UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

MARIANA TAMAZATO LONGHI

**O PAPEL DA FOSFORILAÇÃO DE MASPINA EM
RESÍDUOS DE TIROSINA**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na SPG:

31/08/2012

MARIANA TAMAZATO LONGHI

**O papel da fosforilação de maspina
em resíduos de tirosina**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Nathalie Cella

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Longhi, Mariana Tamazato
L854p O papel da fosforilação de maspina em resíduos de tirosina /
Mariana Tamazato Longhi. – São Paulo, 2012.
85p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Cella, Nathalie

1. Fosforilação de proteína : Bioquímica 2. Transdução de
de sinal : Biologia molecular I. T. II. Cella, Nathalie, orientador.

574.19245 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

“O papel da fosforilação de maspina em resíduos de tirosina”

MARIANA TAMAZATO LONGHI

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovado (a) por:

**Profa. Dra. Nathalie Cella
(Orientadora e Presidente)**

**Profa. Dra. Daniela Sanchez Bassères
IQ - USP**

**Profa. Dra. Ana Paula Lepique
ICB - USP**

**SÃO PAULO
30 de outubro de 2012**

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional, pelo amor, carinho e compreensão. Por serem modelos de pessoas honestas e batalhadoras, que eu tanto admiro.

À minha querida irmã, Érica, por estar sempre ao meu lado.

À minha orientadora Dra. Nathalie Cella, por me acolher como aluna, confiar e acreditar no meu potencial, por ter me ensinado tanto e ser um exemplo de profissional apaixonado e dedicado ao seu trabalho.

À Cris e Mari Pereira, mais que colegas, amigas, que tanto me ajudaram nesse período.

À todos os alunos e técnicos do laboratório do IQ onde trabalhei no início do mestrado, e especialmente à professora Dra. Maria Júlia Alves Manso, professor Dr. Walter Colli, professora Dra. Deborah Schechtman, professor Dr. Ricardo Giordano e ao professor Dr. Robert Ivan Schumacher.

À todos os alunos e técnicos do laboratório atual no ICB, à professora Dra. Marilene Hohmuth Lopes e especialmente à professora Dra. Vanessa Moraes Freitas que por tantas vezes me auxiliou em experimentos e discutiu ideias.

Ao professor Dr. Fábio Sivieiro que permitiu que eu usasse os equipamentos do seu laboratório e ao Adam por me auxiliar nos ensaios e trocar experiências.

À todos os amigos que fiz no IQ, ICB e durante a graduação no IB.

À Talita e Aninha, minhas amigas, roomates, quase irmãs. Obrigada por tudo, pela maravilhosa experiência de morar com vocês mesmo que por pouco tempo. Também agradeço ao Léo e Edilson que estavam sempre conosco.

À minhas amigas de infância, Angélica, Danielle, Larissa, Luciana, Patrícia e Priscila, pelo apoio, diversão, conselhos e broncas.

À minha família maravilhosa, avôs, tios, primos e agregados que fazem da minha vida mais feliz. E especialmente ao João por tornar essa família ainda mais feliz.

Às agências Fapesp e CNPq pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

RESUMO

Longhi, M.T. **O PAPEL DA FOSFORILAÇÃO DE MASPINA EM RESÍDUOS DE TIROSINA**. 84p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Maspina (mammary serpin) foi identificada em 1994 como uma serpina (serine protease inhibitor) que apresenta atividade de supressão tumoral. Foi classificada como uma serpina devido à homologia na sequência de aminoácidos, porém, maspina não apresenta atividade de inibição de serina proteases.

Entre os efeitos biológicos de maspina estão a modulação da adesão, a inibição do crescimento e a invasão tumoral, a inibição da angiogênese, o efeito pró-apoptótico e o controle da resposta ao stress oxidativo, propriedades que contribuem para supressão tumoral. Esta diversidade de funções se reflete nos inúmeros ligantes de maspina e na sua localização subcelular, já que é encontrada na membrana plasmática, no citoplasma, núcleo e mitocôndrias. A localização subcelular de maspina guarda importante relação com sua função, já que foi demonstrado que sua localização nuclear está correlacionada com bom prognóstico em diversos tumores e seu efeito supressor de tumor foi observado somente quando maspina está localizada no núcleo.

Entre os ligantes de maspina estão a HDAC1, IRF6, GST, HSP90 e HSP70, β 1 integrina, uPAR e colágeno tipo I e III. O mecanismo molecular envolvido na regulação dessas atividades não foi elucidado, e até o momento,

somente um gene e uma proteína de maspina foram descritos, desta forma alterações pós-traducionais devem estar envolvidas na regulação dessas atividades.

Com objetivo de verificar se há modificações pós-traducionais em maspina, utilizamos células MCF10A, que expressam grande quantidade dessa proteína, e submetemos seu extrato proteico à separação por gel bidimensional seguido de *western blot*. Identificamos quatro formas de maspina com a mesma massa molecular (42kDa), mas pontos isoeletricos distintos. Três destas formas são sensíveis ao tratamento com fosfatase ácida, o que sugere que estas sejam fosforiladas.

Utilizamos ainda peroxidovanadato de sódio, um potente inibidor de tirosina fosfatase para investigar o papel da fosforilação de maspina em resíduos de tirosina. Através de *western blot* e imunofluorescência, observamos que o tratamento das células com o inibidor resultou no aumento dos níveis celulares de maspina assim como no seu acúmulo no citoplasma.

Deste modo, concluímos que existem três diferentes fosfoformas de maspina em células MCF10A e ainda a inibição de tirosinas fosfatases aumentam os níveis de maspina e resultam no acúmulo da proteína no citoplasma. Esses resultados sugerem que a fosforilação pode estar envolvida na localização subcelular de maspina e na regulação dos seus níveis proteicos na célula.

Palavras-chave: maspina, fosforilação, tirosina, células MCF10A, localização subcelular.

ABSTRACT

Longhi, M.T. **ROLE OF MASPIN PHOSPHORYLATION ON TYROSINE RESIDUES**. 84p. Masters Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Maspin (mammary serpin) was identified in 1994 as a serpin (serine protease inhibitor) which presents tumor suppressor activity. It was classified as a serpin due to its homology in amino acids sequence; however, maspin doesn't exhibit serine protease inhibition activity. Among maspin biological effects are modulation of cell adhesion, inhibition of tumor growth, invasion and angiogenesis, a pro-apoptotic effect and control of oxidative stress response, properties which contribute to tumor suppression. This functional diversity reflects maspin numerous ligands and its subcellular localization, since it is found on the plasma membrane, in the cytoplasm, nucleus and in mitochondria. Maspin subcellular localization is closely related to its function, as its nuclear localization correlates with good prognostic in several tumors and maspin tumor suppressor activity is only observed when it is located in the nucleus.

Among maspin ligands are histone H1 deacetylase, IRF6, GST, HSP90 e HSP70, β 1 integrin, uPAR and type I and III collagen. The molecular mechanisms involved in the regulation of maspin biological activities are poorly understood. So far, only one gene and one protein have been assigned to maspin, so posttranslational modification should be involved.

In order to verify posttranslational modification in maspin, we utilized MCF10A cells, which express great amount of this protein, and we submitted its proteic extract to 2D-SDS-PAGE followed by western blot. We identified four maspin forms with the same molecular mass (42kDa), but different isoelectric point. Three of these forms are sensitive to acidic phosphatase treatment, suggesting that they are phosphorylated maspin forms.

We also utilized sodium peroxovanadate, a potent tyrosine phosphatase inhibitor to investigate the role of maspin tyrosine phosphorylation. Through western blot and immunofluorescence analyses, we observed that cell treatment resulted in increase in maspin cellular levels as well as its cytoplasmic accumulation.

Thus, we concluded that there are three diferente maspin phosphoforms in MCF10A cells and yet tyrosine phosphatase inhibition increases maspin levels and results in accumulation of the protein in the cytoplasm. These data suggest that phosphorylation may be involved in maspin subcellular localization and regulation of its protein levels in the cell.

Key words: maspin, phosphorylation, tyrosine, MCF10A cells, subcellular localization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADRM1 – Molécula Reguladora de Adesão 1 (*Adhesion Regulating Molecule 1*)

AP-1 – Proteína Ativadora 1 (*Activator Protein-1*)

ATF – Fator de Transcrição Artificial (*Artificial Transcription Factor*)

BSA – Albumina de Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CAP2 – Antiproteínase de Citoplasma 2 (*Cytoplasmic Antiproteinase 2*)

CSF-1 – Fator Estimulante de Colônia 1 (*Colony stimulating factor 1*)

DTT – Ditioneítoí (Dithiothreitol)

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

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

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

EGTA – Ácido Etileno Glicol Tetracético (*Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*)

ELISA – Ensaio Imunoenzimático Indireto (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*)

ERK1/2 – Proteínas Quinases Reguladas por Estímulos Extracelulares (*Extracellular Signal Regulated Kinases 1/2*)

FAK – Quinase de Adesão Focal (*Focal Adhesion Kinase*)

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*)

GST – Glutathione S-Transferase (*Glutathione S-Transferase*)

HDAC1 – Histona Deacetilase 1 (*Histone Deacetylase 1*)

HIF – Fator Induzido por Hipóxia (*Hypoxia Inducible Factor*)

HRE – Elemento Responsivo a Hormônios (*Hormone response element*)

HSP70 – Proteína de choque térmico de 70kDa (*Heat Shock Protein 70*)

HSP90 – Proteína de choque térmico de 90kDa (*Heat Shock Protein 90*)

ILK – Quinase acoplada a Integrina (*Integrin-linked kinase*)

IPG – Gradiente de pH Imobilizado (*Immobilized pH Gradient*)

IRF6 – Fator Regulador de Interferon 6 (*Interferon regulatory factor 6*)

MM – Massa Molecular (*Molecular Mass*)

MnSOD – Superóxido dismutase de manganês (*Manganese Superoxide Dismutase*)

NLS – Sinal de Localização Nuclear (*Nuclear Localization Signal*)

NSCLC – Células de Carcinoma de Pulmão Não-Pequenas (*Non-Small Cell Lung Carcinoma*)

PAI-2 – Inibidor do ativador de plasminogênio 2 (*Plasminogen activator inhibitor-2*)

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

PDCD4 – Proteína de morte celular programada 4 (*Programmed Cell Death Protein 4*)

PEDF – Fator Derivado do Pigmento Epitelial (*Pigment Epithelium Derived Factor*)

pI – Ponto Isoelétrico (*Isoelectric Point*)

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

PMSF – Fenilmetilsulfonil Fluoreto (*Phenylmethanesulfonyl Fluoride*)

Rac1 – Ras-relacionada ao Substrato C3 da toxina Botulínica 1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*)

RIPA – Ensaio de Radioimunoprecipitação (*Radioimmunoprecipitation Assay*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RSL – Domínio reativo de Serpinas (*Reactive Site Loop*)

SCCA – Antígeno de carcinoma de células escamosa (*Surface expression of squamous cell carcinoma antigen*)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE – Gel de Poliacrilamida para Eletroforese - Dodecil Sulfato de Sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

TBS – Tampão Tris-HCl salino (*Tris Buffered Saline*)

tPA – Ativador de Plasminogênio do tipo tecidual (*Tissue Plasminogen Activator*)

TPM1 – Tropomiosina 1 (*Tropomyosin 1*)

uPA – Ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator*)

uPAR – Receptor do Ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase (*Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*)

WAP – Proteína ácida do Soro (*Whey Acidic Protein*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1.Maspina: Identificação e classificação	14
1.2.Estrutura.....	16
1.3.Efeitos Biológicos	19
1.3.1.Inibição do crescimento e invasão tumoral	21
1.3.2.Adesão e migração celular.....	22
1.3.3.Inibição da Angiogênese.....	22
1.3.4.Efeito pró-apoptótico.....	23
1.3.5.Controle da resposta ao stress oxidativo	24
1.3.6.Modulação da expressão gênica por maspina	25
1.4.Regulação da expressão de maspina (gene e proteína).....	28
1.5. Controle da atividade de maspina por alterações pós-traducionais	31
2.OBJETIVOS	34
3.MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1.Cultura de células.....	35
3.2.Extração de proteína total das culturas celulares	35
3.2.1.Extrato para SDS-PAGE ou imunoprecipitação de proteína.....	36
3.2.2.Extrato para 2D-SDS-PAGE	36
3.2.3.Fracionamento de núcleo e citoplasma.....	36
3.2.4.Extrato nuclear para 2D-SDS-PAGE.....	37
3.2.Tratamento do extrato com fosfatase ácida	37
3.4.Dosagem de proteínas	37
3.5.Imunoprecipitação	38
3.6. <i>Western blot</i>	38
3.7.Imunofluorescência indireta.....	39
3.8.Separação das isoformas por 2D-SDS-PAGE	41
3.9. Tratamento das células MCF10A com inibidor de tirosina fosfatase	42

4. RESULTADOS	43
4.1. Modelo de estudo	43
4.2. Identificação de formas de maspina diferencialmente fosforiladas	44
4.3. Distribuição das formas fosforiladas de maspina nas frações nuclear e citossólica	49
4.4. Papel biológico da fosforilação de maspina	53
4.5. Análise das formas de maspina em célula tumoral	62
4.5. Vias de sinalização	64
5. CONCLUSÕES.....	69
6. REFERÊNCIAS	71
7. ANEXO.....	82

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o que mais acomete mulheres em todo o mundo e é também responsável pelo maior número de mortes entre as mesmas (Maxmen, 2012). No Brasil foram estimados 52680 novos casos de câncer de mama para o ano de 2012, em estudo realizado pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/Ministério da Saúde. Assim, torna-se fundamental o estudo da patologia bem como das funções básicas desse órgão para o desenvolvimento de terapias e diagnósticos.

A progressão tumoral, em todos os tipos de neoplasia ocorre a partir da transformação de células normais para um estado tumoral à medida que essas adquirem certas capacidades biológicas que envolvem os seguintes fatores: a resistência à morte celular, indução de angiogênese, manutenção da proliferação, sustentação da capacidade de replicação, evasão de supressores de crescimento, e ativação da invasão e metástase (Hanahan e Weinberg, 2011). Portanto, é essencial conhecer os processos que mantêm a homeostase para compreender melhor os desvios que levam ao estado patológico. Muitos estudos nessa área buscam detectar as diferenças entre células normais e células tumorais, e a partir dessa abordagem, a proteína maspina (*mammary serpin*) foi identificada e relacionada à atividade de supressão tumoral.

