

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

JULIANA GALVÃO DA SILVA

Efeito dual de FGF2 e PMA em células HEK 293
transformadas por H-ras^{V12}

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
25/06/2014

JULIANA GALVÃO DA SILVA

**Efeito dual de FGF2 e PMA em células HEK 293
transformadas por H-ras^{V12}**

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

Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

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

Silva, Juliana Galvão da
S586ef Efeito dual de FGF2 e PMA em células HEK 293 transformadas por
H-ras^{v12} / Juliana Galvão da Silva. -- São Paulo, 2014.
100p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Biquímica.
Orientador: Armelin, Hugo Aguirre

1. Biologia molecular 2. Ciclo celular: Fisiologia 3. Câncer
I. T. II. Armelin, Hugo Aguirre, orientador.

574.88 CDD

Juliana Galvão da Silva

Efeito dual de FGF2 e PMA em células HEK 293 transformadas por H-ras^{V12}

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

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus amados pais, Bernadete e Otoniel.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, professor Hugo Armelin, cientista de mente brilhante com o qual eu tive o privilégio de discutir ciência, mas, acima de tudo, um ser humano compreensivo e amigável, excelente contador de histórias, com o qual eu tive o prazer de conviver.

Aos meus colegas e amigos de laboratório atuais e antigos: Matheus Dias, pelo apoio incondicional desde a época do curso de verão e por ter feito tchuchu no Jorge Kalil; Ju Zeidler, uma das cientistas mais determinadas e inteligentes que eu tive o prazer de trabalhar e que consegue me surpreender mesmo após 5 anos de convivência; Alê Dermargos, conselheiro para todas as horas e todos os assuntos; Cecília Sella, Eduardo Lopes, Leo Iwai, Marcelo Reis, Layra Costa, cujas conversas tornaram o dia a dia no laboratório mais agradável e divertido; Fábio Nakano, Gilson Murata, Mariana Koga e Jaqueline Salotti, que apesar do menor tempo de convivência, tornaram-se igualmente queridas e relevantes em meu processo de aprendizado. Obrigada a todos pela ajuda nas discussões, execução de experimentos, análise de resultados, conversas aleatórias e por fazer do laboratório um lugar legal para se trabalhar.

Aos meus orientadores de Iniciação Científica, Selma Jerônimo e Bruna Maciel, por me despertarem para o mundo da ciência.

A todos os professores e funcionários do IQ, em especial à Daniela Basseres e ao Fábio Forti, por cederem reagentes, vetores, células e tempo, sempre que solicitado; e ao Bayardo Torres por ter idealizado o curso de verão e por ter me ajudado com os estudos para a prova de ingresso.

Aos queridos colegas de pós-graduação do IQ e do CeTICS, pelas mais diversas contribuições.

As minhas antigas e atuais companheiras de república, Marli, Anilza, Wal, Laura e Renatinha. Tive sorte de encontrar pessoas tão confiáveis e queridas para dividir o lar.

Aos meus pais, Bernadete e Otoniel, que não mediram esforços para me proporcionar uma educação de qualidade e que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Devo tudo o que me tornei a vocês.

Aos meus irmãos Marcel e Renato, pela torcida em tudo o que eu faço.

A minha sobrinha linda, por existir.

Ao meu amor, Thiago, por sempre estar ao meu lado.

A minha família paulista, que tornou São Paulo um lugar melhor para se viver. Vocês foram o melhor presente que eu ganhei por ter vindo a São Paulo. Agradeço em especial a minha prima Mariana e Tia Margha que me acolheram sem nem mesmo me conhecer.

Aos meus tios, tias, primos e primas, cunhada e madrinhas pelas orações e apoio.

As minhas amigas, Yulão, Karlinha, Nathy, Lore, Rana, MariSukita, Nanda e Katrine. Em especial à Maricotinha, a metade da minha laranja, com quem eu posso contar para tudo.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização desta tese.

Este projeto teve suporte financeiro da FAPESP e do CNPq.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Silva, J.G. **Efeito dual de FGF2 e PMA em células HEK293 transformadas por H-ras^{V12}**. 2014. 100p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sabe-se há décadas que mutações nos genes ras estão presentes em cerca de 20% dos cânceres humanos, mas o desenvolvimento de terapias eficazes para o tratamento de câncer dependente dos oncogenes ras permanece um desafio científico importante. Nesse contexto, o nosso grupo publicou recentemente resultados interessantes mostrando que FGF2 exógeno ou PMA, contrariamente à expectativa geral, inibem a proliferação de células de camundongo malignas dependentes dos oncogenes H- ou K-Ras. Para dar continuidade a estes estudos o projeto desta tese foi planejado para investigar os mecanismos subjacentes a possíveis efeitos citotóxicos de FGF2 e PMA em células humanas transformadas por ras. Para esse fim, a linhagem humana imortalizada HEK 293 foi condicionalmente transformada pela expressão ectópica da construção quimérica de DNA ER:H-ras^{V12}, que codifica a oncoproteína de fusão ER:H-Ras^{V12}, cuja atividade é induzível por 4-hidroxi-tamoxifen (4OHT). Essa abordagem nos permitiu verificar os efeitos de FGF2 e PMA em sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} fenotipicamente “normais” ou transformadas por níveis crescentes da oncoproteína H-Ras^{V12}. Os principais resultados mostraram que tanto FGF2 como PMA tem efeito dual promovendo ou inibindo a proliferação das células transformadas em função da concentração intracelular crescente de H-Ras^{V12}.

Ensaio de crescimento de colônias em suspensão de agarose mostraram que: a) as células parentais HEK293 não desenvolveram colônias mesmo quando tratadas com FGF2 ou PMA, resultados que estão de acordo com seu fenótipo não tumoral; b) mas, as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} deram origem a colônias mesmo quando tratadas com concentrações pequenas de 4OHT, que condicionaram níveis intracelulares baixos de ER:HRas^{V12}; nestas condições experimentais, FGF2 foi um forte promotor do crescimento de colônias, condizente com sua reconhecida atividade promotora do crescimento de células tumorais em suspensão; ainda nestas condições, PMA não teve efeito significativo sobre o crescimento de colônias; c) coerentemente, concentrações elevadas de 4-OHT levaram aos níveis intracelulares mais altos de ER:HRas^{V12} e, por conseguinte, a desenvolvimento máximo de colônias de células HEK/ER:Hras^{V12}, no entanto, nestas condições, ambos FGF2 e PMA inibiram completamente o crescimento de colônias.

Por outro lado, transformação de HEK293 com um vetor de expressão constitutiva de Hras^{V12} levou à seleção e isolamento das sublinhagens tumorais HEK/Hras^{V12}, cujo

fenótipo se caracterizou por: a) nenhum efeito de FGF2 sobre a sua proliferação e b) forte inibição de sua proliferação por PMA.

A ação citotóxica de PMA exclusivamente observada em células HEK 293 transformadas por H-ras^{V12} se caracterizou por: a) total dependência de PKC, provavelmente mediada pela ativação proteolítica específica de PKC δ ; b) envolvimento de níveis elevados e sustentados de ROS com disparo tardio de apoptose.

Palavras-chave: linhagem celular humana HEK 293, Hras^{V12}, FGF2, PMA.

ABSTRACT

Silva, J.G. **Dual effects of FGF2 and PMA on H-ras^{V12} transformed HEK293 cell line.** 2014. 100p. Thesis – Graduate program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

It is known for nearly 20 years that mutated ras oncogenes are found in 20% of human malignancies, however efficacious therapies are not yet available for Ras-driven cancer. Along of these lines, our group recently published provocative results showing, against common belief, that FGF2 and PMA inhibited proliferation of Ras-dependent malignant mouse cells. Aiming to gain insight into this intriguing phenomenon, the present thesis project was planned to investigate the possible cytotoxicity of FGF2 and PMA in human Ras-driven malignant cells. To this end an immortalized non-tumorigenic human cell line (HEK293) was stably transformed with the DNA construction ER:H-ras^{V12}, which encodes the fusion protein ER:H-Ras^{V12}, whose activity requires activation by 4-hidroxi-tamoxifen (4-OHT). This approach allowed us to evaluate FGF2 and PMA effects on HEK/ER:Hras^{V12} sublines under switching from “normal” to transformed phenotypes upon 4-OHT induction. Our main results have shown that both FGF2 and PMA displayed dual effects promoting or inhibiting proliferation of HEK/ER:Hras^{V12} cells in function of ER:HRas^{V12} intracellular levels.

Clonogenic assays in agarose suspension have shown: a) parental HEK293 line did not develop colonies under FGF2 and PMA treatment or not, in agreement with its non-tumorigenic nature; b) however, HEK/ER:Hras^{V12} sublines developed colonies even under low 4-OHT concentrations, which led to low ER:HRas^{V12} intracellular levels; under these conditions FGF2 strongly promoted colony growth and PMA had no effect; c) furthermore, in HEK/ER:Hras^{V12} sublines, elevated 4-OHT concentrations led to high ER:HRas^{V12} intracellular levels and maximal colony growth; but, under these experimental conditions both FGF2 and PMA abolished colony growth.

On the other hand, HEK293 transformation with a vector that constitutively express Hras^{V12} yielded HEK/ER:Hras^{V12} sublines displaying the following phenotypic traits: a) non FGF2 effects on proliferation and b) severe proliferation inhibition by PMA.

PMA toxicity, exclusively observed in Hras^{V12} –transformed HEK293 cells, was characterized by: a) total dependency on PKC, likely mediated by specific proteolytic activation of PKC δ ; b) involvement of high and sustained ROS levels correlated with late apoptosis triggering.

Keywords: Human immortalized HEK 293 cell line, H-Ras^{V12}, FGF2, PMA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-OHT	4-hidroxi-tamoxifen
AKT	Homólogo do oncogene viral v-akt de timoma murino
DAG	Diacilglicerol
DNA-PK	Proteína quinase dependente de DNA
DUSP6	Fosfatase de especificidade dual 6
EGF	Fator de crescimento epidermal
ER	Receptor de estrógeno
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
FC-PKC δ	Fragmento catalítico de PKC delta
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	Receptor de FGF
GAB	Proteína ligante associada a GRB2
GAP	Proteínas ativadoras de GTPase
GDP	Guanosina di-fosfato
GEF	Fatores de troca de guanosina
GRB2	Proteína ligante de receptor de fator de crescimento 2
GTP	Guanosina tri-fosfato
HBD	Domínio de ligação ao hormônio
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	MAP quinase quinase
PDK1	Quinase 1 dependente de 3-fosfoinositídeo
PI3K	Fosfoinositídeo-3-quinase
PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLC ϵ	fosfolipase C Epsilon
PMA	Phorbol-12-miristato-13-acetato
pRB	Proteína retinoblastoma
PTEN	Homólogo a fosfatase e tensina
RKIP	Proteína inibidora da quinase Raf
ROS	Espécies reativas do oxigênio
RSK	Quinase ribossomal S6
RTK	Receptores tirosina quinase
SOS	<i>Son-of-sevenless</i>
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 – ONCOGENE RAS.....	21
1.1.1 – Via de MAPK/ERK.....	25
1.1.2 – A Via de PI3K/AKT.....	26
1.1.3 – Outras vias efetoras de Ras.....	27
1.2 – ESTERES DE FORBOL E A VIA DE PKC.....	28
1.2.1 – PKC e Câncer.....	30
1.2.2 – PKC δ e apoptose.....	32
1.3 – FGF2.....	34
1.4 – ATIVAÇÃO ALOSTÉRICA DE SOS POR RAS-GTP.....	38
2 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS.....	40
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	41
2.1.1 – Objetivos Específicos.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 - CULTURA DE CÉLULAS.....	43
3.2 – PRODUÇÃO DE SOBRENADANTE VIRAL.....	43
3.3 – TRANSDUÇÃO.....	44
3.4 - CURVAS DE CRESCIMENTO.....	47
3.5 - ENSAIO DE COLÔNIA EM SUSPENSÃO DE AGAROSE.....	47
3.6 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRATAMENTO COM DNASE I.....	47
3.7 - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT).....	48
3.8 - PCR QUANTITATIVO (qPCR) OU REAL TIME PCR.....	48

3.9 - CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
3.9.1 - Análise do conteúdo de DNA total.....	49
3.9.2 - Detecção de espécies Reativas do Oxigênio (ROS).....	49
3.10 - EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	50
3.11 - SDS-PAGE E WESTERN BLOT.....	50
3.12 – “PULL DOWN ASSAY” DE RAS-GTP.....	51
3.12.1 - Expressão em bactérias e purificação de GST-RBD (<i>Glutathione-S-transferase – RasGTP-Binding Domain of Raf</i>).....	51
3.12.2 - Precipitação de Ras-GTP.....	52
4 RESULTADOS.....	53
4.1 – EFEITO DE FGF2 EM CÉLULAS HEK 293 MALIGNIZADAS PELA AÇÃO DO ONCOGENE H-RAS ^{V12}	56
4.1.1 - Efeito dual de FGF2 no crescimento de colônias da sublinhagem HEK/ER:Hras ^{V12}	56
4.1.2 - Efeitos de FGF2 nas sublinhagens HEK/Hras ^{V12}	60
4.2 - EFEITO DE PMA EM CÉLULAS HEK 293 TRANSFORMADAS PELA AÇÃO DO ONCOGENE H-RAS ^{V12}	63
4.2.1 - PMA só é citotóxico às células HEK 293 transforma- das pela ação do trans-oncogene ER-Hras ^{V12} , em concentra- ções altas do indutor 4OHT.....	63
4.2.2 – Toxidez de PMA é mediada por ativação de PKC.....	67
4.2.3 - PMA agrava diversos indicadores de estresse em células transformadas HEK/Hras ^{V12} levando tardia- mente a morte celular.....	71
5 DISCUSSÃO.....	76

5.1 – A RESISTÊNCIA A FGF2 EM SUBLINHAGENS HEK/HRAS ^{V12} PODE SER DEVIDO À TRANS-ATIVAÇÃO DO GENE DE FGF2 POR H-RAS ^{V12}	76
5.2 – [ER:H-RAS ^{V12}] X [ER:H-RAS ^{V12} -GTP] EM SUBLINHAGENS HEK/ER:HRAS ^{V12} TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE [4OHT].....	78
5.3 – EFEITO DUAL DE FGF2 NA SUBLINHAGEM HEK/ER:H-RAS ^{V12} PODE SER EXPLICADO PELA ATIVAÇÃO DE SOS POR FGF2.....	80
5.4 – AÇÃO INIBITÓRIA DE FGF2 EM CÉLULAS TUMORAIS.....	82
5.5 – EFEITO CITOTÓXICO DE PMA É DEPENDENTE DOS NÍVEIS DE H-RAS ^{V12}	84
5.6 – PKCδ PARECE SER A ISOFORMA RESPONSÁVEL PELO EFEITO CITOTÓXICO DE PMA.....	85
6 CONCLUSÃO.....	88
7 REFERENCIAS.....	89
SÚMULA CURRICULAR.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – O CICLO CELULAR É DIVIDIDO EM 5 FASES.....	20
FIGURA 1.2 – AS ONCOPROTEÍNAS RAS.....	22
FIGURA 1.3. – REDE DE SINALIZAÇÃO DISPARADA POR RECEPTORES TIROSINA QUINASE (RTKS).....	24
FIGURA 1.4 – ESTRUTURA GERAL DAS SUBFAMÍLIAS DE PKC.....	29
FIGURA 1.5 – MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DE PKC δ	33
FIGURA 1.6 – ANÁLISE EVOLUCIONÁRIA E ESTRUTURA DOS FGFS.....	35
FIGURA 1.7 – O RECEPTOR DE FGF.....	36
FIGURA 1.8 – ESTRUTURA E ATIVAÇÃO DE SOS (SON OF SEVENLESS).....	39
FIGURA 2.1 - ESQUEMA DA ONCOPROTEÍNA DE FUSÃO ER:H-RAS ^{V12}	41
FIGURA 3.1 – MAPA SIMPLIFICADO DO VECTOR PBABEPURO/NEO	44
FIGURA 3.2 – WESTERN BLOT PARA ER:H-RAS ^{V12} OU H-RAS ^{V12} EM SUBLINHAGENS DE HEK 293.....	46
FIGURA 3.3 - ESQUEMA DA ONCOPROTEÍNA DE FUSÃO ER:H-RAS ^{V12}	46
FIGURA 4.1 – EXPRESSÃO DE H-RAS TOTAL E LIGADO À GTP EM CÉLULAS HEK 293 E NAS SUBLINHAGENS HEK/HRAS ^{V12} E HEK/ER:HRAS ^{V12}	53
FIGURA 4.2 – VARIAÇÃO DE [ER:H-RAS ^{V12}] E DE [ER:H-RAS ^{V12} -GTP] INTRACELULARES EM FUNÇÃO DE [4OHT] EXTRACELULAR	55
FIGURA 4.3 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE FGF PARA A LINHAGEM CELULAR HEK 293.....	56

FIGURA 4.4 – FGF2 POSSUI EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS HEK 293 CONDICIONALMENTE MALIGNIZADAS PELA AÇÃO DO ONCOGENE H-RAS ^{V12}	58
FIGURA 4.5 – EFEITO DUAL DE FGF2 NO CRESCIMENTO DE COLÔNIAS EM SUSPENSÃO DE AGAROSE DAS CÉLULAS.....	60
FIGURA 4.6 – CÉLULAS HEK 293 QUE EXPRESSAM CONSTITUTIVAMENTE O ONCOGENE H-RAS ^{V12} NÃO SÃO SENSÍVEIS À AÇÃO DE FGF2.....	61
FIGURA 4.7 – NAS SUBLINHAGENS HEK/HRAS ^{V12} SELECIONADAS, A EXPRESSÃO ECTÓPICA DE H-RAS ^{V12} É ACOMPANHADA DA EXPRESSÃO E SECREÇÃO DE FGF2.....	62
FIGURA 4.8 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE MRNA DE FGF2 EM HEK 293 E HEK/ER:HRAS ^{V12} -K.....	63
FIGURA 4.9 – PMA POSSUI EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS HEK 293 CONDICIONALMENTE TRANSFORMADAS PELA AÇÃO DO ONCOGENE H-RAS ^{V12}	65
FIGURA 4.10 – O EFEITO CITOTÓXICO DE PMA É DEPENDENTE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE H:RAS ^{V12} EM CÉLULAS HEK 293.....	66
FIGURA 4.11 – CURVA DE DOSE-RESPOSTA PARA PMA.....	67
FIGURE 4.12 – O EFEITO TÓXICO DE PMA É DEPENDENTE DA ATIVAÇÃO DE PKC.....	69
FIGURA 4.13 – TRATAMENTO COM PMA ELEVA OS NÍVEIS DO FRAGMENTO CATALÍTICO DE PKC δ EM HEK/HRAS ^{V12}	70
FIGURA 4.14 – TRATAMENTO COM PMA ELEVA DRASTICAMENTE OS NÍVEIS DE P-P38 EM HEK/HRAS ^{V12}	71
FIGURA 4.15 – TRATAMENTO COM PMA ELEVA OS NÍVEIS DE GAMA-H2AX E P38 EM HEK 293 E HEK/HRAS ^{V12}	71
FIGURA 4.16 – LONGA EXPOSIÇÃO AO PMA CAUSA AUMENTO NOS NÍVEIS DE ROS EM CÉLULAS HEK/HRAS ^{V12}	72
FIGURA 4.17 – ADIÇÃO DE PMA AUMENTA A PORCENTAGEM DE CÉLULAS HEK/HRAS ^{V12} E 4OHT-HEK/ER:HRAS ^{V12} COM DNA FRAGMENTADO.....	74

FIGURA 5.1 – HIPÓTESE PARA O MECANISMO DE RESISTÊNCIA A FGF2 DURANTE A SELEÇÃO DE SUBLINHAGENS HEK/HRAS ^{V12}	78
FIGURA 5.2 – ESTIMATIVA DA CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO (K _a) OU DE EQUILÍBRIO (K _e) PARA AS CURVAS [ER:H-RAS ^{V12}] X [4OHT].....	81
FIGURA 5.3 – HIPÓTESE PARA O EFEITO DUAL DE FGF2 EM SUBLINHAGENS HEK/ER:HRAS ^{V12}	83
FIGURA 5.4 – HIPÓTESE PARA MORTE MEDIADA POR PMA EM SUBLINHAGENS HEK 293 TRANSFORMADAS POR H-RAS ^{V12}	87

Índice de Tabela

TABELA 4.1 – ISOFORMAS DA PROTEÍNA QUINASE C (PKC).....	70
---	----

1 INTRODUÇÃO

As células são as unidades básicas funcionais que compõem os tecidos e órgãos de um organismo. Estas estruturas são altamente especializadas e podem desempenhar diferentes funções, dependendo do tecido e sistema do qual fazem parte. Um exemplo clássico para ilustrar este conceito é a comparação entre um neurônio e uma célula muscular, no qual, a primeira é especializada em conduzir o impulso nervoso, enquanto que a segunda é responsável pela contração muscular. Apesar desta diversidade, todas as células de mamíferos possuem a mesma maquinaria molecular para execução e regulação de processos fundamentais como proliferação, diferenciação e morte.

A proliferação de todas as células (com exceção das células sexuais) ocorre através da mitose, no qual, uma célula duplica seu conteúdo intracelular e se divide, originando duas células filhas iguais. Essa divisão acontece na forma de um ciclo, formado por cinco fases: Na ausência de estímulos, a célula encontra-se em um estado de quiescência (fase G_0). Quando estimulada por algum fator externo, a célula entra em uma fase de crescimento celular e preparação para a duplicação do seu material genético (fase G_1). Na fase seguinte (S), todo o seu conteúdo de DNA é duplicado. Posteriormente, a célula continua crescendo (fase G_2) e se preparando para entrar na fase M em que ocorre a divisão celular propriamente dita. Após a divisão, a célula pode retornar a fase G_0 ou iniciar um novo ciclo de divisão celular. Este processo é altamente regulado e a célula dispõe de vários mecanismos de inspeção para evitar falhas que comprometerão o funcionamento e a homeostase do organismo (Figura 1.1). Se o erro acontecer e não puder ser reparado, vias que sinalizam para a morte serão ativadas, levando a autodestruição da célula (apoptose).

Diferentemente de uma célula normal, as células malignas apresentam uma desregulação em seu ciclo celular, que resulta na proliferação desordenada dessas células, independentemente de fatores externos. Há mais de 100 tipos de cânceres descritos na literatura, porém, a aquisição de seis características comuns a todos

eles são consideradas essenciais no processo de malignização: (1) proliferação celular independentemente de fatores de crescimento externos; (2) insensibilidade a fatores antiproliferativos; (3) Evasão da apoptose; (4) potencial replicativo ilimitado; (5) angiogênese sustentada; e (6) invasão tecidual e metástase (Hanahan and Weinberg, 2000). Tais características são resultado de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que conferem à célula vantagens em sua sobrevivência e proliferação.

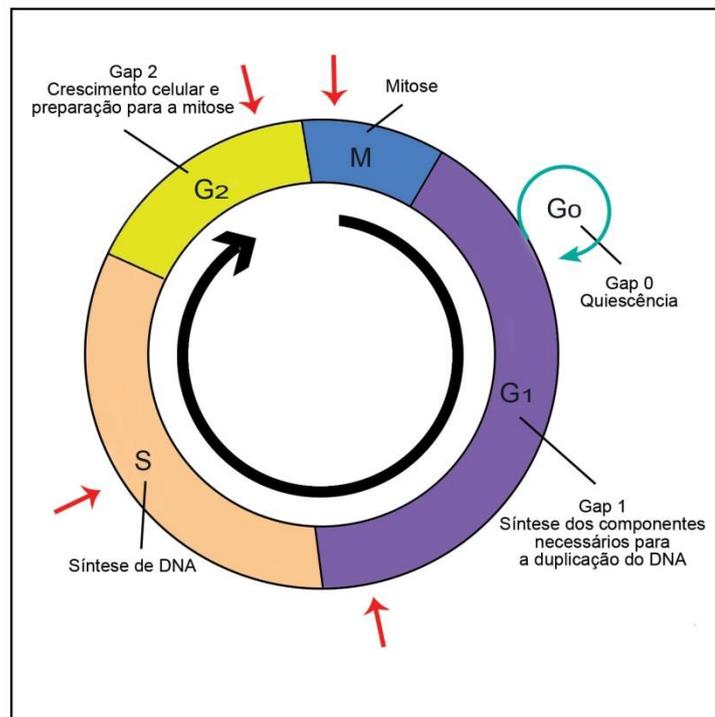


Figura 1.1 – O ciclo celular é dividido em 5 fases. Células normais, não tumorigênicas, permanecem em um estado de quiescência (G0). Quando estimuladas por um fator externo, a célula entra para a fase G1, iniciando o ciclo celular. Durante a progressão no ciclo, há vários pontos de checagem (setas em vermelho), que impedem que uma falha se perpetue no decorrer da divisão celular.

Dentre as alterações genéticas mais comumente estudadas, estão aquelas que envolvem os oncogenes. Estes são resultado de uma mutação genética somática de seus respectivos proto-oncogenes e estão relacionados com o aumento da ativação de vias mitogênicas, independentemente da presença de sinais externos de crescimento. Estudos epidemiológicos mostram que alguns oncogenes são mais

frequentemente encontrados em um ou mais tipos de cânceres e, portanto, tornam-se importantes alvos na busca de novas terapias para o tratamento do câncer.

1.1 – ONCOGENE RAS

A descoberta dos genes *ras* (*rat sarcoma genes*) se deu no final dos anos 70, a partir do estudo da atividade transformante dos retrovírus de sarcoma murino de Harvey and Kirsten. Logo, as sequências homólogas correspondentes foram encontradas nos genomas de ratos, camundongos e humanos, e foram denominadas de H-ras e K-ras, em referência às sequências encontradas nos vírus de sarcoma de Harvey e Kirsten, respectivamente. Poucos anos depois, o terceiro membro N-ras foi descoberto a partir de linhagens celulares de neuroblastomas e leucêmicas (Karnoub and Weinberg, 2008).

Os oncogenes *ras* (H-ras, K-ras e N-ras) fazem parte da complexa superfamília *ras* (Figura 1.2A). Esta superfamília é composta por cinco famílias que, apesar de possuírem uma considerável divergência em suas sequências e funções, possuem em comum a capacidade de ligação e hidrólise do GTP (Rojas et al., 2012). A família *ras* comporta os oncogenes H-ras, K-ras e N-ras, os quais aparecem em formas mutadas em cerca de 20% dos cânceres humanos. A substituição de uma glicina por uma valina no resíduo 12 é a alteração mais frequentemente encontrada. Os resíduos 13 e 61 também aparecem alterados em cânceres humanos, no entanto, em uma frequência bem menos expressiva (Downward, 2003; Karnoub and Weinberg, 2008).

A proteína Ras encontra-se ativada quando ligada a GTP (Figura 1.2B). Sua inativação ocorre através da hidrólise de GTP em GDP. Ras possui uma atividade GTPásica latente que precisa ser ativada por proteínas ativadoras específicas (GAP – *GTPase-activating proteins*), que aceleram em mil vezes a hidrólise do GTP. Para sua ativação, a proteína Ras precisa se desligar do GDP e se ligar a um novo GTP. Para tanto, há o auxílio das proteínas GEFs (*guanine nucleotide-exchange factors*), que aumentam em dez mil vezes a taxa de desligamento do GDP do sítio de ligação ao nucleotídeo. Como, no citosol, o GTP é cerca de dez vezes mais abundante que o GDP, naturalmente, uma molécula de

GTP é reposta em seu lugar. As oncoproteínas resultantes da ativação do oncogene ras possuem sua atividade GTPásica prejudicada, resultando em um Ras constitutivamente ativo (Karnoub and Weinberg, 2008).

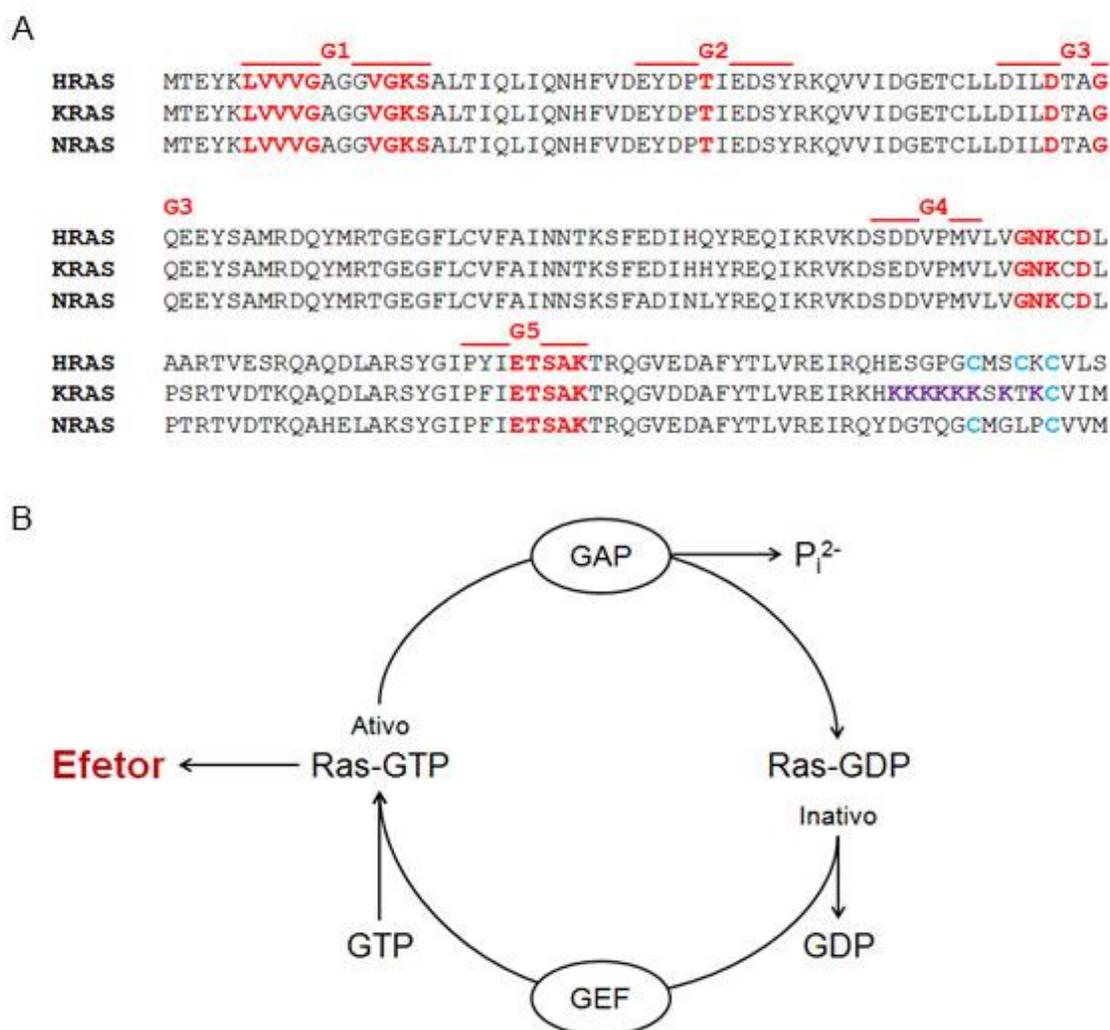


Figura 1.2 – As oncoproteínas Ras. A) Alinhamento das sequências de aminoácidos: os segmentos (G1 a G5) destacados em vermelho são conservados entre os membros da família Ras; na extremidade N-terminal aparecem em azul as cisteínas (C) farnesiladas e palmitoiladas; os três últimos resíduos N-terminais pós C-186 são eliminados por proteólise nas formas maduras das proteínas. A proteína K-Ras possui vários resíduos de lisina (K) em sua porção C-terminal, importantes para estabilização da ligação da proteína à membrana plasmática. **B)** Ciclo de ativação e desativação de Ras; GAP (GAP - GTPase Activating Protein; GEF - G-nucleotide Exchange Factor). O ciclo só gira no sentido horário, como indicado. O seu controle é exclusivamente cinético através do balanço entre as atividades de GEF e GAP. Figuras extraídas de Armelin et al., 2013.

