

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

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

ANTERO FERREIRA DE ALMEIDA MACEDO

**Interação Funcional Entre Hormônios Glicocorticóides
e o Gene Supressor de Tumor *TP53* em um Modelo
Celular de Glioma de Rato**

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo

Data do Depósito na SPG: 13/09/2007
(treze de setembro de dois mil e sete)

ANTERO FERREIRA DE ALMEIDA MACEDO

**Interação Funcional Entre Hormônios Glicocorticóides
e o Gene Supressor de Tumor *TP53* em um Modelo
Celular de Glioma de Rato**

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

Orientador(a): Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo

2007

Antero Ferreira de Almeida Macedo

Interação Funcional Entre Hormônios Glicocorticóides e o Gene Supressor de Tumor *TP53* em um Modelo Celular de Glioma de Rato

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À minha mãe Emília, pela dedicação absoluta à minha alegria, minha educação e meu bem estar. Por ser o maior símbolo de força, perseverança, otimismo e amor à vida que conheço. Por me ensinar, sempre, que viver é amar. E, claro, pela culinária sem igual!

Ao meu pai Silvano, por me mostrar que o mundo é muito menor e mais recheado de encantos do que imaginava. Pelas deliciosas histórias e estórias sobre sua vida que, surpreendentemente, se encaixavam na minha. Por todas as aventuras que compartilhamos, estando juntos ou não. E por todo amor e carinho... que você possa voar pra muito além agora... (*in memoriam*).

A ambos, por me darem a vida! Pra onde quer que eu vá, vocês sempre estarão comigo!

Agradecimentos

À Profa. Mari que, desde o primeiro momento, me recebeu de portas e braços abertos. Pela confiança depositada em mim, me ajudando a crescer junto a ela. Por ter sempre me apoiado, incondicionalmente, nas minhas decisões e nos meus caminhos. Pelo exemplo de extrema força, brilho e determinação e, principalmente, por todo o carinho e atenção dedicados a mim. Muito obrigado!

Ao Dr. Ricardo Correa, por ter provido o laboratório com os vetores lentivirais que me ajudaram a concluir este trabalho, pela amizade e estímulo.

À Fê Ortis, minha mamma durante a iniciação científica, que me aturou tanto naqueles tempos... por seus ensinamentos, pela alegria, paciência e amizade.

Ao Christian Colin, por ser essa pessoa única! Pela grande amizade, inúmeras lições (dos mais cabulosos PCRs aos mais inusitados fitoquímicos) e carinho.

À Lúcia Helena, que, muito além de ter me ensinado a “arte” do Band Shift, compartilhou muitos bons momentos comigo. Por toda a sua amizade, entusiasmo e luz.

Ao Marcos, grande exemplo de integridade, respeito e tranquilidade. Pelas discussões e ajudas ao longo da minha vida no laboratório e pela sua amizade.

À Lu Gomes, pela grande amizade, companherismo, pelos muitos papos (do cult ao trash...) e por ser tão arretada.

À Rita, pela força inicial com os Q-PCR, pela amizade desde os tempos de biologia e por ser, simplesmente, espetáculo.

Ao Wagner, pelas muitas risadas, pelas histórias do arco da velha e pelo carinho durante nossa convivência no lab.

Ao Prof. Dr. Miguel (opa!), por ser uma grande pessoa, pelos muitos (e fundamentais!) ensinamentos sobre a língua castelhana e costumes peruanos e pela grande amizade.

À Dona Helena, por toda a ajuda com as prestações de conta para FAPESP e pelo exemplo de vigor e vida.

À Ana Paula e Angelita, que deixaram muitas saudades...

À Theri, pela amizade e apoio ao longo destes anos e especialmente pela ajuda na “arte final” da tese.

À Zizi, Débora e Sandrinha que, muito além do trabalho técnico, fazem parte da história e de todos os momentos vividos nesta grande “comunidade laboratorial” e que sempre me deram muitos motivos para boas risadas.

Ao Ricardo e Guilherme, aprendizes destas acima, que ajudam a fazer o laboratório “andar”.

À Patrícia Barros, pela grande amizade, confiança e carinho...

Ao Fernando, por termos trilhado o mesmo caminho (nas trilhas e na vida profissional)...

Às pessoas queridas que fizeram muita falta quando saíram do lab: Mauro, Mário, Katlin, Carlos, Ire, Fê Festa, Leo, Sheila, Cleber, Maki, Vitor, entre tantos outros...

Aos meus contemporâneos queridos que ainda estão por aqui: Fernando, Juan, Lu Cruz, André, Letícia Labriola...

Às pessoas queridas que fazem parte da “nova geração” do lab: Ana Cláudia, Flávia, Patrícia, Gustavo, Tati, Maya, Ícaro, Nicole, Ilana, Giseli, Thiago, Daniel, Carol, Marina e todos os outros.

Aos meus amigos de fé, irmãos camaradas, Danilo e João, membros da Fauna Mithologica, por estarem por perto nos melhores e nos mais difíceis momentos, sempre compartilhando comigo seus pensamentos infinitos...

À Letícia, que, não sei como, tem me agüentado durante estes dois anos, por todos os risos e lágrimas, pela companhia deliciosa, amizade, carinho e pela beleza e força de seus ideais. Claro, também pelas longas noites junto a mim no laboratório e por ter imprimido a tese para mim!

A meus tios Zé, Jamil e João e minhas tias Zezé, Cidinha e Guti por todo o apoio, carinho, risadas, exemplos inúmeros e, principalmente, por me ensinarem o significado de Família.

Aos outros três integrantes, cujos nomes não posso revelar, de uma dita turma que se reúne vez ou outra para curtir o que tem que ser curtido entre tios, sobrinhos e primos...

A todas estas pessoas, que tornaram possível meu aprendizado durante estes 7 anos no laboratório e que me proporcionaram a melhor companhia nesta minha segunda casa. Vocês vão fazer MUITA falta na minha vida!

À FAPESP, pelo apoio financeiro que viabilizou este projeto.

“Na aresta de Huantsan, sem equipe de apoio, sem contacto com o exterior, ficávamos realmente separados do mundo. Sobre aquela crista branca erguida contra o céu de um azul intenso, não éramos mais do que três camaradas ligados à mesma corda e ao mesmo destino. Só o ideal que fortalecera a nossa amizade nos levava até aquele cume sem glória que decidíramos conquistar. A solidão absoluta, o desprezo das contingências humanas, a amizade sem reservas, deram à conquista de Huantsan um delicioso sabor de aventura fraterna que fez com que eu a apreciasse mais do que outras empresas mais importantes”.

Lionel Terray em Os Conquistadores do Inútil II

RESUMO

Macedo, A.F.A. **Interação Funcional Entre Hormônios Glicocorticóides e o Gene Supressor de Tumor *TP53* em um Modelo Celular de Glioma de Rato**. 2007. 179p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Tanto hormônios glicocorticóides (GCs) como o gene supressor de tumor *TP53*, medeiam a resposta celular a uma diversidade de condições fisiológicas de estresse, sendo reguladores fundamentais do processo de vida/morte de diversos tipos celulares. A interação funcional entre estes fatores vem sendo explorada, recentemente, revelando que GCs exercem um efeito dual sobre p53.

O modelo celular ST1/P7 de glioma de rato é particularmente interessante para investigar o papel de p53 na ação de GCs, já que estas linhagens apresentam respostas distintas a GCs. O tratamento com Hidrocortisona (Hy) leva as células ST1 a uma completa reversão fenotípica tumoral→normal, enquanto as células P7 são altamente resistentes ao tratamento.

Foi possível observar que a ativação de p53 por Hy ocorre apenas em células ST1, mas não em P7. Esta ativação é mediada pela indução de fosforilação da Ser15 de p53 e seu acúmulo nuclear, o que resulta no aumento de sua ligação a elementos responsivos a p53 no DNA e na sua capacidade de transativação de p53, levando a um aumento da expressão de alguns de seus genes-alvo. Contudo, o bloqueio de p53 através de siRNA não foi suficiente para alterar a resposta de células ST1 a GCs, indicando que a regulação positiva de p53 por GCs pode ser um evento secundário, mas não essencial, para a resposta anti-tumoral exercida por estes hormônios em células ST1.

Palavras-chave: glicocorticóides, p53, glioma, siRNA, controle da proliferação celular

ABSTRACT

Macedo, A.F.A. **Functional Link Between Glucocorticoid Hormones and the *TP53* Tumor Suppressor Gene in a Rat Glioma Cell Model.** 2007. 179p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Both glucocorticoid hormones (GCs) and the *TP53* tumor suppressor gene mediate cellular responses to a diversity of physiological stress conditions, acting as crucial regulators of the life/death process in a wide variety of cell types.

The ST1/P7 rat glioma model cell system is particularly interesting to investigate the role of p53 in the action of GCs, since these cell lines display opposite responses to GCs. Treatment with Hydrocortisone (Hy) leads ST1 cells to a complete tumoral→normal phenotypic reversion, while P7 cells are highly resistant to this treatment.

It was possible to observe that activation of p53 by Hy occurs only in ST1 cells, but not in GC-resistant P7 cells. This activation is mediated by induction of phosphorylation of the Ser15 residue of p53 and its accumulation in the nucleus, resulting in increased binding of p53 to its responsive elements on the DNA and in activation of its transactivating potential, leading to increased expression of some of its target genes. However, blocking of p53 through siRNA was not sufficient to alter ST1 cells response to GCs, indicating that the positive regulation of p53 by GCs may be a secondary, non-essential, event for the anti-tumor response exerted by these hormones in ST1 cells.

Key-words: glucocorticoid, p53, glioma, siRNA, cell growth control

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Indução do tráfego citoplasma-núcleo de GR de células ST1, P7 e C6 tratadas com Hy por 5h ou 24h.....	90
Figura 2. Análise do efeito de hidrocortisona (Hy) e mitomicina C (MMC) sobre a atividade ligante de p53 ao DNA nas linhagens ST1 e P7 por EMSA.	93
Figura 3: Teste da especificidade do vetor repórter p53-luc a p53 em diferentes modelos celulares.....	96
Figura 4: Indução da atividade de transativação de p53 em células ST1.	97
Figura 5: Análise dos níveis de p53 em células ST1 e P7 na presença de Hy.....	100
Figura 6: Hy Induz a Translocação Nuclear e Fosforilação de p53 em Células ST1.....	102
Figura 7: Cinética de fosforilação da Ser15 de p53 em resposta a Hy ou SFB.....	103
Figura 8: Cinética de Indução de SGK em Resposta a Hy e SFB.....	105
Figura 9: Cinética de expressão e fosforilação de p38 MAPK de células ST1 em resposta a Hy.....	106
Figura 10: Curvas de regressão linear obtidas para determinação da eficiência dos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica na linhagem celular ST1 nos experimentos de Q-PCR.	109
Figura 11: Perfil de expressão de genes-alvo de p53 em células ST1 em resposta ao tratamento com Hy.	110
Figura 12: Atividade de p53 em células de glioma humano U87MG, A172 e T98G tratadas com DEX ou ATRA por 24h ou não tratadas e perfil de proliferação de células A172 sob tratamento com DEX.	113
Figura 13: Atividade promotora de p21 das células HCT116 p53 ^{+/+} e HCT116 p53 ^{-/-} em resposta ao tratamento com DEX ou ATRA.....	115
Figura 14: Microscopia das células Am12 e ST1 transduzidas pelo retrovírus pLPCX-EGFP.	118
Figura 15: Atividade de p53 das populações de células ST1 transduzidas com os retrovírus pLXSN, pLXSN-16E6, pLPCX-EGFP ou não transduzidas, sob tratamento com ARA ou MMC.	120
Figura 16: Análise dos níveis de p53 nas populações infectantes de ST1.....	120
Figura 17. Fracionamento em gel de agarose do produto da PCR para amplificação do promotor H1 em fusão com os siRNAs desenhados para p53 de rato.	123
Figura 18: Fracionamento em gel de agarose dos produtos de PCR de colônia relativos ao rastreamento dos clones recombinantes contendo o promotor H1 e o siRNA para p53... 124	124
Figura 19: Fracionamento em gel de agarose dos produtos da digestão dos clones recombinantes Amb6 e Shag17 com a enzima SspI.	125
Figura 20: Titulação lentiviral em células 293T.	126
Figura 21: Avaliação da eficiência dos siRNAs sobre o bloqueio de p53 de células ST1.. 128	128
Figura 22: Microscopia das populações de células ST1 transduzidas pelos lentivírus LV-Amb6, -Shag17, -5, 7, 8 ou Hp53si.	129
Figura 23: Avaliação da eficiência dos siRNAs sobre o bloqueio de p53 de células ST1.. 130	130
Figura 24: Atividade de p53 e promotora de p21 de células ST1 e das populações ST1-siEGFP e ST1-siP53, sob tratamento com Hy ou ARA.....	132
Figura 25: Perfil de expressão de genes-alvo de p53 em células ST1, ST1-siEGFP e ST1-siP53 em resposta ao tratamento com Hy.	136
Figura 26: Resposta proliferativa das populações ST1, ST1-siEGFP e ST1-siP53 a Hy.. 138	138

LISTA DE ABREVIATURAS

ATRA	Ácido retinóico todo-trans
ATP	Trifosfato de adenosina
bp	Pares de base
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRG-1	Brahma-Related Gene 1
Brm	Brahma (Drosophila)
C	Controle
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKN	Cyclin-Dependent Kinase inhibitor
cDNA	DNA complementar
Da	Dalton
DEX	Dexametasona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
E2F	E2F transcription factor
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EST	Expressed Sequence Tag
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GADD45	Growth arrest and DNA-damage-inducible
GC	Glicocorticóide
HPRT1	Hipoxantina Fosforibosil Transferase 1
Hy	Hidrocortisona
IP	Imunoprecipitação
IQ	Instituto de Química
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Meio de Luria-Bertani
ml	mililitros
mRNA	RNA mensageiro
µl	microlitros
µM	micromolar
µg	microgramas
NF-κB	Nuclear Factor- Kappa B
nm	nanômetros
NTC	Non-Template Control
p14ARF Kinase Inhibitor 2A)	Alternative Reading Frame (ou CDKN2A – Cyclin Dependent
p16INK4A Inhibitor 2A)	Inhibitor of CDK4 – A (ou CDKN2A – Cyclin Dependent Kinase
pb	pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor

PIK3R1	PhosphoInositide-3-Kinase, Regulatory subunit 1
PM	Peso Molecular
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Q-PCR	PCR quantitativo em tempo real
Rb1	Retinoblastoma protein 1
RNA	Ácido ribonucléico
Rnase	Ribonuclease
rRNA	RNA ribossomal
RT-PCR	Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction
SFB	Soro Fetal Bovino
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SWI/SNF	Mating-Type SWItch/Sucrose Non-Fermenting complex
TE	Tris-EDTA
TP53	Tumor Protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
USP	Universidade de São Paulo
UTR	UnTranslated Region
WB	Western Blotting

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. <i>Hormônios Glicocorticóides.....</i>	16
1.2. <i>Mecanismos Moleculares da Ação de GCs.....</i>	18
1.3. <i>Ações Não-Gênicas de GCs.....</i>	21
1.4. <i>Regulação da Proliferação Celular por GCs.....</i>	25
1.5. <i>Interação com Fatores Transcricionais.....</i>	26
1.6. <i>O Gene Supressor de Tumor TP53.....</i>	30
1.6.1. <i>Uma Breve Perspectiva Histórica.....</i>	30
1.6.3. <i>Estrutura e Função.....</i>	33
1.6.4. <i>Mutações em TP53.....</i>	36
1.6.5. <i>Regulação de p53.....</i>	40
1.6.6. <i>Regulação Central – MDM2.....</i>	42
1.6.7. <i>Principais Vias Envolvendo p53.....</i>	44
1.7. <i>Interação Funcional Entre p53 e GR.....</i>	46
1.7.1. <i>Intercomunicação Negativa Entre p53 e GR.....</i>	46
1.7.2. <i>Repressão Transcricional.....</i>	49
1.7.3. <i>Intercomunicação Positiva Entre p53 e GR.....</i>	50
1.8. <i>O Modelo Celular C6/ST1/P7.....</i>	53
1.9. <i>Glicocorticóides na Terapia de Gliomas.....</i>	53
1.10. <i>O Modelo C6/ST1/P7 no Estudo da Função de TP53 na Ação Antiproliferativa de GCs.....</i>	57
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
2.1. <i>Soluções e meios de cultura para células de mamífero.....</i>	58
2.2. <i>Linhagens celulares.....</i>	58
2.3. <i>Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....</i>	60
2.4. <i>Congelamento e descongelamento das linhagens celulares.....</i>	60
2.4.1. <i>Congelamento.....</i>	60
2.4.2. <i>Descongelamento.....</i>	61
2.5. <i>Western blot.....</i>	61
2.5.1. <i>Obtenção de extratos protéicos nucleares e citoplasmáticos.....</i>	61
2.5.2. <i>Fracionamento de proteínas em SDS-PAGE e transferência para membrana de PVDF.....</i>	62
2.5.3. <i>Imunorreação e revelação.....</i>	62
2.6. <i>Preparação de bactérias eletrocompetentes.....</i>	63
2.7. <i>Transformação de bactérias Escherichia coli com DNA plasmideal por eletroporação.....</i>	64
2.8. <i>Preparação de DNA plasmideal a partir de bactérias transformadas.....</i>	64
2.9. <i>Transfecção transitória e ensaio de luciferase.....</i>	65
2.9.1. <i>Ensaio de luciferase.....</i>	65
2.9.2. <i>Método de transfecção com Lipofectamina 2000 (Invitrogen).....</i>	65
2.10. <i>Clonagem das seqüências de siRNA para p53 murino.....</i>	65
2.10.1. <i>Clonagem dos siRNAs para p53 murino em fusão ao promotor H1.....</i>	66
2.10.2. <i>Análise dos clones recombinantes por PCR de colônia.....</i>	69
2.10.3. <i>Análise dos clones recombinantes por digestão com SspI.....</i>	70
2.11. <i>Infecção por lentivírus.....</i>	71
2.11.1. <i>Vetores utilizados.....</i>	71

2.11.2. Produção viral.....	72
2.11.3. Titulação viral.....	72
2.11.4. Infecção celular por lentivírus	73
2.12. Produção e infecção pelos retrovírus pLXSN e pLXSN-16E6.....	74
2.12.1. Produção dos retrovírus recombinantes em células 293T e Am12.....	74
2.12.2. Transdução de células ST1 com vetores retrovirais.....	75
2.13. Ensaio de Q-PCR	75
2.13.1. Preparação de RNA total.....	75
2.13.2. Síntese da primeira fita do cDNA	75
2.13.3. Desenho dos oligos iniciadores	76
2.13.4. Reação de Q-PCR	77
2.13.5. Determinação da concentração final de iniciadores.....	79
2.13.6. Determinação da eficiência dos iniciadores	79
2.13.7. Confirmação da expressão diferencial	80
2.14. Imunoprecipitação.....	81
2.14.1. Marcação metabólica	81
2.14.2. Preparo do lisado celular	81
2.14.3. Imunorreação	82
2.14.4. Fixação, amplificação, secagem e revelação do gel.....	82
2.15. Ensaio de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA)	83
2.16. Ensaio de incorporação de timidina	84
2.17. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	85
3.18. Curvas de crescimento.....	85
2.19. Reagentes e Soluções.....	86
3. RESULTADOS.....	89
3.1. Análise da Localização Sub-celular de GR	89
3.2. Caracterização da Funcionalidade de p53 em Resposta a Glicocorticóides	91
3.2.1 Análise da Ação de Glicocorticóide Sobre a Atividade de Ligação de p53 ao DNA.....	91
3.2.2 Análise da Ação de Glicocorticóides Sobre a Atividade de Transativação de p53	94
3.2.3 Análise da Ação de Glicocorticóides Sobre os Níveis Protéicos de p53	98
3.2.4 Análise da Ação de Glicocorticóides Sobre a Translocação Nuclear e o estado de Fosforilação de p53	101
3.2.5 Análise da Ação de Glicocorticóides e SFB Sobre a Expressão de SGK. 104	
3.2.6 Análise da Ação de Glicocorticóide Sobre a Expressão e Fosforilação de p38 MAPK.....	105
3.2.7 Análise da Expressão de Genes-Alvo de p53 em Células ST1 e Sua Regulação por Hy.....	107
3.2.8 Análise da Ação de Glicocorticóides e Ácido All-Trans Retinóico Sobre a Atividade de Transativação de p53 em Linhagens de Glioma Humano	111
3.2.9 Análise da Ação de Glicocorticóides e Ácido All-Trans Retinóico Sobre a Atividade Promotora de p21 e a atividade proliferativa das Linhagens HCT116 p53 ^{+/+} e HCT116 p53 ^{-/-}	114
3.3 Caracterização da Relevância de p53 Para a Resposta de Células ST1 a Glicocorticóides	116
3.3.1 Transdução da Oncoproteína Viral E6 de HPV-16 e Avaliação de sua Capacidade de Modular os Níveis de p53 de Células ST1	116
3.3.2 Clonagem, Transdução e Teste de siRNAs Específicos para p53 Murino em Células ST1	121

3.3.3 <i>Análise da Resposta da População ST1-siP53 a Glicocorticóide</i>	133
4. DISCUSSÃO	139
4.1. <i>Caracterização da Funcionalidade de p53 em Resposta a Glicocorticóides</i> ..	139
4.2. <i>Teste de Diferentes Metodologias para o Bloqueio de p53 de Células ST1</i> ...	145
4.3. <i>Caracterização da Relevância de p53 Para a Resposta de Células ST1 a Glicocorticóides</i>	148
4.4. <i>Análise da Ação de ATRA Sobre a Atividade de p53 em Células ST1 e Busca de Modelos Celulares Humanos Responsíveis a ATRA e GCs</i>	154
5. CONCLUSÕES	159
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hormônios Glicocorticóides

Os hormônios esteróides são constituintes essenciais do sistema de comunicação intercelular que mantém a homeostase em organismos superiores. Glicocorticóides (GCs), a maior subclasse dos hormônios esteróides, são secretados pelo córtex adrenal, sob controle regulatório da alça hipotalâmica-pituitária-adrenal (HPA). Este sistema envolve o controle da secreção de ACTH (hormônio adrenocorticotrópico) pela glândula pituitária, dado pelo CRH (hormônio liberador de corticotropina) e pela AVP (arginina vasopressina) hipotalâmicos. A produção de GCs, incluindo o cortisol, por sua vez, sofre influência direta do ACTH. O cortisol liberado mantém um balanço da alça HPA através da retroalimentação negativa sobre a secreção do ACTH, do CRH e da AVP. Durante o estado de normalidade, níveis basais de CRH, AVP, ACTH e cortisol são liberados em pulsos, de forma circadiana.

Nestes níveis basais, as principais funções do cortisol são a sustentação da normoglicemia e a prevenção de hipotensão arterial. A ativação da alça HPA durante estímulos estressantes internos e externos ao corpo, como inflamação, dor, infecção e até estresse mental, leva ao aumento dos níveis plasmáticos de GCs, resultando na ativação do sistema nervoso central, no aumento das concentrações plasmáticas de glicose e em aumento da pressão sanguínea. De fato, os GCs afetam praticamente todos os órgãos e tecidos do corpo, agindo como reguladores fundamentais da homeostase e modulando diversas funções do sistema nervoso central, de processos inflamatórios, do metabolismo, da diferenciação e da proliferação celular (Bamberger, Schulte *et al.*, 1996).

Para coordenar tal diversidade de processos fisiológicos, os GCs exercem grande influência sobre a proliferação e morte celular, induzindo ou reprimindo a proliferação ou induzindo apoptose em uma grande variedade de tipos celulares. GCs induzem apoptose na maior parte das células nucleadas de origem vascular, como timócitos, células de melanoma e monócitos periféricos sanguíneos (Martin e Green, 1995; Sikora, Rossini *et al.*, 1996; Chauhan, Pandey *et al.*, 1997; Schmidt, Pauels *et al.*, 1999), sendo esta a base de suas influências sobre o processo anti-inflamatório. Por outro lado, GCs exercem um papel citoprotetor, reprimindo a apoptose e/ou induzindo a proliferação de outros tipos celulares, como em uma variedade de células tumorais, neutrófilos, células de pigmento da retina e fibroblastos (He, Wang *et al.*, 1994; Chang, Hung *et al.*, 1997; Li, Mawal-Dewan *et al.*, 1998; Daffern, Jagels *et al.*, 1999; Huang e Cidlowski, 1999). GCs exercem efeitos protetores contra apoptose, também, em hepatócitos humanos e murinos e em células de hepatoma. A administração de dexametasona (Dex), um potente GC sintético, a ratos, reduz o nível de apoptose hepática (Evans-Storms e Cidlowski, 1997; Yamamoto, Fukuda *et al.*, 1998; Bailly-Maitre, De Sousa *et al.*, 2001). Desta forma, pode-se considerar que GCs exercem um papel protetor em células de tecidos e órgãos onde normalmente ocorrem processos inflamatórios.

Devido à ampla e potente regulação que GCs exercem sobre a proliferação celular, estes hormônios têm um vasto emprego farmacológico, sendo um dos tipos de drogas mais prescritos mundialmente. Seu uso clínico está associado ao tratamento de doenças inflamatórias, auto-imunes, linfoproliferativas, como a leucemia linfoblástica aguda (ALL) (Addeo, Casale *et al.*, 2004) e na prevenção de rejeição a transplantes (Chrousos, G.P. 2001).

1.2. Mecanismos Moleculares da Ação de GCs

A resposta celular clássica a GCs, assim como a outros hormônios esteróides, é mediada pelo seu receptor nuclear. O receptor de glicocorticóides (GR), ou NR3C1, como definido pelo Comitê de Nomenclatura de Receptores Nucleares em 1999 (A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily, 1999), pertence à superfamília de receptores nucleares de hormônios. Nesta família filogeneticamente conservada, estão incluídos, também, os receptores de mineralocorticóides, andrógenos, progestinas, estrógenos, vitamina D, hormônio da tireóide, ácido retinóico e um crescente número de receptores órfãos, cujos ligantes ainda não foram identificados (Evans, 1988). Quando interagem com seus ligantes agonistas, estes receptores se ligam especificamente e modulam a atividade dos promotores de seus genes-alvo, sendo caracterizados como fatores de transcrição dependente de ligantes.

Apesar de se ter acreditado, por muito tempo, que as ações de GCs fossem mediadas apenas por uma proteína (GR) (Hollenberg, Weinberger *et al.*, 1985), hoje se sabe que o gene *GR* humano sofre regulação por diversos promotores, o que resulta em, pelo menos, dois transcritos alternativos, GR- α e GR- β , que possuem exons terminais distintos, 9 α e 9 β (Breslin, Geng *et al.*, 2001). Mais recentemente, foi demonstrado, ainda, que a variante GR- α apresenta pelo menos oito sítios de início de tradução, gerando diversos produtos protéicos, nomeados como GR- α -A, -B, -C1 a -C3 e -D1 a -D3 (Lu e Cidlowski, 2005). Especula-se que o transcrito GR- β origine o mesmo número de isoformas, já que a única diferença entre ele e GR- α está no exon 9 e ambos compartilham os mesmos sítios de início de tradução (Chrousos e Kino, 2005).

Pouco se sabe até o momento sobre a função destas isoformas N-terminais de GR- α . Contudo, os níveis destas isoformas parecem variar entre os tecidos, sendo que todas elas são transcricionalmente ativas, cada uma apresentando uma determinada

intensidade transcricional específica. Aliado a este dado, o padrão de modulação da expressão gênica é parcialmente exclusivo para cada isoforma, sendo que elas compartilham a regulação de apenas uma pequena porcentagem de grupos de genes (Lu e Cidlowski, 2005). Existe ainda a possibilidade de interação física entre as isoformas de GR- α e as isoformas putativas de GR- β , resultando em 256 possíveis combinações de homo e heterodímeros de GR, supondo-se existir oito isoformas de cada transcrito alternativo. Esta descoberta traz à luz a complexidade dos mecanismos moleculares que coordenam a resposta a GCs e explica, em parte, a divergência encontrada nas possíveis respostas celulares a GCs. Segundo Chrousos e Kino, as vias de sinalização intracelular coordenadas por GCs podem ser encaradas, segundo o conhecimento atual, como um processo estocástico (Chrousos e Kino, 2005).

A isoforma clássica de GR, atualmente denominada GR- α -A, é, de longe, a mais explorada em termos de estrutura e função e a ela se deve praticamente todo o conhecimento sobre a sinalização intracelular de GCs. Em relação a sua estrutura e organização funcional, a região N-terminal contém seqüências responsáveis pela ativação dos genes-alvo, ou ativadoras de função 1 (AF-1). Outra seqüência ativadora de função, AF-2, é localizada na porção C-terminal da proteína. Através destas seqüências, GR interage com diversas proteínas e complexos protéicos, incluindo complexos co-ativadores [p160, p300/CREB binding protein (CBP) e o fator associado a p300/CBP (p/CAF)] e complexos remodeladores de cromatina, como SWI-SNF e DRIP/TRAP, que são fundamentais para a atividade transcricional de GR para seu acesso ao DNA alvo. Estas interações ainda possibilitam a regulação dos genes-alvo de GCs através da modulação da atividade da RNA polimerase II (RNA Pol-II) e de seus fatores auxiliares. Ainda na região N-terminal, encontram-se diversas serinas que

sofrem fosforilação por inúmeras quinases, regulando, assim, a atividade de GR (Kino, De Martino *et al.*, 2003).

Em sua região central, estão presentes dois motivos conservados de dedos de zinco, constituindo o domínio de ligação ao DNA (Hollenberg, Giguere *et al.*, 1987), que também é importante para a dimerização do receptor (Tsai, Carlstedt-Duke *et al.*, 1988), seu transporte nuclear (Picard e Yamamoto, 1987), sua transativação (Hollenberg, Giguere *et al.*, 1987) e sua interação com a chaperona HSP-90 (Pratt e Toft, 1997). A região C-terminal é ainda mais complexa. Além de interagir com os hormônios ligantes (Giguere, Hollenberg *et al.*, 1986), esta região também possui seqüências importantes para a interação com HSPs (Dalman, Scherrer *et al.*, 1991; Hutchison, Scherrer *et al.*, 1993), seqüências de localização nuclear (NLS) (Picard e Yamamoto, 1987), dimerização (Dahlman-Wright, Wright *et al.*, 1992) e transativação (Hollenberg e Evans, 1988), sendo responsável pelo silenciamento do receptor na ausência de seu ligante (Hollenberg, Giguere *et al.*, 1987).

A distribuição intracelular e, conseqüentemente, a função de GR é regulada pela interação com seus ligantes, que promovem uma mudança conformacional de GR. O resultado é sua dissociação de um complexo protéico, do qual as chaperonas HSP-90,-70, -50 e -20 são os maiores constituintes, que seqüestram a maior parte de GR no citoplasma. A dissociação de GR deste complexo leva à homodimerização parcial do receptor e à exposição de seus NLS, que são reconhecidos por importinas, dirigindo GR ao núcleo na forma de monômeros ou dímeros, já que sua principal função é a regulação da expressão gênica (Nishi e Kawata, 2006). Neste estado, GR pode atuar de diversas maneiras: 1) ligando-se diretamente a elementos responsivos (GREs) específicos em promotores de genes-alvo, promovendo ou inibindo sua expressão; 2) interagindo com outros fatores de transcrição, quando na forma de monômeros ou 3) competindo com

outros fatores de transcrição por co-ativadores, geralmente inibindo a atividade dos fatores de transcrição em questão. A resposta celular a GCs varia de acordo com a modulação do perfil de expressão gênica por GR (Almawi e Melemedjian, 2002).

GR- β , por sua vez, não se liga a GCs, exercendo um papel de dominante negativo sobre GR- α , através de diferentes mecanismos, como heterodimerização e competição com GR- α pelos GREs ou pelos seus co-ativadores (Bamberger, Bamberger *et al.*, 1995; Charmandari, Chrousos *et al.*, 2005). Este papel de dominante negativo pode trazer conseqüências à responsividade/resistência celular a GCs. Como mencionado acima, outro mecanismo de regulação da atividade de GR é via fosforilação de resíduos de serina localizados em sua porção N-terminal. Assim, por exemplo, ERK, JNK, p38 MAPK e diversas CDKs catalisam a fosforilação de GR, modulando positiva ou negativamente sua atividade transcricional, além de controlar o tráfico intracelular de GR (Itoh, Adachi *et al.*, 2002).

1.3. Ações Não-Gênicas de GCs

Os complexos mecanismos de sinalização intracelular promovidos por GCs, descritos acima, caracterizam a resposta “genômica” clássica a GCs, que necessita de, pelo menos, algumas horas para ser completada e culmina, em última instância, na modulação da expressão gênica. Entretanto, alguns dos efeitos exercidos por GCs ocorrem numa fração de tempo muito curta, que varia de segundos a alguns minutos a partir da administração do GC, não podendo compor as etapas clássicas de resposta a GC. Estes efeitos rápidos já foram caracterizados em diferentes tipos de células e tecidos de várias espécies de vertebrados, incluindo músculo, pâncreas, coração, tecido adiposo, o sistema imunológico e o sistema nervoso central (Tasker, Di *et al.*, 2006).

Estas respostas rápidas a GCs têm sido caracterizadas recentemente e podem ser referidas como “efeitos não-genômicos” de GCs, considerando a seguinte definição de efeitos não-genômicos, sugerida por Lösel e Wehling: “Qualquer ação que não influencia a expressão gênica direta e inicialmente, mas dirige efeitos mais rápidos como a ativação de cascatas de sinalização” (Losel e Wehling, 2003). É importante ressaltar que estes efeitos podem dar suporte ou serem antagônicos em relação aos efeitos genômicos de GCs, sendo que, em diversas situações, eles compõem uma onda inicial de resposta, que pode ser seguida por uma segunda onda mais tardia, a qual envolve elementos genômicos. Assim, por exemplo, altas doses de Dex induzem a estabilização de membranas lisossomais, um efeito envolvido na ação anti-anafilática de GCs, de forma rápida (cerca de 10min), mas sustentada. Este efeito só é bloqueado por antagonistas de GR em tempos mais longos (24h), indicando uma ação dupla de GCs, envolvendo efeitos não-genômicos e genômicos numa mesma resposta (Hinz e Hirschelmann, 2000). Por outro lado, a administração de GCs causa uma rápida supressão da secreção de insulina por células β pancreáticas, contrário ao seu efeito tardio, de aumentar os níveis de insulina (Sutter-Dub, 2002).

Estes efeitos rápidos apresentam algumas características distintas em relação aos efeitos clássicos de GCs, além do período de tempo em que ocorrem, entre as quais: 1) um perfil farmacológico distinto, já que os efeitos não são sensíveis a inibidores de transcrição e de síntese protéica; 2) ação exercida em células anucleadas, como plaquetas, eritrócitos e espermatozóides; e 3) possibilidade de análogos de esteróides (como as moléculas esteróides conjugadas à albumina de soro bovino), que não têm acesso ao compartimento celular, desencadearem uma resposta (Schulz, Schneider *et al.*, 2001).

A maioria destes efeitos rápidos foram observados empregando concentrações fisiológicas de GCs. O mecanismo de ação, que difere conforme o tipo celular e o hormônio estudado, frequentemente é mediado por uma variedade de segundos mensageiros, por mudanças no influxo de íons e pela ativação de diferentes quinases (Schulz, Schneider *et al.*, 2001). Muitos dos efeitos rápidos estudados são mediados pelo GR clássico, entretanto, alguns dos efeitos não-genômicos são refratários a antagonistas de GR, indicando que devem ser mediados por mecanismos alternativos. Há indícios crescentes da existência de receptores de glicocorticóides ancorados na membrana plasmática (mGR) e da participação destes na sinalização intracelular de alguns efeitos não-genômicos de GCs.

Recentemente, um receptor membranar de GC foi parcialmente caracterizado. Usando anticorpos anti-GR, um antígeno similar a GR foi detectado em membranas de células de linfoma de camundongo (Gametchu, 1987) (Gametchu, Watson *et al.*, 1991) e de fígado de rato (Grote, Ioannou *et al.*, 1993), apesar de sua baixa abundância nestas células. Estes primeiros achados possibilitaram a separação de populações distintas de células de linfoma de camundongo (Gametchu, Watson *et al.*, 1991) e de ALL humanas (Sackey, Watson *et al.*, 1997), enriquecidas para mGR ou deficientes em mGR, através de marcação com anticorpos, seguida por separação das células fluorescentes e clonagem celular em substrato semi-sólido. Estudos utilizando estas células revelaram algumas diferenças entre o GR clássico e o mGR, incluindo a localização celular, tamanho molecular e uma ligeira diferença na afinidade a GCs. Por outro lado, estas proteínas compartilham algumas características comuns, como: a) a própria estrutura, sendo que mGR tem seus epítomos reconhecidos por três anticorpos anti-GR; b) ligação à mesma classe de esteróides; c) regulação via fosforilação; d) interação com GREs no DNA e com as mesmas HSPs. Foi estabelecida, ainda, uma correlação entre a presença

e a quantidade de mGR em células de linfoma e o potencial de GCs induzirem a lise destas células, sugerindo que a identificação de mGR poderia servir como marcador da sensibilidade de células de linfoma a GCs (Gametchu, Chen *et al.*, 1999). Este receptor foi encontrado, também, em células mononucleares humanas de sangue periférico. Nestes tipos celulares de pacientes com artrite reumatóide, os níveis de mGR são aumentados em resposta ao estímulo com LPS, embora não se saiba ainda qual o seu papel neste processo (Bartholome, Spies *et al.*, 2004). Esses dados sugerem que mGR seja uma forma modificada de GR, embora ainda não se saiba se a forma membranar é codificada pelo mesmo locus gênico da forma clássica.

Algumas evidências têm indicado que o efeito subsequente à ativação do mGR esteja relacionado à atividade de proteína G, sugerindo que mGR seja acoplado à proteína G. Esta interação funcional foi vista em células pituitárias, revelando uma participação de proteína G na regulação aguda da alça HPA (Maier, Runzler *et al.*, 2005). A inibição da atividade de proteína G interfere na regulação negativa que GCs exercem, rapidamente, sobre correntes de cálcio ativadas por altas voltagens, em diferentes tipos celulares, como neurônios do hipocampo (Ffrench-Mullen, 1995) e células PC12 (Lou e Chen, 1998). Além disso, há outros exemplos da modulação dos níveis intracelulares de cAMP por GCs, em mecanismos que envolvem a sinalização via proteína G e PKC ou PKA em células neuronais (Tasker, Di *et al.*, 2006), o que pode ter implicações na resposta comportamental rápida a estímulos estressantes.

A sinalização rápida de GCs pode envolver, também, a ativação de MAPK. Em neurônios deficientes para GR, a administração de corticosterona conjugada a BSA por 15min, induziu a ativação de Erk1/2, JNK e p38 MAPK, via fosforilação. Entretanto, a ativação de MAPKs neste contexto não refletiu modificação alguma na proliferação celular (Xiao, Qi *et al.*, 2005). Estes dados refletem a extrema complexidade das vias

envolvidas na sinalização de GCs, reforçando, ainda mais, o modelo estocástico de ação de GCs proposto por Chrousos e Kino. O melhor entendimento das ações não-genômicas de GCs certamente abrirá novas perspectivas sobre os potenciais empregos farmacológicos de GCs.

1.4. Regulação da Proliferação Celular por GCs

Apesar das recentes descobertas sobre as ações não-genômicas de GCs, os mecanismos conhecidos atualmente, que coordenam a ação antiproliferativa de GCs, uma de suas características mais importantes para seu uso clínico, envolvem a regulação da expressão gênica.

Diversas vias distintas foram identificadas como sendo mediadoras da resposta antiproliferativa de GCs, variando de acordo com o tipo celular estudado. Entretanto, em alguns casos, a ação antiproliferativa de GCs pode se dar através da regulação de diferentes vias de sinalização mesmo em linhagens celulares derivadas de um mesmo tecido, como, por exemplo, nas linhagens U2OS e Saos2 de osteosarcoma (Rogatsky, Trowbridge *et al.*, 1997). A ativação de GR na linhagem U2OS leva à inibição da expressão de quinases dependentes de ciclina (CDKs), CDK4 e CDK6, e da ciclina D3, parceira que regula a atividade enzimática destas CDKs, resultando na hipofosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb), alvo destas quinases. A hipofosforilação de Rb aumenta sua interação com o fator de transcrição E2F-1, proteína-chave na regulação da progressão do ciclo celular. A conseqüente inativação de E2F-1 resulta na inibição de transcrição de c-Myc, fator de transcrição que, assim como E2F-1, induz a transição da fase G1 pra S do ciclo celular. Assim, a ativação de GR leva à inibição da proliferação nestas células através da repressão transcricional de alguns mecanismos pró-proliferativos. Já nas células Saos2, deficientes para Rb, GCs induzem a expressão de

p27 e p21, clássicas proteínas inibidoras de CDKs (CDKi), o que não acontece em células U2OS. A indução destas CDKis medeia, ao menos em parte, a resposta antiproliferativa de SAOS2 a GCs.

Mecanismos similares regulam o acúmulo de células de carcinoma pulmonar, A549 e Calu-1, na fase G0/G1 do ciclo, em resposta a GC. Nestas células, foi observado que o tratamento com Dex por 5 dias inibe a atividade de CDK2 e CDK4 e inibe transcricionalmente os níveis de ciclina D, E2F e c-Myc, ao passo que induz a expressão de p21, resultando na hipofosforilação de Rb. Entretanto, um mecanismo alternativo de regulação da proliferação por GCs também foi demonstrado nestas células. Em tempos mais curtos (24 a 48h), Dex inibe a atividade da quinase relacionada a sinal extracelular (ERK)/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A via de ERK/MAPK está diretamente relacionada à regulação positiva da proliferação em muitos tipos celulares e sua inibição por GCs pode refletir um mecanismo potente para controlar a proliferação (Greenberg, Hu *et al.*, 2002). Recentemente, alguns grupos mostraram a indução de fosfatase de MAPK-1 (MKP-1), uma fosfatase que inibe a sinalização de diversas MAPKs, por GCs (Vedoy e Sogayar, 2002; Wu, Pew *et al.*, 2005). Apesar de não ter sido avaliada a expressão de MKP-1 nestas linhagens de carcinoma pulmonar, é possível que esta fosfatase esteja envolvida na regulação negativa de MAPKs nestas células.

1.5. Interação com Fatores Transcricionais

Muitas das respostas antiproliferativas a GCs envolvem, além da regulação da expressão gênica diretamente por GR (transativação mediada por GREs ou transrepressão mediada por elementos GREs negativos, nGREs), a interação física de monômeros de GR com outros fatores de transcrição que coordenam a proliferação

celular. Este tipo de interação pode trazer diversas conseqüências para a função dos fatores em questão, de acordo com o tipo celular e o fator em si.

A interação com outros fatores de transcrição pode ativar tanto GR quanto o outro fator de transcrição, induzindo a expressão gênica, envolvendo: 1) sítios de ligação compostos nos promotores gênicos, que estariam permitindo a ligação de ambos os fatores no DNA; ou 2) elementos responsivos apenas para o fator conjugado a GR, não envolvendo GREs. Entretanto, a maioria das interações conhecidas entre GR e outros fatores de transcrição resulta na repressão mútua entre eles e, conseqüentemente, na inibição da expressão gênica, através de mecanismos variados, tais como: 1) GR pode inibir a ligação do outro fator de transcrição ao seu elemento responsivo no DNA; 2) GR pode bloquear a atividade do outro fator mesmo sem bloquear sua ligação ao DNA, em regiões promotoras que contenham GREs (envolvendo a ligação de GR ao DNA) ou mesmo na ausência de GREs; ou 3) GR pode competir por co-ativadores comuns, necessários para a atividade transcricional de outros fatores (Newton, 2000).

Neste sentido, pode-se citar dois fatores de transcrição que regulam os processos de proliferação/morte celular, cuja interação com GR foi extensivamente descrita, representando alguns dos mecanismos de regulação descritos acima: NF- κ B e AP-1. O complexo NF- κ B (fator nuclear – κ B) é um mediador fundamental dos processos inflamatórios, sendo estimulado por diversos agentes internos (citocinas inflamatórias) e externos (toxinas bacterianas, vírus, radiação ultra-violeta), geralmente em situações patológicas e regulando a expressão de uma série de genes envolvidos na resposta imune (Igk, Il-1, Il-2, Il-2Ra, Il-6, TNF- α e β e interferon β) e no crescimento celular (p53, c-Myc, ciclina D1 e JunB), entre outros (Pahl, 1999). Em muitos tipos celulares, a ativação de NF- κ B leva à sinalização de sobrevivência e proliferação celular, tendo sido observada, inclusive, uma associação entre NF- κ B e a oncogênese (Luque e Gelinas,

1997). Este complexo pode ser formado por combinações homo ou heterodiméricas entre seus componentes, dos quais a proteína RelA (ou p65) é o constituinte majoritário. GR ativado interage com RelA, resultando, geralmente, no bloqueio da atividade de NF- κ B (Scheinman, Gualberto *et al.*, 1995). Esta repressão, além de ser fundamental para a ação antiinflamatória de GCs, pode estar envolvida também na atividade antiproliferativa de GCs (Carvalho, 2002).

A transdução de sinais mitogênicos, que levam à ativação de Ras e MAPKs, resulta na ativação do complexo AP-1 (proteína ativada-1) e, conseqüentemente, na indução da expressão de genes que controlam positivamente a proliferação celular. AP-1 é composto por proteínas das famílias Fos e Jun, que são capazes de formar homodímeros (Jun/Jun) ou heterodímeros (Fos/Jun). Na presença de seu ligante, GR interage especificamente com Fos, inibindo a atividade de transcrição do complexo AP-1 que contém esta proteína, mesmo sem inibir a ligação do complexo ao DNA (Gottlicher, Heck *et al.*, 1998). Esta é outra forma pela qual GCs reprimem o crescimento celular através da interação de GR com outro fator de transcrição.