1.1. Maspina: Identificação e classificação

As serpinas (*serine protease inhibitor*) pertencem a uma superfamília de proteínas que apresentam uma estrutura conservada que está relacionada a

algumas propriedades funcionais. O nome da família é derivado da atividade que a maioria dos membros desse grupo apresenta, a inibição de serina proteases, principalmente as proteases da família das quimiotripsinas. Alguns membros dessa família, no entanto, não realizam esta atividade, e desenvolveram papéis distintos durante a evolução, como é o caso da maspina.

Maspina foi identificada a partir do método de hibridização subtrativa utilizado na busca por genes candidatos a supressores de tumor em linhagens de células de epitélio mamário. O estudo revelou que em diversas linhagens de células tumorais a expressão de maspina estava drasticamente reduzida. O mesmo estudo constatou que a transfecção do gene de maspina em células tumorais diminui tanto a capacidade de invasão *in vitro* quanto a habilidade de induzir tumores e metástase em camundongos (Zou, Anisowicz *et al.*, 1994b; a).

O gene presente em humanos está localizado num *cluster* de serpinas no cromossomo 18q21.3 que contém ainda os genes para *surface expression of squamous cell carcinoma antigen 1 e 2* (SCCA-1 e SCCA-2), *Plasminogen activator inhibitor-2* [PAI-2] (Sager, Sheng *et al.*, 1994), *Cytoplasmic Antiproteinase 2* (CAP2), *bomapin* (Bartuski, Kamachi *et al.*, 1997), *headpin* (Nakashima, Pak *et al.*, 2000) e *megsin* (Inagi, Miyata, Imasawa *et al.*, 2002; Inagi, Miyata, Nangaku *et al.*, 2002). O cDNA de maspina codifica para uma proteína de 42kDa (376 aminoácidos), que foi classificada como serpina (subgrupo ov-serpinas, as quais são relacionadas a ovalbumina) devido à homologia na sequência de aminoácidos, apesar de não apresentar atividade de inibição de serina proteases (Pemberton, Wong *et al.*, 1995; Bass, Fernandez *et al.*, 2002). Mais de um transcrito de maspina foram identificados (Strausberg, Feingold *et al.*, 2002), e observados experimentalmente (Duan, Zhang *et al.*,

2003), além de uma proteína de menor massa molecular (36kDa) observada somente por *western blot*, utilizando 0,1% SDS no tampão de transferência (Smith, Watson *et al.*, 2003). No entanto, apenas maspina de maior massa molecular foi caracterizada e os efeitos descritos estão relacionados à mesma.

Apesar de ter sido identificada em tecidos mamários, sabe-se hoje que a molécula está presente em inúmeros outros tecidos como útero, testículo, placenta, estômago, intestino, pâncreas, pele, rim e amígdala, porém quase que exclusivamente em epitélios (Pemberton, Tipton *et al.*, 1997). Além de humanos, a sequência de maspina pode ser encontrada em camundongos, ratos, galinha e sapo. Dessas, as sequências em galinha e sapo não demonstraram ser ortólogos confiáveis, mas apresentam grande semelhança estrutural (Law, Irving *et al.*, 2005). Maspina presente em ratos e camundongos apresenta 88 e 89% de homologia com a sequência humana, respectivamente, e compartilha ainda os mesmos efeitos biológicos como a perda de expressão em células tumorais, e a diminuição da tumorigenicidade após re-expressão nas mesmas (Umekita, Hiipakka *et al.*, 1997; Zhang, Sheng *et al.*, 1997; Zhang, Shi *et al.*, 2000; Shi, Zhang *et al.*, 2001b).

1.2. Estrutura

A estrutura de maspina foi resolvida em 2004/2005 (Al-Ayyoubi, Gettins *et al.*, 2004; Law, Irving *et al.*, 2005). Consiste em nove α -hélices (hA-hI) e três folhas β antiparalelas (sA, sB e sC) em conformação característica das serpinas (**Figura 1**). Entre as folhas β sA e sC localiza-se o *reactive site loop* (RSL), uma sequência de 17 aminoácidos que apresenta-se exposta na estrutura da

proteína. Em serpinas inibitórias, o RSL é responsável pelo reconhecimento das proteases.

Figura 1. Representação da estrutura de maspina humana. A estrutura de maspina é característica das serpinas e consiste em nove α -hélices (hA-hI) e três folhas β (sA-sC). O sítio RSL, com maior grau de mobilidade e, portanto baixa densidade eletrônica está representado por linha tracejada. Retirado de (Narayan e Twining, 2010).

A inibição de proteases por serpinas ocorre por um mecanismo irreversível e suicida, que envolve uma grande mudança conformacional de transição entre os estados *stressed* (S) para o estado *relaxed* (R) da molécula. Após interação com o substrato, o RSL insere-se na folha β sA e promove o deslocamento da protease ligada covalentemente a enzima. A completa inserção cliva o sítio RSL e distorce o sítio ativo da protease, resultando em sua inativação. É provável que a energia necessária para efetuar a inserção esteja relacionada à maior estabilidade na conformação onde o *loop* está inserido na estrutura em relação à conformação nativa da enzima (Silverman, Bird *et al.*, 2001).

Foram descritos dois possíveis alvos da atividade inibitória de maspina, *urokinase-type plasminogen activator* [uPA] (Mcgowen, Biliran *et al.*, 2000) e *tissue plasminogen activator* [tPA] (Sheng, Truong *et al.*, 1998), entretanto, esta é uma informação contraditória na literatura. Estudos bioquímicos indicam que maspina é incapaz de passar pela transição S para R e promover a inibição de proteases (Pemberton, Wong *et al.*, 1995; Bass, Fernandez *et al.*, 2002).

O sítio RSL de maspina é distinto de outras serpinas por ser mais curto (quatro resíduos a menos), mais hidrofóbico e rígido (Al-Ayyoubi, Gettins *et al.*, 2004). Apesar de não ter função de inibição de proteases, o RSL de maspina é essencial para alguns efeitos biológicos da proteína. Foi observado que um peptídeo do RSL de maspina por si só é capaz de aumentar a adesão celular e inibir a invasão de células tumorais (Ngamkitidechakul, Warejcka *et al.*, 2003). Por outro lado, foi demonstrado que o mesmo não afeta as propriedades anti-angiogênicas de maspina (Zhang, Volpert *et al.*, 2000).

Foi identificada em maspina uma importante modificação estrutural que não havia sido descrita para nenhuma outra serpina, a torção da α -hélice hG, que é capaz de adquirir as conformações aberta e fechada. Essa modificação é responsável pela redistribuição de cargas na superfície da molécula e expõe uma região de carga negativa que pode ser importantes para interação com cofatores (Law, Irving *et al.*, 2005).

1.3. Efeitos Biológicos

A invasão tumoral e metástase compartilham diversos aspectos com o processo de desenvolvimento embrionário (Gao, Shi *et al.*, 2004), por isso o papel de maspina na embriogênese foi investigado. Verificou-se que maspina é essencial na fase inicial da embriogênese, uma vez que camundongos *knockout* para maspina não sobrevivem além do período de peri-implantação (Gao, Shi *et al.*, 2004). O estudo dos embriões *knockout in vitro* demonstrou que a ausência de maspina provocou desorganização no desenvolvimento e estrutura da massa interna do trofoblasto, sugerindo que o papel dessa proteína está relacionado à proliferação e adesão celular (Gao, et al. 2004). Experimentos *in vitro* demonstraram ainda que a expressão de maspina é modulada na placenta e no citotrofoblasto durante a gestação, de modo que a capacidade de invasão do citotrofoblasto está relacionada ao nível de expressão de maspina, sendo que o tratamento do mesmo com maspina recombinante diminui tal capacidade (Dokras, Gardner *et al.*, 2002).

O efeito supressor de tumor de maspina foi inicialmente observado em linhagens epiteliais mamárias (Zou, Anisowicz *et al.*, 1994a), deste modo

procurou-se entender se a proteína tinha algum papel na biologia deste tecido. De fato, maspina é essencial para o desenvolvimento completo da glândula mamária. Esse processo durante a gestação envolve diferentes mecanismos regulatórios que promovem eventos de proliferação e diferenciação celular. Após a lactação ocorre remodelamento da estrutura dos alvéolos e dutos, seguido de eventos de apoptose para que a glândula retorne ao estado pré-gestacional. O estudo com camundongos transgênicos que superexpressam maspina sob o controle do promotor do gene de *whey acidic protein* (WAP), um gene que codifica uma proteína do leite, verificou que foram formados poucos alvéolos durante a gestação desses animais e que essas estruturas apresentaram ainda um tamanho reduzido em relação aos animais controle (Zhang, Magit *et al.*, 1999). O estudo sugeriu que maspina tem participação na adesão celular, migração e apoptose das células durante o desenvolvimento das glândulas mamárias.

O efeito de supressão tumoral de maspina é resultado de um conjunto de atividades biológicas que a proteína apresenta, tais como a modulação da adesão, a inibição do crescimento e a invasão tumoral, a inibição da angiogênese, o efeito pró-apoptótico e o controle da resposta ao stress oxidativo, que serão detalhados a seguir. Grande parte dos efeitos foi observado em células tumorais transfectadas com o gene de maspina ou em células tratadas com maspina recombinante, deste modo, os mecanismos envolvidos não estão completamente esclarecidos.

A diversidade de funções de maspina se reflete nos seus inúmeros ligantes assim como na sua localização subcelular. Maspina é encontrada na superfície celular (em junções aderentes e interagindo com as moléculas da

matriz extracelular), citoplasma, núcleo, mitocôndria, e pode ainda ser secretada. Sua localização é fator determinante para suas interações proteicas e atividades biológicas.

1.3.1. Inibição do crescimento e invasão tumoral

Os primeiros efeitos biológicos de maspina observados foram a inibição do crescimento e a invasão tumoral (Zou, Anisowicz *et al.*, 1994a; Sheng, Carey *et al.*, 1996; Shi, Zhang *et al.*, 2001a), processos importantes para inibição da progressão tumoral. Acredita-se que a inibição da invasão por maspina ocorra através do seu efeito sobre a expressão de integrinas, uma vez que o tratamento de células tumorais com maspina recombinante aumenta os níveis de integrinas do tipo $\alpha 5$ e $\alpha 3$, aumentando a adesão à fibronectina e modificando o fenótipo celular de fibroblastos para uma morfologia mais epitelial (Seftor, Seftor *et al.*, 1998). Em abordagem semelhante, isto é, tratamento de células tumorais com maspina recombinante, observou-se inibição da motilidade a partir da diminuição da atividade de *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* [Rac1] (Odero-Marrah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2003; Shi, Stafford *et al.*, 2007).

A interação de maspina com a membrana plasmática parece ser via $\beta 1$ integrina e uPA/uPAR (ativador de plasminogênio do tipo uroquinase e seu receptor), um complexo que promove a conversão de plasminogênio para plasmina, uma protease capaz de clivar uma série de proteínas da matriz extracelular. Foi demonstrado que maspina diminui a atividade do complexo a partir da internalização do mesmo, e ainda interage com o zimógeno pro-uPA inibindo sua ativação (Biliran e Sheng, 2001; Yin, Lockett *et al.*, 2006; Endsley,

Hu *et al.*, 2011). Apesar desses estudos, a relação causal entre a interação de maspina com $\beta 1$ integrina e uPA/uPAR na membrana, ativação das vias acima citadas e o efeito anti-proliferativo e anti-invasão de maspina, ainda não foi estabelecida.

1.3.2. Adesão e migração celular

Maspina tem importante papel na adesão e migração celular em diversos tipos celulares (Qin e Zhang, 2010). A regulação da adesão celular por maspina ocorre através de receptores do tipo integrina, os quais são responsáveis pela conexão entre a matriz extracelular, o citoesqueleto de actina e moléculas sinalizadoras da porção intracelular (Delon e Brown, 2007). De fato, maspina está associada ao citoesqueleto cortical e interage fisicamente com $\beta 1$ integrina (Cella, Contreras *et al.*, 2006a). Acredita-se que essas interações sejam responsáveis pelo aumento da atividade de *Integrin-linked kinase* (ILK) e aumento nos níveis de *Focal Adhesion Kinase* (FAK), resultando na reorganização no citoesqueleto de actina que são necessárias nos processos de adesão e migração celular (Qin e Zhang, 2010). Maspina presente na superfície celular também interage com outras moléculas da matriz extracelular, colágeno I e III (Blacque e Worrall, 2002), e essa interação também parece ser fundamental para o papel de adesão celular.

1.3.3. Inibição da Angiogênese

Outro efeito biológico importante de maspina é a inibição da angiogênese. A angiogênese, formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes, é um processo importante na tumorigênese já que células tumorais tem alta taxa de proliferação e, portanto maior demanda por suprimentos. Evidências de inibição da angiogênese *in vivo* e *in vitro* foram demonstradas em um modelo de retina e também em células tumorais de mama e próstata tratadas com maspina recombinante (Zhang, Volpert *et al.*, 2000; Cher, Biliran *et al.*, 2003). Estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nesse processo, porém é possível que a regulação da proliferação, adesão e migração por maspina estejam envolvidas.

1.3.4. Efeito pró-apoptótico

Outro fator que contribui para a supressão tumoral por maspina é o seu efeito pró-apoptótico. Os primeiros indícios do efeito pró-apoptótico de maspina foram demonstrados em ensaios de superexpressão da proteína em glândulas mamárias de camundongos. Nesse tecido, observou-se a inibição do desenvolvimento alveolar durante a gravidez de camundongos devido à maior taxa de apoptose das células (Zhang, Magit *et al.*, 1999). Estudos mais recentes indicam que o mecanismo envolve a translocação de maspina para a mitocôndria, dissipação do potencial de membrana da organela, liberação de citocromo c e consequente morte celular (Latha, Zhang *et al.*, 2005). O RSL tem papel essencial nessa atividade, visto que sua ausência na estrutura de maspina impede a translocação da molécula para a mitocôndria. Além disso, células tumorais transfectadas com maspina apresentam um aumento da expressão de

Bax, diretamente responsável pelo aumento da permeabilidade mitocondrial em células apoptóticas (Liu, Yin *et al.*, 2004). Além disso, estudos sugerem que a superexpressão de maspina inibe a ativação de Akt (uma quinase responsável pela ativação de fatores de sobrevivência) induzida por hipóxia em tumores de próstata, aumentando deste modo a sensibilidade à apoptose (Mckenzie, Sakamoto *et al.*, 2008). Desta forma, o efeito de supressão tumoral de maspina também parece estar associado à via mitocondrial da apoptose.