Além da ligação ao GTP, a localização celular de Ras é primordial para que a proteína desempenhe sua atividade biológica. Para tanto, Ras sofre uma série de modificações pós-traducionais que permite a adição de uma longa cadeia isoprenóide em um resíduo de cisteína C-terminal. Além da isoprenilação, H-Ras e N-Ras ainda sofre a adição de duas cadeias do ácido graxo longo palmitoil em um resíduo de cisteína também C-terminal, porém, à montante do resíduo isoprenilado. A isoprenilação permite a ancoragem da proteína Ras à membrana plasmática, enquanto que a palmitoilação estabiliza esta interação. A proteína K-Ras estabiliza sua ancoragem à membrana através da interação de resíduos de lisina próximos à porção C-terminal com as cabeças polares dos lipídios que compõe a membrana (Figura 1.2A).

A proteína Ras funciona como uma espécie de conector entre os fatores externos e a resposta biológica final. Isto é possível pela diversidade de efetores que Ras é capaz de interagir e ativar. Receptores transmembranares tirosina quinase (RTK) ativos, recrutam proteínas adaptadoras que vão se ligar e ativar GEFs, como a proteína SOS. Outros tipos de receptores, bem como receptores acoplados a proteína G, também podem ativar Ras através da estimulação de GEFs. Uma vez ligado ao GTP, Ras vai interagir e ativar várias outras enzimas efetoras. Estas enzimas, por sua vez, irão ativar outras enzimas e assim sucessivamente. O resultado é a formação de uma complexa rede de sinalização, no qual um sinal externo é percebido e propagado através de uma cascata de efetores intracelulares, que por fim, irá culminar na expressão de fatores de transcrição. Estes irão regular a expressão de genes envolvidos na regulação de diversos processos biológicos, como proliferação e sobrevivência (Figura 1.3).

Após mais de três décadas da descoberta de Ras, uma gama de efetores foram descobertos e estudados. Não obstante, muitos outros ainda vêm sendo encontrados (Malumbres and Barbacid, 2003). O papel de algumas dessas vias à jusante de Ras no processo de malignização de células já é bem conhecido e será abordado aqui.

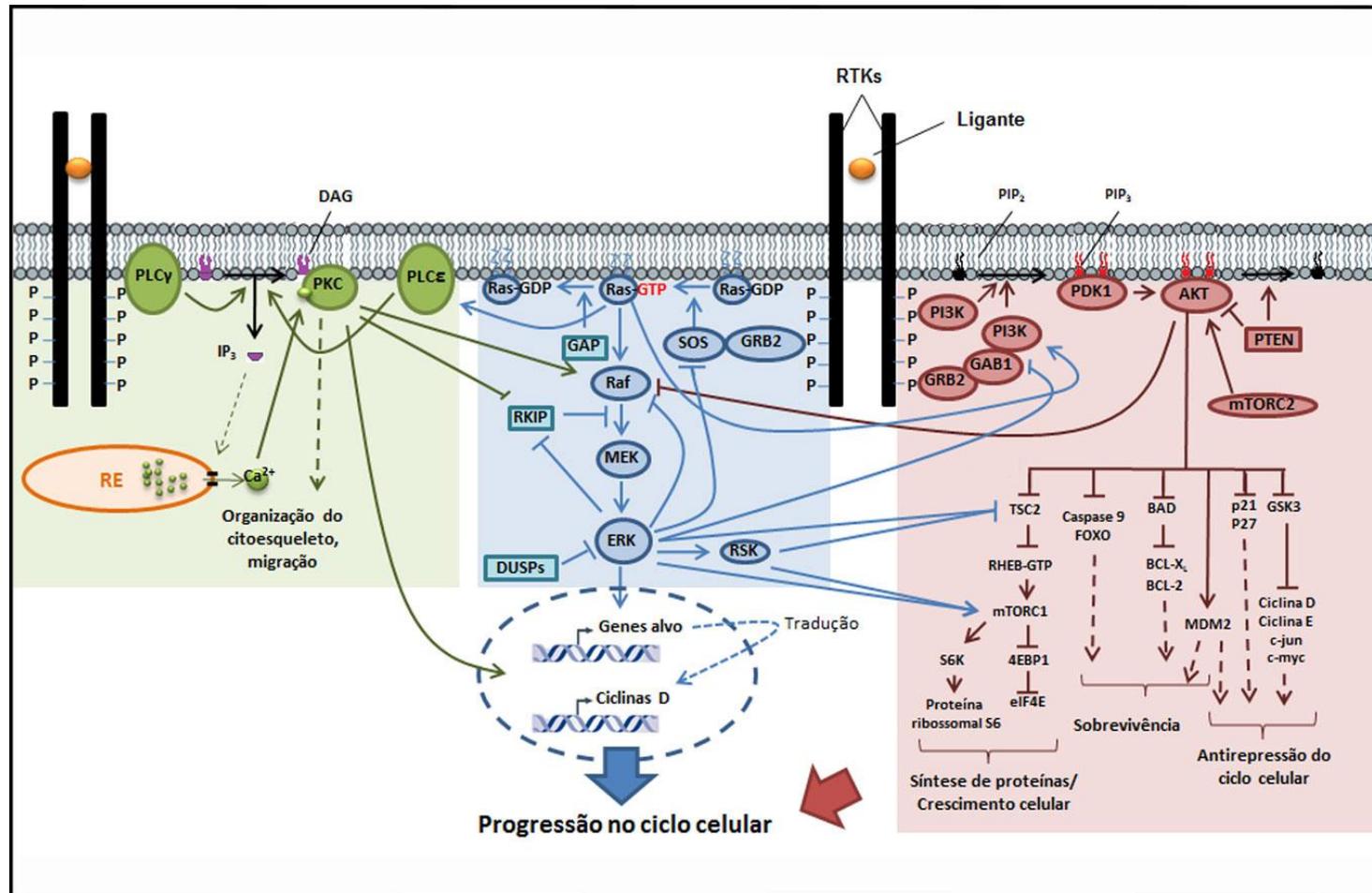


Figura 1.3. – Rede de sinalização disparada por receptores tirosina quinase (RTKs). De maneira geral, RTKs existem na forma de monômeros. Após a ligação do ligante, ocorre a dimerização dos receptores e fosforilação de resíduos de tirosina em seu domínio intracelular. As fosfo-tirosinas recrutam proteínas adaptadoras, que, por sua vez, recrutarão e ativarão outras proteínas e assim sucessivamente, formando uma complexa rede de sinalização. A via de Ras/MAPK está representada em azul; a via de PI3K/Akt em vermelho; e a via de PKC em verde. Figura modificada de Zeidler, 2013.

1.1.1 – Via de MAPK/ERK

As vias de MAPK são cascatas de sinalização, no qual, há a fosforilação e ativação sequencial de seus componentes. Deste modo, as quinases MAP3Ks têm como alvo as MAPKKs que, por sua vez, fosforilam as MAPKs. Por fim, o componente final desta cascata fosforila moléculas alvos que serão responsáveis pela resposta celular ao estímulo extracelular que inicialmente disparou esta cascata. A via de MAPK de ERK (*extracelular signal-regulated kinase*) foi a primeira via efetora de Ras a ser identificada e é a mais bem caracterizada (Figura 1.3, em azul).

As quinases Raf (MAP3K) são os primeiros componentes da via de ERK, cuja ativação é um processo complexo que se inicia com o recrutamento para a membrana plasmática desta quinase por Ras ativo. (Wellbrock et al., 2004). Uma vez ativado, Raf irá fosforilar e ativar as quinase MEK1 e MEK2 (MAPKK), que, sequencialmente ativará ERK1 e ERK2 (MAPK), os efetores finais desta via. Estas últimas são capazes de fosforilar tanto alvos citoplasmáticos (como a quinase S6 ribossomal - RSK), bem como podem se translocar para o núcleo e induzir os chamados “immediate early genes”, entre os quais estão os genes c-fos e c-jun, que codificam os fatores de transcrição c-Fos e c-Jun, que o complexo AP1 (proteína ativadora 1), responsável pela indução de proteínas reguladoras da progressão no ciclo celular (Chambard et al., 2007; Shaul and Seger, 2007).

Sabe-se que a duração e a intensidade do sinal de ERK é uma característica importante na resposta final ao estímulo externo (Ebisuya et al., 2005). A DUSP6 é uma fosfatase dual que regula a desfosforilação e inativação de ERK1/2. No entanto, além desta inativação de ERK1/2 por fosfatases, as próprias ERK1/2 exercem regulação negativa em etapas iniciais da via de MAPK/ERK, incluindo a fosforilação inibitória da GEF SOS, Rafs e MEKs (Corbalan-Garcia et al., 1996; Dougherty et al., 2005; Slack-Davis et al., 2003). Por outro lado, ERK 1/2 também fosforila e inativa a proteína RKIP, que exerce efeito inibitório na via de MAPK/ERK (Yeung et al., 2000).

1.1.2 – A Via de PI3K/AKT

PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) é uma quinase de lípidos cuja unidade funcional é um heterodímero formado por uma subunidade catalítica e outra regulatória. Há três classes principais de PI3K (I, II e III) e diversos subgrupos, classificados de acordo com sua estrutura primária, especificidade ao substrato e regulação. As PI3Ks de classe I são as mais bem caracterizadas e as que possuem maior relação com o câncer humano. Esta classe possui p110 (p110 α , p110 β , p110 γ e p110 δ) como subunidade catalítica que se liga a subunidade regulatória p85. A exceção é a subunidade p110 γ que ao invés de se associar com p85, se liga as subunidades regulatórias p101 e p87. A ativação da quinase PI3K ocorre principalmente pela ativação de RTKs (Receptores de Tirosina Quinase): (1) A subunidade regulatória p85 se liga ao RTK fosforilado, acionando a subunidade catalítica p110; (2) As proteínas adaptadoras GRB2 quando ligada a RTKs ativos, recrutam GAB, que por sua vez, se liga a p85; (3) A proteína Ras ativa se liga diretamente a subunidade catalítica p110, independentemente de p85. Além disso, p110 β pode ainda ser ativado por receptores acoplados à proteína G, sem a participação de RTKs.

Uma vez ativa, PI3K irá promover a conversão de PIP₂ (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) em PIP₃ (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*). É a geração do segundo mensageiro PIP₃ que irá acionar as vias à jusante de PI3K responsáveis por regular uma variedade de processos, como crescimento celular, proliferação, sobrevivência, metabolismo e motilidade celular (Figura 1.3, em vermelho). Os mais bem caracterizados efetores de PI3K são as quinases PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase 1*) e AKT (também chamada de PKB – *Protein Kinase B*), que são recrutadas à membrana plasmática pela ligação de seu domínio PH (*Pleckstrin Homology*) à PIP₃. A sinalização de PI3K é cessada pela desfosforilação de PIP₃ em PIP₂ pelo supressor de tumor PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) (Castellano and Downward, 2011; Franke, 2008; Vanhaesebroeck et al., 2012).

AKT é uma serina/treonina quinase cuja família é composta por três membros (AKT1, AKT2 e AKT3). Para sua total ativação, é necessária a fosforilação de AKT em dois resíduos distintos: Thr308 por PDK1; e Ser473, cujos mecanismos de fosforilação ainda não estão completamente compreendidos, mas, diversas quinases

já foram relatadas como promotoras da ativação deste resíduo, como PDK2, mTORC2 (*rapamycin complex 2*), ILK (*integrin-linked kinase*) e DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Sabe-se que essas fosforilações não acontecem sem a presença de PIP₃. Apesar de ser ativado na membrana plasmática, AKT possui diversos alvos localizado no citoplasma e no núcleo. Sua importância na formação e manutenção de tumores ocorre, principalmente, pela ativação de vias que promovem o crescimento celular e a sobrevivência. Por exemplo, AKT inibe as proteínas proapoptóticas BAD e BAX, da família de Bcl-2; fosforila Mdm2, antagonizando a ação do supressor de tumor p53; regula negativamente os fatores de transcrição NF-κB e *forkhead*, aumentando a transcrição de genes antiapoptóticos e diminuindo a expressão de proteínas promotoras de morte celular; e estimula, via o aumento da ativação de Rheb, a via de mTORC1, responsável pelo aumento da síntese proteica (Cantley, 2002; Courtney et al., 2010; Duronio, 2008; Engelman et al., 2006).

1.1.3 – Outras vias efetoras de Ras

As vias de ERK1/2 e PI3K/AKT foram as primeiras vias identificadas à jusante de Ras. No entanto, ao longo dos anos, cada vez mais efetores vêm sendo descobertos, como por exemplo, Ral-GEFs, PLCε (*phospholipase C epsilon*), Tiam1, p120GAP, NF1, MEKK1, Rin1, AF-6, PKC-ζ, Nore1, Canoe e outros (Ehrhardt et al., 2002; Kelley et al., 2001). As proteínas Ral-GEF (RalGDS, RGL - *RalGDS-like gene*, RGL2 e RGL3), conectam Ras à ativação das pequenas GTPases RalA e RalB. A via de RalGDS atua em conjunto com a via de PI3K/AKT na inibição do fator de transcrição *forkhead*, contribuindo no processo de transformação mediada por Ras (De Rooter et al., 2001; Rodriguez-Viciano and McCormick, 2005). Já a Fosfolipase Cε é responsável por promover a hidrólise de PIP₂ em DAG (*diacylglycerol*) e inositol-1,4,5-trifosfato (Figura 1.3, em verde). Esta via liga Ras à ativação de PKC (*protein kinase C*) e mobilização de Ca⁺⁺ (Kelley et al., 2001).

1.2 – ESTERES DE FORBOL E A VIA DE PKC

Os ésteres de forbol são diterpenos tetracíclicos encontrados naturalmente em *Euphorbiaceae* e *Thymelaceae*. O interesse por estes compostos aumentou quando Berenblum (1941) descreveu pela primeira vez que o óleo isolado da semente de *Croton tiglium* (*Euphorbiaceae*), que continha o ester de forbol PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*), aumentava consideravelmente o potencial carcinogênico do 3,4-benzopirano, quando aplicados na pele de camundongos. Por si só, o óleo de cróton não tinha efeito carcinogênico, bem como, não promovia o crescimento de tumor quando aplicado antes do agente carcinógeno. Sua ação como promotor de tumor era máxima quando a pele do camundongo era exposta a subsequentes doses do éster de forbol, precedidas pela exposição a uma dose única de um iniciador (carcinógeno) (Goel et al., 2007; Klein, 1953). Mesmo desconhecendo-se os meios pelos quais PMA promovia o crescimento tumoral, este experimento se tornou um modelo no estudo dos vários estágios da carcinogênese.

O mecanismo pelo qual os ésteres de forbol promoviam o crescimento tumoral só foi desvendado na década de 80, quando Nishizuka descreveu que a Proteína Kinase C (PKC) é o receptor intracelular desses promotores de tumor (Castagna et al., 1982). Este trabalho demonstrou pela primeira vez a importância de PKC no crescimento celular e carcinogênese. PMA, então, passou a ser uma importante ferramenta no estudo dos processos celulares regulados pela ativação de PKC.

Hoje em dia, são conhecidas pelo menos 10 isoformas de PKC, classificadas em 3 subfamílias, de acordo com sua estrutura e sensibilidade a segundos mensageiros: Convencionais – cPKC - (α , β I, β II e γ), Novas – nPKC (δ , ϵ , η e θ) e Atípicas – aPKC (ζ e ι/λ). Todas as PKCs possuem em sua estrutura uma região reguladora N-terminal e outra catalítica C-terminal, ligadas por um segmento flexível. É o domínio regulador que confere o grau de sensibilidade aos segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e Ca^{2+} . As isozimas convencionais possuem os domínios C1 e C2, com afinidade a DAG e Ca^{2+} , respectivamente. Já as nPKCs, possuem uma variante do domínio C2 não responsiva a Ca^{2+} , sendo sensíveis apenas a DAG. As isoformas atípicas, por sua vez, não são responsivas nem a DAG e nem ao Ca^{2+} (Figura 1.4). Vale salientar que os ésteres de phorbol, como o PMA,

mimetizam os efeitos do DAG e, portanto, são capazes de ativar tanto as PKCs convencionais como as novas.

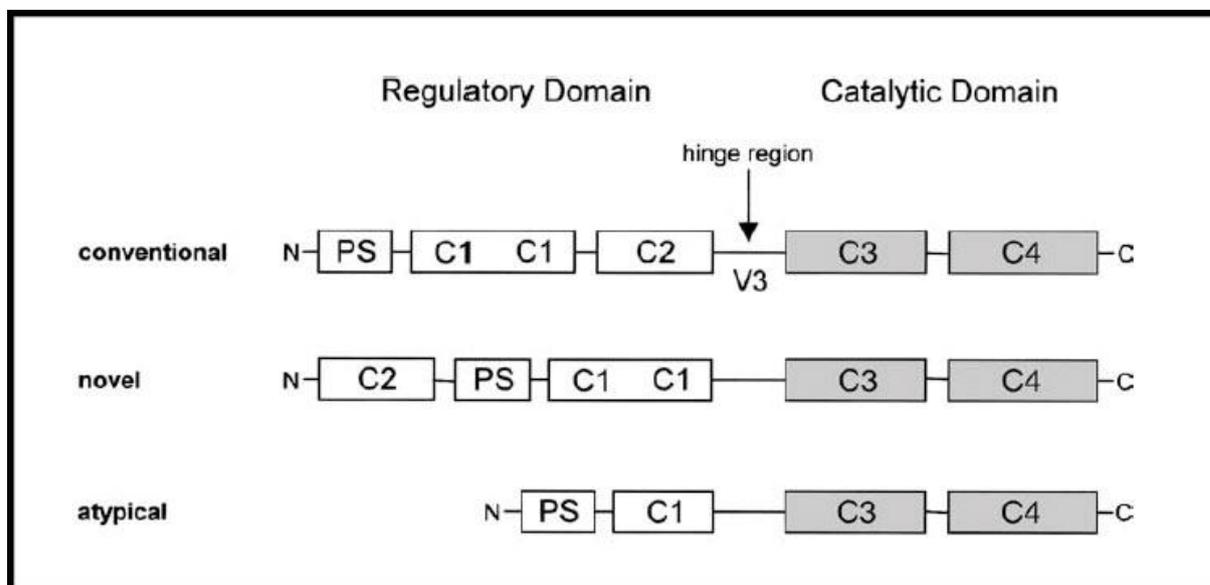


Figura 1.4 – Estrutura geral das subfamílias de PKC. As PKCs convencionais (*conventional*) possuem dois domínios C1 e um domínio C2, responsáveis pela ligação ao DAG e cálcio, respectivamente. As PKCs novas (*novel*) possuem uma variante do domínio C2 não responsiva a cálcio. As PKCs atípicas (*atypical*) possuem apenas um domínio C1 e não respondem nem a DAG, nem a Cálcio. Todas as PKCs possuem à montante do domínio C1, um domínio pseudosubstrato (PS) inibitório. No seguimento entre o domínio regulador e o domínio catalítico (hinge region), encontra-se o sítio de clivagem proteolítica V3 (*variable domain*). N – N-terminal; C – C-terminal; *Regulatory Domain* – Domínio regulatório; *Catalytic Domain* – Domínio catalítico. Figura extraída de Gutcher et al., 2003.

Além dos domínios de ligação a segundos mensageiros, a região reguladora de todas as PKCs possui ainda uma pequena sequência autoinibitória, chamada de pseudosubstrato. Quando inativada, as proteínas quinase C permanecem no citosol, em uma conformação inativa, na qual, o pseudosubstrato ocupa o sítio de ligação ao substrato. Para as PKCs se tornarem ativas e desempenharem suas funções são necessários três passos distintos: (1) A fosforilação da PKC no “loop de ativação”, pela PDK1, seguida pela autofosforilação do “motivo volta” e “motivo hidrofóbico”, que conferem à enzima uma mudança conformacional necessária para a ativação da função catalítica do domínio C-terminal; (2) A ativação alostérica das PKCs por cofatores, como DAG, Ca^{++} e fosfatidilserina, a qual resulta na liberação do

pseudosubstrato do sítio de ligação ao substrato e na translocação das PKCs à membrana; (3) E, finalmente, a interação das PKCs com proteínas específicas que funcionam como ancoras, as quais, posicionam as enzimas próximas a seus substratos e reguladores ou em compartimentos celulares específicos (Keranen et al., 1995; Newton, 2001, 2010; Schechtman and Mochly-Rosen, 2001).

A via de PKC está relacionada com diversos mecanismos biológicos, como, desenvolvimento embrionário, regulação da mitose, hematopoese, migração celular, metabolismo da glicose e sobrevivência celular. Além disso, a existência de várias isoformas que são diferencialmente expressas nos tecidos e que podem desempenhar funções antagônicas ou sobrepostas, torna o estudo dos efetores de cada PKC uma tarefa bastante complexa. Dentre os alvos de PKC já encontrados, estão: fosforilação do receptor de EGF na ausência do ligante, diminuindo a afinidade do receptor por EGF; fosforilação de RAF, ativando a via de MEK/ERK; fosforilação do complexo I- κ B/NF- κ B, liberando NF- κ B; e fosforilação de MARCKS e pleckstina, proteínas envolvidos no remodelamento do esqueleto de actina (Azzi et al., 1992; Kang et al., 2012; Kolch et al., 1993). A desregulação da via de PKC está implicada em várias desordens, como por exemplo, Alzheimer, doenças cardiovasculares, diabetes, imunodeficiências e câncer (Alkon et al., 2007; Baier and Wagner, 2009; Churchill et al., 2008; Danis and Sheetz, 2009; Kawakami et al., 2002; Mochly-Rosen et al., 2012).

1.2.1 – PKC e Câncer

Trabalhos que relacionam alterações genéticas em PKC com câncer são muito raros. Até agora, só foi descrita uma mutação pontual em PKC α (D294G) encontrada em adenocarcinomas e carcinomas foliculares de tireóide e em tumores invasivos de pituitária (Alvaro et al., 1993; Alvaro et al., 1997; Prevostel et al., 1997). Além disso, o gene de PKC ϵ foi encontrado amplificado em tumor de tireóide devido a um rearranjo cromossômico (Knauf et al., 1999).

No entanto, a grande maioria dos trabalhos descreveram alterações na expressão das isoformas de PKC em vários tipos de câncer. Essas alterações variam de acordo com o tipo de tecido e, como as isoformas de PKC podem atuar

como mitógenos ou supressores de tumor, o aumento ou a diminuição de sua expressão implica em diferentes consequências.

Elevados níveis de PKC α foram encontrados em câncer de fígado, bexiga, próstata e endométrio, enquanto baixos níveis foram descritos em tumores de cérebro, ovário e cólon. No câncer de mama, há relatos tanto de hiper quanto hipoexpressão de PKC α e sua presença neste tipo de câncer foi relacionada com ausência de receptores de estrógeno, maior proliferação e mau prognóstico (Bosco et al., 2011; Lonne et al., 2010; Martiny-Baron and Fabbro, 2007). PKC α também foi apontado como responsável pela progressão do ciclo celular e migração de células de glioma (Besson and Yong, 2000; Hu et al., 2010). Por outro lado, a baixa expressão de PKC α em câncer de intestino está associada a tumores mais agressivos (Oster and Leitges, 2006). Neste mesmo tipo de câncer, a ativação de PKC α induziu parada no ciclo celular (Frey et al., 1997). Estes relatos mostram a ação de PKC α como supressor de tumor.

A expressão da Proteína Quinase C Beta (PKC β) aparece diminuída em muitos tipos de câncer, como, pele, bexiga e próstata. Porém, no câncer de cólon, PKC β aparece superexpresso e sua inibição reduz tanto a iniciação como a progressão do tumor *in vivo* (Fields et al., 2009; Griner and Kazanietz, 2007). Yoshijii e colaboradores demonstraram que PKC β está intimamente relacionado com a via VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), um importante fator angiogênico. A inibição de PKC β em células de carcinoma hepatocelular reduziu o aumento da proliferação e a neovascularização ocasionadas por VEGF (Yoshiji et al., 1999).

A isoforma ϵ , da família de PKC, é a que exhibe maior potencial oncogênico. Ela apresenta elevada expressão em inúmeros tipos de cânceres, como, por exemplo, em tumores de bexiga, cérebro, próstata, mama, pele, cabeça, pescoço, pulmão e fígado (Bosco et al., 2011; Griner and Kazanietz, 2007). A superexpressão de PKC ϵ em células NIH-3T3 é suficiente para a aquisição da habilidade de crescer independentemente de ancoragem, bem como, formar tumores *in vivo* (Mischak et al., 1993). Lu et al. demonstraram que PKC ϵ , na linhagem MCF-7 de câncer de mama, impede a dimerização e translocação de Bax para a mitocôndria, protegendo essa célula da apoptose mediada por TNF (Lu et al., 2007). A maior agressividade no câncer de mama também está relacionada com uma maior expressão da proteína

PKC ϵ . Além disso, o *knockdown* desta isoforma em linhagens agressivas de tumores de mama causa uma diminuição na proliferação, metástase e motilidade destas células (Pan et al., 2005). É sabido também que PKC ϵ possui como alvos Raf-1 e AKT, ativando as vias de MAPK e PI3K/AKT, já descritas aqui como promotoras de progressão do ciclo celular e de sobrevivência (Basu and Sivaprasad, 2007).

A PKC δ , por sua vez, é descrita muitas vezes por provocar efeitos opostos à PKC ϵ . Esta isoforma desempenha atividades anti-proliferativas e pró-apoptóticas em muitos tipos celulares. Vários trabalhos relatam que a diminuição de sua expressão ou atividade está relacionada a um fenótipo maligno (Lu et al., 1997; Perletti et al., 1999). O papel pró-apoptótico de PKC δ será melhor explorado na próxima sessão.

1.2.2 – PKC δ e apoptose

PKC δ é ubiquamente expressa em inúmeros tecidos, como epiderme, útero, placenta, pulmão, cérebro, baço e rim (Leibersperger et al., 1991). Além disso, é sabido que inúmeros estímulos apoptóticos são capazes de ativar PKC δ , incluindo, TNF α , agentes que causam dano ao DNA, radiação ultravioleta, PMA, ROS (reactive oxygen species) e interleucina 1 β . Sua ativação pode ocorrer através da ligação do segundo mensageiro DAG ou análogos ao DAG, fosforilação ou clivagem proteolítica (Figura 1.5) (Kanthasamy et al., 2003; Zhao et al., 2012).

Já foi mencionado na sessão 1.2 que a ligação de DAG ou PMA no domínio C1 da subunidade regulatória altera a conformação da molécula que passa de um estado autoinibitório para outro ativo, através da liberação do sítio de ligação ao substrato. Além disso, esta mudança conformacional resulta no surgimento de uma superfície hidrofóbica que permite a translocação de PKC δ para a membrana.

Em PKC δ , os sítios de fosforilação conservados no “loop” de ativação, motivo volta e motivo hidrofóbico encontram-se nos resíduos Thr-505, Ser-643 e Ser -662, respectivamente. Há relatos de que apoptose induzida por PMA e peróxido de hidrogênio podem ativar a fosforilação desses resíduos. No entanto, além desses três resíduos conservados de serina e treonina, a atividade de PKC δ pode ainda ser

modulada por uma série de fosforilações em resíduos de tirosina, como Tyr 52, 64, 155, 187, 311, 332, 512, 523 e 565. Por exemplo, a fosforilação nos resíduos Tyr-64 e Tyr-187 é importante para a translocação de PKC δ para o núcleo e clivagem proteolítica de PKC δ por caspase-3, ocasionando apoptose em células de glioma tratadas com etoposídeo. Este efeito é atenuado quando estas células expressam mutantes em Tyr-64 e Tyr-187 (Blass et al., 2002). Por outro lado, fosforilações em resíduos de tirosina ocasionados por Ras, TGF α e EGF estão relacionados com a diminuição da atividade catalítica de PKC δ (Kikkawa et al., 2002; Zhao et al., 2012).