Surpreendentemente, a resposta fisiológica a GCs depende muito mais da intercomunicação entre GR e outras vias de regulação transcricional, através de interação física entre GR e outros fatores transcricionais, do que da regulação transcricional mediada diretamente pela ligação de GR ao DNA. Camundongos “knockout” para GR (GR^{-/-}) morrem algumas horas após o nascimento, por apresentarem pulmões extremamente imaturos, o que reflete a importância de GR para o desenvolvimento pulmonar (Cole, Blendy *et al.*, 1995). Além disso, estes camundongos apresentam uma redução significativa na expressão de enzimas envolvidas na gliconeogênese e no catabolismo de aminoácidos. A regulação negativa da alça HPA também é comprometida, sendo os níveis de ACTH e de corticosterona 20 e 3 vezes

maiores, respectivamente, em comparação a camundongos selvagem (Kretz, Reichardt *et al.*, 1999).

Em contrapartida, camundongos transgênicos que expressam uma forma mutante de GR (A458T), que compromete a interação de GR com o DNA por impedir a homodimerização de GR, são viáveis e aparentemente saudáveis. Estes camundongos, denominados GR^{dim/dim}, não apresentam indução de genes gliconeogênicos, indicando que sua regulação é dependente da interação direta de GR em suas regiões promotoras. Tanto os níveis de POMC (precursor de ACTH) quanto de prolactina, que sofre regulação negativa por GR, foram fortemente aumentados nos camundongos GR^{dim/dim}, sugerindo que a ligação de GR no DNA é necessária para a regulação negativa destes genes, via nGREs em seus promotores (Reichardt, Kaestner *et al.*, 1998).

Assim, as análises *in vivo* de camundongos selvagens, GR^{-/-} e GR^{dim/dim} demonstraram que GR apresenta funções dependentes e independentes de sua ligação ao DNA, indicando a importância da intercomunicação entre GR e outros fatores para as funções fisiológicas de GCs. Neste sentido, mostra-se fundamental a melhor compreensão da intercomunicação entre GR e outros fatores transcricionais, para o melhor entendimento do mecanismo de ação de hormônios glicocorticóides, de seu papel fisiológico e de suas implicações farmacológicas. Ao longo da última década, o gene supressor de tumor *TP53*, um regulador central do controle da proliferação celular, tem sido caracterizado como um mediador da resposta celular a GCs. A interação funcional entre glicocorticóides e *TP53* será discutida após a descrição das principais funções de *TP53*.

1.6. O Gene Supressor de Tumor TP53

1.6.1. Uma Breve Perspectiva Histórica

As primeiras caracterizações de p53 já indicavam algum envolvimento desta proteína na regulação da proliferação celular. Primeiramente, p53 foi co-imunoprecipitada juntamente com o antígeno LT (Large T) do vírus SV-40 (vírus símio – 40), sabidamente envolvido na transformação celular (Lane e Crawford, 1979). Usando anticorpos específicos anti-p53, foi observado que muitas linhagens celulares transformadas apresentavam altos níveis desta proteína, em contraste com os baixos níveis encontrados em células normais (Deleo, Jay *et al.*, 1979; Rotter, Boss *et al.*, 1981). De acordo com essas evidências, uma variedade de tumores exibia altos níveis de p53 (Rotter, 1983; Rogel, Popliker *et al.*, 1985). Em fibroblastos 3T3 não transformados, os níveis de expressão de p53 aumentavam conforme as células passavam de um estado quiescente (quando carenciadas para soro) para proliferativo (após estímulo com soro) (Reich e Levine, 1984), o que ressaltava ainda mais seu possível papel oncogênico.

O primeiro clone de cDNA de p53 foi obtido a partir do rastreamento de uma biblioteca de cDNAs contruída a partir de mRNAs provenientes da linhagem de camundongo SVT2 (transformada pelo antígeno LT de SV-40). A sonda de cDNA utilizada para este rastreamento foi sintetizada a partir de mRNAs constituintes de polissomos imunoprecipitados com anticorpos anti-p53 (Oren e Levine, 1983). Este clone permitiu a realização dos primeiros ensaios de expressão ectópica de p53, que indicaram claramente a capacidade do antígeno celular tumoral p53 (como denominado na época) de induzir a transformação celular: a expressão de p53 murino cooperou com o oncogene *c-Ha-ras* ativado, para a transformação de fibroblastos embrionários de

rato, resultando em células capazes de formar tumor em animais (Eliyahu, Raz *et al.*, 1984; Parada, Land *et al.*, 1984). Além disso, a expressão deste clone era suficiente para imortalizar condrócitos de rato em baixa passagem (Jenkins, Rudge *et al.*, 1984).

Entretanto, após uma década de evidências apontando para o papel oncogênico de p53, algumas observações começaram a pôr em xeque sua posição de oncogene: 1) em vários tumores de camundongo e humanos, ambos os alelos de *TP53* sofrem mutações e, em alguns casos, deleções grandes ou completas, o que sugere mutações por perda de função; 2) *TP53* selvagem murino impede a transformação de fibroblastos embrionários de rato, mediada por oncogenes como *E1A* de adenovírus e *ras*. Quando estes fibroblastos são co-transfectados com p53 selvagem, *ras* e *E1A*, os níveis de mRNA de p53 selvagem são indetectáveis ou apenas uma forma mutante de p53 é selecionada em cultura. Isto é análogo às observações feitas em tumores (*in vivo*), conforme discutido adiante; 3) tanto p53 como a proteína do retinoblastoma (pRb) interagem fisicamente com as oncoproteínas LT de SV-40 e *E1A* (pRb) e *E1B* (p53) de adenovírus. Esta interação com oncoproteínas de vírus de DNA causadores de tumor provavelmente resulta na inativação destes genes supressores de tumor, contribuindo para a transformação celular. Além disso, foram caracterizadas uma série de mutações pontuais, deleções e inserções no gene *TP53* murino, localizadas entre os aminoácidos 120 a 270 (de seus 390 aminoácidos). Estas mutações favorecem a atividade de p53 para a cooperação com *ras* para a transformação de fibroblastos embrionários de rato. Os mutantes de p53 compartilham algumas características comuns que os distinguem da proteína selvagem, como uma maior meia-vida, o que resulta em maiores níveis totais da proteína e uma mudança conformacional, o que possibilita o reconhecimento exclusivo das formas mutantes por alguns anticorpos (Levine, 1989).

De acordo com estas observações, a expressão de um clone do cDNA de p53, proveniente de carcinoma embrionário F9 (F9 EC) de camundongo, não apresentou a atividade de, juntamente com *ras*, induzir a transformação celular, o que ia contra os dados prévios de complementação entre *ras* e o primeiro clone de p53 para a transformação celular. A comparação entre as seqüências destes dois clones de p53, com evidentes diferenças funcionais, revelou uma troca de valina (primeiro clone) para alanina (clone das células F9 EC) no aminoácido 135 da proteína (Finlay, Hinds *et al.*, 1988). A subsequente comparação entre as seqüências de diversos clones de p53, isolados a partir de células de camundongo, humana e de sapo, evidenciou a presença de cinco regiões bem conservadas entre estas espécies, sendo que a alanina no aminoácido 135 estava presente em uma destas regiões (Eliyahu, Goldfinger *et al.*, 1988), (Soussi, Caron De Fromentel *et al.*, 1987). Concluiu-se então que esta mutação pontual poderia ser atribuída à capacidade tumorigênica do primeiro clone descrito de p53.

Talvez a primeira demonstração marcante do papel de p53 como regulador negativo da proliferação celular tenha vindo dos experimentos realizados por Finlay *et al.*, os quais mostravam que a introdução de p53 selvagem (p53^{wt}) reduzia drasticamente o potencial transformante da expressão de *ras* ativado e p53 mutante (p53^{mt}) ou de *ras* e E1A de adenovírus, em fibroblastos embrionários murinos (Finlay, Hinds *et al.*, 1989). Estas observações, além de ressaltarem a crítica relação entre as formas mutantes de p53 e o processo de tumorigênese e trazerem informações importantes sobre as diferenças funcionais e bioquímicas entre as formas mutantes e selvagem de p53, iniciaram a mudança de paradigma a respeito de p53: de oncogene para gene supressor de tumor.

1.6.2. p53 – O Guardião do Genoma

Do início da década de 90 em diante, o papel de p53 como supressor de tumor foi sendo, irrevogavelmente, estabelecido. Um número extraordinário de trabalhos foi publicado e um número equivalente de funções foram sendo atribuídas à esta proteína, provavelmente pelo fato de ser uma das proteínas mais extensivamente estudadas da história da bioquímica. De forma geral, a proteína p53 trabalha para a manutenção da integridade do genoma celular, intermediando sinais tóxicos, intra ou extracelulares, e dirigindo as respostas celulares, principalmente através da regulação da expressão gênica, a fim de preservar sua estrutura genômica. Tamaña relevância foi resumida por David Lane, responsável pela primeira co-imunoprecipitação de p53 com antígeno LT de SV40, em sua famosa sentença: “p53, o guardião do genoma” (Lane, 1992). Para compreender a extensão da importância de p53 para a integridade celular, os aspectos mais relevantes desta proteína serão resumidos a seguir.

1.6.3. Estrutura e Função

O gene *TP53* humano está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e sua região codificante é dividida em 11 exons. A proteína codificada por este gene contém 393 aminoácidos (aas), pesando cerca de 53kDa, podendo ser dividida, funcionalmente, em três regiões principais: amino-terminal (aas 1-100), central (aas 101-306) e carboxi-terminal (aas 307-393).

A região amino-terminal compreende dois domínios de ativação (AD) de p53, sendo que o primeiro (AD1) é um domínio de ativação ácido, localizado entre os resíduos 1 e 42 (Unger, Nau *et al.*, 1992) e, o segundo (AD2), situado entre os resíduos 43 e 92, engloba um domínio rico em prolina (PRD – aas 64 a 92) que medeia a resposta de p53 a danos no DNA através de apoptose (Walker e Levine, 1996). Esta

região é responsável pela interação com muitos fatores gerais de transcrição, como: a proteína de ligação a TATA-box (TBP), componente do fator geral de transcrição TFIID – interação que favorece a cooperação para a ligação do DNA (Horikoshi, Usheva *et al.*, 1995); diversos fatores associados a TBP (TAFs), como TAF-31 (Lu e Levine, 1995); e a subunidade p62 do fator dual de transcrição/reparo TFIIH (Xiao, Pearson *et al.*, 1994). A região N-terminal de p53 interage ainda com a proteína de ligação a DNA simples fita RP-A (Dutta, Ruppert *et al.*, 1993) e com seu regulador negativo MDM2 (Lin, Chen *et al.*, 1994), interação esta que será melhor discutida mais adiante. Sua seqüência de exclusão nuclear (NES), que tem importância fundamental na regulação da função de p53, também está localizada nesta região (Zhang e Xiong, 2001).

Na região central de p53 está contido o domínio de ligação a seqüências específicas de DNA (Bargonetti, Manfredi *et al.*, 1993), encontradas em regiões promotoras ou intrônicas da maioria de seus genes-alvo, e que envolve um motivo de dedo de zinco (Rainwater, Parks *et al.*, 1995). A ligação ao DNA favorece a formação de fortes interações entre os domínios centrais de tetrâmeros de p53 distintos, o que pode facilitar o dobramento (Balagurumoorthy, Sakamoto *et al.*, 1995) e o enrolamento do DNA (Stenger, Tegtmeyer *et al.*, 1994), propriedades relevantes em promotores que contêm dois elementos responsáveis a p53 (p53-RE) distantes um do outro, como acontece nos promotores de *p21* e *Ciclina G* (Zauberman, Lupo *et al.*, 1995). Na região central estão localizados quatro dos cinco domínios altamente conservados evolutivamente em vertebrados, onde estão situados os sítios mais frequentemente mutados em tumores humanos, o que evidencia sua importância para a funcionalidade da proteína selvagem (Hollstein, Rice *et al.*, 1994). Os tipos de mutações e suas conseqüências sobre a função de p53 e, em última instância, sobre a fisiologia celular,

serão discutidos adiante. Ainda, o domínio central favorece a interação da proteína com o antígeno LT de SV40, o que resulta na inativação de p53.

O domínio C-terminal é o menos caracterizado dos três. Nele estão localizadas as seqüências de localização nuclear (NLS), envolvidas na translocação nuclear da proteína (Shaulsky, Goldfinger *et al.*, 1990; Middeler, Zerf *et al.*, 1997) e o domínio de tetramerização, que possibilita a formação de tetrâmeros de p53 – forma através da qual p53 se liga ao DNA (Lee, Harvey *et al.*, 1994). Através da região C-terminal, p53 interage com seqüências não específicas no DNA, o que permite seu deslizamento ao longo do DNA (Mckinney, Mattia *et al.*, 2004). Especula-se que este deslizamento facilite o encontro dos p53-REs nas regiões promotoras específicas (Liu, Lagowski *et al.*, 2004). A porção C-terminal de p53 é capaz de interagir também com porções de DNA danificado, ou com elementos intermediários do processo de reparo do DNA, como DNA simples fita (ssDNA) (Bakalkin, Yakovleva *et al.*, 1994), “mismatches” por inserção ou deleção (Lee, Elenbaas *et al.*, 1995), intermediários de recombinação (Dudenhoffer, Rohaly *et al.*, 1998) e DNA gama-irradiado, *in vitro* (Reed, Woelker *et al.*, 1995). De acordo com estas observações, estudos de microscopia confocal demonstraram a co-localização de p53 em sítios de DNA danificados por radiação UV em células de pele humanas. Estes dados sugerem que o deslizamento de p53 pelo DNA, através de sua porção C-terminal, seja importante, também, para o reconhecimento de lesões no DNA e conseqüente ativação de p53, já que a interação de p53 com extremidades protuberantes de oligonucleotídeos favorece a ligação do domínio central da proteína ao DNA (Zotchev, Protopopova *et al.*, 2000). Ainda, a atividade de p53 é regulada, principalmente, através de várias modificações pós-traducionais em suas porções N- e C-terminal, o que será melhor discutido mais adiante.

1.6.4. Mutações em TP53

Mutações no gene *TP53* são encontradas em mais de 50% dos tumores humanos (Hollstein, Sidransky *et al.*, 1991), sendo que 74% destas mutações são do tipo “missense”, o que resulta em proteínas completas, apesar de mutantes. Estas mutações pontuais acometem principalmente o domínio central de p53, responsável pela interação da proteína com o DNA (como discutido anteriormente) e podem ser categorizadas de duas formas: mutações do tipo I, que afetam diretamente os resíduos envolvidos na superfície de ligação ao DNA, rompendo os pontos de contato entre a proteína e o DNA (mutantes de contato), sem, contudo, alterar a conformação selvagem da proteína; e mutações do tipo II, com alterações em aminoácidos envolvidos na estrutura terciária da proteína (mutantes conformacionais) (Van Oijen e Slootweg, 2000). Esta última classe sofre uma alteração intensa em sua conformação e possibilita a interação dos mutantes de p53 com a chaperona HSP70, através da exposição de motivos hidrofóbicos, normalmente inacessíveis na proteína selvagem (Sturzbecher, Chumakov *et al.*, 1987). Mutantes da classe II apresentam um fenótipo mais severo que mutantes da classe I *in vitro* (Ory, Legros *et al.*, 1994).

A frequência de mutações “missense” é muito maior em *TP53* do que em outros genes supressores de tumor, como *APC*, *BRCA1* ou *ATM*, nos quais os tipos predominantes de mutação são “nonsense”, deleções ou inserções, que resultam em proteínas truncadas, com evidente perda de função. Esta diferença evidencia o potencial das formas mutantes de p53 de conferir vantagens seletivas para a carcinogênese (Hussain e Harris, 1998). De fato, o melhor entendimento das funções biológicas de alguns mutantes de p53 tem mostrado que seu papel durante a tumorigênese se estende muito além da perda de função da proteína selvagem.

Neste sentido, mutantes de p53 exercem um efeito dominante-negativo (ou trans-dominante) sobre p53 selvagem, o que tem implicações em tumores que apresentam mutação de *TP53* em heterozigose. Mutantes de p53 são capazes de heterodimerizar com p53 selvagem, sendo que a região de oligomerização (resíduos 319 a 360) é totalmente funcional em mutantes do domínio central de p53 (Unger, Mietz *et al.*, 1993). A formação deste complexo resulta na mudança conformacional de p53 selvagem, que adquire uma conformação inativa ou mutante (Milner e Medcalf, 1991). O efeito dominante-negativo já foi caracterizado em uma variedade de processos fisiológicos que envolvem p53 selvagem, como: desenvolvimento e diferenciação (Aloni-Grinstein, Schwartz *et al.*, 1995); apoptose (Lotem e Sachs, 1993; Gottlieb, Haffner *et al.*, 1994); parada de crescimento (Aloni-Grinstein, Schwartz *et al.*, 1995); expressão constitutiva de p21 (Tang, Zhao *et al.*, 1998); estabilidade genômica (Liu, Kraus *et al.*, 1996); resistência a infecção por parvovirus H-1 (Telerman, Tuynder *et al.*, 1993); imortalização (Cao, Gao *et al.*, 1997); e inibição da transformação de fibroblastos embrionários de rato por *ras* (Shaulian, Zauberman *et al.*, 1992). A capacidade de mutantes de p53 interagirem com e bloquearem a função da proteína selvagem se estende para outros membros da família de p53, como p73. Ao contrário de p53 selvagem, que não interage com p73, mutantes de p53 são capazes de se ligar a p73 através de seu domínio de ligação ao DNA (Strano, Munarriz *et al.*, 2000). Como consequência, há inibição de apoptose, de parada no ciclo e da transativação de p21 mediados por p73 (Di Como, Gaiddon *et al.*, 1999).

Além desta ação trans-dominante, é notória a habilidade de mutantes de p53 exercerem efeitos oncogênicos de forma independente de p53 selvagem. Este efeito foi primeiramente descrito em pré-linfócitos B murinos nulos para p53, capazes de induzirem tumores locais em camundongos, que regredem com o tempo. A introdução

de p53 mutante (132 C-F) nestas células é capaz de gerar tumores letais (Wolf, Harris *et al.*, 1984). O papel de ganho de função pela proteína selvagem tem sido melhor caracterizado e, a algumas formas mutantes de p53, tem sido atribuída a maior frequência de mutações (Iwamoto, Mizuno *et al.*, 1996), o bloqueio de diferenciação (Shaulsky, Goldfinger *et al.*, 1991) e o aumento do potencial metastático (Crook e Vousden, 1992).

O que caracteriza, pelo menos parcialmente, o ganho de função de mutantes de p53 é a capacidade de transativar genes específicos, que não são alvos de p53 selvagem. Desta forma, é possível que a indução destes genes, em geral oncogenes, medeie, em grande parte, a função oncogênica de mutantes de p53. Estes mutantes exercem influência sobre as seqüências promotoras de, por exemplo: o gene do transportador multi-drogas *MDR-1* (Dittmer, Pati *et al.*, 1993), *c-myc* (Frazier, He *et al.*, 1998), *PCNA* (Deb, Jackson *et al.*, 1992; Tsutsumi-Ishii, Tadokoro *et al.*, 1995), *interleucina-6* (Margulies e Sehgal, 1993), *HSP-70* (Tsutsumi-Ishii, Tadokoro *et al.*, 1995), *EGFPR* (Ludes-Meyers, Subler *et al.*, 1996) e *IGF-2* (Lee, Lee *et al.*, 2000), sendo que o perfil de genes regulados varia de acordo com o tipo do mutante (Kawamura, Yamashita *et al.*, 1996) e o tipo celular, provavelmente devido a diferenças nas proteínas co-regulatórias (Sehgal e Margulies, 1993; Flaman, Robert *et al.*, 1998; Lanyi, Deb *et al.*, 1998). Em pelo menos alguns destes exemplos, a transativação por p53 parece ser direta, já que sua porção N-terminal, que contém os domínios de transativação necessários para a atividade transcricional de p53 selvagem, também é necessária para a atividade de transativação de p53 mutante (Frazier, He *et al.*, 1998; Lanyi, Deb *et al.*, 1998). Ainda não foi identificada uma seqüência consenso de DNA que possibilite sua interação com formas mutantes de p53. Entretanto, a comparação dos elementos de DNA aos quais o mutante de p53 (245 Gli-Ser) se liga, mostrou que uma característica

comum destas seqüências é a alta tendência de formar conformações de DNA não-B (Koga e Deppert, 2000).

Outra característica de certos mutantes de p53 é a capacidade de interagir com proteínas diferentes dos parceiros da forma selvagem de p53. Entre elas, pode-se citar p38, p42 (Chen, Chen *et al.*, 1994) e MBP1 (Gallagher, Argentini *et al.*, 1999), um membro da família da fibulina. Especula-se que estas interações diferenciais são facilitadas ou pelo surgimento de um novo sítio de interação nas formas mutantes de p53, ou pela perda de algum sítio da forma selvagem, responsável pela interação com alguma proteína que bloqueie a interação com os novos parceiros (Van Oijen e Slootweg, 2000). A função da interação de p53 mutante com p38 ou p42 não é conhecida, mas quando MBP1 e p53 mutante são expressos ectopicamente em células H1299, a taxa de transformação neoplásica é fortemente aumentada. É sabido que a intensidade da interação entre MBP1 e mutantes de p53 varia conforme o tipo de mutação, o que sugere que a capacidade de se ligar a outras proteínas pode ser decisiva para o ganho de função de certos mutantes. Como a expressão destes parceiros de mutantes de p53 é variável, de acordo com o tipo e o contexto celular, alguns ganhos de função podem depender do tipo celular também. Alguns mutantes de p53, deficientes para a transcrição, são capazes de se ligar à topoisomerase I através de sua porção C-terminal (Albor, Kaku *et al.*, 1998). A atividade da topoisomerase I está ligada à instabilidade genômica, através da estimulação de recombinação não-homóloga (Bullock, Champoux *et al.*, 1985). Desta forma, estes mutantes de p53 podem contribuir para a tumorigenicidade através do estímulo da recombinação e da atividade transcricional da topoisomerase I.

Um exemplo da relevância do ganho de função de mutantes de p53 no processo de tumorigênese é a resposta de camundongos transgênicos, que expressam o mutante

p53-His 172, a carcinógenos químicos. Ao contrário de camundongos selvagens ou “knockout” para p53, estes transgênicos apresentam grande susceptibilidade a diversos carcinógenos químicos, com a formação acelerada de papilomas benignos, sua malignização e metastatização. Estes papilomas apresentam uma frequência de anormalidades cromossômicas muito maior (75% das células) do que os papilomas de tumores nulos para p53 (4% das células) (Wang, Greenhalgh *et al.*, 1998). É importante ressaltar, ainda, que mutantes de p53 apresentam uma meia vida muito elevada em comparação com a proteína selvagem, devido ao bloqueio da interação com MDM2 (Ashcroft e Vousden, 1999). Os altos níveis de p53 mutante podem cooperar para sua ação oncogênica, tanto em relação à regulação da expressão gênica, quanto à interação com parceiros intracelulares.

1.6.5. Regulação de p53

p53 funciona como uma ponte entre uma diversidade de estímulos estressantes internos e externos à célula, como: radiação ionizante ou não-ionizante; hipóxia; estresse oxidativo; presença de anti-metabólitos que inibem a biosíntese de ribonucleotídeos; choque térmico; baixo pH extracelular; agentes químicos que promovem danos ao DNA e certas alterações oncogênicas; e a resposta celular a estes estímulos. Fundamentalmente, p53 é um dos principais determinantes celulares a estímulos que podem comprometer a estabilidade genômica, podendo dirigir diferentes respostas, como parada no ciclo celular nas fases G1 ou G2 (medeia os pontos de checagem de G1/S e G2/M), reparo de DNA, apoptose e inibição da angiogênese e de metástase, de acordo com o tipo e a intensidade do estímulo (Kuerbitz, Plunkett *et al.*, 1992; Gottlieb e Oren, 1996; Ko e Prives, 1996; Levine, Hu *et al.*, 2006).

A principal forma de ação de p53 é através do controle da expressão gênica, sendo que, até hoje, já foram identificados mais de 150 alvos gênicos sobre os quais p53 exerce influência na regulação (positiva ou negativa) da expressão (El-Deiry, 1998), (Zhao, Gish *et al.*, 2000). A seqüência consenso de ligação de p53 ao DNA foi identificada em 1992, consistindo duas cópias de um motivo degenerado de 10pb, 5'-RRRCWWGYYY-3', onde R representa nucleotídeos púricos, Y pirimidínicos e W adenosina ou timidina, com um espaçamento de 1 a 13pb (El-Deiry, Kern *et al.*, 1992). Entretanto, o elemento de resposta a p53 apresenta uma grande diversidade entre os promotores de seus genes alvos. A comparação da atividade de 26 diferentes p53-REs, num modelo de levedura, no qual não há variações de outros fatores, como a cromatina, revelou que apenas as diferenças entre as seqüências são capazes de gerar uma diferença de resposta a p53 de até 1.000 X (Inga, Storici *et al.*, 2002).

Entretanto, a atividade de p53, e conseqüente regulação seletiva desta variedade de genes, é determinada, principalmente, através de modificações pós-traducionais em p53, como fosforilação, acetilação, sumoilação, ubiquitinação e isomerização (Zacchi, Gostissa *et al.*, 2002; Zheng, You *et al.*, 2002), que influenciam, por exemplo, a estabilidade da proteína e sua capacidade de ligação ao DNA [revisado em (Appella e Anderson, 2000) e (Appella e Anderson, 2001)]. A interação de p53 com outros fatores transcricionais, como Sp1 (Koutsodontis, Tentes *et al.*, 2001); com proteínas da maquinaria transcricional, como TFIID (Xiao, Pearson *et al.*, 1994); e com complexos remodeladores de cromatina, como SWI/SNF (Lee, Kim *et al.*, 2002), também exerce um papel fundamental sobre sua atividade e especificidade na regulação de seus genes-alvo.

1.6.6. Regulação Central – MDM2

A meia vida de p53 é curta em uma variedade de tipos celulares, entre 6 e 20min, resultado da constante associação de p53 com a E3 ubiquitina-ligase MDM2, que induz a degradação de p53 via proteassoma (Momand, Zambetti *et al.*, 1992), (Haupt, Maya *et al.*, 1997) ou interfere na transativação de alvos de p53 (Dumaz e Meek, 1999). Esta associação tem um papel crucial na regulação da atividade de p53 e durante o crescimento e desenvolvimento normal (Jones, Roe *et al.*, 1995). Em muitos casos, a ativação e estabilização de p53 estão associadas à inibição de sua interação com MDM2, sendo que, em vários tumores que apresentam p53 selvagem, há amplificação do locus gênico de MDM2 (Momand, Jung *et al.*, 1998). Ainda, diferentes sinais estressantes usam diferentes vias que induzem a dissociação entre p53 e MDM2 (Vousden, 2002).

Assim, por exemplo, MDM2 pode ser inibida por p14ARF, uma proteína ativada por sinais hiper-proliferativos, como a superexpressão de E2F-1 e *myc* ou a superativação de *ras*, resultando na ativação de p53 (Sherr, 1998). Interessantemente, a perda de p14ARF é comum em estágios iniciais do desenvolvimento tumoral. Sinais tardios da progressão maligna, como aqueles mediados por invasão ou metástase, podem levar à ativação de p53 por mecanismos independentes de p14ARF. Nestes estágios mais tardios, o desenvolvimento do tumor depende da aquisição de lesões alternativas que inativam p53, incluindo mutações em seu gene. Esta é uma das possíveis explicações para o aparecimento de mutações em *TP53* estar relacionado com estágios avançados do processo de tumorigênese (Vousden e Lu, 2002).

Outra forma de interferir com a interação entre p53 e MDM2 é via fosforilação tanto de p53 quanto de sua ubiquitina-ligase. Quebras na dupla fita do DNA, por exemplo, através de radiação ultravioleta e ionizante, ativam as quinases ATM (Ataxia

Telangiectasia Mutated) e ATR (Ataxia Telangiectasia Related), que têm p53 como substrato comum. Ambas podem fosforilar a Ser15 de p53, resultando em maior atividade por facilitar sua interação com a acetil-transferase p300. A acetilação da porção C-terminal de p53 aumenta sua interação específica com o DNA. Além da ativação direta de p53, ATM e ATR induzem indiretamente a fosforilação da Ser20 de p53, via ativação de Chk2 e Chk1, respectivamente. Este resíduo é fundamental para a interação p53-MDM2 sendo que uma vez fosforilado, induz a quebra do complexo e o acúmulo nuclear de p53. Ainda, ATM é capaz de fosforilar a Ser395 de MDM2, o que também interfere com sua atividade de induzir a degradação de p53 (Abraham, 2001).

MDM2 é ativada por sinais de crescimento/proliferação, através de sinalização via PI3K (fosfoinositídeo 3 quinase) e AKT. Em situações de estresse celular a fosfatase PTEN, alvo transcricional de p53, catalisa a desfosforilação de PI3K, bloqueando a sinalização que leva à ativação de MDM2, induzindo seu acúmulo citoplasmático e, conseqüentemente, induzindo p53 (Mayo e Donner, 2002). Este representa um importante mecanismo de retro-alimentação positiva envolvendo p53 e PTEN, sendo que mutações no gene *PTEN* estão presentes em cerca de 40 a 50% de gliomas de alto grau (Maier, Zhang *et al.*, 1998) e em inúmeros outros tipos de tumor, como prostáticos, endometrióides, mamários e pulmonares (Li, Yen *et al.*, 1997). Por outro lado, a desfosforilação de MDM2 por PP2A (proteína fosfatase 2 A), resulta em aumento de sua atividade. Um dos primeiros alvos descritos de p53 descritos, Ciclina G (Okamoto e Beach, 1994), induz o recrutamento de PP2A para os complexos p53-MDM2, resultando na inativação de p53 (Okamoto, Li *et al.*, 2002). Este representa um mecanismo de retro-alimentação negativa entre p53 e seu alvo Ciclina G. Contudo, a relação entre Ciclina G e p53 parece ser mais complexa, dependendo do complexo formado entre a Ciclina G e MDM2. A presença de p14ARF neste complexo resulta na

estabilização de p53, ao invés de sua degradação envolvendo PP2A (Kimura e Nojima, 2002).

A expressão de MDM2 é fortemente induzida por p53 (Barak, Juven *et al.*, 1993), caracterizando a alça de retro-alimentação negativa mais bem conhecida envolvendo p53. O envolvimento de todas estas vias descritas na regulação da estabilidade e atividade de p53 através de MDM2, evidencia a extensão da importância de MDM2 para a funcionalidade de p53.

1.6.7. Principais Vias Envolvendo p53

Uma questão central na resposta celular a danos no DNA é a decisão entre a parada de proliferação, de forma temporária ou permanente, ou a entrada em apoptose. Diversos fatores afetam esta decisão, incluindo o estado proliferativo em que a célula se encontra, a extensão dos danos e a disponibilidade de fatores de crescimento. Acredita-se que p53 dirija esta resposta através da ativação seletiva de um subconjunto de genes-alvo, resultando em apenas um destino para a célula. Desta forma, dependendo do agente estressante e do dano promovido por ele, p53 pode induzir a parada de crescimento e o reparo de DNA. Em caso de dano intenso no DNA, ou reparo de DNA ineficiente, p53 pode levar as células a apoptose. Esta resposta varia também conforme o tipo celular em questão (Prives, 1998) (Vousden e Lu, 2002).

Diversos alvos de p53 relacionados à parada no ciclo já foram caracterizados, incluindo: *14-3-3 sigma* (Hermeking, Lengauer *et al.*, 1997); *BTG2* (Rouault, Falette *et al.*, 1996); *PTEN* (Stambolic, Macpherson *et al.*, 2001); e *p21* (El-Deiry, Tokino *et al.*, 1993), sendo que o papel deste último na regulação do ciclo celular é o melhor caracterizado. O produto gênico de p21 é outra proteína reguladora do ciclo, considerada como sendo uma inibidora universal de quinases dependentes de ciclina

(CDKs) (Xiong, Hannon *et al.*, 1993). Como resposta à inativação de CDK, a proteína do Retinoblastoma, pRB, mantém-se hipofosforilada, já que sua fosforilação é dependente do complexo CDK4/6-Ciclina D1 (Zhang, 1999). O aumento na expressão de *p21* mediado por p53 resulta na inativação de E2F pela ligação a pRB hipofosforilada (Smith, Zhan *et al.*, 1994). Sendo E2F um fator de transcrição responsável pela expressão dos genes cujos produtos são necessários para o início da síntese do DNA (fase S do ciclo celular), não há progressão no ciclo (Bandara, Buck *et al.*, 1993).

Uma vez interrompida a proliferação, genes relacionados ao reparo de DNA por excisão de nucleotídeo (NER) ou por excisão de base (BER) podem ser regulados por p53. Em relação ao NER, p53 induz os genes *p48XPE* (Hwang, Ford *et al.*, 1999) e *XPC* (Amundson, Do *et al.*, 2000), relacionados à síndrome genética *Xeroderma pigmentosum*, que predispõe ao câncer, e que codificam proteínas ligantes de DNA danificado (DDBs) envolvidas no reconhecimento de lesões no DNA. P53 induz, também, a expressão de *Gadd45*, cujo produto gênico se liga ao DNA danificado por radiação UV (Carrier, Georgel *et al.*, 1999), sendo essencial para o NER (Hollander, Kovalsky *et al.*, 2001). Através de mecanismos menos conhecidos, p53 regula o BER, já que este tipo de reparo é deficiente em células nulas para p53. É sabido que a presença de p53 induz a DNA polimerase β *in vitro*, envolvida em BER (Zhou, Ahn *et al.*, 2001).

Apesar de uma lista crescente de genes pro-apoptóticos ser claramente regulada por p53, é difícil definir qual a contribuição de cada um deles na resposta apoptótica, o que pode refletir uma redundância na via apoptótica e/ou a presença de mecanismos específicos para diferentes tipos de célula ou de estresse (Vousden e Lu, 2002). Contudo, pode-se citar o mecanismo mais amplamente conhecido de regulação de

apoptose por p53, envolvendo a regulação negativa do gene anti-apoptótico *Bcl-2* (Miyashita, Harigai *et al.*, 1994) e positiva de *Bax* (Miyashita e Reed, 1995). PUMA, que também sofre indução por p53 (Nakano e Vousden, 2001), promove a liberação de p53 citoplásmico da interação inibitória com Bcl-xL, facilitando a interação entre p53 e Bax, resultando na ativação de Bax e conseqüente permeabilização da mitocôndria, liberação do citocromo c e apoptose (Chipuk, Bouchier-Hayes *et al.*, 2005).

1.7. Interação Funcional Entre p53 e GR

Assim como p53, GR medeia a resposta a uma diversidade de estresses fisiológicos, sendo regulador fundamental do processo decisório de vida/morte de muitos tipos celulares. Apesar desta clara convergência funcional, apenas recentemente a possível interação entre estes fatores vem sendo explorada diretamente. Interessantemente, tem sido mostrada uma dualidade na interação funcional entre estes fatores, que parece variar conforme o tipo e o contexto celular estudado. O tratamento com GCs pode promover uma intercomunicação tanto positiva entre p53 e GR, resultando em co-ativação destes fatores, quanto negativa, levando a sua co-repressão.

1.7.1. Intercomunicação Negativa Entre p53 e GR

A princípio, era esperado que p53 mediasse o processo de apoptose induzido por GC, afinal, muitos dos genes-alvo de p53 são regulados positivamente durante o programa de apoptose mediado por GC. Assim, por exemplo, camundongos transgênicos que superexpressam Bax apresentam apoptose acelerada em resposta a Dex (Brady, Salomons *et al.*, 1996). Entretanto, outros trabalhos sugeriram que a apoptose induzida por GC fosse p53-independente. Timócitos de camundongos “knockout” para p53 apresentam uma resposta apoptótica alterada em resposta a radiação ionizante (IR),

mas não a GCs (Clarke, Purdie *et al.*, 1993; Lowe, Schmitt *et al.*, 1993). Foi sugerido, ainda, que p53 e GC poderiam auto-regular suas funções negativamente. Mori *et al* mostraram que a indução de apoptose por Dex era aumentada em timócitos de camundongos que não tinham um dos dois alelos de p53 (Mori, Yamate *et al.*, 1999). Em células da granulosa expressando uma forma mutante de p53 temperatura-sensível, foi demonstrado que GC inibe a apoptose induzida por p53, por mecanismos que envolvem a regulação positiva de Bcl-2 (Sasson, Tajima *et al.*, 2001). É interessante ressaltar que, em algumas situações fisiológicas, GCs e p53 desempenham papéis antagônicos. Em condições de estresse fisiológico, como durante hipóxia, GCs induzem o aumento do metabolismo de glicose, ao contrário de p53, que regula negativamente o metabolismo de glicose e induz apoptose (Riva, Chauvin *et al.*, 1998).

A primeira demonstração direta do mecanismo que poderia regular a intercomunicação negativa entre p53 e GCs foi feita através de ensaios de transfecção transitória, onde GR e a forma selvagem ou mutantes de p53 foram superexpressos em fibroblastos de rim de macaco (CV-1). A indução de GR por Dex foi progressivamente inibida por quantidades crescentes de p53 selvagem, mas não por todas as suas formas mutantes. Neste trabalho, foi observado, também, que p53 interage fisicamente com GR *in vitro* (Yu, Yap *et al.*, 1997).

Posteriormente, foi confirmado que a interação física entre p53 e GR, que envolve o domínio central e a NLS de p53, também ocorre *in vivo*. Tanto proteínas expressas ectopicamente quanto as proteínas endógenas, em células normais e tumorais, puderam ser co-imunoprecipitadas (Sengupta, Vonesch *et al.*, 2000; Sengupta e Wasylyk, 2001). Esta interação física, que é dependente da presença de GCs, em células de neuroblastoma, resulta em mútua inibição do potencial de transativação de GR e p53, por seqüestro destas proteínas no citoplasma. Nestas células, GR, na presença de seu

ligante, inibe a parada de crescimento e a indução de apoptose mediada por p53. De forma contrária, um antagonista de GR, RU486, promove a dissociação do complexo GR-p53, induzindo um acúmulo nuclear e a retomada da atividade de transativação de ambos os fatores (Sengupta, Vonesch *et al.*, 2000).

No intuito de encontrar este tipo de intercomunicação num contexto fisiológico, este mesmo grupo demonstrou que o tratamento de células HUVEC com Dex, em condição de hipóxia, promove a formação de um complexo trimérico entre p53, GR e Hdm2, o ortólogo humano de MDM2, resultando na inibição de p53 e GR. Este processo envolve o acúmulo citoplasmático, seguido por ubiquitilação e degradação de ambas as proteínas via proteassoma, inibindo, assim, a ação pró-apoptótica de p53 em situação de hipóxia. Estes resultados também foram observados em células HUVEC em normóxia, quando expostas ao agente alquilante mitomicina C (MMC), conhecido indutor de p53. A identificação desta interação entre p53 e GR em situação de hipóxia, revelou que GR é um novo substrato de MDM2, aumentando a gama de alvos desta ubiquitina ligase. Além disso, para a ubiquitilação de GR é necessária a interação entre p53 e MDM2, já que a quebra desta interação impede a ubiquitilação de p53 e GR induzida por Dex (Sengupta e Wasylyk, 2001). Certamente, este mecanismo de regulação negativa envolvendo a degradação de p53 e GR por MDM2 deve ocorrer apenas em determinados contextos fisiológicos e em tipos celulares específicos, já que em células de neuroblastoma, como discutido acima, a interação p53-GR resulta apenas no seqüestro citoplasmático e não na degradação destas proteínas.

Alguns autores especulam que em outras situações fisiológicas e patológicas nas quais p53 é citoplasmático, como em carcinoma mamário inflamatório (Moll, Riou *et al.*, 1992), neuroblastomas indiferenciados (Moll, Laquaglia *et al.*, 1995), adenocarcinomas de cólon (Bosari, Viale *et al.*, 1995), oligodendrócitos diferenciados,

neurônios e células PC12 de feocromocitoma (Eizenberg, Faber-Elman *et al.*, 1996), GR possa servir de âncora para o seqüestro citoplasmático de p53. Estas observações evidenciam a potencial utilização terapêutica de moléculas capazes de quebrar a interação p53-GR, em diversas situações patológicas.

1.7.2. Repressão Transcricional

Além do seqüestro citoplasmático, p53 e GR podem modular a atividade um do outro ao nível transcricional. A primeira indicação da interação entre p53 e GR (e GCs) ao nível transcricional foi a demonstração de que p53 induz a atividade promotora de *sgk* (*Serum/Glucocorticoid inducible Serine/Threonine Protein Kinase Gene*), um membro da família das serina/treonina quinases que é transcricionalmente regulado por soro e GCs. Foram localizados quatro sítios de ligação a p53 no promotor de *sgk* e um destes sítios foi melhor caracterizado em relação a sua funcionalidade (Maiyar, Huang *et al.*, 1996). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que p53 e GR regulam a atividade do promotor de *sgk* coordenadamente. Em ensaios de “gel shift”, foi visto que p53 inibe a ligação de GR ao seu elemento responsivo no promotor de *sgk*, indicando um nível de regulação transcricional (Maiyar, Phu *et al.*, 1997).

Outro gene cuja regulação transcricional pode sofrer influência pela intercomunicação entre p53 e GR é *c-myb*. Em várias condições que induzem o estresse eritropoiético, como em hipóxia devida a altas altitudes, perda sanguínea e eritroleucemia, GCs induzem a proliferação de progenitores eritróides. As células progenitoras derivadas de fígado fetal de camundongos “knockout” para p53, proliferam melhor que as células de animais selvagens, na presença de Dex, indicando que p53 pode inibir o estresse eritropoiético. *c-myb*, necessário para a proliferação de ebl, é regulado por GR. Nestas células “knockout” para p53, a indução de *c-myb* por Dex é

significativamente maior do que em células selvagens, o que favorece a indução da proliferação, e não da diferenciação, por GC (Ganguli, Back *et al.*, 2002). Estes resultados mostram que a influência que a intercomunicação p53/GR exerce sobre o controle transcricional de *c-myb*, regulador fundamental da proliferação de ebls (Von Lindern, Zauner *et al.*, 1999), pode ser um evento importante na decisão de proliferação *versus* diferenciação.

Recentemente, foi descrita uma regulação transcricional direta de p53 sobre o promotor de GR. Através de ensaios de superexpressão, foi demonstrada a influência positiva do fator de transcrição Sp1 sobre a atividade promotora de GR, através de uma região rica em GC, proximal ao início de transcrição. Contudo, a expressão ectópica de p53 em hepatócitos humanos (células HepG2) inibiu a interação de Sp1 com seu elemento responsivo, através de algum mecanismo não elucidado, conseqüentemente reprimindo sua transativação do promotor de GR (Suehiro, Kaneda *et al.*, 2004). Apesar desta regulação ter sido mostrada em situação de superexpressão de ambos os fatores Sp1 e p53, certamente o controle da atividade promotora de GR por p53 deve ter implicações em diferentes processos fisiológicos.

1.7.3. Intercomunicação Positiva Entre p53 e GR

Apesar das várias evidências da interação negativa entre p53 e GR apresentadas acima, outros autores vêm mostrando que, em determinadas circunstâncias, p53 e GR podem atuar em sinergismo. A primeira evidência de sinergismo entre estas moléculas foi obtida com a demonstração de que GCs podem induzir a expressão gênica de *p21Waf1/Cip1/Sdi1* ou *CDKN1A* (referido nesta tese apenas como p21) através do recrutamento de múltiplos elementos transcricionais a um elemento responsivo a GR no promotor deste gene, em células de hepatoma (Cha, Cram *et al.*, 1998). Ainda, Dex é

capaz de estimular a atividade promotora de *p21* de forma independente do p53-RE localizado neste promotor (Cram, Ramos *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que, em determinados contextos fisiológicos, p53 e GR podem agir cooperativamente, amplificando a resposta celular.

Esta hipótese foi consolidada pela demonstração de que, em células A549 de carcinoma pulmonar, a parada no ciclo celular induzida por Dex, que envolve a regulação positiva de *p21*, é dependente da atividade de p53. Nestas células, o tratamento com Dex induz a fosforilação de p53, sem, contudo, alterar os níveis totais da proteína, resultando na parada do ciclo na fase G0/G1 (Urban, Golden *et al.*, 2003). A serina/treonina fosfatase PP5, cuja expressão é ubíqua em mamíferos e que se associa com uma variedade de proteínas, incluindo o complexo GR-HSP90 (Chen, Silverstein *et al.*, 1996), regula negativamente a atividade de GR e a fosforilação de p53 em células A549. Zuo *et al* propuseram um modelo molecular para explicar a relação entre p53 e GR durante indução da parada de crescimento da linhagem A549 por Dex. Estes autores sugerem que, uma vez ativado, GR promove a fosforilação de p53 através da indução de alguma quinase, que tenha p53 como substrato, ou diretamente, se a quinase for responsável a GR, ou de forma indireta, através da indução de uma cascata de fosforilação (Zuo, Urban *et al.*, 1999).

Evidenciando a participação de p53 na resposta anti-proliferativa mediada por GC nestas células, experimentos usando oligonucleotídeos antisense contra p53 mostraram que a inibição da expressão de p53 estava associada com: 1) um aumento na taxa de proliferação celular; 2) a diminuição da expressão basal de *p21* e 3) o bloqueio da indução de *p21* e da parada no ciclo celular por Dex. Ainda, a supressão da expressão de PP5 promoveu a fosforilação de p53 induzida por Dex (Urban, Golden *et al.*, 2003).

Assim, pode-se concluir que PP5 pode inibir a cascata de sinalização mediada por GR, que influencia a fosforilação de p53 e a expressão de p21.

A intercomunicação positiva entre GR e p53 também foi observada em uma situação fisiológica mais específica. Em neurônios do hipocampo, GR exerce um papel pró-apoptótico, como resposta a estímulos estressantes mediados por GCs (Reagan e Mcewen, 1997). Esta indução de apoptose é dependente de Bax, não sendo observada em ratos “knockout” para Bax tratados com GCs, e depende do balanço positivo entre os níveis protéicos de Bax e Bcl-2 que, nesta situação, parece ser mediado por p53, a qual tem seus níveis aumentados pelo tratamento com Dex (Reagan e Mcewen, 1997).

