 por citometria de fluxo; A) Gráficos de densidade evidenciando células positivas para apoptose, em porcentagem; o quadrante foi ajustado com HaCaT vetor vazio na condição não tratada; B) sobreposição dos histogramas de fluorescência das células não tratadas (em preto) e das tratadas com PMA (linha vermelha); C) Gráfico de barras representando a quantificação dos gráficos de densidade e histogramas de B e C, respectivamente; D) *Western blot* para p53 fosforilada na serina 15 (P-p53), p53 total e p21 de células HaCaT submetidas a irradiação com luz ultravioleta (U.V.) por um minuto, sendo o lisado proteico extraído 16 horas após a irradiação.

Na linhagem de queratinócitos humanos HaCaT foram descritas duas mutações pontuais em p53 no domínio de ligação ao DNA, o que a torna transcricionalmente não funcional (Lehman et al 1993). Para confirmar se as células aqui usadas mantêm essa lesão gênica, HaCaT parental foram submetidas a radiação ultravioleta por 1 minuto e seu lisado protéico foi coletado após 16h. Em seguida, foi realizado *western blot* para p53 total, p53 fosforilada no resíduo serina 15 (induzido após dano no DNA) e para $p21^{CIP1}$. Como exposto na figura 4.22 D, apesar dos níveis de fosforilação de p53 aumentarem nas células irradiadas, os de p21 se mantiveram baixos. Isso indica que embora p53 mantenha a capacidade sensora de estresse, esta proteína está transcricionalmente inativa. Dessa forma é possível sugerir que a apoptose induzida por PMA nos clones HaCaT H-RasV12 é independente de p53.

4.2.7 PMA induz aumento temporário de ROS em HaCaT e aumento alto e persistente em subclones H-RasV12

Células controle e HaCaT H-RasV12 foram tratadas com PMA por 1h, 2h e 4h e incubadas com o substrato de ROS (carboxy-H2DCFDA) por uma hora antes de coletadas para análise por citometria de fluxo. Em duas horas, PMA induziu aumento de fluorescência de carboxy-DCF tanto em HaCaT vetor vazio quanto em células H-RasV12, sendo que nas últimas o efeito foi mais acentuado (figura 4.23 A e B). Vale observar que os clones H-RasV12 por si já apresentam níveis mais altos de ROS em relação às células HaCaT parentais. Quando o tratamento é sustentado por tempos maiores (aqui testado até 96h), nos clones H-RasV12 os níveis de ROS crescem, enquanto que são mantidos baixos nas células vetor vazio (figura 4.23 C).

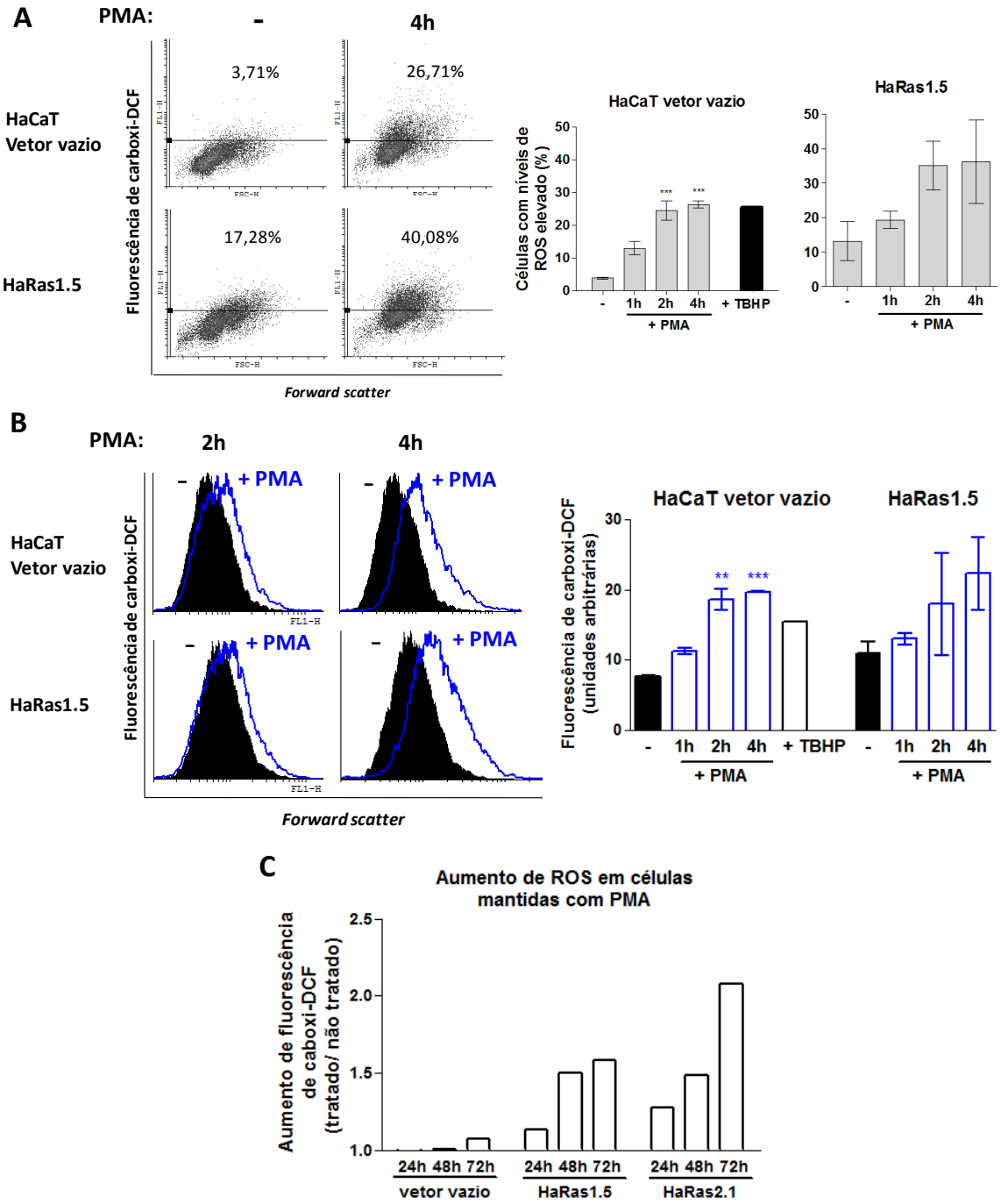


Figura 4.23. PMA induz aumento de ROS em HaCaT. Células HaCaT contendo vetor vazio e clone H-RasV12 (HaRas1.5) foram mantidos na presença de PMA por 1h, 2h e 4h, sendo o substrato de ROS (carboxy-H2DCFDA) adicionado 30 minutos antes; A) Gráficos de densidade evidenciando as células com níveis aumentados de ROS (quadrante superior direito) na população não tratada e tratada por 4h com PMA, conforme indicado; o quadrante foi ajustado com HaCaT vetor vazio na condição não tratada e mantido para as diferentes células em todas condições; ao lado, quantificação das células que apresentaram níveis aumentados de ROS, em porcentagem; TBHP (hidroperóxido tert-butil) foi usado como controle positivo; B) Sobreposição dos histogramas de fluorescência das células não tratadas (em preto) e das tratadas com PMA (linha azul); ao lado, gráfico de barras representando a fluorescência média das células não tratadas e tratadas com PMA nos tempos indicados; os valores estão representados como média ± d.p., n=2; Os asteriscos indicam comparações significantes (* para p<0,05; ** para p <0,01; *** para p<0,001) entre a condição não tratada e o tratamento nos tempos indicados; C) Ensaio em tempos maiores de tratamento com PMA; os valores estão representados como relação da fluorescência de carboxy-DCF entre a condição tratada sobre a não tratada.

Aparentemente queratinócitos HaCaT, em resposta a PMA, têm os níveis de ROS um pouco aumentados, sendo que os mesmos se restabelecem com o tempo ainda que o tratamento seja sustentado. Por outro lado, células transformadas malignamente com H-RasV12 parecem perder a capacidade de reduzir os níveis de ROS quando cultivadas continuamente na presença de PMA. Além disso, seu fenótipo transformado por si parece incluir maiores níveis de ROS intracelular. Talvez seja esse o motivo pelo qual os clones H-RasV12 apresentam sensibilidade a esse éster de forbol enquanto que as células parentais, ao contrário, são estimuladas mitogenicamente por ele.

4.3 Efeito de FGF2 e PMA em linhagens malignas humanas com mutação em Ras

Foram escolhidas treze linhagens de tumores humanos com mutação em Ras no resíduo 12, 13 ou 61: quatro com mutação em K-Ras, quatro em H-Ras e cinco em N-Ras. A seleção das linhagens foi feita por busca no banco de dados de células tumorais do COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer - *Cancer Cell Line Project, Sanger Institute*) (Forbes et al 2011). A lista das linhagens selecionadas informando seu órgão de origem, tipo de câncer, a mutação e o Ras mutado estão apresentados na tabela 6. Essas células foram testadas por curvas de crescimento nas quais FGF2 ou PMA foi sustentado até o final do ensaio, de nove a dez dias (figura 4.24). De todas, apenas UM-UC-3 foi vulnerável a FGF2, sendo as demais mitogenicamente estimuladas (Hs578T, RL95-2, HT-1197 e NCI-H1299) ou indiferentes a esse fator de crescimento. Com exceção de SK-MEL-2 e CALU-1, todas as demais linhagens foram muito sensíveis a PMA.

Tabela 6. Linhagens tumorais humanas com Ras mutado testadas para sensibilidade a FGF2 e PMA.

Linhagem	Órgão de origem	Tipo de câncer	Mutação	Ras mutado
Calu-1	pulmão	carcinoma epidermóide	p.G12Cc.34G>T	K-Ras
Capan-1	pâncreas	adenocarcinoma	p.G12Vc.35G>T	K-Ras
UM-UC-3	bexiga	carninoma de células de transição	p.G12Cc.34G>T	K-Ras
HCT-15	cólon	adenocarcinoma coloretal	p.G13Dc.38G>A	K-Ras
Hs 578T	mama	carcinoma	p.G12Dc.35G>A	H-Ras
NCI-H1915	pulmão	carcinoma de não pequenas células	p.Q61Lc.182A>T	H-Ras
T-24	bexiga	carcinoma de células de transição	p.G12Vc.35G>T	H-Ras
RPL19	útero	carcinoma	p.Q61Hc.183G>T	H-Ras
NCI-H1299	pulmão	Carcinoma de não pequenas células	p.Q61Kc.181C>A	N-Ras
HT-1197	bexiga	carcinoma	p.Q61Rc.182A>G	N-Ras
SK-MEL-2	pele	melanoma	p.Q61Rc.182A>G	N-Ras
CHP-212	cérebro	neuroblastoma	p.Q61Kc.181C>A	N-Ras
Hep G2	fígado	carcinoma hepatocelular	p.Q61Lc.182A>T	N-Ras

Mutações indicadas de acordo com as recomentações da HGV – Human Genome Variation Society: p.= descrição a nível protéico; segue aminoácido (código de uma letra) da proteína selvagem, seguido da posição na cadeia polipeptídica, seguido do aminoácido mutado; **c.=**nucleotídeo codificante; segue posição do nucleotídeo original no DNA, sendo o nucleotídeo 1 o A do códon de iniciação ATG; “>”= “substituído para”; **A**=adenina; **C**= citosina; **G**=guanina; **T**=timidina.

