

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

CECILIA SELLA FONSECA

**Mecanismos Moleculares do Efeito Citotóxico de
FGF2 em Células Transformadas por Ras**

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

02/05/2018

CECILIA SELLA FONSECA

**Mecanismos Moleculares do Efeito Citotóxico de
FGF2 em Células Transformadas por Ras**

*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

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Fonseca, Cecilia Sella
F676m Mecanismos moleculares do efeito citotóxico de FGF2 em células transformadas por Ras. / Cecilia Sella Fonseca. -- São Paulo, 2018. 165p.

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

1. Bioquímica celular 2. Câncer 3. Biologia celular 4. Biologia molecular I. T. II. Armelin, Hugo Aguirre, orientador.

574.876042 CDD

Aos meus pais, com todo amor!

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Serleide, por transmitir o valor dos estudos e do conhecimento desde quando ensinava a seus filhos de poucos anos a fazer os trabalhos de escola bem escritos e bem apresentados; por ter trabalhado e por trabalhar tanto para que seus filhos estudem, trabalhem e façam as coisas da vida; pela dedicação e amor infinitos.

Ao meu pai, José Eduardo, pelos muitos anos de muito trabalho que dedicou por sua família e que me permitiram concluir esta tese; por me apoiar em meus projetos futuros de forma tão generosa; por sua amabilidade, sensibilidade e leveza.

À minha irmã, Denise, por me apoiar sempre e incondicionalmente, por cuidar e se preocupar comigo, e por ter me influenciado a tomar o caminho das ciências biológicas.

A meus demais familiares, incluindo a Bibi e a Milouzinha, por serem parte do núcleo que me dá alegria, segurança e pertencimento.

Ao Prof. Hugo, pela orientação e aprendizados acadêmicos e pessoais proporcionados ao longo de uma década de convivência; pela atenciosa revisão e correção desta tese e pelas contribuições valiosíssimas que só alguém que viveu parte da história da ciência poderia dar; e pelo carinho transparecido.

Ao querido Matheus, por me ensinar os primeiros passos no laboratório, e os segundos e os terceiros, sempre com paciência; pela imensurável colaboração que

deu a esta tese; e por me ensinar, apenas sendo ele mesmo, que as coisas dão mais certo se a gente não se preocupar tanto.

À amiga e “soul sister”, Daiane, pelo apoio e amizade tão próximos, mesmo a tão longa distância; por me inspirar com sua força, resiliência e incrível capacidade de crescimento!

Às amigas Bela, Gaúcha, Dani e Grazi, pela amizade de longa data, por ouvirem meus causos e lamentos, e principalmente pelas risadas certas!

Aos queridos amigos Alê e Caian, pela chance de conviver e aprender a ser melhor com seres tão humanos!

À Nilde, por generosamente participar de minha vida e, também, me ajudar a ser melhor.

À Ju Galvão e à Ju Dias, pela amizade e ensinamentos em meus primeiros anos de doutorado, pelo espírito colaborativo, companhia e conversas. Somo a elas o agradecimento a todos os ex- doutorandos do laboratório que construíram o conhecimento que fundamentou a proposição deste trabalho.

À Carol e ao Marcelo Reis, pelas discussões que contribuíram com meu trabalho, e pelo coleguismo e apoio sempre disponíveis!

Aos bons colegas de laboratório do LETA, especialmente ao Rapha e à Andrea Camarano, pela amizade, conversas, e companheirismo.

À Dona Lídia, por cuidar do laboratório como uma mãe, e aos demais técnicos, especialmente à Mari e ao Ivan, pelo valioso suporte e coleguismo.

Ao Anselmo, pela colaboração em alguns gráficos e análises estatísticas.

Ao Caio Bego, à Fê Neris e à Mari Nascimento, por me ajudarem a dar o próximo passo e contribuir para a conclusão desta etapa da minha vida com serenidade.

Aos demais colegas da PAREXEL, por trazerem mais leveza à minha vida através do ambiente alegre e colaborativo que constroem todos os dias.

À FAPESP, pelo apoio financeiro através dos projetos 2013/09040-5 e 2013/07467-1.

O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.

A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

RESUMO

Fonseca, C.S. **Mecanismos Moleculares do Efeito Citotóxico de FGF2 em células transformadas por Ras**. 165p. 2018. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) é um clássico fator peptídico de crescimento que ativa vias intracelulares de sinalização molecular promovendo a transição $G_0 \rightarrow G_1$ e o comprometimento com o ciclo celular. Não surpreendentemente, seus papéis pró-tumoral e angiogênico estão bem caracterizados e estabelecidos na literatura. No entanto, um crescente corpo de evidências tem indicado que o FGF2 também pode exercer efeitos anti-tumorais *in vitro* e *in vivo*, em modelos murinos e também humanos. Neste contexto, nosso grupo publicou em 2008 que o FGF2 exerce um efeito antiproliferativo seletivo em células murinas malignas dependentes de alta atividade de K-Ras e H-Ras. Os genes *ras* compõem a família de oncogenes mais frequentemente mutada em tumores malignos humanos, alcançando aproximadamente 30% de todos os casos. O desenvolvimento de terapias contra tumores dependentes de Ras fracassou, apesar dos intensos esforços e investimentos desde a descoberta em 1982 de suas mutações ativadoras em múltiplos cânceres. O objetivo deste trabalho foi desvendar os mecanismos moleculares pelo quais o FGF2 inibe irreversivelmente a proliferação de células malignas dependentes da atividade de Ras, empregando como modelos experimentais a linhagem murina Y1 de células adrenocorticais, e 4 linhagens humanas derivadas de sarcomas de Ewing. Identificamos que o efeito citotóxico do FGF2 não se processa por um mecanismo novo e independente das vias