Na tentativa de elucidar melhor o envolvimento de p53 na resposta neuronal a GCs, Crochemore *et al* observaram que a linhagem HT-22 de neurônio de rato responde ao tratamento com Dex com uma intensa redução de proliferação, que envolve a parada das células na fase G1. Durante esta resposta a Dex, p53 e GR sofrem translocação nuclear rápida e concomitantemente, resultando na ativação de p53 e na indução de alguns de seus genes-alvo (*p21*, *Bax* e *Gadd45*), como eventos tardios (Crochemore, Michaelidis *et al.*, 2002). Estes relatos indicam que as vias de p53 e de GR podem atuar em sinergismo, durante respostas específicas a GCs, além de esclarecer, parcialmente, os mecanismos envolvidos na intercomunicação positiva entre p53-GR.

Diante desta divergência encontrada na intercomunicação entre p53 e GR e considerando sua aparente relevância para a resposta celular a GCs, pode-se ressaltar a necessidade de um maior entendimento da relação p53-GR como forma de se entender melhor o mecanismo de ação de GCs. Dentre os pontos mais importantes a serem elucidados, estão: 1) o que determina que estes fatores de transcrição atuem em alças regulatórias positivas ou negativas; 2) qual o preciso mecanismo que leva à ativação de

p53 por GCs; 3) qual a relevância de p53 na resposta antiproliferativa a GCs. Visando elucidar estas questões, foi adotado o modelo celular ST1/P7, apresentado a seguir.

1.8. O Modelo Celular C6/ST1/P7

Há décadas, nosso laboratório tem estudado o mecanismo envolvido na ação anti-proliferativa de GCs, usando o modelo celular ST1/P7 de glioma de rato. Este modelo é particularmente vantajoso para tentar definir qual o papel de p53 na ação de GCs, já que essas duas linhagens celulares foram isoladas a partir da linhagem C6, proveniente de um glioma de rato induzido quimicamente por metilnitrosouréia (Benda, Lightbody *et al.*, 1968), e apresentam respostas distintas a GCs (Valentini, Oliveira *et al.*, 1994; Armelin, Oliveira *et al.*, 1996; Valentini e Armelin, 1996). O tratamento com hidrocortisona (Hy) leva as células tumorais ST1 a um crescimento totalmente dependente de soro e ancoragem, com morfologia semelhante àquela de fibroblastos normais e incapacidade de gerar tumor quando injetadas em camundongos “nude”, caracterizando uma completa reversão fenotípica tumoral-normal tanto *in vitro* como *in vivo*. Já as células P7 são altamente resistentes ao tratamento hormonal (Armelin, Stocco *et al.*, 1983).

1.9. Glicocorticóides na Terapia de Gliomas

Hormônios glicocorticóides vêm sendo utilizados como adjuvantes no tratamento de gliomas há décadas (Gutin, 1975). Devido a sua potente ação antiinflamatória, promovem a redução do edema causado pelo tumor, diminuindo a pressão intracraniana e aliviando a dor de cabeça, reduzindo traumas pós-operatórios e impedindo sua progressão (Freshney, 1984). Apesar da relevância do seu uso como tratamento de suporte, o estudo da ação de GCs diretamente sobre as células tumorais

tem trazido resultados contraditórios e, por vezes, conflitantes em relação ao seu benefício clínico.

Neste sentido, é de grande importância ressaltar a ação citoprotetora de Dex, o principal glicocorticóide usado no tratamento de suporte em gliomas, sobre células em cultura tratadas com uma diversidade de agentes quimioterápicos, muitos dos quais empregados na terapia de gliomas. Já foi demonstrado o efeito anti-apoptótico promovido por Dex quando células de glioma foram expostas a vincristina, citarabina, metotrexato, adriamicina, ACNU, teniposida (VM-26), stauporina, camptotecina, etoposida e taspigargina, por exemplo (Weller, Schmidt *et al.*, 1997; Gorman, Hirt *et al.*, 2000; Ni Chonghaile, Concannon *et al.*, 2006). Ainda não é totalmente conhecido o mecanismo pelo qual Dex promove esta citoproteção, mas há indícios de que o gene anti-apoptótico *Bcl-X* esteja envolvido neste processo, já que sua expressão é induzida pelo tratamento com Dex em duas linhagens de glioma estudadas, sendo uma humana (D384) e outra murina (C6) (Weller, Schmidt *et al.*, 1997; Gorman, Hirt *et al.*, 2000; Ni Chonghaile, Concannon *et al.*, 2006).

Além desta citoproteção a quimioterápicos já usados rotineiramente, especula-se que Dex pode inibir a ação de novas terapias para glioma que ainda estão em fase de estudos clínicos, como no caso da terapia gênica utilizando a timidina quinase do “Herpes Simplex Virus” (HSV-tk) e ganciclovir (GSV). Esta terapia experimental se baseia na sensibilização de células que superexpressam a timidina quinase de HSV, via transfecção ou infecção, à droga antiviral ganciclovir, um análogo de nucleotídeo. A TK de HSV é capaz de monofosforilar o ganciclovir, o que induz subseqüentes bi- e trifosforilações do ganciclovir por proteínas quinases endógenas, permitindo a incorporação da droga no DNA das células em replicação, promovendo a parada no ciclo e apoptose destas células (Moolten, 1986; Rubsam, Davidson *et al.*, 1998; Craperi,

Vicat *et al.*, 1999). Uma das principais vantagens deste sistema é que a fosforilação do ganciclovir pode induzir apoptose não apenas nas células transduzidas e expostas à droga, mas também em suas células vizinhas. A transferência da forma fosforilada de ganciclovir para as células adjacentes, por meio de junções “gap”, é chamada de efeito “bystander” e promove um alcance do sinal suicida em um número de células muito maior do que as que são transduzidas pela HSV-tk (Mesnil, Piccoli *et al.*, 1996; Ishii-Morita, Agbaria *et al.*, 1997).

Apesar do entusiasmo com os resultados dos primeiros testes clínicos avaliando a eficácia da terapia gênica com HSV-tk/ganciclovir em gliomas, um teste clínico de fase 3 de larga escala não demonstrou benefício algum em relação à sobrevivência de pacientes com gliomas (Rainov, 2000). Entre outras possíveis hipóteses para este insucesso está o uso de glicocorticóides concomitantemente à terapia. De fato, quando o efeito de Dex sobre a eficácia desta terapia gênica foi avaliado em linhagens de glioma em cultura, foi demonstrado que Dex inibe o efeito “bystander” por comprometer a comunicação celular via junções “gap”, por modular negativamente as vias apoptóticas induzidas por ganciclovir e por inibir a proliferação de algumas das linhagens estudadas, limitando a incorporação do fosfo-ganciclovir ao DNA (Robe, Nguyen-Khac *et al.*, 2005).

Outros autores estudaram mais extensivamente a influência de GCs sobre o controle da proliferação de células de glioma em cultura, que apresentaram respostas tanto pró- quanto anti-proliferativas aos hormônios. Entre os fatores determinantes do tipo de respostas apresentadas por algumas das linhagens utilizadas, pode-se ressaltar: a) o período de tempo e a estratégia de exposição ao GC (Kaup, Schindler *et al.*, 2001); b) a concentração do GC administrado (Pinski, Halmos *et al.*, 1993; Kaup, Schindler *et al.*, 2001); c) o nível de expressão e a atividade de GR (Langeveld, Van Waas *et al.*, 1992;

Zibera, Gibelli *et al.*, 1992; Pinski, Halmos *et al.*, 1993). Langeveld e colaboradores relacionaram a maior expressão de GR à maior indução de proliferação quando compararam a resposta de linhagens celulares e culturas primárias de gliomas a GCs. Além disso, mostraram que esta resposta pró-proliferativa é dependente de GR (Langeveld, Van Waas *et al.*, 1992). De forma semelhante, quando Pinski *et al* e Zibera *et al* trataram as linhagens U87MG e HU197, respectivamente, com antagonistas de GR, observaram a inibição do efeito pró-proliferativo de Dex sobre estas células (Zibera, Gibelli *et al.*, 1992; Pinski, Halmos *et al.*, 1993).

Algumas linhagens de glioma apresentam uma redução na proliferação quando tratadas com GCs, entre elas: A172, T98G, 86HG39 (humanas) e C6 (murina) (Grasso, Johnson *et al.*, 1977; Armelin, Stocco *et al.*, 1983; Kaup, Schindler *et al.*, 2001). Naturalmente, a divergência na resposta de gliomas a GCs, em relação à proliferação, ainda deve variar de acordo com a natureza do tumor (primário ou secundário) e o estadio em que o tumor se encontra. Levando em consideração todos estes fatores apresentados, um uso mais racional de glicocorticóides no tratamento adjuvante de gliomas tem sido proposto.

1.10. O Modelo C6/ST1/P7 no Estudo da Função de TP53 na Ação Antiproliferativa de GCs

Dados anteriores do nosso laboratório sugeriam o envolvimento de p53 na resposta de células ST1 a Hy, como a indução do acúmulo das células na fase G0/G1 do ciclo celular (Mercado, 1997) e o aumento da expressão de alguns genes-alvo de p53, como *trombospondina-1 (tsp-1)* e *Ciclina G (CycG)* (Vedoy e Sogayar, 2002). A partir destas informações, este trabalho tem a proposta de analisar qual a relevância de p53 na resposta antiproliferativa das células ST1 a GCs. Este estudo deve trazer maiores esclarecimentos sobre a relevância da interação funcional entre p53 e GCs durante a resposta antiproliferativa de células tumorais a hormônios glicocorticóides.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Soluções e meios de cultura para células de mamífero

- ◆ DMEM: "Dubellco's Modified Eagle Medium" (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA).
- ◆ SFB: Soro fetal bovino (Cultilab Materiais para Cultura de Células, Campinas, São Paulo).
- ◆ SFB HyClone (Gibco)
- ◆ *PBSA (Tampão Salina Fosfato sem Ca^{2+} e Mg^{2+}), pH 7,2*
137mM NaCl; 2,7mM KCl; 8,0mM Na_2HPO_4 ; 1,4mM KH_2PO_4
- ◆ Tripsina (ICN Pharmaceuticals Inc., Cleveland, USA; Gibco Limited, Scotland, UK).

2.2. Linhagens celulares

- ◆ C6: linhagem derivada de células de um glioma de rato induzido por metilnitrosouréia, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC).
- ◆ P7: clone derivado de células C6 de glioma de rato, não responsivo ao tratamento com hidrocortisona, transformado e tumorigênico.
- ◆ ST1: clone derivado da linhagem C6 de glioma de rato, hipersensível ao hormônio glicocorticóide, transformado e tumorigênico.
- ◆ 293T: linhagem estabelecida a partir de células de rim humano (derivada de HEK), expressa o antígeno LT de SV-40 e apresenta alta eficiência de transfecção, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC).
- ◆ Phoenix-Eco: linhagem empacotadora ecotrófica humana derivada de HEK-293, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC).

- ◆ Am12: linhagem empacotadora derivada de fibroblastos NIH-3T3 que super-expressa o gene *env* anfitriónico, gentilmente cedida pelo grupo da Dra. Luisa Lina Villa (Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, branch São Paulo).
- ◆ Saos2: linhagem celular derivada de um osteosarcoma humano, sendo $p53^{-/-}$ e $Rb^{-/-}$, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC).
- ◆ T98G: linhagem celular derivada de um glioblastoma multiforme humano, altamente invasiva, tendo ambos os alelos de $p53$ mutados, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC).
- ◆ A172: linhagem celular derivada de um glioblastoma humano, menos invasiva que a anterior, possuindo um alelo mutado para $p53$ e o outro selvagem, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC).
- ◆ U-87 MG: linhagem celular derivada de um glioblastoma humano, possuindo ambos os alelos de $p53$ selvagens, adquirida da American Type Culture Collection (ATCC).
- ◆ HCT116 $p53^{+/+}$: linhagem de carcinoma de cólon humano apresentando $p53$ selvagem, gentilmente cedida pelo Dr. Pierre Hainaut (IARC – FR).
- ◆ HCT116 $p53^{-/-}$: linhagem estabelecida pelo grupo do Dr. B. Vogelstein **ref** derivada da linhagem HCT116 $p53^{+/+}$, mas sendo nula para $p53$, gentilmente cedida pelo Dr. Pierre Hainaut (IARC – FR).

2.3. Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram mantidas em frascos plásticos descartáveis em DMEM suplementado com 0,2; 5; ou 10% de SFB, 1,2 g/L de bicarbonato de sódio, 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina, em atmosfera de 2,5% CO₂/95% ar para manutenção do pH próximo ao fisiológico, 37°C. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiam entre 60% e 80% da densidade de saturação. Para tal, o meio de cultura foi removido, as células lavadas uma vez, com PBSA e, então, a cultura foi tripsinizada (0,1% tripsina em PBSA contendo 1mM EDTA).

2.4. Congelamento e descongelamento das linhagens celulares

2.4.1. Congelamento

As culturas celulares foram lavadas 1x com PBSA, tripsinizadas e as células foram ressuspensas em 2mL de 10%SFB-DMEM, para inativar a tripsina, e sedimentadas a 1.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em meio 10% DMSO - 10% SFB-DMEM, de modo que a concentração celular estivesse entre 1-2x10⁶ células/mL. Essa suspensão de células foi transferida para ampola de congelamento (NUNC) e incubada por 30 minutos a 4°C. Após esse período a ampola foi transferida para -80°C onde permaneceu por 24h antes de ser transferida para o reservatório de nitrogênio líquido.

2.4.2. Descongelamento

A ampola contendo a cultura celular de interesse foi retirada do nitrogênio líquido e colocada em banho a 37°C. Logo após o descongelamento do conteúdo da ampola, a suspensão de células foi homogeneizada cuidadosamente e transferida para frascos de cultura contendo 10% SFB-DMEM. As culturas celulares foram mantidas a 37°C em atmosfera 5% CO₂/95% ar para adesão das células. Após adesão, o meio foi trocado para 5% ou 10% SFB-DMEM, de maneira que as células permanecessem o menor tempo possível em contato com o DMSO, já que este é tóxico para as mesmas.

2.5. Western blot

2.5.1. Obtenção de extratos protéicos nucleares e citoplasmáticos

Células foram plaqueadas em placas de 150 mm de diâmetro (P150) e os devidos tratamentos foram feitos em determinados tempos antes da lise. As células foram lavadas 2 vezes com PBSA gelado, raspadas com o auxílio de um "cell scraper", transferidas para um tubo cônico e centrifugadas a 234xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuspendido em 200µl de solução hipotônica e deixado no gelo por 10min. As células foram lisadas por adição de Nonidet P-40 (0,1%) e agitação em vortex por 30seg. A suspensão foi centrifugada a 20.000xg por 30seg. O sobrenadante, contendo a fração citoplasmática foi guardado. O "pellet" contendo os núcleos foi cuidadosamente lavado com solução hipotônica. Os núcleos foram ressuspendidos em 80µl de solução de extração nuclear e incubados por 30min. A suspensão de núcleos foi centrifugada a 18.000xg por 30min, a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas nucleares foi armazenado a -70°C.

2.5.2. Fracionamento de proteínas em SDS-PAGE e transferência para membrana de PVDF

Para a resolução das proteínas obtidas, 60µg do extrato protéico citoplasmático e 50µg do extrato protéico nuclear de cada amostra, tipicamente, foram misturados ao tampão de amostra cinco vezes concentrado, fervidos por 5min e resolvidos em gel 10, 12 ou 15% SDS-PAGE, de acordo com a proteína em questão. As corridas foram feitas à amperagem constante de 15mA (gel de empilhamento) e 30mA (gel de separação). Após a corrida, os géis foram colocados em tampão de transferência e as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de PVDF ou nitrocelulose por eletroforese, em cuba úmida (Biorad). No caso das membranas de PVDF, estas foram previamente ativadas pela incubação com MetOH por 5seg, seguido por lavagem em água MiliQ por 5min. As membranas foram equilibradas em tampão de transferência durante 15min antes da transferência. Após a transferência, as membranas foram coradas com o corante Ponceau-S para localização das proteínas transferidas e, em seguida, descoradas com água destilada.

2.5.3. Imunorreação e revelação

Os sítios inespecíficos da membrana de PVDF (ou nitrocelulose) foram bloqueados com 5% leite-TBST por 1h, sob agitação. A membrana foi, então, lavada com TBST (4x 10min, temperatura ambiente, sob agitação) e incubada com os anticorpos primários, mono ou policlonais, de interesse, em 5% BSA-TBST, “overnight” a 4°C, sob agitação. As diluições empregadas para cada anticorpo estão apresentadas na sessão “reagentes”. Novamente a membrana foi lavada (4x 10min com TBST, sob agitação) e, então, incubada com o anticorpo secundário específico para IgG de camundongo ou de coelho (dependendo da origem do anticorpo primário), conjugado

com HRP (Vector), na diluição de 1:1000 em 5% leite-TBST por 1h, sob agitação. Após lavagem de 4x 10min com TBST, sob agitação, foi adicionado à membrana o substrato da peroxidase do Kit ECL Plus (GE Health Care) por 5min. A revelação da membrana foi feita através de um aparelho Phosphor Imager, STORM (GE Healthcare).

2.6. Preparação de bactérias eletrocompetentes

Inoculou-se 400mL de meio LB com 1/100 de volume de uma pré-cultura de *E coli* crescida a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, por 16h. As bactérias foram crescidas a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, até $OD_{600nm} = 0,8$ (antes da fase log). Após alcançada a densidade óptica de 0,8 a cultura foi transferida para o gelo onde foi mantida até o final do processo. Esta cultura foi centrifugada (2500xg, 15min, 4°C) e as bactérias sedimentadas foram ressuspensas em 200mL de H₂O gelada. A suspensão foi novamente centrifugada (2.500xg, 15min, 4°C) e o sedimento de bactérias foi ressuspensado em 200mL de H₂O gelada. Seguiu-se mais uma centrifugação e o sedimento foi lavado mais duas vezes com 10% glicerol gelado, nas mesmas condições das lavagens anteriores. Por último, o sedimento de bactérias foi, então, ressuspensado em um pequeno volume de 10% glicerol gelado, de modo que a OD_{600nm} estivesse entre 100 e 200, sendo que uma densidade de 10 unidades corresponde à cerca de $4-8 \times 10^9$ bactérias por mL. Esta suspensão de bactérias eletrocompetentes foi congelada a -80°C em alíquotas de 50µL.

2.7. Transformação de bactérias *Escherichia coli* com DNA plasmideal por eletroporação

O DNA plasmideal de interesse (1 a 50ng) foi adicionado a uma alíquota de 50µl de bactérias eletrocompetentes. Para transformação, estas bactérias eletrocompetentes com DNA plasmideal, foram transferidas para uma cubeta de eletroporação (gap 2mm). A cubeta foi deixada em gelo por alguns minutos. O eletroporador (EC100 Eletroporator) foi ajustado, conforme o manual do aparelho, para 2.500V. Colocou-se a cubeta no eletroporador e após a aplicação de um pulso, adicionou-se imediatamente às bactérias 1mL de meio LB. As bactérias foram incubadas a 37°C por 1h, sob agitação (agitação a 225rpm favorece a recuperação das bactérias). Por fim, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-A contendo 75µg/mL ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16-20 horas.

2.8. Preparação de DNA plasmideal a partir de bactérias transformadas

Uma colônia bem isolada de cada placa de bactérias transformadas, com os respectivos vetores, foi inoculada em 3mL de meio LB contendo 75µg/mL ampicilina e incubada a 37°C, sob agitação de 200-250rpm, por 16h. Um inóculo (1/100) destas pré-culturas foi crescido em 50mL de meio LB contendo ampicilina (75µg/mL) nas mesmas condições anteriores. Para a preparação dos DNAs plasmideais, em média escala, utilizou-se o de midi-prep da Qiagen. Os DNAs foram quantificados por espectrofotometria a 260nm, sendo que uma OD₂₆₀ de 1 corresponde a 50µg/mL de DNA. A pureza desses DNAs foi estimada utilizando-se a relação 260nm/280nm, considerando-se uma pureza satisfatória uma relação 260nm/280nm de, pelo menos, 1,8. A identidade dos DNAs foi analisada através de digestões com enzimas de restrição apropriadas e eletroforese em gel 0,8% agarose, 1X TBE. Como padrão de peso molecular foi usado 1Kb DNA Ladder (GE Healthcare ou MBI Fermentas).

2.9. Transfecção transitória e ensaio de luciferase

2.9.1. Ensaio de luciferase

As linhagens celulares foram plaqueadas ($2,5 \times 10^5$ células/poço) em placas de 24 poços (10mm de diâmetro) um dia antes da transfecção. Os vetores plasmidiais foram transfectados utilizando carreadores lipossomais. Passadas 24hs da transfecção, o meio de cultura foi renovado e o agente específico foi adicionado às respectivas condições e após 24hs adicionais, as células foram lisadas com a solução de lise PLB (Passive Lysis Buffer – PROMEGA) e a atividade dos genes repórter luciferase e Renilla luciferase foi medida em um luminômetro de placa, utilizando o sistema Promega (Dual-Luciferase Reporter Assay System). Cada experimento foi realizado em duplicata, num número mínimo de dois experimentos independentes.

2.9.2. Método de transfecção com Lipofectamina 2000 (Invitrogen)

Por poço a ser transfectado, um total de 0,8 μ g de DNA foi usado, dos quais 0,15 μ g do vetor pRL-TK e 0,65 μ g de p53-luc ou p21-luc. Para cada poço a ser transfectado, a Lipofectamina 2000 (2 μ l) foi diluída em 50 μ l de DMEM sem SFB e, após incubação por 5min, foi adicionada aos vetores previamente diluídos em 50 μ l de DMEM sem SFB. Os complexos DNA-lipossomo foram formados por 20min e o volume total foi adicionado a cada poço, contendo 500 μ l de DMEM, suplementado com a quantidade de SFB apropriada para o cultivo de cada linhagem.

2.10. Clonagem das seqüências de siRNA para p53 murino

2.10.1. Clonagem dos siRNAs para p53 murino em fusão ao promotor H1.

Foram escolhidas 5 seqüências potenciais de siRNA para p53 murino, com base nos critérios utilizados no programa “siRNA finder”, disponível no endereço da empresa Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html). Os óligos F utilizados, contendo estas seqüências para os siRNAs, continham também uma seqüência específica para o promotor H1. Foi usado como “template” para a reação de PCR um vetor plasmideal pSUPER-LIKE, no qual havia sido clonado o promotor H1. Este vetor contém uma seqüência T3, possibilitando o uso de um iniciador T3 reverso para a amplificação do promotor H1. Para obter uma menor taxa de mutação no produto da PCR, fui utilizado o mix de enzimas Triple Master (Fermentas), com o tampão High Fidelity. As condições da PCR estão descritas a seguir:

	Volume (μ l)
H ₂ O:	70,2
10x HiFi Buffer:	10
10mMdNTP (10mM):	5
iniciador F (10 μ M):	5
iniciador R (10 μ M):	5
Triple Master (5U/ μ l):	0,8
Template (0,2ng/ml)	4
TOTAL:	100

PROGRAMA

93°C 3MIN
93°C 30SEG
60°C 40SEG
72°C 1MIN
Go to step 2 34x
72°C 10MIN
4°C FOREVER

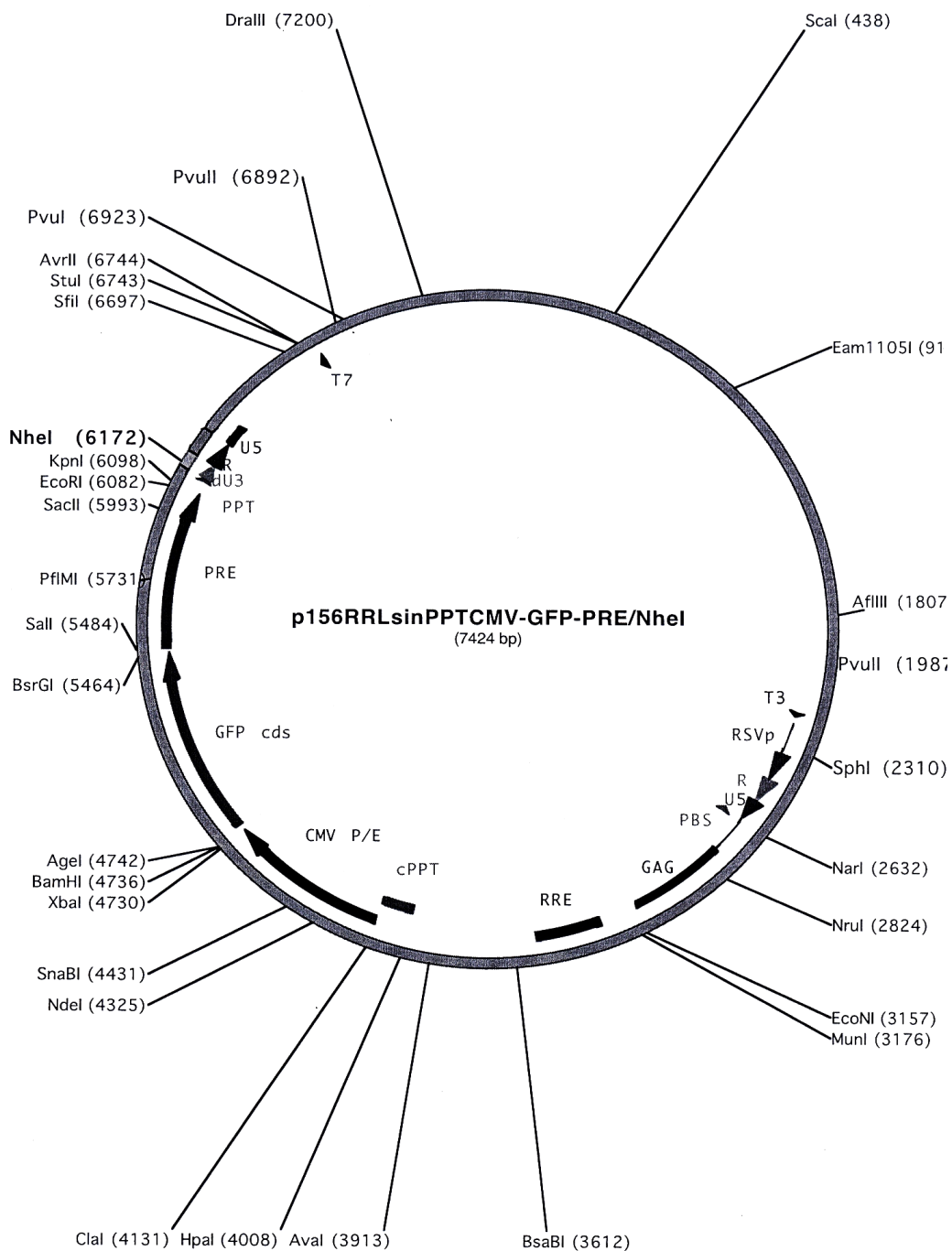
O produto da amplificação foi resolvido em gel 2% agarose, recortado do gel preparativo e purificado com coluna de gel de sílica do kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e digerido com a enzima XbaI. Após digestão, o produto foi re-purificado com o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e passado em coluna Micro-spin S400 (GE Healthcare).

O vetor lentiviral p156RRLsinPPTCMV-GFP-PRE/NheI (nomeado nesta tese de pLV) foi linearizado através de digestão com a enzima NheI e purificado a partir de gel de agarose 0,8% preparativo com coluna de gel de sílica do kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Após desfoforilação com a enzima CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase), o produto de PCR e o vetor foram concentrados juntos em “SpeedVac”. Vetor linearizado e inserto foram então ligados com ligase, num volume de reação de 20µl. Cerca de 2µl desta reação foi usada para transformar bactérias XL1-Blue eletrocompetentes, como descrito acima.

Iniciadores F, contendo as seqüências dos siRNAs para p53 murino, utilizados para amplificar o promotor H1:

LV-5	CTGTCTAGACAAAAAGTACATGTGCAACAGCTCC tctcttgaaGGAGCTGTTGCACATGTAC GGGGATCTGTGGTCTCATACA
LV-7	CTGTCTAGACAAAAA CCACTCGATGGAGAATATT tctcttgaa AATATTCTCCATCGAGTGG GGGGATCTGTGGTCTCATACA
LV-8	CTGTCTAGACAAAAA CTTACCAAGGCAACTATGG tctcttgaa CCATAGTTGCCTTGGTAAG GGGGATCTGTGGTCTCATACA
Amb6	CTGTCTAGACAAAAA CTGTCATGGAGGATTCACA tctcttgaa TGTGAATCTCCATGACAG GGGGATCTGTGGTCTCATACA
Shag17	CTGTCTAGACAAAAA TCGGCTCCGACTATACCACTAT tctcttgaa ATAGTGGTATAGTCCGAGCCGA GGGGATCTGTGGTCTCATACA

Os óligos desenhados contêm um sítio para digestão com a enzima XbaI (sublinhado), antecedendo uma seqüência de pelo menos 4 adenosinas, servindo como sinal de poliadenilação para a RNA Polimerase III. As seqüências “sense” e “anti-sense” de siRNA para p53 estão em itálico, intercaladas por uma seqüência para a formação do “hairpin” na estrutura secundária do siRNA, seguida pela seqüência específica para o promotor H1, sendo que as seqüências estão no sentido 5’-3’. O mapa do vetor lentiviral p156RRLsinPPTCMV-GFP-PRE/NheI está representado abaixo:



2.10.2. Análise dos clones recombinantes por PCR de colônia

Na reação de PCR para checar os clones recombinantes foram usados os iniciadores U3-F e U3-R, que flanqueiam o sítio NheI no vetor e cujo produto da amplificação tem cerca de 350pb. Foram crescidas 50 colônias de bactérias transformadas com cada ligação em placa de 96 wells contendo 100µl de meio LB com 75µg/ml ampicilina. Foram usados 0,2µl de cada ligação como controle positivo e, com cada colônia, foi feito um esfregaço na placa de PCR. As condições da PCR estão descritas a seguir:

	50 reações (µl)
H2O	750
10x Buffer NH4	100
MgCl2 25mM	60
dNTP	50
Iniciador F (10 µM)	15
Iniciador R (10 µM)	15
Taq fermentas	10
Total	1000

PROGRAMA

93°C 3MIN
93°C 30SEG
60°C 40SEG
72°C 1MIN
Go to step 2 34x
72°C 10MIN
4°C FOREVER

Seqüência dos iniciadores usados na PCR de colônia:

U3-F: 5' - CAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCC - 3'

U3-R: 5' - GATCTTGTCTTCGTTGGGAGTG - 3'

2.10.3. Análise dos clones recombinantes por digestão com SspI

Para confirmação da clonagem dos siRNAs no vetor pLV, foram feitas preparações de DNA, seguido por digestão com SspI, dos clones recombinantes que tiveram seus insertos amplificados pela PCR de colônia. A digestão dos clones recombinantes com SspI deveria gerar dois produtos, um de cerca de 6Kpb e o outro com cerca de 1,4Kpb. A reação de digestão, descrita a seguir, foi incubada a 37⁰C por 1h. O produto da digestão foi resolvido em gel de agarose 0,8%.

Template (Miniprep)	20µl
10x SspI Buffer	3µl
SspI (5U/µl)	2µl
H2O	5µl
Total	30µl

2.11. Infecção por lentivírus

2.11.1. Vetores utilizados

Os vetores usados para a produção viral foram gentilmente cedidos pelo Dr. Inder Verma (Salk Institute for Biological Studies - CA), exceto os vetores pLV construídos no laboratório, contendo seqüências de siRNA desenhadas especificamente para *TP53* de rato:

Vetores estruturais:

- pMDL – vetor codificante para as seqüências gag e pol
- pREV – vetor codificante para a proteína Rev, responsável pela exportação do RNA viral para fora do núcleo
- pVSVG – vetor codificante para a proteína VSVG do envelope viral

Vetores lentivirais:

- pLV-Hp53si - vetor lentiviral contendo um “hairpin” para p53 humano
- pLV-Amb6, -Shag17, -5, -7 e -8 - vetores lentivirais contendo um “hairpin” para p53 murino
- pLV-siEGFP - vetor lentiviral contendo um “hairpin” para EGFP

Este sistema de empacotamento viral emprega a formação do envelope viral heterólogo VSVG (“vesicular stomatitis virus G glicoprotein”), que apresenta alta capacidade de infecção em uma vasta diversidade de células. O vetor pMDL codifica as proteínas gag e pol e o vetor pREV codifica a proteína rev, que regula a expressão lentiviral ao nível pós-transcricional.

2.11.2. Produção viral

Células 293T foram plaqueadas ($\sim 10^7$ células/placa) em placas p150, previamente embebidas com Poly-L-Lysina por 15min, e mantidas em meio DMEM 10% soro HyClone, na ausência de antibióticos. No dia seguinte, os seguintes plasmídeos foram usados para transfectar as células 293T, na seguinte proporção:

- pMDL	3,3 μ g
- pREV	1,3 μ g
- pVSVG	1,8 μ g
- pLV	5 μ g

No total, 11,4 μ g de DNA e 20 μ l de lipofectamina 2000 foram utilizados para cada transfecção (descrita no item transfecção transitória). O meio utilizado durante a transfecção foi DMEM 10% soro HyClone, na ausência de antibióticos. Após 5h do início da transfecção, o meio de cultura foi substituído por 15ml DMEM 10% HyClone, adicionado de antibióticos. O meio de cada condição (suspensão viral) foi, então, coletado a cada 24h, filtrado em filtro de 0,45 μ m para a retirada de debris celulares, aliquoteado e congelado a -70°C.

2.11.3. Titulação viral

Células 293T foram plaqueadas em placas de 6 wells (10^5 células/well). No dia seguinte, o meio de cultura foi substituído por 2ml de DMEM 10%SFB contendo diluições seriadas da suspensão viral (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Após 48h, o meio foi retirado das placas e foi adicionado PBSA. As células foram então observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon TE-300) com filtro para o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína

(FITC). Na maior diluição da suspensão viral (10^{-4}) já foi possível visualizar colônias expressando EGFP. Nesta condição, todas as colônias da placa de 6 wells ($10\text{cm}^2/\text{well}$) foram contadas.

Para o cálculo do título viral, o número de colônias verdes contadas foi multiplicado pelo inverso do fator de diluição da suspensão viral ($1/10^{-4}$), multiplicado pela diluição inicial da suspensão ($5x$). Desta forma, foi determinado o nível de unidades infecciosas (IU – “infection units”) por ml da suspensão viral (IU/ml). Cada unidade infecciosa se refere à mínima quantidade viral capaz de produzir uma infecção numa célula suscetível.

Para a infecção das células de interesse, foi levado em conta o MOI (“multiplicity of infection”) de cada condição. O MOI representa a relação entre unidades infecciosas e a quantidade de células disponíveis para a transdução (IU/número de células). Ou seja, para um MOI de 1, deve haver uma unidade infecciosa por célula a ser transduzida. Entretanto, na prática, dificilmente a população celular inteira é transduzida utilizando um MOI de 1.

2.11.4. Infecção celular por lentivírus

Células ST1 foram plaqueadas em placas de 12 wells (3×10^4 células/well) e, no dia seguinte, foram adicionados determinados volumes de suspensão viral, de acordo com o MOI desejado (100 a 200). As populações celulares foram re-infectadas 2 vezes, num intervalo de 24h e, então, foram expandidas, congeladas e plaqueadas para os respectivos experimentos.

Para o enriquecimento da população para células EGFP positivas, quando necessário, as células foram submetidas a um “sorting” pelo FACS Advantage (BD

Biosciences), localizado no laboratório da Prfa. Maristela Martins de Camargo (ICB-IV). O critério de separação foi o nível de fluorescência emitida pelas células, proporcional à expressão de EGFP. Assim, os 30% das células das populações transduzidas que expressavam maior nível de EGFP foi separado e mantido em cultura para os experimentos devidos.

2.12. Produção e infecção pelos retrovírus pLXSN e pLXSN-16E6

2.12.1. Produção dos retrovírus recombinantes em células 293T e Am12

O vetor retroviral pLXSN e seu derivado pLXSN-16E6, que contém um cassete de expressão de E6 de HPV-16, foram usados para transfectar células Phoenix-eco, linhagem empacotadora ecotrópica humana derivada de HEK-293. O vetor pLPCX-EGFP, que medeia a expressão do gene-repórter EGFP, foi usado em paralelo para avaliar a eficiência de produção e transdução viral. Os sobrenadantes virais resultantes, contendo partículas virais ecotrópicas, foram usados para infectar a linhagem Am12, derivada de fibroblastos NIH-3T3 que superexpressa o gene *env* Ampho, responsável pela formação do envelope viral anfotrópico. Desta forma, ocorre uma mudança do envelope viral, de eco pra anfotrópico.

Uma vez transduzidas, as células foram selecionadas com 0,8mg/ml G418 (Geneticina) por um período de duas semanas, já que o vetor pLXSN e seu derivado possuem o gene *Neo*, conferindo resistência a neomicina. As populações resultantes são linhagens empacotadoras estáveis, produtoras de altos títulos virais.

2.12.2. Transdução de células ST1 com vetores retrovirais

Os sobrenadantes virais provenientes das linhagens empacotadoras derivadas de Am12 foram, então, utilizados para a transdução de células ST1. Um alto título viral foi alcançado através deste procedimento, sendo que se obteve a transdução da totalidade das células ST1, avaliada através da expressão do gene-repórter EGFP, sob microscópio de fluorescência. Após a transdução viral, as células foram submetidas a duas semanas de seleção com 1mg/ml G418, sendo então expandidas, congeladas e plaqueadas para os devidos experimentos.

2.13. Ensaios de Q-PCR

2.13.1. Preparação de RNA total

5×10^5 células foram plaqueadas em placas P60. Após os devidos tratamentos, as células foram lisadas em solução de lise (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM pH7, e betamercaptoetanol 0,1M). O RNA foi purificado a partir lisado em membrana de gel de sílica, pelo kit de purificação de RNA total RNeasy mini-kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Após a quantificação espectrofotométrica, a qualidade do RNA foi avaliada, também, em gel agarose-formaldeído.

2.13.2. Síntese da primeira fita do cDNA

Amostras de RNA total foram utilizadas como “template” para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa. Alíquotas de 1µg de RNA total foram submetidas a tratamento prévio com 2µl de DNase I (1U/µl, Fermentas) em solução contendo 2µl de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Invitrogen) e

0,5µl de RNase OUT™ (40U/µl, Invitrogen) em volume final de 10µl. O tratamento ocorreu através de incubação de 10min a 37°C. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada a 75°C por 10min. Para cada amostra de RNA previamente tratado foram preparadas reações contendo 0,5µl de Oligo dT (0,5µg/µl, Invitrogen), 0,5µl de “Random Primer” (100ng/µl, Invitrogen) e 1µl de dNTP (10mM, Invitrogen) para um volume final de 12µl. As amostras foram incubadas a 75°C por 10min para desnaturação das moléculas e, em seguida, adicionou-se 7µl de uma solução contendo 2µl de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Invitrogen), 2µl de DTT (0,1M, Invitrogen), 0,5µl de RNase OUT™ (40U/µl, Invitrogen) e 2,5µl de água Milli-Q® para um volume final de 19µl. Houve uma nova incubação de 25°C por 10min, para anelamento dos iniciadores, 42°C por 2min e, então, foi adicionado 1µl da enzima SuperScript™ III (200U/µl, Invitrogen). A reação de transcrição reversa ocorreu durante incubação a 42°C por 2h e, em seguida, inativada a 72°C por 10min. Visando degradar o RNA, foi adicionado 1µl de RNase H (5U/µl, Fermentas) em cada tubo e os tubos foram incubados a 37°C por 30min, seguidos de uma incubação a 72°C por 10min para inativação da enzima. Posteriormente, as amostras, em volume final de 20µl, foram diluídas 3x em tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0).

2.13.3. Desenho dos óligos iniciadores

Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes nos experimentos de Q-PCR foram desenhados com o auxílio do programa computacional “Primer Express” versão 2.0 (Applied Biosystems). As principais características dos oligos desenhados pelo programa são: amplificar fragmentos cujo tamanho varie entre 50-150bp, apresentar quantidade de CG entre 30 e 80%, não possuir a capacidade de formação de dímeros ou de estrutura secundária, apresentar temperatura de anelamento entre 58°C e

60°C de acordo com o algoritmo “nearest neighbor” (Breslauer, Frank *et al.*, 1986). Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, os pares de iniciadores foram desenhados em exons diferentes do gene.

2.13.4. Reação de Q-PCR

Para a quantificação do produto formado durante a reação de Q-PCR foi utilizado o reagente SYBR® Green Dye (Applied Biosystems). O corante SYBER®Green possui afinidade pela “minor groove” da dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520nm, entretanto, quando se liga à dupla fita de DNA, a fluorescência aumenta cerca de 100x, permitindo então a detecção do produto do PCR em tempo real. O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa computacional GeneAmp 5700 (Applied Biosystems).

Todas as reações de Q-PCR foram realizadas em duplicata. Como “template”, foram utilizados 3µl do cDNA sintetizado anteriormente, diluído 30x em TE, 3µl do conjunto de iniciadores na concentração final previamente determinada e 6µl do reagente SYBER®Green Dye.

Todas as amplificações utilizando cDNAs das linhagens celulares como “template” foram realizadas no termociclador GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As reações foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 min (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase, AmpEraser), 95°C por 10 min (etapa de ativação da enzima DNA Polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C de 15 seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 min (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do amplicon).

A especificidade do sinal obtido foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado. O corante SYBR® intercala inespecificamente em DNA dupla-fita. Assim, a presença de amplificação inespecífica e contaminações, além da formação de dímeros de iniciadores, poderiam interferir na intensidade de fluorescência medida pelo aparelho. Para avaliar a especificidade das reações de amplificação e detectar a presença de eventual contaminação, uma reação de dissociação do produto amplificado é realizada ao término de cada reação. A temperatura da amostra é elevada gradativamente e a intensidade da fluorescência é medida. Quando a temperatura da amostra atinge a temperatura de desnaturação (TM) do produto amplificado, o mesmo se desnatura e o corante se dissocia do DNA, diminuindo a intensidade da fluorescência detectada pelo aparelho. A partir dos dados de fluorescência uma curva de dissociação do produto é gerada. Como produtos de diferentes tamanhos e composição de bases apresentam diferentes TMs, esta curva possibilita a distinção entre diferentes produtos amplificados na reação, a presença de amplificação no controle negativo e a formação de dímeros de iniciadores.

Na análise inicial dos dados, realizada através do programa GeneAmp 5700, definiu-se um “threshold” na fase exponencial de amplificação do gene. Assim que foi estabelecido o “threshold”, a partir da intersecção deste com a curva de amplificação obteve-se o Ct da amostra (“Threshold cycle”, ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do “background”). Desta forma, para determinação do Ct de cada reação foi determinado manualmente um ponto de corte (“threshold”) de 0,1.

Em experimentos de Q-PCR, deve-se considerar a possibilidade da variação da concentração inicial de cDNA na análise dos dados provenientes de duas ou mais amostras. Desta forma, para que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam previamente normalizados. Assim, para cada amostra de cDNA analisada

foram realizadas duas reações, uma utilizando iniciadores para o gene alvo e a outra utilizando iniciadores para um gene de expressão constitutiva, o qual atuou como controle interno da quantidade de cDNA utilizada nas reações. Por fim, a expressão do gene alvo foi determinada em função da expressão do gene controle.

2.13.5. Determinação da concentração final de iniciadores

Reações contendo iniciadores variando entre uma concentração final máxima de 800nM e mínima de 100nM foram realizadas utilizando-se como “template” uma mistura de cDNAs provenientes de células ST1. Desta forma, foi possível determinar a menor concentração final de iniciadores que resultou em uma formação de dímeros mínima, ou inexistente, sem que houvesse variação no valor do Ct e no perfil da curva de amplificação do gene em relação às maiores concentrações analisadas.

2.13.6. Determinação da eficiência dos iniciadores

Reações de amplificação, contendo iniciadores numa concentração ideal, foram realizadas utilizando-se como template uma mistura de cDNAs provenientes de células ST1 diluídas em série. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em $y=ax+b$) que foi utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos iniciadores, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

2.13.7. Confirmação da expressão diferencial

De posse dos Cts, inicialmente foi calculada a média dos Cts das duplicatas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência, calculou-se então a diferença entre a Média dos Cts da amostra referência e a Média dos Cts da amostra estudada. Essa diferença foi definida como ΔC_p . O cálculo do ΔC_p foi realizado para os dados do gene alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final (Pfaffl, 2001) para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos iniciadores utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{Ef_{\text{gene alvo}}^{\Delta CP_{\text{gene alvo}}}}{Ef_{\text{controle endógeno}}^{\Delta CP_{\text{controle endógeno}}}}$$

Tabela dos óligos iniciadores usados:

GENE	FORWARD	REVERSE
<i>p21 (CDKN1A)</i>	GGAGGCAGACCAGCCTAACAG	CCTGACCCACAGCAGAAGAAG
<i>HPRT1</i>	GCCCTTGACTATAATGAGCACTTCAG	GTAGATTCAACTTGCCGCTGTCTT
<i>PTEN</i>	AACTGCTAGCCTCTGGATTTGATG	AAAGACAAGGCCAACCGATACTTC
<i>TP53</i>	CTACCAACCCATTCCCAATC	CAAGACAATGCTAGTCCCTTCACTG
<i>NRPB</i>	GTGGCAATGGAAGAACTCATCAC	GACCACGCCGTCATTCTGTA
<i>MDM2</i>	TCCGACCACCGTGCTTCT	AGCACCCTCGGTAGACACAGA
<i>DUSP</i>	CCTGTAGCACCCCTCTCTACGA	TCTTTCCGGGAAGCATGGT
<i>Ciclina G</i>	AATGAAGGTACAGGCGAAGCA	GCGGGACGTTCTTTCT
<i>Bcl-2</i>	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA	ACAGTTCCACAAAGGCATCC
<i>BAX</i>	CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC	GAAGTTGCCGCTGCAAACA
<i>PUMA</i>	GCGGAGACAAGAAGAGCAAC	TCCAGGATCCCTGGGTAAG

2.14. Imunoprecipitação

2.14.1. Marcação metabólica

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços contendo meio DMEM-5% ou 10% SFB. Os devidos tratamentos foram feitos. O meio foi retirado e os poços lavados com PBSA 2 vezes. A cada poço foi adicionado meio DMEM sem metionina contendo 5% ou 10% SFB dialisado. Após 30 minutos, foi adicionado 200 μ Ci/ml de metionina radioativa S³⁵ (3000Ci/mmol) (GE Healthcare). As células foram incubadas em atmosfera de CO₂, a 37°C por 2 ou 4h, para incorporação das proteínas com metionina radioativa durante a síntese protéica. Para a normalização do volume do lisado radioativo a ser utilizado, as células foram plaqueadas em duplicata, sendo que metade das células não foi marcada metabolicamente. Após contagem celular em câmara de Neubauer, a quantidade de células não marcadas com S³⁵ existente em cada condição foi utilizada para a normalização.