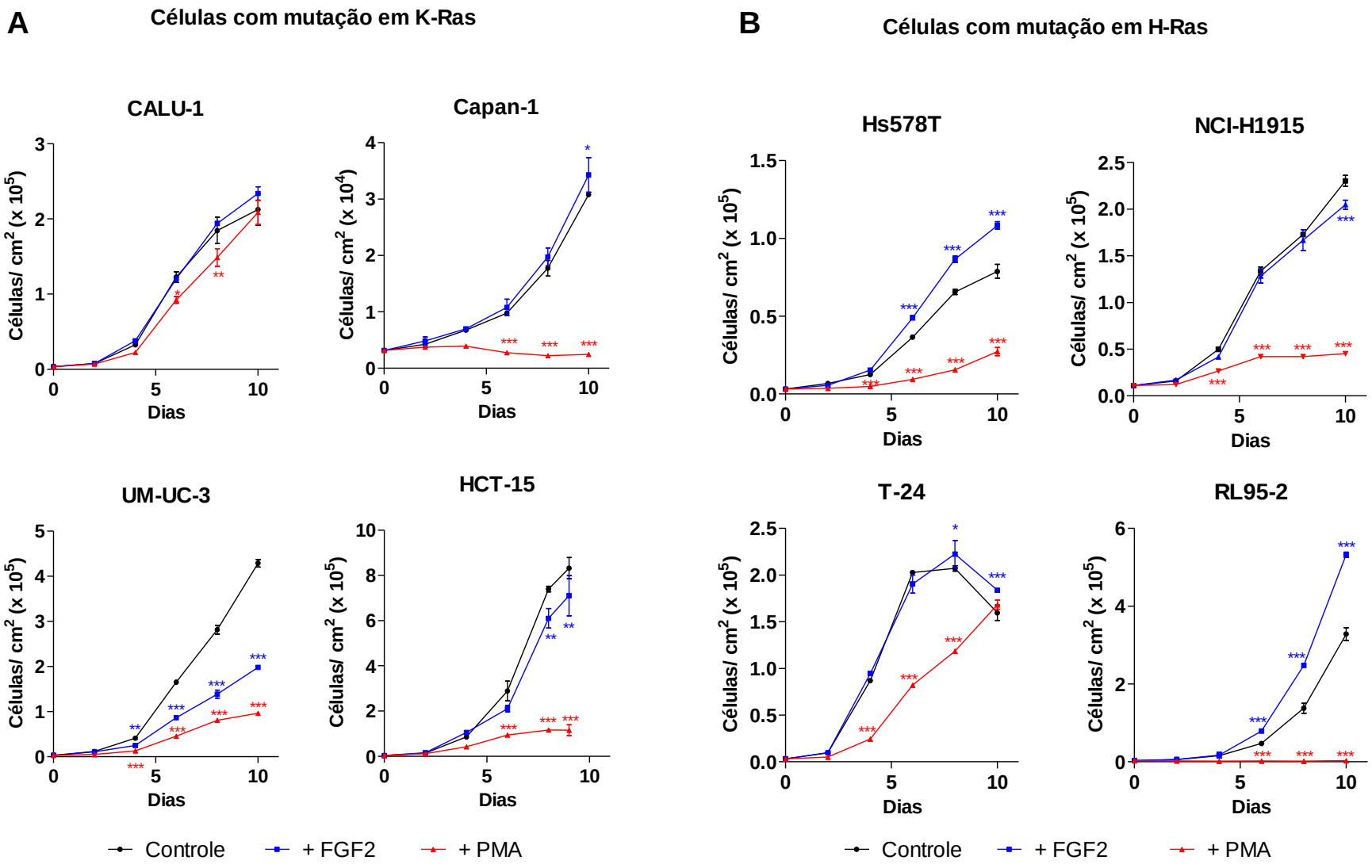


Figura 4.24. Continua na próxima página.

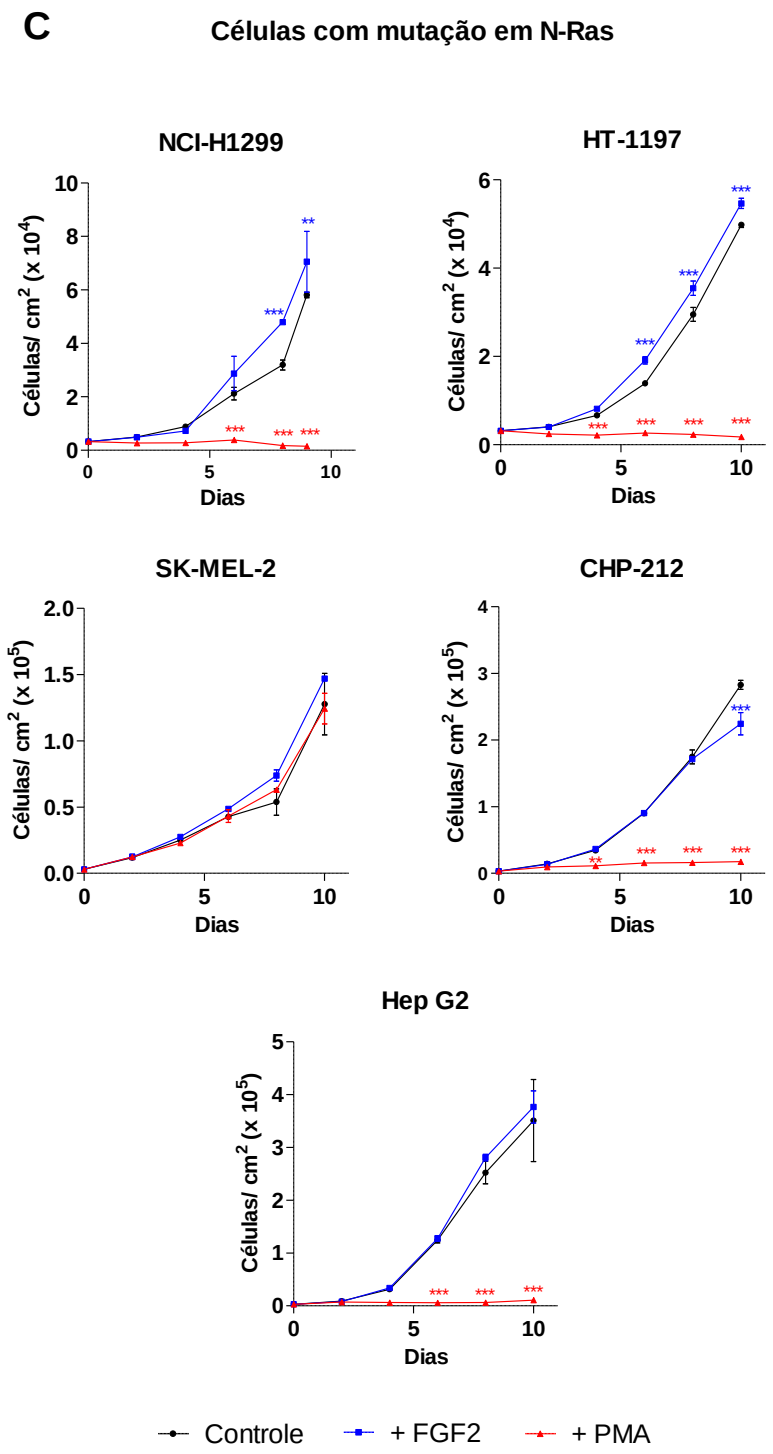


Figura 4.24. Linhagens humanas com mutação em Ras apresentam diferentes respostas a FGF2 e PMA. Curvas de crescimento com diferentes linhagens de células tumorais humanas com mutações em: A) K-Ras; B) H-Ras; C) N-Ras. Foram plaqueadas cerca de 30.000 células por poço de placa de seis poços, sendo o meio e os tratamentos renovados a cada dois dias, na ocasião da coleta de cada ponto; FGF2 e PMA foram usados a 10 ng/ml; os valores estão apresentados como média ± d.p. n=2; os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Os asteriscos indicam os pontos das curvas tratadas com FGF2 (em azul) e com PMA (em vermelho) cuja diferença com o controle sem tratamento foi considerada significante (* para p<0,05, ** para p<0,01 e *** para p<0,001).

5 DISCUSSÃO

5.1 FGFs e queratinócitos humanos

FGF2 já foi usado em ensaios clínicos para acelerar cicatrização de feridas (Robson et al 2000; Robson et al 1992), KGF promove melhora de ferida incisional em ratos (Jimenez & Rampy 1999) e FGF10 já foi descrito acelerar a cura de úlceras venosas em humanos (Robson et al 2001). FGF1 e FGF2 foram também considerados úteis no tratamento de doença coronária cardíaca (Stegmann 1998). Como o uso clínico de FGFs é promissor, o estudo de seus mecanismos de ação torna-se então uma necessidade. Contribuindo nesse sentido aqui descrevemos a presença de um receptor até o momento pouco conhecido em queratinócitos, o FGFR4, além da expressão endógena de FGF1 e FGF2 nesse tipo celular.

5.1.1 Expressão de FGFRs em queratinócitos humanos

A expressão de receptores de FGFs em queratinócitos já foi explorada anteriormente em outros estudos (Bottaro et al 1990; Pilcher et al 1997). Pilcher *et al.* (1997) detectaram a expressão de FGFR2 e FGFR3 em queratinócitos humanos, ambos identificados como isoforma IIIb, mas não detectaram FGFR1 e FGFR4. Aqui, igualmente, identificamos FGFR2 e FGFR3 e não FGFR1 em HaCaT e em queratinócitos humanos imortalizados com E6 e E7 de HPV. No entanto, foi também detectada a expressão de FGFR4.

A única descrição de FGFR4 em queratinócitos publicada até o momento trata-se de um estudo que descreve um método para medir expressão de mRNA de FGFRs baseado em

PCR semiquantitativo (Tartaglia et al 2001). Aqui também foi detectada sua expressão transcricional, além de proteica. A presença de diferentes isoformas de receptores em um tipo celular tem importantes implicações nas diferentes respostas disparadas por fatores de crescimento da mesma família, além de contribuir para a estabilidade e robustez da sinalização quando assume funções redundantes às de outros receptores. A expressão de FGFR4 em queratinócitos ainda é pouco conhecida ou mesmo desconhecida por muitos da comunidade científica. Essa pode ser a peça que faltava para explicar o porquê de FGF2 disparar proliferação e migração de queratinócitos (Sogabe et al 2006), sendo que até então para essas células apenas foram descritos receptores de baixa atividade a esse FGF (para atividade de FGFRs, consultar Zhang et al 2006).

5.1.2 Expressão de FGFs por queratinócitos humanos

Na pele já foi descrita a expressão de FGF1, FGF2, FGF5 e FGF7 (KGF) e aumento de seus níveis após injúria, sugerindo a participação desses fatores de crescimento na cicatrização de feridas. A importância de FGF2 nesse processo já é bem estabelecida, enquanto que o papel de FGF1 tem sido negligenciado (Werner & Grose 2003).

FGF1 é um potente mitógeno para queratinócitos, fibroblastos e células vasculares endoteliais (Dlugosz et al 1994a; Gospodarowicz et al 1990; Shipley et al 1989; Thomas et al 1985), além de estimular quimiotaxia destas últimas e induzir formação de vasos sanguíneos *in vivo* (Stokes et al 1990; Thomas et al 1985). No entanto Basilico e colaboradores, ao testarem cicatrização de feridas em camundongos *knock-out* para FGF1, não observaram qualquer alteração em relação ao grupo selvagem, enquanto que tanto *knock-out* para FGF2 quanto duplo *knock-out* FGF1/FGF2 semelhantemente apresentaram atraso no fechamento

de feridas (Miller et al 2000; Ortega et al 1998). Após essas publicações, até foi sugerido que FGF1 seria dispensável nesse processo (Werner & Grose 2003). No entanto, pode ser que outros FGFs ou mesmo outras moléculas sinalizadoras podem funcionalmente promover compensação, sendo o FGF5 um provável candidato. Como queratinócitos expressam FGF1, visto nesta tese e em uma antiga publicação (Gospodarowicz et al 1990), sua importância na homeostasia da pele merece ser reconsiderada.