1.3.5. Controle da resposta ao *stress* oxidativo

Três proteínas relacionadas ao *stress* foram identificadas como ligantes de maspina citoplasmática, *Glutathione S-Transferase* (GST), *Heat Shock Protein 90* (HSP90) e *Heat Shock Protein 70* [HSP70] (Yin, Li *et al.*, 2005a). A interação de maspina com GST foi detectada em tecidos de próstata normal e tumoral e é diretamente proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio nas células. Tal interação leva à diminuição de espécies reativas de oxigênio (ROS), ao contrário do que ocorre quando a expressão de maspina é inibida por siRNA, que resulta no aumento dos níveis de ROS na célula (Yin, Li *et al.*, 2005b). O efeito de maspina sobre os níveis de ROS pode, portanto contribuir para o efeito de supressão tumoral da proteína já que estudos mostram que a presença de ROS leva, entre outros efeitos, a danos no DNA, proteínas e lipídeos e promove a angiogênese (Dachs e Tozer, 2000).

Observou-se ainda que baixas concentrações de oxigênio resultam em aumento da expressão do gene de maspina assim como a formação de pontes dissulfeto intramolecular na proteína. O significado biológico dessa alteração

ainda é desconhecido (Eitel, Bijangi-Vishehsaraei *et al.*, 2009; Nawata, Shi *et al.*, 2011).

1.3.6. Modulação da expressão gênica por maspina

Maspina atua na modulação da expressão de alguns genes. Apesar de não possuir um sinal de localização nuclear típico, maspina está presente no núcleo das células e nesse, interage com deacetilase de histona H1 (HDAC1), atuando em sua inibição (Li, Yin *et al.*, 2006a). A deacetilação de histonas promove condensação da cromatina, que consequentemente impede o acesso de fatores de transcrição ao DNA, portanto, ao inibir a atividade de HDAC1, maspina interfere na expressão gênica. A regulação da atividade de deacetilases de histona é fundamental para modular a expressão gênica que ocorre durante os processos de desenvolvimento embrionário (Brunmeir, Lagger *et al.*, 2009) e progressão tumoral (Kelly e Marks, 2005). Além disso, outro ligante de maspina é o *Interferon regulatory factor 6* [IRF6] (Bailey, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2006), um fator de transcrição. O efeito de IRF6 é pouco conhecido, mas evidências sugerem que está envolvido na regulação da expressão de genes que codificam N-caderina e vimentina, marcadores da transição epitélio-mesenquimal. A interação de maspina com IRF6 promove a inibição desse fator de transcrição. O mecanismo envolvido no processo de inibição de IRF6 ainda não está claro, maspina pode impedir sua translocação para o núcleo ou já no núcleo impedir sua interação com o DNA (Bailey, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2005).

A **Figura 2** apresenta um modelo resumido dos efeitos biológicos de maspina.

Figura 2. Esquema ilustrativo dos efeitos de maspina observados nas células tumorais. Efeito do tratamento de células tumorais com rMaspina ou re-expressão de maspina observado em modelos **A.** *in vitro* e **B.** *in cellula*. Adaptado de (Bodenstine, Seftor *et al.*, 2012).

Células tumorais com o fenótipo típico de fibroblastos, consequente de transição epitélio mesenquimal, apresentam um fenótipo mais epitelial após a reintrodução de maspina nas células (Odero-Marrah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2003;

Chen, Florens *et al.*, 2005). Para compreender melhor essas modificações, alguns estudos buscaram vias de sinalização que podem estar relacionadas à reexpressão de maspina nas células. A análise por *microarray* dos genes induzidos após introdução de maspina em células tumorais de mama indica que foram ativados genes envolvidos em vias de controle do ciclo celular, regulação transcricional e regulação da estrutura da matriz extracelular (Bailey, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2006). Em outra abordagem, a análise proteômica de células de carcinoma invasivo transfectadas com o gene de maspina indica que ocorre a alteração de expressão de algumas proteínas relacionadas à morte celular, rearranjo do citoesqueleto e degradação proteica levando a aumento da apoptose, redução da capacidade de invasão, reorganização do citoesqueleto e alteração da atividade do proteasoma (Chen, Florens *et al.*, 2005). Verifica-se, portanto um conjunto complexo de atividades, ligantes e localizações celulares de maspina, que necessitam de mais estudos para compreender seus mecanismos e regulação tanto em células normais quanto no processo de progressão tumoral.

Em muitos tecidos verifica-se que a transformação maligna está relacionada à perda da expressão do gene de maspina resultante da metilação do seu promotor (Futscher, Oshiro *et al.*, 2002). Em tumores de mama, tecido em que maspina é muito estudada, observou-se que maiores níveis celulares de maspina estão correlacionados a um melhor prognóstico. O mesmo ocorre para carcinoma epidermóide (Xia, Lau *et al.*, 2000), ovário e renal (Bauerschlag, Habermann *et al.*, 2010), entre outros. Porém, outros estudos obtiveram resultados divergentes desses, mostrando que a expressão de maspina está relacionada a um pior prognóstico clínico (Maass, Hojo *et al.*, 2001; Sood, Fletcher *et al.*, 2002; Umekita, Ohi *et al.*, 2002; Mohsin, Zhang *et al.*, 2003; Smith, Watson *et al.*, 2003). Muitos

desses estudos clínicos relatam que maspina citoplasmática está associada a um mal prognóstico enquanto que maspina nuclear representa o oposto (Mohsin, Zhang *et al.*, 2003; Dietmaier, Bettstetter *et al.*, 2006; Lonardo, Li *et al.*, 2006; Marioni, Gaio *et al.*, 2008; Marioni, Giacomelli *et al.*, 2008). De fato, um estudo recente ressalta que a localização subcelular de maspina é melhor indicativo da progressão tumoral do que seus níveis de expressão (Goulet, Kennette *et al.*, 2011). Verificou-se que o efeito supressor de metástase é perdido se maspina for excluída do núcleo em células de carcinoma, e o estudo sugere que parte desse efeito está associado à atividade de fator de transcrição de maspina, conforme observado para o gene CSF-1 que tem papel na progressão tumoral e metástase em tumores de mama (Beck, Espinosa *et al.*, 2009).

1.4. Regulação da expressão de maspina (gene e proteína)

Em tecido tumorais é comum a perda ou redução da expressão de maspina, que leva ao aumento do potencial invasivo e muitas vezes à metástase. Nesses tecidos não se observa a perda ou rearranjo do gene de maspina (Zou, Anisowicz *et al.*, 1994a), sugerindo que os fatores responsáveis pela regulação da expressão de maspina são alterados durante a progressão tumoral.

O estudo do promotor de maspina por ensaios com gene repórter indicam que o promotor de maspina está menos ativo em tecidos mamários tumorais do que em tecidos normais (Zhang, Maass *et al.*, 1997). Foram identificados sítios de interação de Ets, *Activator Protein-1* (AP-1), *Hormone response element* (HRE), *Hypoxia Inducible Factor* (HIF) e p53 na região promotora do gene de maspina (Zhang, Magit *et al.*, 1997).

O elemento Ets também está presente no desenvolvimento da glândula mamária e é responsável pela regulação da expressão de proteínas do leite como proteína ácidas do soro, lactalbumina e lactoglobulina (Mink, Härtig *et al.*, 1992). O controle por Ets está frequentemente associado a ligação de outras proteínas, e nesse caso foi demonstrado que a proteína AP-1 está envolvida. A ausência de expressão de maspina em células tumorais está relacionada à ausência de ativação do elemento Ets no promotor de maspina e a perda da capacidade de cooperação com AP-1 nessas células (Zhang, Maass *et al.*, 1997).

Em células de próstata a expressão de maspina é negativamente regulada pela região de interação com HRE tanto em células normais quanto em células tumorais.

O p53 está envolvido em supressão tumoral por ser uma proteína que regula ciclo celular e participa de processos de angiogênese e apoptose. Maspina foi identificada como um dos alvos de p53, pois apresenta um sítio de ligação a esta proteína na sua região promotora que ativa sua expressão gênica (Machtens, Kuczyk *et al.*, 2000). Foi então sugerido que a participação de p53 na apoptose e angiogênese ocorre por ação de maspina.

Alterações epigenéticas de genes são frequentemente observadas na tumorigênese (Laird e Jaenisch, 1994). A expressão de maspina também está submetida ao controle epigenético e mostrou ser tecido-específica. Células normais e tumorais que expressam maspina apresentam as citosinas do promotor do gene não metiladas e as histonas dessa região acetiladas, portanto a cromatina está acessível (Akiyama, Maesawa *et al.*, 2003; Fitzgerald, Oshiro *et al.*, 2003; Yatabe, Mitsudomi *et al.*, 2004). Situação inversa ocorre em células normais e tumorais que

não expressam maspina - o promotor do gene de maspina está completamente metilado, as histonas hipoacetiladas e a cromatina inacessível (Domann, Rice *et al.*, 2000; Futscher, Oshiro *et al.*, 2002; Reis-Filho, Torio *et al.*, 2002; Boltze, Schneider-Stock *et al.*, 2003; Bettstetter, Woenckhaus *et al.*, 2005). Corroborando essas observações, o tratamento de células de mama e bexiga deficientes em maspina com 5-aza-2'deoxicitidina e tricotatina A, um inibidor de metiltransferase de DNA e um inibidor de histona deacetilase, respectivamente, resultaram no restabelecimento da expressão de maspina dessas células (Maass, Biallek *et al.*, 2002; Sugimoto, Maass *et al.*, 2004). Esses dados reforçam a hipótese de que o mecanismo de supressão tumoral não está associado somente à presença de maspina nas células.

Atualmente, grande atenção tem sido direcionada aos miRNAs, que são uma classe de RNA não codificante que ocorre naturalmente nas células e tem papel geralmente na inibição da tradução por levar à degradação de RNAm. Ao contrário dos siRNAs, os alvos dos miRNAs são *cluster* de genes, e não um gene específico. Essa classe de RNA afeta diversos processos celulares como a proliferação, apoptose e diferenciação (Chen, Li *et al.*, 2004; Croce e Calin, 2005) e, portanto sua desregulação está envolvida em diversas patologias, como o câncer (Iorio, Ferracin *et al.*, 2005). A partir da utilização de oligonucleotídeos *antisense*, que inibem os miRNAs, um estudo demonstrou que maspina é alvo do miRNA-21 (Zhu, Wu *et al.*, 2008), assim como *tropomyosin 1* (TPM1) e *programmed cell death protein 4* (PDCD4), outras proteínas envolvidas na invasão e metástase. O estudo sugere ainda que o completo silenciamento de maspina requer a atividade dos miRNAs.

Outra forma de regulação pós-transcricional de maspina envolve a participação da enzima *Manganese Superoxide Dismutase* (MnSOD), responsável pela conversão de superóxido, a primeira forma de ROS gerada na cadeia

respiratória, a peróxido de hidrogênio. Assim como maspina, a expressão de MnSOD apresenta-se reduzida em diversos tumores (Oberley e Buettner, 1979; Sun, Colburn *et al.*, 1993; Izutani, Asano *et al.*, 1998). A transfecção de MnSOD em células de tumor de mama e próstata levam à acúmulo do RNAm de maspina, porém, verificou-se que a enzima MnSOD não está envolvida na transcrição do RNAm de maspina, e sim na maior estabilidade do mesmo (Duan, Zhang *et al.*, 2003). O mecanismo não está esclarecido, porém sabe-se que a ligação de fatores na região 3'-UTR é responsável pela regulação da estabilidade de RNAm, e a ligação destes fatores à região é redox sensível (Malter e Hong, 1991; Goswami, Sheren *et al.*, 2000), podendo ser afetada pelos produtos das reações catalisadas por MnSOD.

1.5. Controle da atividade de maspina por alterações pós-traducionais

Diversos efeitos biológicos, localizações subcelulares e ligantes de maspina foram descritos, no entanto pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam essas atividades na célula. Apenas um gene e uma proteína foram descritos na literatura, desse modo torna-se fundamental buscar por regulações a nível proteico de maspina. Algumas modificações pós-traducionais de maspina já foram descritas. A formação de pontes dissulfeto intramoleculares em maspina foi observada sob *stress* oxidativo (Nawata, Shi *et al.*, 2011). Esta forma que apresenta menor massa molecular (36kDa), tem também menor afinidade por GST, e deve ter propriedades distintas da maspina não modificada durante situações de *stress* oxidativo, porém pouco se sabe sobre as funções biológicas dessa molécula.

A nitrosilação de maspina foi observada em células epiteliais de próstata (Lam, Yuan *et al.*, 2010). Tumores de próstata apresentam superexpressão de sintase de óxido nítrico, por isso o estudo identificou proteínas que são potenciais alvos de modificação por nitrosilação entre as quais maspina foi identificada, no entanto, são necessários mais estudos para entender o papel de maspina nitrosilada.

A fosforilação de maspina em resíduos de tirosina foi observada em linhagens de células de epitélio mamário normal, HMEC1331 e 1436N1 (Odero-Marrah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002). O estudo também verificou que a transfecção de maspina em linhagens de células tumorais de glândula mamária também apresentou maspina na forma fosforilada, e indica que a fosforilação pode ocorrer *in vitro* pelo domínio quinase do *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR).

Em células epiteliais de córnea, maspina é fosforilada em resíduos de tirosina, serina e treonina. Interessantemente, a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina ocorre apenas no lisado total dessas células, ao contrário de maspina secretada, que aparentemente não é fosforilada em resíduos de tirosina (Narayan, Mirza *et al.*, 2011). Essas observações sugerem que maspina, que é uma molécula que apresenta propriedades tão distintas de outras serpinas, pode ter papel importante na transdução de sinal intracelular.

Está claro que a presença de maspina nas células, aliada a sua localização nuclear são fatores importantes para sua atividade supressora de tumor, desta forma é importante entender quais são os mecanismos que regulam as atividades de maspina assim como quais são os desvios nessas vias que levam à transformação maligna das células. Visto que maspina apresenta grande diversidade de funções,

ligantes e localizações subcelulares responsáveis por seu efeito biológico, e que apenas um gene e uma proteína foram descritos para esta molécula, este trabalho pretende caracterizar modificações pós-traducionais que possam estar envolvidas na regulação das atividades da proteína, e deste modo esclarecer como estes mecanismos podem estar modificados em células tumorais.

2.OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem por objetivo caracterizar as formas fosforiladas de maspina bem como correlacioná-la com sua localização subcelular.

Objetivos específicos

1. Identificar diferentes formas de maspina em células MCF10A
2. Verificar se a formas de maspina são fosforiladas
3. Caracterizar a distribuição das formas fosforiladas de maspina nos compartimentos nuclear e citoplasmático
4. Verificar o papel da fosforilação de maspina em resíduos de tirosina

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

Células MCF10A (epitélio mamário humano adquirido no banco de células do Rio de Janeiro) foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 5% de soro de cavalo (Gibco), 20 ng/ml de *Epidermal Growth Factor* (EGF) (Invitrogen), 100 ng/ml de toxina colérica (Sigma), 10 ug/ml de insulina (Invitrogen) 500 ng/ml de hidro cortisona (Sigma) e antibióticos penicilina/estreptamicina (Sigma).