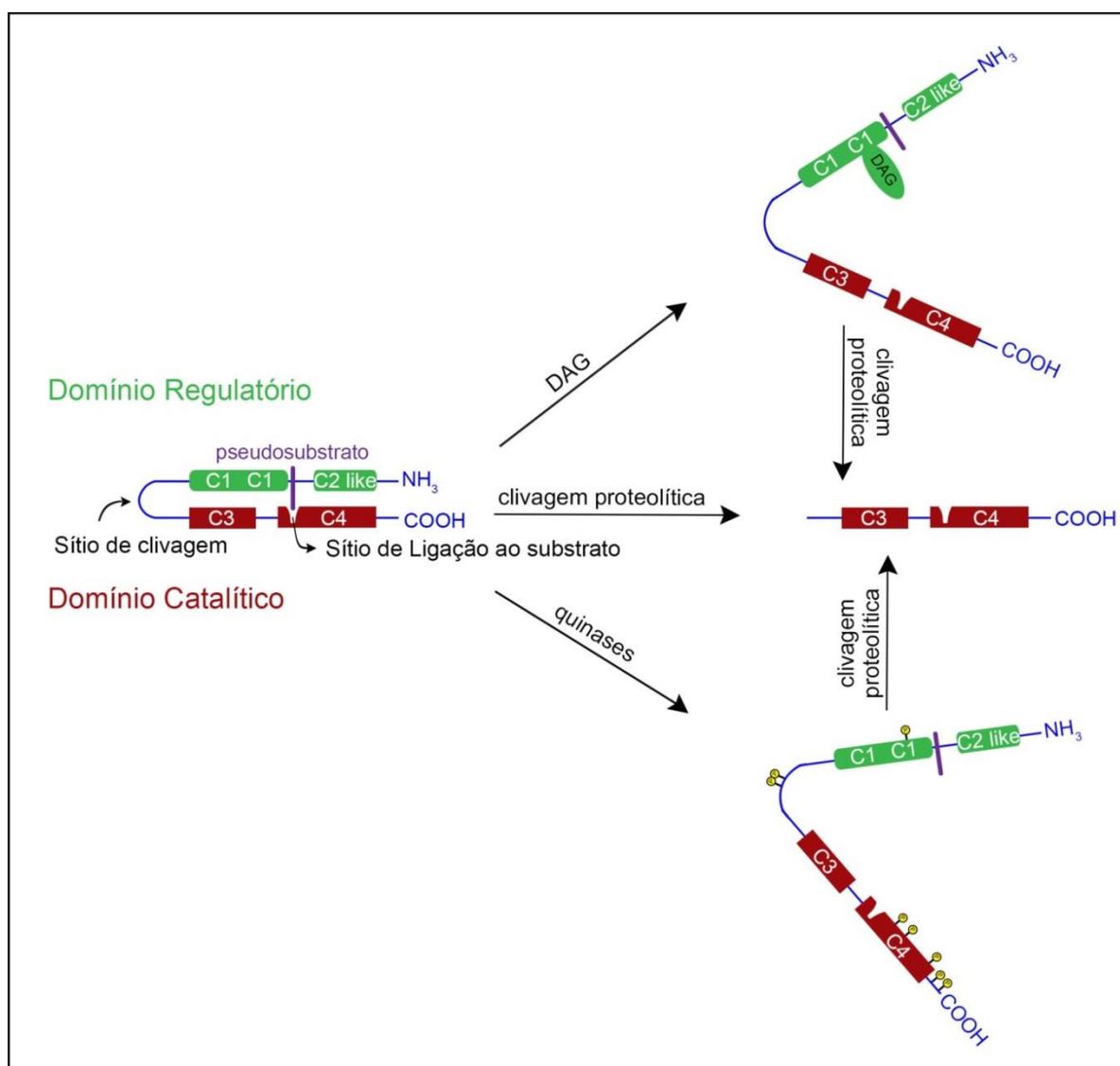


Figura 1.5 – Mecanismos de ativação de PKC δ . PKC δ pode ser ativado por três mecanismos distintos: (1) Ligação à DAG; (2) Clivagem proteolítica; (3) Fosforilação. Figura extraída de Zhao et al., 2012.

Finalmente, PKC δ também pode ser ativado por clivagem proteolítica. O acionamento de vias apoptóticas causa a ativação de caspase-3, que possui PKC δ como um de seus substratos. Caspase-3, então, cliva PKC δ no seguimento conector entre a subunidade reguladora e a catalítica. Isso causa a dissociação permanente dessas subunidades, gerando um fragmento regulatório de 38 KDa e outro catalítico de 41 KDa. Diferentemente da ativação por segundo mensageiro e por fosforilação, a clivagem proteolítica ativa PKC δ irreversivelmente. O fragmento catalítico de PKC δ (FC-PKC δ) constitutivamente ativo pode translocar para outros compartimentos celulares, como núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático. Dentre os efeitos da ativação de PKC δ estão liberação de citocromo c, ativação de caspase 9, aumento da expressão e ativação de Bax, inativação de DNA-PK (Proteína quinase dependente de DNA) e fosforilação de p53 e Rad9, potencializando seus efeitos apoptóticos. Além desses alvos e de outros, PKC δ possui como próprio substrato a caspase-3. Isto cria um “loop” de ativação, no qual, caspase-3 cliva e ativa PKC δ que, por sua vez, ativa mais caspase-3, potencializando o estímulo apoptótico (Gutcher et al., 2003; Kanthasamy et al., 2003; Zhao et al., 2012).

1.3 – FGF2

A família de FGF é composta por 22 membros que estão subdivididos em 7 subfamílias, de acordo com a similaridade de sua sequência e propriedades bioquímicas (Figura 1.6A). Seus pesos moleculares variam de 17 a 34 KDa e eles possuem em comum um *core* central de 120 a 130 aminoácidos, além de alta afinidade por heparina e heparan sulfato (Figura 1.6B). Funcionalmente, os FGFs desempenham diferentes papéis, tanto durante o desenvolvimento, nos estágios embrionário e fetal, quanto no organismo adulto, podendo atuar de maneira endócrina, parácrina, autócrina ou intrácrina (Itoh and Ornitz, 2004; Ornitz and Itoh, 2001).

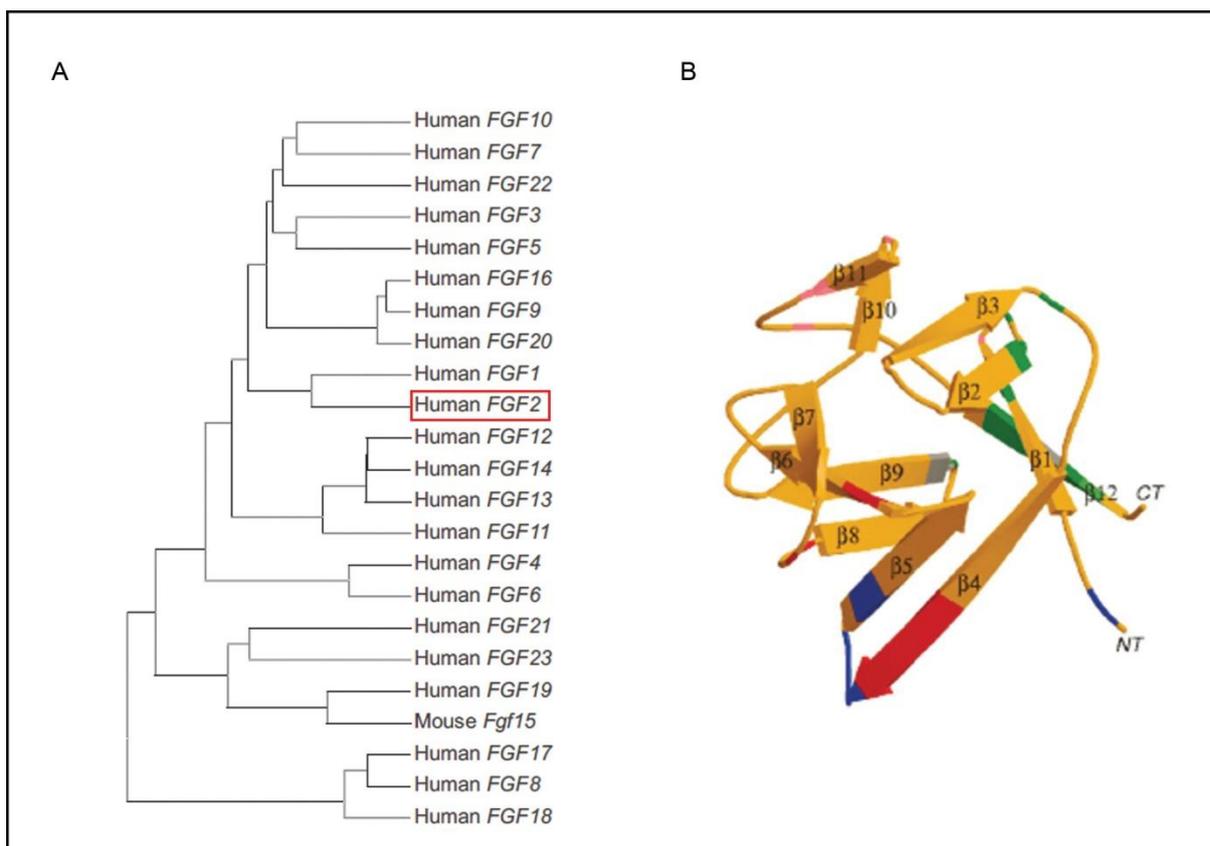


Figura 1.6 – Análise evolucionária e estrutura dos FGFs. **A.** Análise evolucionária da família de FGF. Seus membros podem ser subdivididos em 7 subfamílias, de acordo com a similaridade sequencial e propriedades bioquímicas. O Fgf15 de camundongo é ortólogo ao FGF19 humano. **B.** Estrutura tridimensional do FGF2, mostrando o *core* conservado, encontrado em todos os membros da família de FGF. As regiões em rosa representam os resíduos de aminoácidos que se ligam à heparina. As regiões de contato com o receptor de FGF estão em verde (região IgII do FGFR), azul (metade N-terminal da região IgIII do FGFR), vermelho (metade C-terminal da região IgIII do FGFR) e cinza (seguimento que conecta os domínios IgII e IgIII do FGFR). Figuras extraídas de Ornitz & Itoh, 2001.

Com exceção dos membros de atuação intrácrina (FGF11-14), os FGFs desempenham suas funções através da ligação e ativação dos receptores tirosina quinase FGFRs. Os receptores de FGF são proteínas transmembranares compostas por um domínio extracelular (N-terminal), formado por três domínios semelhantes à imunoglobulina (IgI, IgII e IgIII); e um domínio intracelular (C-terminal) com função tirosina quinase (Figura 1.7A). Há 5 tipos de receptores de FGF (FGFR1-5), porém, o receptor 5 não apresenta o domínio tirosina quinase, desempenhando um papel apenas regulatório. Os FGFR1-3 podem ainda sofrer *splicing* alternativo, na região IgIII, para formar as isoformas IIIB ou IIIC, que apresentam diferentes afinidades aos membros da família de FGF (Figura 1.7B). A especificidade na

ligação do FGFRs aos diferentes FGFs, bem como, a expressão diferencial dos FGFs e seus receptores entre os diferentes tecidos, conferem à via de FGF uma maior complexidade na regulação dos processos celulares para os variados tipos de tecido (Eswarakumar et al., 2005; Mohammadi et al., 2005).

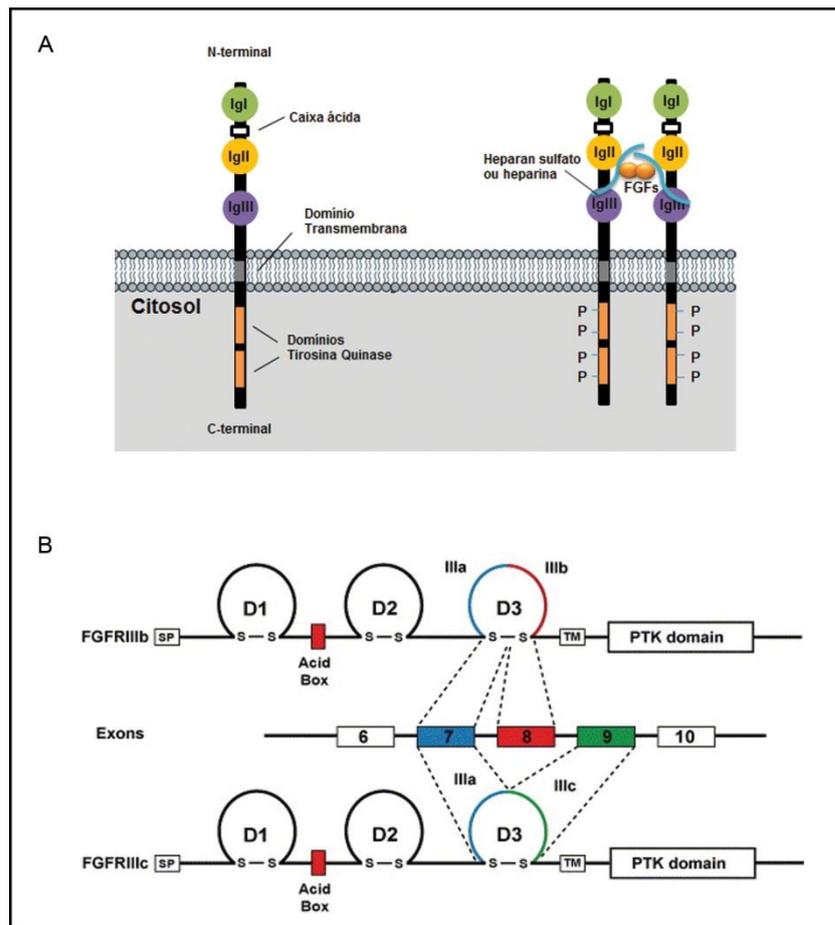


Figura 1.7 – O receptor de FGF. **A)** Os receptores de FGF são formados por uma porção extracelular, que inclui domínios semelhantes à imunoglobulina (Igl em verde, IgII em amarelo e IgIII em roxo), uma porção transmembrana e uma porção citosólica (C-terminal), que comporta os domínios tirosina quinase. Uma eficiente ativação do receptor de FGF requer a formação de um complexo composto por duas moléculas de FGFR, duas de FGF e duas de heparina e heparan sulfato. **B)** Os receptores FGFR1-3 podem sofrer splicing alternativo na metade c-terminal do domínio IgIII (representado como D3 na figura). Os receptores FGFR-IIIb são formados pelo éxon 8, enquanto que as isoformas FGFR-IIIc são formadas pelo éxon 9. Figura extraída de Eswarakumar & Schlessinger, 2005.

Assim como outras RTKs, os receptores de FGF sofrem autofosforilação após a ligação do ligante e a dimerização do receptor. No entanto, para a estabilização deste complexo (2FGF:2FGFR) é necessária a ligação de duas moléculas de heparan sulfato (Figura 1.7A). Uma vez ativos, os FGFRs disparam vias mitogênicas clássicas como as vias de Ras, PI3K/AKT e PLC/PKC (Figura 1.3), função que é comum a outros tipos de RTKs.

O FGF2 foi o primeiro membro da família de FGF a ser descoberto por promover a proliferação de fibroblastos murinos da linhagem 3T3, originando daí a denominação de fator de crescimento de fibroblasto (FGF – *Fibroblast growth factor*) (Armelin, 1973). Atualmente, seu envolvimento no controle da mitogênese, diferenciação e migração celular em processos de embriogênese, morfogênese, renovação e reparo de tecidos está bem estabelecido (Sorensen et al., 2006). No entanto, o papel de FGF2 na oncogênese permanece mal definido. Devido aos seus efeitos como fator mitogênico, FGF2 foi inicialmente considerado uma oncoproteína em potencial, apesar de nenhuma mutação ativadora ter sido documentada. De fato, elevados níveis de FGF2 foram encontrados em diversos cânceres e alguns relatos mostram que FGF2 está implicado na proteção de células cancerosas submetidas à quimioterapia (Gan et al., 2006; Pardo et al., 2006; Seno et al., 1998). Apesar de suas propriedades como um fator de crescimento, diversos laboratórios vêm mostrando que FGF2 exógeno inibe proliferação, dispara morte celular e sensibiliza células malignas à ação tóxica de quimioterápicos (Coleman et al., 2002; Costa et al., 2008; Liu et al., 1998; Salotti et al., 2013; Smits et al., 2000; Sturla et al., 2000; Westwood et al., 2002). Estas últimas observações contrariam a noção de que FGF2 é oncogênico, sugerindo o oposto, isto é, que FGF2 pode restaurar mecanismos supressores de tumor para bloquear a proliferação de células malignas. A importância de se entender os mecanismos pelos quais FGF2 ataca vulnerabilidades de células malignas para a terapia do câncer é evidente.

1.4 – ATIVAÇÃO ALOSTÉRICA DE SOS POR RAS-GTP

Já foi comentado anteriormente, na sessão 1.1, que para ser ativada, Ras depende da ação de GEFs, que atuam facilitando a saída de GDP do sítio de ligação ao nucleotídeo e, portanto, permitindo a ligação de uma molécula de GTP. A mais importante família de GEFs para a grande maioria dos tipos celulares em mamíferos é SOS (*Son of Sevenless*), que, em humanos, compreende duas proteínas: SOS1 e SOS2.

Ambas as proteínas, SOS1 e SOS2, são formadas por vários domínios (Figura 1.8A). Na porção C-terminal há o domínio rico em prolina (PR), que é o sítio de reconhecimento ao domínio SH3, presente na proteína adaptadora GRB2; o domínio homólogo a *cdc25* (*cdc25H*), que possui estrutura de grampo e onde se localiza o sítio catalítico de troca do nucleotídeo; e o domínio REM (*Ras Exchanger motif*), que, além de estabilizar a conformação do domínio *cdc25H*, possui um sítio alostérico de ligação a Ras-GTP, que potencializa a ação de SOS. Na porção N-terminal há os domínios HD (histone-like domain), DH (Dbl homology domain) e PH (pleckstrin domain), que juntos estão envolvidos na inibição da ativação de Ras.

SOS é ubiquamente expressa e encontra-se no citoplasma da célula, na forma inativa, no qual, o domínio HD se liga a um seguimento entre os domínios PH e REM. Nesta conformação, o domínio DH obstrui o sítio alostérico presente no domínio REM. Após a ativação de RTKs, GRB2 liga-se aos domínios tirosina quinase fosforilados dos receptores e recruta SOS para a membrana plasmática, onde se localiza a proteína Ras madura (figura 1.8B). Além disso, o domínio PH interage com PIP2 e ácidos fosfatídicos presentes na membrana, resultantes também da ativação do receptor tirosina quinase. Há ainda um terceiro ponto de interação com a membrana, que envolve o domínio semelhante a histona (HD) e O resultado do ancoramento de SOS à membrana é uma mudança conformacional que irá ativar o sítio catalítico presente em *cdc25H* e liberar o sítio alostérico presente em REM. No entanto, apesar de ativa, SOS permanece em um estado basal de funcionamento. Para sua total ativação, é necessária a ligação de Ras-GTP ao sítio alostérico em REM, que promove uma segunda mudança conformacional, estabilizando ainda mais SOS e aumentando sua atividade em até 500 vezes (Gureasko et al., 2008; Margarit et al., 2003; Sondermann et al., 2005).

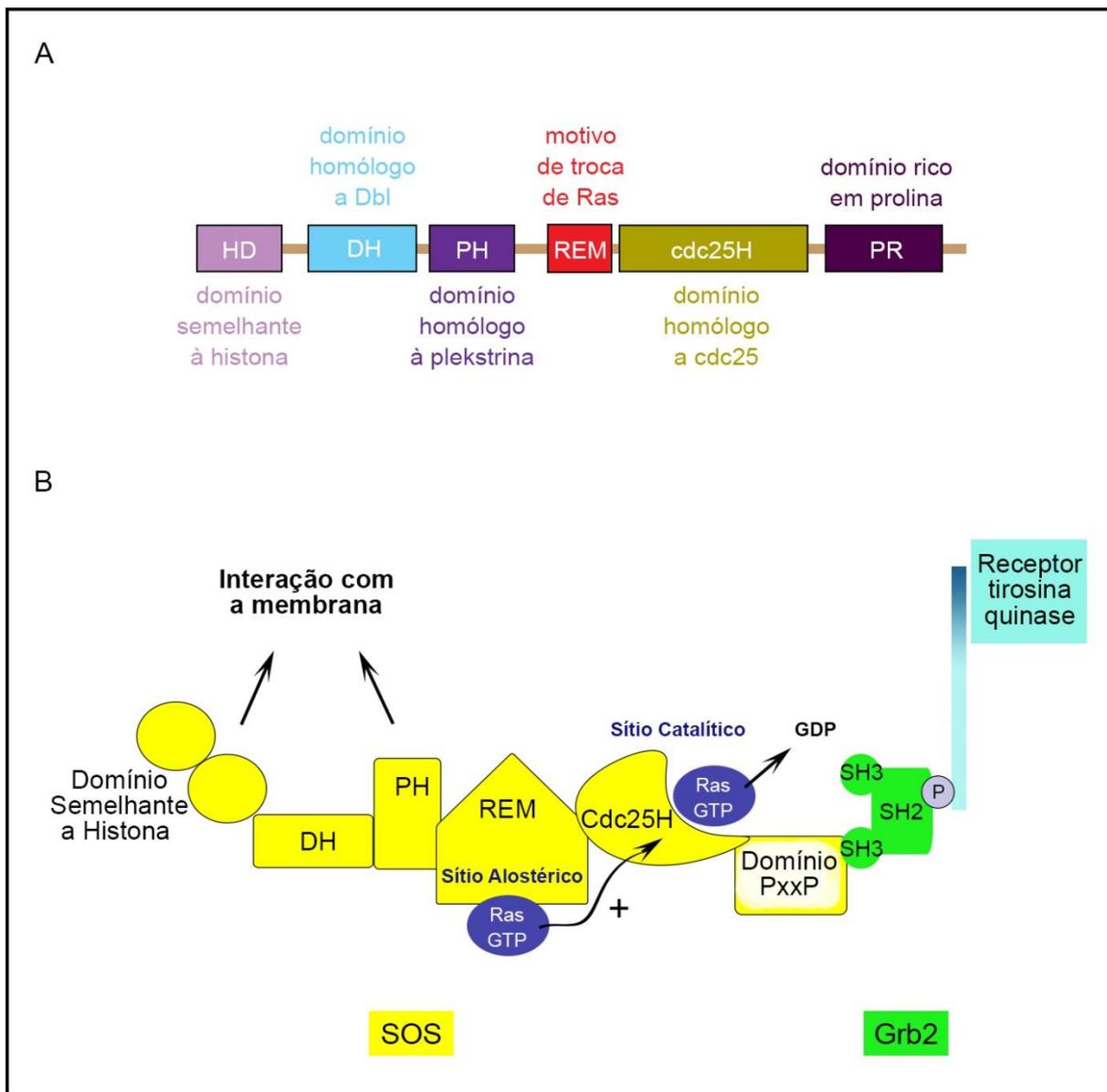


Figura 1.8 – Estrutura e ativação de SOS (son of sevenless). **A)** Estrutura da proteína multidomínio SOS. **B)** SOS em seu estado de ativação completo, no qual, Ras-GTP ocupa o sítio alostérico em REM, promovendo um aumento da atividade do sítio catalítico em Cdc25H.

2 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

Mutações em ras estão presentes em cerca de 20% dos cânceres humanos e a busca de novas terapias para o tratamento desses cânceres ainda é um desafio para a ciência. O nosso grupo publicou que FGF2 exógeno inibe a proliferação, *in vitro* e *in vivo*, de células malignas de camundongo da linhagem Y1 dependentes do oncogene K-ras (Costa et al., 2008). Esse efeito citostático é mediado pela atividade quinásica dos FGFRs e, à jusante destes, por RhoA-GTP. Por outro lado, as vias canônicas de sinalização mitogênicas que também estão à jusante da atividade quinásica dos FGFRs, MEK/ERK, PI3K/Akt e PKC, não estão envolvidas nesta resposta de estresse. Além disso, também foi visto em nosso laboratório que esta mesma linhagem Y1 também apresentava suscetibilidade à toxidez de PMA. No entanto, o efeito tóxico de PMA, mas não o de FGF2, é revertido por inibidores de PKC (Forti and Armelin, 2011; Matos, 2007). A importância potencial destes resultados com células malignas de camundongo para a biologia e terapia dos cânceres dependentes de Ras, é indiscutível, motivando o estudo dos efeitos de FGF2 e PMA em linhagens celulares humanas experimentalmente malignizadas pelo oncogene ras, levado avante pelo projeto desta tese.

A linhagem imortalizada HEK 293 foi desenvolvida a partir da exposição de células de rim de embrião humano a fragmentos de DNA de adenovírus tipo 5 (Graham et al., 1977). Posteriormente, foi descoberto que células HEK 293 continham em seu genoma as regiões E1a e E1b deste vírus, as quais codificam proteínas que interagem e inativam as proteínas supressoras de tumor pRB e p53, respectivamente (Louis et al., 1997; Moran, 1993). Apesar de imortalizada pela ação destas proteínas virais, a linhagem HEK 293 não é capaz de crescer em meio semissólido ou formar tumores em animais suscetíveis, podendo ser classificada como imortalizada e não tumoral (Graham et al., 1977).

Em nossa abordagem experimental, as células HEK 293 foram infectadas com a construção quimérica de DNA ER:Hras^{V12} em vetor retroviral (Fig. 2.1), cujo produto é a proteína de fusão composta pelo domínio de ligação ao hormônio (HBD)

do receptor de estrógeno mutado (G525R) fusionado à porção N-terminal da oncoproteína H-Ras^{V12}. A substituição de uma Glicina por uma Arginina na posição 525 reduz a afinidade de HBD ao 17- β -estradiol, porém, não altera sua afinidade pelo ligante sintético 4-hidroxi-tamoxifen (4-OHT) (Danielian et al., 1993; Littlewood et al., 1995). O resultado desta construção quimérica é a expressão ectópica da oncoproteína de fusão ER:H-Ras^{V12}. No entanto, sua expressão não é suficiente para o acionamento da oncoproteína H-Ras^{V12}, cuja ativação, é dependente de indução por 4-OHT.

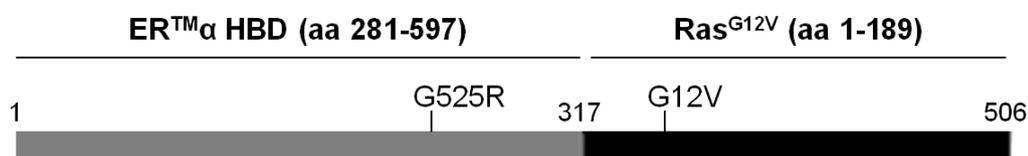


Figura 2.1 - Esquema da oncoproteína de fusão ER:H-Ras^{V12}, cuja atividade é induzível por 4-OHT. O gene quimérico foi inserido no vetor retroviral pBabeNeo sob controle do promotor de SV40, que garante sua expressão constitutiva (Figura extraída de Reuter and Khavari, 2006).

Esta abordagem nos permite verificar os efeitos de FGF2 e PMA em células HEK 293 sob duas condições fenotípicas diferentes e reversíveis: a) exibindo o fenótipo maligno induzido por 4-OHT através da ativação da oncoproteína H-Ras^{V12}; b) mostrando um fenótipo “normal” na ausência de 4-OHT.

2.1 – OBJETIVO GERAL

Investigar a possível toxidez de FGF2 e PMA em células malignas humanas dependentes de Ras, através da análise dos efeitos de FGF2 recombinante e PMA em células HEK 293, transformadas ou não pela ação do oncogene H-ras^{V12}.

2.1.1 – Objetivos Específicos

- Transduzir a linhagem HEK 293 com os vetores retrovirais pBabeNeo.ER:Hras^{V12} e pBabePuro.Hras^{V12} e selecionar sublinhagens monoclonais e policlonais estáveis que expressem a oncoproteína H-Ras^{V12} e a proteína de fusão ER:H-Ras^{V12}.
- Verificar os efeitos da expressão de H-Ras^{V12} na proliferação, viabilidade e capacidade de crescer em substrato semissólido da linhagem HEK 293.
- Analisar comparativamente os efeitos de FGF2 e PMA na proliferação e viabilidade das: a) linhagem parental HEK 293, b) sublinhagens HEK/Hras^{V12} e c) sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}, na presença e ausência de 4-OHT.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular HEK 293 (Graham et al., 1977), derivada de rim de embrião humano, foi gentilmente cedida pelo laboratório do Prof. Dr. Carlos Menck (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo), que as adquiriu previamente da ATCC (*American Type Culture Collection*). As células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com sulfato de estreptomicina (100 µg/mL), ampicilina (25 µg/mL) e 10% de soro fetal bovino (SFB). Estoques congelados foram mantidos em nitrogênio líquido ou, temporariamente, em congelador de -80°C. As mesmas foram mantidas em garrafas de poliestireno, próprias para cultura, e acondicionadas em estufas a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO₂. Para subcultivo ou plaqueamento, as células foram lavadas por duas vezes com PBSA (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM ; KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,2) e, após adição de tripsina e total descolamento da superfície da garrafa, as células foram ressuspensas em 10% SFB-DMEM. Uma alíquota desta suspensão foi usada para ensaios ou manutenção da linhagem em cultura.