2.14.2. Preparo do lisado celular

O meio de cultura foi retirado e os poços lavados 2 vezes com PBSA gelado. A cada poço foi adicionado 300 μ l de solução de lise NP-40+ e os clusters foram agitados por 10min a 4°C. O lisado foi transferido para tubos eppendorf de fundo cônico, seringados 5 vezes em gelo (para quebra do DNA) e centrifugado por 30min a 16.000g, 4°C, para clarificação do sobrenadante com a retirada dos debris celulares.

2.14.3. Imunorreação

Após normalização do volume, os lisados foram fervidos por 5min e pré-incubados com 30µl de uma solução proteína A-agarose 50% em 100mM Tris-HCl, pH 7,5 "overnight" a 4^oC, para diminuir reações inespecíficas. Os tubos foram centrifugados a 14.000g por 30seg e o sobrenadante foi então utilizado. O anticorpo anti-p53 (PAb-240) (1µg) foi adicionado aos lisados e após 2h em agitação, 30µl de proteína A-agarose 50% foi adicionado. Após a incubação de 2h a 4^oC sob agitação, os lisados foram centrifugados a 14.000g por 10 seg e o sobrenadante foi descartado. As "beads" foram lavadas 3 vezes com o tampão de lise celular apropriado. Ao pellet final de "beads" foi adicionado 15µl de tampão de amostra e as mesmas foram fervidas durante 5 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi aplicado em um gel de SDS-PAGE 12%.

2.14.4. Fixação, amplificação, secagem e revelação do gel

Após fixação do gel com solução 10% metanol e 7% ácido acético, durante 30 min, sob agitação, o mesmo foi incubado com a solução de fluorografia (Amplify –GE Healthcare) por 30 min. Após secagem a vácuo, a 180^oC, por 2 h, o gel foi exposto a um cassete apropriado por, aproximadamente, uma semana. Sua leitura, referente à emissão de radiação β, foi feita através do aparelho de Phosphor Image STORM e quantificada no programa ImageQuant.

2.15. Ensaio de mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida (EMSA)

◆ Reação de marcação radioativa do oligonucleotídeo

Os oligonucleotídeos complementares utilizados contêm o sítio de reconhecimento do complexo p53:

5'-TAC AGA ACA TGT CTA AGC ATG CTG GGG-3'

3'-ATG TCT TGT ACA GAT TCG TAC GAC CCC-5'

O oligonucleotídeo dupla-fita foi marcado através de fosforilação da extremidade 5' com [γ 32 P]-ATP, catalisada pela enzima T4 Polinucleotídeo Kinase, na seguinte reação:

1pmol de oligonucleotídeo;

1,5pmol de [γ 32 P]-ATP;

1U de T4 Polinucleotídeo Kinase;

1X tampão PNK.

A reação foi incubada a 37°C por 1 hora. Adicionou-se TE/0,1M NaCl, para parar a reação. Fez-se, então, uma extração fenol/clorofórmio (1:1) e a fração aquosa foi purificada em MicroSpin S-300 HR Columns (Pharmacia).

▪ Reação de ligação DNA-proteína e eletroforese em gel de poliacrilamida

As reações foram preparadas em gelo, contendo:

5 μ g de proteína do extrato nuclear;

6 μ g de DNA de timo;

1pmol de oligonucleotídeo marcado com 32 P;

5 μ L de tampão de amostra.

A seguir, foram incubadas a 30°C por 15min. Adicionou-se 2µl de uma solução de azul de bromofenol em TE/50% glicerol, a cada reação.

As amostras foram aplicadas em gel 4% poliacrilamida (30 poliacrilamida: 1 bisacrilamida) em 0,4X TBE (pré-corrido a 100V por 2 horas) e submetidas a eletroforese a 170V (30mA). Após a corrida, o gel foi seco a vácuo a 80°C por 2 horas. O gel foi exposto em um cassete específico para a leitura no Phosphor Image por um dia.

2.16. Ensaio de incorporação de timidina

Foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em uma bandeja de 96 poços, em meio de cultura adequado. As culturas receberam o tratamento adequado e 12-18 horas antes da lise, foi adicionado timidina tritiada ao meio de cultura (na concentração final de 2,5µCi/mL) e timidina fria (10^{-7} M), para incorporação ao DNA. O meio de cultura foi removido e as culturas foram lavadas 2 vezes com TCA 5% gelado. As células foram lisadas com 0,1mL/poço de NaOH 0,5M e incubadas a 37°C por 30 minutos. A seguir, foi colocado em cada poço, um papel de filtro grosso de 1,0x1,5cm, numerado para absorção do material.

Os filtros foram lavados, sucessivamente, 1x com TCA 5% gelado, 2x álcool gelado 90% e 1x com acetona. Após secagem em estufa, cada filtro foi colocado em frascos de cintilação (numerados) com 3ml de líquido de cintilação/frasco e a radioatividade incorporada ao DNA foi medida em um contador de cintilação (Hewlett-Packard).

2.17. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Foram plaqueadas cerca de 2×10^5 células em meio DMEM 5 ou 10% SFB em uma placa p60. Após terem permanecido nas condições desejadas, as células foram tripsinizadas de modo a se obter uma suspensão celular. As células foram centrifugadas à $100 \times g$ por 5 min e ressuspendidas em 500 μ L de PBSA e fixadas com a adição de 4,5ml de etanol 100% por 15 min. As células fixadas foram centrifugadas e novamente ressuspendidas em 500 μ L de PBSA. As células foram novamente centrifugadas e ressuspendidas em 500 μ L da solução contendo iodeto de propídio para análise no citômetro de fluxo (Iodeto de propídio 20 μ g/ml, Triton X100 0,1%, Citrato de sódio 0,1%), incubando-se por 15 min a 37°C para permeabilização celular e marcação do DNA nuclear. Após este período, foi feita a leitura no citômetro de fluxo (FACS Calibur Benton Dickinson), sendo que os dados obtidos foram analisados através do programa CellQuest. Após a captura dos dados os gráficos foram analisados com auxílio do programa ModFit que permite a delimitação e quantificação da população de células nas diferentes fases do ciclo celular.

3.18. Curvas de crescimento

Foram plaqueadas 5×10^4 células ST1-siEGFP e ST1-siP53 por poço em placas de 6 poços contendo meio DMEM 5% SFB. As coletas foram iniciadas 24h após o plaqueamento, sendo que as monocamadas celulares foram lavadas com PBSA, tripsinizadas com um volume de 0,4ml de tripsina e ressuspendidas adicionando-se 0,5ml de PBSA. As células ressuspendidas foram fixadas adicionando-se 0,1ml de formaldeído 37%. Foram feitas coletas dos dias 1, 2, 3, 5, 7 e 9, em duplicata, para cada condição. Nas curvas em que foi feito o tratamento com hidrocortisona (100ng/ml), iniciou-se o tratamento 24h após o plaqueamento. A troca de meio foi feita de três em três dias. Para as contagens, foi utilizada uma câmara de Neubauer.

2.19. Reagentes e Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, segundo formulações descritas em manuais de laboratório.

◆ *Corante Coomassie Blue*

0,25% Coomassie Brilliant Blue; 10% ácido acético glacial; 45% metanol

◆ *Géis de poliacrilamida para SDS-PAGE*

- Fase de corrida: 12% acrilamida a 30:1 (29 partes de acrilamida para 1 de N-N'-metilenebisacrilamida); 375 mM Tris.Cl (pH 8,8); 0,1% de SDS; 0,1% persulfato de amônio; 0,04-0,08% de TEMED.

- Fase de empilhamento: 5% acrilamida (30:1); 125 mM Tris.HCl (pH 6,8); 0,1% SDS; 0,1% de persulfato amônio; 0,1% de TEMED.

◆ *LB Meio de Lúria-Bertani*

1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 1% NaCl, pH7,5.

◆ *LB-A*

Meio LB sólido contendo 1,5% ágar, para cultivo em placas.

◆ *Tampão de amostra para proteínas (3 vezes concentrado)*

150mM Tris-HCl, pH 6,8; 3% SDS; 30% glicerol; 15% β -mercaptoetanol; 0,01% azul de bromofenol

◆ *Tampão de corrida para SDS-PAGE*

25mM Tris-base; 250 mM glicina (pH 8,3); 0,1% SDS

◆ *Tampão de transferência pH 8,3 para Western blot*

48mM Tris-base; 39mM glicina; 0,037% SDS; 20% metanol

- ◆ *Ponceau*
0,1% Ponceau; 10% ácido acético glacial
- ◆ *TBS (Tampão Tris-Salina)*
150mM NaCl; 50mM Tris-Cl; pH 7,5
- ◆ *TBST (Tampão Tris-Salina-Tween)*
0,1% Tween-20 em TBS
- ◆ *Tampão de bloqueio para Western blot*
5% leite em pó desnatado em TBST
- ◆ *TE (Tampão Tris-EDTA)*
10mM Tris-Cl; 1mM EDTA; pH8,0
- ◆ *TBE (Tampão Tris-Borato-EDTA) - 5 vezes concentrado*
446mM Tris-base; 445mM ácido bórico; 10mM EDTA; pH8,0
- ◆ *Tampão de amostra para DNA (5X)*
50% glicerol; 0,125% azul de bromofenol; 0,125% xileno cianol
- ◆ *Solução de Extração Nuclear*
20 mM Hepes (pH 7,9), 0,4 M NaCl, 1,0 mM EDTA, 1,0 mM EGTA, 1,0 mM DTT,
1,0 mM PMSF, 1x Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare), 1µg/ml ortovanadato de sódio, 5µg/ml NaF
- ◆ *Solução Hipotônica*
10 mM Hepes (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1,0 mM DTT,
1,0 mM PMSF, 1x Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare), 1µg/ml ortovanadato de sódio, 5µg/ml NaF

◆ *Solução de lise NP-40+*

50mM Tris.HCl (pH7,4), 150mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glicerol, 0,5% Nonidet P-40, 1mM MgCl₂, 1mM PMSF, 10µg/ml leupeptina, 5µg/ml pepstatina, 5µg/ml aprotinina, 1µg/ml ortovanadato de sódio, 5µg/ml NaF

◆ *Anticorpos monoclonais*

- Cell signalling

anti-p53 (1C12) – Diluição Wb: 1:2000

anti-fosfo-p53 (Ser15) – Diluição Wb: 1:1000

- Santa Cruz

anti-p38 – Diluição Wb: 1:250

anti-fosfo-p38 – Diluição Wb: 1:250

anti-p21 (F5) – Diluição Wb: 1:250

anti-p53 (pAb-240)-IP

anti-p53 (FL-393)-IP

anti-GR (M-20) – Diluição Wb: 1:1000

- Vector

anti-mouse e anti-rabbit IgG– conjugado com HRP

3. RESULTADOS

3.1. Análise da Localização Sub-celular de GR

A variabilidade da resposta celular a hormônios glicocorticóides pode ser devida, em parte, à quantidade protéica do receptor de glicocorticóides (GR) disponível na célula-alvo (Moalli e Rosen, 1994) e à capacidade do ligante de induzir a translocação nuclear do complexo GR-GC, através da dissociação do complexo multi-protéico, que inclui Hsp90, Hsp56, Hsp70 e p23, o qual seqüestra GR no citoplasma. Após a dimerização de GR no núcleo, este fator de transcrição pode interagir com GREs, localizados nos promotores de seus genes-alvo (Beato, 1989). A fim de analisar possíveis diferenças na cinética de internalização nuclear e nos níveis de GR em células C6, P7 e ST1, na presença de Hy, o que poderia modular a atividade do receptor entre estas células, realizou-se um experimento de Western blot com extratos protéicos enriquecidos para proteínas citoplasmáticas e nucleares destas células, mantidas na presença ou na ausência do hormônio.

A figura 1 indica que há diferenças nos níveis protéicos de GR entre as três linhagens, tanto na ausência quanto na presença do hormônio, sendo que ST1 apresenta maior nível de GR, seguido por C6 e P7. É interessante notar que os níveis intermediários de GR em C6, em relação a suas variantes ST1 e P7, indica que esta linhagem polimórfica possui componentes que diferem quanto à expressão de GR. Esta diferença pode estar relacionada, pelo menos em parte, à resposta destas linhagens a GCs, já que os níveis de GR nestas linhagens estão de acordo com o grau de responsividade que apresentam a GCs: ST1>C6>P7. Apesar dos menores níveis de GR apresentados pelas células P7, o tratamento com Hy induz a translocação nuclear do complexo GR-GC nesta célula, sugerindo a funcionalidade do receptor. A cinética do

tráfego citoplasma-núcleo de GR se assemelha nas três linhagens, sendo que em 5h de tratamento com Hy, a quantidade de GR nuclear é semelhante àquela medida em 24h. Em experimentos de gene-repórter realizados previamente em nosso laboratório em colaboração com a Dra Vilma Martins (resultados não publicados), utilizando uma construção contendo o promotor de MMTV, que possui elementos responsáveis a GR, os resultados obtidos são congruentes em relação a estes, sugerindo que os níveis diferenciais de GR nestas linhagens estão de acordo com a atividade do receptor, tanto em condições basais quanto na presença de Hy.

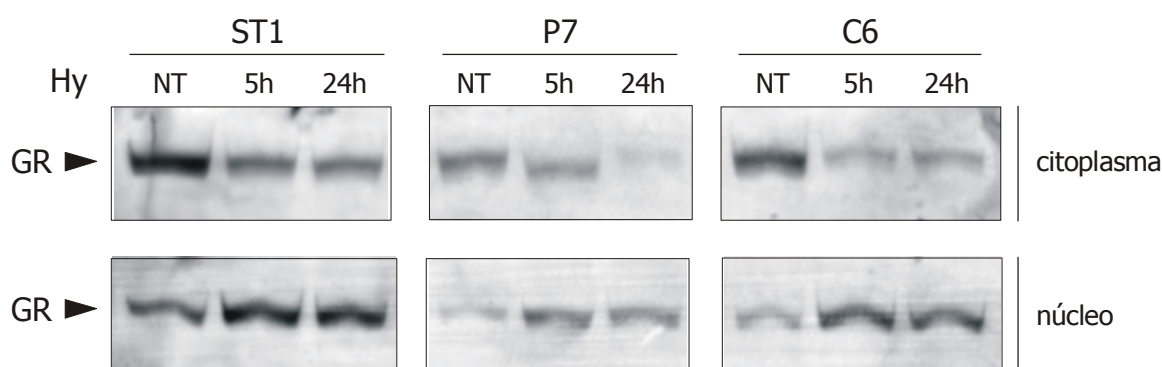


Figura 1: Indução do tráfego citoplasma-núcleo de GR de células ST1, P7 e C6 tratadas com Hy por 5h ou 24h.

Células ST1, P7 e C6 foram tratadas com 100ng/ml Hy por 5h ou 24h, ou não tratadas, 60µg de seus extratos citoplasmáticos ou 40µg de seus extratos nucleares foram resolvidos em gel 10% SDS-PAGE. O ensaio de “immunobloting” foi realizado com o anticorpo anti-GR M20 na diluição de 1:1.000. A banda indicada, de aproximadamente 85KDa, representa GR. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

3.2. Caracterização da Funcionalidade de p53 em Resposta a Glicocorticóides

3.2.1 Análise da Ação de Glicocorticóide Sobre a Atividade de Ligação de p53 ao DNA

A fim de avaliar o possível envolvimento de p53 na resposta antiproliferativa de GCs, diversas características funcionais de p53 de células ST1 e P7 foram analisadas. A transativação mediada por p53 requer sua ligação a seqüências responsivas no DNA, localizadas nos promotores de seus genes-alvo. Para analisar o efeito de Hy sobre a capacidade de ligação de p53 a seqüências específicas de DNA, a técnica de "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA) foi aplicada, utilizando extratos protéicos nucleares das linhagens ST1 e P7, mantidas na ausência ou na presença do hormônio por 24 horas. A seqüência do oligonucleotídeo dupla-fita utilizado, correspondente a uma seqüência responsiva a p53 (p53-RE), foi:

5'-TAC AGA ACA TGT CTA AGC ATG CTG GGG-3'

Como controle positivo para a ligação de p53 ao DNA, células ST1 foram tratadas com 2µg/ml do agente alquilante mitomicina C (MMC) por 24 horas. Este agente altamente genotóxico, usado como quimioterápico no tratamento de alguns tipos de neoplasias, é um potente ativador de p53, aumentando sua ligação ao seu elemento responsivo no DNA em fibroblastos NIH-3T3 (Tishler, Calderwood *et al.*, 1993).

Comparando a intensidade dos complexos formados nos canais 1 e 7 da figura 2, é evidente que o tratamento de células ST1 com MMC induziu a ligação de p53 ao DNA, quando comparados tanto o complexo I quanto o II destes mesmos canais, indicando que a via de ativação de p53 por dano de DNA deve estar intacta nestas células transformadas. A presença destes dois complexos e a indução do complexo I apenas na condição de tratamento de ST1 com MMC, provavelmente, deve advir do fato de p53 se associar com diferentes complexos protéicos, dependendo do tipo de

estímulo recebido pela célula, o que tem implicações diretas sobre a cinética de indução da expressão e a seleção de seus genes-alvo (Espinosa, Verdun *et al.*, 2003). As linhagens estudadas apresentam uma atividade basal de p53 de ligação ao DNA equivalente (canais 1 e 3). Na presença de Hy, entretanto, o sinal do complexo II é intensificado apenas nos extratos de células ST1, como pode ser visto comparando os canais 1 e 2, indicando o aumento da capacidade de ligação de p53 ao seu elemento responsivo no DNA. A linhagem P7, resistente ao tratamento com GCs, não apresenta modulação na capacidade de ligação de p53 ao DNA mediada por Hy, como mostrado nos canais 3 e 4.

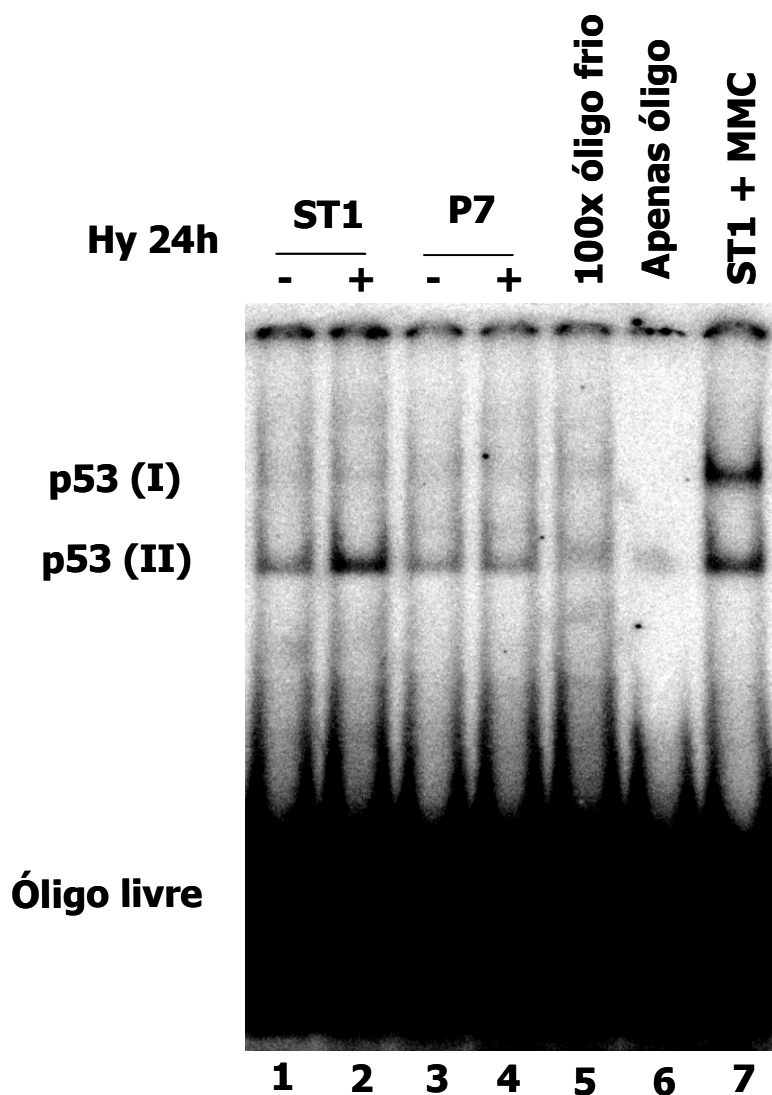


Figura 2. Análise do efeito de hidrocortisona (Hy) e mitomicina C (MMC) sobre a atividade ligante de p53 ao DNA nas linhagens ST1 e P7 por EMSA.

Extratos nucleares foram obtidos a partir de culturas mantidas em 5% FCS-DMEM, não tratadas e tratadas com Hy (100ng/mL) ou MMC (2µg/mL) por 24 horas. Figura representativa de dois experimentos independentes.

3.2.2 Análise da Ação de Glicocorticóides Sobre a Atividade de Transativação de p53

Para avaliar se a capacidade de ligação de p53 ao DNA correspondia diretamente à sua atividade de transativação, ensaios de gene-repórter foram empregados. Para tal, o vetor repórter p53-luc (Stratagene), gentilmente cedido pelo Dr. Cláudio Joazeiro (Instituto Scripps - San Diego, Califórnia, EUA), foi testado em diferentes modelos celulares e, posteriormente, utilizado em células ST1 e P7. Este vetor apresenta 14 repetições "in tandem" de uma seqüência responsiva a p53 (5'-TGCCTGGACTTGCCTGG-3'), posicionadas à frente de um promotor mínimo (TATA Box), dirigindo a expressão do gene-repórter *Luciferase*, cujo cDNA foi isolado do vagalume *Photinus pyralis*. Seu produto gênico, a enzima Luciferase, catalisa a conversão da luciferina de besouro a oxiluciferina, havendo emissão de luz durante a reação. Como a Luciferase não requer modificações pós-traducionais para sua atividade enzimática, a intensidade luminosa registrada por um luminômetro é diretamente proporcional à atividade de p53 na célula e depende da condição estudada.

Apesar da transfecção de DNA mediada por lipossomos apresentar alta reprodutibilidade, as células foram co-transfectadas com o vetor repórter de controle interno pRL-TK (Promega). Este vetor é constituído pelo promotor da timidina quinase do "Herpes Simplex Vírus" (HSV-TK), clonados à frente de um promotor da T7 RNA polimerase, dirigindo a expressão da Renilla luciferase de forma constitutiva (pRL-TK). O gene da *Renilla luciferase*, isolado do organismo marinho *Renilla reniformis*, codifica uma enzima semelhante à Luciferase, que converte o substrato coelenterazina a coelenteramida, resultando, também, na emissão de luz. Assim, a atividade da Luciferase foi sempre normalizada pela atividade da Renilla luciferase.

A primeira medida tomada para caracterizar a resposta do vetor p53-luc à atividade de p53 foi a transfecção deste vetor em células Saos2 (nulas para p53),

juntamente com o vetor controle pBSSK ou o vetor de expressão de p53 denominado pFC-p53 (Stratagene). Como mostrado na figura 3.A, nestas células a proteína p53 só é detectada por Western blotting quando as células são transfectadas com o vetor pFC-p53. A atividade de luciferase foi mensurável apenas na condição de expressão ectópica de p53, como mostrado na figura 3.B. O outro modelo usado para avaliar a especificidade do vetor p53-luc em relação a p53 foi a linhagem de carcinoma de cólon humano HCT116 p53^{+/+} e sua variante HCT116 p53^{-/-}, estabelecida pelo grupo de B. Vogelstein (Bunz, Dutriaux *et al.*, 1998). Como apresentado na figura 3.C, apesar de existir uma atividade transcricional basal de p53 em células HCT116 p53^{-/-}, esta atividade é cerca de 10x menor, quando comparada à atividade da linhagem HCT116 p53^{+/+}. A validação da especificidade da resposta do vetor p53-luc a p53, indicando pouca ou nenhuma influência de outros membros da família de p53 sobre esta construção, possibilitou seu uso para os experimentos seguintes.

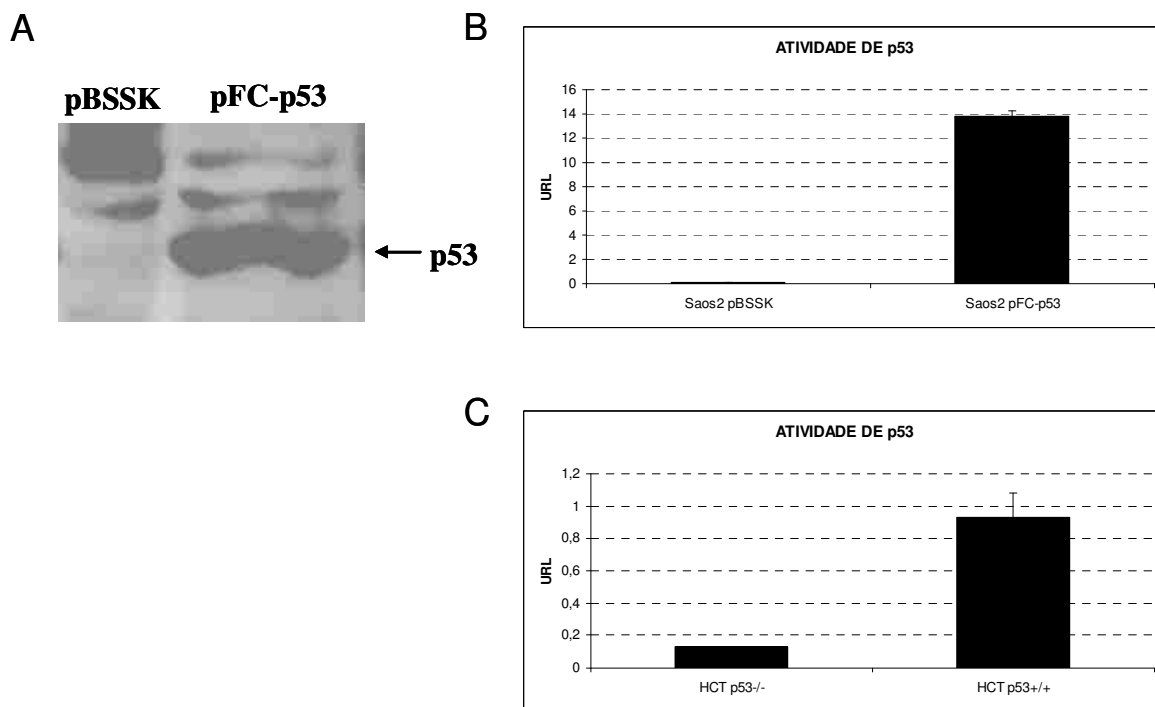


Figura 3: Teste da especificidade do vetor repórter p53-luc a p53 em diferentes modelos celulares.

A- Western blotting para p53 usando lisados de células Saos2 controle ou expressando ectopicamente p53. Células Saos2 foram transfectadas com o vetor pBlueScript (pBSSK) ou o vetor de expressão de p53 (pFC-p53) e amostras de seus extratos protéicos (100µg) foram resolvidos em gel 10% SDS-PAGE. O ensaio de Western blotting foi realizado com o anticorpo anti-p53 FL-393, na diluição de 1:1.000. A banda indicada, de 53KDa, representa p53. **B-** Atividade de p53 medida por ensaio de gene-repórter em células Saos2 controle ou expressando ectopicamente p53. Células Saos2 foram co-transfectadas com o vetor pBSSK ou com o vetor de expressão de p53 pFC-p53, o vetor repórter p53-luc e o vetor controle pRL-TK. A atividade de Luciferase foi normalizada pela atividade da Renilla Luciferase. (URL: Unidades Relativas de Luciferase) **C-** Atividade de p53 em células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}. Células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} foram co-transfectadas com o vetor repórter p53-luc e o vetor controle pRL-TK. 24h após a transfecção, a atividade de Luciferase foi normalizada pela atividade da Renilla Luciferase.

Ensaio de gene-repórter foram realizados em células ST1 e P7, tratadas ou não com Hy por 24h. Conforme indicado na figura 4, a atividade basal de p53 de células ST1 é o dobro da atividade basal de células P7, diferentemente de sua atividade de ligação ao DNA, medida por EMSA, que é equivalente entre as linhagens. Além da maior atividade basal, a indução de p53 nas células ST1, mediante tratamento com Hy por 24h é induzido cerca de 3 vezes, enquanto que sua atividade permanece inalterada em P7, condizente com o que havia sido observado em ensaios de EMSA.

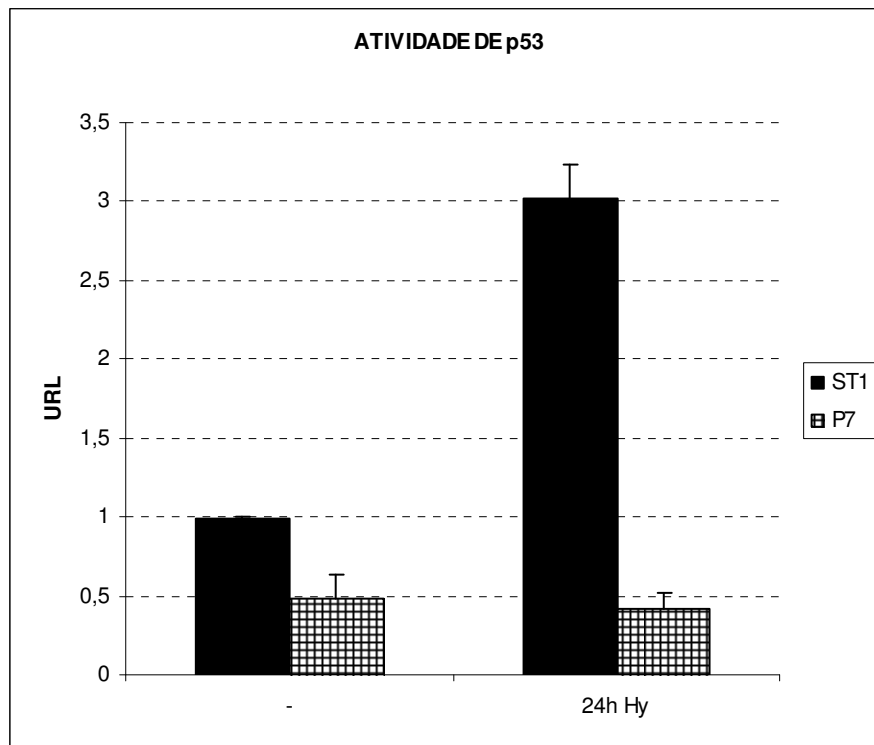


Figura 4: Indução da atividade de transativação de p53 em células ST1.

Células ST1 e P7 foram co-transfectadas com o vetor repórter p53-luc e o vetor controle pRL-TK e depois tratadas (ou não) com 100ng/ml Hy por 24h. A atividade de Luciferase foi normalizada pela atividade da Renilla Luciferase. Resultado de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata.

3.2.3 Análise da Ação de Glicocorticóides Sobre os Níveis Protéicos de p53

Como detalhado na Introdução, o aumento da atividade de p53, ocorre em diversas circunstâncias, em decorrência do aumento da estabilidade da proteína, através da inativação de MDM2. Esta inativação pode se dar através de fosforilação em determinados resíduos de p53 e/ou MDM2, resultando numa menor interação entre estas proteínas, ou, ainda, através do aumento da degradação ou da retenção nuclear de MDM2 (Prives, 1998; Tao e Levine, 1999). O resultado é a maior estabilidade de p53, que passa a ter uma meia vida de algumas horas. A fim de analisar se os níveis de p53 de células ST1 e P7 são modulados pelo tratamento com Hy, diversos experimentos de Western blotting, utilizando diferentes tipos de extração protéica e diferentes anticorpos anti-p53, foram realizados, sendo que a quantidade de p53 não era suficientemente abundante para detecção através desta técnica. Experimentos de marcação metabólica, através da administração de metionina marcada com S³⁵, seguida por imunoprecipitação, foram realizados e os níveis de p53 de células ST1 e P7 foram analisados após o tratamento com Hy por diferentes períodos de tempo.

Para a normalização da quantidade de lisado protéico utilizado para cada condição, as células foram plaqueadas e tratadas em duplicata, sendo que apenas uma placa por condição foi marcada radioativamente, sendo a outra utilizada para contagem do número de células. A quantidade de células não marcadas, determinada no momento da hora da lise das células marcadas radioativamente, foi usado para a normalização do volume de lisado de cada condição, que deveria ser utilizado para a imunoprecipitação. Por esta razão, pode-se observar na figura 5.A, diferenças marcantes nos sinais de fundo entre as condições de tratamento das células com Hy, já que GCs aumentam a tomada de aminoácidos por determinados tipos celulares (Schwertfeger, Roskos *et al.*, 2000).

Contudo, o aumento do sinal de fundo nas condições em que Hy foi administrada às células, é acompanhado pelo aumento do sinal da banda de 53KDa imunoprecipitada, correspondente a p53. Após as bandas do filme de raio-X em ter sido densitometradas, a intensidade desta banda de 53KDa foi normalizada pela banda localizada mais acima em cada condição, que corresponde às proteínas de alto peso molecular não resolvidas durante a eletroforese. O resultado desta normalização está expresso no gráfico da figura 5.B. Conforme indicado, não há alterações significativas nos níveis totais de p53 de células ST1 e P7, tanto em situações basais quanto durante o tratamento das células com Hy durante 4, 12 ou 24h. Além disso, os níveis de p53 apresentados nestas linhagens são tão baixos quanto os apresentados por fibroblastos embrionários de rato (REF), o que explica a dificuldade para se detectar a proteína por ensaios de Western blot.

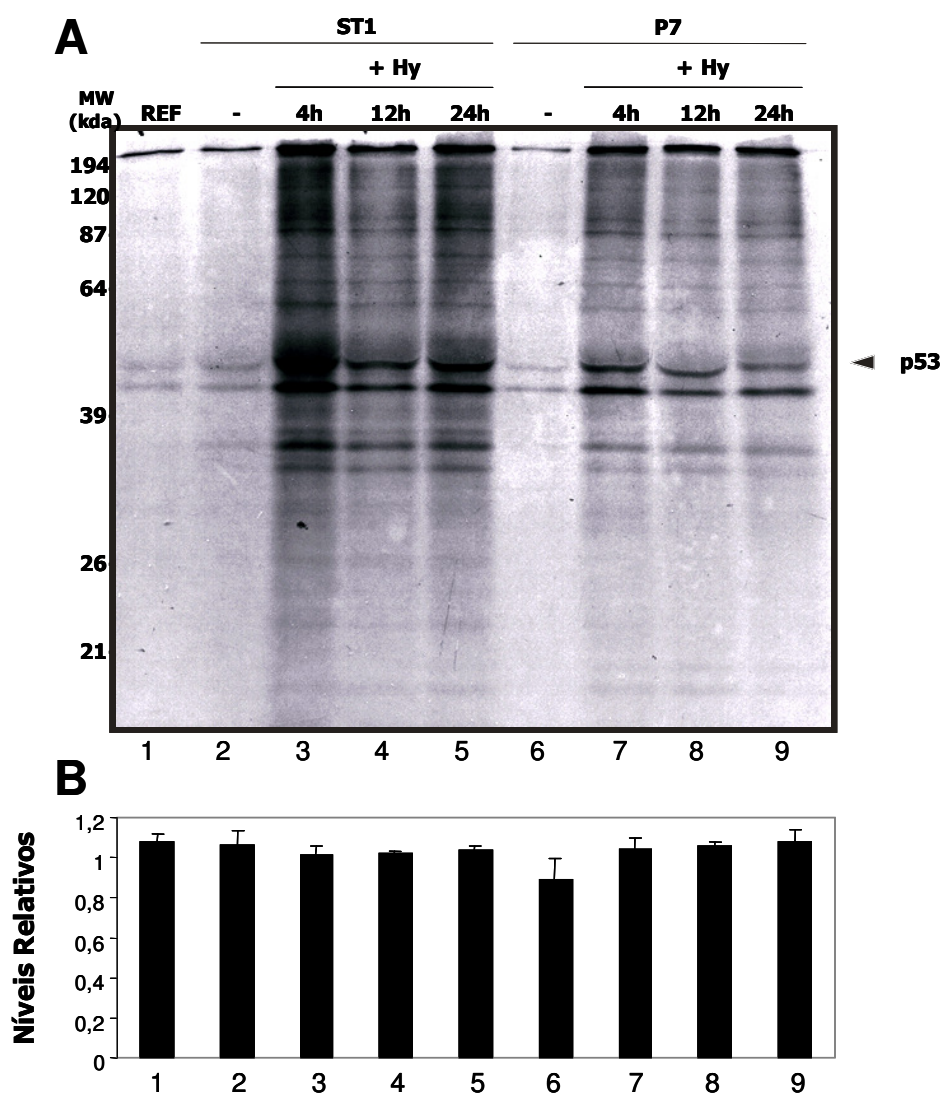


Figura 5: Análise dos níveis de p53 em células ST1 e P7 na presença de Hy.

A- Imunoprecipitação da proteína p53, usando o anti-p53 pAb-240, em extratos protéicos de células ST1 e P7, tratadas com Hy (100ng/ml) por 4, 12 ou 24h ou não tratadas, e em células REF. As células foram mantidas na presença de 200 μ Ci/ml de metionina contendo o isótopo radioativo S³⁵ por 4h antes da lise. A quantidade de lisado a ser usada para imunoprecipitação foi normalizada pela quantidade de células em cada condição e as proteínas imunoprecipitadas foram resolvidas em gel SDS-PAGE 12%.

B- Representação gráfica da normalização da intensidade do sinal da banda de p53 pelo sinal da banda correspondente em relação às proteínas não resolvidas no gel, após análise densitométrica do filme de raio-X.

3.2.4 Análise da Ação de Glicocorticóides Sobre a Translocação Nuclear e o estado de Fosforilação de p53

Em determinadas situações, a ativação de p53 pode ocorrer independentemente de alterações em seu nível protéico total (Crochemore, Michaelidis et al., 2002), podendo envolver, contudo, modificações pós-traducionais (Appella e Anderson, 2001) e alterações na dinâmica de internalização nuclear da proteína (Scotto, Delphin et al., 1999). Estas duas outras possibilidades foram analisadas nas células ST1, visando a melhor compreensão do mecanismo de ativação de p53 por Hy.

As células ST1 são parcialmente sincronizadas quando mantidas em 0,2% SFB por 24h e sua resposta a Hy é ainda mais intensa nesta condição (Armelin e Armelin, 1978). A regulação por Hy de grande parte dos genes identificados por Vedoy & Sogayar em células ST1 é mais acentuada quando as células são carenciadas e mantidas em 0,2% SFB do que em células crescendo exponencialmente na presença de 5% SFB (Vedoy e Sogayar, 2002). Para comparar o efeito da adição de Hy a culturas de células ST1 carenciadas para soro sobre a translocação nuclear e o estado de fosforilação da Ser15 da fração nuclear de p53, as células foram mantidas por 24h em 0,2% SFB e tratadas com Hy por diferentes períodos de tempo.

Como pode ser visto na Figura 6, os níveis nucleares tanto de p53 total quanto de sua forma fosforilada na Ser15 aumentam após o tratamento das células ST1 com Hy. Contudo, a cinética de internalização nuclear de p53 é diferente daquela de fosforilação da Ser15 de p53 nuclear. Enquanto o acúmulo de p53 no núcleo atinge um pico (2,5 vezes em relação ao controle) em 5h de tratamento com Hy, nível este que é sustentado até 10h e que decresce ligeiramente após 24h, os níveis de fosfo-Ser15-p53 atingem o ápice (2,5 vezes em relação ao controle) em apenas 1h de tratamento, retornando para níveis próximos ao basal após 5h.

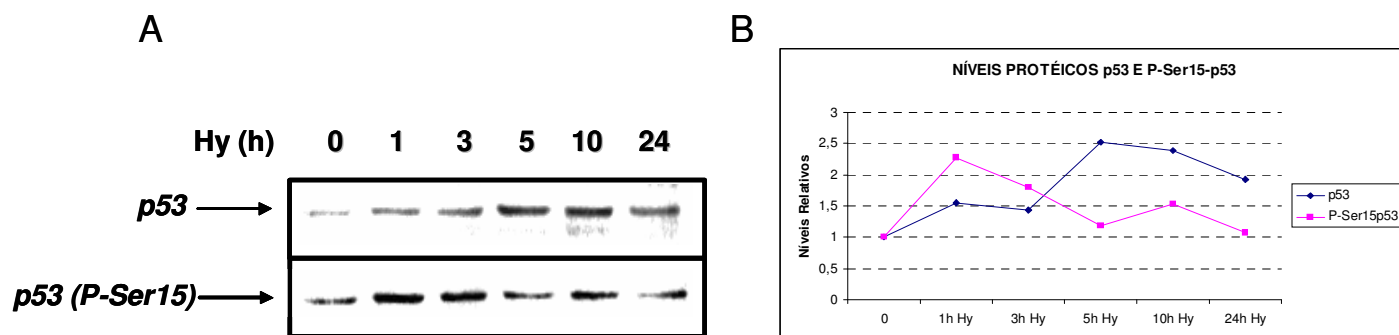


Figura 6: Hy Induz a Translocação Nuclear e Fosforilação de p53 em Células ST1.

A- Células ST1 foram mantidas em 0,2% SFB por 24h e tratadas por diferentes períodos de tempo com 100ng/ml Hy. 50µg do extrato protéico nuclear de cada amostra foi resolvido em gel 12% SDS-PAGE. O primeiro ensaio de “immunobloting” foi realizado com o anticorpo anti-fosfo Ser15-p53, na diluição de 1:1.000. A membrana foi então desibridizada e incubada com um anticorpo anti-p53 (Cell Signalling), na diluição de 1:2.000. As bandas indicadas, de aproximadamente 53KDa, representam p53 (acima) e sua forma fosforilada em Ser15 (abaixo). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. **B-** Representação gráfica das intensidades dos sinais das bandas de p53 e fosfo-Ser15-p53. Os sinais foram quantificados através do programa ImageQuant.

É sabido que a fosforilação da Ser15 de p53 é induzida horas após a estimulação de células carenciadas com SFB (Buschmann, Adler *et al.*, 2000). A comparação da cinética de fosforilação da Ser15 de p53 nuclear em células ST1, após tratamento com Hy ou com 5% SFB, poderia ajudar a elucidar a via de ativação de p53 por GCs. Células ST1 foram mantidas na presença de 0,2% SFB por 24h e, em seguida, tratadas com Hy ou 5% SFB por diferentes períodos de tempo ou com MMC por 24h (controle positivo). O perfil de fosforilação da Ser15 nestas condições é apresentado na figura 7.

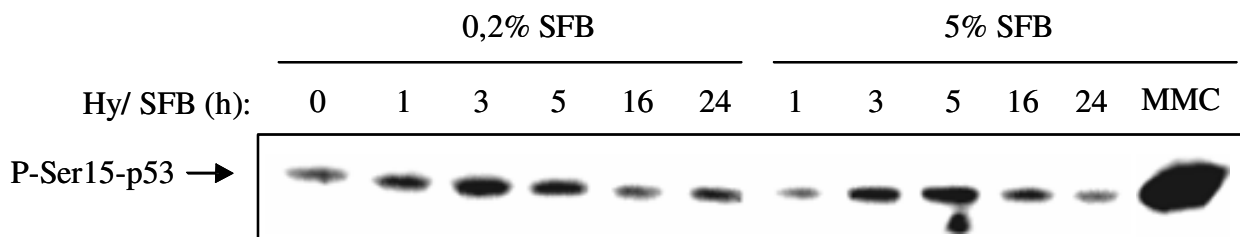


Figura 7: Cinética de fosforilação da Ser15 de p53 em resposta a Hy ou SFB.

Células ST1 foram mantidas em 0,2% SFB por 24h e tratadas por diferentes períodos de tempo com 100ng/ml Hy ou 5% SFB. Como controle positivo, células ST1 foram tratadas por 24h com 2µg/ml mitomicina C (MMC). 40µg do extrato protéico nuclear de cada amostra foi resolvido em gel 15% SDS-PAGE. O ensaio de “immunobloting” foi realizado com o anticorpo anti-fosfo Ser15-p53 na diluição de 1:1.000. A banda indicada, de aproximadamente 53KDa, representa a forma fosforilada de p53 na Ser15.

Apesar do tratamento com MMC induzir de forma muito mais eficiente a fosforilação da Ser15 de p53, as cinéticas de indução da sua fosforilação por SFB e Hy são muito semelhantes, sendo que o pico de fosforilação se dá durante as primeiras horas de tratamento em ambas as condições, quando a maior parte das células está na fase G1 do ciclo celular. A semelhança no padrão de fosforilação de p53 durante estes tratamentos, que promovem respostas antagônicas em relação à proliferação de células ST1, sugere o envolvimento de uma proteína quinase comum nestes dois processos.

3.2.5 Análise da Ação de Glicocorticóides e SFB Sobre a Expressão de SGK

A única quinase conhecida por ser ativada tanto por soro quanto por glicocorticóides é a SGK (Serum and Glucocorticoid inducible protein Kinase), uma serina/treonina proteína quinase de 50KDa. Um dos mecanismos de regulação da sua expressão é dependente de p53, que age através de um elemento responsivo (p53-RE) localizado em seu promotor (Maiyar, Huang *et al.*, 1996). Apesar dos substratos de SGK não terem sido identificados ainda, sua regulação em células ST1 poderia sugerir algum envolvimento desta quinase na fosforilação de p53.