A expressão de FGF2 em queratinócitos já havia sido descrito no final da década de 80 e início da década de 90 (Gospodarowicz et al 1990; Halaban et al 1988). Atualmente já é bem estabelecido que a produção de FGF2 na pele é importante na angiogênese e reepitelização de feridas (Barrientos et al 2008; Behm et al 2011).

5.2 Efeitos de FGF2 em queratinócitos malignamente transformados com H-RasV12 e em linhagens humanas derivadas de tumores com mutação em Ras

Diversos laboratórios já descreveram a ação inibitória de FGF2 sobre o crescimento de células tumorais (tabela 1). Em nosso laboratório (Costa et al 2008; Dias 2012; Salotti 2009), vimos que FGF2 antagonicamente dispara a transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ e, também, induz bloqueio transiente na fase S e irreversível na fase G_2 do ciclo celular de células malignas Y1 (linhagem clonal Y1, derivada de carcinoma adrenocortical de camundongo; Yasumura et al 1966), as quais exibem um fenótipo maligno dependente de amplificação do proto-oncogene K-Ras, com consequente super expressão da proteína K-Ras (Kimura & Armelin 1988; Schwab et al 1983). Além disso, verificamos que a proliferação de fibroblastos BALB3T3 transformados com H-RasV12 também é inibida por FGF2 (Costa et al 2008). Interessantemente, a seleção de clones de Y1 resistentes a FGF2 gerou sub-linhagens que

perderam parte da amplificação de K-Ras e não mais exibem superexpressão desse oncogene (Matos 2007). Estas observações nos sugeriram que FGF2 dispara um robusto mecanismo supressor de tumor em células malignas de camundongo dependentes de Ras.

No entanto, doze das treze linhagens aqui testadas, derivadas de tumores humanos com Ras mutado, tal mecanismo de defesa antitumor disparado por FGF2 ou inexiste em células humanas ou é superado à medida que o câncer progride. A primeira suposição pode ser descartada pelo fato da ativação transiente de Ras promover vulnerabilidade a FGF2, como visto nos experimentos realizados em HaCaT (figura 4.7) e em HEK293 (resultados não publicados da doutoranda Juliana Galvão) com o sistema indutível ER:RasV12. O fato de tanto clones de HaCaT quanto de HEK293 com expressão constitutiva de H-RasV12 serem resilientes aos efeitos tóxicos de FGF2 sugere a segunda hipótese. Essas evidências experimentais apóiam a conjectura de que, em células humanas: a) a ativação transiente do oncogene H-RasV12 predispõe vulnerabilidade ao efeito tóxico de FGF2; b) a presença constitutiva de Ras mutado (dominante positivo) agiria como uma forte pressão seletiva para geração de células malignas robustas resistentes ao proposto mecanismo supressor de tumor que antes as tornavam vulneráveis a FGF2.

Apesar da associação entre superexpressão de FGF2 e malignidade (Turner & Grose 2010), na literatura existem vários relatos de células humanas malignas inibidas por esse mitógeno (tabela 1) e isoformas de FGFRs também já foram descritas assumindo propriedades supressoras de tumor (Ahmad et al 2012). Quanto a dados clínicos, altos níveis de FGF2 correlacionam com bom prognóstico em cânceres de mama e de ovário (Colomer et al 1997; Obermair et al 1998; Yiangou et al 1997). Evidências desta tese e dos estudos citados reforçam que esse fator de crescimento pode desempenhar função antitumoral.

A transformação maligna resulta em células com secretoma alterado (Karagiannis et al 2010). Existem vários relatos de tumores humanos com alta expressão, secreção e até mesmo níveis séricos de FGF2 aumentados em pacientes (Poon et al 2001; Turner & Grose 2010). Se a transformação maligna promover liberação de FGF2 ao meio extracelular, a contínua estimulação do tumor pode selecionar células resistentes ao seu mecanismo anticâncer. Moléculas como angiotensina II, endotelina-1, interleucina-1 e TGβ-1 são capazes de induzir aumento de expressão de FGF2 (Fischer et al 1997; Strutz et al 2001). Endotelina-1 (ET-1), cuja expressão é comumente associada a células endoteliais, é também expressa e secretada por queratinócitos (Bagnato et al 1995; Yohn et al 1993). Já foi demonstrado que aumento de níveis de ROS induz expressão transcricional e secreção de ET-1, com provável participação da via de Ras/Raf/ERK (Cheng et al 2003; Cheng et al 2001). Como a presença de Ras oncogênico sabidamente aumenta a produção de ROS intracelular (Irani et al 1997; Lee et al 1999; Weyemi et al 2012), é possível que um eixo semelhante a "H-RasV12→níveis de ROS aumentados→produção e secreção de ET-1→ aumento de expressão e secreção de FGF2" ocorra em queratinócitos transformados com H-RasV12, bem como com as demais linhagens humanas com Ras mutado. Além disso, em nosso laboratório, subclones de Y1 transfectados com vetor que confere expressão constitutiva de FGF2 (isoforma de 18 kDa) se mostraram resistentes ao seu efeito antiproliferativo (Dermargos 2007). Isso fornece forte indicativo de que células malignas que expressam e secretam FGF2 acabam tornando-se resilientes ao seu efeito antitumoral.

Os mecanismos sugeridos para susceptibilidade e resistência a FGF2 em células com lesão em Ras estão reunidos na figura 5.1.

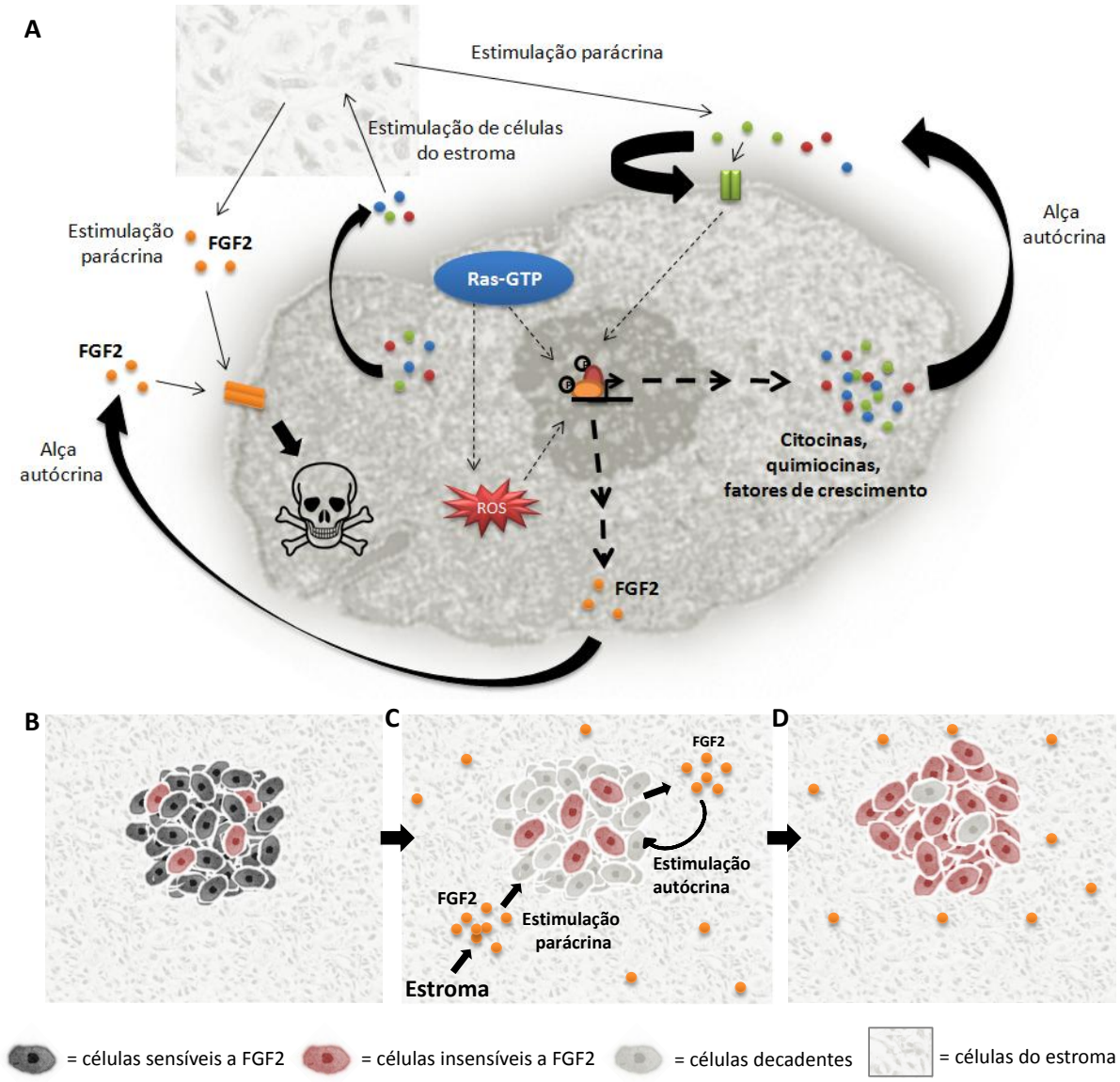


Figura 5.1. Mecanismos hipotéticos para susceptibilidade e resistência aos efeitos tóxicos de FGF2 em células dependentes de Ras. A) Ras oncogênico pode estimular a produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que autocrinamente induziriam aumento de expressão de FGF2 endógeno, o qual pode ser secretado e promover estimulação do próprio tumor, desencadeando seus efeitos tóxicos. Alternativamente, tais sinalizadores podem induzir células do estroma circundante a sintetizar e secretar FGF2, promovendo estimulação parácrina do tumor. O próprio Ras oncogênico poderia de forma mais direta estimular a produção de FGF2 (não descrito na literatura); B) Em uma massa tumoral ocasionalmente surgem células insensíveis aos efeitos tóxicos de FGF2; C) em algum momento FGF2 passaria a ser produzido como mecanismo de defesa anti-tumor pelas células pré-malignas e/ou pelas células do estroma; D) isso resultaria na seleção e multiplicação apenas das células resistentes a FGF2, permitindo a progressão maligna. No caso de não haver seleção, a geração de tumores com baixos níveis de FGF2 pode ser favorecida, como é o caso de cânceres de mama.

5.3 A susceptibilidade da linhagem UM-UC-3 à toxidez de FGF2

Tumores uroteliais evoluem frequentemente para duas variantes fenotípicas principais: a papilar superficial, de baixo grau de malignidade, e as invasivas. O primeiro tipo caracteristicamente carrega consigo mutação ativadora no gene HRAS (em aproximadamente 30% deles) ou FGFR3 (aproximadamente 70%), mutuamente exclusivas (Jebar et al 2005; Wu 2005). As linhagens T-24 (com mutação em H-Ras), UM-UC-3 (com K-Ras mutado) e HT-1197 (N-Ras mutado), aqui testadas quanto à sensibilidade a FGF2 e PMA, são derivadas de carcinoma de bexiga. Enquanto que FGF2 inibiu o crescimento de UM-UC-3, HT-1197 foi estimulada mitogenicamente e T-24 foi indiferente ao mesmo tratamento. Como essas três linhagens apresentam FGFR3 selvagem (Lamont et al 2011), a explicação para essas diferenças pode estar então no *status* de outros receptores de FGF.