3.2 – PRODUÇÃO DE SOBRENADANTE VIRAL

Células empacotadoras de vírus Phoenix-Ampho (φNX), cedidas pelo Prof. Dr. Garry Nolan (Stanford University), foram plaqueadas em placa de 60 mm de diâmetro (p60) em meio 10% SFB-DMEM, em uma confluência de aproximadamente 50%, e, em seguida, incubadas em estufas a 37°C e 5% CO₂. No dia seguinte, as células φNX foram transfectadas com os vetores retrovirais pBabeNeo.ER:Hras^{V12} (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Christopher Counter, Duke University) e pBabePuro.Hras^{V12} (desenvolvido em nosso laboratório pela Dra Julianna Zeidler), utilizando lipofectamine 2000 (invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. Após 6h de incubação, o meio de transfecção foi trocado por DMEM-10% SFB. Após 12, 24 e 72 horas, o meio das placas contendo o sobrenadante viral foi coletado e

substituído por um novo 10% FCS-DMEM. Inicialmente, o meio coletado foi mantido em tubos falcon a 4°C. Entretanto, após a última coleta de 72h, o meio contendo o sobrenadante viral foi filtrado em filtro millipore de 45 µm, distribuídos em alíquotas de 1 mL e armazenados a -80°C.

3.3 - TRANSDUÇÃO

De acordo com o protocolo descrito no parágrafo seguinte, a linhagem celular HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*), foi transduzida com os vetores retrovirais pBabepuro.Hras^{V12} e pBabeNeo.ER:Hras^{V12} (Figura 3.1), para obter duas séries de sublinhagens denominadas, respectivamente, HEK/Hras^{V12} e HEK/ER:Hras^{V12}.

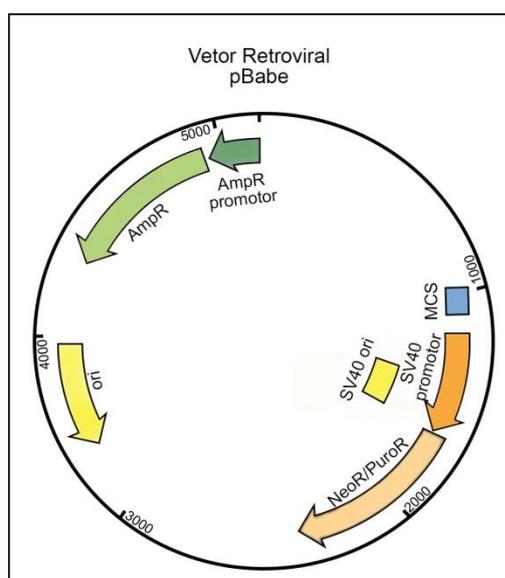


Figura 3.1 – Mapa simplificado do vetor pBabePuro/Neo. Os genes de interesse (ER:H-ras^{V12} e H-ras^{V12}) então inseridos na região MCS (*multiple cloning site*) e estão sob controle do promotor de SV40.

No dia anterior à transdução, células HEK 293 foram plaqueadas em placas p60, a uma confluência de aproximadamente 50%. No dia da transdução, o meio DMEM-10% SFB foi descartado e foram adicionados à placa 1 mL de DMEM-10%SFB fresco e 1 mL de sobrenadante viral, previamente aquecido a 37°C. Em

seguida, foi adicionado polibreno, na concentração final de 4 µg/mL. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 24h. Após este período, o meio de cultura foi trocado por um novo DMEM-10% SFB e, no dia posterior, cada p60 foi subcultivada em 3 placas de 100 mm de diâmetro (p100) contendo 10 mL de DMEM-10% SFB. O processo de seleção por resistência a antibiótico só foi iniciado um dia após o subcultivo. Foram adicionados 800 µg/mL de geneticina (G418) para as células transduzidas com o vetor pBabeNeo.ER:Hras^{V12} e 2 µg/mL de puomicina para àquelas transduzidas com o vetor pBabePuro.Hras^{V12}. O meio das placas p100 contendo o antibiótico de seleção foi trocado a cada 2 ou 3 dias e após a morte de todas as células da placa controle, foram coletados clones com o auxílio de anéis de aço para clonagem.

Foram selecionadas e isoladas cinco sublinhagens monoclonais chamadas HEK/ER:Hras^{V12}-B,-C,-D,-G e -K e duas policlonais (HEK/ER:Hras^{V12}-Pol1 e -Pol2) de HEK 293 transduzida com pBabeNeo.ER:Hras^{V12}, que foram submetidas a uma triagem inicial para detectar a expressão induzida da proteína de fusão ER:Hras^{V12}, cujos resultados estão documentados na Figura 3.2A. Esta figura mostra que, como se esperava, as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} expressam constitutivamente níveis estacionários mínimos da proteína ER:HRas^{V12}, que se elevam drasticamente com o tratamento por 4-hidroxi-tamoxifeno (4OHT). A Figura 3.3 explica esquematicamente este processo de indução: na ausência de 4OHT a proteína ER:H-Ras^{V12} fica associada às proteínas bloqueadoras do receptor de estrógeno e é preferencialmente degradada; por outro lado, 4OHT se associa ao domínio ER (numa reação de equilíbrio clássica Ligante-Receptor) da proteína ER:H-Ras^{V12} liberando-a do complexo de inativação e promovendo sua estabilidade. Da série das sublinhagens HEK-ER:HRas^{V12} originalmente isoladas, foram escolhidas a clonal K e a policlonal Pol2 para estudos experimentais exaustivos.

Já a transdução com o vetor pBabePuro.Hras^{V12}, permitiu isolar vinte sublinhagens monoclonais (R1.1; R1.2; R1.3; R1.4; R1.5; R1.6; R1.7; R1.8; R1.9; R1.10; R1.12; R1.14; R2.1; R2.2; R2.3; R2.4; R2.5; R2.7; R2.8 e R2.9) e duas sublinhagens policlonais (R1 e R2). Na triagem, estas sublinhagens HEK/Hras^{V12} mostraram níveis estacionários constitutivamente altos da oncoproteína H-Ras^{V12} e, por conseguinte, também níveis cronicamente altos de H-Ras^{V12}-GTP independentemente do estado metabólico da célula (Figura 3.2B). Das sublinhagens

inicialmente isoladas foram escolhidas a clonal R1.6 e a policlonal R2 para o trabalho posterior.

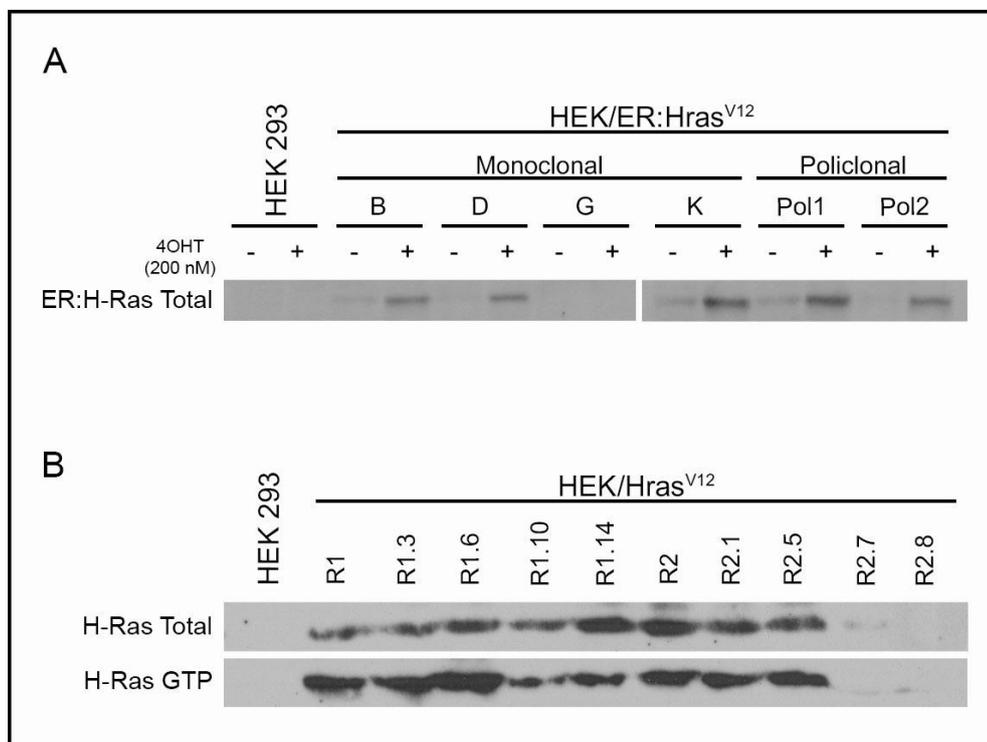


Figura 3.2 – Western blot para ER:H-ras^{V12} ou H-ras^{V12} em sublinhagens de HEK 293. A) HEK/ER:Hras^{V12}. B) HEK/Hras^{V12}.

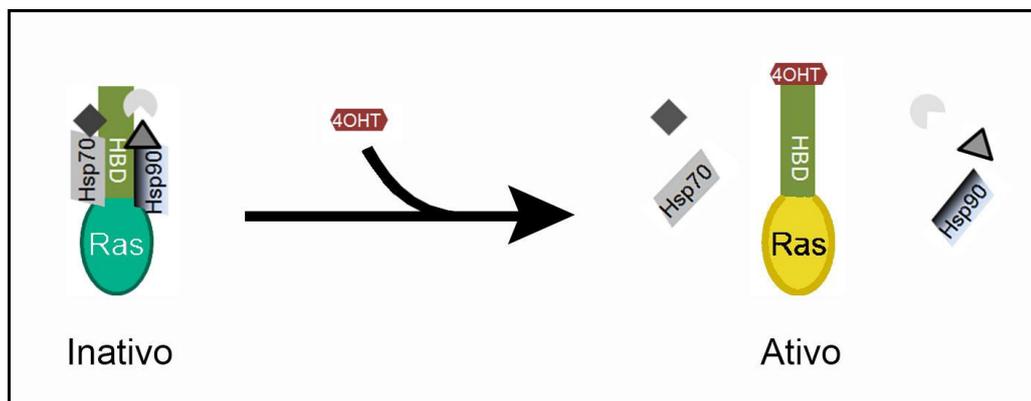


Figura 3.3 - Esquema da oncoproteína de fusão ER:H-Ras^{V12}. A construção ER:Hras^{V12} é constitutivamente expressa. Na ausência do ligante (4OHT), a proteína de fusão encontra-se inativa, provavelmente, devido à ligação de um complexo inibitório de proteínas. A ligação de 4OHT libera a região HBD do complexo inibitório, estabilizando a oncoproteína H-Ras^{V12}.

3.4 - CURVAS DE CRESCIMENTO

Para ensaios de curvas de crescimento, foram plaqueadas 50 000 células em uma placa de 35 mm de diâmetro (p35) contendo 1,5 mL de 10% SFB-DMEM +/- estímulos indicados. O meio foi renovado em dias alternados. Para coleta, o meio das placas foi descartado e após uma lavagem com PBSA, foi adicionado 250 µL de tripsina. Após 5 minutos, as células foram ressuspensas em 750 µl de PBS-3,7% formaldeído e armazenadas em eppendorfs de 1,5 mL a 4°C até o dia da contagem. Para determinar o número de células por mL, foi utilizado o contador de partículas Z2 counter Beckman Coulter®.

3.5 - ENSAIO DE COLÔNIA EM SUSPENSÃO DE AGAROSE

Em cada poço de uma *multwell* de 24 poços, foi adicionado 0,5 mL de 0.6% de agarose em 10%SFB-DMEM para formar uma primeira camada, denominada agarose-dura. Após gelificação, 1 mL de uma camada semi-sólida contendo uma suspensão com 5 000 células em 0.3% de agarose + 10%SFB-DMEM foi sobreposta à camada de agarose-dura e, posteriormente, a placa foi acondicionada em uma estufa a 37°C e 5% de CO₂. No dia seguinte, foi adicionado no topo da bicamada de agarose, 0,5 mL de meio de cultura contendo os tratamentos indicados. Este meio líquido foi trocado em dias alternados e após 2 a 4 semanas, o número de colônias foi contado a olho nu ou com o auxílio do microscópio.

3.6 - EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E TRATAMENTO COM DNASE I

Para a extração de RNA total as células foram cultivadas em placas p60 e, ao atingirem a confluência ideal, o meio foi descartado e o RNA total foi coletado utilizando 1 mL do reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante. As soluções finais dos RNAs obtidos foram quantificadas por espectrometria e tratadas com desoxirribonuclease (DNase, Invitrogen), segundo especificações do fabricante, para eliminar eventuais contaminações com DNA.

3.7 - TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Para a primeira fase da reação de transcrição reversa, foram utilizados 4 µg de RNA previamente tratados com DNase I, 1 µL de dNTP (10 mM) e 1 µL de *random primers* (300 nM). Esses componentes foram reunidos em um tubo próprio para PCR e incubados a 65°C por 5 minutos. Para a segunda fase, foi adicionado 5U da transcriptase reversa SuperScriptIII (Invitrogen) no seu respectivo tampão na concentração final de 1x (5 mM de MgCl₂ e 0,1M de DTT). Para a segunda reação, os tubos foram incubados, em um termociclador, a 25°C por 10 minutos, 50°C por 50 minutos e 85°C por 5 min. O cDNA resultante foi conservado a -20°C.

3.8 - PCR QUANTITATIVO (qPCR) OU REAL TIME PCR

Para cada reação de Real Time foram adicionados 10 µl do kit SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2,5 µL de primers forward e reverse (75nM cada primer) e 1 ng de cDNA, resultando em um volume final total de 20 µL . A reação ocorreu no termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). O cálculo da eficiência de cada par de primer para cada reação foi calculado pelo software LinRegPCR (versão 12.17) e a média da eficiência para cada par de primer foi utilizada para a análise dos dados pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

FGFR1	F: AGCTTTCTCCTGTCGGTTTGG R: TGCTGTAGCCCTGAGGACAA
FGFR2	F: CACATAAACGGCAGTGTTAAAACAT R: TCCCTGCTCAGTGTAGCTAGGTT
FGFR 3	F: TGGCTCAGGGTGGTCTCTTC R: GTCGCTGGGTAAACAAAATCG
FGFR 4	F: TGTGTCCTGATGGCCCAAAT R: CAGCCAGGCTCAGCCAAA
FGFR5	F: CCTACCTCAATAAGCTGCTCATCA R: AAGCTGTAGCCCATGGTGTTG
β Actin	F: TCCTCCTGAGCGCAAGTACTC R: TCCTGCTTGCTGATCCACATC

3.9 - CITOMETRIA DE FLUXO

3.9.1 - Análise do conteúdo de DNA total

As células foram plaqueadas em placas p60 a uma confluência de aproximadamente 30%. No dia seguinte, foi adicionado um novo meio com os estímulos indicados. Após finalização do período de estímulo, as placas foram lavadas por duas vezes com PBSA, tripsinizadas, centrifugadas e lavadas por duas vezes com PBS. Para fixação, o pellet de células foi ressuspendido em uma parte de PBS e 3 partes de etanol absoluto, ambos gelados. O etanol foi adicionado aos poucos enquanto o tubo contendo a suspensão de células era gentilmente homogeneizado. As células fixadas em 75% de etanol, foram condicionadas a 4°C por pelo menos 24 horas. Para marcação do conteúdo total de DNA, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e, em seguida, as amostras foram ressuspendidas em 0,5 a 1 mL de uma solução de PBS contendo 50 µg/mL de iodeto de propídio e 100 µg/mL de RNase A. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e protegidas da luz, as amostras foram lidas no citômetro de fluxo (BD Biosciences FACSCalibur).

3.9.2 - Detecção de espécies Reativas do Oxigênio (ROS)

Para detecção de espécies reativas do oxigênio foi utilizado o kit *Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection* (Invitrogen). As células foram plaqueadas a uma confluência de 30% em placas p35. Os tratamentos foram realizados a cada dia de forma regressiva, de modo que, todos os tempos de tratamento foram coletados no mesmo dia para marcação e análise das amostras. Para marcação, foi adicionado carboxi-H₂DCFDA (25 µM) à monocamada celular e, após 30 minutos, as células foram tripsinizadas, lavadas uma vez com PBS, ressuspendidas em 0,6 mL do mesmo tampão e imediatamente lidas no citômetro.

3.10 - EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

Após finalizado o tempo de estímulo necessário, o meio das placas foi desprezado e as mesmas foram lavadas por duas vezes com PBS gelado e mantidas em gelo. Depois, para cada cm^2 de placa, foi adicionado cerca de 8 μL de RIPA (*Radioimmunoprecipitation Buffer*) mais inibidores de proteases e fosfatases: PSFM (1 mM), aprotinina (1 mg/ml), pepstatina A (1 mg/ml), leupeptina (10 mg/ml), ortovanadato de sódio (1 mM) e fluoreto de sódio (5 mM). O tampão de lise RIPA foi homogeneamente espalhado por toda a área da placa e após 10 minutos de incubação no gelo, as células foram raspadas da superfície da placa com o auxílio de um rodinho (*cell scraper*). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13 000 rpm em centrífuga refrigerada (4°C) e o sobrenadante contendo o lisado de proteína total foi recuperado e armazenado a -21°C. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford.

3.11 - SDS-PAGE E WESTERN BLOT

Após quantificação, uma alíquota equivalente a 70 μg de proteína total de cada amostra foi misturada a um tampão de amostra para proteínas e incubada a 100°C por 5 minutos e, em seguida, retornadas ao gelo. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida (10-15%) e submetidas a uma corrida eletroforética a 60 V por, aproximadamente, 16h. Após separação das proteínas por tamanho, a mesmas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond C-Extra (Amersham-Pharmacia) através de um sistema semi-seco de transferência. A análise da qualidade da transferência foi realizada pela coloração com o reagente Ponceau-S. Após a descoloração da membrana por lavagens com TBS-T, a membrana foi bloqueada com uma solução de leite desnatado a 5% em TBS-T durante uma hora. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T e, em seguida, incubada overnight com o anticorpo primário específico para a proteína a ser analisada, diluído em uma solução de BSA a 5% em TBS-T na concentração de 1:1000. Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com TBS-T por 3 vezes de 10 minutos e, posteriormente, incubada por uma hora com um anticorpo secundário, conjugado à enzima peroxidase, na diluição de

1:5000 em TBS-T. Decorrido esse tempo, a membrana foi novamente lavada com TBS-T por 3 vezes de 10 minutos e, para a detecção das proteínas desejadas, utilizamos o kit ECL Plus Western Blotting Detection System (GE healthcare®) de acordo com o protocolo do fabricante para sensibilizar filmes fotográficos permitindo a análise da expressão das proteínas de interesse.

3.12 – “PULL DOWN ASSAY” DE RAS-GTP

3.12.1 - Expressão em bactérias e purificação de GST-RBD (*Glutathione-S-transferase – RasGTP-Binding Domain of Raf*)

Bactérias BL-21 competentes foram transformadas com o plasmídeo pGEX-GST-RBD e plaqueadas em LB-ágar suplementado com 100 µg/ml de ampicilina (LB/amp). Uma colônia foi coletada e cultivada em 200 ml de LB com 100 µg/ml de ampicilina (LB/Amp) por 16h a 37°C sob agitação. Esses 200 ml foram diluídos em 2L de LB/Amp, incubados a 37°C sob agitação. Após atingir a densidade óptica de 0,84 (600 nm), foi adicionado IPTG a 0,5 mM nos 2L de meio com bactérias, sendo incubado por mais 2h a 37°C, sob agitação. A suspensão de bactérias foi centrifugada (8.000 rpm por 10 minutos a 4°C), o sedimento foi posto em gelo e ressuspenso em 20 ml de tampão de lise (50 mM de Tris pH 7.5, 1% de triton X-100, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml de leupeptina e aprotinina). As bactérias foram então lisadas com auxílio de sonicador (10 sonicações de 1 minuto, com intervalo de 1 minuto, com o tubo imerso em gelo). A suspensão resultante foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante coletado foi congelado a -80°C com 10 % de glicerol ou imediatamente usado para purificação da proteína de fusão.

Cerca de 500 µL de “beads” de *Glutathione-Sepharose 4B* (Amersham Biosciences), previamente lavados por 3 x com PBS gelado, foi incubado com 12 ml do extrato de bactérias, obtido no procedimento anterior, por 1,5h a 4°C sob rotação. Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 3 minutos a 3.000 rpm e as “beads” foram transferidos para um eppendorf de 1,5 ml e ressuspenso com 1 ml de

tampão de lavagem (50 mM de Tris pH 7.5, 0,5 % de Triton X-100, 150 mM de NaCl, 5mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 1 µg/ml de leupeptina e aprotinina), lavados por 6x e ressuspensos em 5ml do mesmo tampão na presença de glicerol a 10%. Alíquotas de 100 µL da suspensão da proteína de fusão (GST-RBD) adsorvida às “beads”, em tubos eppendorf, foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

3.12.2 - Precipitação de Ras-GTP

Cerca de 100 µL de GST-RBD-beads, preparado no item anterior, foi incubado com 500 µg de lisado de proteína total, por 1h, a 4°C e sob rotação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e lavadas por 4 vezes com tampão RIPA acrescido dos inibidores de protease e fosfatase (1mM PSFM, 1 mg/mL aprotinina, 1 mg/mL pepstatina A, 10 mg/mL leupeptina, 1 mM ortovanadato de sódio e 4 mM fluoreto de sódio). Após as lavagens, os beads foram ressuspensos em 50 µL de tampão de amostra de proteínas e em seguida, submetidos à SDS-PAGE e *western blot* para H-Ras.

4 RESULTADOS

As sublinhagens transformadas HEK/Hras^{V12} e HEK/ER:Hras^{V12} foram obtidas conforme descrito em Métodos (seção 3.3). Como esperado, as sublinhagens representativas das células HEK/Hras^{V12} expressam constitutivamente a oncoproteína H-Ras^{V12} que, devido à mutação, exibem níveis crônicos de H-Ras^{V12}-GTP independentemente do estado metabólico da célula (Fig. 4.1A). Por outro lado, as células HEK/ER:Hras^{V12} somente mostram níveis estacionários elevados da proteína de fusão ER:H-Ras^{V12} sob tratamento com 4-hidroxi-tamoxifeno (4OHT) e, por conseguinte, também mostram altas concentrações estacionárias de ER:H-Ras^{V12}-GTP (Fig. 4.1B). Sob as mesmas condições de ensaio, a linhagem parental HEK 293 apresentou níveis endógenos negligenciáveis de H-Ras total e H-Ras-GTP (Fig. 4.1 A).

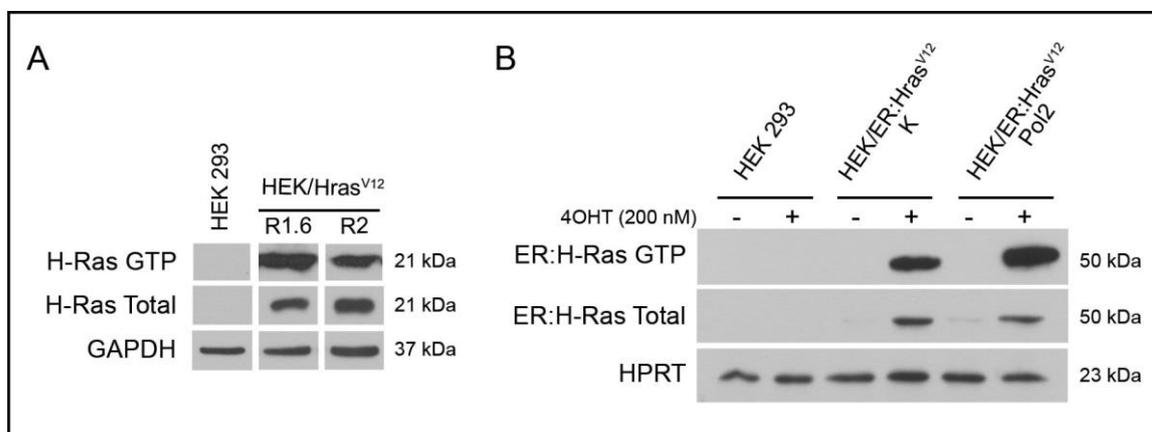


Figura 4.1 – Expressão de H-Ras Total e ligado à GTP em células HEK 293 e nas sublinhagens HEK/Hras^{V12} e HEK/ER:Hras^{V12}. **A)** O clone R1.6 e o policlone R2, representativos da sublinhagem HEK/Hras^{V12}, apresentaram níveis constitutivos de H-Ras total e ativo, enquanto que a linhagem parental HEK 293 exibiu níveis não detectáveis de H-Ras endógeno. **B)** O clone K e o policlonal Pol2, representativos da sublinhagem HEK/ER:Hras^{V12}, expressaram altos níveis de ER:H-Ras^{V12} somente em presença de 4OHT.

Para avaliar como variam os níveis intracelulares de [ER:H-Ras^{V12}] em função das concentrações extracelulares de [4OHT], foram realizadas curvas dose/resposta

através de ensaios de western blot, cujos resultados aparecem nos gráficos da figura 4.2. Múltiplos experimentos independentes com ambas as sublinhagens, HEK/ER:Hras^{V12}-K e -Pol2, resultaram em consistentes curvas hiperbólicas de saturação, como se espera de um processo que depende de interação entre ligante (4OHT) e receptor (domínio ER da proteína ER:Hras^{V12}), conforme ilustrado anteriormente pelo esquema da Fig. 3.3. Considerando a premissa de que [4OHT] extracelular e intracelular são iguais, é possível estimar o valor de 50-60 nM para a constante de associação entre 4OHT e o domínio ER de ER:H-Ras^{V12} (Fig. 4.2A à esquerda e 4.2B). Por outro lado, quando se analisou a concentração de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] em função de [4OHT], a curva de dose resultante (Fig. 4.2 à direita) revelou-se de forma sigmoidal abrupta com forte tendência a um platô logo após [4OHT] 20nM. Logo, em concentrações de [4OHT] superiores a 50nM aparecem concentrações estacionárias crescentes de [ER:H-Ras^{V12}] disponíveis para serem ativadas, presumivelmente, na forma do complexo [4OHT/ER:H-Ras^{V12}]. Este excesso de [ER:H-Ras^{V12}] pode decorrer de concentrações limitantes de [SOS] para promover a ativação de [ER:H-Ras^{V12}] a [ER:H-Ras^{V12}-GTP] em meio 10% de soro. Além disso, é razoável assumir a hipótese de que a curva de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] em função de [4OHT] seja sigmoidal (Fig. 4.2 à direita), uma vez que sabidamente SOS é uma proteína alostérica positivamente ativada por Ras-GTP (seção 1.4).

A seguir, a linhagem parental HEK 293 e suas sublinhagens estavelmente transduzidas (HEK/ER:Hras^{V12}-K e -Pol2; HEK/Hras^{V12}-R1.6 e -R2) foram testadas quanto à sensibilidade ao FGF2 (*fibroblast growth factor*) e ao ester de forbol PMA (*phorbol 12-myristate 13-acetate*).

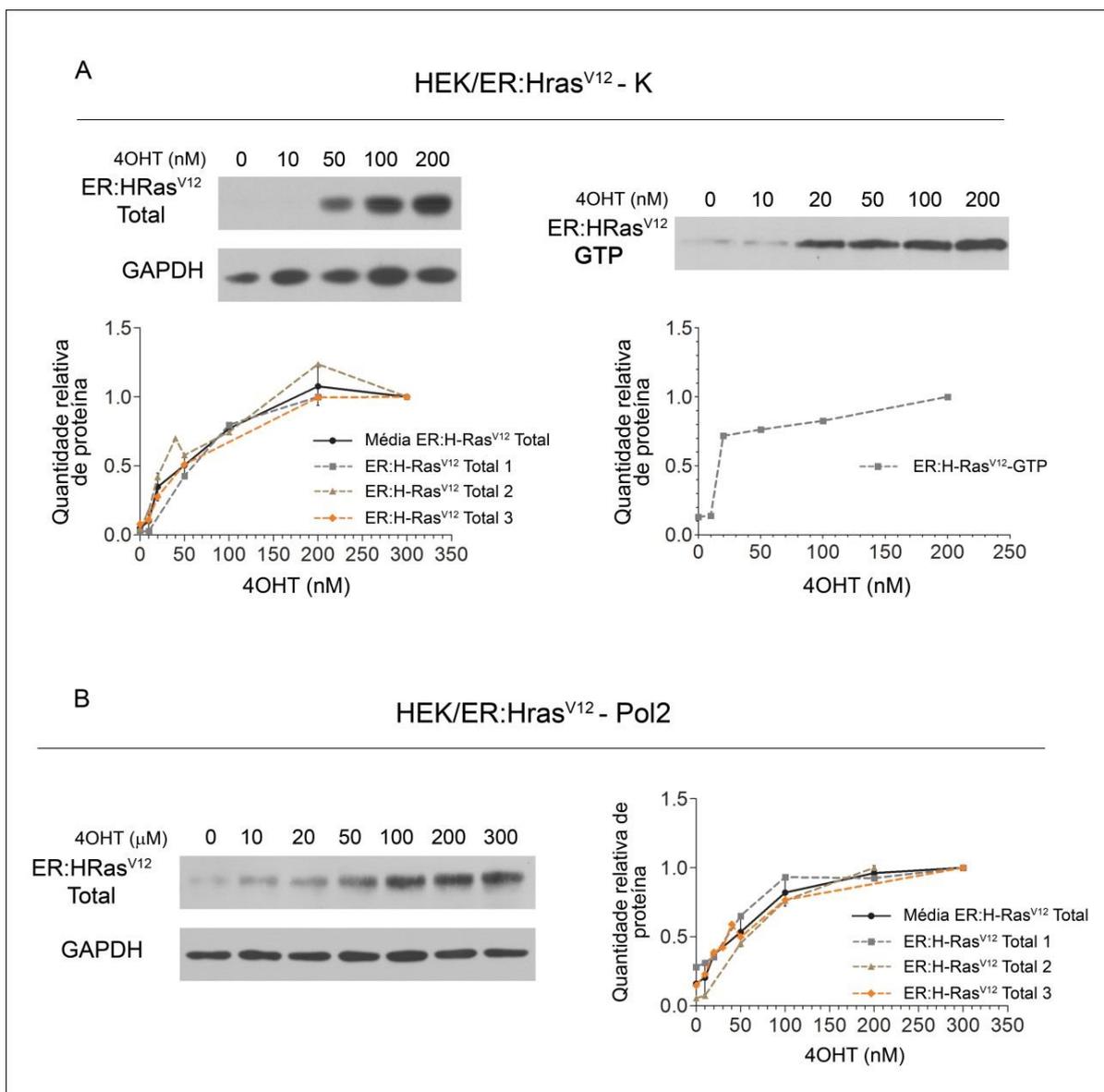


Figura 4.2 – Variação de [ER:H-Ras^{V12}] e de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] intracelulares em função de [4OHT] extracelular. A) Esquerda. Western blot representativo para [ER:H-Ras^{V12}] de células HEK/ER:Hras^{V12}-K tratadas por 24h com concentrações crescentes de [4OHT]. Três westerns de experimentos biologicamente independentes foram quantificados por densitometria. A curva em preto é a média dos três ensaios distintos, representados pelas linhas pontilhadas. Para cada ensaio foram utilizados 70 μg de proteína celular total. **Direita.** 500μg de proteína total de células HEK/ER:Hras^{V12}-K tratadas por 24h com concentrações crescentes de [4OHT] foram utilizadas para isolar quantificadamente [ER:H-Ras^{V12}-GTP] por ligação específica ao domínio ligante de RasGTP da quinase Raf1. Cada porção de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] isolada foi submetida ao western blot mostrado na figura, que foi quantificado por densitometria para gerar a curva dose/resposta do gráfico logo abaixo. **B)** Western blot para [ER:H-Ras^{V12}] das células HEK/ER:Hras^{V12}-Pol2, seguindo protocolo idêntico ao descrito em A.