Os níveis de SGK foram analisados em extratos protéicos totais de células ST1 carenciadas para soro e mantidas na presença de 0,2% SFB e tratadas com Hy ou estimuladas com 5% SFB, por diferentes períodos de tempo, com a intenção de comparar a cinética de indução desta quinase em relação à cinética de fosforilação da Ser15 de p53 nas mesmas condições. Como apresentado na figura 8, os níveis de SGK são progressivamente induzidos após o tratamento com Hy, sendo que o pico de indução de SGK por Hy se dá em 16h, sendo sustentado até 24h de tratamento. A indução por SFB, contudo, ocorre mais precocemente, logo nas primeiras horas de tratamento, retornando aos níveis basais nos tempos mais longos (16 e 24h), de forma semelhante à cinética de fosforilação da Ser15 de p53 após o tratamento com SFB (figura 7).

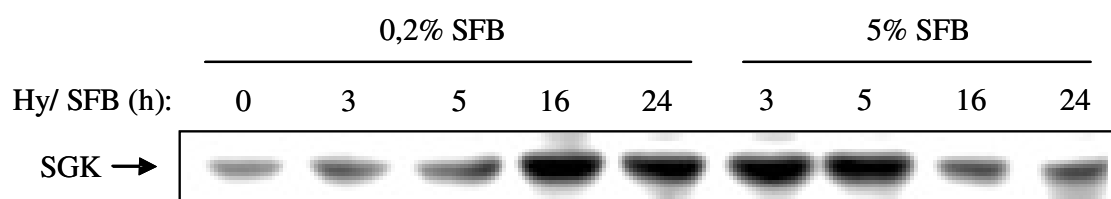


Figura 8: Cinética de Indução de SGK em Resposta a Hy e SFB.

Células ST1 foram mantidas em 0,2% SFB por 24h e tratadas por diferentes períodos de tempo com 100ng/ml Hy ou 5% SFB. 30µg do extrato protéico total de cada amostra foi resolvido em gel 12% SDS-PAGE. O ensaio de “immunoblotting” foi realizado com o anticorpo anti-SGK na concentração de 1µg/µl. A banda indicada, de aproximadamente 50KDa, representa SGK1. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

3.2.6 Análise da Ação de Glicocorticóide Sobre a Expressão e Fosforilação de p38 MAPK

Até onde se tem conhecimento, a única quinase responsável por catalisar a fosforilação da Ser15 de p53 e que é regulada por glicocorticóides é a p38 MAPK, podendo ser tanto induzida (Miller, Webb *et al.*, 2005) quanto reprimida por GCs (Lasa, Abraham *et al.*, 2002). Desta forma, a alteração nos níveis totais ou de fosforilação de p38 por Hy em células ST1 poderia sugerir seu envolvimento em relação à ativação de p53. A expressão de p38 MAPK e os níveis de suas formas fosforiladas foram avaliados por Western blotting, utilizando extratos protéicos de células ST1, enriquecidos para proteínas citoplasmáticas, após diferentes períodos de tempo de tratamento com Hy. Entretanto, como apresentado na figura 9, Hy induz um ligeiro aumento nos níveis totais de p38 após 16h de tratamento sem, contudo, regular a fosforilação desta quinase.

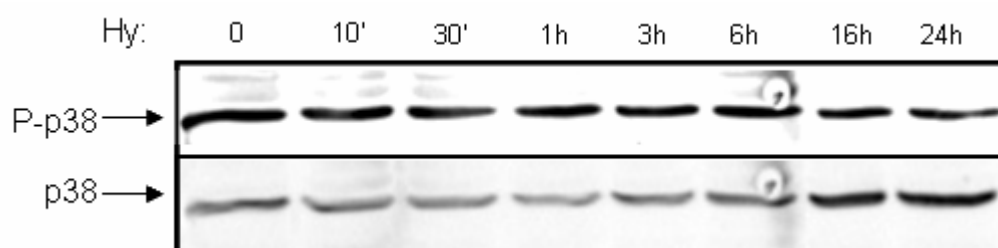
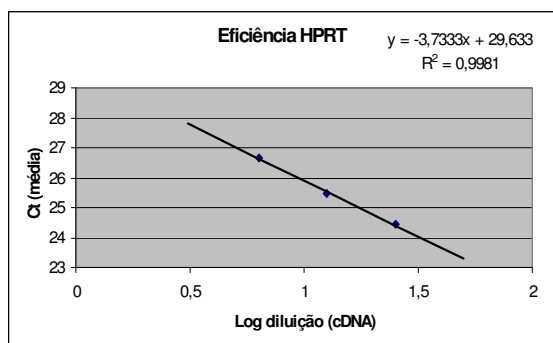
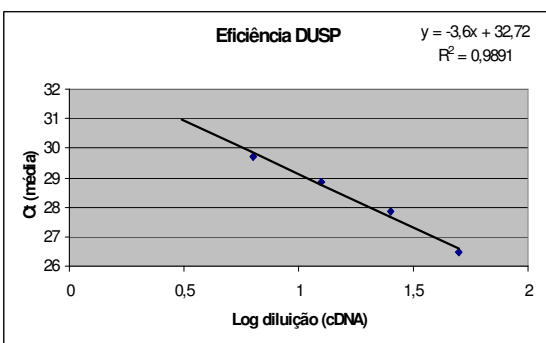
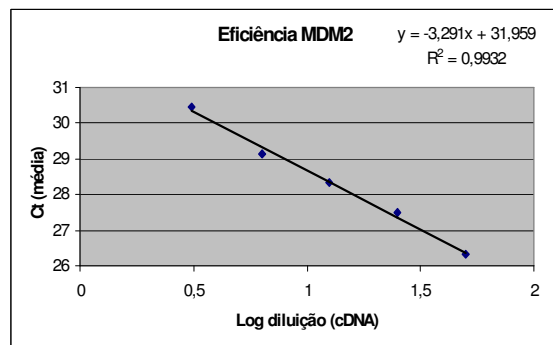
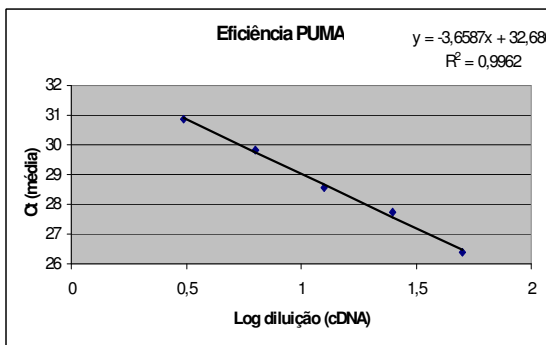
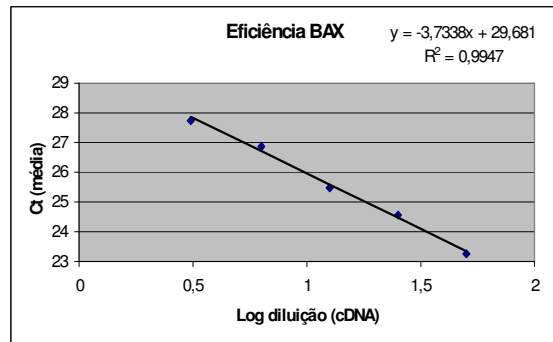
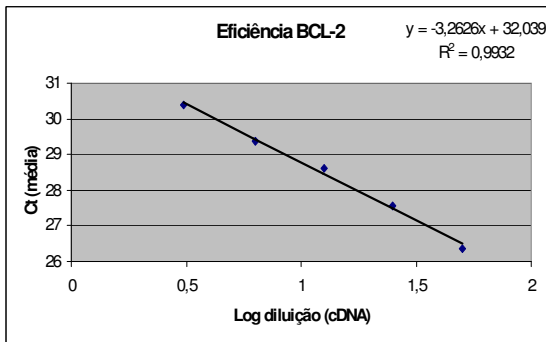
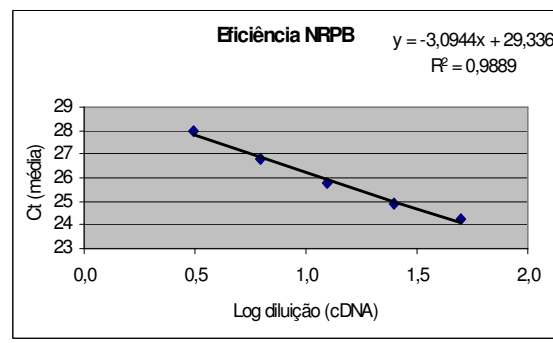
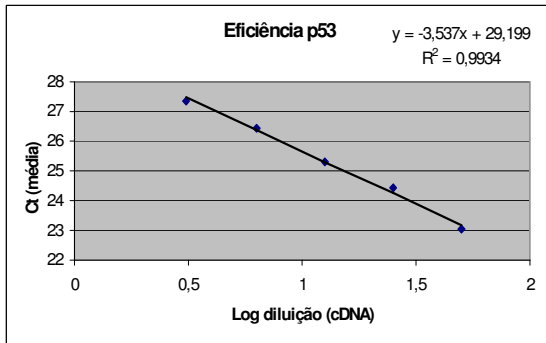
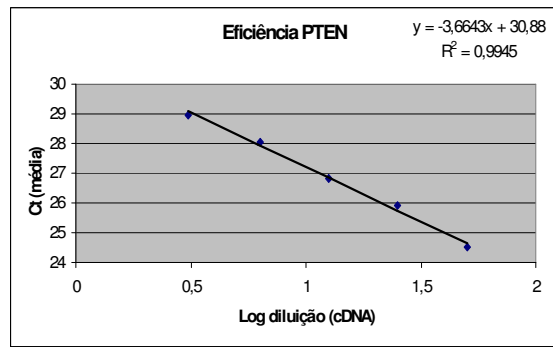
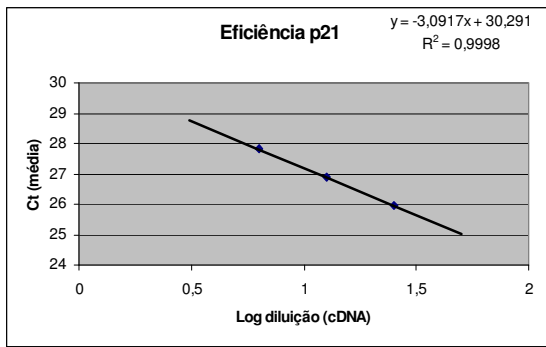


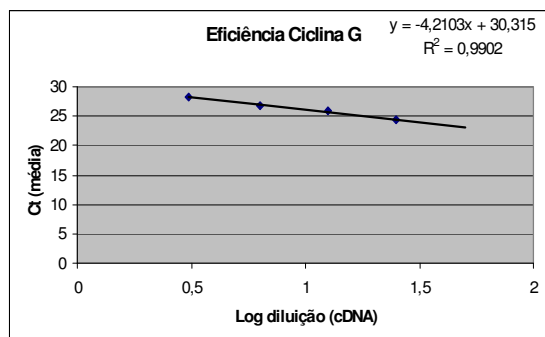
Figura 9: Cinética de expressão e fosforilação de p38 MAPK de células ST1 em resposta a Hy.

Células ST1 foram mantidas em 0,2% SFB por 24h e tratadas por diferentes períodos de tempo com 100ng/ml Hy. 60µg de extrato protéico enriquecido para proteínas citoplasmáticas, de cada amostra, foi resolvido em gel 12% SDS-PAGE. O primeiro ensaio de “immunobloting” foi realizado com o anticorpo anti-fosfo-p38 MAPK, na diluição de 1:100. A membrana foi então desibridizada e incubada com um anticorpo anti-p38, na diluição de 1:100. As bandas indicadas, de aproximadamente 38KDa, representam as formas totais e fosforiladas de p38 MAPK. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

3.2.7 Análise da Expressão de Genes-Alvo de p53 em Células ST1 e Sua Regulação por Hy

A expressão de alguns genes-alvo de p53 foi analisada durante a resposta de células ST1 a Hy, por RT-PCR quantitativo (Q-PCR). Como discutido em Materiais e Métodos, a padronização da reação de Q-PCR consiste, basicamente, na determinação da concentração mínima de iniciadores necessária para a amplificação do produto desejado, sem que ocorra a formação de dímeros e sem que haja variação no valor do Ct e no perfil da curva de amplificação do gene em relação às maiores concentrações analisadas. Uma vez determinada a concentração ideal de iniciadores, é montada uma curva de regressão linear para calcular a eficiência de amplificação do produto específico para cada par de iniciadores. Tal valor é usado para o cálculo final da quantidade relativa do produto formado em cada reação. A figura 10 representa as curvas de regressão linear usadas para o cálculo da eficiência de amplificação de cada par de iniciadores utilizado. Estes valores estão resumidos na tabela da mesma figura. Para os experimentos de Q-PCR, foi utilizado como normalizador a expressão do gene da Hipoxantina Fosforibosiltransferase (HPRT). Em todos os experimentos, a condição ST1 controle (-) foi utilizada como controle calibrador. As células ST1 foram mantidas em baixa concentração (0,2%) de SFB por 24h previamente, em relação ao início dos tratamentos com 100ng/ml Hy por diferentes períodos de tempo.





PRIMERS	CONCENTRAÇÃO (nM)	EFICIÊNCIA
<i>P21</i>	200	2,1
<i>PTEN</i>	200	1,9
<i>P53</i>	200	1,9
<i>NRPB</i>	600	2,1
<i>BCL-2</i>	200	2,0
<i>BAX</i>	200	1,9
<i>PUMA</i>	200	1,9
<i>MDM2</i>	200	2,0
<i>CICLINA G1</i>	200	1,7
<i>DUSP</i>	200	1,9
<i>HPRT</i>	200	1,9

Figura 10: Curvas de regressão linear obtidas para determinação da eficiência dos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica na linhagem celular ST1 nos experimentos de Q-PCR.

Reações contendo iniciadores numa concentração final determinada previamente foram realizadas utilizando, como “template”, diluições seriadas de uma mistura de cDNAs provenientes de células ST1. Uma análise de regressão linear foi realizada a partir dos valores obtidos de Ct em função do logaritmo da respectiva diluição. Os coeficientes angulares das retas obtidas foram utilizados para o cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos iniciadores. As concentrações empregadas para cada iniciador e suas respectivas eficiências de amplificação estão resumidas na tabela acima.

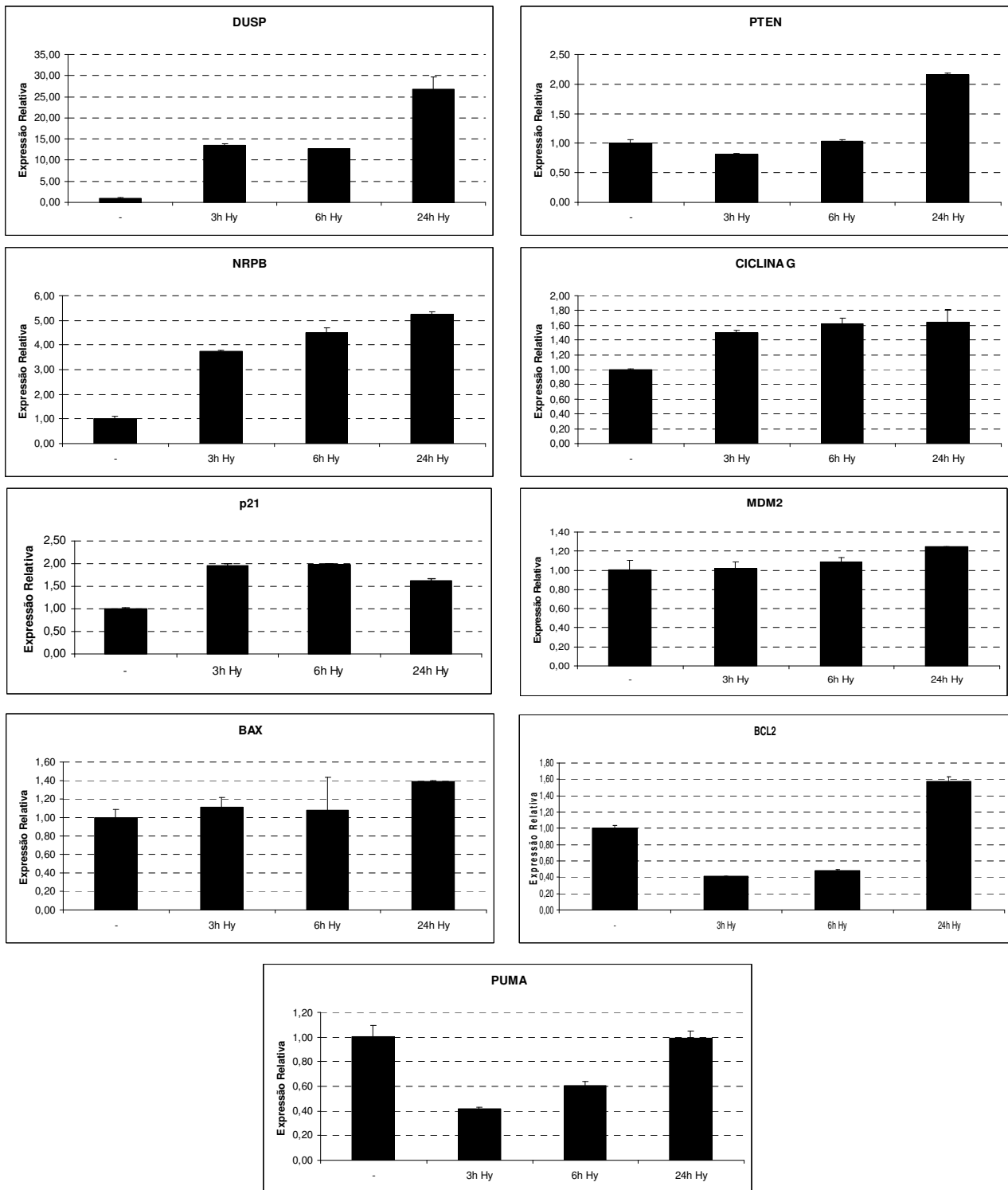


Figura 11: Perfil de expressão de genes-alvo de p53 em células ST1 em resposta ao tratamento com Hy.

Células ST1 foram mantidas em baixa concentração de SFB (0,2%) por 24h e tratadas com 100ng/ml Hy por diferentes períodos de tempo: 3, 6 ou 24h, ou não tratadas. A expressão de nove genes-alvo de p53 foi avaliada nestas condições por Q-PCR. Como normalizador para os cálculos de expressão relativa, foi usado o gene HPRT.

Os nove genes-alvo cuja expressão foi analisada (figura 11), podem ser agrupados de acordo com sua função, sendo que cinco deles (p21, NRPB, Ciclina G, PTEN e DUSP11) estão basicamente relacionados com o controle da proliferação celular e, de forma geral, o tratamento com Hy induz um aumento progressivo na sua expressão, atingindo um pico em 24h. A única exceção é p21, que apresentou uma rápida indução (3h), que se manteve ao longo do tratamento.

Dentre os outros genes analisados, encontram-se alguns dos alvos de p53 que controlam a via de apoptose: Bcl-2, Bax e PUMA. Enquanto a expressão de Bax se manteve constante, a expressão de Bcl-2 (anti-apoptótico) foi reprimida nas primeiras horas de tratamento, voltando a níveis próximos ao basal no tempo de 24h, de forma semelhante à regulação da expressão do gene pro-apoptótico PUMA. Estes dados são condizentes com a resposta das células ST1 a Hy, caracterizada pela parada de crescimento por aumento da proporção das células na fase G0/G1 do ciclo, sem haver indução de apoptose. A expressão do regulador negativo de p53, MDM2, não foi alterada em resposta a Hy.

3.2.8 Análise da Ação de Glicocorticóides e Ácido All-Trans Retinóico Sobre a Atividade de Transativação de p53 em Linhagens de Glioma Humano

Na tentativa de extrapolar os resultados obtidos na linhagem de glioma de rato ST1 para células humanas, a atividade de p53 em resposta a GC foi analisada em três linhagens de glioma humano, que apresentam diferentes “status” de p53. Como a resposta antiproliferativa das células ST1 a Hy se assemelha muito à sua resposta ao agente antiproliferativo e diferenciador ácido *all-trans* retinóico (ATRA) (Bengtson, 2002), e sendo p53 induzido em resposta aos dois agentes de forma similar (figura 24.A), as linhagens humanas U87MG (p53 selvagem), A172 (p53 mutado em um alelo)

e T98G (p53 mutado em ambos os alelos) foram tratadas com 10^{-7} M DEX ou 10^{-5} M ATRA por 24h e a atividade de transativação de p53 foi analisada, nestas condições, através de ensaios de gene-repórter. Como apresentado na figura 12, não houve variações significativas na atividade de p53 durante o tratamento das linhagens U87MG e A172 com DEX ou ATRA. Como esperado, a atividade de p53 em T98G, medida pelo vetor repórter p53-luc, é praticamente indetectável. Como observado por análise de citometria de fluxo (figura 24.B), a linhagem A172 responde ao tratamento com DEX com um acúmulo progressivo da porcentagem das células nas fases G0/G1 do ciclo celular, apresentando um decréscimo na porcentagem tanto de células em S quanto em G2-M. Esta resposta é mais evidente após 48h de tratamento com 10^{-7} M DEX, quando a porcentagem de células em G0/G1 aumenta de 65% (controle) para cerca de 80% (DEX).

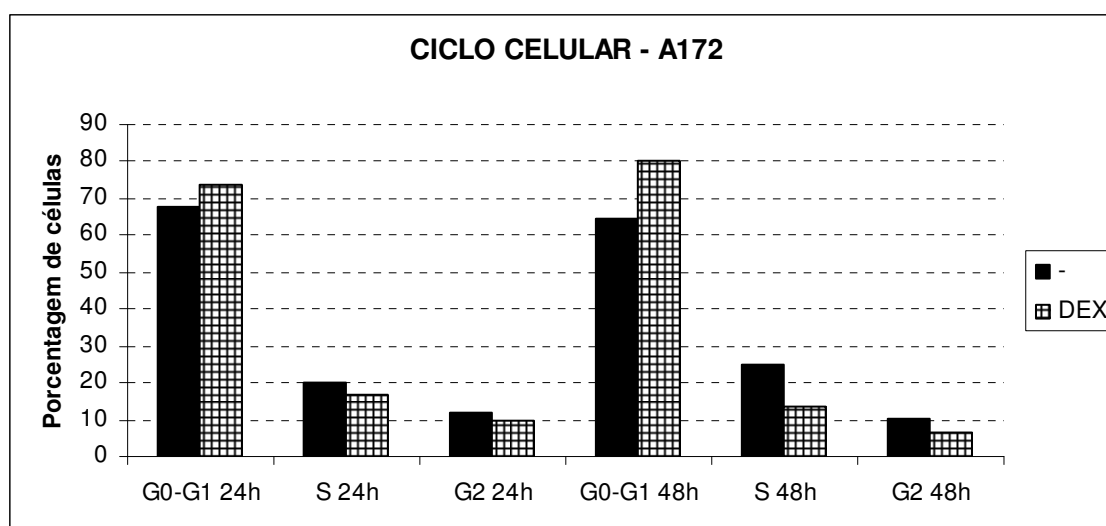
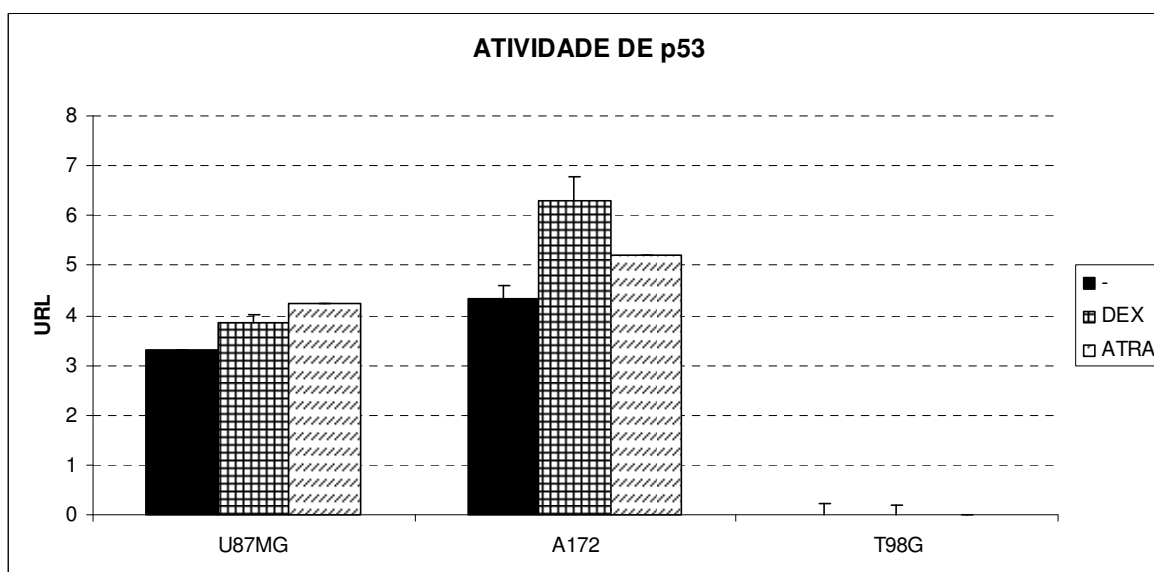


Figura 12: Atividade de p53 em células de glioma humano U87MG, A172 e T98G tratadas com DEX ou ATRA por 24h ou não tratadas e perfil de proliferação de células A172 sob tratamento com DEX.

A-Células U87MG, A172 e T98G foram co-transfectadas com o vetor repórter p53-luc e o vetor controle pRL-TK e tratadas ou não com 10^{-7} M DEX ou 10^{-5} M ATRA por 24h. A atividade de Luciferase foi normalizada pela atividade da Renilla Luciferase. Resultado de 2 experimentos independentes, realizados em duplicata. **B-** Análise, por citometria de fluxo, do padrão de distribuição no ciclo celular de células A172 tratadas com 10^{-7} M DEX por 24h ou 48h e seus respectivos controles.

3.2.9 Análise da Ação de Glicocorticóides e Ácido All-Trans Retinóico Sobre a Atividade Promotora de p21 e a atividade proliferativa das Linhagens HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-}

Na procura de modelos celulares humanos apresentando respostas semelhantes às de células ST1 a glicocorticóides e ácido retinóico e, ainda, para analisar a relevância de p53 na resposta a estes agentes, foram utilizadas a linhagem de carcinoma de cólon humano HCT116 p53^{+/+} e sua variante HCT116 p53^{-/-}, nula para p53. Primeiramente, a atividade promotora de p21 foi analisada em ambas as células utilizando a construção repórter p21-luc (El-Deiry, Tokino *et al.*, 1993), gentilmente cedida pelo professor Dr. Pedro Lazo (Centro de Investigación del Cáncer CSIC-Universidad de Salamanca, Salamanca, Espanha). A Figura 13.A mostra que a atividade promotora de p21 aumenta em resposta a ATRA, de forma dose-dependente, em células HCT116 p53^{+/+}, não havendo alteração em sua atividade nas células HCT116 p53^{-/-}, que é nula para p53, ou em qualquer uma destas células quando tratadas com diferentes concentrações de DEX. Esta resposta a ATRA mostra a influência de p53 na regulação da atividade promotora de p21 nestas células.

Para analisar a relevância desta modulação de p21 sobre a proliferação de células HCT116, foram realizados experimentos de incorporação de H³-timidina. Apesar da ativação do promotor de p21 pelo tratamento com ATRA, não houve modulação na incorporação de H³-timidina por ambas as células em nenhuma das concentrações de ATRA ou DEX usadas, conforme apresentado nos gráficos da Figura 13.B. Portanto, se não há alteração na proliferação das HCT116 p53^{+/+} por ATRA, mesmo havendo ativação do promotor de p21 pelo tratamento, estas células não são um modelo compatível com o de células ST1 para estudar os efeitos anti-tumorais de ATRA.

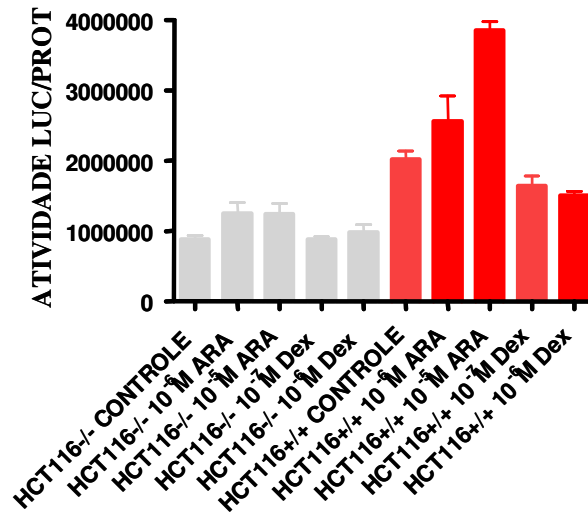
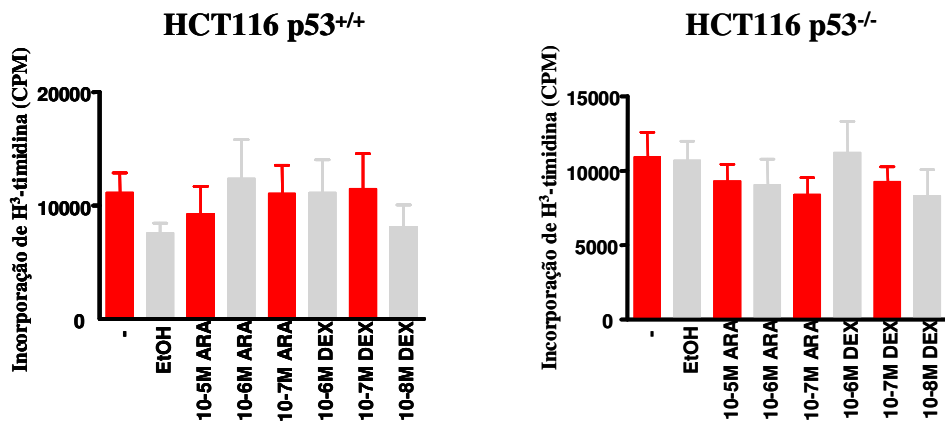
A**B**

Figura 13: Atividade promotora de p21 das células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} em resposta ao tratamento com DEX ou ATRA.

A-Atividade promotora de p21 foi medida através de ensaios de gene-repórter em células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} tratadas com Dex ou ATRA por 24h. Células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} foram transfectadas com o vetor repórter p21-luc e tratadas (ou não) com ATRA (10⁻⁶M ou 10⁻⁵M) ou DEX (10⁻⁷M ou 10⁻⁸M) por 24h. A atividade de Luciferase foi normalizada pela quantidade de proteínas dos lisados. B-Incorporação de H³-timidina em DNA por células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} tratadas com DEX ou ATRA por 48h. Células HCT116 p53^{+/+} e HCT116 p53^{-/-} foram plaqueadas em placas de 96 poços e tratadas (ou não) com ATRA (10⁻⁷M, 10⁻⁶M ou 10⁻⁵M) ou Dex (10⁻⁸M, 10⁻⁷M ou 10⁻⁶M) por 24h. 18h antes da lise, adicionou-se ao meio 0,25μCi/ml H³-timidina e 10⁻⁷M de timidina fria. A contagem de H³-timidina incorporada ao DNA foi medida por β-cintilador. Resultado de 1 experimento realizado em octuplicata.

3.3 Caracterização da Relevância de p53 Para a Resposta de Células ST1 a Glicocorticóides

Diferentes metodologias foram empregadas na tentativa de bloquear p53 de células ST1 e, assim, avaliar a relevância desta proteína para a responsividade destas células a GCs. Entre estas metodologias, serão apresentadas a transdução da proteína E6 de HPV-16, mediada por vetor retroviral, e a transdução de diferentes seqüências de siRNA (*small interfering RNA*), desenhados especificamente para p53 de rato, através de vetor lentiviral.

3.3.1 Transdução da Oncoproteína Viral E6 de HPV-16 e Avaliação de sua Capacidade de Modular os Níveis de p53 de Células ST1

O estudo dos processos moleculares envolvidos na indução de tumorigênese por vírus tumorais revelou que a proteína p53 era um alvo comum de inativação por oncoproteínas virais (Ko e Prives, 1996). Muitos trabalhos utilizaram, como ferramenta para o bloqueio de p53, a super-expressão de oncogenes virais, como E6 das formas tumorigênicas de HPV (16 e 18) em diversas linhagens celulares humanas (Munger, Baldwin *et al.*, 2004). A super-expressão destes oncogenes virais foi extensamente utilizada, à princípio, pelo seu potencial de imortalizar culturas primárias de células. Posteriormente, a expressão ectópica de alguns proto-oncogenes virais passou a ser utilizada para melhor caracterizar o papel fisiológico de p53.

O vetor retroviral pLXSN-16E6, que contém um cassete de expressão de E6 de HPV-16, e o correspondente vetor vazio (pLXSN) (Halbert, Demers *et al.*, 1991), foram gentilmente cedidos pela Dra. Denise Galloway (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA, EUA) e doados ao nosso laboratório por intermédio do pesquisador

Dr. Enrique Boccardo (Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo), que já havia trabalhado com estes vetores.

Para a produção dos retrovírus recombinantes, foram utilizadas duas linhagens empacotadoras, a Phoenix-Eco, linhagem ecotrópica humana derivada de HEK-293 e a Am12, linhagem derivada de fibroblastos NIH-3T3 que super-expressa o gene *env* anfotrópico (Markowitz, Goff *et al.*, 1988). Primeiramente, a linhagem Phoenix-Eco foi transfectada com os vetores retrovirais pLXSN, pLXSN-16E6 e pLPCX-EGFP. Este último vetor, que contém um cassete de expressão do gene EGFP, foi utilizado como controle para avaliar a eficiência de produção viral e de transdução das células de interesse, por meio do gene repórter EGFP. O sobrenadante viral ecotrópico, coletado das culturas transfectantes de Phoenix-Eco, foi usado para infectar a linhagem Am12. Uma vez transduzidas, estas células foram selecionadas com 0,8mg/ml G418 (Geneticina) por um período de duas semanas. As populações resultantes são linhagens empacotadoras estáveis, dos respectivos retrovírus. As figuras 14.A e 14.B mostram a alta eficiência de transdução das células Am12 pelo retrovírus pLPCX-EGFP, mesmo na ausência de seleção por G418.

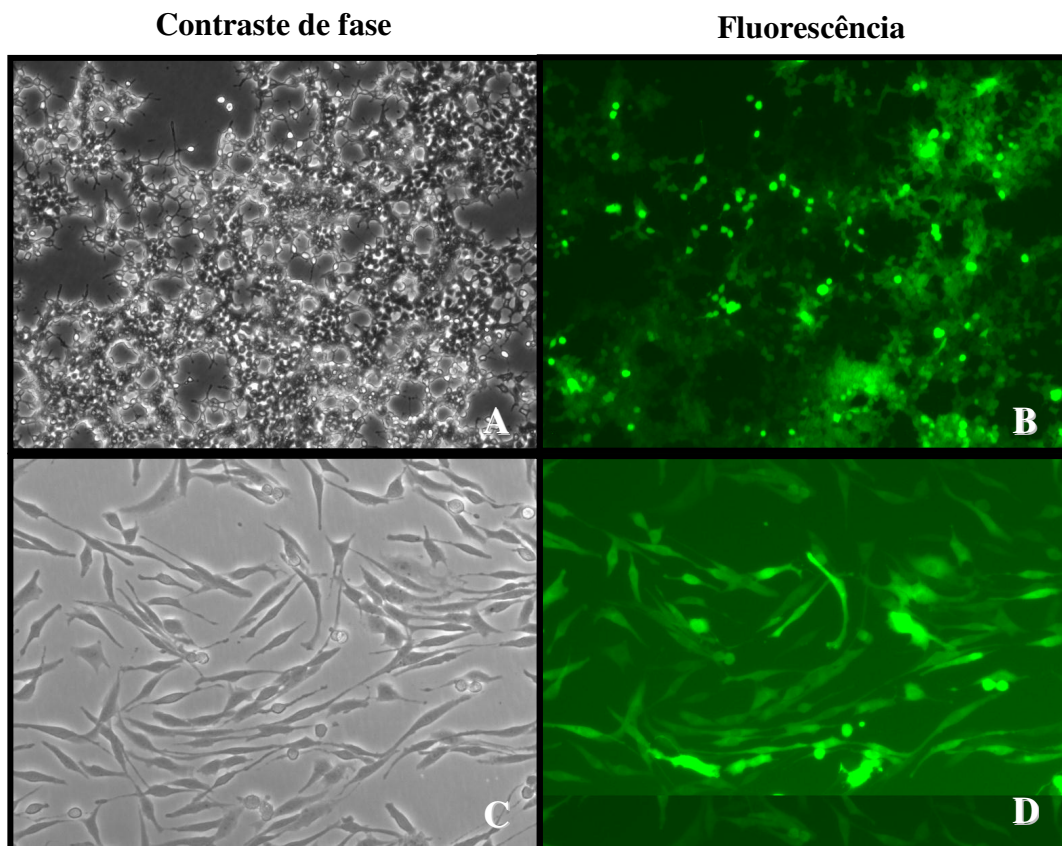


Figura 14: Microscopia das células Am12 e ST1 transduzidas pelo retrovírus pLPCX-EGFP.

Células empacotadoras Am12 (A e B) foram transduzidas pelo retrovírus pLPCX-EGFP e selecionadas com 0,8mg/ml G418 por duas semanas. O sobrenadante viral foi usado para transduzir células ST1 (C e D), atingindo 100% de eficiência de transdução.

Os sobrenadantes virais provenientes das linhagens empacotadoras derivadas de Am12 foram, então, utilizados para a transdução de células ST1. Um alto título viral foi alcançado através deste procedimento, sendo que se obteve a transdução da totalidade das células ST1 pelo vírus pLPCX-EGFP, como apresentado nas figuras 14.C e 14.D. Durante o trabalho de Doutorado do então doutorando deste laboratório Marcos Ângelo Demasi, a maior eficiência de transdução de células ST1 atingida com este mesmo vetor foi de cerca de 80%, após concentração do sobrenadante viral por centrifugação e empregando um MOI de 100 (Demasi, 2005). Desta forma, o estabelecimento de linhagens estáveis de células Am12 empacotadoras parece ser a melhor opção encontrada até o presente para a produção de partículas retrovirais e transdução de células ST1.

Após duas semanas de seleção das células ST1-pLXSN e ST1-pLXSN-16E6 com 1mg/ml G418, as populações resultantes foram expandidas e o efeito da expressão de E6 sobre p53 foi analisado por ensaios de gene-repórter e Western Blotting. Células ST1 parentais e as populações infectadas ST1-EGFP, ST1-pLXSN e ST1-pLXSN-16E6 foram tratadas com 10^{-5} M ácido *all-trans* retinóico (ATRA) ou com 10 μ g/ml mitomicina C (MMC), dois agentes sabidamente capazes de induzir p53 em células ST1, por um período de 24h. Desta forma, a eficiência de E6 para o bloqueio da atividade tanto basal quanto estimulada de p53 foi avaliada, como apresentado na figura 15. Nenhuma diferença significativa na atividade de p53 foi observada, em qualquer uma destas condições. O tratamento das células com alta concentração de MMC provocou a morte de muitas células, gerando um desvio padrão exacerbado nesta condição. Os níveis protéicos de p53 foram avaliados, por Western Blotting, nestas populações, mostrando que a expressão de E6 não induziu a degradação de p53 (figura 16).

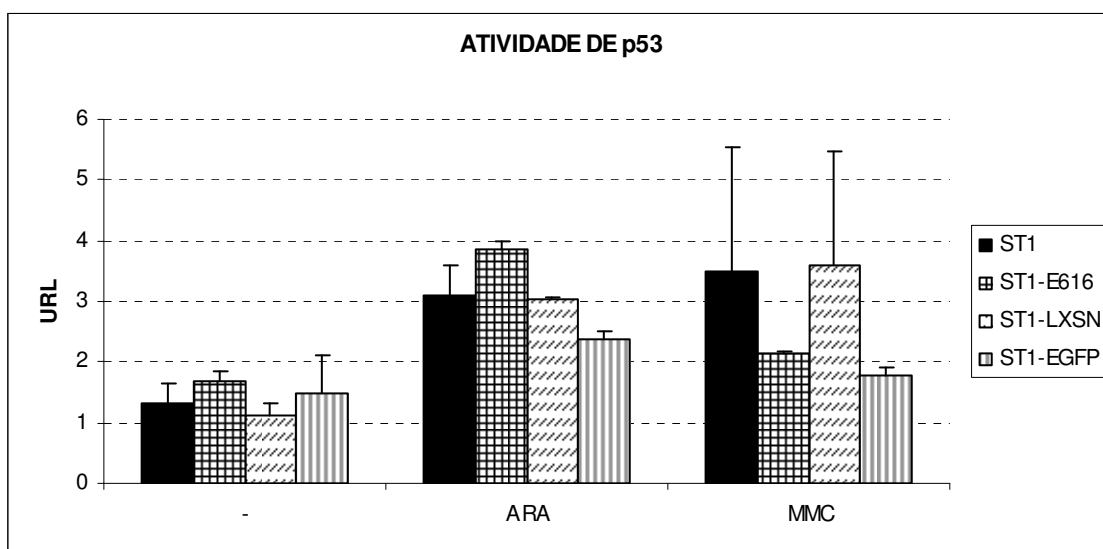


Figura 15: Atividade de p53 das populações de células ST1 transduzidas com os retrovírus pLXSN, pLXSN-16E6, pLPCX-EGFP ou não transduzidas, sob tratamento com ARA ou MMC.

A atividade de p53 das populações de células ST1 transduzidas com os retrovírus pLXSN, pLXSN-16E6, pLPCX-EGFP ou não transduzidas foi medida através de ensaios de gene repórter. As populações foram co-transfectadas com o vetor repórter p53-luc e o vetor controle pRL-TK e, 24h após a transfecção, as células foram tratadas por 24h com 10^{-5} M ATRA, $10\mu\text{g/ml}$ MMC ou não tratadas. Após a lise, a atividade de Luciferase foi quantificada e normalizada pela atividade de Renilla Luciferase (URL).

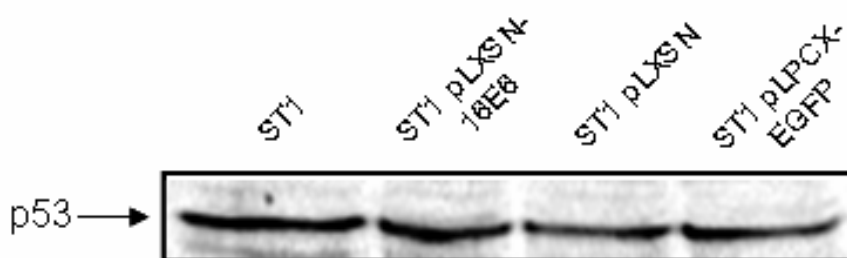


Figura 16: Análise dos níveis de p53 nas populações infectantes de ST1.

As populações de células ST1 foram transduzidas com os retrovírus pLXSN, pLXSN-16E6, pLPCX-EGFP ou não transduzidas. Após duas semanas de seleção por G418 (1mg/ml), as células foram lisadas e $50\mu\text{g}$ do extrato protéico nuclear de cada amostra foi resolvido em gel 12% SDS-PAGE. O ensaio de Western blotting foi realizado com o anticorpo monoclonal anti-p53 (1C12- Cell Signalling), na diluição de 1:2.000. A banda indicada, de 53KDa, representa a proteína p53.

3.3.2 Clonagem, Transdução e Teste de siRNAs Específicos para p53 Murino em Células ST1

A metodologia de bloqueio da expressão gênica por meio de siRNA (“small interfering RNA”) foi adotada, na tentativa de analisar a relevância de p53 na resposta das células ST1 a Hy. Esta forma de bloqueio gênico vem se mostrando muito eficiente. Ao contrário da metodologia de RNA de interferência (RNAi), que emprega longos RNAs dupla fita, com mais de 50pb, os siRNA são compostos por uma pequena seqüência (~20b) complementar a uma região do transcrito do gene de interesse, uma curta seqüência como espaçador e a seqüência reversa-complementar à primeira, formando uma estrutura em forma de “hairpin”, seguida por um sinal de “stop codon” para a RNA polimerase III. Devido ao reduzido tamanho do siRNA, nenhuma resposta celular inespecífica pela via do interferon é desencadeada, como acontece em muitos casos no emprego de RNAi (Elbashir, Harborth et al., 2001). Esta metodologia, aliada à entrega gênica lentiviral, de alta eficiência e com a vantagem de integração genômica em células que não estão em divisão, representa uma ferramenta poderosa para o bloqueio gênico específico.

O vetor lentiviral escolhido para a clonagem dos óligos de siRNA foi o p156RRLsinPPTCMV-GFP-PRE/NheI (Tiscornia, Singer *et al.*, 2003) (gentilmente cedido pelo Dr. Inder Verma - Salk Institute, CA e trazido ao laboratório pelo Dr. Ricardo Correa), denominado nesta tese como pLV. Este vetor contém um cassete de expressão de EGFP (“Enhanced Green Fluorescent Protein”), facilitando a titulação viral e permitindo avaliar sua transdução nas células de interesse, através da emissão de um sinal fluorescente verde por EGFP, quando as células são excitadas com um comprimento de onda de 395nm. Neste vetor, foram clonadas cinco seqüências distintas de siRNA, as quais foram desenhadas com base na seqüência da região codificante de

p53 de rato através de um programa disponível no site da empresa Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html), que seleciona uma lista das seqüências provavelmente mais eficazes para o bloqueio do gene em questão.

Como este vetor lentiviral não possui seqüências promotoras responsáveis à RNA Polimerase III (responsável pela transcrição de siRNAs), a estratégia de clonagem dos óligos de siRNA envolveu a amplificação do promotor H1 (responsível à RNA Pol III) juntamente às seqüências de siRNA. Para tanto, os iniciadores desenhados para amplificar o promotor H1 continham as seqüências dos siRNAs de interesse. Usando como “template” para a reação de PCR, um vetor pSUPER-Like, que contém o promotor H1, esta região promotora foi amplificada juntamente com os siRNAs. A figura 17 mostra os produtos de aproximadamente 350pb, resultado da amplificação de alguns dos siRNAs testados em fusão com o promotor H1.