Tomlinson e colaboradores (2009) reportaram que o nível de expressão transcricional de FGFR1 é aumentado na maioria dos tumores e linhagens derivadas de câncer de bexiga, independente de seu estágio e grau de malignidade. Eles sugeriram ainda que nessas células FGFR1 desempenha importante papel na resposta proliferativa e de sobrevivência. Dentre as linhagens testadas nesse estudo, UM-UC-3 e HT-1197 apresentam altos níveis de expressão de FGFR1. *Knockdown* desse receptor em UM-UC-3 reduziu sua capacidade de crescimento independente de ancoragem e tumorigenicidade *in vivo*, sugerindo dependência FGFR1 para seu fenótipo maligno (Tomlinson et al 2009).

Expressão reduzida de FGFR2 IIIb é encontrada em vários tipos de câncer (Ahmad et al 2012). Restauração da expressão desse receptor já foi visto inibir o crescimento de células de tumores de próstata e adenocarcinoma salivar (Matsubara et al 1998; Zhang et al 2001) e níveis de expressão reduzidos estão associados a mal prognóstico em cânceres de bexiga

(Diez de Medina et al 1997). Em células T-24, transfecção de FGFR2 IIIb reduziu seu crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Bernard-Pierrot et al 2004; Ricol et al 1999), sugerindo que FGFR2 pode assumir função supressora de tumor. Como células UM-UC-3 não expressam a isoforma IIIb de FGFR2 (Ricol et al 1999), pode ser que FGF2 induza sua expressão, o que explicaria os efeitos inibitórios na proliferação dessas células. Se for esse o caso, quanto ao fato de T-24 e HT-1197 serem refratárias a FGF2 poderia ser facilmente explicado se o receptor 2 for completamente ausente nessas linhagens, mas isso precisa ser investigado.

Das três linhagens de carcinoma urotelial, apenas UM-UC-3 apresenta alto grau de malignidade. T-24 é considerada fracamente tumorigênica, pois desenvolvem apenas tumores de crescimento lento quando xenoenxertadas em camundongo *nude* (Bernard-Pierrot et al 2006) e HT-1197 não se mostrou capaz de crescer em suspensão de agarose e forma apenas nódulos subcutâneos transientes *in vivo* (Tomlinson et al 2009). Por outro lado, UM-UC-3, linhagem derivada de carcinoma invasivo, apresenta alta capacidade de crescimento independente de ancoragem, além de desenvolver tumores em ensaios de tumorigênese *in vivo* (Tomlinson et al 2009). Com isso não se pode descartar a possibilidade das diferentes respostas a FGF2 serem na verdade atribuídas ao grau de malignidade dessas linhagens.

5.4 Papel de PKC na resposta de queratinócitos HaCaT a PMA

É intrigante como PMA, um clássico promotor de tumor largamente usado em ensaio de carcinogênese *in vivo*, possa também inibir o crescimento de células malignas. De fato,

são inúmeros os relatos nesse sentido (tabela 2). Aqui foi visto que em queratinócitos imortalizados da linhagem HaCaT, PMA promove proliferação enquanto induz apoptose em sublinhagens transformadas com H-RasV12, de forma PKC-dependente. Tal antagonismo pode ser explicado pela modulação diferencial de isoformas de PKC nesses distintos contextos celulares (células imortalizadas e malignas dependentes de H-RasV12), argumento suportado pelas seguintes evidências: superexpressão de diferentes isoformas de PKC em células HaCaT estimulam funções tão diferentes quanto diferenciação e susceptibilidade a apoptose (por PKC α e δ) quanto proliferação e crescimento de tumor (PKC β e ε) (Papp et al 2004); expressão alterada dessas isoenzimas é observada em muitos cânceres (Griner & Kazanietz 2007); ras oncogênico foi visto alterar atividade e expressão de isoformas de PKC em diferentes células, sendo comumente PKCα modulada positivamente (Borner et al 1992; Delage et al 1993; Dlugosz et al 1994b). O papel isoenzima-específica na conjuntura aqui estudada ainda precisa ser estabelecido. Como é provável que células HaCaT H-RasV12 apresentem padrão de expressão de PKCs diferente ao de células parentais, pode ser que o mesmo estímulo, no caso PMA, acabe ativando isoenzimas diferentes nos dois casos, levando-as a destinos distintos. Tendo em vista que em queratinócitos PKCα e PKCδ estão associados à parada de crescimento e susceptibilidade a apoptose (Jerome-Morais et al 2009; Papp et al 2004), esses seriam os principais suspeitos no caso HaCaT H-RasV12 + PMA.

Curiosamente, células HaCaT vetor vazio foram estimuladas a proliferar na presença dos inibidores de PKC Gö6983 e binsidolilmaleimida I (figura 4.14). Papp, Czifra e colaboradores (2006) constataram que inibição da atividade dessa proteína quinase com inibidores gerais (que inibem várias isoformas) suprime a expressão de marcadores de diferenciação. Dessa forma, a inibição generalizada de PKC nessas células pode conduzi-las a um estado menos diferenciado, aumentando sua capacidade proliferativa.

5.5 O papel de ROS na resposta de queratinócitos a PMA

Takahashi *et al.* (2006), elegantemente mostraram que ROS é imprescindível para a indução de senescência e para a manutenção das células no estado senescente. Dessa forma foi bem demonstrado que espécies reativas de oxigênio participam de mecanismos supressores de tumor, superando a idéia antiquada de que esses agentes redox teriam apenas funções danosas no organismo. Contribuindo nesse sentido, os resultados discutidos nesta seção propõem papel anticâncer de ROS em células com lesão oncogênica que por si já promove um *status* oxidativo celular mais elevado que o normal.

Já é bem estabelecido que PMA estimula a produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos via NADPH oxidase (Geiszt & Leto 2004), o que ocorre também em outros tipos celulares como músculo liso vascular, células endoteliais, fibroblastos e queratinócitos (Inoguchi et al 2000; Meier et al 1991; Steinbrenner et al 2005). HaCaT expressam componentes de NADPH oxidase constitutivamente (Rac1, p67 phox, p40 phox, p22 phox, Nox1, Nox2 e pelo menos mRNA de Nox4), gerando complexo com atividade produtora de superóxido (Chamulitrat et al 2004; Kim et al 2011). Dessa forma é muito provável que PMA seja capaz de estimular a geração de ROS por essa via em HaCaT. De fato, dentro de duas horas esse composto foi capaz de aumentar a fluorescência de carboxy-DCF (substrato de ROS) tanto em HaCaT vetor vazio quanto em clones H-RasV12 (figura 4.23). Sob diversos estímulos, PKC é capaz de promover fosforilação de p47 phox (Jiang et al 2011), além de ser capaz de ativar Rac1, componentes do complexo NADPH oxidase (Price et al 2003). Isso pode explicar o aumento de ROS induzido por PMA. Um estudo com queratinócitos de pele de camundongo mostrou por ensaios *in vitro* e *in vivo* que em células portando mutação ativadora em H-Ras, PMA induz apoptose dependente de p53 pela geração de ROS via

NADPH oxidase (Zhao et al 2006). Apesar da semelhança próxima, os resultados aqui mostrados sugerem que a apoptose induzida em clones HaCaT H-RasV12 independem de p53. Por outro lado, sob estresse oxidativo, PKCδ pode ser ativada e translocada para a membrana, induzindo apoptose (Majumder et al 2001). Apoptose induzida por PMA em células de leucemia mielóide e MCF-7 (de câncer de mama) também está associada à translocação de PKCδ para a mitocôndria, com consequente liberação de citocromo c e ativação de caspase 3 (Majumder et al 2000). Por ser uma via independente de p53, a ativação de PKCδ via ROS é um provável mecanismo pela qual apoptose é induzida em células HaCaT H-RasV12 estimuladas com PMA.

Produção de ROS disparado por Ras oncogênico já foi relacionado tanto a estímulo proliferativo e tumorigênico (Irani et al 1997; Yang et al 2002) quanto indução de senescência (Lee et al 1999; Weyemi et al 2012). Aqui foi visto que clones HaCaT H-RasV12 por si já apresentaram um basal mais aumentado de ROS em relação às células parentais. Resultados semelhantes já foram descritos na mesma linhagem transfectada com v-Ha-ras sugestivamente envolvendo a participação de NADPH oxidase (Yang et al 1999). Mais recentemente foi demonstrado que H-RasV12 induz produção de ROS, dano no DNA e consequentemente senescência via regulação traducional de Nox-4 e de seu parceiro funcional p22 phox (Weyemi et al 2012). Pode ser que a diferença entre os níveis basais de espécies reativas em queratinócitos H-RasV12 e sua contraparte imortalizada seja o que determina as diferentes respostas a PMA. Este éster de forbol poderia induzir geração de ROS via Nox-1 e/ou Nox-2, disparando estímulo proliferativo nas células imortalizadas. Por outro lado, em células H-RasV12, que já apresentariam Nox-4 atuante por causa da expressão de H-RasV12, a ativação de outras oxidases da mesma família por PMA geraria níveis tão elevados e danosos de ROS que as células não seriam mais capazes de suportar.

De fato, enquanto que o aumento dos níveis de ROS em HaCaT parental são transitórios, em células H-RasV12 eles são altos e sustentados, o que provavelmente gera danos insuperáveis em sua maquinaria celular (ver figura 4.23 C). Efeito semelhante foi visto por Shaw e colaboradores (2011) em fibroblastos de camundongo: a despeito de células normais, células expressando K-Ras mutado (dominante positivo) foram ineficientes em remover ROS intracelular induzido por lanperisona, o que causou estresse oxidativo e morte. Vale ressaltar que além da via NADPH oxidase, Ras oncogênico, pelo menos no caso de K-Ras, pode também gerar estresse oxidativo por promover disfunção mitocondrial (Hu et al 2012). Dessa forma é importante definir por que via H-RasV12 e PMA aumenta o *status* oxidativo de células HaCaT.

Além do uso de compostos indutores de ROS, outra estratégia promissora em terapia contra o câncer baseada na manipulação do *status* oxidativo celular está no ataque das defesas antioxidantes celulares. Muitos cânceres tornam-se altamente adaptados ao estresse oxidativo e possuem maior capacidade antioxidante. Ao interferir com os níveis ou com a função de antioxidantes celulares, como catalase, superóxido dismutase, redoxinas e glutationa, a célula maligna pode tornar-se então vulnerável aos níveis oxidativos elevados que ela mesma gera (Trachootham et al 2009). Oncogenes como K-Ras, B-Raf e Myc foram vistos promover aumento da expressão e estabilização do fator de transcrição Nfr2, conhecido por ativar a expressão de enzimas antioxidantes (DeNicola et al 2011). Piperlongumina (PL), uma pequena molécula identificada em um *screening* pela toxidez específica para células malignas, aumentou os níveis de ROS e induziu apoptose em células tumorais sem afetar significativamente células normais. PL foi visto interferir com as defesas antioxidantes das células ao inibir a atividade de glutationa-S-transferase pi (GST-pi) (Raj et al 2011).