4.1 – EFEITO DE FGF2 EM CÉLULAS HEK 293 MALIGNIZADAS PELA AÇÃO DO ONCOGENE H-RAS^{V12}

Antes de iniciar os testes com FGF2, foi realizado um PCR quantitativo e uma imunoprecipitação seguida de western blot para verificar se e quais receptores de FGF (FGFRs) são expressos pela linhagem HEK 293. A análise da expressão de mRNA de receptores de FGF mostrou que o receptor R3 é o dominante, seguido pela expressão dos receptores R1 e R4. O receptores FGFR2 e R5, por sua vez, apresentaram níveis negligenciáveis de mRNA (Figura 4.3). Para detecção da expressão proteica desses receptores, foram realizados ensaios de imunoprecipitação seguidos de western blot para os receptores FGFR1 ao R4. Todas as quatro isoformas testadas de FGFRs foram detectadas (Figura 4.1C em Zeidler, 2012).

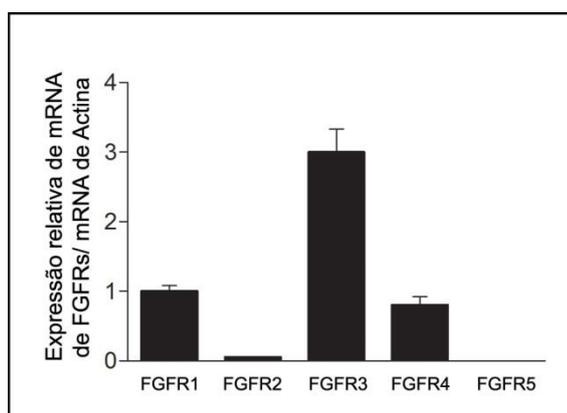


Figura 4.3 – Análise da expressão de receptores de FGF para a linhagem celular HEK 293. PCR quantitativo para os receptores de FGF 1-5, normalizados pela expressão do gene de actina. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão ($n=3$) de apenas um ensaio, representativo de três experimentos independentes.

4.1.1 - Efeito dual de FGF2 no crescimento de colônias da sublinhagem HEK/ER:Hras^{V12}

Os efeitos de FGF2 sobre a linhagem HEK 293 e suas sublinhagens transformadas pelo oncogene H-ras^{V12}, foram inicialmente testados na sublinhagem HEK/ER:Hras^{V12}. Os ensaios de curvas de crescimento em monocamadas aderidas a substrato sólido mostraram que FGF2 e/ou 4OHT não exerceram nenhuma

alteração significativa na proliferação da linhagem parental HEK 293 (Figura 4.4A e B). Na ausência de 4OHT, as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}-K e -Pol2 comportaram-se como a linhagem parental. Porém, a adição de 4OHT estimulou a proliferação das mesmas, resultado esperado para ativação de um forte oncogene. No entanto, o tratamento com FGF2, concomitante com a ativação de ER:H-Ras^{V12} por 4OHT, mostrou tendência para inibir a proliferação celular. Múltiplos testes experimentais sugeriram que o efeito negativo da combinação FGF2 + 4OHT na proliferação das sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}-K e -Pol2, em monocamadas, pode não ser relevante, pois é pequeno, variável e de difícil quantificação.

Resultados muito diferentes foram obtidos ao realizarmos ensaios clonogênicos em suspensão de agarose semi-sólida. Na ausência de estímulos, a capacidade de ambas as sublinhagens, HEK/ER:Hras^{V12}-K e -Pol2, formarem colônia em suspensão de agarose foi nula (Figura 4.4C). No entanto, o tratamento com FGF2 ou 4OHT estimulou o desenvolvimento de colônias em suspensão de agarose, uma característica típica de células malignamente transformadas. Contudo, a adição conjunta de 4OHT e FGF2 praticamente aboliu o desenvolvimento de colônias em suspensão de agarose. Por outro lado, a linhagem parental HEK 293 não foi capaz de crescer em suspensão de agarose, independentemente do tratamento usado.

Portanto, os resultados de ensaios clonogênicos em suspensão de agarose demonstram que, quando HEK 293 está expressando altos níveis da oncoproteína ER:H-Ras^{V12}, sob indução de altas concentrações de 4OHT, FGF2 deixa de exibir sua função canônica de fator mitogênico e passa a ter uma inesperada ação citotóxica.

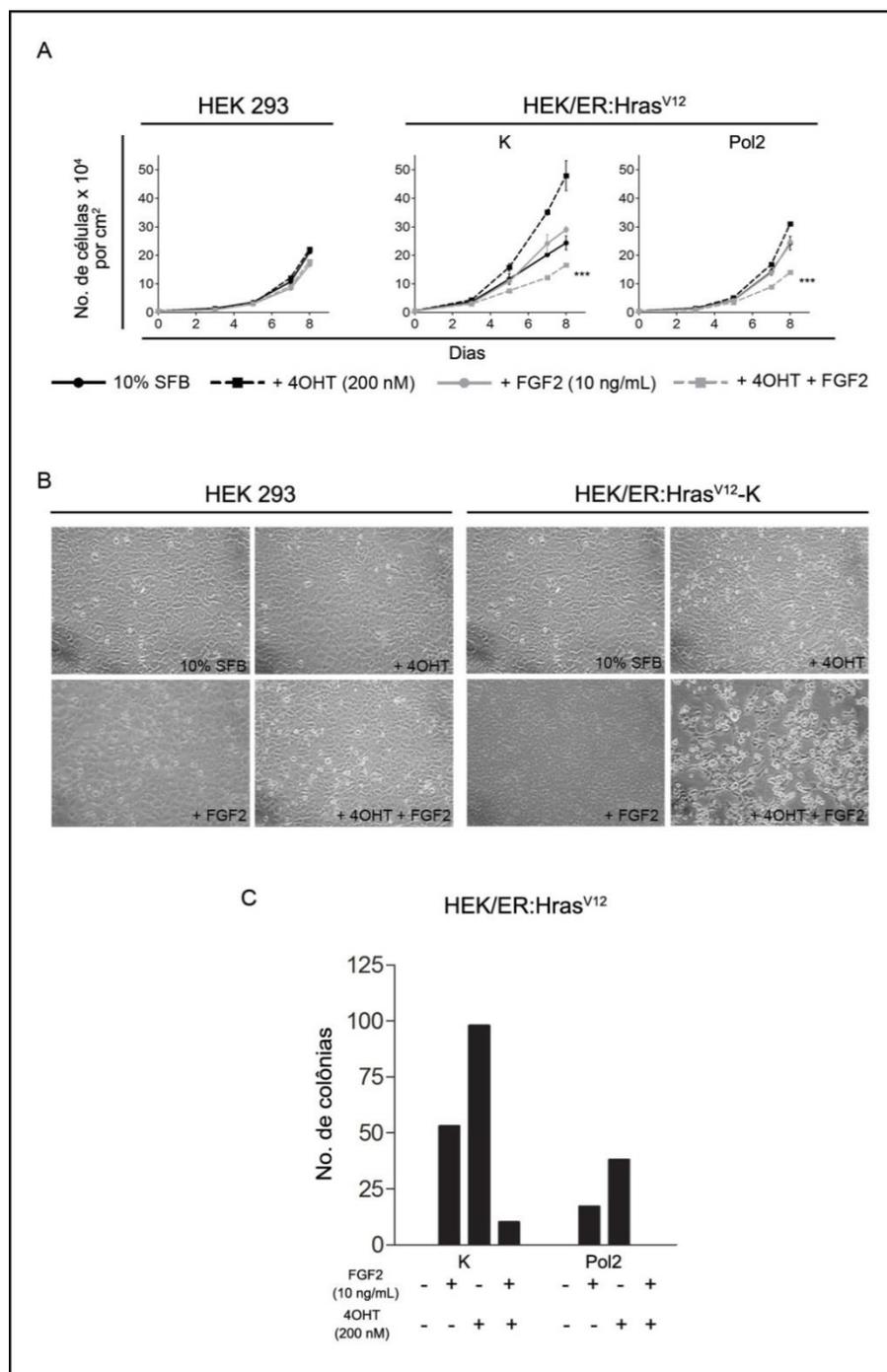


Figura 4.4 – FGF2 possui efeito citotóxico em células HEK 293 condicionalmente malignizadas pela ação do oncogene H-ras^{V12}. **A)** Curvas de crescimento de HEK 293 e suas sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}, sem tratamento (10% SFB) ou tratadas com FGF2 e/ou 4OHT. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (Two-way ANOVA, *** $p < 0,001$). Qualitativamente, este resultado é representativo de experimentos em duplicata de quatro diferentes sublinhagens monoclonais. **B)** Ensaio de colônia em suspensão de agarose para as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} sem tratamento (10% SFB) ou tratadas com FGF2 e/ou 4OHT ($n=1$). Qualitativamente, este resultado é representativo de experimentos em duplicata de quatro sublinhagens monoclonais e uma sublinhagem policlonal. A célula parental HEK 293 não é capaz de formar colônia em substrato semi-sólido.

Para verificar se e como varia a ação de FGF2 em função das concentrações intracelulares de [ER:H-Ras^{V12}] e [ER:H-Ras^{V12}-GTP], adicionamos este fator de crescimento juntamente com concentrações extracelulares crescentes de [4OHT] em ensaios clonogênicos em suspensão de agarose (Fig. 4.5). FGF2 sozinho promoveu o desenvolvimento de colônia na sublinhagem HEK/ER:Hras^{V12}-K, apesar de não ser capaz de promover o desenvolvimento de colônias em suspensão nas células parentais HEK 293. A 25 nM, 4OHT foi suficiente para estimular o desenvolvimento de colônias, com um número de aproximadamente 90 colônias/placa. No entanto, com 4OHT 50 nM, a variável dependente “número de colônias/placa” já atinge um platô, ou seja, mesmo com o incremento de 4OHT para uma concentração quatro vezes maior, o número de colônias que se desenvolveram por placa continua em torno de 180. A combinação de FGF2 com 4OHT trouxe resultados duais inesperados: FGF2 10 ng/mL + 4OHT 25 nM tiveram um efeito quase somatório na promoção do crescimento de colônias, bem de acordo com a expectativa de que FGF2 é um mitógeno potencialmente oncogênico. Contudo, a combinação de altos níveis de [4OHT] com FGF2 (FGF2 10 ng/mL + 4OHT 200nM) trouxe resultados opostos, não esperados, pois, nestas condições, FGF2 aparece como um agente citostático (ou citotóxico), bloqueando o desenvolvimento de colônias. Em conclusão, FGF2 mostra um efeito dual sobre o crescimento de colônias em suspensão das células HEK/ER:Hras^{V12}: é mitogênico em concentrações moderadas de 4OHT e severamente inibitório em concentrações altas de 4OHT.

Nesta tese não foram medidas as concentrações intracelulares de [ER:H-Ras^{V12}] e [ER:H-Ras^{V12}-GTP] das células HEK/ER:Hras^{V12} em função do tratamento com FGF2 10 ng/mL, - ou + concentrações crescentes de [4OHT] extracelular. Na ausência destes dados experimentais, assumimos a hipótese de que FGF2 10 ng/mL (concentração saturante) ativa a via FGFR → SOS elevando os níveis de [SOS ativada] disponível para catálise da reação: [ER:H-Ras^{V12}] + GTP → [ER:H-Ras^{V12}-GTP].

O corolário dessa hipótese admite que: a) em níveis baixos de [4OHT] (25 nM), correspondentes a valores também baixos de [ER:H-Ras^{V12}], o incremento de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] devido a FGF2 (10 ng/mL) é moderado e o efeito é mitogênico; b) com concentração de 200 nM de [4OHT], FGF2 (10 ng/mL) promove uma

elevação de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] a níveis estressantes, causando citotoxicidade e bloqueio do crescimento de colônias.

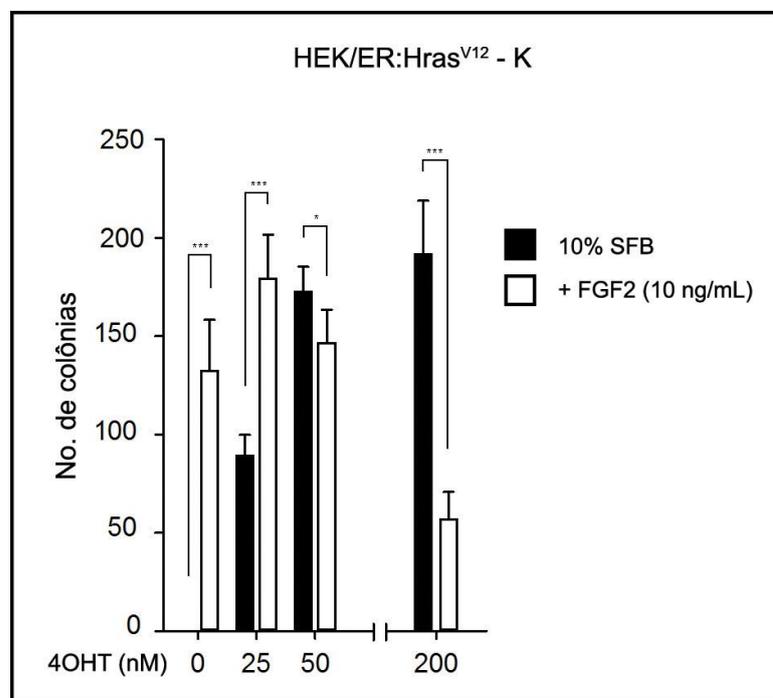


Figura 4.5 – Efeito dual de FGF2 no crescimento de colônias em suspensão de agarose das células. HEK-ER:Hras^{V12} em função da concentração [4OHT]: mitogênico em 25nM e inibitório em 200nM. Ensaio de colônia em suspensão de agarose para a HEK/ER:Hras^{V12} tratada com diferentes concentrações de 4OHT, com ou sem a adição de FGF2. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n=4) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes (Teste T de Student, * p = 0,045, *** p < 0,001).

4.1.2 - Efeitos de FGF2 nas sublinhagens HEK/Hras^{V12}

Os experimentos e resultados obtidos com as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}, descritos nos parágrafos anteriores, sugeriram que há um nível ótimo de expressão da oncoproteína H-Ras^{V12} para garantir um fenótipo maligno em uma célula robustamente viável. Níveis acima desse ótimo de [H-Ras^{V12}] gera uma célula sob estresse oncogênico, mesmo em linhagens imortalizadas como HEK 293, que são deficientes nas funções das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb. Por conseguinte, era de se esperar que a transformação de HEK 293 com um vetor de expressão constitutiva para H-ras^{V12} selecionasse sublinhagens HEK/Hras^{V12} com

variados níveis de expressão de [H-Ras^{V12}] e, portanto, diferentes respostas à FGF2: resposta mitogênica, citotóxica, ou ainda, nula.

Essa expectativa de resultados foi aparentemente bem atendida quando as sublinhagens HEK/Hras^{V12}-R1.6 e -R2 foram testadas para resposta a FGF2, tanto em monocamadas em substrato sólido (Fig. 4.6A), como em suspensão de agarose (Fig. 4.6B): em ambas as condições não houve efeito significativo de FGF2 sobre os crescimento das células.

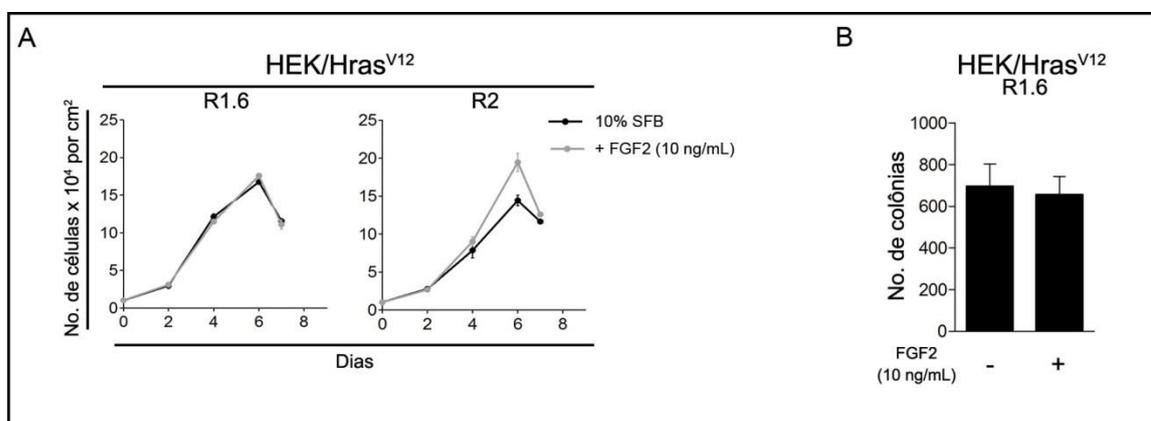


Figura 4.6 – Células HEK 293 que expressam constitutivamente o oncogene H-Ras^{V12} não são sensíveis à ação de FGF2. **A)** Curva de crescimento para sublinhagem HEK/Hras^{V12} em 10% SFB ± FGF2. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n=3) de apenas um ensaio, porém, representativas de testes em 8 sublinhagens diferentes. **B)** Ensaio de colônia em suspensão de agarose para sublinhagem HEK/Hras^{V12} em 10% SFB ± FGF2. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n=2) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes.

De acordo com a hipótese sugerida acima, duas forças positivamente seletivas predominaram no processo de seleção das sublinhagens HEK/Hras^{V12}: a) expressão em níveis adequados da proteína exógena que confere resistência à puomicina; e b) expressão suficiente de H-Ras^{V12} para garantir valores constitutivamente ótimos de [H-Ras^{V12}-GTP] para o crescimento celular. Por outro lado, esta hipótese também previa que este processo seletivo deveria ser neutro com respeito à resposta celular a FGF2. No entanto, não foram encontradas boas

respondedoras a FGF2 entre as sublinhagens clonais HEK/H-Ras^{V12} selecionadas, sugerindo que o processo seletivo não é neutro para resposta a FGF2.

Em decorrência desta última observação, aventamos uma hipótese alternativa: o processo seletivo poderia estar favorecendo a seleção de células produtoras e secretoras de FGF2 endógeno e, portanto, insensíveis a FGF2 exógeno.

Para testar esta hipótese alternativa, medimos a produção e secreção de FGF2 por western blot em, respectivamente, extrato proteico total e meio de cultura da parental HEK 293 e sublinhagens HEK/Hras^{V12}. A figura 4.7, de fato, mostra níveis significativamente altos de FGF2 nos extratos proteicos (Fig.4.7A) e nos meios de cultura (Fig. 4.7B) das células HEK/Hras^{V12}, mas não no extrato e meio de cultura das células parentais HEK 293.

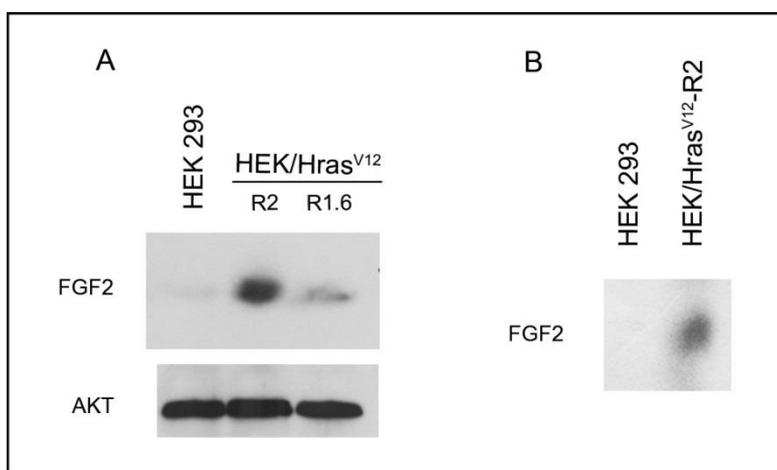


Figura 4.7 – Nas sublinhagens HEK/Hras^{V12} selecionadas, a expressão ectópica de H-Ras^{V12} é acompanhada da expressão e secreção de FGF2. A) Western blot para FGF2 a partir de extrato proteico total de HEK 293 e HEK/Hras^{V12}. **B)** Western blot para FGF2 a partir de sobrenadante de cultura de HEK 293 e HEK/Hras^{V12} policlonal.

Mais ainda, testes iniciais com a sublinhagem HEK/ER:Hras^{V12}-K demonstraram que a indução de ER:H-Ras^{V12} por 4OHT aumenta a expressão de mRNA para FGF2 (Figura 4.8).

Diante dos resultados documentados nas figuras 4.7 e 4.8, consideramos, então, que o fenômeno envolvido não é de seleção, mas sim de epistasia, isto é, o trans-oncogene H-Ras^{V12} induz o gene endógeno de FGF2.

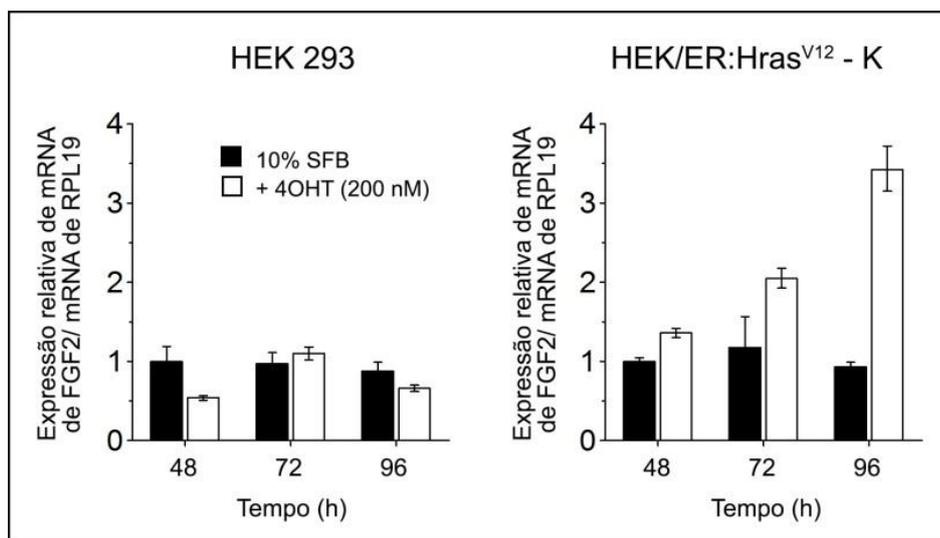


Figura 4.8 – Análise da expressão de mRNA de FGF2 em HEK 293 e HEK/ER:Hras^{V12}-K. PCR quantitativo para detectar a expressão relativa de mRNA de FGF2 na célula parental HEK 293 e na sublinhagem HEK/ER:HrasV12 tratadas com 4OHT por 48, 72 e 96 horas. Para normalização do ensaio, foi utilizada a expressão de mRNA de RPL19. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n=3) de apenas um ensaio.

4.2 - EFEITO DE PMA EM CÉLULAS HEK 293 TRANSFORMADAS PELA AÇÃO DO ONCOGENE H-RAS^{V12}

4.2.1 - PMA só é citotóxico às células HEK 293 transformadas pela ação do trans-oncogene ER-Hras^{V12}, em concentrações altas do indutor 4OHT.

Para avaliar os efeitos de PMA em células HEK 293 transformadas pela ação do oncogene H-Ras^{V12}, nós realizamos curvas de crescimento e ensaios de colônia em suspensão de agarose. Na figura 4.9A, observamos que PMA suavemente diminui a proliferação da linhagem parental HEK 293, mas, inibiu drasticamente a proliferação de células HEK/Hras^{V12}. Da mesma maneira, PMA restringiu a

proliferação das sublinhagens HEK/ER:H-ras^{V12} em presença de 4OHT. Porém, sem a ativação da expressão de ER:H-Ras^{V12}, esta sublinhagem comportou-se como a linhagem parental e PMA pouco interferiu em sua proliferação. Ensaios de suspensão de agarose mostraram que a expressão de H-Ras^{V12}, tanto constitutivamente, com induzida por 4OHT, tornou a linhagem HEK 293 capaz de desenvolver colônias em meio semi-sólido (figura 4.9B); contudo, o tratamento com PMA diminui drasticamente o número de colônias.

O efeito de FGF2 sobre as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}, conforme descrito nas seções anteriores de Resultados, mostrou uma dualidade dependente da relação entre os valores intracelulares de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] e [ER:H-Ras^{V12}]. Logo, tornou-se obrigatório analisar como varia o efeito tóxico de PMA sobre as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} em função dos valores de [4OHT] extracelulares. Para isso, realizamos ensaios de colônia em suspensão de agarose e curvas de crescimento com as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}, tratadas com diferentes concentrações de 4OHT. As curvas de crescimento da Fig. 4.10A são representativas de diversos experimentos que mostraram uma tendência nítida: à medida que aumentamos [ER:H-Ras^{V12}] induzida por concentrações crescentes de [4OHT], maior é a inibição causada por PMA na proliferação das células HEK/ER:Hras^{V12} (figura 4.10A).

Já os ensaios clonogênicos em suspensão de agarose demonstraram que, com [4OHT] = 25nM, as células desenvolveram colônias sem qualquer interferência de PMA (Figura 4.10B). A partir de [4OHT] = 50nM, PMA passa a ser tóxico, porém, a inibição no desenvolvimento de colônias torna-se ainda mais drástica, quando as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} são tratadas com [4OHT] = 200nM. Portanto, PMA, à semelhança de FGF2, evidenciou que células HEK/ER:Hras^{V12} se tornam muito vulneráveis se, concomitantemente, a razão [ER:HRas^{V12}-GTP] / [ER:HRas^{V12}] for baixa e a soma [ER:HRas^{V12}-GTP] + [ER:HRas^{V12}] for alta, como quando estas células são tratadas por [4OHT] = 200nM.

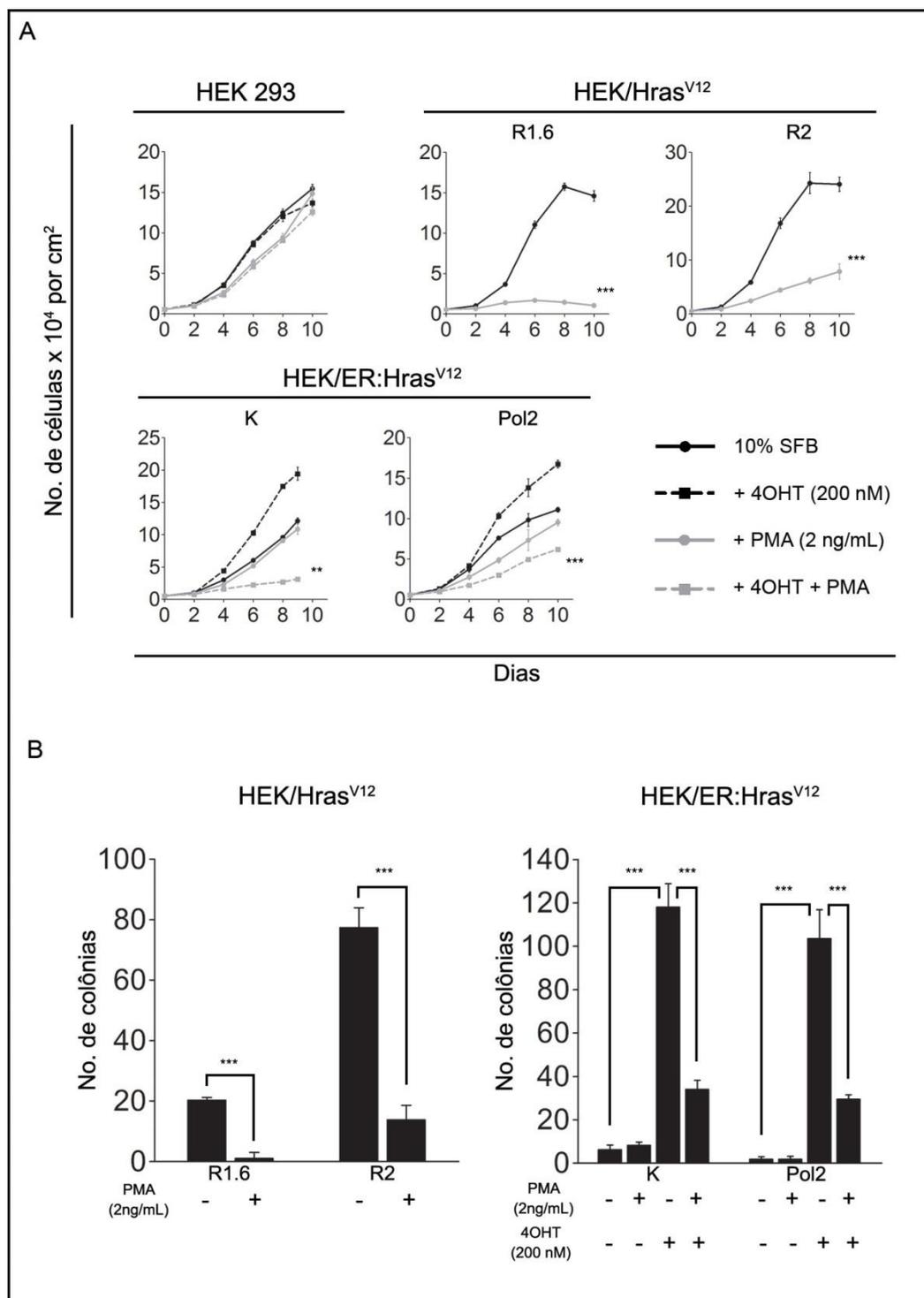


Figura 4.9 – PMA possui efeito citotóxico em células HEK 293 condicionalmente transformadas pela ação do oncogene $H\text{-ras}^{V12}$. **A)** Curvas de crescimento de HEK 293 e suas sublinhagens HEK/ $H\text{-ras}^{V12}$ e HEK/ER: $H\text{-ras}^{V12}$, sem tratamento (10% SFB) ou tratadas com PMA e/ou 4OHT. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=3$) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes (Two-way ANOVA, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). **B) Esquerda:** ensaio de colônia em suspensão de agarose para as sublinhagens HEK/ $H\text{-ras}^{V12}$, sem tratamento (10% SFB) ou tratadas com PMA e/ou 4OHT. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=4$) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes (Teste T de Student

T test, *** $p < 0,0001$). **Direita:** ensaio de colônia em suspensão de agarose para as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}, sem tratamento (10% SFB) ou tratadas com PMA e/ou 4OHT. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=4) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes (One-way ANOVA com pós teste de Bonferroni, *** $p < 0,0001$).