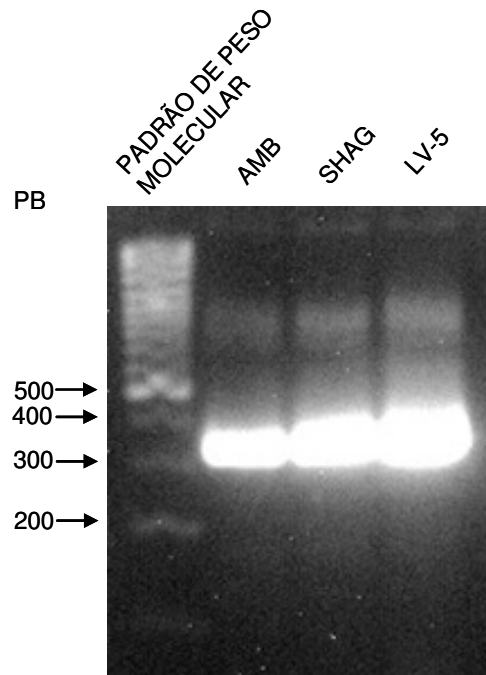


Figura 17. Fracionamento em gel de agarose do produto da PCR para amplificação do promotor H1 em fusão com os siRNAs desenhados para p53 de rato.

Os produtos da PCR foram fracionados em gel de agarose 2%. As bandas de cerca de 350pb indicam a amplificação do promotor H1 em fusão com os siRNAs desenhados para diferentes regiões de p53 de rato, denominados AMBIRATP53H1 (Amb), PSHAGRATP53H1 (Shag) e LV-5.

Das cerca de 50 colônias recombinantes rastreadas para cada um dos insertos, foi possível isolar apenas algumas colônias positivas para cada inserto. A figura 18 mostra o resultado de PCRs de colônia, nas quais os insertos Amb e Shag foram amplificados, indicando a possível clonagem destes no vetor pLV.

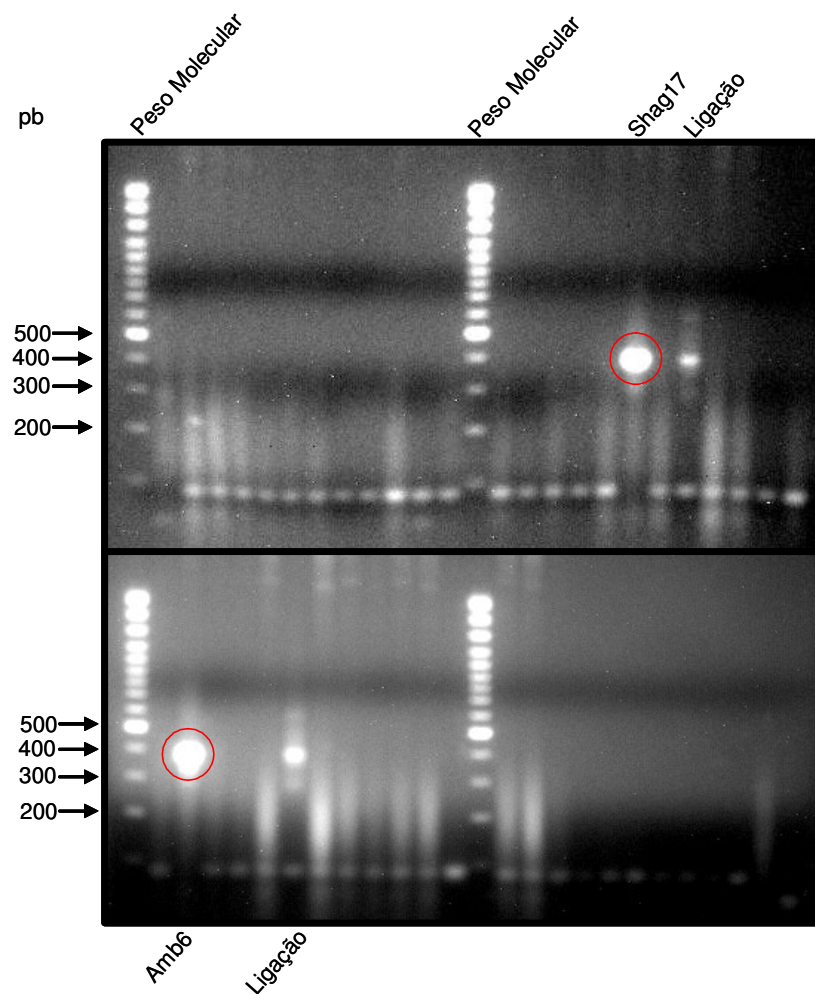


Figura 18: Fracionamento em gel de agarose dos produtos de PCR de colônia relativos ao rastreamento dos clones recombinantes contendo o promotor H1 e o siRNA para p53.

Os produtos de PCR de colônia foram fracionados em gel de agarose a 2%. As bandas de cerca de 380pb circulasadas em vermelho indicam os dois clones que contêm o inserto (promotor H1 e o siRNA para p53), sendo um positivo para o siRNA Shag (Shag17) e outro para o siRNA Amb (Amb6). As bandas de mesmo peso molecular localizadas nas canaletas indicadas como “ligaçào” foram amplificadas a partir da reação de ligaçào dos insertos com o vetor pLV, servindo como controle positivo da reação de PCR.

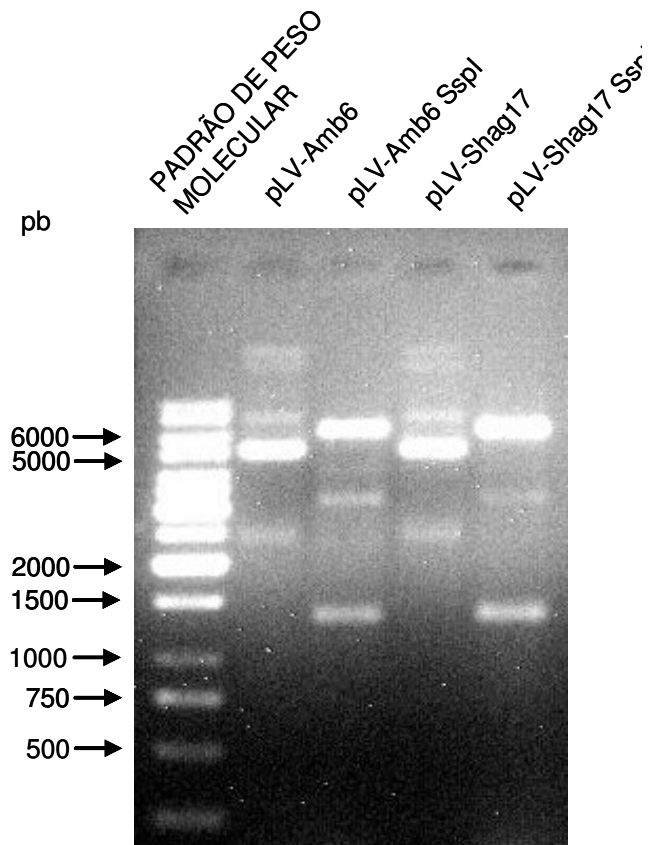


Figura 19: Fracionamento em gel de agarose dos produtos da digestão dos clones recombinantes Amb6 e Shag17 com a enzima SspI.

Os vetores pLV-Amb6 e pLV-Shag17, bem como os produtos das reações de digestão com a enzima SspI (pLV-Amb6 SspI e pLV-Shag17 SspI), foram fracionados em gel de agarose a 0,8%. As bandas de cerca de 6Kpb e 1,4Kpb, geradas pela digestão dos clones com SspI, confirmam a clonagem dos insertos correspondentes.

Após seleção das construções recombinantes, a linhagem 293T, variante de HEK-293 transformada pelo antígeno LT de SV40 que apresenta alta eficiência de transfecção e produz altos títulos virais, foi adotada como linhagem empacotadora. As construções lentivirais foram co-transfectadas com os vetores estruturais pMDL, pREV e pVSVG. Este sistema de empacotamento emprega a formação do envelope viral

heterólogo VSVG (“vesicular stomatitis virus G-glicoprotein”), que confere às partículas virais um amplo tropismo a células de diferentes espécies. Após a produção das partículas virais em células 293T, o título viral foi estabelecido nestas mesmas células, como apresentado na figura 20. Os títulos virais obtidos eram, tipicamente, da ordem de 10^6 UI/ml (Unidades Infecciosas/ml).

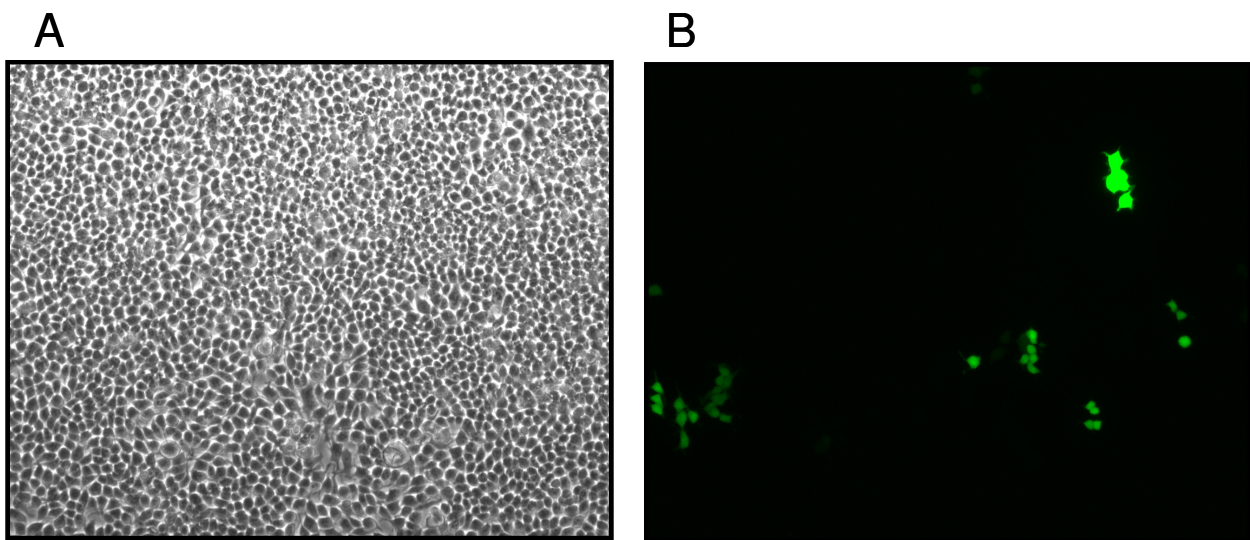


Figura 20: Titulação lentiviral em células 293T.

Células 293T foram plaqueadas em placas de 6 wells (105 células/well) e amostras de diferentes diluições (10-2, 10-3, 10-4) dos sobrenadantes das células empacotadoras, contendo partículas virais, foram adicionadas ao meio de cultura. 48h após a adição, o meio foi removido e PBSA foi adicionado às placas. As células foram analisadas sob microscópio de fluorescência em luz branca (A), ou luz UV (B). As figuras representam um campo da diluição de 10-4. As células verdes em B refletem a transdução viral, pela expressão de EGFP.

Para confirmar a clonagem destes insertos, os plasmídeos recombinantes foram preparados e digeridos com a enzima de restrição SspI. Esta digestão gerou dois fragmentos, sendo um de aproximadamente 6Kpb e outro de aproximadamente 1,4Kpb, conforme esperado (figura 19).

De forma geral, células ST1 foram transduzidas usando MOIs da ordem de 100 a 200. Quando MOIs mais baixos foram usados, as populações não foram 100% transduzidas, tendo sido submetidas a um procedimento de “cell sorting” para o enriquecimento de células EGFP positivas. Primeiramente, duas das construções estabelecidas, Amb6 e Shag17, foram testadas em relação ao bloqueio de p53 em células ST1. Para tal, experimentos de Western blotting e de gene-repórter foram empregados (figura 21). Como controle para o processo de infecção e de siRNA, as células foram infectadas com lentivírus produzidos a partir do vetor viral pLV-siEGFP, que possibilita a expressão de um siRNA não relacionado com p53 (EGFP). Apesar do aparente ligeiro bloqueio da construção Amb6 sobre os níveis de p53 (21.A) e sobre sua atividade, basal ou estimulada por MMC (21.B), a redução dos níveis protéicos e da atividade de transativação de p53 não foram satisfatórias. Portanto, três novas seqüências de siRNA foram desenhadas e clonadas no vetor pLV e sua eficiência no bloqueio de p53 foi testada em células ST1. A figura 22 mostra a microscopia das populações de células ST1 transduzidas pelas diferentes construções lentivirais.

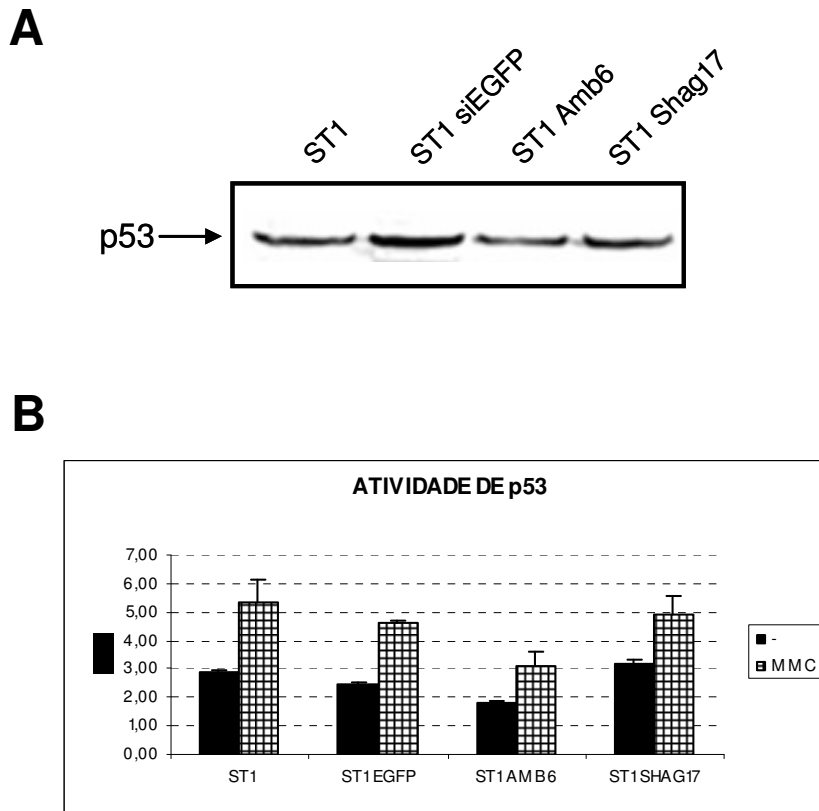


Figura 21: Avaliação da eficiência dos siRNAs sobre o bloqueio de p53 de células ST1.

Células ST1 foram transduzidas pelos lentivírus LV-siEGFP, Amb6 ou Shag17. **A-** Após duas semanas de expansão das culturas, as células foram lisadas e 50µg do extrato protéico nuclear de cada amostra foi resolvido em gel 12% SDS-PAGE. O ensaio de imunoblotting foi realizado com o anticorpo monoclonal anti-p53 (1C12- Cell Signalling), na diluição de 1:2000. A banda indicada, de 53KDa, representa a proteína p53. **B-** A atividade de p53 das populações de células ST1 transduzidas, ou não transduzidas, foi medida através de gene repórter. As populações foram co-transfectadas com o vetor repórter p53-luc e o vetor controle pRL-TK e, 24h após a transfecção, tratadas com 2µg/ml MMC, ou não tratadas, por 24h. As células foram lisadas e a atividade de Luciferase foi quantificada e normalizada pela atividade de Renilla Luciferase (URL).

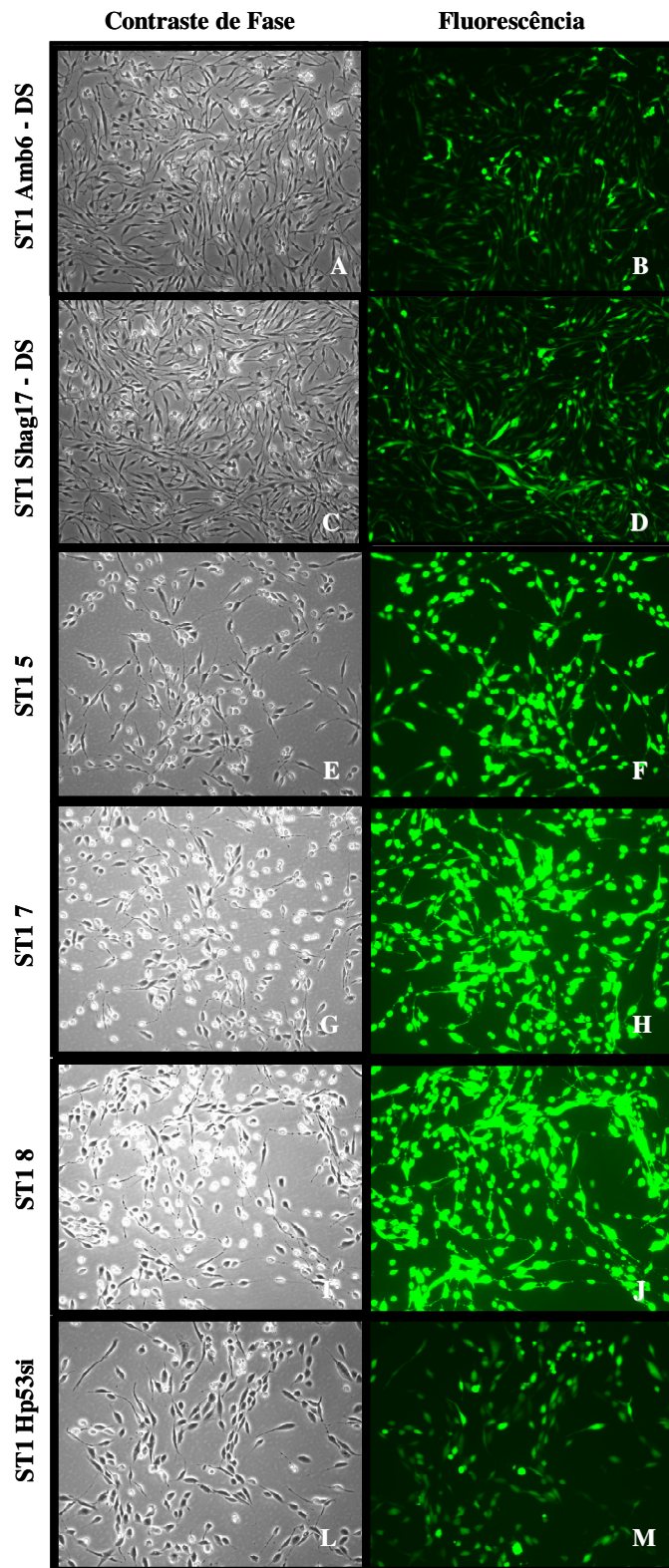


Figura 22: Microscopia das populações de células ST1 transduzidas pelos lentivírus LV-Amb6, -Shag17, -5, 7, 8 ou Hp53si.

Células ST1 foram transduzidas pelos lentivírus LV-Amb6, -Shag17,-5, 7, 8 ou Hp53si. As populações celulares foram analisadas em microscopia de contraste de fase e de fluorescência, na qual o sinal verde reflete a transdução viral, pela expressão de EGFP.

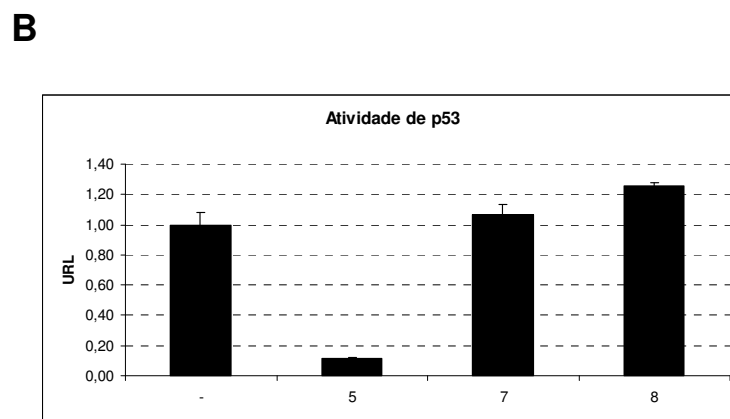
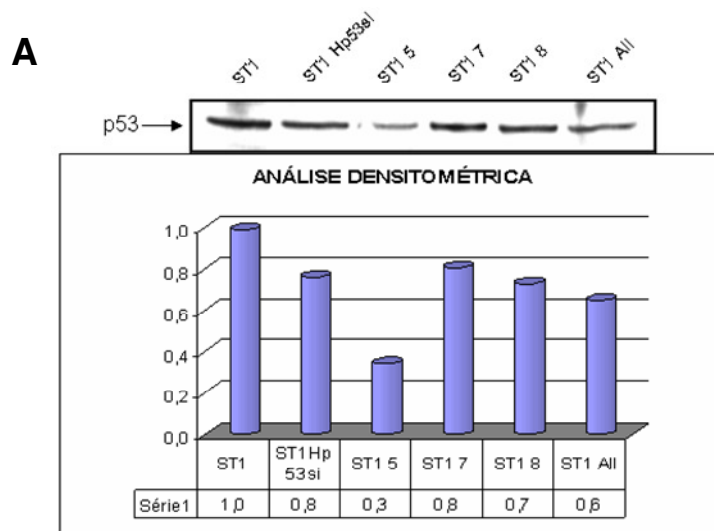


Figura 23: Avaliação da eficiência dos siRNAs sobre o bloqueio de p53 de células ST1.

Células ST1 foram transduzidas pelos lentivírus LV-5, 7, 8, Hp53si ou por todos estes conjuntamente (ST1 All). **A-** Após duas semanas de expansão das culturas, as células foram lisadas e 50µg do extrato protéico nuclear de cada amostra foi resolvido em gel 12% SDS-PAGE. O ensaio de imunoblotting foi realizado com o anticorpo monoclonal anti-p53 (1C12- Cell Signalling), na diluição de 1:2.000. A banda indicada, de 53KDa, representa a proteína p53. O sinal das bandas foi quantificado através do programa ImageQuant e os resultados estão expressos no gráfico acima. **B-** A atividade de p53 das populações de ensaios de células ST1 transduzidas, ou não transduzidas, foi medida através de gene repórter. As populações foram co-transfectadas com o vetor repórter p53-luc e o vetor controle pRL-TK e, 48h após a transfecção, as células foram lisadas e a atividade de Luciferase foi quantificada e normalizada pela atividade de Renilla Luciferase (URL).

Juntamente a estas três novas construções (denominadas LV-5, 7 e 8), o vetor pLV-siHp53 (Tiscornia, Singer *et al.*, 2003), que contém um siRNA específico para p53 humano que difere em apenas uma base em relação à complementariedade com a sequência de p53 de rato, foi testado em células ST1. Conforme apresentado na figura 23, apenas a construção LV-5 foi efetivamente capaz de bloquear p53 de células ST1. A transdução deste siRNA reduziu os níveis protéicos de p53 para apenas 30% do basal (figura 23.A), resultando num bloqueio de cerca de 90% de sua atividade de transativação (figura 23.B). A população de células ST1 transduzida com o siRNA LV-5 foi denominada ST1-siP53 e, após esta primeira caracterização, a população foi re-infectada com uma carga viral similar à primeira, a fim de intensificar o bloqueio de p53. A atividade de transativação de p53 nesta população foi analisada, ainda, durante a administração de 100ng/ml Hy ou 10^{-5} M ARA por 24h, através de dois vetores-repórter: p53-luc, que contém um promotor artificial compreendido por 14 repetições *in tandem* de um elemento responsivo a p53; e p21-luc, que contém aproximadamente 2,5Kb da região promotora de p21 humano, incluindo elementos responsáveis a p53, dirigindo a expressão de Luciferase (El-Deiry, Tokino *et al.*, 1993).

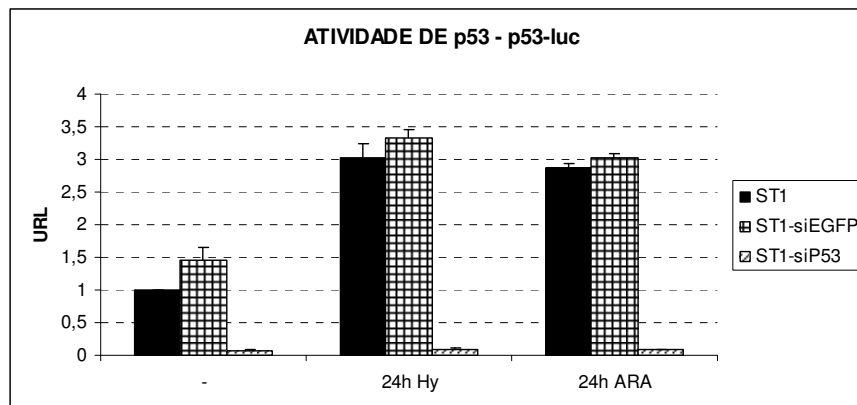
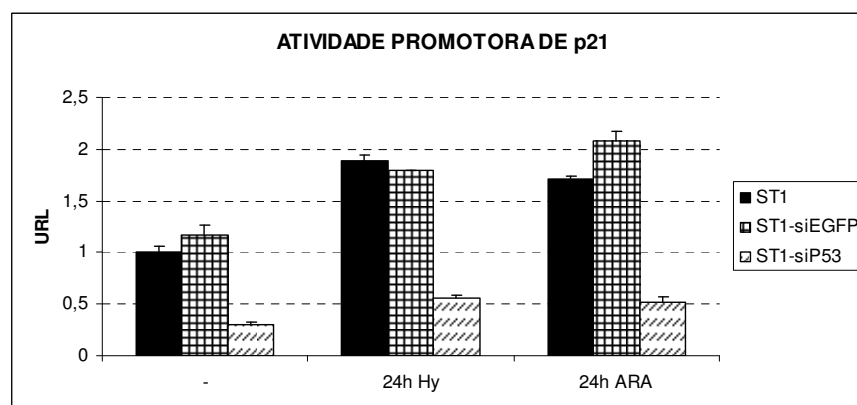
A**B**

Figura 24: Atividade de p53 e promotora de p21 de células ST1 e das populações ST1-siEGFP e ST1-siP53, sob tratamento com Hy ou ARA.

A atividade de p53 (A) e promotora de p21 (B) das populações de células ST1 transduzidas pelos lentivírus LV-siEGFP ou LV-5, ou não transduzidas, foi medida através de gene repórter. As populações foram co-transfectadas com o vetor repórter p53-luc (A), ou o vetor p21-luc (B) e o vetor controle pRL-TK e, 24h após a transfecção, tratadas com 100ng/ml Hy ou 10^{-5} M ARA, ou não tratadas, por 24h. As células foram lisadas e a atividade de Luciferase foi quantificada e normalizada pela atividade de Renilla Luciferase (URL).

Conforme apresentado na figura 24.A, a re-infecção da população ST1-siP53 com o lentivírus LV-5 reduziu ainda mais a atividade de transativação de p53, para menos de 5% de sua atividade basal. Interessantemente, os tratamentos com Hy ou ARA não foram capazes de induzir a atividade de p53, medida através das construções p53-luc (24.A) e p21-luc (24.B). Além disso, o promotor de p21 parece sofrer uma grande influência de p53 em células ST1, já que o bloqueio deste reduz sua atividade para cerca de 30% da atividade basal (24.B). O tratamento destas células com Hy ou ARA induz a atividade promotora de p21 de maneira similar (entre 1,5 a 2 vezes). Na ausência de p53 (ST1-siP53), ainda há uma indução da atividade deste promotor, sugerindo o envolvimento de outros fatores em sua regulação. Contudo, a atividade promotora de p21, durante o tratamento celular com os dois agentes, é cerca de 3 vezes menor na ausência de p53 do que em células ST1 parentais ou ST1-siEGFP.

3.3.3 Análise da Resposta da População ST1-siP53 a Glicocorticóide

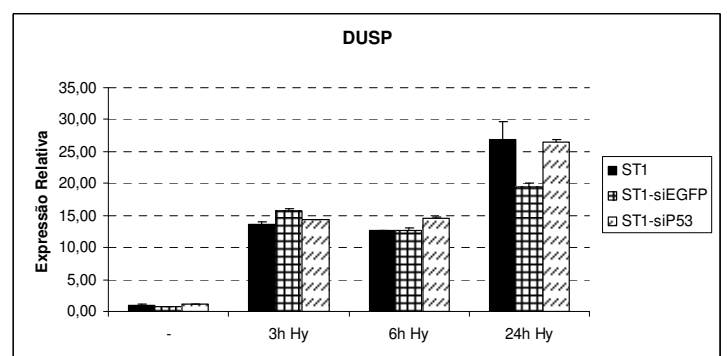
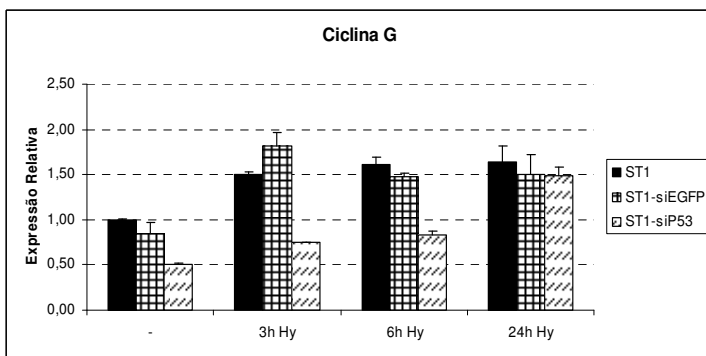
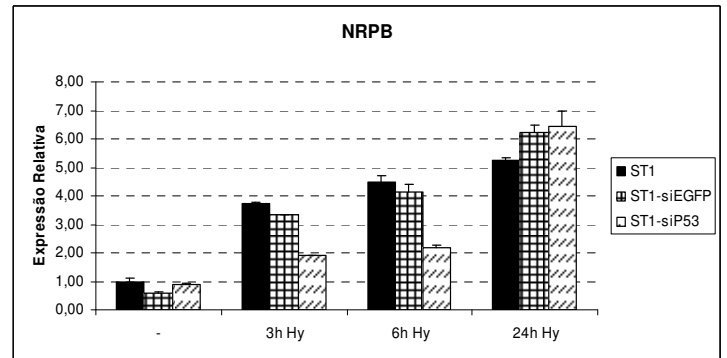
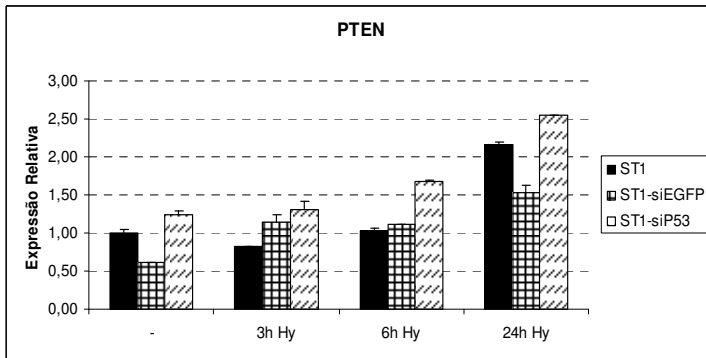
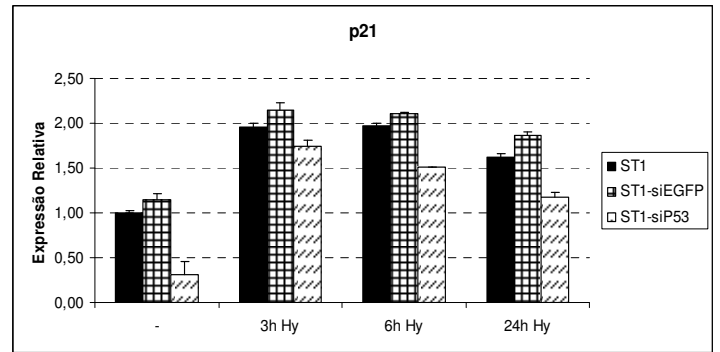
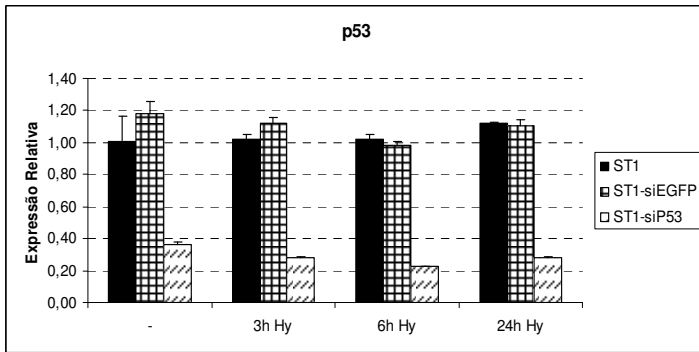
Com a obtenção de uma população deficiente para p53 derivada de células ST1, foi possível caracterizar se a participação de p53 na resposta destas células a Hy era efetiva. A expressão de alguns genes regulados por Hy em células ST1 foi analisada em células ST1-siP53, bem como sua resposta a Hy em relação à proliferação.

3.3.3.1 Análise da Expressão de Genes-Alvo de p53 em Resposta a Glicocorticóide na População ST1-siP53

Após validação, por diferentes metodologias, da eficiência da construção pLV-5 sobre o bloqueio de p53 de células ST1, foi possível avaliar o perfil de expressão de alguns genes-alvos de p53, alguns dos quais regulados por Hy, em células ST1-siP53. As células ST1 e seus variantes ST1-siEGFP e ST1-siP53, foram mantidas em baixa

concentração de SFB (0,2%) por 24h previamente em relação ao início dos tratamentos com 100ng/ml Hy por diferentes períodos de tempo. Em todos os experimentos de Q-PCR, foram utilizados, como controle calibrador, os resultados obtidos na condição ST1 controle (-) (figura 25). Os níveis de mRNA de p53 também foram avaliados por Q-PCR, havendo uma redução de 60 a 80% sob efeito do siRNA LV-5 (população ST1-siP53 em relação a ST1).

Foi possível observar que o bloqueio de p53 modulou a resposta de alguns dos genes estudados a Hy, em determinadas condições. Neste sentido, pode-se citar p21, cujo nível basal de seu mRNA é cerca de 60% menor em células ST1-siP53 em relação às células parentais sendo, contudo, induzido por Hy numa intensidade apenas ligeiramente mais baixa que em células ST1. A indução de NRPB, Ciclina G e PUMA em células ST1-siP53 parece ser reduzida nos primeiros tempos de tratamento com Hy, apresentando, contudo, os mesmos níveis de mensageiro que as células ST1 após 24h de tratamento. Embora haja outras pequenas diferenças entre os níveis de mRNA entre as células ST1-siP53 e ST1, estas são as mais expressivas, sendo que, aparentemente, os outros genes-alvo de p53 analisados (PTEN, BAX, MDM2 e DUSP1) não estão sob controle de p53 durante o tratamento com Hy. Os níveis de PP5, cuja expressão sabidamente não sofre influência de p53, também foram analisados, como um controle negativo. De fato, não há diferenças no perfil de expressão deste gene entre as diferentes populações. Contudo, este gene pareceu ser induzido por Hy progressivamente ao longo do tratamento, culminando com uma indução de 3 vezes sobre os níveis basais no ponto de 24h.



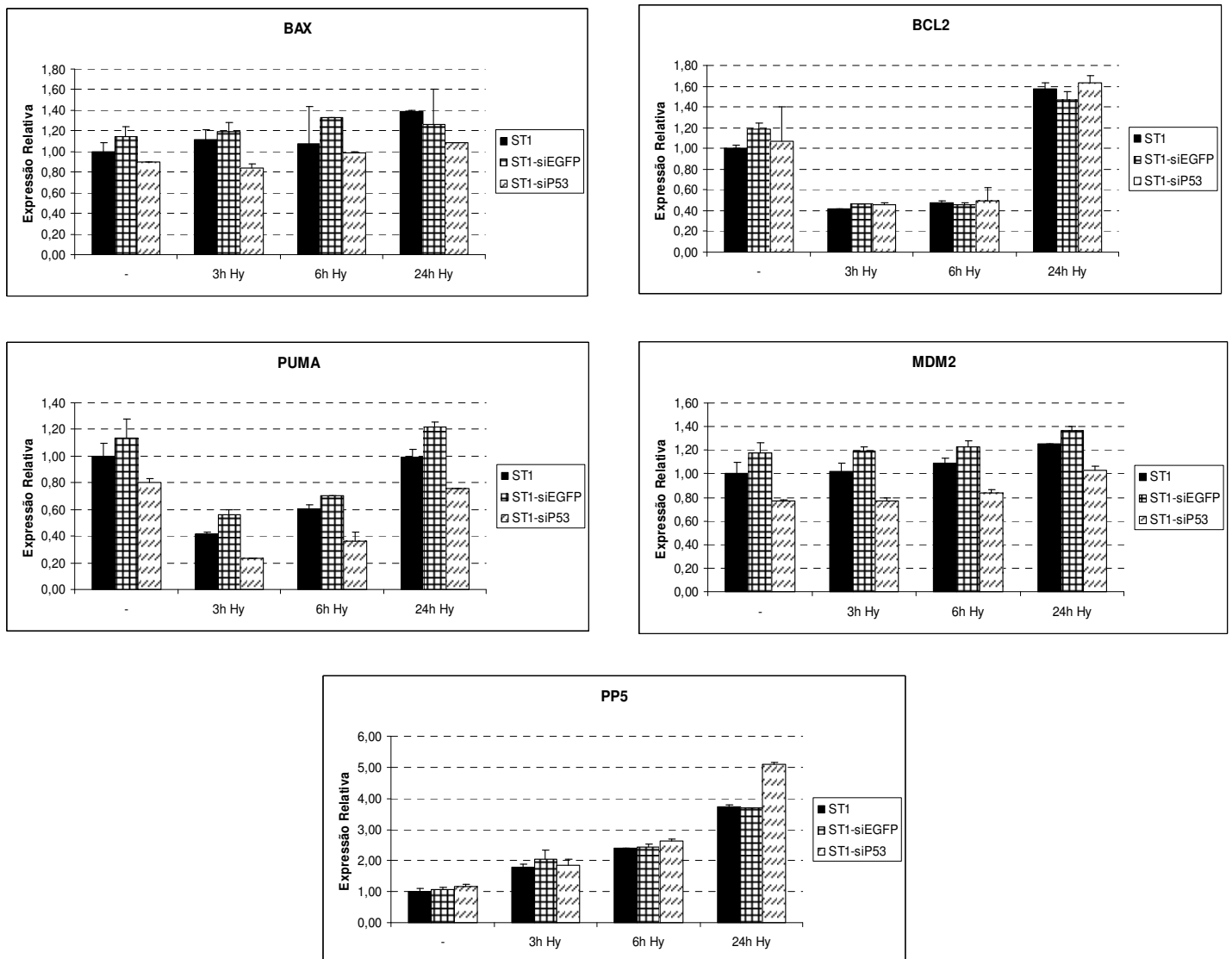


Figura 25: Perfil de expressão de genes-alvo de p53 em células ST1, ST1-siEGFP e ST1-siP53 em resposta ao tratamento com Hy.

Células ST1, ST1-siEGFP e ST1-siP53 foram mantidas em baixa concentração de SFB (0,2%) por 24h e tratadas com 100ng/ml Hy por diferentes períodos de tempo: 3, 6 ou 24h, ou não tratadas. A expressão de genes-alvo de p53 foi avaliada nestas condições por Q-PCR. Como normalizador para os cálculos de expressão relativa, foi usado o gene HPRT.

3.3.3.2 Análise da Proliferação de células ST1, ST1-siEGFP e ST1-siP53 em Resposta a Glicocorticóides

A resposta proliferativa das células ST1siP53, deficientes para p53, a Hy, foi analisada através de duas metodologias diferentes: curva de crescimento e análise de ciclo celular por citometria de fluxo. De acordo com os resultados apresentados na figura 26, o bloqueio de p53 não foi suficiente para impedir a resposta antiproliferativa de Hy nas células ST1. A taxa de crescimento das populações ST1-siEGFP e ST1-siP53 são similares, tanto na ausência quanto na presença do hormônio (26.A), sendo que ambas as populações sofrem uma parada de proliferação marcante quando tratadas com Hy. Esta parada de proliferação é caracterizada pela diminuição da porcentagem de células na fase S e G2 do ciclo celular e o acúmulo das células em G0/G1, nas três populações estudadas (26.B). A figura 26.B representa a definição das fases do ciclo celular de células ST1 no histograma, na ausência (área com preenchimento em vermelho) ou na presença de Hy (área bordeada sem preenchimento).

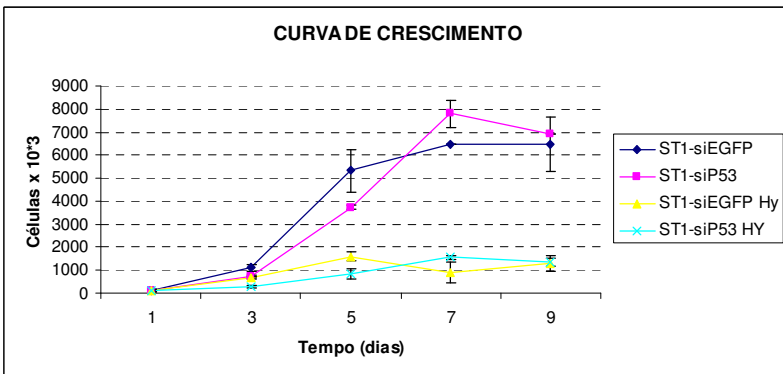
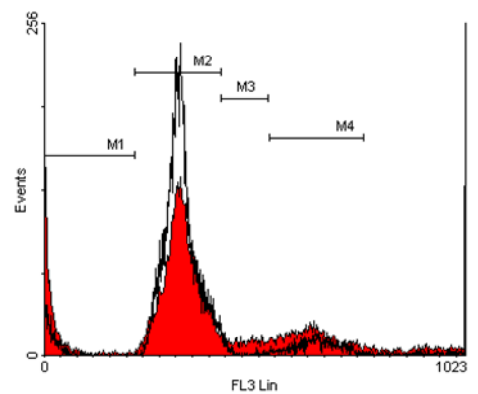
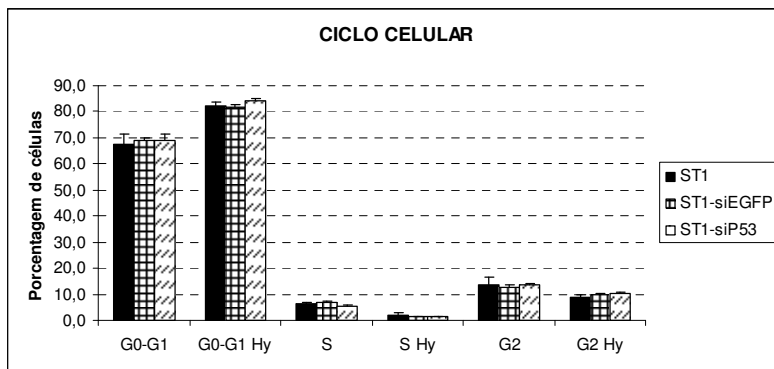
A**B**

Figura 26: Resposta proliferativa das populações ST1, ST1-siEGFP e ST1-siP53 a Hy.

A- Curvas de crescimento das células ST1 e das populações ST1-siEGFP e ST1-siP53 na ausência ou na presença de 100ng/ml hidrocortisona. Foram plaqueadas 5×10^4 células em duplicata, que foram mantidas em meio DMEM-SFB 5%. As coletas foram feitas nos períodos de tempo indicados no gráfico. Foram feitos dois experimentos independentes. **B-** Análise, por citometria de fluxo, do padrão de distribuição no ciclo celular das células ST1, ST1-siEGFP e ST1-siP53, carenciadas em meio DMEM-SFB 0,2% por 24h e tratadas com hidrocortisona (100ng/ml) por 24h em meio DMEM-SFB 0,2%.

4. DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da Funcionalidade de p53 em Resposta a Glicocorticóides

Para melhor elucidar o mecanismo de ação de hormônios glicocorticóides (GCs) e as bases moleculares de seu potencial anti-tumoral, nosso laboratório vem utilizando, como modelo, a linhagem celular C6, obtida de um glioma de rato induzido quimicamente por metilnitrosouréia (Benda, Lightbody *et al.*, 1968), e seus variantes ST1 e P7, isolados pelo nosso grupo de pesquisa por suas respostas distintas ao tratamento com glicocorticóides (Armelin e Armelin, 1983; Valentini, Oliveira *et al.*, 1994; Armelin, Oliveira *et al.*, 1996; Valentini e Armelin, 1996). O clone ST1 apresenta uma resposta dramática ao tratamento com o glicocorticóide hidrocortisona (Hy), passando de um fenótipo transformado e tumoral para normal, isto é, passa a ter sua proliferação regulada por fatores de crescimento e torna-se incapaz de crescer em suspensão ou de gerar tumores em animais, enquanto o clone P7 mantém o mesmo caráter transformado e tumorigênico, tanto na ausência como na presença de hidrocortisona (Armelin, Stocco *et al.*, 1983).

Dados anteriores do nosso laboratório sugeriam o envolvimento de p53 na resposta de ST1 a Hy, como a indução do acúmulo das células na fase G0/G1 do ciclo celular (Mercado, 1997) e o aumento da expressão de alguns genes-alvo de p53, como trombospondina-1 (tsp-1) e Ciclina G (CycG) (Vedoy e Sogayar, 2002). No intuito de se obter uma maior compreensão do envolvimento de p53 na resposta antiproliferativa a hormônios glicocorticóides, diversas características funcionais de p53 foram analisadas nestas células de glioma de rato, que apresentam diferentes respostas a GCs. Inicialmente, a atividade de p53 foi comparada entre estas linhagens, tanto em condições basais quanto em resposta à Hy. A atividade basal de ligação de p53 a

elementos responsivos no DNA, avaliada por EMSA, é equivalente entre a linhagem responsável (ST1) e a linhagem resistente (P7) ao hormônio. Contudo, o tratamento com Hy induz a capacidade de ligação ao DNA apenas em p53 de células ST1 (figura 2), o que reflete diretamente um aumento na sua atividade de transativação nestas células (figura 4).