Células AsPC-1 (adenocarcinoma de pâncreas, cedidas pelo Professor Eduardo Moraes Rego Reis) foram cultivadas em meio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cutilab).

As duas linhagens foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. O repique foi feito a cada 2 ou 3 dias a partir do tratamento das células com 0,05% tripsina e 0,53 mM de *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* [EDTA] (Invitrogen), utilizando diluição de 1:6.

3.2. Extração de proteína total das culturas celulares

As células mantidas em placas de 10 cm de diâmetro foram lavadas duas vezes com PBS e as proteínas foram extraídas diretamente na placa com tampão de extração adequado ao ensaio subsequente:

3.2.1. Extrato para SDS-PAGE ou imunoprecipitação de proteínas

O lisado foi obtido com tampão RIPA: 50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato de sódio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0 e 1mM *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid* (EGTA), complementado com inibidores de protease [1 mM *Phenylmethanesulfonyl Fluoride* (PMSF), 1 ug/ml aprotinina e 1 ug/ml leupeptina) e de fosfatase (1 mM Na_3VO_4 , 50 uM β -glicerofosfato e 5 mM NaF].

3.2.2. Extrato para 2D-SDS-PAGE

O lisado foi obtido com tampão contendo 8M uréia e 2% CHAPS, 50mM *Dithiothreitol* [DTT] (Mercke), o mesmo tampão utilizado para hidratação das fitas de *Immobilized pH Gradient* (IPG).

Após lise das células com a utilização de um *cell scraper*, os materiais obtidos nos itens 2.1 e 2.2 foram incubados por 20 minutos a 4°C sob agitação para completar a lise, e foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C (MIKRO 200R, Hettich). O sobrenadante, que contém o extrato total de proteínas solubilizadas, foi separado e a concentração proteica determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.3. Fracionamento de núcleo e citoplasma

O lisado foi obtido com tampão contendo 500 mM Hepes pH 7.9, 1M KCl, 500 mM EDTA, 200 mM EGTA e inibidores acima descritos (item 3.2.1) por 30 minutos.

Passada essa incubação, 3% de NP-40 foi adicionado, e a solução foi vortexada por 10 segundos e centrifugada a 14.000 rpm durante 30 segundos. O sobrenadante recolhido corresponde à fração citossólica. Para obtenção da fração nuclear, o *pellet* foi ressuspensionado em tampão contendo 500 mM Hepes pH 7.9, 3 M NaCl, 500 mM EDTA, 200 mM EGTA, inibidores e incubado em gelo por 30 minutos. Foi realizada nova centrifugação a 14.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante, correspondente à fração nuclear, foi dialisado *overnight* contra água milli-Q.

3.2.4. Extrato nuclear para 2D-SDS-PAGE

O extrato nuclear com baixa concentração de sais e, portanto compatível com a focalização isoeletrica foi obtido a partir do kit 2-D Sample Prep for Nuclear Proteins (Pierce).

3.3. Tratamento do extrato com fosfatase ácida

Para o tratamento com fosfatase ácida, o lisado obtido a partir do tampão RIPA não foi acrescido de inibidores de fosfatases, apenas inibidores de proteases.

O pH do extrato proteico foi ajustado para 6,0 com solução de HCl diluída. Este extrato foi incubado por 30 minutos à 37°C na presença de 100ug/mL de fosfatase ácida (Sigma). O extrato controle foi submetido ao mesmo procedimento, porém sem adição de fosfatase ácida.

3.4. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico Bradford (Bradford, 1976) utilizando uma curva padrão de *Bovine Serum Albumin* [BSA] (Cell Signalling), em leitor de *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* [ELISA] (Epoch, BioTek) com valores de absorbância obtidos em 595 nm.

3.5. Imunoprecipitação

O extrato total (500µg) foi incubado com 1,5 ug de anticorpo [anti-maspina monoclonal (Pharmingen); ou anti-fosfo-tirosina (Millipore); ou anti-fosfo-serina (Sigma)] *overnight* a 4°C. O material foi imunoprecipitado com proteína G-sepharose (Zymed) e os *beads* de *sepharose*, lavados 3 vezes com a mesma solução utilizada na extração proteica (item 2.1). O material imunoprecipitado foi fervido em tampão de amostra redutor (2% SDS, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol, 62,5 mM Tris HCl pH6,8) e separado em gel SDS-PAGE a 12%.

3.6. Western blot

Os extratos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, contendo *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) como descrito (Laemmli, 1970).

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Millipore), usando tampão de transferência (25mM Tris, 150mM glicina e 20% metanol) em sistema de transferência Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad). A seguir, a membrana foi bloqueada por 30 minutos em PBS-Molico 5%. Anticorpos primários foram incubados no mesmo tampão de bloqueio *overnight* à 4°C. A seguir a membrana foi

lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS-Tween (TBS-Tween para anticorpos que reconhecem proteínas fosforiladas) 0,1% e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Sigma) foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente em PBS-Molico 5%. A membrana foi lavada novamente conforme descrito acima, e incubada com solução para quimioluminescência [2,5 mM luminol (Sigma), 400µM ácido p-cumárico (Sigma), 100µM Tris HCl pH8,5 ; 5,4mM H₂O₂] e exposta a filme de raios-X (Ortho CP-G Plus - AGFA). As auto-radiografias foram digitalizadas e quantificadas através do software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para tanto, a primeira banda da imagem foi demarcada, em seguida foi selecionado *Analyze>Gels>Select First Lane*. A próxima banda foi selecionada arrastando a demarcação da primeira e selecionando *Analyze>Gels>Select Next Lane*, esse passo foi repetido para as bandas subseqüentes. A seguir utilizamos a ferramenta *Analyze>Gels>Plot Lanes*, que gerou vários gráficos referentes às bandas. A área dos gráficos foi quantificada a partir de *Analyze>Measure*.

3.7. Imunofluorescência indireta

As células MCF10A cultivadas em lamínulas foram lavadas e fixadas em solução de 2% paraformaldeído em PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi realizada a permeabilização incubando as células em solução de 0,5% Triton X-100 em PBS por 10 minutos em ambiente úmido. A seguir foi feito o bloqueio com 10% de soro de cabra em PBS por 1 hora. O anticorpo primário *mouse* anti-maspina (BD) foi diluído 1:100 na solução de bloqueio e incubado overnight a 4°C.

As lamínulas foram então lavadas 3 vezes com PBS/0,1%Tween20. O anticorpo secundário (anti-mouse Alexa-fluor 594 - Invitrogen) foi diluído também na solução de bloqueio (1:5000) e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Três lavagens foram feitas e em seguida incubamos Hoechst (1:5000 em PBS) por 5 minutos a temperatura ambiente. Uma última lavagem foi realizada e a lâmina foi montada utilizando-se meio de montagem (SlowFade Antifade Kit, Invitrogen) e observada em microscópio de fluorescência convencional. As imagens obtidas no microscópio de fluorescência Axiophot widefield fluorescence microscope utilizando objetiva PlanApo 1.4 NA, aumento de 63 (Carl Zeiss). As imagens foram adquiridas utilizando câmera monocromática CCD (CoolSnap HQ2, 137 Photometrics Inc., Tucson, AZ, USA). O microscópio e dispositivos foram manipulados pelo software Metamorph Premier 7.6 (Molecular 138 Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Para quantificação das imagens, utilizou-se o software ImageJ, que possui a ferramenta de medição da densidade de pixels. Para quantificar separadamente os compartimentos nuclear e citoplasmático, a área do núcleo foi selecionada na imagem com marcação para Hoeschst (núcleo), em seguida foi selecionado *Edit>Copy* e na imagem com marcação para maspina foi selecionado *Edit>Selection>Restore Selection*, deste modo a localização nuclear foi preservada em imagem diferente. A quantificação foi feita tanto para área do núcleo quanto para a marcação total de maspina a partir da ferramenta *Analyze>Measure>IntDen*. O valor obtido (*IntDen*: razão da média de intensidade de pixels pela área) para quantificação do núcleo foi subtraído do valor total (ambos da marcação pra maspina) e assim foi obtida a quantificação para o citoplasma.

3.8. Separação das isoformas por 2D-SDS-PAGE

Os extratos utilizados na focalização isoeletrica foram previamente precipitados com acetona a fim de eliminar grande parte dos sais que interferem na eficiência da focalização isoeletrica. Para tanto, três volumes de acetona gelada foram adicionados à amostra e incubados a -20°C por ao menos 2 horas, seguida de centrifugação a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C. A acetona residual foi removida deixando o *pellet* secar, e o mesmo foi ressuscitado em tampão de hidratação citado no item 2.

1ª dimensão. A primeira dimensão consiste na separação das proteínas de acordo com seu pI. Utilizamos fitas de IPG (Bio-Rad) de 17 cm de pH em gradiente linear imobilizado de 4,7 a 5,9. As fitas foram reidratadas em 300µL de extrato proteico ressuscitado em tampão de hidratação e 1X ReadyStrip buffer pH 4,7-5,9 (BioRad), por no mínimo 16 horas a temperatura ambiente. As focalizações isoeletricas foram conduzidas no sistema Ettan IPG phor3 (GE Healthcare), onde as fitas reidratadas foram acomodadas e cobertas com óleo DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare). A programação utilizada para focalização isoeletrica é apresentada a seguir na Tabela 1.

Tabela 1. Programa das condições de focalização utilizada para fita de IPG de 17 cm, pH 4,7 a 5,9.

Step	Voltagem	Volts/h
1	500V	500Vh
2	1000V	800Vh
3	10000V	16500Vh
4	10000V	39200Vh
5	500V	16h
6	10000V	1h

Tratamento das fitas. As fitas foram tratadas por 20 minutos em 2 soluções distintas. A primeira solução, redutora, consiste em solução de equilíbrio, contendo 50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e azul de bromofenol adicionada de 1% DTT (Merck); a segunda solução, necessária para alquilação das proteínas, consiste em solução de equilíbrio adicionada de 2,5% de iodoacetamida (Merck).

2ª dimensão. A segunda dimensão consiste na separação das proteínas por massa molecular. As fitas focalizadas, reduzidas e alquiladas foram submetidas à eletrofore em gel SDS-PAGE 12%, utilizando-se o sistema Ruby (GE Healthcare). As fitas foram colocadas na parte superior do gel de poliacrilamida e o padrão de massa molecular (BenchMark Protein Ladder- Invitrogen) foi aplicado ao lado.

3.9. Tratamento das células MCF10A com inibidor de tirosina fosfatase

Cultura de células MCF10A com cerca de 80% de confluência foram tratadas com 25µM de peroxidovanadato de sódio adicionado ao meio de cultura, conforme

descrito (Edwards, Wilford *et al.*, 1998). A solução de peroxidovanadato de sódio foi obtida através da reação de mesmo volume de 20 μ M de ortovanadato de sódio (Sigma) e 20 μ M de H₂O₂ (Sigma) por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período foi adicionado 200 μ g/ml de catalase (Sigma) para degradar o peróxido de hidrogênio que não reagiu. Duas horas antes do tratamento o meio de cultura das células foi trocado.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Maspina apresenta atividade pleiotrópica nas células, que se reflete em sua diversidade de ligantes e localização subcelular. Foram descritas diferentes modificações pós-traducionais da proteína, incluindo a fosforilação (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002; Narayan, Mirza *et al.*, 2011), nitrosilação (Lam, Yuan *et al.*, 2010) e pontes dissulfeto (Nawata, Shi *et al.*, 2011), no entanto, a função biológica destas modificações é desconhecida. O objetivo deste trabalho foi esclarecer alguns dos mecanismos envolvidos na regulação das atividades de maspina a partir de modificações pós-traducionais.

4.1. Modelo de estudo

Este estudo foi conduzido na linhagem MCF10A, uma linhagem epitelial mamária humana não transformada, diploide e estável geneticamente até mesmo em passagens mais altas na cultura (Vitolo, Weiss *et al.*, 2009). Esta linhagem é também um reconhecido modelo para o estudo de migração e proliferação celular induzida por EGF (Muthuswamy, Li *et al.*, 2001; Irie, Pearline *et al.*, 2005).

Finalmente, células MCF10A expressam maspina endogenamente e em níveis facilmente detectáveis, o que a torna um excelente modelo para investigar os mecanismos moleculares nos quais esta proteína está envolvida. Outras linhagens não tumorais testadas, como EpH4 e HC11 (linhagens de epitélio mamário não transformado de camundongo) não apresentaram níveis detectáveis de maspina (**Figura 3**).

Figura 3. Expressão de maspina em diferentes linhagens celulares verificada por *western blot*. Extrato proteico das células MCF10A, EpH4 e HC11 foram submetidos à eletroforese em gel de SDS a 12%, transferidos para membrana de PVDF e incubados com anticorpo anti-maspina.

4.2. Identificação de formas de maspina diferencialmente fosforiladas

As modificações pós-traducionais são resultado de adição de proteínas ou grupamentos químicos à proteína alvo, logo o 2D-SDS-PAGE é um método ideal para verificar alterações na carga ou massa molecular das proteínas modificadas.

Na primeira tentativa de separar as formas de maspina por 2D-SDS-PAGE, 100µg de extrato proteico das células MCF10A foram submetidos à focalização

isoelétrica em fita de 11cm com gradiente de pH de 3 a 10, seguida de SDS-PAGE a 12% e *immunoblot* com anti-maspina. Este primeiro ensaio (**Figura 4A**) revelou um *spot* predominante de maspina (seta) próximo a um aparente precursor de um *spot* independente (ponta da seta). Neste ensaio, o pI estimado de maspina foi de 5,65 e está próximo do valor calculado para maspina de células epiteliais de córnea (Narayan, Mirza *et al.*, 2011).

Na tentativa de melhorar a resolução na separação das formas de maspina, um segundo experimento foi realizado com uma fita maior, 13 cm, e uma faixa de pH mais restrita, 4 a 7, na qual foram hidratados 700µg de extrato. Observaram-se dois *spots* independentes de maspina, um *spot* majoritário (seta) e outro menor e mais ácido [ponta da seta] (**Figura 4B**). A fim de obter a melhor resolução possível, uma nova focalização do extrato foi realizada em fita de IPG mais longa, 17cm, com gradiente ainda mais restrito, pH 4,7 a 5,9 e 2 mg de extrato proteico. Nesse ensaio observaram-se 4 *spots* de maspina (**Figura 4C**, setas), uma forma majoritária e três formas menos representadas e mais ácidas que esta.