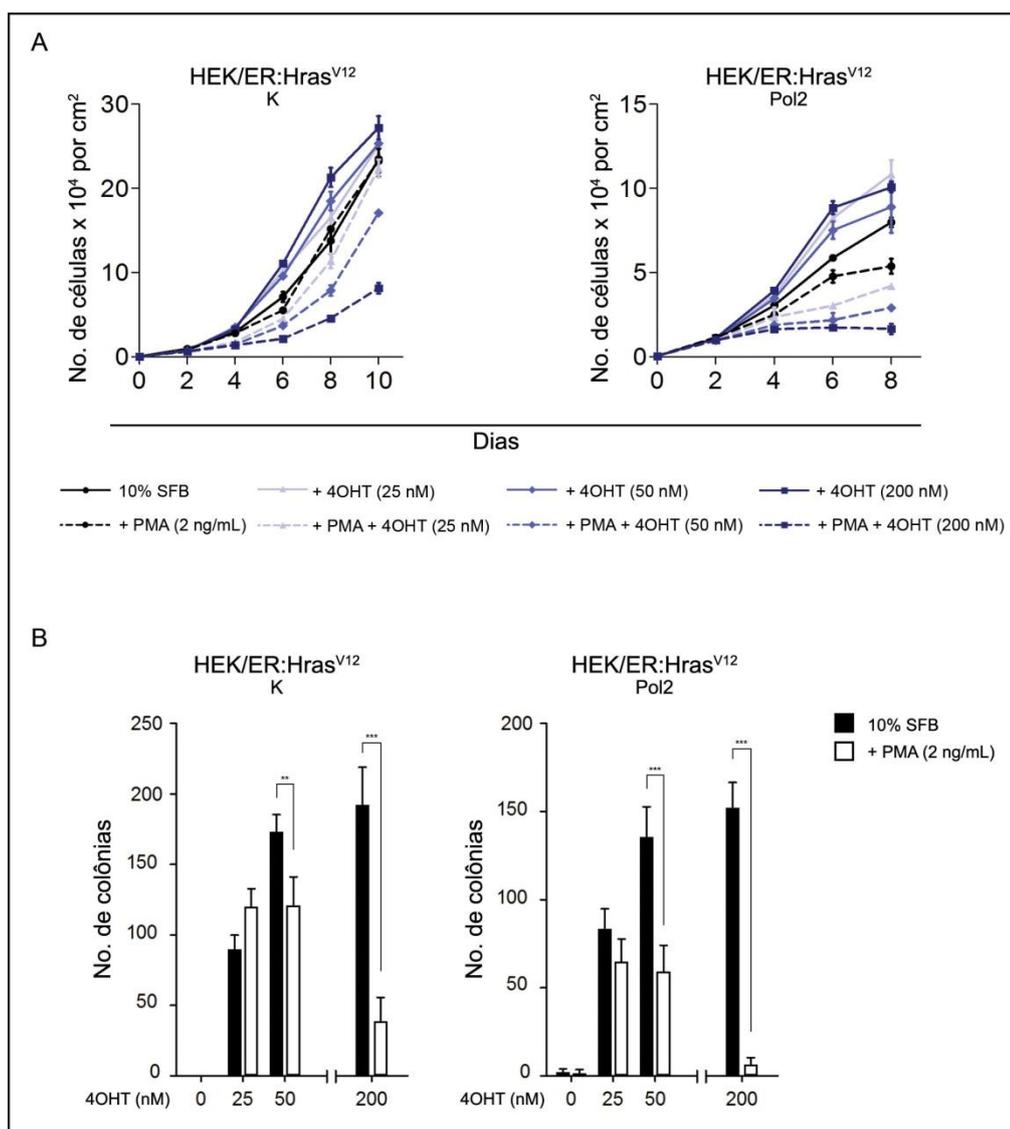


Figura 4.10 – O efeito citotóxico de PMA é dependente dos níveis de expressão de H:Ras^{V12} em células HEK 293. A) Curvas de crescimento com as sublinhagens de HEK/ER:Hras^{V12} tratadas com 0, 25, 50 e 200 nM de 4OHT, com ou sem a adição de PMA. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n=3) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes. **B)** Ensaio de colônia em suspensão de agarose com as sublinhagens de HEK/ER:Hras^{V12} tratadas com 0, 25, 50 e 200 nM de 4OHT, com ou sem a adição de PMA. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n = 4) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes (Teste T de Student, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$).

4.2.2 – Toxidez de PMA é mediada por ativação de PKC

A determinação de curvas dose-resposta para o efeito tóxico de PMA afasta ou sugere indicações de que a ativação de PKCs pode ser o alvo desta ação tóxica de PMA. Por esse motivo, realizamos medidas de proliferação com 0, 1, 2, 5 e 10 ng/mL de PMA no meio de cultura das células parentais HEK 293 e das sublinhagens HEK/Hras^{V12}, contando o número total de células no quinto dia de tratamento. Pudemos constatar que, tanto a linhagem parental HEK 293, como as sublinhagens HEK/Hras^{V12} são passíveis de inibição por PMA (Fig. 4.11), sendo as células parentais, claramente, as menos sensíveis. Enquanto as células HEK 293 apresentaram cerca de 30% de inibição celular, as sublinhagens HEK/Hras^{V12}-R2 e -R1.6 apresentaram, respectivamente, 60% e 50% de inibição (Figura 4.11B).

Nos experimentos da Fig. 4.11, a série de concentrações de PMA não foi a mais favorável para gerar curvas que permitissem estimar constantes de inibição com boa precisão. Não obstante, as curvas sugerem tendência de saturação e convergência para um mesmo valor de constante de inibição da ordem de 1 ng/mL de PMA. Este valor muito aproximado da constante de inibição é compatível com os valores bem conhecidos da ativação de PKCs por PMA.

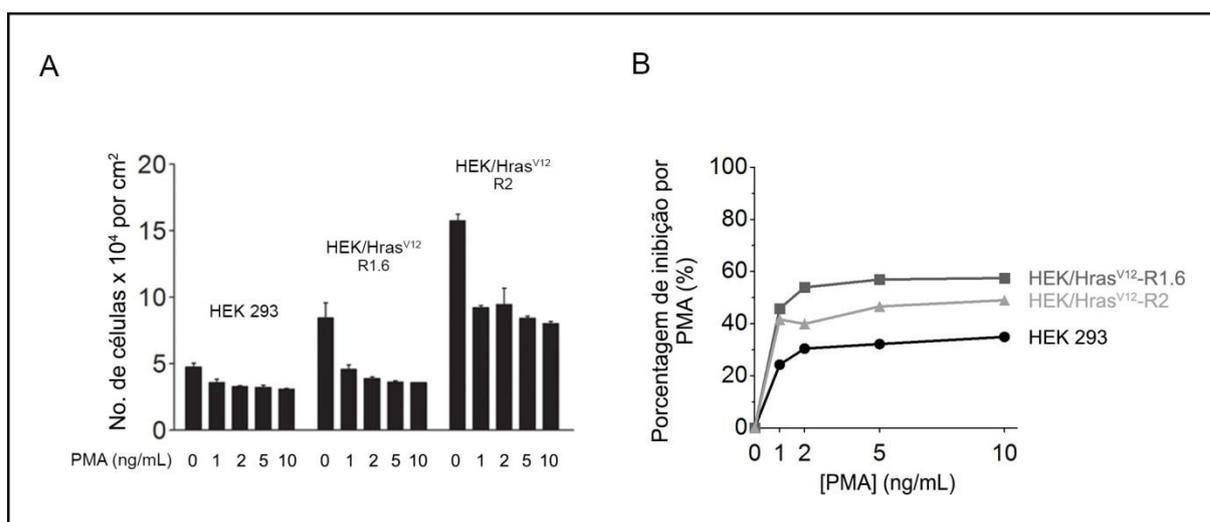


Figura 4.11 – Curva de dose-resposta para PMA. Quinto dia de curvas de crescimento das células HEK 293 e HEK/Hras^{V12} tratadas com 0, 1, 2, 5 e 10 ng/mL de PMA. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=3) de apenas um ensaio.

A fim de se testar de maneira mais direta a hipótese de que ativação de PKCs é o meio pelo qual PMA exerce seu efeito tóxico, medimos a proliferação celular das células HEK 293 e HEK/Hras^{V12} submetidas a PMA, juntamente com dois inibidores químicos diferentes de PKC: Gö 6983 e Bisindolilmaleimida I (Bis I). Primeiramente, estes inibidores foram testados para verificar se seriam capazes de inibir a fosforilação de ERK1/2 (P-ERK1/2) por PMA, que sabidamente é mediada por ativação de PKCs. A análise de western blot mostrou que 1 μ M de cada um desses inibidores foi suficiente para diminuir [P-ERK1/2] a níveis negligenciáveis, tanto em células HEK293 como em HEK/Hras^{V12} (figura 4.12A). Posteriormente, estas células foram plaqueadas com PMA, na ausência e na presença de 1 μ M de Gö 6983 ou Bis I. No quarto dia de tratamento, as células foram tripsinizadas, fixadas e contadas. A figura 4.12B mostra que PMA inibiu a proliferação celular, como já relatado anteriormente, das células parentais HEK293 e mais drasticamente ainda, das sublinhagens HEK/Hras^{V12} (Figura 4.9A). Porém, a adição dos inibidores Gö 6983 ou Bis I eliminou completamente este efeito tóxico de PMA. Além disso, os efeitos deletérios de PMA morfologicamente detectáveis nas células HEK 293 e HEK/Hras^{V12}, também foram suprimidos por Gö 6983 ou Bis I (figura 4.12C).

Atentando para o fato de que (a) PMA é capaz de ativar somente as isoformas clássicas e novas de PKC e que (b) ambos os inibidores de PKC usados protegeram completamente as sublinhagens de HEK/Hras^{V12} do efeito citotóxico de PMA; nós identificamos as isoformas de PKC responsivas a PMA e que são alvos de ambos inibidores (tabela 4.3): PKCs α , β , γ e δ . Dentre estas, PKC δ é a isoforma que, na literatura especializada, mais se encontra envolvida em processos de estresse e de morte celular. Durante apoptose, PKC δ sofre clivagem proteolítica, resultando em um fragmento catalítico constitutivamente ativo, cuja translocação para o núcleo e/ou mitocôndria amplifica a cascata apoptótica.

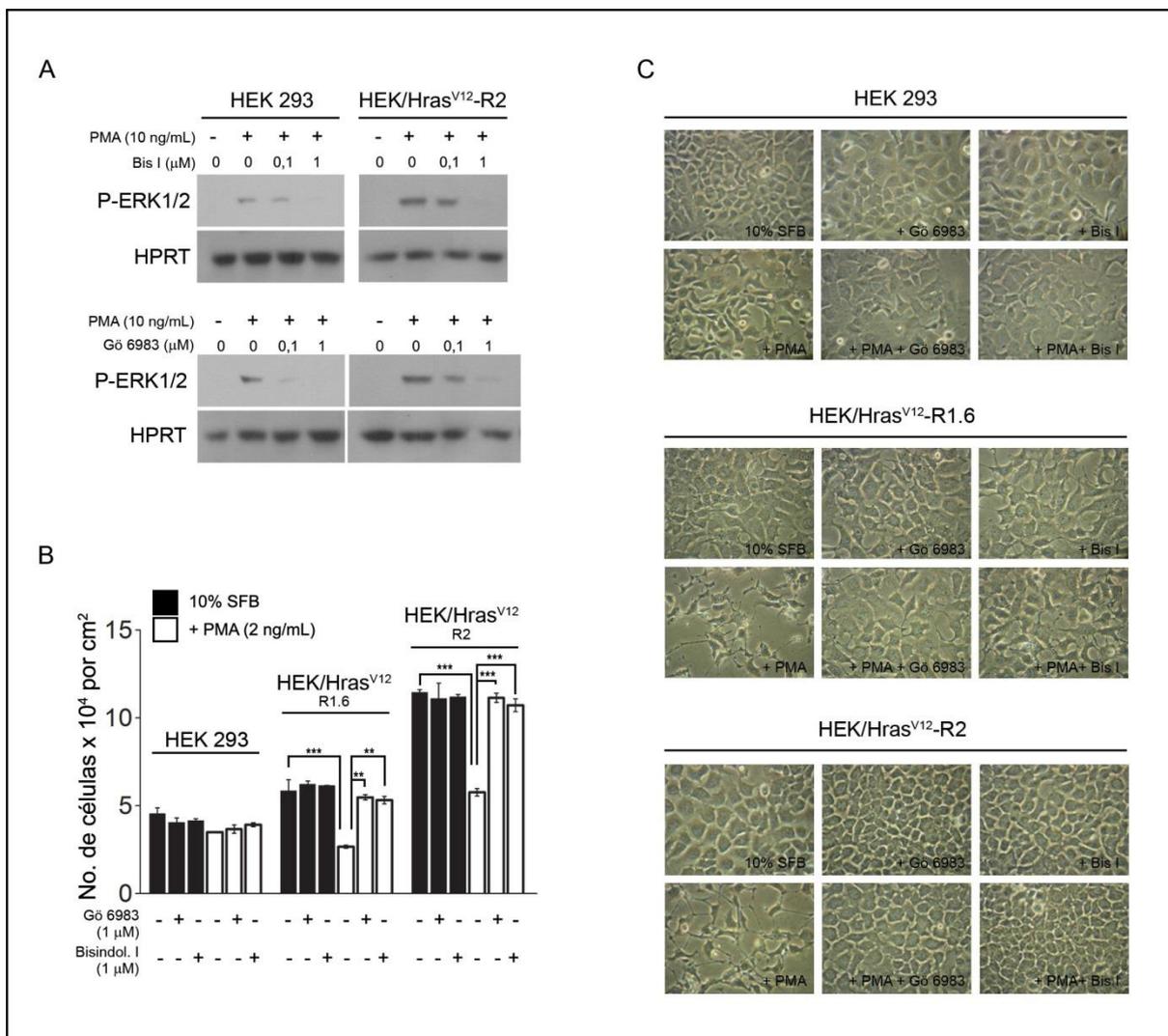


Figure 4.12 – O efeito tóxico de PMA é dependente da ativação de PKC. A) Western blots para ERK1/2 fosforilado após 15 minutos de tratamento com PMA e com diferentes concentrações dos inibidores de PKC Gö 6983 e Bis I. Os inibidores foram adicionados 1 hora antes da adição de PMA. **B)** Quarto dia de curva de crescimento das células HEK 293 e HEK/Hras^{V12} tratadas com PMA, na presença e ausências dos inibidores químicos de PKC (Gö 6983 e Bis I). Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($n=2$) de apenas um ensaio, representativo de dois experimentos independentes (One-way ANOVA com o pós teste de Bonferroni, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **C)** Micrografias mostrando a morfologias das células HEK 293 e HEK/Hras^{V12} tratadas com PMA, na presença e ausências dos inibidores químicos de PKC (Gö 6983 e Bis I).

Tabela 4.1 - Isoformas da Proteína Quinase C (PKC)

PMA	cPKCs	●	α	●	●	βI	●	●	βII	●	●	γ	●
	nPKCs	●	δ	●	●	ε	●	●	η	●	●	θ	●
	aPKCs	●	ζ	●	●	ι	●	●		●	●		●

● Gö 6983
● Bisindolilmaleimida I

Tendo em conta estas informações da literatura, procuramos verificar, através de western blot, se ocorre a clivagem de PKC δ após tratamento de células HEK/Hras^{V12} com PMA. Na figura 4.13, podemos observar que, em células HEK/Hras^{V12}, o fragmento catalítico de PKC δ (FC-PKC δ) correlaciona com a expressão ectópica de H-Ras^{V12}, independentemente de PMA. Por outro lado, o tratamento sustentado de PMA por 24, 48 e 72h provocou, tardiamente, um modesto aumento nos níveis de FC-PKC δ . Estes resultados implicam a PKC δ em efeitos tóxicos tardios de PMA em células HEK/Hras^{V12}.

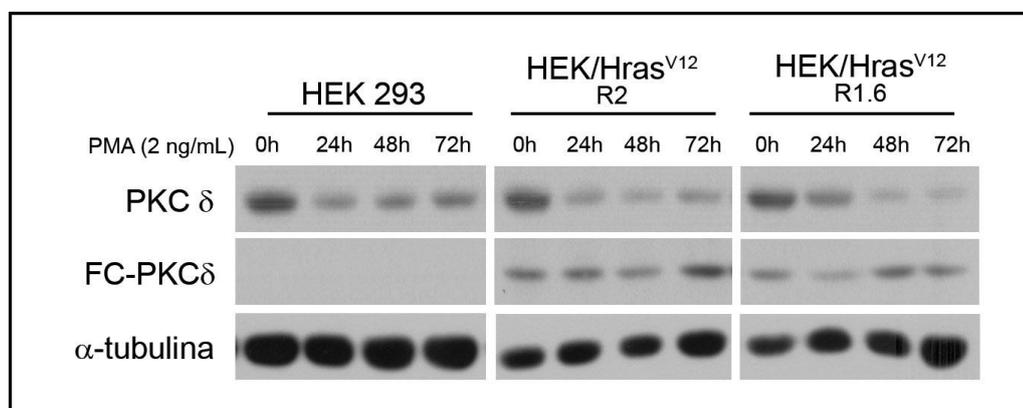


Figura 4.13 – Tratamento com PMA eleva os níveis do fragmento catalítico de PKC δ em HEK/Hras^{V12}. Western blot para a proteína PKC δ com as células HEK 293 e HEK/Hras^{V12}, após 24, 48 e 72h de tratamento com PMA.

4.2.3 - PMA agrava diversos indicadores de estresse em células transformadas HEK/Hras^{V12} levando tardiamente a morte celular.

Múltiplos indicadores de estresse que já aparecem cronicamente na linhagem parental HEK293 são acentuados com a expressão ectópica de H-Ras^{V12} em células transformadas HEK/Hras^{V12} e, muito mais agravados, com tratamentos sustentados de PMA. Entre estes indicadores de estresse cabe destacar: a) níveis elevadamente ativados de p38-MAPK (Fig. 4.14); b) lesões de DNA com quebras da dupla hélice indicadas por fosforilação da classe de histonas gama-H2AX e também expressão de p21 que participa do bloqueio do ciclo celular (Fig. 4.15); c) estresse oxidativo indicado por aumento nos níveis de ROS (Fig. 4.16).

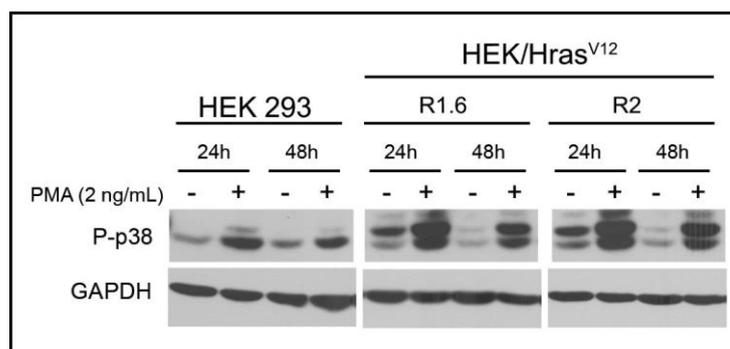


Figura 4.14 – Tratamento com PMA eleva drasticamente os níveis de P-p38 em HEK/Hras^{V12}. Western blot para a proteína p38 fosforilada com as células HEK 293 e HEK/Hras^{V12}, após 24 e 48 h de tratamento com PMA.

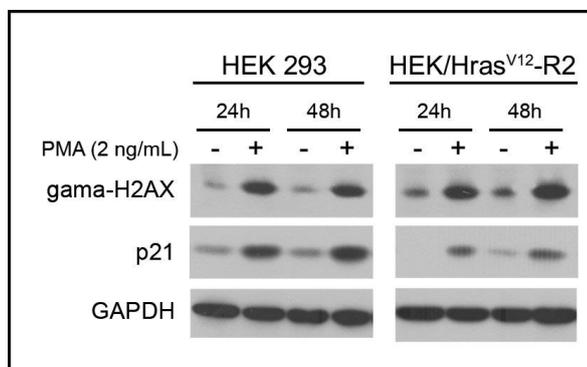


Figura 4.15 – Tratamento com PMA eleva os níveis de gama-H2AX e p21 em HEK 293 e HEK^{HrasV12}. Western blot para as proteínas gama-H2AX e p21 com as células HEK 293 e HEK/Hras^{V12}-R2, após 24 e 48 h de tratamento com PMA.

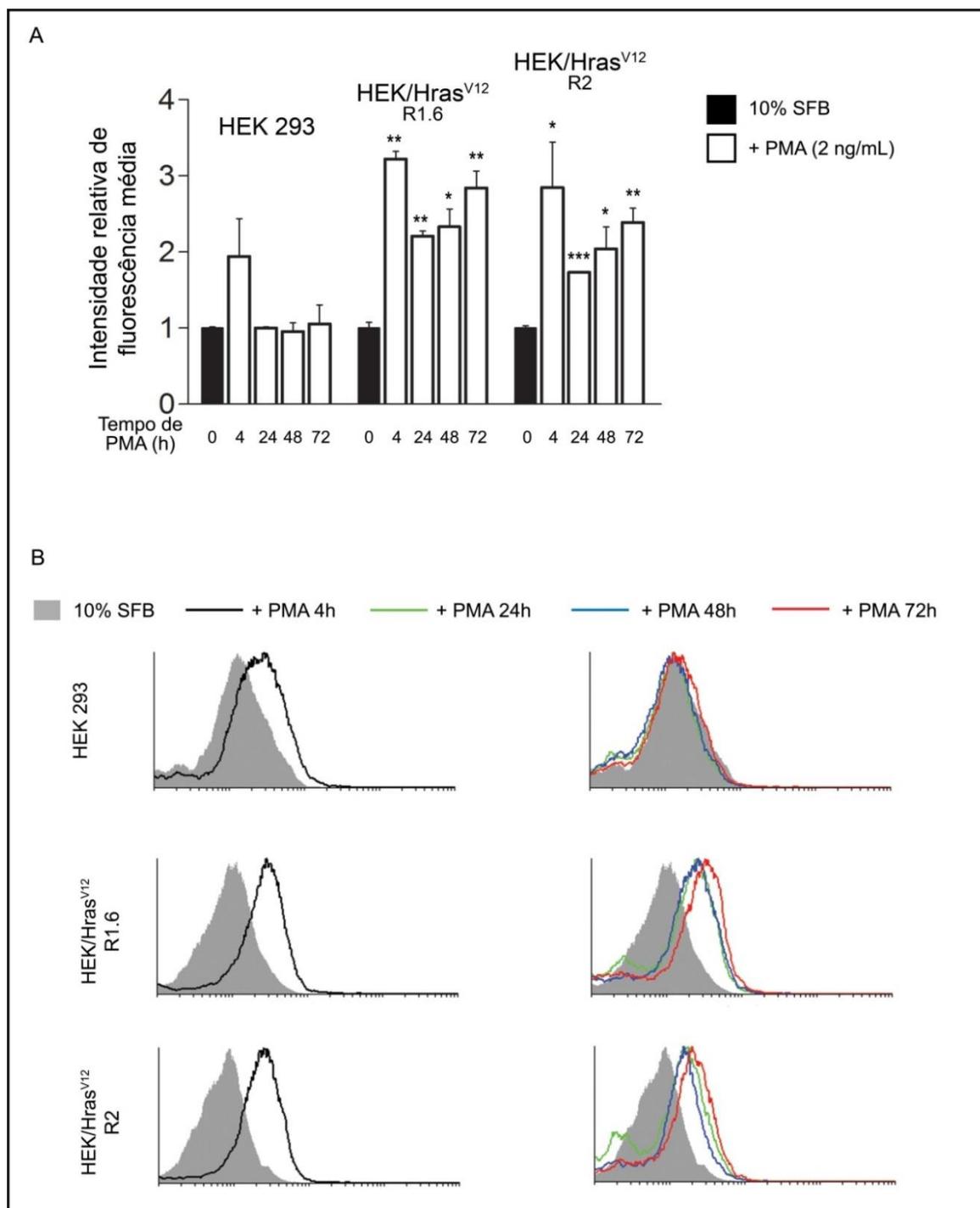


Figura 4.16 – Longa exposição ao PMA causa aumento nos níveis de ROS em células HEK/Hras^{V12}. **A)** As células HEK 293 e HEK/Hras^{V12} foram tratadas com PMA durante os tempos indicados. Após adição de Carboxi-H2DCFDA por 30 minutos, as mesmas foram tripsinizadas e analisadas por FACS quanto à imunofluorescência média de Carboxi-DCF. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=2) de apenas um ensaio, representativo de três experimentos independentes (Teste T de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). **B)** Sobreposição dos histogramas para Carboxi-DCF, comparando o perfil de imunofluorescência da linhagem HEK 293 e sublinhagens HEK/Hras^{V12} sem tratamento (cinza) e tratadas com PMA por 4h (preto), 24h (verde), 48h (azul) e 72h (vermelho).

Todas essas evidências de agravamento dos níveis de indicadores de estresse sugeriram que PMA pode estar finalmente contribuindo para morte celular das células HEK293 transformadas pelo oncogene H-ras^{V12}. Para verificar se PMA pode estar causando morte celular, fomos analisar degradação de DNA por citometria de fluxo. A linhagem HEK 293 e as sublinhagens HEK/Hras^{V12} e HEK/ER:Hras^{V12} foram plaqueadas e, no dia seguinte, foi adicionado PMA num tratamento sustentado por 24, 48 ou 72h durante o qual o meio de cultura foi renovado todos os dias. Como evidenciado na figura 4.17, a porcentagem de células HEK 293 que apresentam degradação de DNA permanece em níveis negligenciáveis, mesmo depois de 72 horas de tratamento com PMA. No entanto, o PMA aumentou progressivamente a população de resíduos celulares de HEK/Hras^{V12} com conteúdo de DNA menor que G0/G1. A ativação de H-Ras^{V12} (adição de 4OHT) em células HEK/ER:Hras^{V12} não alterou o quantidade de células com conteúdo de DNA sub G1. Por sua vez, o tratamento conjunto de 4OHT e PMA aumentou severamente a porcentagem de células com degradação de DNA. Com estas evidências experimentais, podemos concluir que, PMA causa tardiamente morte célula em HEK 293 expressando ectopicamente a oncoproteína H-Ras^{V12}, mas não em suas correspondentes parentais não transformadas (Fig. 4.17).