Após avaliar a especificidade da resposta do vetor repórter p53-luc a p53 (figura 3), ensaios de gene-repórter evidenciaram uma maior atividade basal de p53 (2 vezes) em células ST1, quando comparadas a células P7. Contudo, além de ambas as linhagens apresentarem p53 selvagem (avaliado neste estudo), os níveis desta proteína são iguais entre as duas células (figura 5), assim como a ligação de p53 ao DNA em situação basal, o que indica a influência de outros fatores sobre a atividade de p53. De fato, a atividade de p53 é influenciada por um grande número de co-ativadores e co-repressores (Jin e Levine, 2001). Entre estes, complexos remodeladores de cromatina, como SWI/SNF, que são reguladores fundamentais da atividade de p53 (Lee, Kim *et al.*, 2002). Dados obtidos anteriormente em nosso laboratório (Ortis, 2002) indicam que células ST1 apresentam maiores níveis de transcritos de *rBrm*, homólogo de rato do gene *SWI2/SNF2* de *S. cerevisiae*, em comparação a células P7. A expressão deste gene é induzida por Hy apenas em células ST1; contudo, os níveis protéicos de rBrm em células P7, que apresenta níveis praticamente indetectáveis de seu transcrito, são elevados e constantes durante o tratamento com Hy, sugerindo que haja alguma mutação que leve à estabilização e perda de função desta proteína nestas células, como já foi descrito na literatura (Muchardt e Yaniv, 1993). Além disso, a composição do complexo SWI/SNF parece diferir entre células ST1 e P7 (Ortis, 2002). Estas observações sugerem, pelo menos em parte, o possível envolvimento do complexo SWI/SNF nas diferenças de atividade transcricional de p53 entre estas duas linhagens,

já que este complexo é necessário para sua atividade, mesmo quando avaliada através de vetores repórter na forma episomal, na ausência de um envolvimento da organização da cromatina (Lee, Kim *et al.*, 2002).

A ativação de p53 por Hy apenas em células ST1, responsáveis ao hormônio, sugere o envolvimento desta proteína na resposta antiproliferativa. É interessante notar que os níveis citoplasmáticos e nucleares de GR em células ST1, tanto em condições basais quanto durante a resposta a Hy, são maiores do que em células P7 (figura 1). Como mencionado anteriormente, resultados prévios de nosso laboratório compararam a atividade do promotor de MMTV, responsável a GCs, entre células C6, ST1 e P7. A atividade promotora, que, em última instância, pode refletir a atividade de GR, é induzida cerca de cinco vezes tanto em células ST1 quanto em células P7. Contudo, sua atividade em células ST1 é cerca de 20 vezes maior do que em P7 (V. Martins, dados não publicados). Provavelmente, os diferentes níveis de GR destas linhagens contribuem para tamanha diferença de atividade, mas certamente outros fatores devem estar envolvidos. Entre estes, a expressão de GR- β , que exerce um papel dominante-negativo sobre GR- α por diferentes mecanismos, como heterodimerização e competição com GR- α pelos GREs ou pelos seus coativadores (Bamberger, Bamberger *et al.*, 1995; Charmandari, Chrousos *et al.*, 2005). Além disso, a fosforilação de resíduos de serina, localizados na porção N-terminal de GR, pode modular positiva ou negativamente sua atividade transcricional, além de controlar seu tráfego intracelular (Itoh, Adachi *et al.*, 2002). Contudo, talvez a observação mais relevante para este estudo seja a correlação positiva entre os níveis de expressão/ativação de GR nestas linhagens e a atividade de p53.

Os mecanismos envolvidos na indução de p53 por GCs descritos na literatura, enquanto este trabalho estava sendo desenvolvido, são a fosforilação e a internalização nuclear de p53 (Crochemore, Michaelidis *et al.*, 2002; Urban, Golden *et al.*, 2003). De fato, foi observada a participação destes dois eventos durante a ativação de p53 de células ST1 por Hy. A fosforilação da Ser15 de p53, que acontece durante as primeiras horas de tratamento com Hy (figura 6), é bem caracterizada em resposta a danos ao DNA. Nesta situação, são conhecidas pelo menos três quinases que catalizam a fosforilação deste resíduo: DNA-PK (Shieh, Ikeda *et al.*, 1997), ATM (Banin, Moyal *et al.*, 1998) e ATR (Tibbetts, Brumbaugh *et al.*, 1999). Como resultado, a inibição da atividade de transativação de p53 por MDM2 é diminuída, provavelmente pela modificação conformacional sofrida por p53, já que a interação entre estas proteínas não é alterada (Shieh, Ikeda *et al.*, 1997). Além disso, a fosforilação da Ser15 induz a interação entre o motivo rico em prolina de p53, localizado no seu segundo domínio de ativação, e seu coativador transcricional p300, que é capaz de acetilar p53 em seu C-terminal de forma dependente da interação de p53 com DNA, aumentando sua atividade (Dornan, Shimizu *et al.*, 2003). Desta forma, a fosforilação da Ser15 de p53 de células ST1 está envolvida no aumento de sua atividade transativadora (figura 4).

O mecanismo pelo qual GCs induzem a fosforilação de p53 não é conhecido. É sabido, entretanto, que a Ser15 de p53 pode ser fosforilada em células carenciadas após estímulo com soro (Buschmann, Adler *et al.*, 2000). A comparação da cinética de fosforilação da Ser15 de p53 nuclear em células ST1, após tratamento com Hy ou com 5% SFB, poderia ajudar a elucidar a via de ativação de p53 por GCs. Interessantemente, o padrão de fosforilação deste resíduo é muito semelhante mediante administração de Hy ou de SFB, sendo que o pico acontece nas primeiras horas de tratamento, momento em que a maior parte das células está na fase G1 (figura 7). A semelhança na cinética de

fosforilação de p53 durante estes tratamentos, que promovem respostas antagônicas em relação à proliferação de células ST1, poderia sugerir o envolvimento de uma proteína quinase comum nestes dois processos.

A única quinase que sabidamente pode ser ativada por soro e glicocorticóides é a SGK (Serum and Glucocorticoid inducible protein Kinase), uma serina/treonina proteína quinase de 50KDa. Evidências recentes têm mostrado a importância de SGK na sinalização intracelular envolvendo receptores nucleares e de superfície e vias de estresse celular, controlando a proliferação e sobrevivência celular, osmorregulação e apoptose (Firestone, Giampaolo *et al.*, 2003). Quando células Con8.hd6 de tumor de mama de rato, responsivas a glicocorticóides, são carenciadas para soro, o estímulo com soro e/ou dexametasona (Dex) induz rapidamente a expressão de SGK. Contudo, enquanto a distribuição da proteína em resposta ao soro (estímulo pró-proliferativo) é predominantemente nuclear, a presença de Dex (estímulo anti-proliferativo) induz seu acúmulo no citoplasma e região perinuclear (Buse, Tran *et al.*, 1999). Portanto, a mesma proteína é ativada por estímulos proliferativos opostos que modulam sua localização intracelular. Entretanto, nenhum substrato de SGK fora identificado neste processo, ou seja, não se sabe por qual via SGK pode induzir a parada de crescimento celular em resposta a glicocorticóides.

Um dos mecanismos de regulação da sua expressão é dependente de p53, que age através de um elemento responsivo (p53-RE) localizado em seu promotor (Maiyar, Huang *et al.*, 1996). Muitos dos genes-alvo de p53 estão envolvidos na regulação da atividade de p53, tanto positiva (Mayo e Donner, 2002; Ongusaha, Kim *et al.*, 2003), quanto negativamente, como classicamente caracterizado para MDM2 (Almog, Milyavsky *et al.*, 2001). Como a via envolvida na fosforilação de p53 em resposta a GCs ainda não foi caracterizada e levando em conta estes mecanismos de “feedback” na

regulação de p53, SGK poderia ser um candidato à regulação do estado de fosforilação de p53 na resposta a Hy.

Como apresentado na figura 8, os níveis de SGK são progressivamente induzidos após o tratamento com Hy, sendo que o pico de indução de SGK por Hy se dá em 16h, sendo sustentado por até 24h de tratamento. A indução por SFB, contudo, ocorre mais precocemente, logo nas primeiras horas de tratamento, retornando aos níveis basais nos tempos mais longos (16 e 24h), de forma semelhante à cinética de fosforilação da Ser15 de p53 após o tratamento com SFB (figura 7). Como a cinética de indução de SGK é diferente entre os tratamentos com Hy e SFB, não é possível sugerir que esta quinase esteja envolvida em ambas as vias de ativação de p53. Contudo, foi possível identificar a regulação de mais uma proteína na resposta de células ST1 à Hy. Portanto, ainda não foi possível caracterizar o mecanismo pelo qual Hy induz a fosforilação da Ser15 de p53 em células ST1. A regulação de PP5 (Proteína Fosfatase do tipo 5) mediante estímulo com Hy foi analisada. Esta fosfatase inibe a ação de GCs através do bloqueio de GR, resultando numa menor atividade deste receptor. Ela também atua mantendo p53 no estado hipofosforilado (Zuo, Urban *et al.*, 1999). Apesar de ser esperada uma redução dos níveis de PP5 em células ST1 após tratamento com Hy, foi visto, por Q-PCR, que PP5 sofre uma indução progressiva, com um pico de pouco menos que quatro vezes após 24h de tratamento com o hormônio (figura 25). Talvez sua indução esteja associada à desfosforilação de p53 após 5h de tratamento com Hy (figura 6).

4.2. Teste de Diferentes Metodologias para o Bloqueio de p53 de Células ST1

O bloqueio de p53 de células ST1 permitiu avaliar a relevância desta proteína para a responsividade destas células a GCs. Três diferentes estratégias foram empregadas na tentativa de bloquear p53: a administração do inibidor químico de p53 PFT- α (Pifithrin- α); a superexpressão de E6 de HPV-16; e a transdução de siRNA por meio de vetor lentiviral, sendo que apenas a última foi eficiente.

O inibidor de p53, PFT- α , foi selecionado em meio a uma biblioteca de drogas quimicamente sintetizadas pela sua capacidade de inibir, transitoriamente, a atividade de p53. Inicialmente, o propósito do uso desta droga era de amenizar os efeitos colaterais do tratamento de tumores por rádio e quimioterapia. Desta forma, se administrado em conjunto com rádio e/ou quimioterápicos, poderia diminuir a morte de células não tumorais atingidas pelo tratamento, mas garantindo a manutenção da estabilidade genômica destas células pela retomada da atividade de p53 após sua administração (Komarov, Komarova *et al.*, 1999). Embora o foco original no desenvolvimento desta droga estivesse em seu uso clínico, vários grupos adotaram a PFT- α como ferramenta no estudo da dependência de p53 sobre uma variedade de respostas celulares (Feldherr, Akin *et al.*, 2001; Alves Da Costa, Paitel *et al.*, 2002; Mrass, Rendl *et al.*, 2004). Contudo, a administração de PFT- α a células ST1, mesmo em baixas concentrações, acarretaram numa forte citotoxicidade. De fato, há registros de uma resposta celular inesperada a PFT- α , como a promoção de apoptose em células normais epidermais de camundongo (JB6), por mecanismos dependentes e independentes de p53 (Kaji, Zhang *et al.*, 2003). Além disso, recentemente, foi mostrado que PFT α pode aumentar a ligação de GR ao seu ligante sintético DEX, através da maior retenção intracelular de DEX, levando a um aumento da atividade transcricional de GR, de forma independente de p53 (Murphy, Galigniana *et al.*, 2004). Com base nos resultados

obtidos e nestes recentes e inesperados dados na literatura, decidiu-se abandonar os estudos com PFT- α .

A degradação de p53 é um dos processos moleculares envolvidos na indução de tumorigênese pelas formas de alto risco de HPV (16 e 18) e se dá através da expressão da proteína viral E6. Esta oncoproteína é capaz de se ligar a p53 e a E6AP, uma ubiquitina-ligase intracelular que direciona p53 à degradação via proteassoma de forma dependente de E6 (Scheffner, Werness et al., 1990). Apesar de p53 não ser o único alvo a ser afetado por E6, que também dirige o aumento da atividade promotora de h-TERT, a subunidade catalítica da telomerase (Mcmurray e Mccance, 2003), decidiu-se testar o potencial de E6 de HPV-16 para induzir a degradação de p53 em células ST1. Contudo, a população de células ST1 expressando estavelmente E6 (ST1-E616) não apresentou modulação alguma tanto nos níveis protéicos (figura 16) quanto na atividade de p53, basal ou induzida por ATRA ou MMC (figura 15).

É sabido que certas formas mutantes de p53 humano não sofrem degradação pela oncoproteína E6 de HPV-16 e que outras são menos degradadas do que p53 selvagem (Scheffner, Takahashi *et al.*, 1992). Entretanto, o gene *TP53* da linhagem ST1 é selvagem, não justificando a ineficiência de E6 na degradação de p53 destas células. A propriedade de E6 de HPV-16 induzir a degradação de p53 murino selvagem foi muito pouco estudada e os dados encontrados parecem conflitantes. Há indicações de que E6 pode induzir a degradação de p53 em algumas células murinas (Inoue, Oka *et al.*, 1998), mas há também registros sobre a ineficiência de E6 em induzir a degradação de p53 em outras linhagens de rato (Inoue, Kondoh *et al.*, 1992). Talvez a capacidade de E6 induzir a degradação de p53 murino dependa do tipo de célula em questão, o que explicaria a manutenção dos níveis de p53 na população ST1-E616, sendo que os critérios para a funcionalidade ou não de E6 precisariam ser melhor caracterizados.

A expressão de um RNA dupla fita em células eucarióticas resulta no seu processamento, através da RNase Dicer, gerando fragmentos de 20 a 25 nucleotídeos, denominados siRNAs (small interfering RNAs). O complexo RISC (“RNA-induced silencing complex”), então, promove a separação da dupla fita do siRNA e dirige uma destas fitas a uma molécula de seu mRNA alvo, para a qual a fita de siRNA é complementar. O silenciamento gênico se dá pela conseqüente clivagem do mRNA-alvo, pela ação do RISC (Hannon, 2002). Este potente mecanismo de bloqueio gênico provê uma resposta celular mais fisiológica do que a expressão ectópica, por exemplo, de proteínas bloqueadoras. Desta forma, esta metodologia vem sendo empregada no estudo da função de uma diversidade de genes em células humanas (Hannon e Rossi, 2004). No total, cinco seqüências de siRNA, desenhadas com base em regiões distintas da porção codificante de *TP53* de rato, foram clonadas em vetor lentiviral. Conjuntamente a uma seqüência de siRNA funcional sobre p53 humano, estas cinco seqüências foram transduzidas em células ST1, sendo que apenas uma delas foi capaz de silenciar p53 destas células, gerando a população ST1-siP53. Esta população resultante apresenta uma redução de cerca de 70% dos níveis do transcrito e da proteína de p53, em comparação às células parentais, o que resulta num bloqueio de mais de 90% da atividade de transativação deste fator de transcrição, possibilitando, enfim, a continuidade dos estudos sobre o papel de p53 na resposta a GCs em células ST1.

4.3 Caracterização da Relevância de p53 Para a Resposta de Células ST1 a Glicocorticóides

Os nove genes responsáveis a p53, cuja expressão foi analisada em células ST1 (figura 11), podem ser agrupados de acordo com sua função, sendo que cinco deles (*p21*, *NRPB*, *Ciclina G*, *PTEN* e *DUSP-1*) são relacionados, basicamente, com o controle da proliferação celular e, de forma geral, o tratamento com Hy induz um aumento progressivo na sua expressão.

DUSP-1 (*CL-100* ou *MKP-1*), que apresentou uma rápida e forte indução, de cerca de 25 vezes, codifica uma fosfatase que tem como substrato MAPK (Sun, Charles *et al.*, 1993). A resposta de DUSP a GCs e sua ação inibitória sobre p38 MAPK, via desfosforilação, já haviam sido descritas (Lasa, Abraham *et al.*, 2002). Contudo, não foi observada modulação alguma no perfil de fosforilação de p38 MAPK em células ST1 tratadas com Hy (figura 9). DUSP1 possui outros alvos da via de MAPK, podendo inibir, por exemplo, ERK MAPK (Liu, Shi *et al.*, 2005). O bloqueio da sinalização pró-proliferativa dada através da via de MAPK pode ser um mecanismo importante pelo qual a Hy induz a parada de crescimento nas células ST1. Apesar desta fosfatase ter sido descrita como alvo transcricional de p53 (Li, Zhou *et al.*, 2003), o bloqueio de p53 em células ST1 não exerceu influência sobre a indução de DUSP1 por Hy (figura 25), sugerindo a existência de mecanismos alternativos para a regulação de sua expressão por GCs.

Como discutido na Introdução, p21 é um mediador fundamental do “checkpoint” da fase G1 do ciclo, inibindo a atividade de complexos ciclina/CDKs. Sua expressão basal em células ST1 parece ser influenciada por p53, já que células ST1-siP53 apresentam uma menor atividade promotora de p21 (figura 24.B) e menores níveis de

seu transcrito. Contudo, enquanto o tratamento com Hy induz apenas parcialmente sua atividade promotora nestas células, provavelmente através de elementos localizados “upstream” ao elemento responsável a p53 neste promotor (Cha, Cram *et al.*, 1998), o nível de seu transcrito nesta situação é apenas ligeiramente menor do que nas células parentais (figura 25). Uma região responsável a GC, localizada nas posições -1.481 e -1.184 em relação ao início de transcrição, já foi identificada no promotor de p21. Esta região é ativada de forma independente do p53-RE (Cha, Cram *et al.*, 1998), localizado na posição -2.280 antes do início de transcrição (El-Deiry, Tokino *et al.*, 1993). Possivelmente, existem outros elementos através dos quais GCs atuam no promotor de p21, de forma direta ou indireta, e que estejam localizados ainda mais “upstream” em relação ao p53-RE. Como a porção da região promotora de p21 clonada no vetor p21-luc compreende apenas 2,4Kb, é possível que outras regiões em seu promotor, potencialmente influenciadas por GCs, não estejam presentes neste vetor. De qualquer forma, a indução de p21 por Hy em células ST1 parece ocorrer também de forma independente de p53.

NRPB/Enc-1 foi primeiramente descrito como sendo um dos genes fortemente regulados por p53, poucas horas antes de células de carcinoma de próstata adquirirem um fenótipo apoptótico, sendo denominado *PIG10* (p53-induced gene 10) (Polyak, Xia *et al.*, 1997). Este gene, abundantemente expresso em cérebro, codifica uma proteína de matriz nuclear que é capaz de interagir com pRB, estando envolvida na diferenciação neuronal (Kim, Lim *et al.*, 1998). A indução de *NRPB* por GCs foi primeiramente descrita em nosso laboratório (Vedoy e Sogayar, 2002), sendo que o papel deste gene durante a resposta antiproliferativa de Hy vem sendo caracterizado em detalhes (Degaki, 2006). A expressão ectópica de *NRPB* em células ST1 conferiu um fenótipo menos tumorigênico a estas células, caracterizado pela redução da capacidade de crescimento

em substrato semi-sólido e de formação de tumor em camundongos nude. A indução de sua expressão por Hy em células ST1 é progressiva e parece ser parcialmente dependente de p53, já que em células ST1-siP53 os tratamentos com Hy por 3 ou 6h resultam numa menor indução de NRPB (figura 25). Contudo, após 24h de tratamento, os níveis de seu mensageiro são semelhantes entre ST1 e ST1-siP53.

Ciclina G, um dos primeiros alvos transcricionais de p53 identificados (Okamoto e Beach, 1994), foi outro gene descrito em nosso laboratório como sendo regulado por Hy (Vedoy e Sogayar, 2002). Conforme mostrado por um doutorando do nosso laboratório, células ST1 que superexpressam *Ciclina G* apresentam um tempo de dobramento maior e uma menor densidade de saturação em relação às células parentais. Além disso, a super-expressão da *Ciclina G* nas células ST1 leva a uma intensificação do efeito da hidrocortisona e, também, a um prolongamento do seu efeito (Demasi, 2005). Na época da clonagem das seqüências de siRNA para p53 murino em vetor lentiviral, foi possível clonar três seqüências de siRNA para *Ciclina G* de rato no mesmo vetor, sendo que, aparentemente, uma destas seqüências foi parcialmente validada em relação ao bloqueio desta ciclina. Dada a importância e a dualidade desta proteína sobre a estabilidade de p53 (Kimura e Nojima, 2002), o bloqueio de *Ciclina G* em células ST1 poderá dar maiores indícios da regulação que exerce sobre p53 durante o tratamento com GCs.

Tanto a expressão basal de *Ciclina G*, quanto sua indução por Hy durante as primeiras horas de tratamento, parecem ser influenciadas por p53 em células ST1, à semelhança do observado para o gene NRPB (figura 25). Talvez, de fato, o perfil da regulação gênica por p53 nestas células, em resposta à Hy, pudesse ser caracterizado apenas transitoriamente, da mesma forma que se dá sua fosforilação na Ser15. Contudo, os ensaios de gene-repórter e de EMSA, que indicam a ativação de p53, foram

realizados com células tratadas com o hormônio por 24h. Sendo a meia-vida da Luciferase de apenas 3h, é improvável que a atividade de p53, medida após 24h de tratamento, seja reflexo de uma ativação muito mais precoce. De fato, ao contrário da cinética de fosforilação de p53, o acúmulo nuclear de p53 total é sustentado mesmo após 24h de administração de Hy. Provavelmente, estes genes que sofrem uma influência parcial de p53 durante sua indução por Hy, devem apresentar uma outra forma de regulação por GCs, seja ela direta ou indireta, que compense a deficiência de p53.

PTEN, que codifica para uma fosfatase de múltipla especificidade, tem um papel crucial por promover a regulação negativa da via dos fosfatidil-inositóis, através da qual é transmitido o sinal mitogênico de muitos receptores de fatores de crescimento (Chu e Tarnawski, 2004). Recentemente, a demonstração de que o receptor de PDGF é um substrato para *PTEN*, adicionou um grau de complexidade aos mecanismos de supressão tumoral desempenhados por esta fosfatase (Mahimainathan e Choudhury, 2004). *PTEN* participa de uma retro-alimentação positiva juntamente com p53, já que é um alvo transcricional de p53 (Stambolic, Macpherson *et al.*, 2001) e, através da desfosforilação de PI3K em situações de estresse celular, bloqueia a ativação de MDM2, induzindo p53 (Mayo e Donner, 2002). Apesar de sua indução por GC em células ST1 não ser dependente de p53, o aumento de seus transcritos, após 24h de tratamento, deve estar diretamente relacionado à manutenção do acúmulo destas células na fase G0/G1 do ciclo.

A expressão basal de *MDM2* em diferentes tecidos murinos não é influenciada por p53, sendo que a alça auto-regulatória entre p53 e *MDM2* parece ocorrer apenas mediante estímulos estressantes (Mendrysa e Perry, 2000). De fato, sua expressão é equivalente entre a população ST1-siP53 e sua linhagem parental correspondente. Não

há modulação de sua expressão ao longo do tratamento com Hy, o que está de acordo com os níveis constantes de p53 encontrados nas células ST1.

A expressão de alguns dos alvos de p53 que controlam a via de apoptose também foi avaliada em células ST1. Enquanto os níveis de *BAX*, gene pró-apoptótico que tem sua expressão regulada positivamente por p53, são constantes ao longo do tratamento com Hy, o gene anti-apoptótico *Bcl-2*, cuja expressão é normalmente reduzida por p53, é regulado negativamente durante as primeiras horas de tratamento, de forma semelhante ao que ocorre com os níveis de PUMA. Estes genes são membros de uma mesma família, a de *Bcl-2*. Embora compartilhem domínios conservados, que são importantes para a indução de apoptose, estes genes apresentam um papel antagônico no controle apoptótico (Haupt, Berger *et al.*, 2003). A responsividade de PUMA a p53 foi caracterizada mais recentemente, sendo que este gene parece ter um papel essencial na indução de apoptose por Bax (Yu, Zhang *et al.*, 2001). Além da regulação da apoptose via expressão gênica, recentemente, foi descrita uma função para o acúmulo citoplasmático de p53, que resulta na indução de apoptose por ativação direta de Bax. Esta ativação é bloqueada através da interação de p53 com membros de *Bcl-2*, um mecanismo repressor de apoptose. PUMA, que é essencial para a atividade pro-apoptótica de p53, desfaz esta interação repressora, liberando p53 para ativar Bax e, conseqüentemente, promovendo a liberação do citocromo C da mitocôndria e ativação de caspases (Chipuk, Bouchier-Hayes *et al.*, 2005). Desta forma, a inibição tanto de *Bcl-2* quanto de PUMA, provavelmente, mantém um equilíbrio na atividade apoptótica de células ST1, o que é condizente à resposta destas células à Hy, caracterizada pela parada de crescimento por aumento da proporção das células na fase G0/G1 do ciclo, sem haver indução de apoptose. Aparentemente, o bloqueio de p53, através de siRNA, resulta em menores níveis apenas dos transcritos de PUMA em células ST1.

Aparte à regulação da expressão gênica, as populações ST1-siP53 e ST1-siEGFP apresentaram a mesma taxa de crescimento, tanto na ausência quanto na presença do hormônio (26.A), sendo que ambas as populações sofrem uma parada de proliferação marcante quando tratadas com Hy ao longo dos dias, havendo uma diminuição da porcentagem de células nas fases S e G2-M do ciclo celular e o acúmulo das células em G0/G1 (26.B). Juntos, estes dados apontam para uma atividade condicional de p53 sobre o gene estudado. Apesar da clara ativação por Hy em células ST1, seu bloqueio, através de siRNA, interferiu apenas parcialmente no controle da expressão de alguns de seus alvos analisados, durante o tratamento com GC, não sendo suficiente para modificar a resposta antiproliferativa destas células ao hormônio. Pode-se afirmar, portanto, que a modulação de p53 compõe parte da resposta de células ST1 a Hy sem, contudo, ser um fator essencial para esta resposta.

É possível que outros membros da família de p53 (p63 ou p73) participem desta resposta de forma mais marcante. A estes genes, tem sido atribuído um papel relacionado tanto ao desenvolvimento quanto à supressão tumoral, sendo que ambos compartilham alguns genes-alvo comuns a p53 (Levrero, De Laurenzi *et al.*, 2000). A interferência de p53, através da expressão de siRNA, pode, ainda, ter promovido um mecanismo de compensação, no qual a atividade destes genes poderia suprir a perda de p53. Este tipo de mecanismo compensatório já foi observado em algumas situações de bloqueio gênico. Assim, por exemplo, camundongos “knockout” para Cdk2, Cdk4 ou Cdk6 são viáveis, enquanto camundongos duplo-“knockout” para Cdk2 e Cdk4 morrem logo após completarem o desenvolvimento embriogênico, provavelmente devido a deficiência cardíaca, sugerindo a existência de mecanismos compensatórios para a perda de cada Cdk individualmente (Cédric Barrière, 2007).

Recentemente, foi descrita a interação física entre p73 e GR. Ao contrário de p53, que reprime a atividade de GR através da ligação a este fator, na presença de GC, p73 pode estimular a capacidade de transativação de GR (Zhang, Nie *et al.*, 2006). Além disso, um dos fenótipos mais marcantes apresentados por camundongos “knockout” para p73 consiste em defeitos no sistema inflamatório, sendo que mais de 80% destes camundongos apresentam, de maneira crônica e bilateral, rinite, otite, edema periorbital e conjuntivite (Yang, Walker *et al.*, 2000). Dada a extensão dos efeitos antiinflamatórios de GCs, estes dados sugerem um possível envolvimento de p73 na mediação da resposta celular a GCs, pelo menos em situações inflamatórias. O papel de p73 na resposta de células ST1 a GCs não foi estudado, mas estas evidências citadas acima, juntamente com a ausência de regulação de alguns genes-alvo de p53 por esta proteína, apontam para a relevância do estudo de p73 neste sistema.

4.4. Análise da Ação de ATRA Sobre a Atividade de p53 em Células ST1 e Busca de Modelos Celulares Humanos Responsíveis a ATRA e GCs

A atividade de p53 em células ST1 também foi analisada mediante o tratamento com ácido *all-trans* retinóico (ATRA). A resposta destas células a ATRA foi descrita em nosso laboratório pelo doutorando Mário Henrique Bentson, sendo que este agente exerce uma drástica alteração nas características tumorais de ST1, composta por uma forte e progressiva inibição na proliferação celular. Nas primeiras 10h de tratamento com ATRA não há alterações na taxa de crescimento, sendo que após 24h há uma progressiva inibição na entrada destas células na fase S do ciclo celular, atingindo um bloqueio quase total em 72h de tratamento com ATRA. Esta inibição no crescimento não é acompanhada por apoptose. A ação de ATRA nestas células também se dá sobre a formação de colônias em substrato semi-sólido, reduzindo fortemente o tamanho e a

quantidade de colônias formadas (Bengtson, 2002). A resposta fenotípica de células ST1 ao tratamento com ATRA e Hy é muito similar e a comparação entre as vias envolvidas na reversão fenotípica tumoral-normal mediada por estes dois agentes pode evidenciar mecanismos comuns à ação anti-proliferativa de ATRA e glicocorticóides em células de glioma.

Em diversos tipos celulares, já foi demonstrado que o tratamento com ATRA pode alterar alguns aspectos funcionais de p53, podendo regular os níveis de seu transcrito e de sua proteína (Sarkar e Sharma, 2002), positiva ou negativamente, promover retenção da proteína no núcleo (Takada, Isogai *et al.*, 2001), aumentar sua capacidade de transativação (Curtin, Dragnev *et al.*, 2001) e, conseqüentemente, regular a expressão de alguns genes-alvo como p21 (Takada, Isogai *et al.*, 2001) e BCL-2 (Haidar, Manshouri *et al.*, 2000). Tais alterações sofridas por p53 parecem mediar a resposta celular ao ATRA ou, em alguns casos, representar apenas um efeito secundário ao tratamento.

Alguns indícios sugerem haver uma relação mais extensa entre p53 e ATRA. Assim, por exemplo, camundongos transgênicos deficientes para o receptor alfa de ácido retinóico (RAR α) apresentam baixa expressão deste receptor em diversos tecidos (baço, medula óssea e timo), o que leva a uma diminuição significativa na expressão de p53 e, também, a uma maior expressão de BCL-2 nestes tecidos. Como resultado, há alta incidência de linfomas nestes animais, similarmente ao visto em camundongos "knock-out" para p53 (Haidar, Manshouri *et al.*, 2000).

Foi possível observar que o nível de ativação tanto de p53 quanto do promotor de p21 pelo tratamento de células ST1 com ATRA e Hy por 24h é equivalente (figura 24) e que o bloqueio de p53 por siRNA reduz a atividade promotora de p21 nestas duas situações, de maneira similar. A expressão de p21 é induzida em células ST1 sob

tratamento com ATRA (Bengtson, 2002), semelhantemente à resposta à Hy (figura 11). Estes dados apontam para uma possível convergência, mesmo que parcial, entre as respostas antiproliferativas de células ST1 a Hy e ATRA.

O potencial antiproliferativo do ácido retinóico foi testado em diversas linhagens celulares de glioma, as quais apresentaram respostas distintas quanto à inibição de crescimento em monocamada (Rutka, De Armond *et al.*, 1988; Magrassi, Butti *et al.*, 1995; Bouterfa, Picht *et al.*, 2000; Schmidt, Groscurth *et al.*, 2000) e em suspensão (Yung, Lotan *et al.*, 1989; Mukherjee e Das, 1995). Entretanto, o ATRA exerceu ampla ação antiproliferativa em todas as culturas primárias de gliomas humanos estudadas (Bouterfa, Picht *et al.*, 2000).

Dada a grande importância de p53 na manutenção da estabilidade genômica e no controle do ciclo celular, bem como a alta e progressiva incidência de mutações em p53 em gliomas humanos (Nozaki, Tada *et al.*, 1999), sua atividade, em resposta a ATRA e DEX, foi medida em linhagens de glioma humano que apresentam diferentes “status” de p53: U87MG (p53 selvagem), A172 (p53 mutado em um alelo) e T98G (p53 mutado em ambos os alelos). Como apresentado na figura 12.A, não houve variações significativas na atividade de p53 durante o tratamento das linhagens U87MG e A172 com DEX ou ATRA. Devido ao estado mutado de p53 de T98G, sua atividade é praticamente indetectável nestas células. As células A172 respondem ao tratamento com DEX, apresentando um decréscimo na porcentagem tanto de células em S quanto em G2-M e um conseqüente acúmulo de células nas fases G0/G1 do ciclo celular. Esta resposta é progressiva e torna-se mais evidente após 48h de tratamento com 10^{-7} M DEX, quando a porcentagem de células em G0/G1 aumenta de 65% (controle) para cerca de 80% (DEX) (figura 12.B). Contudo, esta resposta parece não estar relacionada com a ativação de p53, que não é modulada nestas condições.

Segundo a literatura, a proliferação de células U87MG, ao contrário de A172, é estimulada pelo tratamento com DEX, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, num processo que depende de GR (Pinski, Halmos *et al.*, 1993). A indução da proliferação destas células por DEX também não pode ser relacionada à inibição da atividade de p53, a qual não sofre modulação (figura 12.A). A linhagem T98G também parece ser responsável a DEX, apresentando um bloqueio proliferativo na presença do hormônio (Kaup, Schindler *et al.*, 2001). Contudo, esta linhagem possui ambos os alelos de p53 mutados, o que revoga sua atividade de transativação (figura 12.A). Portanto, sua resposta a GC não está associada à ação de p53.

Na época em que a atividade de p53 destas linhagens estava sendo analisada, a resposta proliferativa das mesmas, em resposta ao ATRA, estava sendo caracterizada neste laboratório pelo Dr. Mário Henrique Bentson. As linhagens T98G e A172 apresentam respostas similares a ATRA em relação à capacidade de crescimento em substrato semi-sólido, sendo que o tratamento impede a formação de colônias de ambas as linhagens, quando plaqueadas em agarose, sugerindo a possível interferência no potencial tumorigênico destas. Entretanto, em relação à proliferação em substrato sólido, apenas a linhagem T98G apresentou um forte bloqueio na síntese de DNA, medida através da incorporação de H³-timidina, enquanto células A172 não sofreram qualquer alteração (Mário Bengtson, dados não publicados). Apesar de p53 da linhagem A172 apresentar a capacidade de transativar, sua atividade não é estimulada por ATRA. A resposta de T98G ao tratamento também ocorre por mecanismos independentes de p53. Portanto, a tentativa de extrapolar os resultados observados em células ST1 de glioma de rato para linhagens de glioma humano indicou que, diferentemente de ST1, a resposta destas células humanas a GC e ATRA não envolve p53.

Na procura de modelos celulares humanos que apresentassem respostas semelhantes às de células ST1 a glicocorticóides e ácido retinóico e, ainda, para analisar a relevância de p53 na resposta a estes agentes, foram utilizadas a linhagem de carcinoma de cólon humano HCT116 p53^{+/+} e sua variante HCT116 p53^{-/-}, nula para p53. A atividade promotora de p21 foi analisada nestas linhagens, quando tratadas com estes agentes, o que poderia indicar uma modulação da atividade de p53. Conforme apresentado na figura 13.A, a atividade promotora de p21 é maior em células HCT116 p53^{+/+} do que em HCT116 p53^{-/-} em situação basal, indicando a influência de p53 sobre este promotor nestas células. Sua atividade foi aumentada em resposta a ATRA, mas não a DEX, de forma dose-dependente, apenas nas linhagens p53^{+/+}, evidenciando que a regulação do promotor de p21 por ATRA, nestas células, é condicional à presença de p53. Entretanto, os tratamentos não modularam a taxa de síntese de DNA em qualquer uma das células analisadas (figura 13.B), sendo que a ativação de p53 e indução de p21 não foram suficientes para induzir uma parada de proliferação destas linhagens de tumor de cólon. Portanto, estas células não se mostraram um modelo compatível com aquele de células ST1 para estudar os efeitos anti-proliferativos de GCs e ATRA.

5. CONCLUSÕES

- A ativação p53 por Hy foi observada apenas nas células ST1 (responsíveis a GCs), mas não em P7 (resistentes ao tratamento). Em células ST1, GCs induzem o aumento da capacidade de p53 se ligar ao DNA e transativar, através do acúmulo nuclear da proteína e de sua fosforilação na Ser15, sem haver modulação nos níveis de mRNA e de proteína total de p53.
- Os níveis de GR nas linhagens estudadas estão de acordo com o grau de responsividade delas a GCs: ST1>C6>P7; havendo uma correlação positiva entre os níveis de expressão/atividade de GR e a ativação de p53 por GCs nestas células.
- O perfil de indução da fosforilação da Ser15 de p53 por Hy e soro é similar em células ST1. Contudo, não há correlação entre a cinética de fosforilação de p53 e a indução de SGK e p38 MAPK.
- O envolvimento de p53 na resposta antiproliferativa de GCs e ATRA, observado em células ST1, não ocorre nas linhagens de glioma humano estudadas.
- A expressão ectópica da proteína E6 de HPV-16 não altera os níveis de p53 em células ST1.
- O bloqueio de p53 de células ST1, através da expressão de siRNA, resultou numa modulação parcial da expressão de alguns de seus genes-alvo, mas não foi suficiente para revogar o efeito anti-tumoral exercido por Hy nestas células, indicando que a modulação de p53 pode estar associada a um efeito secundário, mas não essencial, à resposta a GCs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev, v.15, n.17, Sep 1, p.2177-96. 2001.

Addeo, R., F. Casale, *et al.* Glucocorticoids induce G1 arrest of lymphoblastic cells through retinoblastoma protein Rb1 dephosphorylation in childhood acute lymphoblastic leukemia in vivo. Cancer Biol Ther, v.3, n.5, May, p.470-6. 2004.

Albor, A., S. Kaku, *et al.* Wild-type and mutant forms of p53 activate human topoisomerase I: a possible mechanism for gain of function in mutants. Cancer Res, v.58, n.10, May 15, p.2091-4. 1998.

Almawi, W. Y. e O. K. Melemedjian. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. J Leukoc Biol, v.71, n.1, Jan, p.9-15. 2002.

Almog, N., M. Milyavsky, *et al.* The role of the C' terminus of murine p53 in the p53/mdm-2 regulatory loop. Carcinogenesis, v.22, n.5, May, p.779-85. 2001.

Aloni-Grinstein, R., D. Schwartz, *et al.* Accumulation of wild-type p53 protein upon gamma-irradiation induces a G2 arrest-dependent immunoglobulin kappa light chain gene expression. Embo J, v.14, n.7, Apr 3, p.1392-401. 1995.

Alves Da Costa, C., E. Paitel, *et al.* Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.6, Mar 19, p.4043-8. 2002.

Amundson, S. A., K. T. Do, *et al.* Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. Radiat Res, v.154, n.3, Sep, p.342-6. 2000.

Appella, E. e C. W. Anderson. Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. Pathol Biol (Paris), v.48, n.3, Apr, p.227-45. 2000.

_____. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. Eur J Biochem, v.268, n.10, May, p.2764-72. 2001.

Armelin, M. C. e H. A. Armelin. Steroid hormones mediate reversible phenotypic transition between transformed and untransformed states in mouse fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A, v.75, n.6, Jun, p.2805-9. 1978.

_____. Glucocorticoid hormone modulation of both cell surface and cytoskeleton related to growth control of rat glioma cells. J Cell Biol, v.97, n.2, Aug, p.459-65. 1983.

Armelin, M. C., M. L. Oliveira, *et al.* Molecular genetic approach to cell proliferation control and neoplasia. Braz J Med Biol Res, v.29, n.7, Jul, p.911-9. 1996.

Armelin, M. C., R. C. Stocco, *et al.* Control of rat C6 glioma cell proliferation: uncoupling of the inhibitory effects of hydrocortisone hormone in suspension and monolayer cultures. J Cell Biol, v.97, n.2, Aug, p.455-8. 1983.

Ashcroft, M. e K. H. Vousden. Regulation of p53 stability. Oncogene, v.18, n.53, Dec 13, p.7637-43. 1999.

- Bailly-Maitre, B., G. De Sousa, *et al.* Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. Cell Death Differ, v.8, n.3, Mar, p.279-88. 2001.
- Bakalkin, G., T. Yakovleva, *et al.* p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.1, Jan 4, p.413-7. 1994.
- Balagurumoorthy, P., H. Sakamoto, *et al.* Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.19, Sep 12, p.8591-5. 1995.
- Bamberger, C. M., A. M. Bamberger, *et al.* Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. J Clin Invest, v.95, n.6, Jun, p.2435-41. 1995.
- Bamberger, C. M., H. M. Schulte, *et al.* Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. Endocr Rev, v.17, n.3, Jun, p.245-61. 1996.
- Bandara, L. R., V. M. Buck, *et al.* Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. Embo J, v.12, n.11, Nov, p.4317-24. 1993.
- Banin, S., L. Moyal, *et al.* Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. Science, v.281, n.5383, Sep 11, p.1674-7. 1998.
- Barak, Y., T. Juven, *et al.* mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. Embo J, v.12, n.2, Feb, p.461-8. 1993.
- Bargonetti, J., J. J. Manfredi, *et al.* A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. Genes Dev, v.7, n.12B, Dec, p.2565-74. 1993.
- Bartholome, B., C. M. Spies, *et al.* Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. Faseb J, v.18, n.1, Jan, p.70-80. 2004.
- Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. Cell, v.56, n.3, Feb 10, p.335-44. 1989.
- Benda, P., J. Lightbody, *et al.* Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science, v.161, n.839, Jul 26, p.370-1. 1968.
- Bengtson, M. Caracterização celular e molecular dos efeitos do ácido retinóico sobre as células ST1 de glioma de rato. . Tese defendida no Instituto de Química da USP, São Paulo, Brasil2002.
- Bosari, S., G. Viale, *et al.* p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. Am J Pathol, v.147, n.3, Sep, p.790-8. 1995.
- Bouterfa, H., T. Picht, *et al.* Retinoids inhibit human glioma cell proliferation and migration in primary cell cultures but not in established cell lines. Neurosurgery, v.46, n.2, Feb, p.419-30. 2000.
- Brady, H. J., G. S. Salomons, *et al.* T cells from baxalpha transgenic mice show accelerated apoptosis in response to stimuli but do not show restored DNA damage-induced cell death in the absence of p53. gene product in. Embo J, v.15, n.6, Mar 15, p.1221-30. 1996.

- Breslauer, K. J., R. Frank, *et al.* Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.11, Jun, p.3746-50. 1986.
- Breslin, M. B., C. D. Geng, *et al.* Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. Mol Endocrinol, v.15, n.8, Aug, p.1381-95. 2001.
- Bullock, P., J. J. Champoux, *et al.* Association of crossover points with topoisomerase I cleavage sites: a model for nonhomologous recombination. Science, v.230, n.4728, Nov 22, p.954-8. 1985.
- Bunz, F., A. Dutriaux, *et al.* Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science, v.282, n.5393, Nov 20, p.1497-501. 1998.
- Buschmann, T., V. Adler, *et al.* p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH2-terminal kinase, p14ARF, and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. Cancer Res, v.60, n.4, Feb 15, p.896-900. 2000.
- Buse, P., S. H. Tran, *et al.* Cell cycle and hormonal control of nuclear-cytoplasmic localization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, in mammary tumor cells. A novel convergence point of anti-proliferative and proliferative cell signaling pathways. J Biol Chem, v.274, n.11, Mar 12, p.7253-63. 1999.
- Cao, Y., Q. Gao, *et al.* Abrogation of wild-type p53-mediated transactivation is insufficient for mutant p53-induced immortalization of normal human mammary epithelial cells. Cancer Res, v.57, n.24, Dec 15, p.5584-9. 1997.
- Carrier, F., P. T. Georgel, *et al.* Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. Mol Cell Biol, v.19, n.3, Mar, p.1673-85. 1999.
- Cédric Barrière, D. S., Antonio Cerqueira, Javier Galán, Alberto Martín, Sagrario Ortega, Marcos Malumbres, Pierre Dubus and Mariano Barbacid Mice thrive without Cdk4 and Cdk2 Molecular Oncology, v.1, n.1, June, p.72-83. 2007.
- Cha, H. H., E. J. Cram, *et al.* Glucocorticoids stimulate p21 gene expression by targeting multiple transcriptional elements within a steroid responsive region of the p21waf1/cip1 promoter in rat hepatoma cells. J Biol Chem, v.273, n.4, Jan 23, p.1998-2007. 1998.
- Chang, T. C., M. W. Hung, *et al.* Dexamethasone suppresses apoptosis in a human gastric cancer cell line through modulation of bcl-x gene expression. FEBS Lett, v.415, n.1, Sep 22, p.11-5. 1997.
- Charmandari, E., G. P. Chrousos, *et al.* The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. Mol Endocrinol, v.19, n.1, Jan, p.52-64. 2005.
- Chauhan, D., P. Pandey, *et al.* Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. Oncogene, v.15, n.7, Aug 14, p.837-43. 1997.
- Chen, M. S., A. M. Silverstein, *et al.* The tetratricopeptide repeat domain of protein phosphatase 5 mediates binding to glucocorticoid receptor heterocomplexes and acts as a dominant negative mutant. J Biol Chem, v.271, n.50, Dec 13, p.32315-20. 1996.
- Chen, Y., P. L. Chen, *et al.* Hot-spot p53 mutants interact specifically with two cellular proteins during progression of the cell cycle. Mol Cell Biol, v.14, n.10, Oct, p.6764-72. 1994.

- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, *et al.* PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. Science, v.309, n.5741, Sep 9, p.1732-5. 2005.
- Chrousos, G. P. e T. Kino. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. Sci STKE, v.2005, n.304, Oct 4, p.pe48. 2005.
- Chu, E. C. e A. S. Tarnawski. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. Med Sci Monit, v.10, n.10, Oct, p.RA235-41. 2004.
- Clarke, A. R., C. A. Purdie, *et al.* Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. Nature, v.362, n.6423, Apr 29, p.849-52. 1993.
- Cole, T. J., J. A. Blendy, *et al.* Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. Genes Dev, v.9, n.13, Jul 1, p.1608-21. 1995.
- Cram, E. J., R. A. Ramos, *et al.* Role of the CCAAT/enhancer binding protein-alpha transcription factor in the glucocorticoid stimulation of p21waf1/cip1 gene promoter activity in growth-arrested rat hepatoma cells. J Biol Chem, v.273, n.4, Jan 23, p.2008-14. 1998.
- Craperi, D., J. M. Vicat, *et al.* Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line. Hum Gene Ther, v.10, n.4, Mar 1, p.679-88. 1999.
- Crochemore, C., T. M. Michaelidis, *et al.* Enhancement of p53 activity and inhibition of neural cell proliferation by glucocorticoid receptor activation. Faseb J, v.16, n.8, Jun, p.761-70. 2002.
- Crook, T. e K. H. Vousden. Properties of p53 mutations detected in primary and secondary cervical cancers suggest mechanisms of metastasis and involvement of environmental carcinogens. Embo J, v.11, n.11, Nov, p.3935-40. 1992.
- Curtin, J. C., K. H. Dragnev, *et al.* Retinoic acid activates p53 in human embryonal carcinoma through retinoid receptor-dependent stimulation of p53 transactivation function. Oncogene, v.20, n.20, May 3, p.2559-69. 2001.
- Daffern, P. J., M. A. Jagels, *et al.* Multiple epithelial cell-derived factors enhance neutrophil survival. Regulation by glucocorticoids and tumor necrosis factor-alpha. Am J Respir Cell Mol Biol, v.21, n.2, Aug, p.259-67. 1999.
- Dahlman-Wright, K., A. P. Wright, *et al.* Determinants of high-affinity DNA binding by the glucocorticoid receptor: evaluation of receptor domains outside the DNA-binding domain. Biochemistry, v.31, n.37, Sep 22, p.9040-4. 1992.
- Dalman, F. C., L. C. Scherrer, *et al.* Localization of the 90-kDa heat shock protein-binding site within the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor by peptide competition. J Biol Chem, v.266, n.6, Feb 25, p.3482-90. 1991.
- Deb, S., C. T. Jackson, *et al.* Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. J Virol, v.66, n.10, Oct, p.6164-70. 1992.
- Degaki, T. Genoma funcional e análise in silico na caracterização e no isolamento de genes envolvidos em gliomas humanos. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química Universidade de São Paulo, 2006.

Deleo, A. B., G. Jay, *et al.* Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.5, May, p.2420-4. 1979.

Demasi, M. Caracterização funcional de genes diferencialmente regulados por glicocorticóides e análise do proteoma em linhagem de glioma sensível a hormônios anti-tumorais glicocorticóides. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2005.

Di Como, C. J., C. Gaiddon, *et al.* p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants in mammalian cells. Mol Cell Biol, v.19, n.2, Feb, p.1438-49. 1999.

Dittmer, D., S. Pati, *et al.* Gain of function mutations in p53. Nat Genet, v.4, n.1, May, p.42-6. 1993.

Dornan, D., H. Shimizu, *et al.* The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. Mol Cell Biol, v.23, n.23, Dec, p.8846-61. 2003.

Dudenhoffer, C., G. Rohaly, *et al.* Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. Mol Cell Biol, v.18, n.9, Sep, p.5332-42. 1998.

Dumaz, N. e D. W. Meek. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. Embo J, v.18, n.24, Dec 15, p.7002-10. 1999.

Dutta, A., J. M. Ruppert, *et al.* Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. Nature, v.365, n.6441, Sep 2, p.79-82. 1993.

Eizenberg, O., A. Faber-Elman, *et al.* p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. Mol Cell Biol, v.16, n.9, Sep, p.5178-85. 1996.

El-Deiry, W. S. Regulation of p53 downstream genes. Semin Cancer Biol, v.8, n.5, p.345-57. 1998.

El-Deiry, W. S., S. E. Kern, *et al.* Definition of a consensus binding site for p53. Nat Genet. 1: 45-9 p. 1992.

El-Deiry, W. S., T. Tokino, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell, v.75, n.4, Nov 19, p.817-25. 1993.

Elbashir, S. M., J. Harborth, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, v.411, n.6836, May 24, p.494-8. 2001.

Eliyahu, D., N. Goldfinger, *et al.* Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. Oncogene, v.3, n.3, Sep, p.313-21. 1988.

Eliyahu, D., A. Raz, *et al.* Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. Nature, v.312, n.5995, Dec 13-19, p.646-9. 1984.

Espinosa, J. M., R. E. Verdun, *et al.* p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. Mol Cell, v.12, n.4, Oct, p.1015-27. 2003.

- Evans-Storms, R. B. e J. A. Cidlowski. Dominant suppression of lymphocyte apoptosis by hepatoma cells. Exp Cell Res, v.230, n.1, Jan 10, p.121-32. 1997.
- Evans, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science, v.240, n.4854, May 13, p.889-95. 1988.
- Feldherr, C. M., D. Akin, *et al.* Regulation of functional nuclear pore size in fibroblasts. J Cell Sci, v.114, n.Pt 24, Dec, p.4621-7. 2001.
- Ffrench-Mullen, J. M. Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C. J Neurosci, v.15, n.1 Pt 2, Jan, p.903-11. 1995.
- Finlay, C. A., P. W. Hinds, *et al.* The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell, v.57, n.7, Jun 30, p.1083-93. 1989.
- _____. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. Mol Cell Biol, v.8, n.2, Feb, p.531-9. 1988.
- Firestone, G. L., J. R. Giampaolo, *et al.* Stimulus-dependent regulation of serum and glucocorticoid inducible protein kinase (SGK) transcription, subcellular localization and enzymatic activity. Cell Physiol Biochem, v.13, n.1, p.1-12. 2003.
- Flaman, J. M., V. Robert, *et al.* Identification of human p53 mutations with differential effects on the bax and p21 promoters using functional assays in yeast. Oncogene, v.16, n.10, Mar 12, p.1369-72. 1998.
- Frazier, M. W., X. He, *et al.* Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. Mol Cell Biol, v.18, n.7, Jul, p.3735-43. 1998.
- Freshney, R. I. Effects of glucocorticoids on glioma cells in culture. Minireview on cancer research. Exp Cell Biol, v.52, n.5, p.286-92. 1984.
- Gallagher, W. M., M. Argentini, *et al.* MBP1: a novel mutant p53-specific protein partner with oncogenic properties. Oncogene, v.18, n.24, Jun 17, p.3608-16. 1999.
- Gametchu, B. Glucocorticoid receptor-like antigen in lymphoma cell membranes: correlation to cell lysis. Science, v.236, n.4800, Apr 24, p.456-61. 1987.
- Gametchu, B., F. Chen, *et al.* Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. Steroids, v.64, n.1-2, Jan-Feb, p.107-19. 1999.
- Gametchu, B., C. S. Watson, *et al.* Size and steroid-binding characterization of membrane-associated glucocorticoid receptor in S-49 lymphoma cells. Steroids, v.56, n.8, Aug, p.402-10. 1991.
- Ganguli, G., J. Back, *et al.* The p53 tumour suppressor inhibits glucocorticoid-induced proliferation of erythroid progenitors. EMBO Rep, v.3, n.6, Jun, p.569-74. 2002.
- Giguere, V., S. M. Hollenberg, *et al.* Functional domains of the human glucocorticoid receptor. Cell, v.46, n.5, Aug 29, p.645-52. 1986.
- Gorman, A. M., U. A. Hirt, *et al.* Dexamethasone pre-treatment interferes with apoptotic death in glioma cells. Neuroscience, v.96, n.2, p.417-25. 2000.

- Gottlicher, M., S. Heck, *et al.* Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. J Mol Med, v.76, n.7, Jun, p.480-9. 1998.
- Gottlieb, E., R. Haffner, *et al.* Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. Embo J, v.13, n.6, Mar 15, p.1368-74. 1994.
- Gottlieb, T. M. e M. Oren. p53 in growth control and neoplasia. Biochim Biophys Acta, v.1287, n.2-3, Jun 7, p.77-102. 1996.
- Grasso, R. J., C. E. Johnson, *et al.* Combined growth-inhibitory responses and ultrastructural alterations produced by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and dexamethasone in rat glioma cell cultures. Cancer Res, v.37, n.2, Feb, p.585-94. 1977.
- Greenberg, A. K., J. Hu, *et al.* Glucocorticoids inhibit lung cancer cell growth through both the extracellular signal-related kinase pathway and cell cycle regulators. Am J Respir Cell Mol Biol, v.27, n.3, Sep, p.320-8. 2002.
- Grote, H., I. Ioannou, *et al.* Localization of the glucocorticoid receptor in rat liver cells: evidence for plasma membrane bound receptor. Int J Biochem, v.25, n.11, Nov, p.1593-9. 1993.
- Gutin, P. H. Corticosteroid therapy in patients with cerebral tumors: benefits, mechanisms, problems, practicalities. Semin Oncol, v.2, n.1, Mar, p.49-56. 1975.
- Haidar, M. A., T. Manshour, *et al.* Downregulation of the p53 tumor suppressor gene and upregulation of the bcl-2 gene in retinoic acid receptor alpha-deficient transgenic mice. Int J Oncol, v.16, n.3, Mar, p.561-5. 2000.
- Halbert, C. L., G. W. Demers, *et al.* The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. J Virol, v.65, n.1, Jan, p.473-8. 1991.
- Hannon, G. J. RNA interference. Nature, v.418, n.6894, Jul 11, p.244-51. 2002.
- Hannon, G. J. e J. J. Rossi. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. Nature, v.431, n.7006, Sep 16, p.371-8. 2004.
- Haupt, S., M. Berger, *et al.* Apoptosis - the p53 network. J Cell Sci, v.116, n.Pt 20, Oct 15, p.4077-85. 2003.
- Haupt, Y., R. Maya, *et al.* Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. Nature, v.387, n.6630, May 15, p.296-9. 1997.
- He, S., H. M. Wang, *et al.* Dexamethasone induced proliferation of cultured retinal pigment epithelial cells. Curr Eye Res, v.13, n.4, Apr, p.257-61. 1994.
- Hermeking, H., C. Lengauer, *et al.* 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. Mol Cell, v.1, n.1, Dec, p.3-11. 1997.
- Hinz, B. e R. Hirschelmann. Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. Pharm Res, v.17, n.10, Oct, p.1273-7. 2000.
- Hollander, M. C., O. Kovalsky, *et al.* Dimethylbenzanthracene carcinogenesis in Gadd45a-null mice is associated with decreased DNA repair and increased mutation frequency. Cancer Res, v.61, n.6, Mar 15, p.2487-91. 2001.

- Hollenberg, S. M. e R. M. Evans. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. Cell, v.55, n.5, Dec 2, p.899-906. 1988.
- Hollenberg, S. M., V. Giguere, *et al.* Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. Cell, v.49, n.1, Apr 10, p.39-46. 1987.
- Hollenberg, S. M., C. Weinberger, *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. Nature, v.318, n.6047, Dec 19-1986 Jan 1, p.635-41. 1985.
- Hollstein, M., K. Rice, *et al.* Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. Nucleic Acids Res, v.22, n.17, Sep, p.3551-5. 1994.
- Hollstein, M., D. Sidransky, *et al.* p53 mutations in human cancers. Science, v.253, n.5015, Jul 5, p.49-53. 1991.
- Horikoshi, N., A. Usheva, *et al.* Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. Mol Cell Biol, v.15, n.1, Jan, p.227-34. 1995.
- Huang, S. T. e J. A. Cidlowski. Glucocorticoids inhibit serum depletion-induced apoptosis in T lymphocytes expressing Bcl-2. Faseb J, v.13, n.3, Mar, p.467-76. 1999.
- Hussain, S. P. e C. C. Harris. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. Cancer Res, v.58, n.18, Sep 15, p.4023-37. 1998.
- Hutchison, K. A., L. C. Scherrer, *et al.* Regulation of glucocorticoid receptor function through assembly of a receptor-heat shock protein complex. Ann N Y Acad Sci, v.684, Jun 11, p.35-48. 1993.
- Hwang, B. J., J. M. Ford, *et al.* Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.2, Jan 19, p.424-8. 1999.
- Inga, A., F. Storici, *et al.* Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. Mol Cell Biol, v.22, n.24, Dec, p.8612-25. 2002.
- Inoue, H., G. Kondoh, *et al.* Stability of p53 protein in rat cells transformed by various viral transforming genes. Virology, v.187, n.1, Mar, p.343-7. 1992.
- Inoue, T., K. Oka, *et al.* Dispensability of p53 degradation for tumorigenicity and decreased serum requirement of human papillomavirus type 16 E6. Mol Carcinog, v.21, n.3, Mar, p.215-22. 1998.
- Ishii-Morita, H., R. Agbaria, *et al.* Mechanism of 'bystander effect' killing in the herpes simplex thymidine kinase gene therapy model of cancer treatment. Gene Ther, v.4, n.3, Mar, p.244-51. 1997.
- Itoh, M., M. Adachi, *et al.* Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. Mol Endocrinol, v.16, n.10, Oct, p.2382-92. 2002.

- Iwamoto, K. S., T. Mizuno, *et al.* Gain-of-function p53 mutations enhance alteration of the T-cell receptor following X-irradiation, independently of the cell cycle and cell survival. Cancer Res, v.56, n.17, Sep 1, p.3862-5. 1996.
- Jenkins, J. R., K. Rudge, *et al.* Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. Nature, v.312, n.5995, Dec 13-19, p.651-4. 1984.
- Jin, S. e A. J. Levine. The p53 functional circuit. J Cell Sci, v.114, n.Pt 23, Dec, p.4139-40. 2001.
- Jones, S. N., A. E. Roe, *et al.* Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. Nature, v.378, n.6553, Nov 9, p.206-8. 1995.
- Kaji, A., Y. Zhang, *et al.* Pifithrin-alpha promotes p53-mediated apoptosis in JB6 cells. Mol Carcinog, v.37, n.3, Jul, p.138-48. 2003.
- Kaup, B., I. Schindler, *et al.* Time-dependent inhibition of glioblastoma cell proliferation by dexamethasone. J Neurooncol, v.51, n.2, Jan, p.105-10. 2001.
- Kawamura, M., T. Yamashita, *et al.* The 273rd codon mutants of p53 show growth modulation activities not correlated with p53-specific transactivation activity. Oncogene, v.12, n.11, Jun 6, p.2361-7. 1996.
- Kim, T. A., J. Lim, *et al.* NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. J Cell Biol, v.141, n.3, May 4, p.553-66. 1998.
- Kimura, S. H. e H. Nojima. Cyclin G1 associates with MDM2 and regulates accumulation and degradation of p53 protein. Genes Cells, v.7, n.8, Aug, p.869-80. 2002.
- Kino, T., M. U. De Martino, *et al.* Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. J Steroid Biochem Mol Biol, v.85, n.2-5, Jun, p.457-67. 2003.
- Ko, L. J. e C. Prives. p53: puzzle and paradigm. Genes Dev, v.10, n.9, May 1, p.1054-72. 1996.
- Koga, H. e W. Deppert. Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245-->Ser) in vivo. Oncogene, v.19, n.36, Aug 24, p.4178-83. 2000.
- Komarov, P. G., E. A. Komarova, *et al.* A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. Science, v.285, n.5434, Sep 10, p.1733-7. 1999.
- Koutsodontis, G., I. Tentes, *et al.* Sp1 plays a critical role in the transcriptional activation of the human cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) gene by the p53 tumor suppressor protein. J Biol Chem, v.276, n.31, Aug 3, p.29116-25. 2001.
- Kretz, O., H. M. Reichardt, *et al.* Corticotropin-releasing hormone expression is the major target for glucocorticoid feedback-control at the hypothalamic level. Brain Res, v.818, n.2, Feb 13, p.488-91. 1999.
- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, *et al.* Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.16, Aug 15, p.7491-5. 1992.
- Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature, v.358, n.6381, Jul 2, p.15-6. 1992.

- Lane, D. P. e L. V. Crawford. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature, v.278, n.5701, Mar 15, p.261-3. 1979.
- Langeveld, C. H., M. P. Van Waas, *et al.* Implication of glucocorticoid receptors in the stimulation of human glioma cell proliferation by dexamethasone. J Neurosci Res, v.31, n.3, Mar, p.524-31. 1992.
- Lanyi, A., D. Deb, *et al.* 'Gain of function' phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid-binding domain. Oncogene, v.16, n.24, Jun 18, p.3169-76. 1998.
- Lasa, M., S. M. Abraham, *et al.* Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. Mol Cell Biol, v.22, n.22, Nov, p.7802-11. 2002.
- Lee, D., J. W. Kim, *et al.* SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. J Biol Chem, v.277, n.25, Jun 21, p.22330-7. 2002.
- Lee, S., B. Elenbaas, *et al.* p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. Cell, v.81, n.7, Jun 30, p.1013-20. 1995.
- Lee, W., T. S. Harvey, *et al.* Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. Nat Struct Biol, v.1, n.12, Dec, p.877-90. 1994.
- Lee, Y. I., S. Lee, *et al.* Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. Oncogene, v.19, n.33, Aug 3, p.3717-26. 2000.
- Levine, A. J. The p53 tumor suppressor gene and gene product. Princess Takamatsu Symp, v.20, p.221-30. 1989.
- Levine, A. J., W. Hu, *et al.* The P53 pathway: what questions remain to be explored? Cell Death Differ, v.13, n.6, Jun, p.1027-36. 2006.
- Leverro, M., V. De Laurenzi, *et al.* The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. J Cell Sci, v.113 (Pt 10), May, p.1661-70. 2000.
- Li, J., C. Yen, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. Science, v.275, n.5308, Mar 28, p.1943-7. 1997.
- Li, M., J. Y. Zhou, *et al.* The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. J Biol Chem, v.278, n.42, Oct 17, p.41059-68. 2003.
- Li, S., M. Mawal-Dewan, *et al.* Enhanced proliferation of human fibroblasts, in the presence of dexamethasone, is accompanied by changes in p21Waf1/Cip1/Sdi1 and the insulin-like growth factor type 1 receptor. J Cell Physiol, v.177, n.3, Dec, p.396-401. 1998.
- Lin, J., J. Chen, *et al.* Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. Genes Dev, v.8, n.10, May 15, p.1235-46. 1994.

- Liu, C., Y. Shi, *et al.* Dual-specificity phosphatase DUSP1 protects overactivation of hypoxia-inducible factor 1 through inactivating ERK MAPK. Exp Cell Res, v.309, n.2, Oct 1, p.410-8. 2005.
- Liu, P. K., E. Kraus, *et al.* Analysis of genomic instability in Li-Fraumeni fibroblasts with germline p53 mutations. Oncogene, v.12, n.11, Jun 6, p.2267-78. 1996.
- Liu, Y., J. P. Lagowski, *et al.* Facilitated search for specific genomic targets by p53 C-terminal basic DNA binding domain. Cancer Biol Ther, v.3, n.11, Nov, p.1102-8. 2004.
- Losel, R. e M. Wehling. Nongenomic actions of steroid hormones. Nat Rev Mol Cell Biol, v.4, n.1, Jan, p.46-56. 2003.
- Lotem, J. e L. Sachs. Regulation by bcl-2, c-myc, and p53 of susceptibility to induction of apoptosis by heat shock and cancer chemotherapy compounds in differentiation-competent and -defective myeloid leukemic cells. Cell Growth Differ, v.4, n.1, Jan, p.41-7. 1993.
- Lou, S. J. e Y. Z. Chen. The rapid inhibitory effect of glucocorticoid on cytosolic free Ca²⁺ increment induced by high extracellular K⁺ and its underlying mechanism in PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun, v.244, n.2, Mar 17, p.403-7. 1998.
- Lowe, S. W., E. M. Schmitt, *et al.* p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature, v.362, n.6423, Apr 29, p.847-9. 1993.
- Lu, H. e A. J. Levine. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.11, May 23, p.5154-8. 1995.
- Lu, N. Z. e J. A. Cidlowski. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. Mol Cell, v.18, n.3, Apr 29, p.331-42. 2005.
- Ludes-Meyers, J. H., M. A. Subler, *et al.* Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. Mol Cell Biol, v.16, n.11, Nov, p.6009-19. 1996.
- Luque, I. e C. Gelinas. Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. Semin Cancer Biol, v.8, n.2, Apr, p.103-11. 1997.
- Magrassi, L., G. Butti, *et al.* Effects of vitamin D and retinoic acid on human glioblastoma cell lines. Acta Neurochir (Wien), v.133, n.3-4, p.184-90. 1995.
- Mahimainathan, L. e G. G. Choudhury. Inactivation of platelet-derived growth factor receptor by the tumor suppressor PTEN provides a novel mechanism of action of the phosphatase. J Biol Chem, v.279, n.15, Apr 9, p.15258-68. 2004.
- Maier, C., D. Runzler, *et al.* G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. J Cell Sci, v.118, n.Pt 15, Aug 1, p.3353-61. 2005.
- Maier, D., Z. Zhang, *et al.* Somatic deletion mapping on chromosome 10 and sequence analysis of PTEN/MMAC1 point to the 10q25-26 region as the primary target in low-grade and high-grade gliomas. Oncogene, v.16, n.25, Jun 25, p.3331-5. 1998.
- Maiyar, A. C., A. J. Huang, *et al.* p53 stimulates promoter activity of the sgk. serum/glucocorticoid-inducible serine/threonine protein kinase gene in rodent mammary epithelial cells. J Biol Chem, v.271, n.21, May 24, p.12414-22. 1996.

- Maiyar, A. C., P. T. Phu, *et al.* Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein. Mol Endocrinol, v.11, n.3, Mar, p.312-29. 1997.
- Margulies, L. e P. B. Sehgal. Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP beta (NF-IL6) activity by p53 species. J Biol Chem, v.268, n.20, Jul 15, p.15096-100. 1993.
- Markowitz, D., S. Goff, *et al.* Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. Virology, v.167, n.2, Dec, p.400-6. 1988.
- Martin, S. J. e D. R. Green. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. Crit Rev Oncol Hematol, v.18, n.2, Feb, p.137-53. 1995.
- Mayo, L. D. e D. B. Donner. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. Trends Biochem Sci, v.27, n.9, Sep, p.462-7. 2002.
- Mckinney, K., M. Mattia, *et al.* p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. Mol Cell, v.16, n.3, Nov 5, p.413-24. 2004.
- Mcmurray, H. R. e D. J. Mccance. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. J Virol, v.77, n.18, Sep, p.9852-61. 2003.
- Mendrysa, S. M. e M. E. Perry. The p53 tumor suppressor protein does not regulate expression of its own inhibitor, MDM2, except under conditions of stress. Mol Cell Biol, v.20, n.6, Mar, p.2023-30. 2000.
- Mercado, J. M. Reversão fenotípica de células ST1 induzida por hormônios glucocorticóides: análise ao nível de ciclo celular e de genes supressores de tumor. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1997.
- Mesnil, M., C. Piccoli, *et al.* Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.5, Mar 5, p.1831-5. 1996.
- Middeler, G., K. Zerf, *et al.* The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. Oncogene, v.14, n.12, Mar 27, p.1407-17. 1997.
- Miller, A. L., M. S. Webb, *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. Mol Endocrinol, v.19, n.6, Jun, p.1569-83. 2005.
- Milner, J. e E. A. Medcalf. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. Cell, v.65, n.5, May 31, p.765-74. 1991.
- Miyashita, T., M. Harigai, *et al.* Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. Cancer Res, v.54, n.12, Jun 15, p.3131-5. 1994.
- Miyashita, T. e J. C. Reed. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell, v.80, n.2, Jan 27, p.293-9. 1995.

- Moalli, P. A. e S. T. Rosen. Glucocorticoid receptors and resistance to glucocorticoids in hematologic malignancies. Leuk Lymphoma, v.15, n.5-6, Nov, p.363-74. 1994.
- Moll, U. M., M. Laquaglia, *et al.* Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.10, May 9, p.4407-11. 1995.
- Moll, U. M., G. Riou, *et al.* Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.15, Aug 1, p.7262-6. 1992.
- Momand, J., D. Jung, *et al.* The MDM2 gene amplification database. Nucleic Acids Res, v.26, n.15, Aug 1, p.3453-9. 1998.
- Momand, J., G. P. Zambetti, *et al.* The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell, v.69, n.7, Jun 26, p.1237-45. 1992.
- Moolten, F. L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. Cancer Res, v.46, n.10, Oct, p.5276-81. 1986.
- Mori, N., J. Yamate, *et al.* Modulations of glucocorticoid-induced apoptosis linked to the p53 deletion and to the apoptosis susceptibility gene Rapop1 (Radiation-induced apoptosis 1). Oncogene, v.18, n.29, Jul 22, p.4282-5. 1999.
- Mrass, P., M. Rendl, *et al.* Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis: a possible explanation for tumor preventive action of retinoids. Cancer Res, v.64, n.18, Sep 15, p.6542-8. 2004.
- Muchardt, C. e M. Yaniv. A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. Embo J, v.12, n.11, Nov, p.4279-90. 1993.
- Mukherjee, P. e S. K. Das. Action of retinoic acid on human glioblastoma-astrocytoma--14 cells in culture. Neoplasma, v.42, n.3, p.123-8. 1995.
- Munger, K., A. Baldwin, *et al.* Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. J Virol, v.78, n.21, Nov, p.11451-60. 2004.
- Murphy, P. J., M. D. Galigniana, *et al.* Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. J Biol Chem, v.279, n.29, Jul 16, p.30195-201. 2004.
- Nakano, K. e K. H. Vousden. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell, v.7, n.3, Mar, p.683-94. 2001.
- Newton, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? Thorax, v.55, n.7, Jul, p.603-13. 2000.
- Ni Chonghaile, T., C. G. Concannon, *et al.* Dexamethasone inhibits apoptosis in C6 glioma cells through increased expression of Bcl-XL. Apoptosis, v.11, n.7, Jul, p.1247-55. 2006.
- Nishi, M. e M. Kawata. Brain corticosteroid receptor dynamics and trafficking: Implications from live cell imaging. Neuroscientist, v.12, n.2, Apr, p.119-33. 2006.

- Nozaki, M., M. Tada, *et al.* Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. Neuro Oncol, v.1, n.2, Apr, p.124-37. 1999.
- Okamoto, K. e D. Beach. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. Embo J, v.13, n.20, Oct 17, p.4816-22. 1994.
- Okamoto, K., H. Li, *et al.* Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. Mol Cell, v.9, n.4, Apr, p.761-71. 2002.
- Ongusaha, P. P., J. I. Kim, *et al.* p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. Embo J, v.22, n.6, Mar 17, p.1289-301. 2003.
- Oren, M. e A. J. Levine. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. Proc Natl Acad Sci U S A, v.80, n.1, Jan, p.56-9. 1983.
- Ortis, F. Papel de BRG1 e Brm, Reguladores Globais de Transcrição, na Reversão Fenotípica de Células ST1 Pela Ação de Glicocorticóides. Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, 2002.
- Ory, K., Y. Legros, *et al.* Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. Embo J, v.13, n.15, Aug 1, p.3496-504. 1994.
- Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene, v.18, n.49, Nov 22, p.6853-66. 1999.
- Parada, L. F., H. Land, *et al.* Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. Nature, v.312, n.5995, Dec 13-19, p.649-51. 1984.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.
- Picard, D. e K. R. Yamamoto. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. Embo J, v.6, n.11, Nov, p.3333-40. 1987.
- Pinski, J., G. Halmos, *et al.* Inhibition of growth of the human malignant glioma cell line (U87MG) by the steroid hormone antagonist RU486. J Clin Endocrinol Metab, v.77, n.5, Nov, p.1388-92. 1993.
- Polyak, K., Y. Xia, *et al.* A model for p53-induced apoptosis. Nature, v.389, n.6648, Sep 18, p.300-5. 1997.
- Pratt, W. B. e D. O. Toft. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocr Rev, v.18, n.3, Jun, p.306-60. 1997.
- Prives, C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. Cell, v.95, n.1, Oct 2, p.5-8. 1998.
- Rainov, N. G. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. Hum Gene Ther, v.11, n.17, Nov 20, p.2389-401. 2000.
- Rainwater, R., D. Parks, *et al.* Role of cysteine residues in regulation of p53 function. Mol Cell Biol, v.15, n.7, Jul, p.3892-903. 1995.

- Reagan, L. P. e B. S. Mcewen. Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. J Chem Neuroanat, v.13, n.3, Aug, p.149-67. 1997.
- Reed, M., B. Woelker, *et al.* The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.21, Oct 10, p.9455-9. 1995.
- Reich, N. C. e A. J. Levine. Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. Nature, v.308, n.5955, Mar 8-14, p.199-201. 1984.
- Reichardt, H. M., K. H. Kaestner, *et al.* DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. Cell, v.93, n.4, May 15, p.531-41. 1998.
- Riva, C., C. Chauvin, *et al.* Cellular physiology and molecular events in hypoxia-induced apoptosis. Anticancer Res, v.18, n.6B, Nov-Dec, p.4729-36. 1998.
- Robe, P. A., M. Nguyen-Khac, *et al.* Dexamethasone inhibits the HSV-tk/ ganciclovir bystander effect in malignant glioma cells. BMC Cancer, v.5, n.1, p.32. 2005.
- Rogatsky, I., J. M. Trowbridge, *et al.* Glucocorticoid receptor-mediated cell cycle arrest is achieved through distinct cell-specific transcriptional regulatory mechanisms. Mol Cell Biol, v.17, n.6, Jun, p.3181-93. 1997.
- Rogel, A., M. Popliker, *et al.* p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. Mol Cell Biol, v.5, n.10, Oct, p.2851-5. 1985.
- Rotter, V. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.80, n.9, May, p.2613-7. 1983.
- Rotter, V., M. A. Boss, *et al.* Increased concentration of an apparently identical cellular protein in cells transformed by either Abelson murine leukemia virus or other transforming agents. J Virol, v.38, n.1, Apr, p.336-46. 1981.
- Rouault, J. P., N. Falette, *et al.* Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway. Nat Genet, v.14, n.4, Dec, p.482-6. 1996.
- Rubsam, L. Z., B. L. Davidson, *et al.* Superior cytotoxicity with ganciclovir compared with acyclovir and 1-beta-D-arabinofuranosylthymine in herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing cells: a novel paradigm for cell killing. Cancer Res, v.58, n.17, Sep 1, p.3873-82. 1998.
- Rutka, J. T., S. J. De Armond, *et al.* Effect of retinoids on the proliferation, morphology and expression of glial fibrillary acidic protein of an anaplastic astrocytoma cell line. Int J Cancer, v.42, n.3, Sep 15, p.419-27. 1988.
- Sackey, F. N., C. S. Watson, *et al.* Cell cycle regulation of membrane glucocorticoid receptor in CCRF-CEM human ALL cells: correlation to apoptosis. Am J Physiol, v.273, n.3 Pt 1, Sep, p.E571-83. 1997.
- Sarkar, S. A. e R. P. Sharma. All-trans-retinoic acid-mediated modulation of p53 during neural differentiation in murine embryonic stem cells. Cell Biol Toxicol, v.18, n.4, p.243-57. 2002.

- Sasson, R., K. Tajima, *et al.* Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. Endocrinology, v.142, n.2, Feb, p.802-11. 2001.
- Scheffner, M., T. Takahashi, *et al.* Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins. J Virol, v.66, n.8, Aug, p.5100-5. 1992.
- Scheffner, M., B. A. Werness, *et al.* The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell, v.63, n.6, Dec 21, p.1129-36. 1990.
- Scheinman, R. I., A. Gualberto, *et al.* Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol, v.15, n.2, Feb, p.943-53. 1995.
- Schmidt, F., P. Groscurth, *et al.* Human malignant glioma cell lines are refractory to retinoic acid-mediated differentiation and sensitization to apoptosis. Cell Physiol Biochem, v.10, n.3, p.159-68. 2000.
- Schmidt, M., H. G. Pauels, *et al.* Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. J Immunol, v.163, n.6, Sep 15, p.3484-90. 1999.
- Schulz, M., S. Schneider, *et al.* Identification of nucleolin as a glucocorticoid receptor interacting protein. Biochem Biophys Res Commun, v.280, n.2, Jan 19, p.476-80. 2001.
- Schwertfeger, M., M. Roskos, *et al.* Identification of the site of glucocorticoid action on neutral amino acid transport in superficial nephrons of rat kidney. Amino Acids, v.18, n.3, p.279-88. 2000.
- Scotto, C., C. Delphin, *et al.* Concerted regulation of wild-type p53 nuclear accumulation and activation by S100B and calcium-dependent protein kinase C. Mol Cell Biol, v.19, n.10, Oct, p.7168-80. 1999.
- Sehgal, P. B. e L. Margulies. Cell-type- and promoter-dependent ts phenotype of p53 Val135. Oncogene, v.8, n.12, Dec, p.3417-9. 1993.
- Sengupta, S., J. L. Vonesch, *et al.* Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. Embo J, v.19, n.22, Nov 15, p.6051-64. 2000.
- Sengupta, S. e B. Wasylyk. Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. Genes Dev, v.15, n.18, Sep 15, p.2367-80. 2001.
- Shaulian, E., A. Zauberman, *et al.* Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. Mol Cell Biol, v.12, n.12, Dec, p.5581-92. 1992.
- Shaulsky, G., N. Goldfinger, *et al.* Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. Mol Cell Biol, v.10, n.12, Dec, p.6565-77. 1990.
- _____. Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. Cancer Res, v.51, n.19, Oct 1, p.5232-7. 1991.
- Sherr, C. J. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. Genes Dev, v.12, n.19, Oct 1, p.2984-91. 1998.

- Shieh, S. Y., M. Ikeda, *et al.* DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. Cell, v.91, n.3, Oct 31, p.325-34. 1997.
- Sikora, E., G. P. Rossini, *et al.* Interference between DNA binding activities of AP-1 and GR transcription factors in rat thymocytes undergoing dexamethasone-induced apoptosis. Acta Biochim Pol, v.43, n.4, p.721-31. 1996.
- Smith, M. L., Q. Zhan, *et al.* Role of retinoblastoma gene product in p53-mediated DNA damage response. Exp Cell Res, v.215, n.2, Dec, p.386-9. 1994.
- Soussi, T., C. Caron De Fromentel, *et al.* Cloning and characterization of a cDNA from *Xenopus laevis* coding for a protein homologous to human and murine p53. Oncogene, v.1, n.1, Mar, p.71-8. 1987.
- Stambolic, V., D. Macpherson, *et al.* Regulation of PTEN transcription by p53. Mol Cell, v.8, n.2, Aug, p.317-25. 2001.
- Stenger, J. E., P. Tegtmeier, *et al.* p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. Embo J, v.13, n.24, Dec 15, p.6011-20. 1994.
- Strano, S., E. Munarriz, *et al.* Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. J Biol Chem, v.275, n.38, Sep 22, p.29503-12. 2000.
- Sturzbecher, H. W., P. Chumakov, *et al.* Mutant p53 proteins bind hsp 72/73 cellular heat shock-related proteins in SV40-transformed monkey cells. Oncogene, v.1, n.2, May, p.201-11. 1987.
- Suehiro, T., T. Kaneda, *et al.* Regulation of human glucocorticoid receptor gene transcription by Sp1 and p53. Mol Cell Endocrinol, v.222, n.1-2, Jul 30, p.33-40. 2004.
- Sun, H., C. H. Charles, *et al.* MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. Cell, v.75, n.3, Nov 5, p.487-93. 1993.
- Sutter-Dub, M. T. Rapid non-genomic and genomic responses to progestogens, estrogens, and glucocorticoids in the endocrine pancreatic B cell, the adipocyte and other cell types. Steroids, v.67, n.2, Feb, p.77-93. 2002.
- Takada, N., E. Isogai, *et al.* Retinoic acid-induced apoptosis of the CHP134 neuroblastoma cell line is associated with nuclear accumulation of p53 and is rescued by the GDNF/Ret signal. Med Pediatr Oncol, v.36, n.1, Jan, p.122-6. 2001.
- Tang, H. Y., K. Zhao, *et al.* Constitutive expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is transcriptionally regulated by the tumor suppressor protein p53. J Biol Chem, v.273, n.44, Oct 30, p.29156-63. 1998.
- Tao, W. e A. J. Levine. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.12, Jun 8, p.6937-41. 1999.
- Tasker, J. G., S. Di, *et al.* Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. Endocrinology, v.147, n.12, Dec, p.5549-56. 2006.
- Telerman, A., M. Tuijnder, *et al.* A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.18, Sep 15, p.8702-6. 1993.

- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, *et al.* A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. Genes Dev, v.13, n.2, Jan 15, p.152-7. 1999.
- Tiscornia, G., O. Singer, *et al.* A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.4, Feb 18, p.1844-8. 2003.
- Tishler, R. B., S. K. Calderwood, *et al.* Increases in sequence specific DNA binding by p53 following treatment with chemotherapeutic and DNA damaging agents. Cancer Res, v.53, n.10 Suppl, May 15, p.2212-6. 1993.
- Tsai, S. Y., J. Carlstedt-Duke, *et al.* Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. Cell, v.55, n.2, Oct 21, p.361-9. 1988.
- Tsutsumi-Ishii, Y., K. Tadokoro, *et al.* Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. Cell Growth Differ, v.6, n.1, Jan, p.1-8. 1995.
- Unger, T., J. A. Mietz, *et al.* Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. Mol Cell Biol, v.13, n.9, Sep, p.5186-94. 1993.
- Unger, T., M. M. Nau, *et al.* p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. Embo J, v.11, n.4, Apr, p.1383-90. 1992.
- A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. Cell, v.97, n.2, Apr 16, p.161-3. 1999.
- Urban, G., T. Golden, *et al.* Identification of a functional link for the p53 tumor suppressor protein in dexamethasone-induced growth suppression. J Biol Chem, v.278, n.11, Mar 14, p.9747-53. 2003.
- Valentini, S. R. e M. C. Armelin. Cloning of glucocorticoid-regulated genes in C6/ST1 rat glioma phenotypic reversion. J Endocrinol, v.148, n.1, Jan, p.11-7. 1996.
- Valentini, S. R., M. L. Oliveira, *et al.* Glucocorticoid-regulated gene in transformed to normal phenotypic reversion. Braz J Med Biol Res, v.27, n.2, Feb, p.541-6. 1994.
- Van Oijen, M. G. e P. J. Slootweg. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. Clin Cancer Res, v.6, n.6, Jun, p.2138-45. 2000.
- Vedoy, C. G. e M. C. Sogayar. Isolation and characterization of genes associated with the anti-tumor activity of glucocorticoids. Brain Res Mol Brain Res, v.106, n.1-2, Oct 15, p.57-69. 2002.
- Von Lindern, M., W. Zauner, *et al.* The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. Blood, v.94, n.2, Jul 15, p.550-9. 1999.
- Vousden, K. H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. Biochim Biophys Acta, v.1602, n.1, Mar 14, p.47-59. 2002.
- Vousden, K. H. e X. Lu. Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer, v.2, n.8, Aug, p.594-604. 2002.

- Walker, K. K. e A. J. Levine. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.26, Dec 24, p.15335-40. 1996.
- Wang, X. J., D. A. Greenhalgh, *et al.* Analysis of centrosome abnormalities and angiogenesis in epidermal-targeted p53172H mutant and p53-knockout mice after chemical carcinogenesis: evidence for a gain of function. Mol Carcinog, v.23, n.3, Nov, p.185-92. 1998.
- Weller, M., C. Schmidt, *et al.* Chemotherapy of human malignant glioma: prevention of efficacy by dexamethasone? Neurology, v.48, n.6, Jun, p.1704-9. 1997.
- Wolf, D., N. Harris, *et al.* Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. Cell, v.38, n.1, Aug, p.119-26. 1984.
- Wu, W., T. Pew, *et al.* Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. J Biol Chem, v.280, n.6, Feb 11, p.4117-24. 2005.
- Xiao, H., A. Pearson, *et al.* Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. Mol Cell Biol, v.14, n.10, Oct, p.7013-24. 1994.
- Xiao, L., A. Qi, *et al.* Cultured embryonic hippocampal neurons deficient in glucocorticoid (GC) receptor: a novel model for studying nongenomic effects of GC in the neural system. Endocrinology, v.146, n.9, Sep, p.4036-41. 2005.
- Xiong, Y., G. J. Hannon, *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature, v.366, n.6456, Dec 16, p.701-4. 1993.
- Yamamoto, M., K. Fukuda, *et al.* Inhibition by dexamethasone of transforming growth factor beta1-induced apoptosis in rat hepatoma cells: a possible association with Bcl-xL induction. Hepatology, v.27, n.4, Apr, p.959-66. 1998.
- Yang, A., N. Walker, *et al.* p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. Nature, v.404, n.6773, Mar 2, p.99-103. 2000.
- Yu, C., N. Yap, *et al.* Modulation of hormone-dependent transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by the tumor suppressor p53. Cancer Lett, v.116, n.2, Jun 24, p.191-6. 1997.
- Yu, J., L. Zhang, *et al.* PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Mol Cell, v.7, n.3, Mar, p.673-82. 2001.
- Yung, W. K., R. Lotan, *et al.* Modulation of growth and epidermal growth factor receptor activity by retinoic acid in human glioma cells. Cancer Res, v.49, n.4, Feb 15, p.1014-9. 1989.
- Zacchi, P., M. Gostissa, *et al.* The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. Nature, v.419, n.6909, Oct 24, p.853-7. 2002.
- Zauberman, A., A. Lupo, *et al.* Identification of p53 target genes through immune selection of genomic DNA: the cyclin G gene contains two distinct p53 binding sites. Oncogene, v.10, n.12, Jun 15, p.2361-6. 1995.
- Zhang, L., L. Nie, *et al.* P53 and p73 differ in their ability to inhibit glucocorticoid receptor (GR) transcriptional activity. Mol Cancer, v.5, p.68. 2006.

Zhang, P. The cell cycle and development: redundant roles of cell cycle regulators. Curr Opin Cell Biol, v.11, n.6, Dec, p.655-62. 1999.

Zhang, Y. e Y. Xiong. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. Science, v.292, n.5523, Jun 8, p.1910-5. 2001.

Zhao, R., K. Gish, *et al.* Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. Genes Dev, v.14, n.8, Apr 15, p.981-93. 2000.

Zheng, H., H. You, *et al.* The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. Nature, v.419, n.6909, Oct 24, p.849-53. 2002.

Zhou, J., J. Ahn, *et al.* A role for p53 in base excision repair. Embo J, v.20, n.4, Feb 15, p.914-23. 2001.

Zibera, C., N. Gibelli, *et al.* Proliferative effect of dexamethasone on a human glioblastoma cell line (HU 197) is mediated by glucocorticoid receptors. Anticancer Res, v.12, n.5, Sep-Oct, p.1571-4. 1992.

Zotchev, S. B., M. Protopopova, *et al.* p53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core. Nucleic Acids Res, v.28, n.20, Oct 15, p.4005-12. 2000.

Zuo, Z., G. Urban, *et al.* Ser/Thr protein phosphatase type 5 (PP5) is a negative regulator of glucocorticoid receptor-mediated growth arrest. Biochemistry, v.38, n.28, Jul 13, p.8849-57. 1999.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Antero Ferreira de Almeida Macedo

Data de nascimento: 19 de Maio de 1980. Local: São Paulo.

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Colégio Etapa, São Paulo, 1995-1997.

Graduação: Ciências Biológicas.

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998-2001.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, Fev. 2002 a Fev. 2007

PUBLICAÇÕES

Comunicações e Resumos Publicados em Anais de Congressos ou Periódicos (resumo)

1. MACEDO, A. F. A., Demasi, M.A.A., Carvalho, L.H., Sogayar, M.C. ROLE OF P53 IN THE CELLULAR RESPONSIVENESS TO GLUCOCORTICOID HORMONE-MEDIATED GROWTH ARREST IN A RAT GLIOMA MODEL In: 12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, 2006, Atenas. **12th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer.** , 2006.

2. MACEDO, A. F. A., Demasi, M.A.A., Carvalho, L.H., Sogayar, M.C. ROLE OF P53 IN THE CELLULAR RESPONSIVENESS/RESISTANCE TO GLUCOCORTICOID-MEDIATED GROWTH ARREST IN A RAT GLIOMA CELL MODEL In: 7TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PREDICTIVE ONCOLOGY & INTERVENTION STRATEGIES, 2004, NICE. **CANCER DETECTION AND PREVENTION - 2004 SYMPOSIUM VOLUME.** CANCER DETECTION AND PREVENTION, 2004. v.28. p.S-69 - S-69

3. MACEDO, A. F. A., Carvalho, L.H., Demasi, M.A.A., Sogayar, M.C. ENHANCEMENT OF P53 ACTIVITY AND UP-REGULATION OF ITS TARGET-GENES DURING THE GLUCOCORTICOID-INDUCED PHENOTYPIC REVERSION OF ST1 GLIOMA CELLS In: XXXII Reunião Anual da SBBq, 2003, Caxambu - MG. **Programa e Resumos da XXXII Reunião Anual da SBBq.** , 2003. v.XXXII. p.16 – 16.
4. Ortis, F, Colin, C., MACEDO, A. F. A., Sogayar, M.C. PHENOTYPIC REVERSION INDUCED BY BRG-1 AND BRM GENES OVEREXPRESSION IN RAT GLIOMA CELL LINES In: XXXI Reunião Anual da SBBq, 2002, Caxambu - MG. **Programa e Resumos da XXXI Reunião Anual da SBBq.** , 2002. p.18 – 18.
5. Ortis, F, Pompéia, C., Vila, R.L., MACEDO, A. F. A., Sogayar, M.C. JE-MCP-1 CYTOKINE EXPRESSION DURING THE PHENOTYPIC REVERSION OF THE C6/ST1 GLIOMA CELLS CAUSED BY GLUCOCORTICOID TREATMENT In: XXX Reunião Anual da SBBq, 2001, Caxambu - MG. **Programa e Resumos da XXX Reunião Anual da SBBq.**, 2001.