Figura 4. Análise do padrão de *spots* de maspina obtidos por 2D-SDS-PAGE. Extrato proteico total de células MCF10A foi focalizado em fitas de IPG de **A.** 11 cm contendo gradiente linear de pH 3 a 10; **B.** 13 cm contendo gradiente linear de pH 4 a 7; e **C.** 17 cm contendo gradiente linear de pH 4,7 a 5,9. Em seguida prosseguiu-se com SDS-PAGE a 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e maspina foi detectada por *immunoblot* com anti-maspina.

A utilização de uma faixa mais restrita de pH em um comprimento maior de fita de IPG permitiu melhor separação das diferentes formas de maspina, e demonstrou que existem variações no pI das formas identificadas porém pouca alteração em sua massa molecular, o que sugere que maspina sofre modificações pós-traducionais nas células MCF10A. Tendo em vista a boa resolução alcançada na separação das formas de maspina, os ensaios subsequentes foram padronizados de acordo com as condições mencionadas anteriormente.

A fosforilação é a mais ubíqua das modificações pós-traducionais, e adiciona carga negativa à proteína alvo. Essas cargas resultam em alteração no padrão da focalização isoeletrica, de modo que os *spots* passam a apresentar uma distribuição horizontal, que corresponde à variação no pI das proteínas, mas pouca variação vertical, devido à pequena adição na massa molecular [cerca de 80Da por grupo fosfato] (Seo e Lee, 2004). O padrão de *spots* de maspina é compatível com modificações causadas por fosforilação, portanto, a seguir foi verificado se maspina é mesmo fosforilada nas células MCF10A e em quais resíduos esta fosforilação ocorre. Realizamos a imunoprecipitação de maspina seguida de *western blot* com anticorpo anti-fosfo-serina e anti-fosfo-tirosina, porém não foi possível detectar fosfo-serina ou fosfo-tirosina nesse ensaio (dados não mostrados). O ensaio inverso, isto é, a imunoprecipitação do extrato com os anticorpos anti-fosfo-serina e anti-fosfo-

tirosina, seguida de *western blot* com anticorpo anti-maspina, revelou a presença de maspina entre as fosfoproteínas imunoprecipitadas (**Figura 5**).

Figura 5. Análise dos resíduos fosforilados de maspina por imunoprecipitação. A imunoprecipitação foi realizada com anticorpos anti-maspina (2), anti-fosfo-tirosina (3) e anti-fosfo-serina(5). Os produtos das imunoprecipitações foram submetidos à SDS-PAGE a 12%, assim como extrato total de MCF10A (1 e 4). Em seguida o gel foi transferido para membrana de PVDF e incubado com anticorpo anti-maspina. Maspina foi detectada entre as proteínas fosforiladas em tirosina e serina.

Maspina foi detectada entre as proteínas fosforiladas em tirosina e serina do imunoprecipitado. A fosforilação de maspina em resíduos de tirosina já havia sido descrita anteriormente (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002), mas o papel biológico da proteína fosforilada não foi esclarecido.

Trabalho mais recente observou a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina, serina e treonina no lisado total de células epiteliais de córnea. A fosforilação em resíduos de tirosina não foi observada nas moléculas de maspina encontradas no meio condicionado, isto é, na maspina secretada das células epiteliais de córnea (Narayan, Mirza *et al.*, 2011), de forma semelhante, apenas uma pequena fração de maspina fosforilada neste resíduo foi observada no meio condicionado de células epiteliais de mama (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*,

2002). Esses dados indicam que a fosforilação em serina/treonina pode ter papel na secreção de maspina, ao contrário da fosforilação em resíduos de tirosina. Outra possibilidade é que a fosforilação em determinados resíduos de serina/treonina ocorra extracelularmente, conforme observado para outra serpina não-inibitória, *Pigment Epithelium Derived Factor* [PEDF] (Maik-Rachline, Shaltiel *et al.*, 2005).

A detecção de fosfo-tirosina no material imunoprecipitado por maspina também não foi obtida em outro trabalho (Narayan, Mirza *et al.*, 2011), sugerindo que apenas uma pequena porção de maspina seja fosforilada intracelularmente, ou os anticorpos anti-maspina comercialmente disponíveis pouco reconhecem a proteína fosforilada em tirosina.

Como a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina foi observada em outras linhagens celulares (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002; Narayan, Mirza *et al.*, 2011), prosseguimos o estudo da fosforilação nestes resíduos para tentar relacionar um papel biológico a essa modificação. Em sua sequência de aminoácidos, maspina possui cinco tirosinas, nas posições 84, 93, 112, 166 e 356. Apesar de ter sido verificada em nossos experimentos (**Figura 5**) e em outros trabalhos (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002; Narayan, Mirza *et al.*, 2011), a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina foi descrita como improvável já que segundo o estudo da estrutura de maspina, nenhum dos resíduos de tirosina está acessível para fosforilação por uma quinase (Law, Irving *et al.*, 2005). Entretanto, tirosina 84, 112 e 166 estão localizadas em regiões que passam por mudanças conformacionais em outras serpinas e poderiam expor esses resíduos (Law, Irving *et al.*, 2005). Existe ainda a possibilidade de que a fosforilação ocorra durante a tradução e *folding* da proteína, ou ainda, a fosforilação de um resíduo poderia

resultar na mudança conformacional da proteína, e possibilitar a fosforilação de outros resíduos (Narayan, Mirza *et al.*, 2011).

A fim de verificar a fosforilação dos *spots* de maspina em 2D-SDS-PAGE, decidimos realizar o tratamento do extrato com fosfatase ácida, porém o extrato proteico total utilizado nas focalizações isoeletricas não é compatível com tal abordagem por conter grande concentração de uréia em sua composição. Deste modo, partimos para análise dos extratos fracionados, que permitem tal análise.

4.3. Distribuição das formas fosforiladas de maspina nas frações nuclear e citossólica

Inicialmente realizamos um protocolo de fracionamento do extrato celular (**Figura 6**), que separou com eficiência as frações nuclear e citossólica.

Figura 6. Maspina está em diferentes frações celulares. Extrato total de células MCF10A ou o extrato das frações nuclear e citossólica foram separados em SDS-PAGE a 12% e analisados por *immunoblot* com anti-maspina. Para confirmar a eficiência do

fracionamento, a membrana foi também incubada com anti- *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase* (GAPDH) e anti-histona, marcadores de citoplasma e de núcleo, respectivamente. MM - massa molecular em kDa.

Maspina está bem representada no citossol e em menor concentração no núcleo das células MCF10A. A seguir caracterizamos as formas de maspina das frações celulares por 2D-SDS-PAGE, iniciando pela fração citossólica (**Figura 7**).

Figura 7. Identificação da forma fosforilada de maspina na fração citossólica. A fração citossólica de células MCF10A foi analisada com e sem tratamento com fosfatase ácida. Extratos foram focalizados em fita de IPG de 17 cm contendo o gradiente de pH indicado. O material foi transferido para membrana PVDF e analisado por *immunoblot* com anti-maspina.

Três spots de maspina podem ser detectados nessa fração (**Figura 7**), dos quais dois são sensíveis ao tratamento com fosfatase ácida e, portanto representam formas fosforiladas de maspina no citossol das células MCF10A.

A seguir caracterizamos o padrão de distribuição das formas de maspina por 2D-SDS-PAGE na fração nuclear. O extrato nuclear é obtido a partir de uma grande concentração de sal pelo protocolo citado (**Figura 6**), o que o torna incompatível com a focalização isoeletrica, além disso, a diálise da fração apresentou baixo

rendimento. Deste modo, para obter a fração nuclear utilizamos o kit 2D Sample Prep for Nuclear Proteins (Pierce). O extrato foi tratado com fosfatase ácida e submetido à focalização nas mesmas condições (**Figura 8**).

Figura 8. Identificação da forma fosforilada de maspina na fração nuclear. A fração nuclear de células MCF10A foi analisada com e sem tratamento com fosfatase ácida. Extratos foram focalizados em fita de IPG de 17 cm contendo o gradiente de pH indicado. O material foi transferido para membrana PVDF e analisado por *immunoblot* com anti-maspina.

O tratamento com fosfatase ácida resultou na eliminação integral dos *spots* localizados na porção mais ácida da fita, à semelhança do observado na fração citossólica. Esses dados indicam que os *spots* de maspina sensíveis ao tratamento representam moléculas de maspina fosforiladas de forma distinta.

O *spot* localizado na extrema direita não se alterou com o tratamento com fosfatase e, portanto representa a forma desfosforilada de maspina. Apesar de o *spot* aparentemente não fosforilado ter diminuído com o tratamento, acreditamos que isso possa ser devido à proteólise, ainda que inibidores tanto de proteases quanto de fosfatases tenham sido adicionados no tratamento com fosfatase ácida. Mesmo ocorrendo proteólise, podemos afirmar que ocorrem formas fosforiladas de

maspina pois nosso experimento de imunoprecipitação (Figura 5) reforça essa hipótese. Não podemos descartar ainda a hipótese de que o *spot* que desconfiamos ser a forma não fosforilada de maspina seja na realidade dois *spots* próximos que com a técnica de *western blot* apareceram como um *spot* maior. Deste modo, com o tratamento com fosfatase ácida, apenas uma das formas foi eliminada, restando um *spot* menor.

Esse *spot* foi utilizado para o alinhamento e comparação da distribuição nas diferentes frações (**Figura 9**).

Figura 9. Comparação das formas de maspina presentes nos extratos fracionados. **A.** Os extratos fracionados de MCF10A (núcleo, citoplasma e extrato total) foram submetidos a 2D-SDS-PAGE seguido de *western blot* com anti-maspina. O alinhamento dos spots (1, 2, 3 e 4) obtidos revela uma distribuição distinta das formas de maspina entre o núcleo e o citoplasma. **B.** A fita de IPG apresenta gradiente linear de pH e permite o cálculo aproximado do pI das formas de maspina.

A partir desta comparação foi possível observar que a forma 4, que representa maspina não fosforilada, é a forma mais abundante em todas as frações. A proporção em que as formas fosforiladas estão representadas varia de acordo com a fração analisada. O extrato nuclear, por exemplo, apresenta a forma 3 mais representada, ao contrário do extrato citossólico que tem a forma 1 em maior quantidade e a forma 3 não foi detectada. Podemos dizer que as formas fosforiladas de maspina são distribuídas de maneira distinta no núcleo e citossol (**Figura 9A**). Não é possível inferir ainda se a fosforilação é responsável pela translocação de maspina entre os compartimentos subcelulares ou se o padrão da fosforilação é decorrente da compartimentalização de maspina.

A fosforilação de uma proteína modifica seu pI para um valor menor. Há dois principais fatores que determinam o grau de variação do pI de uma proteína após sua fosforilação: a massa molecular e o pI da proteína nativa. Maiores variações no pI após fosforilação de uma proteína são observadas para proteínas menores e mais básicas. A proteína precursora de *Adhesion Regulating Molecule 1* (ADRM1), por exemplo, que tem massa molecular de 40,4KDa e valor de pI próximo a 5, apresentou uma variação de apenas cerca de 0,4 no valor de seu pI após adição de oito grupos fosfato (Kumar, Khachane *et al.*, 2004). Maspina apresenta 42kDa e o pI estimado da forma não fosforilada é 5,65, sugerindo que a fosforilação de fato causará pouca variação no pI da molécula. Os dados obtidos por 2D-SDS-PAGE de fato demonstram variação menor que 0,1 no pI das formas de maspina (**Figura 9B**).

4.4. Papel biológico da fosforilação de maspina

Como demonstrado anteriormente, maspina é fosforilada em resíduos de serina e tirosina em células MCF10A (**Figura 5**). Nosso próximo passo foi tentar identificar o resíduo em que maspina é fosforilada nos *spots* identificados. Para isso tentamos submeter o material imunoprecipitado com anti-maspina à 2D-SDS-PAGE e analisar esse material por *immunoblot* com anti-fosfo-tirosina e anti-fosfo-serina. De forma semelhante ao descrito para o ensaio da **Figura 5**, não foi possível detectar fosfo-tirosina ou fosfo-serina nesse material (dado não mostrado). Estudos anteriores indicam que maspina intracelular é predominantemente fosforilada em resíduos de tirosina (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002; Narayan, Mirza *et al.*, 2011). Assim, fomos testar se os *spots* identificados em nosso modelo são moléculas de maspina fosforiladas em tirosina. Para tanto, decidimos realizar tratamento das células com inibidor de tirosina fosfatases para possibilitar a visualização de uma porção maior de maspina fosforilada e investigar se existe alguma consequência deste tratamento na localização subcelular da mesma. Segundo a literatura, peroxidovanadatos são potentes inibidores de tirosina fosfatases (Posner, Faure *et al.*, 1994) e foram utilizamos sob a forma de peroxidovanadato de sódio (25 μ M) por 90 minutos nas células MCF10A, e seu extrato foi submetido a 2D-SDS-PAGE (**Figura 10**).

Figura 10. Análise do padrão de *spots* de maspina das células MCF10A tratadas com peroxidovanadato de sódio obtidos por 2D-SDS-PAGE. Após tratamento das células com peroxidovanadato de sódio por 90 minutos, o extrato proteico foi obtido e focalizado em fita de IPG 17 cm contendo gradiente linear de pH 4,7 a 5,9. Em seguida prosseguiu-se com SDS-PAGE a 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e maspina foi detectada por *immunoblot* com anti-maspina. As setas indicam *spots* de maspina na porção mais ácida da fita antes não observados, que apareceram com o tratamento.

O tratamento das células com peroxidovanadato de sódio resultou no aumento das formas fosforiladas de maspina. Este dado sugere que maspina intracelular é fosforilada de forma predominante em resíduos de tirosina (**Figura 10**), e o nível de maspina fosforilada em tirosina parece estar sob controle de tirosinas fosfatases. Além disso, novos *spots* de maspina na porção ácida da fita foram identificados (setas), os quais não estavam aparentes no extrato não tratado (**Figura 4C**). Assim, é possível que mais formas fosforiladas de maspina estejam presentes nas células MCF10A, porém estão representadas em baixos níveis e a quantidade de extrato proteico utilizado nos ensaios não permitiu a visualização destas formas.

De forma geral, o nível de maspina, representado pelo tamanho dos *spots*, em todas as suas formas, também aumenta com o tratamento e, portanto foi investigado em seguida o papel da fosforilação em tirosina nos níveis proteicos de maspina. Para este propósito, realizamos diferentes tempos de tratamento das células com peroxidovanadato de sódio, por 15, 45 e 90 minutos, e em seguida os extratos totais tiveram os níveis de maspina analisados por *western blot* (**Figura 11**).