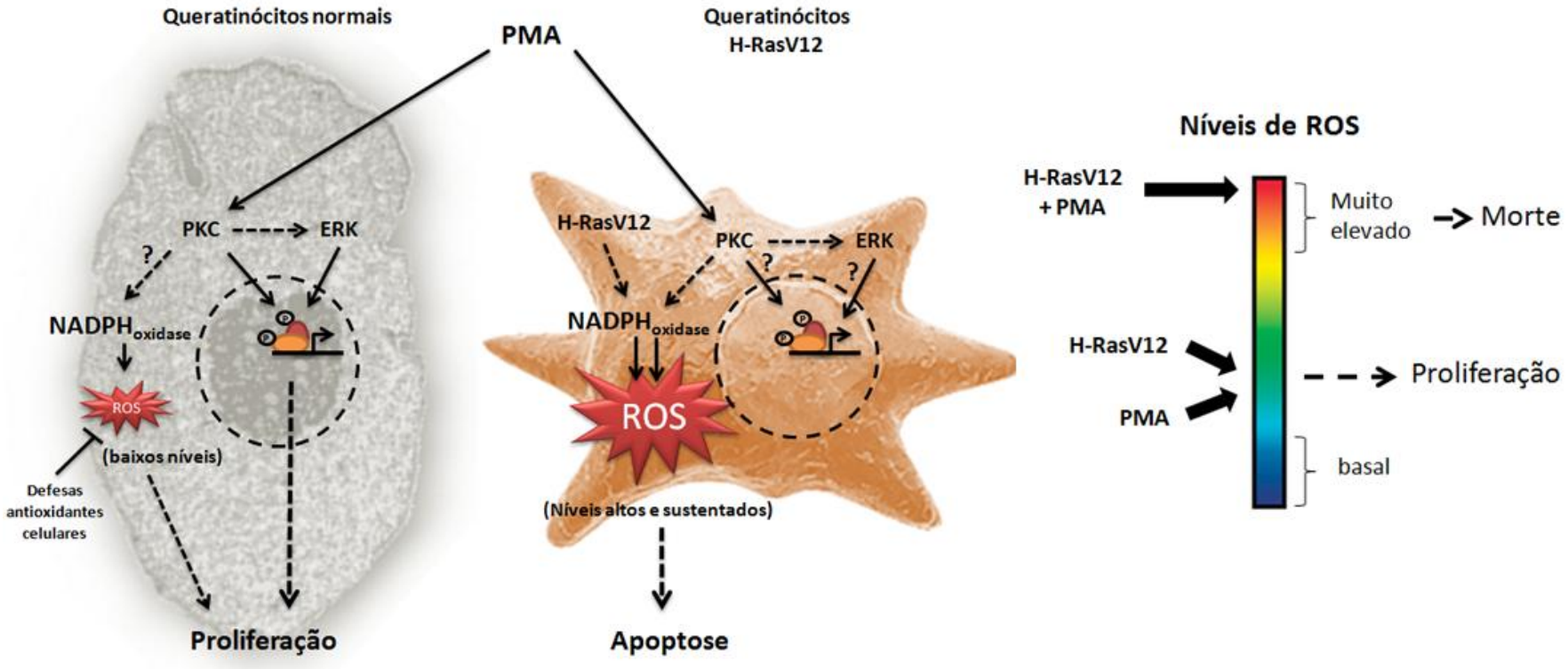


Figura 5.2 Perspectiva esquemática dos sugeridos mecanismos de ação de PMA em queratinócitos humanos normais e malignamente transformados com H-RasV12. Em queratinócitos normais, PMA ativa PKC que por sua vez fosforila fatores de transcrição no núcleo, estimulando progressão no ciclo celular. O mesmo estímulo também ativa a via mitogênica MAPK, o que também pode contribuir para a resposta proliferativa dessas células. Como PKC é um conhecido ativador de NADPH oxidase, a geração de ROS em ambas as células estimuladas por PMA teria origem desse complexo enzimático. Queratinócitos normais apresentam um aumento transitório nos níveis de ROS sob estímulo com PMA, o que seria facilmente normalizado pelas defesas antioxidantes celulares e estimularia proliferação. Por outro lado, em queratinócitos H-RasV12, cujos níveis de ROS já são mais elevados devido à expressão de Ras oncogênico, a elevação adicional desses níveis geraria um status oxidativo extremamente danoso, levando as células à morte.

5.6 PMA em tumores humanos com Ras mutado

De treze linhagens de tumores humanos com Ras mutado, onze foram vulneráveis a PMA e apenas duas, CALU-1 e SK-MEL-2, se mostraram resilientes ao seu efeito tóxico (figura 4.24). Isso sugere fortemente que há associação entre mutação em Ras e sensibilidade a PMA. Administração de PMA em humanos é bem tolerada (Han et al 1998; Strair et al 2002), indicando baixa toxidez em células normais e especificidade para células malignas. O fato de a linhagem HaCaT parental (imortalizada) ser tolerante a esse composto a despeito de seus subclones H-RasV12 reforça o argumento. Além disso, não existe associação entre o tipo de Ras, sensibilidade ou resistência a PMA. No entanto, os níveis de Ras-GTP podem ser determinantes e isso precisa ser explorado.

6 CONCLUSÕES

Queratinócitos humanos HaCaT possuem todos os recursos e funcionalidades da sinalização mitogênica disparada por FGFs. Antagonicamente, para células da mesma linhagem em que H-RasV12 é transientemente ativado, FGF2 é citotóxico. Clones malignamente transformados por ativação constitutiva do mesmo oncogene, no entanto, não apresentam tal vulnerabilidade.

PMA estimula a proliferação de HaCaT parental mas induz efeito citotóxico (e não citostático), via ativação de PKC, em subclones expressando H-RasV12 constitutivamente, induzindo apoptose independente de p53. Em ambas as células, PMA induz aumento de ROS, sendo que susceptibilidade a esse composto está correlacionada à indução de níveis altos e sustentados dessas espécies reativas.

Ensaio com linhagens de células humanas tumorais permitiu demonstrar que mutação ativadora em Ras condiciona vulnerabilidade a PMA, mas não a FGF2. Dessa forma, PMA tem ação generalizada, interferindo na proliferação de células com Ras ativado constitutivamente enquanto que a vulnerabilidade a FGF2 é transitória e parece ser superada à medida que o tumor progride.

7 REFERÊNCIAS

Aaronson SA, Todaro GJ. 1968. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol* 72:141-8

Ahearn IM, Haigis K, Bar-Sagi D, Philips MR. 2012. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:39-51

Ahmad I, Iwata T, Leung HY. 2012. Mechanisms of FGFR-mediated carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1823:850-60

Albanes D, Heinonen OP, Taylor PR, Virtamo J, Edwards BK, et al. 1996. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst* 88:1560-70

Armelin HA. 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:2702-6

Avraham R, Yarden Y. 2011. Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:104-17

Bagnato A, Venuti A, Di Castro V, Marcante ML. 1995. Identification of the ETA receptor subtype that mediates endothelin induced autocrine proliferation of normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 209:80-6

Bairati I, Meyer F, Gelinas M, Fortin A, Nabid A, et al. 2005. Randomized trial of antioxidant vitamins to prevent acute adverse effects of radiation therapy in head and neck cancer patients. *J Clin Oncol* 23:5805-13

Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16:585-601

Beenken A, Mohammadi M. 2009. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8:235-53

Behm B, Babilas P, Landthaler M, Schreml S. 2011. Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol*

Bernard-Pierrot I, Brams A, Dunois-Larde C, Caillault A, Diez de Medina SG, et al. 2006. Oncogenic properties of the mutated forms of fibroblast growth factor receptor 3b. *Carcinogenesis* 27:740-7

Bernard-Pierrot I, Ricol D, Cassidy A, Graham A, Elvin P, et al. 2004. Inhibition of human bladder tumour cell growth by fibroblast growth factor receptor 2b is independent of its kinase activity. Involvement of the carboxy-terminal region of the receptor. *Oncogene* 23:9201-11

Borner C, Guadagno SN, Hsiao WW, Fabbro D, Barr M, Weinstein IB. 1992. Expression of four protein kinase C isoforms in rat fibroblasts. Differential alterations in ras-, src-, and fos-transformed cells. *J Biol Chem* 267:12900-10

Bottaro DP, Rubin JS, Ron D, Finch PW, Florio C, Aaronson SA. 1990. Characterization of the receptor for keratinocyte growth factor. Evidence for multiple fibroblast growth factor receptors. *J Biol Chem* 265:12767-70

Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761-71

Breitkreutz D, Schoop VM, Mirancea N, Baur M, Stark HJ, Fusenig NE. 1998. Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur J Cell Biol* 75:273-86

Carroll MP, May WS. 1994. Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem* 269:1249-56

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257:7847-51

Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. 2007. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773:1299-310

Chamulitrat W, Stremmel W, Kawahara T, Rokutan K, Fujii H, et al. 2004. A constitutive NADPH oxidase-like system containing gp91phox homologs in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122:1000-9

Chang C, Simmons DT, Martin MA, Mora PT. 1979. Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol* 31:463-71

Chen JK, Chao HH, Yang VC. 1995. Inhibition of the growth of a human nasopharyngeal carcinoma cell line by bFGF is mediated via FGFR-1. *FASEB J* 9:1211-9

Chen N, Karantza-Wadsworth V. 2009. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1793:1516-23

Cheng TH, Cheng PY, Shih NL, Chen IB, Wang DL, Chen JJ. 2003. Involvement of reactive oxygen species in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts. *J Am Coll Cardiol* 42:1845-54

Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Loh SH, Cheng PY, et al. 2001. Reactive oxygen species mediate cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression via Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 33:1805-14

Collado M, Serrano M. 2010. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10:51-7

Colomer R, Aparicio J, Montero S, Guzman C, Larrodera L, Cortes-Funes H. 1997. Low levels of basic fibroblast growth factor (bFGF) are associated with a poor prognosis in human breast carcinoma. *Br J Cancer* 76:1215-20

Costa ET, Forti FL, Matos TG, Dermargos A, Nakano F, et al. 2008. Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res* 68:6215-23

Cotter TG. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9:501-7

Cozzi SJ, Parsons PG, Ogbourne SM, Pedley J, Boyle GM. 2006. Induction of senescence in diterpene ester-treated melanoma cells via protein kinase C-dependent hyperactivation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res* 66:10083-91

Cruz FD, Matushansky I. 2012. Solid tumor differentiation therapy - is it possible? *Oncotarget* 3:559-67

Delage S, Chastre E, Empereur S, Wicek D, Veissiere D, et al. 1993. Increased protein kinase C alpha expression in human colonic Caco-2 cells after insertion of human Ha-ras or polyoma virus middle T oncogenes. *Cancer Res* 53:2762-70

Delclos KB, Nagle DS, Blumberg PM. 1980. Specific binding of phorbol ester tumor promoters to mouse skin. *Cell* 19:1025-32

DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. 1979. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:2420-4

DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, et al. 2011. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475:106-9

Dermargos A. 2007. *FGF2: estudo de estrutura e função*. Tese (doutorado em ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Detjen KM, Brembeck FH, Welzel M, Kaiser A, Haller H, et al. 2000. Activation of protein kinase Calpha inhibits growth of pancreatic cancer cells via p21(cip)-mediated G(1) arrest. *J Cell Sci* 113 (Pt 17):3025-35

Deyrieux AF, Wilson VG. 2007. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology* 54:77-83

Dias MHS. 2012. *Mecanismos da toxidez de FGF2 em células malignas dependentes de Ras: bloqueio de divisão celular e estresse proteotóxico*. Tese (doutorado em ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Dickinson BC, Chang CJ. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* 7:504-11

Diez de Medina SG, Chopin D, El Marjou A, Delouvee A, LaRochelle WJ, et al. 1997. Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional cell bladder carcinomas. *Oncogene* 14:323-30

Dikic I, Johansen T, Kirkin V. 2010. Selective autophagy in cancer development and therapy. *Cancer Res* 70:3431-4