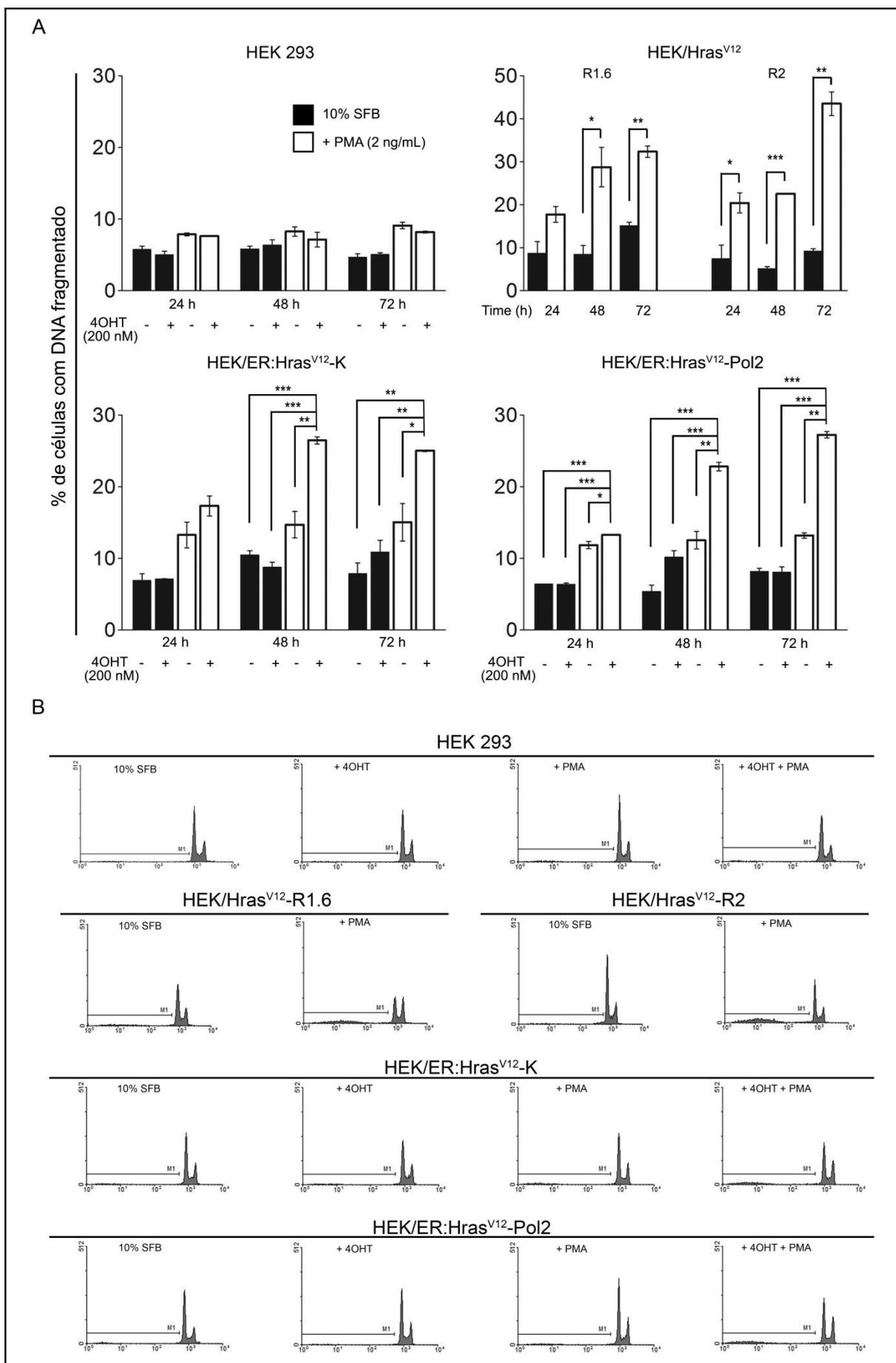


Figura 4.17 – Adição de PMA aumenta a porcentagem de células HEK/Hras^{V12} e 4OHT-HEK/ER:Hras^{V12} com DNA fragmentado. A) A linhagem HEK 293 e as sublinhagens HEK/Hras^{V12} e HEK/ER:Hras^{V12} foram plaqueadas e, no dia seguinte, foram adicionados os tratamentos apontados. Nos tempos determinados, as células foram fixadas, marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (n=2) de apenas um ensaio, representativo de três experimentos independentes (One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001). **B)** Histogramas representativos do ponto de 72 h.

5 DISCUSSÃO

O crescimento e a proliferação de uma célula normal são modulados por uma complexa rede de sinalização, que percebe e interpreta sinais externos, transformando-os em uma resposta celular adequada. No câncer, a resposta celular à rede de sinalização externa encontra-se desregulada, permitindo descontrole da proliferação e da sobrevivência celular. Cerca de 20% dos cânceres em humanos contêm mutação em ras, para os quais ainda não há terapia eficaz, evidenciando a necessidade de se estudar novos alvos terapêuticos.

Nosso laboratório deu um passo nesta direção quando publicou que FGF2 causa um atraso em S e um bloqueio irreversível em G2/M em células Y1 de camundongo, cujo fenótipo maligno é dependente de uma amplificação no gene K-ras (Costa et al., 2008). Além disso, esta mesma linhagem apresentou suscetibilidade aos efeitos tóxicos de PMA (Forti and Armelin, 2011; Matos, 2007). No entanto, permaneceu a necessidade de verificar se os efeitos citotóxicos de FGF2 e PMA também se estendem a linhagens celulares humanas experimentalmente malignizadas pelo oncogene ras.

5.1 – A RESISTÊNCIA A FGF2 EM SUBLINHAGENS HEK/HRAS^{V12} PODE SER DEVIDO À TRANS-ATIVAÇÃO DO GENE DE FGF2 POR H-RAS^{V12}

Para realizar esta tese, foi adotado um modelo experimental, no qual, a linhagem imortalizada, não tumorigênica, HEK 293, foi transduzida com os vetores retrovirais pBabeNeo ou pBabepuro, contendo, respectivamente, a construção quimérica ER:H-ras^{V12} ou o oncogene H-ras^{V12}. Tanto os genes de seleção a antibiótico (geneticina para pBabeneo e puromicina para pBabepuro) quanto os genes de interesse estão sob o controle do promotor de SV40 (Figura 3.1). Este promotor é rico em motivos GC, portanto, é alvo do fator de transcrição SP1 (Specificity Protein 1), que é ubiquamente expresso em células de mamíferos. Deste modo, as proteínas ER:H-Ras^{V12} e H-Ras^{V12} são constitutivamente expressas.

Apesar da proteína ER:H-Ras^{V12} estar em constante expressão, postula-se que, assim como ocorre com os receptores de estrógeno, o domínio HBD da porção ER encontra-se associado a heterocomplexos inibitórios, compostos principalmente por chaperonas, como a Hsp90 (Figura 3.3). Deste modo, na ausência do ligante, a proteína de fusão ER:H-Ras^{V12} encontra-se bloqueada e instável. A ligação do ligante (4OHT) libera ER:H-Ras^{V12} de seu complexo de inibição e estabiliza a proteína. Portanto, no processo de obtenção de sublinhagens transduzidas com pBabeneo.ER:Hras^{V12}, as células tiveram que se sobrepôr apenas à pressão seletiva provocada pela presença do antibiótico. Por outro lado, as sublinhagens HEK/Hras^{V12} foram submetidas a duas diferentes forças seletivas: expressão de níveis adequados do gene de resistência a puromicina e de níveis ótimos de [H-Ras-GTP], que favoreçam o crescimento das células.

Embora a pressão seletiva exercida por H-Ras^{V12} em HEK/Hras^{V12} selecione sublinhagens com características completamente distintas daquelas encontradas nas sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}, não esperávamos que o processo de seleção interferisse no fenótipo “sensibilidade a FGF2”. No entanto, resultados presentes nesta tese mostraram que: (a) FGF2 causa um efeito dual em células HEK 293 condicionalmente malignizadas pela ação do oncogene H-ras^{V12}: na ausência ou em baixos níveis de [ER:H-Ras^{V12}-GTP], FGF2 atua como um clássico fator mitogênico e estimula o crescimento em suspensão dessas células. Porém, quando HEK 293 expressa elevados níveis de [ER:H-Ras^{V12}-GTP], FGF2 torna-se citotóxico; (b) FGF2 exógeno é neutro em sublinhagens HEK 293 malignizadas pela expressão constitutiva de H-Ras^{V12}.

Uma vez conhecido que a ativação de Ras oncogênico resulta na expressão de diversos fatores de transcrição, como, SP1, SP2, AP2 e ETS, e que estes irão aumentar a transcrição de diversos fatores de crescimento e angiogênicos, incluindo, FGF2 (Pylayeva-Gupta et al., 2011); nós verificamos se o aumento da expressão de H-Ras^{V12} estaria ocasionando a trans-ativação do gene de FGF2.

De fato, resultados iniciais descritos aqui nesta tese mostraram que a expressão de H-Ras^{V12} seleciona células com maior expressão e secreção de FGF2 (Figura 4.7). A indução de ER:H-Ras^{V12} por 4OHT também resultou em um aumento dos níveis de mRNA de FGF2 na sublinhagem HEK/ER:Hras^{V12}. Conforme descrito

na figura 4.8, este aumento foi dependente de níveis sustentados de 4OHT por, no mínimo, 72h. Ainda não sabemos como se comporta os níveis proteicos e a secreção de FGF2 nas sublinhagens induzíveis, bem como, um maior número de sublinhagens HEK/Hras^{V12} necessitam ser testadas. No entanto, juntos, os resultados das figuras 4.7 e 4.8 mostram que a expressão de H-Ras^{V12} em células HEK 293 aumenta os níveis de produção e secreção de FGF2. Deste modo, somente células resistentes a FGF2 iriam sobreviver e proliferar (Figura 5.1).

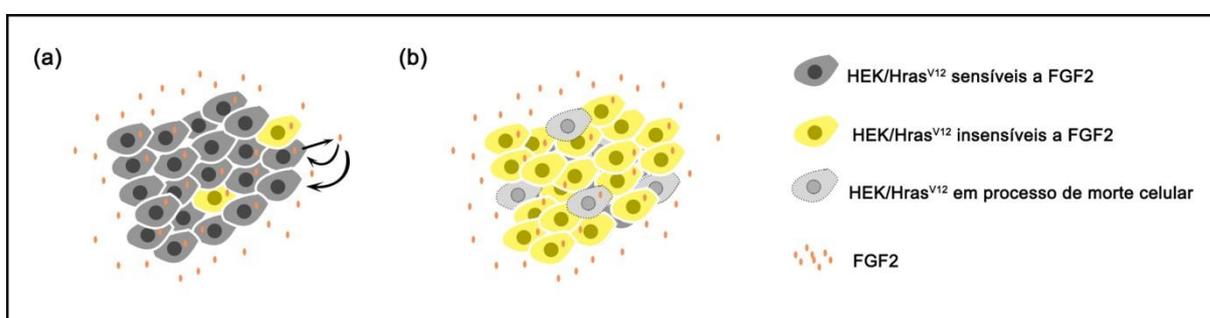


Figura 5.1 – Hipótese para o mecanismo de resistência a FGF2 durante a seleção de sublinhagens HEK/Hras^{V12}. Em uma população de células HEK293, inicialmente transduzidas com pBabepuro.Hras^{V12}, haverá uma maior quantidade de células sensíveis a FGF2. No entanto, a expressão prolongada do oncogene H-ras^{V12} em células HEK 293 ocasiona a trans-ativação do gene de FGF2, aumentando os níveis proteicos e secretados deste fator de crescimento. O FGF2 secretado terá ação autócrina e parácrina **(a)**. Somente as células resistentes a FGF2, ou que, eram sensíveis, mas, desenvolveram mecanismos defensivos contra os efeitos citotóxicos de FGF2, irão perpetuar. As células que permaneceram sensíveis irão, ocasionalmente, senescer ou morrer **(b)**.

5.2 – [ER:H-Ras^{V12}] x [ER:H-Ras^{V12}-GTP] EM SUBLINHAGENS HEK/ER:HRAS^{V12} TRATADAS COM DIFERENTES DOSES DE [4OHT]

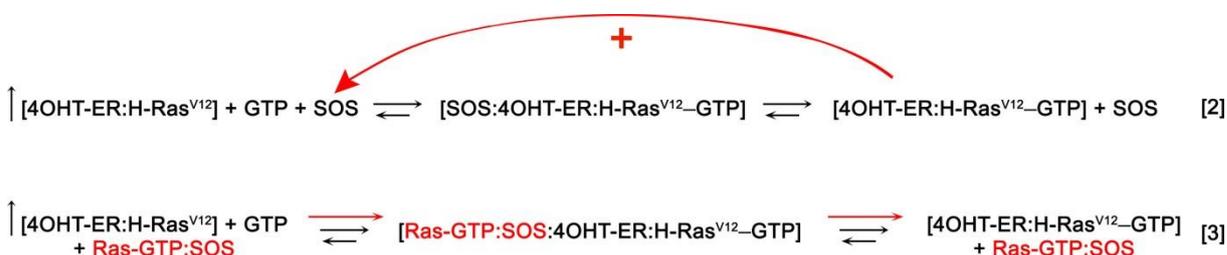
Na figura 4.2, mostramos as medidas experimentais das concentrações de ER:H-Ras^{V12} total e ligado a GTP, em função da concentração de 4OHT. A curva de [ER:H-Ras^{V12}], que foi extensivamente explorada em duas sublinhagens diferentes (Figuras 4.2A, a esquerda, e 4.2B), demonstrou ser uma hipérbole clássica, com indicações claras de saturação a partir de 200 nM de 4OHT. Este resultado já era esperado, uma vez que se trata de uma reação ligante-receptor, no qual, o aumento

da concentração do ligante (4OHT) desloca o equilíbrio da ligação no sentido de formação do complexo 4OHT-ER:H-Ras^{V12}, conforme a equação abaixo [1]:



A partir da curva $[\text{ER:H-Ras}^{\text{V12}}] \times [4\text{OHT}]$, é possível estimar uma constante de associação (K_a) de 50-60 nM, a qual, corresponde à concentração de 4OHT em que 50% de ER:H-Ras^{V12} encontra-se na forma complexada ao ligante (4OHT-ER:H-Ras^{V12}) (Figura 5.2A).

No entanto, ao avaliar a $[\text{ER:H-Ras}^{\text{V12}}\text{-GTP}]$ em relação a $[4\text{OHT}]$, o gráfico resultante foi uma curva sigmoide, com tendência à saturação em concentrações a partir de 20 nM de 4OHT (Figura 4.2A, a direita). Este resultado não foi uma surpresa, visto que, a ativação de Ras é um processo muito mais complexo que a simples associação entre ligante-receptor (seção 1.4): inicialmente, o aumento de $[4\text{OHT}]$ resulta em um aumento da proteína de fusão em seu estado estável, deslocando o equilíbrio da reação no sentido de formação de 4OHT-ER:H-Ras^{V12}-GTP. No entanto, o próprio produto da reação exerce um efeito alostérico positivo sobre a enzima SOS (Equação [2]), cuja atividade catalítica sofre um incremento de até 500 vezes, quando Ras-GTP está ligado ao seu sítio alostérico (seção 1.4). Este processo acelera a ativação de 4OHT-ER:H-Ras^{V12}, o que resultaria em uma curva sigmoide de $[\text{ER:H-Ras}^{\text{V12}}\text{-GTP}] \times [4\text{OHT}]$ (Equação [3]).



A partir desta curva, também é possível estimar uma constante de equilíbrio (K_e) de 10-20 nM, no qual, 50% de 4OHT-ER:H-Ras^{V12} encontra-se na forma ativa, ou seja, ligado a GTP (Figura 5.2B).

Ao analisarmos os valores de K_a (50-60 nM) e K_e (20 nM) para as curvas de ER:H-Ras^{V12} e ER:H-Ras^{V12}-GTP, respectivamente, podemos inferir que o aumento de 4OHT eleva os níveis de [ER:H-Ras^{V12}] estável e disponível para ativação por SOS. Não obstante, a ativação de ER:H-Ras^{V12} para ER:H-Ras^{V12}-GTP não acompanha o aumento de [ER:H-Ras^{V12}]. Isto implica que, em altas concentrações de 4OHT, como em 200 nM, há uma quantidade ótima de [ER:H-Ras^{V12}-GTP], que favorece a proliferação celular e o desenvolvimento de colônias em substrato semi-sólido (Figuras 4.4 e 4.9), no entanto, ainda há um excesso de [ER:H-Ras^{V12}] estável e disponível para ativação.

Ao considerar a variável dependente “desenvolvimento de colônias” por [4OHT] na figura 4.5, é possível estimar uma DE_{50} de 4OHT 25 nM, o qual, representa a dose efetiva do indutor que provoca o aumento de 50% na quantidade de colônias que se desenvolveram por placa (Figura 5.2C). Este valor de DE_{50} aproxima-se bem da curva de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] em função de [4OHT] da Fig. 5.2B, indicando que o crescimento de colônias depende dos níveis intracelulares de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] e não de [ER:H-Ras^{V12}]. Estes resultados eram esperados, pois, sabe-se há décadas que a oncoproteína Ras mutada é oncogênica, logo, não deve ser surpresa que a expressão ectópica de ER:H-Ras^{V12}, induzida por 4OHT, promova o crescimento de colônias de HEK293 em suspensão em função da concentração de sua forma ativada [ER:HRas^{V12}-GTP].

5.3 – EFEITO DUAL DE FGF2 NA SUBLINHAGEM HEK/ER:H-RAS^{V12} PODE SER EXPLICADO PELA ATIVAÇÃO DE SOS POR FGF2

Os resultados mostrados na figura 4.5 evidenciaram que o tratamento conjunto de FGF2 + 4OHT 25 nM resultou em um efeito somatório da atividade mitogênica do FGF2 com a ação oncogênica da ativação de ER:H-Ras^{V12}. No entanto, na presença de 200 nM 4OHT, FGF2 atuou como um agente citotóxico, inibindo o desenvolvimento de colônias.

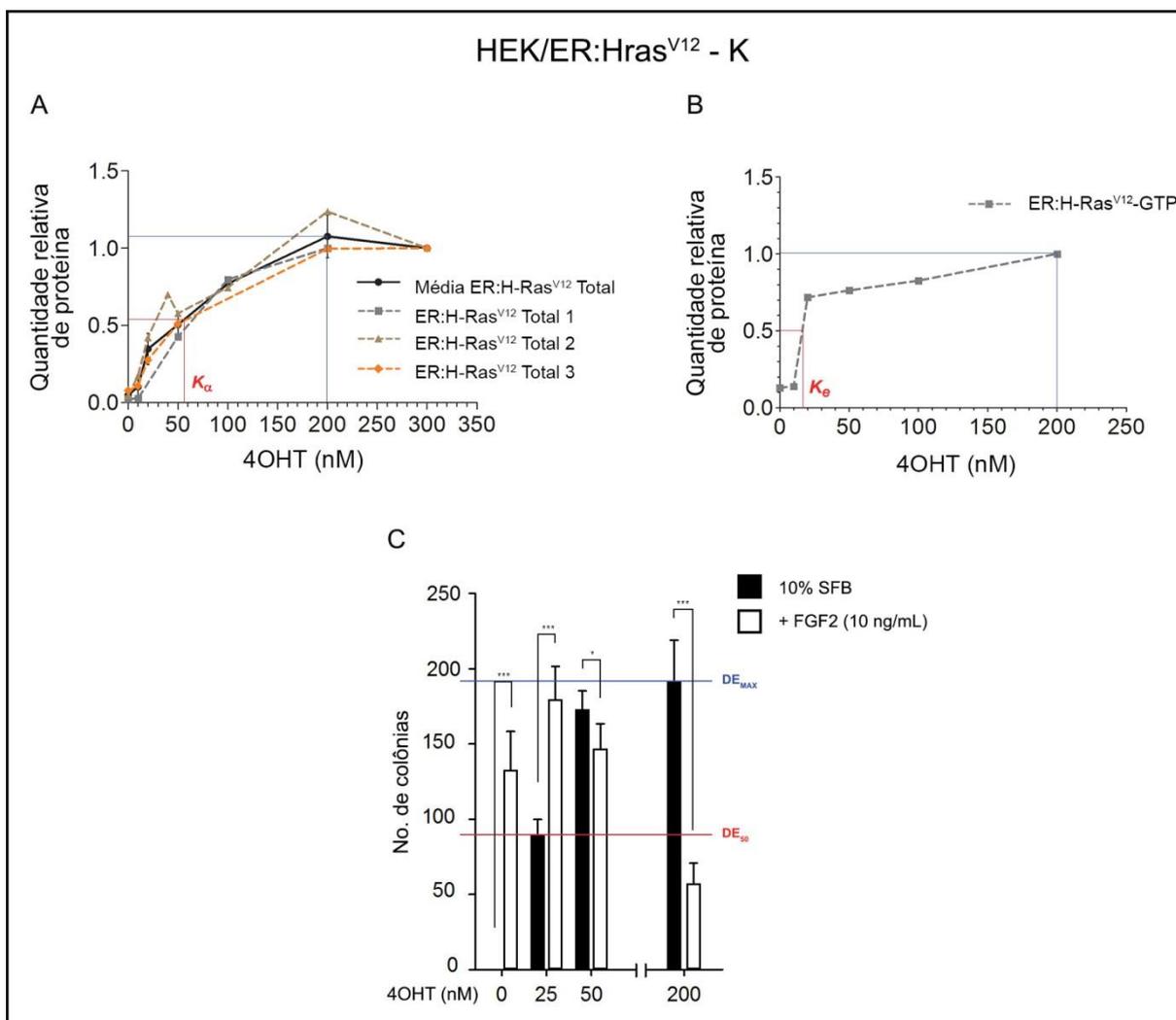


Figura 5.2 – Estimativa da constante de associação (K_a) ou de equilíbrio (K_e) para as curvas [ER:H-Ras^{V12}] x [4OHT] (Fig. 4.2A, a esquerda) (A) ou [ER:H-Ras^{V12}-GTP] x [4OHT] (Fig. 4.2A, a direita) (B), respectivamente. C) Estimativa da dose efetiva (DE_{50}) para a variável “número de colônias” pela [4OHT] (Fig. 4.5).

Conforme discutido na seção 5.2, a 200 nM de 4OHT, as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} possuem níveis ótimos de [ER:HRas^{V12}-GTP], que favorecem a proliferação dessas células. No entanto, ainda há um excesso de [ER:HRas^{V12}] estável, disponível para ativação. Além disso, FGF2 é um fator de crescimento, cuja ação ocorre através da ativação de receptores tirosina quinase (RTKs) transmembranares. Uma vez ativos, os receptores de FGF2 recrutam a proteína adaptadora Grb2, que por sua vez, recrutam e ativam a proteína SOS.

Diante destes fatos, elaboramos a seguinte hipótese para explicar o efeito dual de FGF2 (Fig. 5.3): (a) em meio 10%SFB-DME, as sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} se encontram com um nível basal de SOS ativo e grande parte da proteína de fusão ER:H-Ras^{V12} sintetizada permanece bloqueada e instável, e é preferencialmente degradada. (b) A adição de 200 nM 4OHT estabiliza a proteína ER:H-Ras^{V12} que fica disponível para ativação, deslocando o equilíbrio da reação no sentido de formação de ER:H-Ras^{V12}-GTP (Equação [2]). O aumento dos níveis de ER:H-Ras^{V12}-GTP favorecem a ativação alostérica de SOS, que, sofre apenas um aumento em sua atividade catalítica, sem interferir nos níveis basais de SOS ativos (Equação [3]). Esta condição favorece um incremento nos níveis de ER:H-Ras^{V12}-GTP a concentrações ótimas, as quais conferem vantagem proliferativa às sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}. (c) Quando à situação descrita em (b), adiciona-se FGF2, há a ativação dos FGFRs, que sofrem fosforilação cruzada em sua porção citoplasmática. A proteína adaptadora Grb2 liga-se a esses domínios tirosina quinase fosforilados de FGFR e recruta SOS para a membrana. Com o aumento expressivo dos níveis de SOS ancorados a membrana, somado à presença de níveis significativos de seu ativador alostérico (ER:H-Ras^{V12}-GTP), FGF2 promove um aumento de ER:H-Ras^{V12}-GTP a níveis estressantes, causando citotoxicidade nas sublinhagens 200nM4OHT- HEK/ER:Hras^{V12}.

Para a validação desta hipótese, faz-se necessária a medição das concentrações intracelulares de [ER:H-Ras^{V12}] e [ER:H-Ras^{V12}-GTP] das sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12} em função do tratamento com FGF2 (10 ng/mL), + ou - concentrações crescentes de [4OHT] extracelular.

5.4 – AÇÃO INIBITÓRIA DE FGF2 EM CÉLULAS TUMORAIS

Nosso grupo reportou que FGF2 dispara vias mitogênicas em linhagens de camundongo malignas dependentes de Ras (Y1 e 3T3^{RAS}), no entanto, inibe a proliferação celular causando bloqueio irreversível em G2/M. Esta resposta citotóxica de FGF2 ocorre via FGFR e depende da ativação das vias de RhoA-GTP e Src. As vias mitogênicas canônicas MEK/ERK1/2, PI3K/AKT e PKC, apesar de

ativas, não estão envolvidas neste bloqueio causado por FGF2 (Costa et al., 2008; Salotti et al., 2013).

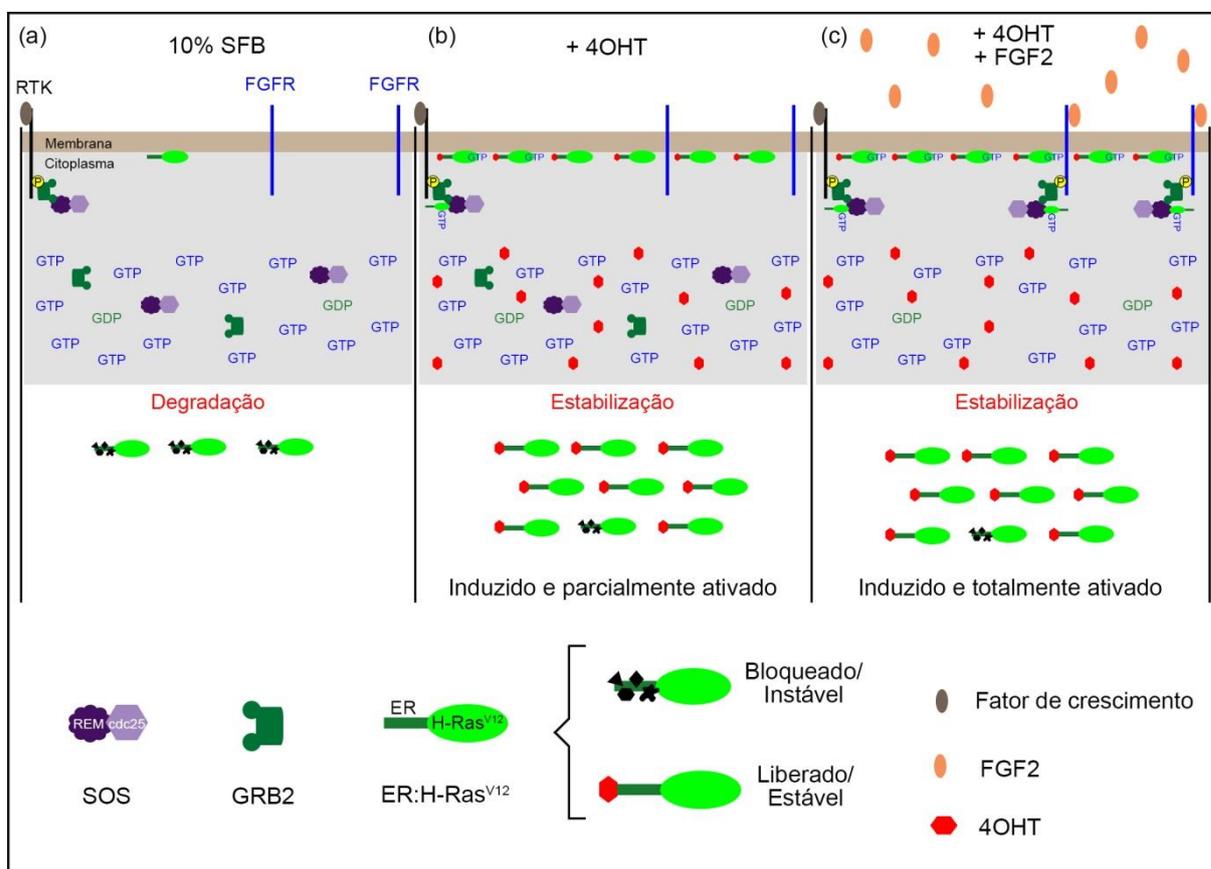


Figura 5.3 – Hipótese para o efeito dual de FGF2 em sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}. (a) Na condição controle (10%SFB-DME), há um nível basal de SOS ativo e pouca ou nenhuma proteína ER:H-Ras^{V12} disponível para ser ativada. (b) Com a adição de 200 nM 4OHT, há um aumento de [ER:H-Ras^{V12}] e [ER:H-Ras^{V12}-GTP], porém a relação [ER:H-Ras^{V12}-GTP] / [ER:H-Ras^{V12}] é baixa. Os níveis de SOS ativo continuam inalterados, porém, o incremento de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] provoca a ativação alostérica de SOS. (c) A adição de FGF2 (10 ng/mL) à condição 200 nM [4OHT] resulta em um aumento nos níveis de SOS ancorados à membrana e alostericamente ativos, resultando em uma elevação de ER:H-Ras^{V12}-GTP a níveis estressantes, causando citotoxicidade nestas células.

Além do nosso grupo, outros laboratórios também reportaram efeito inibitório em linhagens tumorais. Chen e colaboradores descreveram que FGF2, mas não FGF1, inibe a proliferação da linhagem celular CG-1, derivada de carcinoma nasofaríngeo humano (Chen et al., 1995). Já o grupo de Liu descreveu que a

linhagem MCF-7, originada de metástase de tumor de mama, só é sensível a FGF2, quando as mesmas expressam o oncogene v-H-ras. Além disso, diferentemente do que acontece com Y1 e 3T3^{RAS}, o inibidor de MEK foi capaz de reverter o efeito antiproliferativo de FGF2 (Liu et al., 1998). Outros relatos mostraram ainda que, FGF2 causa bloqueio em G2 (Smits et al., 2000), dispara morte celular pela ativação da atividade de diversas caspases (Westwood et al., 2002) e sensibiliza células tumorais à ação tóxica de quimioterápicos (Coleman et al., 2002).

Nesta tese foi reportado o efeito dual de FGF2 em células HEK 293 malignizadas pela ação do oncogene H-Ras^{V12}: quando HEK 293 não está expressando H-Ras^{V12}, FGF2 atua como um clássico fator mitogênico, no entanto, em presença de elevados níveis de H-Ras^{V12}, FGF2 torna-se citotóxico. De maneira inédita, esta tese contribui ainda para demonstrar que o efeito mitogênico ou tóxico de FGF2 é dependente das concentrações internas de [H-Ras^{V12}] e [H-Ras^{V12}-GTP].