Figura 11. Análise da quantidade de maspina em MCF10A tratadas com peroxidovanadato de sódio. **A.** Após tratamento das células com 25 μ M de solução de peroxidovanadato por 15, 45 e 90 minutos, foram feitos extratos proteicos, e 50 μ g dos mesmos foram resolvidos por SDS-PAGE a 12%, transferidos para membranas de PVDF e analisados por *immunoblot* com anti-maspina e anti- α -tubulina. **B.** A quantificação das bandas foi realizada através do programa ImageJ.

De fato, o nível proteico de maspina aumentou 35% após 15 minutos de tratamento. Este aumento permaneceu após 45 minutos, e decorridos 90 minutos de tratamento o aumento detectado foi 77,7%, que está de acordo com o observado na focalização isoeletrica do extrato tratado (**Figura 10**). O aumento dos níveis de maspina no ensaio indicam que o tratamento com inibidor de tirosina fosfatase pode aumentar o nível de expressão da proteína ou proporcionar maior estabilidade à mesma. A fosforilação em tirosina como mecanismo de regulação da degradação de proteínas já foi descrito para muitas proteínas (Wang, Nakajima *et al.*, 2006; Ruschmann, Ho *et al.*, 2010).

Como o padrão das formas fosforiladas de maspina são diferentes no núcleo e citossol, decidimos investigar se a fosforilação em resíduos de tirosina tem algum papel na localização subcelular de maspina. Realizamos a seguir a imunofluorescência das células MCF10A após tratamento com peroxidovanadato de sódio (**Figura 12**).

B

Figura 12. Localização subcelular de maspina nas células MCF10A determinada por imunofluorescência. **A.** Imagens representativas do ensaio. Células tratadas com 25µM de peroxidovanadato de sódio por 90 minutos foram fixadas e processadas para imunofluorescência com anticorpo monoclonal anti-maspina. O núcleo das células foi corado com Hoechst. **B.** Quantificação foi realizada pelo programa ImageJ. O gráfico representa a média de valores obtidos por célula. Barra de escala – 10 µm.

Após tratamento com peroxidovanadato é possível observar um aumento significativo nos níveis intracelulares de maspina, que estão de acordo com os resultados observados nos ensaios de 2D-SDS-PAGE e *western blot* das células tratadas. A partir da quantificação das fotos (**Figura 12B**) verificou-se que o aumento de maspina citoplasmática é 1,8 vezes maior que o aumento de maspina nuclear após o tratamento, enquanto que o controle da reação não apresentou diferença significativa entre maspina nos dois compartimentos celulares. Esses dados sugerem que a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina tem papel nos níveis de maspina intracelular e levam a um acúmulo da proteína no citoplasma. O acúmulo de maspina no citoplasma das células MCF10A após tratamento com peroxidovanadato de sódio foi analisado por *western blot* dos extratos obtidos após tratamento das células nos tempos de 0, 15 e 90 minutos (**Figura 13**).

Figura 13. Análise da quantidade de maspina citoplasmática de células MCF10A tratadas com peroxidovanadato de sódio. **A.** As células foram tratadas com 25 μ M de solução de peroxidovanadato por 15 e 90 minutos. Extratos das frações citossólicas foram separados

por SDS-PAGE a 12% e analisados por *immunoblot* com anti-maspina e anti-GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase). **B.** A quantificação foi realizada pelo programa ImageJ. MM - massa molecular em kDa.

Mesmo após diversas tentativas, não conseguimos detectar maspina na fração nuclear tratada com inibidor de tirosina fosfatase, por isso apenas os dados da fração citossólica foram apresentados.

Maspina está presente no núcleo das células, porém sua sequência de aminoácidos não apresenta um *Nuclear Localization Signal* (NLS) clássico, o que significa que sua translocação para o núcleo pode ocorrer por meio de um NLS atípico ou a partir da interação com outra proteína nuclear, e translocação conjunta. Devido à variedade e diversidade de vias de transporte nuclear e NLSs, muitos bancos de dados e ferramentas *in silico* foram desenvolvidos e aprimorados para orientar as abordagens experimentais e auxiliar na predição de proteínas nucleares e novos NLS. Essas ferramentas buscam homologia com NLSs conhecidos na literatura (*similarity-based models*) ou detectam propriedades na sequência que seriam compatíveis com a maquinaria de importação nuclear [NLS-based models] (Marfori, Mynott *et al.*, 2011). Utilizando os principais algoritmos de predição [analisados e comparados por (Marfori, Mynott *et al.*, 2011)], nenhuma predição de NLS em maspina com alta probabilidade foi obtida utilizando-se os *similarity-based models* (dados não mostrados). Entre os NLS-based models o programa cNLS Mapper indicou duas sequências de aminoácidos na maspina que poderia ser um NLS monopartido ou um bipartido (**Figura 14A**).

A

cNLS Mapper Result

Predicted NLSs in query sequence	
MDALQLANSFAVDLFRQLCEKEPLGNVLFSPICLSTSLSLAQVGAGDGT	50
ANEIGQVLHFENVRDIPFGFQTVTSDVNKLSSFYSLKLIKRLYVDKSLNL	100
STEFISSTKRPYAKEL	ETVDFKDKLEETKQINNSIRDLDGHFENILAD 150
NSVNDQTKILVVNAAYFVGKMMKFPESSEKCPFLNKDTPKPVQMMNM	200
EATFCMGNIDSINCKIIELPFQNHLSMFILLPKDVEDESTGLEKIEKQL	250
NSESLSQWTNPSTMANAKVKLSIPKFKVERMIDPKACLENLGLKHIFSED	300
TSDFGSMSETRGVALSNVIHKVCLIEDGGDSIEVPGARILQHKDELNA	350
DHPFIYIIRHNKTRNIIFPGKFCSP	375

Predicted monopartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
108	TKRPYAKEL	6

Predicted bipartite NLS		
Pos.	Sequence	Score
87	KLIKRLYVDKSLNLSTEFISSTKRPYAK	6.1

B

Figura 14. Predição teórica do sinal de localização nuclear de maspina. A sequência de aminoácidos de maspina foi submetida à análise pelo programa cNLS Mapper **A**. A figura indica a sequência do provável sinal de localização nuclear. **B**. Localização do provável sinal de localização nuclear na sequência de maspina visualizada com o auxílio do programa Cn3D Macromolecular structure viewer do NCBI. A sequência está representada em amarelo na estrutura. A estrutura de maspina foi resolvida em (Law, Irving *et al.*, 2005).

A sequência obtida tem uma grande porção exposta na estrutura de maspina (**Figura 14B**) e, portanto acessível às carioferinas, moléculas que realizam o transporte núcleo-citoplasma de outras proteínas. Interessantemente, entre os resíduos de aminoácidos das sequências, existem tirosinas, que conforme apresentado anteriormente, parecem regular a localização de maspina através de fosforilação. A fosforilação dos sinais de localização e exportação nuclear regula o processo de translocação núcleo-citoplasma que por fim afeta a transcrição gênica, ciclo celular e proliferação (Nardozzi, Lott *et al.*, 2010). O possível papel deste sinal

de localização nuclear predito assim como o papel da fosforilação na regulação da localização subcelular de maspina estão sendo investigados experimentalmente.

Não podemos descartar a possibilidade de que o acúmulo de maspina nas células MCF-10A seja efeito indireto do tratamento com peroxidovanadato de sódio, visto que esse não é um inibidor específico, ele atua inibindo todas as tirosinas fosfatases da célula. Para esclarecer essa questão, a mutação sítio-dirigida de maspina em resíduos de tirosina estão em produção no laboratório e serão estudadas a seguir.

4.5. Análise das formas de maspina em célula tumoral

Os primeiros estudos clínicos com maspina demonstravam uma relação entre a diminuição de sua expressão nas células e a progressão tumoral. Entretanto, as evidências atuais mostram que a localização subcelular de maspina é um melhor indicativo de prognóstico. A localização citoplasmática de maspina tem sido correlacionada à progressão tumoral, portanto fomos verificar o padrão das formas de maspina em 2D-SDS-PAGE de células AsPC-1, uma linhagem de tumor de pâncreas que tem expressão de maspina sobretudo no citoplasma (Maass, Hojo *et al.*, 2001) (**Figura 15**).

Figura 15. Análise do padrão de spots de maspina das células AsPC-1 obtidos por 2D-SDS-PAGE. O extrato proteico foi obtido e focalizado em fita de IPG 17 cm contendo gradiente linear de pH 4,7 a 5,9 em seguida prosseguiu-se com SDS-PAGE a 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e maspina foi detectada por *immunoblot* com anti-maspina. O retângulo indica as formas de maspina identificadas em células MCF10A e a seta, um *spot* de maspina, na porção ácida da fita, não identificado anteriormente.

Três *spots* de maspina detectados no extrato de células AsPC-1 têm seus correspondentes nos *spots* já identificados em células MCF10A (retângulo), representados pelas formas 1, 2 e 4 (**Figura 9A**). Um novo *spot* de maspina bem representado na parte mais ácida da fita foi detectado (seta), e o valor aproximado do pI desta forma é 5,2.

Existe grande similaridade entre o padrão de *spots* de maspina das células AsPC-1 e de células MCF10A tratadas com peroxidovanadato de sódio (**Figura 10**), o que sugere que maspina das células AsPC-1 também apresenta fosforilação em resíduos de tirosina. Os *spots* de maspina incluídos no retângulo da **Figura 15** também apresentam padrão muito semelhante ao observado para o 2D-SDS-PAGE da fração citossólica das células MCF10A (**Figura 7**). Essas observações suportam a correlação entre maspina fosforilada em tirosina e acúmulo da proteína no citoplasma, visto que em células AsPC-1, maspina tem localização principalmente citoplasmática.

Recentemente, estudos clínicos em tecidos tumorais têm apontado para um melhor prognóstico associado à maspina nuclear (Sood, Fletcher *et al.*, 2002; Mohsin, Zhang *et al.*, 2003). De fato, outro estudo demonstrou que a exclusão de maspina do compartimento nuclear leva a perda de sua atividade de supressão tumoral, e o mecanismo envolve ao menos em parte os genes alvos de maspina

(Goulet, Kennette *et al.*, 2011). Portanto, a localização citoplasmática de maspina pode estar relacionada a um pior prognóstico tumoral devido à perda das atividades de maspina nuclear. Será importante verificar se existe correlação entre os níveis de fosforilação de maspina em tirosina e a progressão tumoral.

4.6. Vias de sinalização

Para compreender como as modificações pós-traducionais regulam as funções de maspina é fundamental que se investigue potenciais vias de sinalização responsáveis por tais modificações. Células MCF10A são cultivadas na presença de vários fatores solúveis, além do soro fetal de cavalo. Na busca por possíveis vias de sinalização envolvidas na fosforilação de maspina, fomos verificar se algum desses fatores presentes no meio de cultivo poderia regular a fosforilação de maspina.

EGF é um dos fatores de crescimento adicionados ao meio de crescimento das células MCF10A. A partir de abordagens proteômicas, um estudo verificou que EGF tem efeito positivo sobre a expressão de maspina (Yang, Cai *et al.*, 2010). Além disso, a cascata de sinalização de EGF está frequentemente alterada em diversos casos de câncer em humanos (Hynes e Lane, 2005), e os receptores de EGF possuem atividade tirosina quinase. Portanto, testamos inicialmente esse fator. Para tanto, células MCF10A foram carenciadas de soro de cavalo e todos os outros fatores de crescimento por 16 horas e em seguida tratadas com 40 ng/ul de EGF por 15 minutos (**Figura 16**).

Figura 16. Análise das formas de maspina após carenciamento. Células MCF10A foram submetidas a 16 horas de carenciamento e em seguida foram tratadas com 40ng/μl de EGF por 15 minutos. O extrato total das células foi focalizado em fita de IPG de 17 cm, pH 4,7 a 5,9. O material foi submetido à eletroforese em gel SDS-PAGE a 12%, transferido para membrana PVDF e analisado por *immunoblot* com anti-maspina.

Após 16 horas de carenciamento ainda observamos um *spot* de maspina que parece ser correspondente a forma 4 do nosso alinhamento (**Figura 9**), e outros *spots* menos representado na parte mais ácida da fita que parecem não ter correspondência com os *spots* já identificados, mas tem padrão compatível com produtos de fosforilação. Portanto, maspina parece estar fosforilada mesmo após 16 horas de carenciamento das células MCF10A, e os *spots* fosforilados tornaram-se ausentes ou sensivelmente reduzidos após tratamento com EGF.

Apesar do experimento não ser diretamente comparável com os dados anteriores em que as células não foram carenciadas, esse novo dado sugere que a via de EGF regula a fosforilação de maspina, e talvez por isso a forma regulada por EGF esteja pouco representada nas células MCF10A cultivadas no meio completo. Esta via poderia estar regulando a fosforilação de maspina de diferentes formas: (1)

ativando de uma fosfatase que desfosforila maspina; (2) inibindo de uma quinase que fosforila maspina ou (3) ativando de uma fosfatase que inibe a quinase responsável pela fosforilação de maspina.

A fosforilação em resíduos de tirosina tem importante papel na via do receptor de EGF, sendo que o mesmo apresenta atividade de tirosina quinase e é capaz de ativar diversas outras tirosina quinases ou fosfatases. Portanto decidimos avaliar se as formas de maspina reguladas pela via de EGF são produto de fosforilação em resíduos de tirosina. Utilizamos novamente o tratamento com o inibidor de tirosinas fosfatases, mas desta vez em células previamente carenciadas de soro e fatores de crescimento (**Figura 17**).

Figura 17. Análise das formas de maspina por 2D-SDS-PAGE das células MCF10A previamente carenciadas de soro e fatores de crescimento e tratadas com peroxidovanadato de sódio. Após 16 horas de carenciamento, as células foram tratadas com peroxidovanadato de sódio por 90 minutos, o extrato proteico foi obtido e focalizado em fita de IPG 17 cm contendo gradiente linear de pH 4,7 a 5,9 em seguida prosseguiu-se com SDS-PAGE a 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF e maspina foi detectada por imunoblot com anti-maspina.

Ao comparar o padrão de *spots* de maspina das células carenciadas com e sem tratamento de peroxidovanadato (**Figuras 16 e 17**) observa-se que o tratamento das células carenciadas com o inibidor de tirosinas fosfatases não

provocou grandes alterações nas formas fosforiladas de maspina. O dado sugere que os *spots* de maspina identificados nas células carenciadas não são resultado de fosforilação em resíduos de tirosina, e sim em resíduos de serina/treonina. A fosforilação nestes resíduos já foi detectada para células MCF10A não carenciadas (**Figura 5**).