Dlugosz AA, Cheng C, Denning MF, Dempsey PJ, Coffey RJ, Jr., Yuspa SH. 1994a. Keratinocyte growth factor receptor ligands induce transforming growth factor alpha expression and activate the epidermal growth factor receptor signaling pathway in cultured epidermal keratinocytes. *Cell Growth Differ* 5:1283-92

Dlugosz AA, Cheng C, Williams EK, Dharia AG, Denning MF, Yuspa SH. 1994b. Alterations in murine keratinocyte differentiation induced by activated rasHa genes are mediated by protein kinase C-alpha. *Cancer Res* 54:6413-20

Downward J. 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3:11-22

Driedger PE, Blumberg PM. 1980. Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:567-71

Duesberg P, Li R. 2003. Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* 2:202-10

Edgar RS, Green EW, Zhao Y, van Ooijen G, Olmedo M, et al. 2012. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature* 485:459-64

Emoto H, Tagashira S, Mattei MG, Yamasaki M, Hashimoto G, et al. 1997. Structure and expression of human fibroblast growth factor-10. *J Biol Chem* 272:23191-4

Engedal N, Korkmaz CG, Saatcioglu F. 2002. C-Jun N-terminal kinase is required for phorbol ester- and thapsigargin-induced apoptosis in the androgen responsive prostate cancer cell line LNCaP. *Oncogene* 21:1017-27

Finkel T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194:7-15

Fischer TA, Ungureanu-Longrois D, Singh K, de Zengotita J, DeUgarte D, et al. 1997. Regulation of bFGF expression and ANG II secretion in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* 272:H958-68

Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, et al. 2011. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39:D945-50

Franke TF. 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27:6473-88

Fuchs E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol* 111:2807-14

Fuchs E, Raghavan S. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet* 3:199-209

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19:107-20

Geiszt M, Leto TL. 2004. The Nox family of NAD(P)H oxidases: host defense and beyond. *J Biol Chem* 279:51715-8

Goel G, Makkar HP, Francis G, Becker K. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International journal of toxicology* 26:279-88

Gospodarowicz D, Plouet J, Malerstein B. 1990. Comparison of the ability of basic and acidic fibroblast growth factor to stimulate the proliferation of an established keratinocyte cell line: modulation of their biological effects by heparin, transforming growth factor beta (TGF beta), and epidermal growth factor (EGF). *J Cell Physiol* 142:325-33

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74

Griner EM, Kazanietz MG. 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer* 7:281-94

Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, et al. 1988. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol* 107:1611-9

Halliwell B. 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 401:1-11

Han ZT, Zhu XX, Yang RY, Sun JZ, Tian GF, et al. 1998. Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5357-61

Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646-74

Hashimoto K. 2000. Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci* 24 Suppl 1:S46-50

Hers I, Vincent EE, Tavare JM. 2011. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23:1515-27

Hu Y, Lu W, Chen G, Wang P, Chen Z, et al. 2012. K-ras(G12V) transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Cell Res* 22:399-412

Huberman E, Callaham MF. 1979. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1293-7

Igney FH, Krammer PH. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-88

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, et al. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49:1939-45

Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, et al. 1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275:1649-52

Itoh N, Ornitz DM. 2011. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* 149:121-30

Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA. 2005. FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma. *Oncogene* 24:5218-25

Jerome-Morais A, Rahn HR, Tibudan SS, Denning MF. 2009. Role for protein kinase C-alpha in keratinocyte growth arrest. *J Invest Dermatol* 129:2365-75

Jetten AM. 1989. Action of retinoids and phorbol esters on cell growth and the binding of epidermal growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 359:200-17

Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. 2011. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev* 63:218-42

Jimenez PA, Rampy MA. 1999. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res* 81:238-42

Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. 2010. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol* 4:496-510

Karnoub AE, Weinberg RA. 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:517-31

Kastan MB, Bartek J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432:316-23

Kholodenko BN, Hancock JF, Kolch W. 2010. Signalling ballet in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:414-26

Kim JS, Bak EJ, Lee BC, Kim YS, Park JB, Choi IG. 2011. Neuregulin induces HaCaT keratinocyte migration via Rac1-mediated NADPH-oxidase activation. *J Cell Physiol* 226:3014-21

Kim MS, Kim CJ, Jung HS, Seo MR, Juhnn YS, et al. 2004. Fibroblast growth factor 2 induces differentiation and apoptosis of Askin tumour cells. *J Pathol* 202:103-12

Kimura E, Armelin HA. 1988. Role of proto-oncogene c-Ki-ras amplification and overexpression in the malignancy of Y-1 adrenocortical tumor cells. *Braz J Med Biol Res* 21:189-201

Kovary K, Armelin MC, Armelin HA. 1989. Ha-Ras-1 oncogene dosage differentially affects Balb/3T3 cells' growth factor requirement and tumorigenicity. *Oncogene Res* 4:55-64

Krejci P, Bryja V, Pachernik J, Hampl A, Pogue R, et al. 2004. FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells. *Exp Cell Res* 297:152-64

Kruse JP, Gu W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* 137:609-22

Lamont FR, Tomlinson DC, Cooper PA, Shnyder SD, Chester JD, Knowles MA. 2011. Small molecule FGF receptor inhibitors block FGFR-dependent urothelial carcinoma growth in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 104:75-82

Lee AC, Fenster BE, Ito H, Takeda K, Bae NS, et al. 1999. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 274:7936-40

Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, et al. 1993. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 14:833-9

Li L, Price JE, Fan D, Zhang RD, Bucana CD, Fidler IJ. 1989. Correlation of growth capacity of human tumor cells in hard agarose with their in vivo proliferative capacity at specific metastatic sites. *J Natl Cancer Inst* 81:1406-12

Li Y, Bhuiyan M, Mohammad RM, Sarkar FH. 1998. Induction of apoptosis in breast cancer cells by TPA. *Oncogene* 17:2915-20

Linzer DI, Levine AJ. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52

Liu JF, Issad T, Chevet E, Ledoux D, Courty J, et al. 1998. Fibroblast growth factor-2 has opposite effects on human breast cancer MCF-7 cell growth depending on the activation level of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Eur J Biochem* 258:271-6

Lotem J, Sachs L. 1979. Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5158-62

Mackay HJ, Twelves CJ. 2007. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nat Rev Cancer* 7:554-62

Majumder PK, Mishra NC, Sun X, Bharti A, Kharbanda S, et al. 2001. Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ* 12:465-70

Majumder PK, Pandey P, Sun X, Cheng K, Datta R, et al. 2000. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 275:21793-6

Malumbres M, Barbacid M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 1:222-31

Malumbres M, Barbacid M. 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9:153-66

Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261-74

Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192:1-15

Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. 2008. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Arch Toxicol* 82:273-99

Matos TGF. 2007. *Mecanismos antiproliferativos disparados por FGF2 e éster de forbol em células de camundongos transformadas por Ras*. Tese (doutorado em ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Matsubara A, Kan M, Feng S, McKeehan WL. 1998. Inhibition of growth of malignant rat prostate tumor cells by restoration of fibroblast growth factor receptor 2. *Cancer Res* 58:1509-14

Matsumoto A, Nakayama KI. 2012. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim Biophys Acta*

McLeskey SW, Ding IY, Lippman ME, Kern FG. 1994. MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands. *Cancer Res* 54:523-30

Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ, Jones OT. 1991. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J* 275 (Pt 1):241-5

Mendoza MC, Er EE, Blenis J. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 36:320-8

Menendez D, Inga A, Resnick MA. 2009. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* 9:724-37

Micallef L, Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, et al. 2009. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol* 18:143-51

Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. 2000. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol* 20:2260-8

Miller MS, Miller LD. 2011. RAS Mutations and Oncogenesis: Not all RAS Mutations are Created Equally. *Front Genet* 2:100

Nakagawa M, Oliva JL, Kothapalli D, Fournier A, Assoian RK, Kazanietz MG. 2005. Phorbol ester-induced G1 phase arrest selectively mediated by protein kinase Cdelta-dependent induction of p21. *J Biol Chem* 280:33926-34

Nishizuka Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308:693-8

Obaya AJ, Sedivy JM. 2002. Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 59:126-42

Obermair A, Speiser P, Reisenberger K, Ullrich R, Czerwenka K, et al. 1998. Influence of intratumoral basic fibroblast growth factor concentration on survival in ovarian cancer patients. *Cancer Lett* 130:69-76

Oliva JL, Caino MC, Senderowicz AM, Kazanietz MG. 2008. S-Phase-specific activation of PKC alpha induces senescence in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* 283:5466-76

Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, et al. 1996. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334:1150-5

Oren M, Rotter V. 2010. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001107

Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C. 1998. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5672-7

Osborne CK, Hamilton B, Nover M, Ziegler J. 1981. Antagonism between epidermal growth factor and phorbol ester tumor promoters in human breast cancer cells. *J Clin Invest* 67:943-51

Papp H, Czifra G, Bodo E, Lazar J, Kovacs I, et al. 2004. Opposite roles of protein kinase C isoforms in proliferation, differentiation, apoptosis, and tumorigenicity of human HaCaT keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* 61:1095-105

Perl M, Chung CS, Ayala A. 2005. Apoptosis. *Crit Care Med* 33:S526-9

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45

Pilcher BK, Gaither-Ganim J, Parks WC, Welgus HG. 1997. Cell type-specific inhibition of keratinocyte collagenase-1 expression by basic fibroblast growth factor and keratinocyte growth factor. A common receptor pathway. *J Biol Chem* 272:18147-54

Poon RT, Fan ST, Wong J. 2001. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 19:1207-25

Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, et al. 2012. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483:100-3

Price LS, Langeslag M, ten Klooster JP, Hordijk PL, Jalink K, Collard JG. 2003. Calcium signaling regulates translocation and activation of Rac. *J Biol Chem* 278:39413-21

Prior IA, Lewis PD, Mattos C. 2012. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res* 72:2457-67

Prosperi MT, Dupre G, Lidereau R, Goubin G. 1990. Point mutation at codon 12 of the Ki-ras gene in a primary breast carcinoma and the MDA-MB-134 human mammary carcinoma cell line. *Cancer Lett* 51:169-74

Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 11:761-74

Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, et al. 2011. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 475:231-4

Reyland ME. 2009. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 14:2386-99

Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, et al. 1999. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* 18:7234-43

Robson MC, Hill DP, Smith PD, Wang X, Meyer-Siegler K, et al. 2000. Sequential cytokine therapy for pressure ulcers: clinical and mechanistic response. *Ann Surg* 231:600-11

Robson MC, Phillips LG, Lawrence WT, Bishop JB, Youngerman JS, et al. 1992. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg* 216:401-6; discussion 6-8

Robson MC, Phillips TJ, Falanga V, Odenheimer DJ, Parish LC, et al. 2001. Randomized trial of topically applied repifermin (recombinant human keratinocyte growth factor-2) to accelerate wound healing in venous ulcers. *Wound Repair Regen* 9:347-52

Rodier F, Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192:547-56

Rojas AM, Fuentes G, Rausell A, Valencia A. 2012. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *J Cell Biol* 196:189-201

Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. 2010. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:103-12

Rubin JS, Bottaro DP, Chedid M, Miki T, Ron D, et al. 1995. Keratinocyte growth factor. *Cell Biol Int* 19:399-411

Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. 1989. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:802-6

Salotti J. 2009. *Mecanismos moleculares e celulares de citotoxicidade de FGF2 parácrino em células tumorais dependentes de Ras*. Tese (doutorado em ciências) Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Schaar D, Goodell L, Aisner J, Cui XX, Han ZT, et al. 2006. A phase I clinical trial of 12- O-tetradecanoylphorbol-13-acetate for patients with relapsed/refractory malignancies. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 57:789-95

Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. 1999. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 112:343-53

Schwab M, Alitalo K, Varmus HE, Bishop JM, George D. 1983. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature* 303:497-501

Shaul YD, Seger R. 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773:1213-26

Shaw AT, Winslow MM, Magendantz M, Ouyang C, Dowdle J, et al. 2011. Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8773-8

Shin SY, Rath O, Choo SM, Fee F, McFerran B, et al. 2009. Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J Cell Sci* 122:425-35

Shipley GD, Keeble WW, Hendrickson JE, Coffey RJ, Jr., Pittelkow MR. 1989. Growth of normal human keratinocytes and fibroblasts in serum-free medium is stimulated by acidic and basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 138:511-8

Smits VA, van Peer MA, Essers MA, Klompmaker R, Rijksen G, Medema RH. 2000. Negative growth regulation of SK-N-MC cells by bFGF defines a growth factor-sensitive point in G2. *J Biol Chem* 275:19375-81

Sogabe Y, Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O. 2006. Basic fibroblast growth factor stimulates human keratinocyte motility by Rac activation. *Wound Repair Regen* 14:457-62

Stegmann TJ. 1998. FGF-1: a human growth factor in the induction of neoangiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* 7:2011-5

Steinbrenner H, Ramos MC, Stuhlmann D, Mitic D, Sies H, Brenneisen P. 2005. Tumor promoter TPA stimulates MMP-9 secretion from human keratinocytes by activation of superoxide-producing NADPH oxidase. *Free Radic Res* 39:245-53

Stiewe T. 2007. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 7:165-8

Stokes CL, Rupnick MA, Williams SK, Lauffenburger DA. 1990. Chemotaxis of human microvessel endothelial cells in response to acidic fibroblast growth factor. *Lab Invest* 63:657-68

Strair RK, Schaar D, Goodell L, Aisner J, Chin KV, et al. 2002. Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Clin Cancer Res* 8:2512-8

Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, et al. 2001. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59:579-92

Sturla LM, Westwood G, Selby PJ, Lewis IJ, Burchill SA. 2000. Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 60:6160-70

Takahashi A, Ohtani N, Yamakoshi K, Iida S, Tahara H, et al. 2006. Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 8:1291-7

Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y. 1977. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* 252:7603-9

Takeya R, Sumimoto H. 2006. Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxid Redox Signal* 8:1523-32

Tartaglia M, Fragale A, Battaglia PA. 2001. A competitive PCR-based method to measure human fibroblast growth factor receptor 1-4 (FGFR1-4) gene expression. *DNA Cell Biol* 20:367-79

Thomas KA, Rios-Candelore M, Gimenez-Gallego G, DiSalvo J, Bennett C, et al. 1985. Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6409-13

Tomic-Canic M, Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M. 1998. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci* 17:167-81

Tomlinson DC, Lamont FR, Shnyder SD, Knowles MA. 2009. Fibroblast growth factor receptor 1 promotes proliferation and survival via activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in bladder cancer. *Cancer Res* 69:4613-20

Trachootham D, Alexandre J, Huang P. 2009. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 8:579-91

Turner N, Grose R. 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10:116-29

Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:195-203

Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. 2012. p53 Opens the Mitochondrial Permeability Transition Pore to Trigger Necrosis. *Cell* 149:1536-48

Werner S, Grose R. 2003. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 83:835-70

Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. 2011. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437:199-213

Westwood G, Dibling BC, Cuthbert-Heavens D, Burchill SA. 2002. Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway. *Oncogene* 21:809-24

Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraqech M, Prenois F, Courtin F, et al. 2012. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* 31:1117-29

Wong KK. 2009. Recent developments in anti-cancer agents targeting the Ras/Raf/ MEK/ERK pathway. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4:28-35

Wu Q, Liu S, Ye XF, Huang ZW, Su WJ. 2002. Dual roles of Nur77 in selective regulation of apoptosis and cell cycle by TPA and ATRA in gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 23:1583-92

Wu XR. 2005. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer* 5:713-25

Yamasaki M, Miyake A, Tagashira S, Itoh N. 1996. Structure and expression of the rat mRNA encoding a novel member of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15918-21

Yang JQ, Buettner GR, Domann FE, Li Q, Engelhardt JF, et al. 2002. v-Ha-ras mitogenic signaling through superoxide and derived reactive oxygen species. *Mol Carcinog* 33:206-18

Yang JQ, Li S, Domann FE, Buettner GR, Oberley LW. 1999. Superoxide generation in v-Ha-ras-transduced human keratinocyte HaCaT cells. *Mol Carcinog* 26:180-8

Yasumura Y, Buonassisi V, Sato G. 1966. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res* 26:529-35

Yiangou C, Gomm JJ, Coope RC, Law M, Luqmani YA, et al. 1997. Fibroblast growth factor 2 in breast cancer: occurrence and prognostic significance. *Br J Cancer* 75:28-33

Yohn JJ, Morelli JG, Walchak SJ, Rundell KB, Norris DA, Zamora MR. 1993. Cultured human keratinocytes synthesize and secrete endothelin-1. *J Invest Dermatol* 100:23-6

Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. 2006. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem* 281:15694-700

Zhang Y, Wang H, Toratani S, Sato JD, Kan M, et al. 2001. Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11336-40

Zhao Y, Chaiswing L, Bakthavatchalu V, Oberley TD, St Clair DK. 2006. Ras mutation promotes p53 activation and apoptosis of skin keratinocytes. *Carcinogenesis* 27:1692-8

APÊNDICE

Resultados de reações de sequenciamento de produtos de RT-PCR obtidos a partir de amostras de mRNA de HaCaT e análise por BLAST

FGF1

<GGCGTCATTCAGCTGCAGCTCAGTGCGGAAGCGTGGGGGAGGTGTATATAAAGAGTACCGAGACTGGCCAGTACTTGG
CCATGGACACCGACRGGCTTTTATACGGCTCACAGACACCAAATGAGGAATGTTTGTTCCTGGAAAGGCTGGAGGAGAAC
CATTACAACACCTATATATCCAAGAAGCATGCAGAGAAGAATTGGTTTGTTGGCCTCAAGAAKAATGGGAGCTGCAAACG
CGGTCCTCGGACTCACTATGGCCAGAAAGCAATCTTGTTTCTCCCCCTGCCAGTCTCTTCTGATTAAAGAGATCTGTTCTGG
GTGTTGACCACTCCAKAGAAGTTTCSAGGGGTCCTCACCTGGTTGACCYAAAAATGTTCCCTTGACCATTGGCTGCGCTAAC
CCCCAGCCCACAGAGCCTGAATTTGTAAGCAACTTGCTTCTAAATGCCCAGTTCACTTCTTGCMAAGCCTAAA>

BLAST

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_001144892.1	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 4, mRNA	809	809	98%	0.0	98%
NM_000800.3	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 1, mRNA	809	809	98%	0.0	98%
NR_026695.1	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 7, non-coding RNA	809	809	98%	0.0	98%
NM_001144935.1	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 6, mRNA	809	809	98%	0.0	98%
NM_001144934.1	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 5, mRNA	809	809	98%	0.0	98%
NR_026696.1	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 8, non-coding RNA	794	794	98%	0.0	97%
NM_033136.2	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 2, mRNA	634	634	77%	3,00E-179	98%
NM_033137.2	Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript variant 3, mRNA	625	625	76%	2,00E-176	98%

```
>ref|NM_001144892.1| Homo sapiens fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1), transcript
variant 4, mRNA
Length=3669

 Score =   809 bits (896),  Expect = 0.0
 Identities = 460/469 (98%), Gaps = 2/469 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  6    CATTCAGCTGCAGCTCAGTGCGGAA-GCGTGGGGGAGGTGTATATAAAGAGTACCGAGAC  64
            ||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  248  CATTCAGCTGCAGCTCAGTGCGGAAAGCGTGGGGGAGGTGTATATAAAGAGTACCGAGAC  307

Query  65   TGGCCAGTACTTGGCCATGGACACCGACRGGCTTTTATACGGCTCACAGACACCAAATGA  124
            ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  308  TGGCCAGTACTTGGCCATGGACACCGACGGGCTTTTATACGGCTCACAGACACCAAATGA  367

Query  125  GGAATGTTTGTTCCTGGAAAGGCTGGAGGAGAACCATTACAACACCTATATATCCAAGAA  184
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  368  GGAATGTTTGTTCCTGGAAAGGCTGGAGGAGAACCATTACAACACCTATATATCCAAGAA  427

Query  185  GCATGCAGAGAAGAATTGGTTTGTTGGCCTCAAGAAKAATGGGAGCTGCAAACGCGGTCC  244
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  428  GCATGCAGAGAAGAATTGGTTTGTTGGCCTCAAGAAGAATGGGAGCTGCAAACGCGGTCC  487

Query  245  TCGGACTCACTATGGCCAGAAAGCAATCTTGTTTCTCCCCCTGCCAGTCTCTTCTGATTA  304
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  488  TCGGACTCACTATGGCCAGAAAGCAATCTTGTTTCTCCCCCTGCCAGTCTCTTCTGATTA  547

Query  305  AAGAGATCTGTTCTGGGTGTTGACCACTCCAKAGAAGTTTCSAGGGGTCCTCACCTGGTT  364
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  548  AAGAGATCTGTTCTGGGTGTTGACCACTCCAGAGAAGTTTCGAGGGGTCCTCACCTGGTT  607

Query  365  GACCYAAAAATGTTCCCTTGACCATTGGCTGCGCTAACCCCCAGCCCACAGAGCCTGAAT  424
            |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  608  GACCCAAAAATGTTCCCTTGACCATTGGCTGCGCTAACCCCCAGCCCACAGAGCCTGAAT  667

Query  425  TTGTAAGCAACTTGCTTCTAAATGCCCAGTTCACTTC-TTGCMAAGCCT  472
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||  |||||
Sbjct  668  TTGTAAGCAACTTGCTTCTAAATGCCCAGTTCACTTCTTTGCAGAGCCT  716
```

FGF2

<TRTGAYAATCTGCCTGCTCAGCAGTCACCATAGCAGCTGACTGAAAATCAGCACTGCCTGAGTAGTTTTGATCAGTTTAAC
TTGAATCACTAACTGACTGAAAATTGAATGGGCAAATAAGTGCTTTTGTCTCCAGAGTATGCGGGAGACCCTTCCACCTCC
AGCTGCGAATTTATAGCCTGCCGTGCTTCTAGTAAAACTGATSAAAACTACTGAWGYAAAGCTGAGTGTGGWTRAGRTGC
WATGGTGACTGYWGAGCAGGGCAGATTYCCTGYCTASCCCCCTGCGGTGCTAATCKARTAAGCCACGGCAGGYAACYTYR
AAGTTACTCCCCAGCCCGGAGGACAGKTTTGATGGATACAGAACCGAATTTTTATCTASTTRCATACCTAARACCAAACACA
AAGGWAAAAACCAGACATTAGGMASCACACAMTCAWMAACMCCCCGCYSTKTTTTGTGTGTGGGGGGGSMCCCCCC
CCC>