5.5 – EFEITO CITOTÓXICO DE PMA É DEPENDENTE DOS NÍVEIS DE H-RAS^{V12}

Resultados presentes nesta tese demonstraram que, assim como ocorre com células de camundongo, a ativação de PKC por PMA causa morte em sublinhagens HEK/Hras^{V12} e 4OHT-HEK/ER:Hras^{V12}. Da mesma maneira que FGF2, a ação tóxica de PMA também se mostrou dependente dos níveis intracelulares de [ER:H-Ras^{V12}] e [ER:H-Ras^{V12}-GTP] (Figura 4.10B): na ausência e a 25 nM 4OHT, PMA não interfere no desenvolvimento de colônias das sublinhagens HEK/ER:Hras^{V12}. A 50 nM 4OHT, PMA passa a ter um efeito tóxico, que aumenta consideravelmente quando a concentração de 4OHT aumenta para 200 nM.

Apesar do promotor de FGF2 possuir uma região responsiva a PKC (Moffett et al., 1998), em nenhum momento PMA atuou favorecendo a proliferação ou o desenvolvimento de colônias da linhagem HEK 293 ou de suas sublinhagens HEK/Hras^{V12} e HEK/ER:Hras^{V12} (Figuras 4.10 e 4.11), indicando que o mecanismo referente ao efeito citotóxico mediado por PMA é diferente daquele mediado por FGF2.

5.6 – PKC δ PARECE SER A ISOFORMA RESPONSÁVEL PELO EFEITO CITOTÓXICO DE PMA

Quando Nishizuka, em 1982 (Castagna et al., 1982), descobriu que PKC é o alvo biológico dos esteroides de forbol, estes análogos de DAG se tornaram uma importante ferramenta nos estudos da ativação de PKC nos mais variados processos biológicos. No entanto, muitos outros receptores de esteroides de forbol foram descobertos, como PKD, quimerinas, Ras GRPs e Munc-13. De fato, essas proteínas estão envolvidas em diversos processos que, antes, foram atribuídos a PKC (Brose and Rosenmund, 2002; Kazanietz, 2000). Inicialmente, devido a maior afinidade por PKC, curvas dose-resposta com PMA eram realizadas para determinar se os efeitos mediados pelo ester de forbol ocorriam via ativação de PKC. Entretanto, hoje em dia, há diversas ferramentas disponíveis para distinguir PKC de outros receptores de PMA, como, inibidores químicos, RNAi (RNA de interferência) e peptídeos inibidores (Way et al., 2000).

Aqui nós mostramos que PMA causa morte em células HEK 293 transformadas pela ação do oncogene H-ras^{V12}. Na figura 4.12 foi mostrado que inibidores químicos de PKC, Gö 6983 e Bisindolilmaleimida I, revertem completamente o efeito citotóxico mediado por PMA. Portanto, a participação de PKCs responsivas à PMA neste processo é indiscutível.

Dentre as isoformas de PKC que são responsivas à PMA, Gö 6983 e Bis I possuem em comum a capacidade de inibir as PKCs α , β , δ e γ (tabela 4.1), tornando-as os possíveis efetores da morte causada por PMA. Dentre os candidatos, o menos provável em estar envolvido nesta resposta citotóxica de PMA é PKC γ , uma vez que esta isoforma é expressa apenas em cérebro e medula espinhal (Saito and Shirai, 2002). Por outro lado, todas as outras isoformas candidatas já foram descritas como importantes no processo de tumorigênese (seção 1.2.1). PKC α , por exemplo, já foi relacionada com inibição da proliferação e indução de apoptose, como também, com o aumento da capacidade de metástase de tumores (Clark et al., 2004; Garcia-Bermejo et al., 2002; Powell et al., 1996). Já PKC β foi associada tanto à iniciação e progressão de tumores, como à apoptose e supressão de angiogênese (Fields et al., 2009; Herbst et al., 2007). Entretanto, a maioria dos trabalhos publicados mostram que PKC δ é a isoforma que mais se encontra

relacionada com apoptose em diversos modelos celulares (seção 1.2.2) (Brodie and Blumberg, 2003; Fujii et al., 2000; Gonzalez-Guerrico et al., 2005; Gutcher et al., 2003).

É sabido que, durante apoptose, PKC δ sofre clivagem proteolítica, resultando em um fragmento catalítico constitutivamente ativo, cuja translocação para o núcleo e/ou mitocôndria amplifica a cascata apoptótica (seção 1.2.2). A figura 4.13 revela que a expressão da oncoproteína H-Ras^{V12} é suficiente para o aparecimento do fragmento catalítico de PKC δ (FC-PKC δ). No entanto, o tratamento sustentado com PMA diminui os níveis de PKC δ , enquanto que, discretamente eleva os de FC-PKC δ . Este resultado implica a Proteína Kinase C δ como possível efetora da morte causada por PMA em células HEK 293 transformadas pela ação do oncogene H-ras^{V12}.

Uma vez que é necessário um estímulo apoptótico inicial (como dano ao DNA ou estresse oxidativo) para a ativação de caspases que clivarão PKC δ , os elevados níveis de ROS após tratamento sustentado com PMA em sublinhagens HEK/Hras^{V12} (Figura 4.16) podem ser os ativadores iniciais do efeito de morte mediado por PMA. A atuação de PKC δ como uma quinase sensível a ROS não é uma novidade (Kanthasamy et al., 2003). Majumder e colaboradores, por exemplo, demonstraram que a apoptose disparada por H₂O₂ é dependente da ativação e translocação de PKC δ para a mitocôndria (Majumder et al., 2001).

Juntos, os resultados das figuras 4.13 e 4.16 indicam que o tratamento prolongado com PMA promove um aumento sustentado dos níveis de ROS em sublinhagens HEK 293 transformadas pelo oncogene H-ras^{V12}. Este estresse oxidativo dispara vias apoptóticas, que resultam na ativação de caspase 3. Esta protease, por sua vez, cliva PKC δ , liberando um fragmento catalítico que é constitutivamente ativo. FC-PKC δ ativa mais caspase 3, alimentando uma alça positiva que amplifica a cascata apoptótica, levando estas células à morte (Figura 5.4).

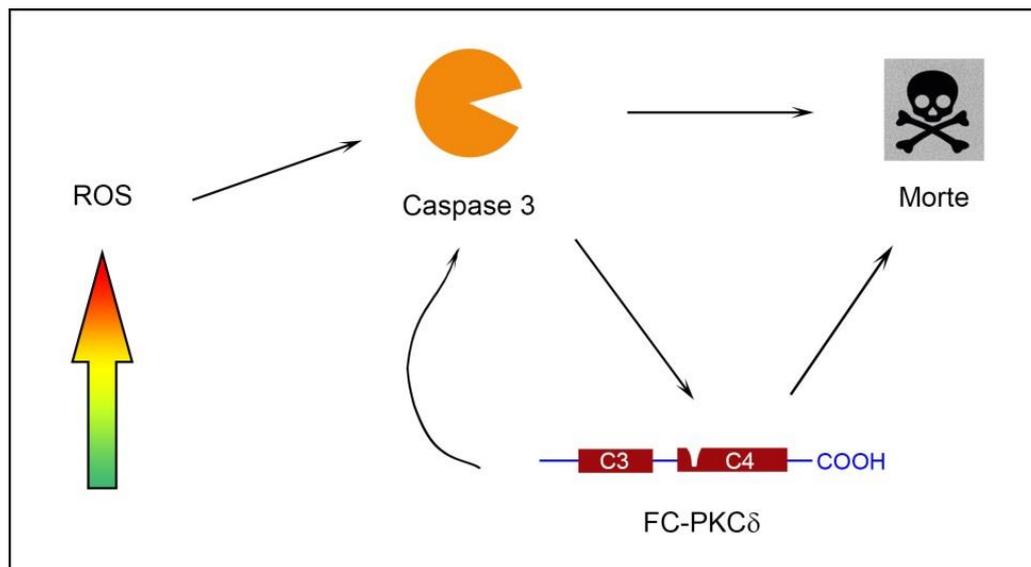


Figura 5.4 – Hipótese para morte mediada por PMA em sublinhagens HEK 293 transformadas por H-Ras^{V12}. O aumento sustentado de ROS (espécies reativas de oxigênio) ativa vias apoptóticas que acionam a caspase 3. PKCδ é clivado por esta protease, liberando o fragmento catalítico de PKCδ (FC-PKCδ) que, por não possuir mais o domínio regulatório, é constitutivamente ativo. FC-PKCδ, por sua vez, além de translocar para a mitocôndria e núcleo, disparando mecanismos de morte celular, também ativa mais caspase 3. Isso gera um ciclo vicioso que resulta no acúmulo da ativação de vias apoptóticas, levando a morte celular.

6 CONCLUSÃO

FGF2 causa um efeito dual em células HEK 293 condicionalmente malignizadas pela ação do oncogene H-ras^{V12}: na ausência ou em baixas concentrações de 4OHT (pouco [ER:H-Ras^{V12}-GTP]), FGF2 exibe sua função canônica de fator mitogênico e estimula o crescimento em suspensão dessas células. Porém, quando HEK 293 expressa elevados níveis de [ER:H-Ras^{V12}-GTP] (200nm4OHT-HEK/Hras^{V12}), FGF2 passa a ter uma inesperada ação citotóxica.

FGF2 exógeno é neutro em sublinhagens HEK 293 malignizadas pela expressão constitutiva de H-Ras^{V12}, provavelmente devido a um fenômeno de epistasia.

A ativação de PKC por PMA causa morte em células HEK 293 malignizadas pela ação da oncoproteína H-ras^{V12}, mas não em suas correspondentes parentais não transformadas.

7 REFERENCIAS

Alkon, D.L., Sun, M.K., Nelson, T.J., 2007. PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. *Trends in pharmacological sciences* 28, 51-60.

Alvaro, V., Levy, L., Dubray, C., Roche, A., Peillon, F., Querat, B., Joubert, D., 1993. Invasive human pituitary tumors express a point-mutated alpha-protein kinase-C. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 77, 1125-1129.

Alvaro, V., Prevostel, C., Joubert, D., Slosberg, E., Weinstein, B.I., 1997. Ectopic expression of a mutant form of PKCalpha originally found in human tumors: aberrant subcellular translocation and effects on growth control. *Oncogene* 14, 677-685.

Armelin, H.A., 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 2702-2706.

Azzi, A., Boscoboinik, D., Hensey, C., 1992. The protein kinase C family. *European journal of biochemistry / FEBS* 208, 547-557.

Baier, G., Wagner, J., 2009. PKC inhibitors: potential in T cell-dependent immune diseases. *Current opinion in cell biology* 21, 262-267.

Basu, A., Sivaprasad, U., 2007. Protein kinase Cepsilon makes the life and death decision. *Cellular signalling* 19, 1633-1642.

Berenblum, I., 1941. The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res* 1, 44-48.

Besson, A., Yong, V.W., 2000. Involvement of p21(Waf1/Cip1) in protein kinase C alpha-induced cell cycle progression. *Molecular and cellular biology* 20, 4580-4590.

Blass, M., Kronfeld, I., Kazimirsky, G., Blumberg, P.M., Brodie, C., 2002. Tyrosine phosphorylation of protein kinase Cdelta is essential for its apoptotic effect in response to etoposide. *Molecular and cellular biology* 22, 182-195.

Bosco, R., Melloni, E., Celeghini, C., Rimondi, E., Vaccarezza, M., Zauli, G., 2011. Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside. *Mini reviews in medicinal chemistry* 11, 185-199.

Brodie, C., Blumberg, P.M., 2003. Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 8, 19-27.

Brose, N., Rosenmund, C., 2002. Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *Journal of cell science* 115, 4399-4411.

Cantley, L.C., 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 1982. Direct Activation of Calcium-Activated, Phospholipid-Dependent Protein-Kinase by Tumor-Promoting Phorbol Esters. *J Biol Chem* 257, 7847-7851.

Castellano, E., Downward, J., 2011. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & cancer* 2, 261-274.

Chambard, J.C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., Lenormand, P., 2007. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1299-1310.

Chen, J.K., Chao, H.-H., Yang, V.C., 1995. Inhibition of the growth of a human nasopharyngeal carcinoma cell line by bFGF is mediated via FGFR-1. *The FASEB journal* 9, 1211-1219.

Churchill, E., Budas, G., Vallentin, A., Koyanagi, T., Mochly-Rosen, D., 2008. PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets? *Annual review of pharmacology and toxicology* 48, 569-599.

Clark, J.A., Black, A.R., Leontieva, O.V., Frey, M.R., Pysz, M.A., Kunneva, L., Woloszynska-Read, A., Roy, D., Black, J.D., 2004. Involvement of the ERK signaling cascade in protein kinase C-mediated cell cycle arrest in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 279, 9233-9247.

Coleman, A.B., Metz, M.Z., Donohue, C.A., Schwarz, R.E., Kane, S.E., 2002. Chemosensitization by fibroblast growth factor-2 is not dependent upon proliferation, S-phase accumulation, or p53 status. *Biochemical pharmacology* 64, 1111-1123.

Corbalan-Garcia, S., Yang, S.S., Degenhardt, K.R., Bar-Sagi, D., 1996. Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Molecular and cellular biology* 16, 5674-5682.

Costa, E.T., Forti, F.L., Matos, T.G., Dermargos, A., Nakano, F., Salotti, J., Rocha, K.M., Asprino, P.F., Yoshihara, C.K., Koga, M.M., Armelin, H.A., 2008. Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res* 68, 6215-6223.

Courtney, K.D., Corcoran, R.B., Engelman, J.A., 2010. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, 1075-1083.

Danielian, P.S., White, R., Hoare, S.A., Fawell, S.E., Parker, M.G., 1993. Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Molecular endocrinology* 7, 232-240.

Danis, R.P., Sheetz, M.J., 2009. Ruboxistaurin: PKC-beta inhibition for complications of diabetes. *Expert opinion on pharmacotherapy* 10, 2913-2925.

De Ruiter, N.D., Burgering, B.M., Bos, J.L., 2001. Regulation of the Forkhead transcription factor AFX by Ral-dependent phosphorylation of threonines 447 and 451. *Molecular and cellular biology* 21, 8225-8235.

Dougherty, M.K., Muller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., Morrison, D.K., 2005. Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Molecular cell* 17, 215-224.

Downward, J., 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 3, 11-22.

Duronio, V., 2008. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *The Biochemical journal* 415, 333-344.

Ebisuya, M., Kondoh, K., Nishida, E., 2005. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of cell science* 118, 2997-3002.

Ehrhardt, A., Ehrhardt, G.R., Guo, X., Schrader, J.W., 2002. Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. *Experimental hematology* 30, 1089-1106.

Engelman, J.A., Luo, J., Cantley, L.C., 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics* 7, 606-619.

Eswarakumar, V.P., Lax, I., Schlessinger, J., 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 139-149.

Fields, A.P., Calcagno, S.R., Krishna, M., Rak, S., Leitges, M., Murray, N.R., 2009. Protein kinase C β is an effective target for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* 69, 1643-1650.

Forti, F.L., Armelin, H.A., 2011. Arginine vasopressin controls p27(Kip1) protein expression by PKC activation and irreversibly inhibits the proliferation of K-Ras-dependent mouse Y1 adrenocortical malignant cells. *Biochimica et biophysica acta* 1813, 1438-1445.

Franke, T.F., 2008. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27, 6473-6488.

Frey, M.R., Saxon, M.L., Zhao, X., Rollins, A., Evans, S.S., Black, J.D., 1997. Protein kinase C isozyme-mediated cell cycle arrest involves induction of p21(waf1/cip1) and p27(kip1) and hypophosphorylation of the retinoblastoma protein in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 272, 9424-9435.

Fujii, T., Garcia-Bermejo, M.L., Bernabo, J.L., Caamano, J., Ohba, M., Kuroki, T., Li, L., Yuspa, S.H., Kazanietz, M.G., 2000. Involvement of protein kinase C delta (PKCdelta) in phorbol ester-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Lack of proteolytic cleavage of PKCdelta. *J Biol Chem* 275, 7574-7582.

Gan, Y., Wientjes, M.G., Au, J.L., 2006. Expression of basic fibroblast growth factor correlates with resistance to paclitaxel in human patient tumors. *Pharmaceutical research* 23, 1324-1331.

Garcia-Bermejo, M.L., Leskow, F.C., Fujii, T., Wang, Q., Blumberg, P.M., Ohba, M., Kuroki, T., Han, K.C., Lee, J., Marquez, V.E., Kazanietz, M.G., 2002. Diacylglycerol (DAG)-lactones, a new class of protein kinase C (PKC) agonists, induce apoptosis in LNCaP prostate cancer cells by selective activation of PKC α . *J Biol Chem* 277, 645-655.

Goel, G., Makkar, H.P.S., Francis, G., Becker, K., 2007. Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. *Int J Toxicol* 26, 279-288.

Gonzalez-Guerrico, A.M., Meshki, J., Xiao, L., Benavides, F., Conti, C.J., Kazanietz, M.G., 2005. Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Journal of biochemistry and molecular biology* 38, 639-645.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* 36, 59-74.

Griner, E.M., Kazanietz, M.G., 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature reviews. Cancer* 7, 281-294.

Gureasko, J., Galush, W., Boykevisch, S., Sondermann, H., Bar-Sagi, D., Groves, J., Kuriyan, J., 2008. Membrane-dependent signal integration by the Ras activator Son of sevenless. *Nature structural & molecular biology* 15, 452-461.

Gutcher, I., Webb, P.R., Anderson, N.G., 2003. The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 1061-1070.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Herbst, R.S., Oh, Y., Wagle, A., Lahn, M., 2007. Enzastaurin, a protein kinase C β -selective inhibitor, and its potential application as an anticancer agent in lung cancer.

Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13, s4641-4646.

Hu, J.G., Wang, X.F., Zhou, J.S., Wang, F.C., Li, X.W., Lu, H.Z., 2010. Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. *Acta neurobiologiae experimentalis* 70, 239-245.

Itoh, N., Ornitz, D.M., 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in genetics : TIG* 20, 563-569.

Kang, J.H., Toita, R., Kim, C.W., Katayama, Y., 2012. Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design. *Biotechnology advances* 30, 1662-1672.

Kanthasamy, A.G., Kitazawa, M., Kanthasamy, A., Anantharam, V., 2003. Role of proteolytic activation of protein kinase Cdelta in oxidative stress-induced apoptosis. *Antioxidants & redox signaling* 5, 609-620.

Karnoub, A.E., Weinberg, R.A., 2008. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 517-531.

Kawakami, T., Kawakami, Y., Kitaura, J., 2002. Protein kinase C beta (PKC beta): normal functions and diseases. *Journal of biochemistry* 132, 677-682.

Kazanietz, M.G., 2000. Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Molecular carcinogenesis* 28, 5-11.

Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., Smrcka, A.V., 2001. Phospholipase C(epsilon): a novel Ras effector. *The EMBO journal* 20, 743-754.

Keranen, L.M., Dutil, E.M., Newton, A.C., 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Current biology : CB* 5, 1394-1403.

Kikkawa, U., Matsuzaki, H., Yamamoto, T., 2002. Protein kinase C delta (PKC delta): activation mechanisms and functions. *Journal of biochemistry* 132, 831-839.

Klein, M., 1953. Influence of Continued and Intermittent Painting with Croton Oil on Skin Tumorigenesis in Mice. *J Natl Cancer I* 14, 83-91.

Knauf, J.A., Elisei, R., Mochly-Rosen, D., Liron, T., Chen, X.N., Gonsky, R., Korenberg, J.R., Fagin, J.A., 1999. Involvement of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) in thyroid cell death. A truncated chimeric PKCepsilon cloned from a thyroid cancer cell line protects thyroid cells from apoptosis. *J Biol Chem* 274, 23414-23425.

Kolch, W., Heidecker, G., Kochs, G., Hummel, R., Vahidi, H., Mischak, H., Finkenzeller, G., Marme, D., Rapp, U.R., 1993. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.

Leibersperger, H., Gschwendt, M., Gernold, M., Marks, F., 1991. Immunological demonstration of a calcium-unresponsive protein kinase C of the delta-type in different species and murine tissues. Predominance in epidermis. *J Biol Chem* 266, 14778-14784.

Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., Evan, G.I., 1995. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic acids research* 23, 1686-1690.

Liu, J.F., Issad, T., Chevet, E., Ledoux, D., Courty, J., Caruelle, J.P., Barritault, D., Crepin, M., Bertin, B., 1998. Fibroblast growth factor-2 has opposite effects on human breast cancer MCF-7 cell growth depending on the activation level of the mitogen-activated protein kinase pathway. *European journal of biochemistry / FEBS* 258, 271-276.

Lonne, G.K., Cornmark, L., Zahirovic, I.O., Landberg, G., Jirstrom, K., Larsson, C., 2010. PKCalpha expression is a marker for breast cancer aggressiveness. *Molecular cancer* 9, 76.

Louis, N., Eveleigh, C., Graham, F.L., 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233, 423-429.

Lu, D., Sivaprasad, U., Huang, J., Shankar, E., Morrow, S., Basu, A., 2007. Protein kinase C-epsilon protects MCF-7 cells from TNF-mediated cell death by inhibiting Bax translocation. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 12, 1893-1900.

Lu, Z., Hornia, A., Jiang, Y.W., Zang, Q., Ohno, S., Foster, D.A., 1997. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Molecular and cellular biology* 17, 3418-3428.

Majumder, P.K., Mishra, N.C., Sun, X., Bharti, A., Kharbanda, S., Saxena, S., Kufe, D., 2001. Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 12, 465-470.

Malumbres, M., Barbacid, M., 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer* 3, 459-465.

Margarit, S., Sondermann, H., Hall, B., Nagar, B., Hoelz, A., Pirruccello, M., Bar-Sagi, D., Kuriyan, J., 2003. Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* 112, 685-695.

Martiny-Baron, G., Fabbro, D., 2007. Classical PKC isoforms in cancer. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 55, 477-486.

Matos, T.G.d.F., 2007. Mecanismos anti-proliferativos disparados por FGF2 e éster de forbol em células de camundongos transformadas por Ras, Departamento de Bioquímica. Universidade de São Paulo, p. 159.

Mischak, H., Goodnight, J.A., Kolch, W., Martiny-Baron, G., Schaehtle, C., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., Pierce, J.H., Mushinski, J.F., 1993. Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 268, 6090-6096.

Mochly-Rosen, D., Das, K., Grimes, K.V., 2012. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature reviews. Drug discovery* 11, 937-957.

Moffett, J., Kratz, E., Myers, J., Stachowiak, E.K., Florkiewicz, R.Z., Stachowiak, M.K., 1998. Transcriptional regulation of fibroblast growth factor-2 expression in human astrocytes: implications for cell plasticity. *Molecular biology of the cell* 9, 2269-2285.

Mohammadi, M., Olsen, S.K., Ibrahimi, O.A., 2005. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & growth factor reviews* 16, 107-137.

Moran, E., 1993. Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 7, 880-885.

Newton, A.C., 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical reviews* 101, 2353-2364.

Newton, A.C., 2010. Protein kinase C: poised to signal. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298, E395-402.

Ornitz, D.M., Itoh, N., 2001. Fibroblast growth factors. *Genome biology* 2, REVIEWS3005.

Oster, H., Leitges, M., 2006. Protein kinase C alpha but not PKCzeta suppresses intestinal tumor formation in ApcMin/+ mice. *Cancer Res* 66, 6955-6963.

Pan, Q., Bao, L.W., Kleer, C.G., Sabel, M.S., Griffith, K.A., Teknos, T.N., Merajver, S.D., 2005. Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. *Cancer Res* 65, 8366-8371.

Pardo, O.E., Wellbrock, C., Khaznada, U.K., Aubert, M., Arozarena, I., Davidson, S., Bowen, F., Parker, P.J., Filonenko, V.V., Gout, I.T., Sebire, N., Marais, R., Downward, J., Seckl, M.J., 2006. FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKCepsilon, B-Raf and S6K2. *The EMBO journal* 25, 3078-3088.

Perletti, G.P., Marras, E., Concari, P., Piccinini, F., Tashjian, A.H., Jr., 1999. PKCdelta acts as a growth and tumor suppressor in rat colonic epithelial cells. *Oncogene* 18, 1251-1256.

Powell, C.T., Brittis, N.J., Stec, D., Hug, H., Heston, W.D., Fair, W.R., 1996. Persistent membrane translocation of protein kinase C alpha during 12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis of LNCaP human prostate cancer cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 7, 419-428.

Prevostel, C., Martin, A., Alvaro, V., Jaffiol, C., Joubert, D., 1997. Protein kinase C alpha and tumorigenesis of the endocrine gland. *Hormone research* 47, 140-144.

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., Bar-Sagi, D., 2011. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews. Cancer* 11, 761-774.

Reuter, J., Khavari, P., 2006. Use of conditionally active ras fusion proteins to study epidermal growth, differentiation, and neoplasia. *Methods in enzymology* 407, 691-702.

Rodriguez-Viciano, P., McCormick, F., 2005. RalGDS comes of age. *Cancer cell* 7, 205-206.

Rojas, A.M., Fuentes, G., Rausell, A., Valencia, A., 2012. The Ras protein superfamily: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of cell biology* 196, 189-201.

Saito, N., Shirai, Y., 2002. Protein kinase C gamma (PKC gamma): function of neuron specific isotype. *Journal of biochemistry* 132, 683-687.

Salotti, J., Dias, M.H., Koga, M.M., Armelin, H.A., 2013. Fibroblast growth factor 2 causes G2/M cell cycle arrest in ras-driven tumor cells through a Src-dependent pathway. *PLoS one* 8, e72582.

Schechtman, D., Mochly-Rosen, D., 2001. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene* 20, 6339-6347.

Seno, M., Masago, A., Nishimura, A., Tada, H., Kosaka, M., Sasada, R., Igarashi, K., Seno, S., Yamada, H., 1998. BALB/c 3T3 cells co-expressing FGF-2 and soluble FGF receptor acquire tumorigenicity. *Cytokine* 10, 290-294.

Shaul, Y.D., Seger, R., 2007. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et biophysica acta* 1773, 1213-1226.

Slack-Davis, J.K., Eblen, S.T., Zecevic, M., Boerner, S.A., Tarcsafalvi, A., Diaz, H.B., Marshall, M.S., Weber, M.J., Parsons, J.T., Catling, A.D., 2003. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *The Journal of cell biology* 162, 281-291.

Smits, V.A., van Peer, M.A., Essers, M.A., Klompmaker, R., Rijksen, G., Medema, R.H., 2000. Negative growth regulation of SK-N-MC cells by bFGF defines a growth factor-sensitive point in G2. *J Biol Chem* 275, 19375-19381.

Sondermann, H., Nagar, B., Bar-Sagi, D., Kuriyan, J., 2005. Computational docking and solution x-ray scattering predict a membrane-interacting role for the histone domain of the Ras activator son of sevenless. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16632-16637.

Sorensen, V., Nilsen, T., Wiedlocha, A., 2006. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 28, 504-514.

Sturla, L.M., Westwood, G., Selby, P.J., Lewis, I.J., Burchill, S.A., 2000. Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma. *Cancer Res* 60, 6160-6170.

Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., Hawkins, P., 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 195-203.

Way, K.J., Chou, E., King, G.L., 2000. Identification of PKC-isoform-specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends in pharmacological sciences* 21, 181-187.

Wellbrock, C., Karasarides, M., Marais, R., 2004. The RAF proteins take centre stage. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 875-885.

Westwood, G., Dibling, B.C., Cuthbert-Heavens, D., Burchill, S.A., 2002. Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway. *Oncogene* 21, 809-824.

Yeung, K., Janosch, P., McFerran, B., Rose, D.W., Mischak, H., Sedivy, J.M., Kolch, W., 2000. Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Molecular and cellular biology* 20, 3079-3085.

Yoshiji, H., Kuriyama, S., Ways, D.K., Yoshii, J., Miyamoto, Y., Kawata, M., Ikenaka, Y., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Shibuya, M., Fukui, H., 1999. Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res* 59, 4413-4418.

Zeidler, J.D., 2012. Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor, Departamento de Bioquímica. Universidade de São Paulo, p. 136.

Zhao, M., Xia, L., Chen, G.Q., 2012. Protein kinase c delta in apoptosis: a brief overview. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 60, 361-372.

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Juliana Galvão da Silva

Nascida a 02 de Junho de 1985 em Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte, Brasil.

E-mail: julianagalvao@usp.br

Formação Acadêmica

Pós-graduação: Candidata ao título de doutorado em Bioquímica junto ao Laboratório Especial de Ciclo Celular (LECC), Instituto Butantan; pelo programa de pós graduação do Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo.

Ingresso em 2008 e previsão de conclusão em 2014.

Graduação: Bacharel em Biomedicina com habilitação em análises clínicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, RN, Brasil.

Ingresso em 2003 e conclusão em 2008.

Ensinos fundamental e Médio: Colégio Marista de Natal, Natal, RN, Brasil.

Ingresso em 1992 e conclusão em 2002.

Ocupação atual

Aluno de doutorado pelo departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Bolsista CNPq. Vigência 08/2008 a 07/2013

Trabalhos Completos Publicados em Periódicos

Maciel BL, Lacerda HG, Queiroz JW, Galvão J, Pontes NN, Dimenstein R, McGowan SE, Pedrosa LF & Jerônimo SM (2008). Association of nutritional status

with the response to infection with *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg 79(4):591-8.

Participações Selecionadas em Congressos

- Mechanisms & Models of Cancer Meeting 2012 (14-18 de Agosto)
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor/NY, USA.
Apresentação de Poster: Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) induces Cell Death in Human Embryonic Kidney Cell Line Displaying a Ras-driven Malignant Phenotype.
- Gordon Research Seminar: Cell Growth & Proliferation 2013 (22-23 de Junho)
Mount Snow Resort, West Dover/VT, USA.
Apresentação Oral: Phorbol Ester-responsive PKC Isoforms Induce Cell Death in Human Embryonic Kidney Cell Line (HEK 293) Displaying a Ras-driven Malignant Phenotype
- Gordon Research Conference: Cell Growth & Proliferation 2013 (23-28 de Junho)
Mount Snow Resort, West Dover/VT, USA.
Poster session: Phorbol Ester-responsive PKC Isoforms Induce Cell Death in Human Embryonic Kidney Cell Line (HEK 293) Displaying a Ras-driven Malignant Phenotype.