Dados da literatura demonstraram que o domínio quinase do receptor de EGF é capaz de promover a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina em ensaios *in vitro* (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002). Entretanto, nossos dados mostram que EGF atua na desfosforilação de maspina em resíduos de serina/treonina e, portanto, na situação de carenciamento de todos os fatores das células MCF10A, o domínio quinase do EGFR não atua diretamente na fosforilação de maspina em resíduos de tirosina, o que indica que a via de sinalização responsável pela regulação da fosforilação dessa molécula é mais complexa. É possível também que o resultado realizado *in vitro* com maspina recombinante e o domínio quinase do receptor de EGF não reflita exatamente os fenômenos que acontecem no citoplasma.

É interessante notar que todas as análises de fosforilação em maspina por 2D-SDS-PAGE foram realizadas a partir de cultura de células MCF10A aderidas, logo, existe a possibilidade de que sinais gerados a partir da interação célula-substrato possam ter papel na fosforilação de maspina. A presença de formas fosforiladas de maspina mesmo após 16 horas de carenciamento de soro e outros fatores de crescimento sugere que a manutenção do estado fosforilado de maspina independe desses fatores. Interessantemente, maspina está associada ao citoesqueleto celular e interage fisicamente com $\beta 1$ integrina (Cella, Contreras *et al.*, 2006b). Receptores do tipo integrina promovem a conexão entre a matriz

extracelular, o citoesqueleto de actina e moléculas sinalizadoras da porção intracelular (Lo, 2006; Delon e Brown, 2007; Zaidel-Bar, Itzkovitz *et al.*, 2007) e, portanto podem estar envolvidas na fosforilação de maspina.

Os receptores da família do ErbB (entre eles o receptor de EGF) são responsáveis por regular processos celulares fundamentais, como a proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência, metabolismo e controle do ciclo celular (Blume-Jensen e Hunter, 2001). A linhagem MCF10A é modelo para estudos de mecanismos que regulam a migração celular induzida por EGF (Irie, Pearline *et al.*, 2005; Amit, Citri *et al.*, 2007; Katz, Amit *et al.*, 2007; Simpson, Selfors *et al.*, 2008), fenômeno primariamente dependente de $\beta 1$ integrina (Katz, Amit *et al.*, 2007). Quando carenciadas de soro, as células MCF10A são induzidas a migrar quando estimuladas por EGF, e não a proliferar (Irie, Pearline *et al.*, 2005; Amit, Citri *et al.*, 2007). Visto que a fosforilação de maspina diminui após tratamento com EGF das células carenciada, e sabendo que maspina está envolvida no processo de migração (Qin e Zhang, 2010) e entre seus ligantes está $\beta 1$ integrina (Cella, Contreras *et al.*, 2006b), é possível que maspina esteja envolvida na via de sinalização que induz a migração celular na presença de EGF. Essa hipótese será testada na continuação desse processo.

5. CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do projeto foram identificadas quatro formas de maspina em células MCF10A por 2D-SDS-PAGE. Os ensaios mostraram que as diferentes formas de maspina exibem variação em seu pI enquanto a massa molecular não apresenta alterações detectáveis. Dentre as formas identificadas, três são sensíveis ao tratamento com fosfatase ácida e, portanto representam formas fosforiladas da proteína. A fosforilação de maspina ocorre em resíduo de serina e tirosina conforme verificado por imunoprecipitações com anticorpo anti-fosfo-serina e anti-fosfo-tirosina, e as formas fosforiladas estão diferentemente distribuídas nas frações nuclear e citoplasmática.

Decidimos abordar o papel da fosforilação em tirosina porque dados anteriores mostram que maspina é fosforilada em resíduos de tirosina em outras linhagens celulares (Odero-Marah, Khalkhali-Ellis *et al.*, 2002; Narayan, Mirza *et al.*, 2011). Já que não foi possível detectar as formas fosforiladas de maspina no material imunoprecipitado com anti-maspina, utilizamos outra abordagem, o tratamento das células com peroxidovanadato de sódio, um potente inibidor de tirosinas fosfatases. O tratamento das células com peroxidovanadato de sódio foi analisado por imunofluorescência e *western blot* e as duas abordagens indicam que ocorre aumento dos níveis de maspina nas células e acúmulo da proteína no citossol, sugerindo que a fosforilação tem um papel na localização subcelular de maspina.

A localização de maspina tem se mostrado importante no prognóstico de câncer, as evidências atuais mostram que existe correlação entre maspina citoplasmática e a progressão tumoral. Portanto, analisamos o padrão de *spots* de

maspina por 2D-SDS-PAGE seguido de *western blot* das células AsPC-1, uma linhagem de tumor de pâncreas que apresenta maspina localizada principalmente no citoplasma das células. As formas de maspina observadas são bem semelhantes aos *spots* obtidos com o tratamento das células MCF10A com peroxidovanadato de sódio, portanto sugere que maspina está fosforilada em resíduos de tirosina nestas células e ainda, é mais uma evidência da correlação entre fosforilação em resíduos de tirosina e a localização citoplasmática de maspina.

Na busca por vias de sinalização envolvidas na fosforilação de maspina, verificamos que a via de EGF regula a fosforilação de maspina. Após 16 horas de carenciamento de soro fetal bovino e fatores de crescimento das células MCF10A, maspina encontra-se fosforilada. O tratamento das células com EGF por 15 minutos resultou em importante inibição da fosforilação de maspina. Este dado sugere que EGF pode estar ativando uma fosfatase ou inibindo uma quinase. Ainda, após tratamento das células carenciadas com inibidor de tirosinas fosfatases, concluímos que as formas de maspina reguladas por EGF não são resultado de fosforilação em tirosina, já que não observamos aumento dos níveis de maspina nesses *spots* após o tratamento.

Os resultados apresentados são os primeiros a indicar um papel biológico para a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina. Concluímos que existe uma correlação entre a fosforilação de maspina em resíduos de tirosina, a localização citoplasmática da mesma, e possivelmente a progressão tumoral nessas condições. Indicamos ainda, o envolvimento da via de EGF na regulação da fosforilação de maspina. Portanto, nossos dados trazem informações relevantes para o desenvolvimento de alvos terapêuticos no tratamento de câncer.

6.REFERÊNCIAS

AKIYAMA, Y. et al. Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. **Am J Pathol**, v. 163, n. 5, p. 1911-9, Nov 2003. ISSN 0002-9440.

AL-AYYOUBI, M.; GETTINS, P. G.; VOLZ, K. Crystal structure of human maspin, a serpin with antitumor properties: reactive center loop of maspin is exposed but constrained. **J Biol Chem**, v. 279, n. 53, p. 55540-4, Dec 2004. ISSN 0021-9258.

AMIT, I. et al. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. **Nat Genet**, v. 39, n. 4, p. 503-12, Apr 2007. ISSN 1061-4036.

BAILEY, C. M. et al. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. **J Biol Chem**, v. 280, n. 40, p. 34210-7, Oct 7 2005.

_____. Biological functions of maspin. **J Cell Physiol**, v. 209, n. 3, p. 617-24, Dec 2006. ISSN 0021-9541.

BARTUSKI, A. J. et al. Cytoplasmic antiproteinase 2 (PI8) and bomapin (PI10) map to the serpin cluster at 18q21.3. **Genomics**, v. 43, n. 3, p. 321-8, Aug 1997. ISSN 0888-7543.

BASS, R.; FERNANDEZ, A. M.; ELLIS, V. Maspin inhibits cell migration in the absence of protease inhibitory activity. **J Biol Chem**, v. 277, n. 49, p. 46845-8, Dec 6 2002.

BAUERSCHLAG, D. O. et al. Heterogeneous expression of serine protease inhibitor maspin in ovarian cancer. **Anticancer Res**, v. 30, n. 7, p. 2739-44, Jul 2010. ISSN 1791-7530.

BECK, A. H. et al. The macrophage colony-stimulating factor 1 response signature in breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 3, p. 778-87, Feb 2009. ISSN 1078-0432.

BETTSTETTER, M. et al. Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. **J Pathol**, v. 205, n. 5, p. 606-14, Apr 2005. ISSN 0022-3417.

BILIRAN, H.; SHENG, S. Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin. **Cancer Res**, v. 61, n. 24, p. 8676-82, Dec 2001. ISSN 0008-5472.

BLACQUE, O. E.; WORRALL, D. M. Evidence for a direct interaction between the tumor suppressor serpin, maspin, and types I and III collagen. **J Biol Chem**, v. 277, n. 13, p. 10783-8, Mar 29 2002.

BLUME-JENSEN, P.; HUNTER, T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 355-65, May 2001. ISSN 0028-0836.

BODENSTINE, T. M. et al. Maspin: molecular mechanisms and therapeutic implications. **Cancer Metastasis Rev**, Jul 2012. ISSN 1573-7233.

BOLTZE, C. et al. Silencing of the maspin gene by promoter hypermethylation in thyroid cancer. **Int J Mol Med**, v. 12, n. 4, p. 479-84, Oct 2003. ISSN 1107-3756.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697.

BRUNMEIR, R.; LAGGER, S.; SEISER, C. Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic development and cell differentiation. **Int J Dev Biol**, v. 53, n. 2-3, p. 275-89, 2009. ISSN 1696-3547.

CELLA, N. et al. Maspin is physically associated with [beta]1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells. **Faseb J**, v. 20, n. 9, p. 1510-2, Jul 2006a.

CHEN, C. Z. et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 83-6, Jan 2004. ISSN 1095-9203.

CHEN, E. I. et al. Maspin alters the carcinoma proteome. **FASEB J**, v. 19, n. 9, p. 1123-4, Jul 2005. ISSN 1530-6860.

CHER, M. L. et al. Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 13, p. 7847-52, Jun 24 2003.

CROCE, C. M.; CALIN, G. A. miRNAs, cancer, and stem cell division. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 6-7, Jul 2005. ISSN 0092-8674.

DACHS, G. U.; TOZER, G. M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. **Eur J Cancer**, v. 36, n. 13 Spec No, p. 1649-60, Aug 2000. ISSN 0959-8049.

DELON, I.; BROWN, N. H. Integrins and the actin cytoskeleton. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 1, p. 43-50, Feb 2007. ISSN 0955-0674.

DIETMAIER, W. et al. Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. **Int J Cancer**, v. 118, n. 9, p. 2247-54, May 2006. ISSN 0020-7136.

DOKRAS, A. et al. The tumour suppressor gene maspin is differentially regulated in cytotrophoblasts during human placental development. **Placenta**, v. 23, n. 4, p. 274-80, Apr 2002. ISSN 0143-4004.

DOMANN, F. E. et al. Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. **Int J Cancer**, v. 85, n. 6, p. 805-10, Mar 2000. ISSN 0020-7136.

DUAN, H. et al. MnSOD up-regulates maspin tumor suppressor gene expression in human breast and prostate cancer cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 5, n. 5, p. 677-88, Oct 2003. ISSN 1523-0864.

EDWARDS, G. M. et al. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. **J Biol Chem**, v. 273, n. 16, p. 9495-500, Apr 1998. ISSN 0021-9258.

EITEL, J. A. et al. PTEN and p53 are required for hypoxia induced expression of maspin in glioblastoma cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 6, p. 896-901, Mar 2009. ISSN 1551-4005.

ENDSLEY, M. P. et al. Maspin, the molecular bridge between the plasminogen activator system and beta1 integrin that facilitates cell adhesion. **J Biol Chem**, v. 286, n. 28, p. 24599-607, Jul 2011. ISSN 1083-351X.

FITZGERALD, M. et al. Human pancreatic carcinoma cells activate maspin expression through loss of epigenetic control. **Neoplasia**, v. 5, n. 5, p. 427-36, 2003 Sep-Oct 2003. ISSN 1522-8002.

FUTSCHER, B. W. et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. **Nat Genet**, v. 31, n. 2, p. 175-9, Jun 2002. ISSN 1061-4036.

GAO, F. et al. Maspin plays an essential role in early embryonic development. **Development**, v. 131, n. 7, p. 1479-89, Apr 2004. ISSN 0950-1991.

GOSWAMI, P. C. et al. Cell cycle-coupled variation in topoisomerase IIalpha mRNA is regulated by the 3'-untranslated region. Possible role of redox-sensitive protein binding in mRNA accumulation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 49, p. 38384-92, Dec 2000. ISSN 0021-9258.

GOULET, B. et al. Nuclear localization of maspin is essential for its inhibition of tumor growth and metastasis. **Lab Invest**, v. 91, n. 8, p. 1181-7, Aug 2011. ISSN 1530-0307.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer**, v. 5, n. 5, p. 341-54, May 2005. ISSN 1474-175X.

INAGI, R. et al. Mesangial cell-predominant gene, megsin. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17 Suppl 9, p. 32-3, 2002. ISSN 0931-0509.

_____. Transcriptional regulation of a mesangium-predominant gene, megsin. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 11, p. 2715-22, Nov 2002. ISSN 1046-6673.

IORIO, M. V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 65, n. 16, p. 7065-70, Aug 2005. ISSN 0008-5472.

IRIE, H. Y. et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Biol**, v. 171, n. 6, p. 1023-34, Dec 2005. ISSN 0021-9525.

IZUTANI, R. et al. Expression of manganese superoxide dismutase in esophageal and gastric cancers. **J Gastroenterol**, v. 33, n. 6, p. 816-22, Dec 1998. ISSN 0944-1174.

KATZ, M. et al. A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 8, p. 961-9, Aug 2007. ISSN 1465-7392.

KELLY, W. K.; MARKS, P. A. Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 2, n. 3, p. 150-7, Mar 2005. ISSN 1743-4254.

KUMAR, Y. et al. ProteoMod: A new tool to quantitate protein post-translational modifications. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1672-83, Jun 2004. ISSN 1615-9853.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836.

LAIRD, P. W.; JAENISCH, R. DNA methylation and cancer. **Hum Mol Genet**, v. 3 Spec No, p. 1487-95, 1994. ISSN 0964-6906.

LAM, Y. W. et al. Comprehensive identification and modified-site mapping of S-nitrosylated targets in prostate epithelial cells. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9075, 2010. ISSN 1932-6203.

LATHA, K. et al. Maspin mediates increased tumor cell apoptosis upon induction of the mitochondrial permeability transition. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 5, p. 1737-48, Mar 2005. ISSN 0270-7306.

LAW, R. H. et al. The high resolution crystal structure of the human tumor suppressor maspin reveals a novel conformational switch in the G-helix. **J Biol Chem**, v. 280, n. 23, p. 22356-64, Jun 2005. ISSN 0021-9258.

LI, X. et al. HDAC1 inhibition by maspin abrogates epigenetic silencing of glutathione S-transferase pi in prostate carcinoma cells. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 6, p. 733-45, Jun 2011. ISSN 1557-3125.

_____. Endogenous inhibition of histone deacetylase 1 by tumor-suppressive maspin. **Cancer Res**, v. 66, n. 18, p. 9323-9, Sep 15 2006a.