BLAST

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_002006.4	Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA	275	368	55%	3,00E-71	98%
NR_024435.1	Homo sapiens hypothetical LOC100133991 (LOC100133991), non-coding RNA	41.0	41.0	6%	1.3	88%

```
>ref|NM_002006.4| UEGM Homo sapiens fibroblast growth factor 2 (basic) (FGF2), mRNA
Length=6774

 GENE ID: 2247 FGF2 | fibroblast growth factor 2 (basic) [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)


                                                        Sort alignments for this subject sequence by:
                                                          E value  Score  Percent identity
                                                          Query start position  Subject start position
 Score =   275 bits (304),  Expect = 3e-71
 Identities = 159/162 (98%), Gaps = 1/162 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  7     AATCTGCC-TGCTCAGCAGTCACCATAGCAGCTGACTGAAAATCAGCACTGCCTGAGTAG  65
             |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3527  AATCTGCCCTGCTCAGCAGTCACCATAGCAGCTGACTGAAAATCAGCACTGCCTGAGTAG  3586

Query  66    TTTTGATCAGTTTAACTTGAATCACTAACTGACTGAAAATTGAATGGGCAAATAAGTGCT  125
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3587  TTTTGATCAGTTTAACTTGAATCACTAACTGACTGAAAATTGAATGGGCAAATAAGTGCT  3646

Query  126   TTTGTCTCCAGAGTATGCGGGAGACCCTTCCACCTCCAGCTG  167
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||
Sbjct  3647  TTTGTCTCCAGAGTATGCGGGAGACCCTTCCACCTCAAGATG  3688


 Score = 93.3 bits (102),  Expect = 2e-16
 Identities = 83/109 (76%), Gaps = 0/109 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  185   GTGCTTCTAGTAAAACTGATSAAAACTACTGAWGYAAAGCTGAGTGTGGWTRAGRTGCWA  244
             ||| ||| ||| |||||||| ||||||||| | | |  ||||| | |   | || ||| |
Sbjct  3611  GTGATTCAAGTTAAACTGATCAAAACTACTCAGGCAGTGCTGATTTTCAGTCAGCTGCTA  3552

Query  245   TGGTGACTGYWGAGCAGGGCAGATTYCCTGYCTASCCCCCTGCGGTGCT  293
             |||||||||  |||||||||||||||  ||  ||| |||| | |||||||
Sbjct  3551  TGGTGACTGCTGAGCAGGGCAGATTTGCTCACTACCCCCATCCGGTGCT  3503

>ref|NR_024435.1| UGM Homo sapiens hypothetical LOC100133991 (LOC100133991), non-coding
RNA
Length=1260

 GENE ID: 100133991 MAP3K14-AS1 | MAP3K14 antisense RNA 1 [Homo sapiens]
(10 or fewer PubMed links)


 Score = 41.0 bits (44),  Expect = 1.3
 Identities = 28/32 (88%), Gaps = 0/32 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  9     TCTGCCTGCTCAGCAGTCACCATAGCAGCTGA  40
             ||| |||||||||||||| || | ||||||||
Sbjct  427   TCTCCCTGCTCAGCAGTCCCCGTGGCAGCTGA  396
```

FGFR2

<CGAGTCTCGAGTTGACTTCCAGAGGACCCAAAATGGGAGTTTCCAAGAGATAAGCTGACACTGGGCAAGCCCCTGGGAG
AAGGTTGCTTTGGGCAAGTGGTCATGGCGGAAGCAGTGGGAATTGACAAAGACAAGCCCAAGGAGGCGGTCACCGTGG
CCGTGAAGATGTTGAAAGATGATGCCACAGAGAAAGACCTTTCTGATCTGGTGTCAGAGATGGAGATGATGAAGATGATT
GGGAAACACAAGAATATCATAAATCTTCTTGGAGCCTGCACACAGGATGGGCCTCTCTATGTCATAGTTGAGTATGCCTCT
AAAGGCAACCTCCGAGAATACCTCCGAGCCCGGAGGCCACCCGGGATGGAKCAGCTGCGAAAAGAGTGTTTCGTGTTTCG
CTMMAACMTCAGAGAAGAGCAGCACCACACGGCCTCAACTTACGACGTATTTTGGGGGGGGGGGGTGTCCCCGCCCTG
GATGTCGTCGMGTGKATTWTRCAGATACGCGGGGGGGTGGCTTGATGTATMAAT>

BLAST

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_001144913.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 3, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_001144919.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 9, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_001144914.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 4, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_001144916.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 6, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_001144915.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 5, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_001144918.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 8, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_001144917.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 7, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_000141.4	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 1, mRNA	639	639	68%	0.0	99%
NM_022970.3	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript variant 2, mRNA	639	639	68%	0.0	99%

```
>ref|NM_001144913.1| UGM Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), transcript
variant 3, mRNA
Length=2781

 GENE ID: 2263 FGFR2 | fibroblast growth factor receptor 2 [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)


 Score =   639 bits (708),  Expect = 0.0
 Identities = 365/368 (99%), Gaps = 3/368 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  4     GTCTC-GAGT-TGA-CTTCCAGAGGACCCAAAATGGGAGTTTCCAAGAGATAAGCTGACA  60
             ||||| |||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1540  GTCTCCGAGTATGAACTTCCAGAGGACCCAAAATGGGAGTTTCCAAGAGATAAGCTGACA  1599

Query  61    CTGGGCAAGCCCCTGGGAGAAGGTTGCTTTGGGCAAGTGGTCATGGCGGAAGCAGTGGGA  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1600  CTGGGCAAGCCCCTGGGAGAAGGTTGCTTTGGGCAAGTGGTCATGGCGGAAGCAGTGGGA  1659

Query  121   ATTGACAAAGACAAGCCCAAGGAGGCGGTCACCGTGGCCGTGAAGATGTTGAAAGATGAT  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1660  ATTGACAAAGACAAGCCCAAGGAGGCGGTCACCGTGGCCGTGAAGATGTTGAAAGATGAT  1719

Query  181   GCCACAGAGAAAGACCTTTCTGATCTGGTGTCAGAGATGGAGATGATGAAGATGATTGGG  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1720  GCCACAGAGAAAGACCTTTCTGATCTGGTGTCAGAGATGGAGATGATGAAGATGATTGGG  1779

Query  241   AAACACAAGAATATCATAAATCTTCTTGGAGCCTGCACACAGGATGGGCCTCTCTATGTC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1780  AAACACAAGAATATCATAAATCTTCTTGGAGCCTGCACACAGGATGGGCCTCTCTATGTC  1839

Query  301   ATAGTTGAGTATGCCTCTAAAGGCAACCTCCGAGAATACCTCCGAGCCCGGAGGCCACCC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1840  ATAGTTGAGTATGCCTCTAAAGGCAACCTCCGAGAATACCTCCGAGCCCGGAGGCCACCC  1899

Query  361   GGGATGGA  368
             ||||||||
Sbjct  1900  GGGATGGA  1907
```

FGFR4

<GGCTGCAGTACTGCGGGGACACCGTCAGTTCCGCTGTCCAGCTGCAGGCAACCCCACGCCCACCATCCGCTGGCTTAAG
GATGGACAGGCCTTTCATGGGGAGAACCGCATTGGAGGCATTCGGCTGCGCCATCAGCACTGGAGTCTCGTGATGGAGA
GCGTGGTGCCCTCGGACCGCGGCACATACACCSMCGMTATYCMTSYGATAATCGSGCTGATGGCGACTRAATGCTCCGCG
GAATGCAGGGGGTTATTCGCRCAWAGTGGGGGGGGGGGGGGCGGWTGGCACTWACRGATTCKTTGTWTGCTGGGTG
CTTTCTTCGTTTCCGGGTGARGGCAAYAGCAGGAGGTACTTAATATGCCCGCGAYGMTTCSCARTAGMMAYCMTCTGKTG
TGGGGGGGGGSYCCCCCCAA>

BLAST

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_022963.2	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), transcript variant 2, mRNA	318	318	45%	3,00E-84	98%
NM_213647.1	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), transcript variant 3, mRNA	318	318	45%	3,00E-84	98%
NM_002011.3	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), transcript variant 1, mRNA	318	318	45%	3,00E-84	98%

```
>ref|NM_022963.2| UEGM Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4), transcript
variant 2, mRNA
Length=2807

 GENE ID: 2264 FGFR4 | fibroblast growth factor receptor 4 [Homo sapiens]
(Over 100 PubMed links)


 Score =   318 bits (352),  Expect = 3e-84
 Identities = 187/190 (98%), Gaps = 3/190 (2%)
 Strand=Plus/Plus

Query  4    TGCAGTAC-TGCGGGGA-CACCGTCA-GTTCCGCTGTCCAGCTGCAGGCAACCCCACGCC  60
            |||||||| |||||||| |||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  533  TGCAGTACCTGCGGGGAACACCGTCAAGTTCCGCTGTCCAGCTGCAGGCAACCCCACGCC  592

Query  61   CACCATCCGCTGGCTTAAGGATGGACAGGCCTTTCATGGGGAGAACCGCATTGGAGGCAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  593  CACCATCCGCTGGCTTAAGGATGGACAGGCCTTTCATGGGGAGAACCGCATTGGAGGCAT  652

Query  121  TCGGCTGCGCCATCAGCACTGGAGTCTCGTGATGGAGAGCGTGGTGCCCTCGGACCGCGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  653  TCGGCTGCGCCATCAGCACTGGAGTCTCGTGATGGAGAGCGTGGTGCCCTCGGACCGCGG  712

Query  181  CACATACACC  190
            ||||||||||
Sbjct  713  CACATACACC  722
```

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Julianna Dias Zeidler
Nascida a 11 de Julho de 1984 em Boa Vista, Roraima, Brasil.

E-mail: julianna@usp.br

EDUCAÇÃO

Centro Federal de Educação Tecnológica de Roraima. Boa Vista, RR, 2001.
Ensino Médio.

Centro Federal de Educação Tecnológica de Roraima. Boa Vista, RR, 2003.
Curso técnico em laboratório - habilitação em patologia clínica.

Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, RR, 2007.
Bacharelado em Ciências Biológicas – ênfase em bioquímica e biologia molecular.

Doutoramento direto em Bioquímica, junto ao grupo de pesquisa do Laboratório Especial de Ciclo Celular (LECC), Centro de Toxinologia Aplicada (CAT), Instituto Butantan, pelo programa de pós-graduação do Instituto de Química (IQ) – USP.

OCUPAÇÃO

Aluna de Doutorado; Bolsista Capes.

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos

Zeidler, J.D.; Acosta, P.O.A.; Barreto, P.P.; Cordeiro, J.S. Dengue virus in Aedes aegypti larvae and infestation dynamics in Roraima, Brazil. *Rev. Saúde Pública* [online]. 2008, vol.42, n.6, p. 986-991.

Artigos em preparação

Zeidler, J.D.; Lopes, E.; Armelin, H.A. Differences in mitogenic signaling triggered by FGF1, FGF2 and KGF in human keratinocytes.

Galvão, J.S.; Zeidler, J.D.; Armelin, H.A. FGF2 has tumor suppressor proprieties in human cells expressing inducible H-RasV12.

Zeidler, J.D. & Armelin, H.A. PMA promotes oxidative stress and apoptosis in H-RasV12-dependent human malignant keratinocytes.

Seleção de Resumos em Congressos

Zeidler, J.D. PMA antagonic effects on proliferation of immortalized human HaCaT keratinocytes: stimulation of normal and inhibition of H-RasV12-transformed keratinocytes. 10th International Congress on Cell Biology. 2012. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Poster session.

Zeidler, J.D. Effect of FGF2 on human keratinocytes expressing H-RasV12. XII Reunião Científica Annual do Instituto Butantan. 2010. São Paulo, SP, Brasil. Sessão de pôster.

Zeidler, J.D. Investigation of FGFs role in human keratinocytes cell line HaCaT expressing H-RasV12 oncogene. XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia, SP, Brazil. Poster session.