LIU, J. et al. Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin. **Cancer Res**, v. 64, n. 5, p. 1703-11, Mar 2004. ISSN 0008-5472.

LO, S. H. Focal adhesions: what's new inside. **Dev Biol**, v. 294, n. 2, p. 280-91, Jun 2006. ISSN 0012-1606.

LONARDO, F. et al. Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 51, n. 1, p. 31-9, Jan 2006. ISSN 0169-5002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16159682> >.

MAASS, N. et al. Hypermethylation and histone deacetylation lead to silencing of the maspin gene in human breast cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 297, n. 1, p. 125-8, Sep 2002. ISSN 0006-291X.

_____. Expression of the tumor suppressor gene Maspin in human pancreatic cancers. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 4, p. 812-7, Apr 2001. ISSN 1078-0432.

MACHTENS, S. et al. P53 regulated maspin protein expression determines recurrence-free survival of patients with localised prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v. 3, n. S1, p. S27, Dec 2000. ISSN 1476-5608.

MAIK-RACHLINE, G.; SHALTIEL, S.; SEGER, R. Extracellular phosphorylation converts pigment epithelium-derived factor from a neurotrophic to an antiangiogenic factor. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 670-8, Jan 2005. ISSN 0006-4971.

MALTER, J. S.; HONG, Y. A redox switch and phosphorylation are involved in the post-translational up-regulation of the adenosine-uridine binding factor by phorbol ester and ionophore. **J Biol Chem**, v. 266, n. 5, p. 3167-71, Feb 1991. ISSN 0021-9258.

MARFORI, M. et al. Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 9, p. 1562-77, Sep 2011. ISSN 0006-3002.

MARIONI, G. et al. MASPIN subcellular localization and expression in oral cavity squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 265 Suppl 1, p. S97-104, Jul 2008. ISSN 0937-4477.

_____. Nuclear localization of mammary serine protease inhibitor (MASPIN): is its impact on the prognosis in laryngeal carcinoma due to a proapoptotic effect? **Am J Otolaryngol**, v. 29, n. 3, p. 156-62, 2008 May-Jun 2008. ISSN 1532-818X.

MAXMEN, A. The hard facts. **Nature**, v. 485, n. 7400, p. S50-1, May 2012. ISSN 1476-4687.

MCGOWEN, R. et al. The surface of prostate carcinoma DU145 cells mediates the inhibition of urokinase-type plasminogen activator by maspin. **Cancer Res**, v. 60, n. 17, p. 4771-8, Sep 2000. ISSN 0008-5472.

MCKENZIE, S.; SAKAMOTO, S.; KYPRIANOU, N. Maspin modulates prostate cancer cell apoptotic and angiogenic response to hypoxia via targeting AKT. **Oncogene**, v. 27, n. 57, p. 7171-9, Dec 2008. ISSN 1476-5594.

MINK, S. et al. A mammary cell-specific enhancer in mouse mammary tumor virus DNA is composed of multiple regulatory elements including binding sites for CTF/NFI and a novel transcription factor, mammary cell-activating factor. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 11, p. 4906-18, Nov 1992. ISSN 0270-7306.

MOHSIN, S. K. et al. Maspin expression in invasive breast cancer: association with other prognostic factors. **J Pathol**, v. 199, n. 4, p. 432-5, Apr 2003. ISSN 0022-3417.

MUTHUSWAMY, S. K. et al. ErbB2, but not ErbB1, reinitiates proliferation and induces luminal repopulation in epithelial acini. **Nat Cell Biol**, v. 3, n. 9, p. 785-92, Sep 2001. ISSN 1465-7392.

NAKASHIMA, T. et al. Genomic cloning, mapping, structure and promoter analysis of HEADPIN, a serpin which is down-regulated in head and neck cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1492, n. 2-3, p. 441-6, Jul 2000. ISSN 0006-3002.

NARAYAN, M.; MIRZA, S. P.; TWINING, S. S. Identification of phosphorylation sites on extracellular corneal epithelial cell maspin. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1382-90, Apr 2011. ISSN 1615-9861.

NARAYAN, M.; TWINING, S. Focus on molecules: maspin. **Exp Eye Res**, v. 90, n. 1, p. 2-3, Jan 2010. ISSN 1096-0007.

NARDOZZI, J. D.; LOTT, K.; CINGOLANI, G. Phosphorylation meets nuclear import: a review. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 32, 2010. ISSN 1478-811X.

NAWATA, S. et al. Evidence of post-translational modification of the tumor suppressor maspin under oxidative stress. **Int J Mol Med**, v. 27, n. 2, p. 249-54, Feb 2011. ISSN 1791-244X.

NGAMKITIDECHAKUL, C. et al. Sufficiency of the reactive site loop of maspin for induction of cell-matrix adhesion and inhibition of cell invasion. Conversion of ovalbumin to a maspin-like molecule. **J Biol Chem**, v. 278, n. 34, p. 31796-806, Aug 2003. ISSN 0021-9258.

OBERLEY, L. W.; BUETTNER, G. R. Role of superoxide dismutase in cancer: a review. **Cancer Res**, v. 39, n. 4, p. 1141-9, Apr 1979. ISSN 0008-5472.

ODERO-MARAH, V. A. et al. Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. **Cancer Biol Ther**, v. 2, n. 4, p. 398-403, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1538-4047.

_____. Tyrosine phosphorylation of maspin in normal mammary epithelia and breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 295, n. 4, p. 800-5, Jul 2002. ISSN 0006-291X.

PEMBERTON, P. A. et al. Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. **J Histochem Cytochem**, v. 45, n. 12, p. 1697-706, Dec 1997. ISSN 0022-1554.

_____. The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases. Evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. **J Biol Chem**, v. 270, n. 26, p. 15832-7, Jun 30 1995.

POSNER, B. I. et al. Peroxovanadium compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. **J Biol Chem**, v. 269, n. 6, p. 4596-604, Feb 1994. ISSN 0021-9258.

QIN, L.; ZHANG, M. Maspin regulates endothelial cell adhesion and migration through an integrin signaling pathway. **J Biol Chem**, v. 285, n. 42, p. 32360-9, Oct 2010. ISSN 1083-351X.

REIS-FILHO, J. S. et al. Maspin expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. **Virchows Arch**, v. 441, n. 6, p. 551-8, Dec 2002. ISSN 0945-6317.

RUSCHMANN, J. et al. Tyrosine phosphorylation of SHIP promotes its proteasomal degradation. **Exp Hematol**, v. 38, n. 5, p. 392-402, 402.e1, May 2010. ISSN 1873-2399.

SAGER, R. et al. RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 59, p. 537-46, 1994. ISSN 0091-7451.

SEFTOR, R. E. et al. maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. **Cancer Res**, v. 58, n. 24, p. 5681-5, Dec 1998. ISSN 0008-5472.

SEO, J.; LEE, K. J. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. **J Biochem Mol Biol**, v. 37, n. 1, p. 35-44, Jan 2004. ISSN 1225-8687.

SHENG, S. et al. Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 21, p. 11669-74, Oct 15 1996.

_____. Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 2, p. 499-504, Jan 1998. ISSN 0027-8424. .

SHI, H. Y. et al. Maspin controls mammary tumor cell migration through inhibiting Rac1 and Cdc42, but not the RhoA GTPase. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 64, n. 5, p. 338-46, May 2007. ISSN 0886-1544.

_____. Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. **Cancer Res**, v. 61, n. 18, p. 6945-51, Sep 2001b. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559574> >.

SILVERMAN, G. A. et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. **J Biol Chem**, v. 276, n. 36, p. 33293-6, Sep 2001. ISSN 0021-9258.

SIMPSON, K. J. et al. Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 9, p. 1027-38, Sep 2008. ISSN 1465-7392.

SMITH, S. L. et al. Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. **Oncogene**, v. 22, n. 54, p. 8677-87, Nov 2003. ISSN 0950-9232.

SOOD, A. K. et al. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 9, p. 2924-32, Sep 2002. ISSN 1078-0432.

STRAUSBERG, R. L. et al. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 26, p. 16899-903, Dec 2002. ISSN 0027-8424.

SUGIMOTO, S. et al. Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in human bladder cancer. **Cancer Lett**, v. 203, n. 2, p. 209-15, Jan 2004. ISSN 0304-3835.

SUN, Y.; COLBURN, N. H.; OBERLEY, L. W. Decreased expression of manganese superoxide dismutase mRNA and protein after immortalization and transformation of mouse liver cells. **Oncol Res**, v. 5, n. 3, p. 127-32, 1993. ISSN 0965-0407.

UMEKITA, Y.; HIIPAKKA, R. A.; LIAO, S. Rat and human maspins: structures, metastatic suppressor activity and mutation in prostate cancer cells. **Cancer Lett**, v. 113, n. 1-2, p. 87-93, Feb 1997. ISSN 0304-3835.

UMEKITA, Y. et al. Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. **Int J Cancer**, v. 100, n. 4, p. 452-5, Aug 2002. ISSN 0020-7136.

VITOLO, M. I. et al. Deletion of PTEN promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells. **Cancer Res**, v. 69, n. 21, p. 8275-83, Nov 2009. ISSN 1538-7445.

WANG, S. C. et al. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability. **Nat Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 1359-68, Dec 2006. ISSN 1465-7392.

XIA, W. et al. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. **Oncogene**, v. 19, n. 20, p. 2398-403, May 2000. ISSN 0950-9232.

YANG, W. et al. Quantitative proteomics analysis reveals molecular networks regulated by epidermal growth factor receptor level in head and neck cancer. **J Proteome Res**, v. 9, n. 6, p. 3073-82, Jun 2010. ISSN 1535-3907.

YATABE, Y.; MITSUDOMI, T.; TAKAHASHI, T. Maspin expression in normal lung and non-small-cell lung cancers: cellular property-associated expression under the control of promoter DNA methylation. **Oncogene**, v. 23, n. 23, p. 4041-9, May 2004. ISSN 0950-9232.

YIN, S. et al. Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathione S-transferase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 41, p. 34985-96, Oct 14 2005a.

_____. Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator/urokinase-type plasminogen activator receptor system. **Cancer Res**, v. 66, n. 8, p. 4173-81, Apr 2006. ISSN 0008-5472.

ZAIDEL-BAR, R. et al. Functional atlas of the integrin adhesome. **Nat Cell Biol**, v. 9, n. 8, p. 858-67, Aug 2007. ISSN 1465-7392.

ZHANG, M. et al. Transactivation through Ets and Ap1 transcription sites determines the expression of the tumor-suppressing gene maspin. **Cell Growth Differ**, v. 8, n. 2, p. 179-86, Feb 1997. ISSN 1044-9523.

_____. Maspin plays an important role in mammary gland development. **Dev Biol**, v. 215, n. 2, p. 278-87, Nov 1999. ISSN 0012-1606.

ZHANG, M.; MAGIT, D.; SAGER, R. Expression of maspin in prostate cells is regulated by a positive ets element and a negative hormonal responsive element site recognized by androgen receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 11, p. 5673-8, May 1997. ISSN 0027-8424.

ZHANG, M. et al. mMaspin: the mouse homolog of a human tumor suppressor gene inhibits mammary tumor invasion and motility. **Mol Med**, v. 3, n. 1, p. 49-59, Jan 1997. ISSN 1076-1551.

_____. Reduced mammary tumor progression in WAP-TAg/WAP-maspin bitransgenic mice. **Oncogene**, v. 19, n. 52, p. 6053-8, Dec 2000. ISSN 0950-9232.

_____. Maspin is an angiogenesis inhibitor. **Nat Med**, v. 6, n. 2, p. 196-9, Feb 2000.

ZHU, S. et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. **Cell Res**, v. 18, n. 3, p. 350-9, Mar 2008. ISSN 1748-7838.

ZOU, Z. et al. Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. **Science**, v. 263, n. 5146, p. 526-9, Jan 28 1994a.

7.ANEXO

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Mariana Tamazato Longhi

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo, 15 de novembro de 1986.

EDUCAÇÃO

Colégio COC, São Bernardo do Campo, até 2003.

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2005 a 2009.

Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado

Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 2010 a 2012.

Mestrado em Bioquímica, Instituto de Química

OCUPAÇÃO

Bolsista de Mestrado, Agência CNPq, Março/2010 a Fevereiro/2011

Bolsista de Mestrado, Agência Fapesp, Março/2011 a Março/2012

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos

Longhi, M. T.; Cella, N. . Tyrosine phosphorylation plays a role in increasing maspin protein levels and its cytoplasmic accumulation. *FEBS Open Bio*, v. 2, p. 93-97, 2012.

Oliveira, T. R. ; **Longhi, M. T.** ; Gonçalves, A. P. ; Morais, Z. M. ; Vasconcellos, S. A. ; Nascimento, A. L. T. O. . LipL53, a temperature regulated protein from *Leptospira interrogans* that binds to extracellular matrix molecules. *Microbes and Infection*, v. 12, p. 207-217, 2010.

Longhi, M. T. ; Oliveira, T. R. ; Romero, E. C. ; Gonçalves, A. P. ; Morais, Z. M. ; Vasconcellos, S. A. ; Nascimento, A. L. T. O. . A newly identified protein of *Leptospira interrogans* mediates binding to laminin. *International Journal of Medical Microbiology. Supplement*, v. 58, p. 1275-1282, 2009.

Oliveira, T. R. ; **Longhi, M. T.** ; Morais, Z. M. ; Romero, E. C. ; Blanco, R. M. ; Kirchgatter, K. ; Vasconcellos, S. A. ; Nascimento, A. L. T. O. . Evaluation of Leptospiral Recombinant Antigens MPL17 and MPL21 for Serological Diagnosis of Leptospirosis by Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 15, p. 1715-1722, 2008.

Resumos em Congressos

Longhi, M.T., Cella, N.(2012). Tyrosine phosphorylation plays a role in increasing maspin protein levels and its cytoplasmic accumulation. *X International Congress in Cell Biology*. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

Longhi, M.T., Cella, N. (2011). Maspin is phosphorylated in MCF10A mammary epithelial cells. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

Longhi, M.T., Hirata, C.L., Cella, N. (2010). Characterization of posttranslational modification of maspin and correlation with different subcellular localization. XV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular. (Congresso, Apresentação de Trabalho).

Longhi, M. T., Oliveira, T. R., Nascimento, A. L. T. O. . Cloning and expression of genes that encode predicted leptospiral lipoproteins in *Escherichia coli*. 2008. X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan. (Congresso/Apresentação de Trabalho).

Longhi, M. T., Oliveira, T. R., Nascimento, A. L. T. O. . Cloning and expression of genes that encode predicted leptospiral lipoproteins in *Escherichia coli*. 2007. IX Reunião Científica Anual do Instituto Butantan. (Congresso, Apresentação de Trabalho).