proliferativas classicamente ativadas por fatores peptídicos de crescimento. Ao contrário, seu efeito tóxico é resultado de sinalização mitogênica exagerada decorrente de estimulação sustentada por FGF2. A ativação da via de MAPK, principal sinalização mitogênica intracelular, a níveis elevados e sustentados provoca estresse mitogênico, que se propaga para a fase S na forma de estresse replicativo. Nesta situação, a célula passa a depender exageradamente da sinalização protetora de ATR, de modo que a combinação de estimulação com FGF2 e inibição de ATR foi altamente letal para as células malignas dependentes de Ras empregadas neste trabalho. Também analisamos as bases moleculares de resistência a FGF2 exibida por células Y1 anteriormente selecionadas para resistir ao efeito tóxico do FGF2 (Y1FRs). Descobrimos que a pressão seletiva do FGF2 não teve efeito na expressão de seus receptores, mas provocou a eliminação de um dos dois cromossomos que portam a amplificação gênica de ras nesta linhagem, enquanto o segundo cromossomo foi mantido por ser a única fonte de genes ribossomais ativos. Suas cópias de ras, no entanto, mostraram-se transcricionalmente silenciadas. Além disso, as sublinhagens Y1FRs não expressam o principal RasGEF, GRP4, encontrado nas células parentais Y1, o que pode ter influenciado o surgimento do fenótipo resistente ao FGF2. As linhagens resistentes mostraram grande redução no número de cromossomos e aumento da frequência de fusões entre cromossomos não homólogos em relação às células parentais.

Palavras chave: FGF2, Ras, Estresse replicativo, ATR, MAPK.

ABSTRACT

Fonseca, C.S. **Molecular Mechanisms of the Cytotoxic Effect of FGF2 in Ras-transformed cells.** 165p. 2018. PhD Thesis - Graduate Program in Biological Sciences (Biochemistry). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) is a classic peptide growth factor that activates intracellular molecular signaling pathways promoting the G0 → G1 transition and cell cycle commitment. Not surprisingly, its pro-tumor and angiogenic roles are well characterized and established in the literature. However, a growing body of evidence has indicated that FGF2 may also exert anti-tumor effects *in vitro* and *in vivo* in murine and human models. In this context, our group reported in 2008 that FGF2 exerts a selective antiproliferative effect in murine cells dependent on high activity of K-Ras and H-Ras. Ras genes make up the most frequently mutated oncogene family in human malignant tumors, reaching approximately 30% of all cases. The development of therapies against Ras-dependent tumors has failed despite intense efforts and investments since the discovery in 1982 of its activating mutations in multiple cancers. The objective of this work was to uncover the molecular mechanisms by which FGF2 irreversibly inhibits the proliferation of malignant cells dependent on Ras activity, using as experimental models the Y1 murine lineage of adrenocortical malignant cells and 4 human lineages derived from Ewing' sarcomas. We showed that the cytotoxic effect of FGF2 did not involve novel cell cycle regulatory pathways; instead, this cytotoxic effect is a result of sustained

hyper mitogenic stimulation by FGF2. Activation of the KRas/MAPK pathway, the major intracellular mitogenic signaling, at high and sustained levels provokes mitogenic stress, which is propagated to S phase as replicative stress. In this situation, the cell dependence on the ATR protective signaling is enhanced, so that the combination of stimulation with FGF2 and inhibition of ATR was highly lethal for the Ras dependent malignant cells employed in this work. We also analyzed the molecular basis of FGF2 resistance exhibited by Y1 cells previously selected for resistance to FGF2. We found that the selective pressure of FGF2 had no effect on the expression of its receptors but promoted the elimination of one of the two marker chromosomes that carry the K-ras amplified copies, while the second chromosome was maintained because it is the only source of active ribosomal genes; however, its K-ras amplified copies were transcriptionally silenced. In addition, the Y1FRs sublines did not express the main RasGEF, GRP4, found in the parental Y1 cells, which might have played a role in the emergence of the FGF2-resistant phenotype. The resistant Y1FRs sublines showed a large reduction in chromosome numbers and increased frequency of fusions between non-homologous chromosomes in relation to parental cells.

Key words: FGF2, Ras, Replicative stress, ATR, MAPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema arbitrariamente reducionista evidenciando a evolução do tema “ciclo celular: organização, dinâmica e controle biológico” ao longo do tempo	23
Figura 2: Esquema simplificado dos módulos de sinalização que controlam a entrada e progressão no ciclo celular	24
Figura 3: Levantamento do número de artigos publicados por ano sobre o EGF, desde a sua descoberta por Stanley Cohen, e do número de artigos publicados sobre o tema “ <i>Peptide growth-factors</i> ” até 2009	27
Figura 4: Relações evolutivas entre a família gênica de FGFs, estabelecida por análise filogenética	28
Figura 5: Isoformas de FGF2 expressas em humanos	29
Figura 6: Estrutura dos receptores de FGF (FGFRs)	30
Figura 7: Esquema resumido da principal via mitogênica ativada tanto por EGF/EFGR como por FGF/FGFR	31
Figura 8: Estrutura primária das isoformas parálogas das proteínas Ras-GTPases	37
Figura 9: Núcleo de ativação das Ras-GTPases	38
Figura 10: O FGF2 exacerba o estresse replicativo basal de células Y1	66

Figura 11: O FGF2 ativa a Resposta de Dano de DNA e o <i>checkpoint</i> dependente de ATR em células Y1	69
Figura 12: Efeito da inibição do <i>checkpoint</i> de ATM/ATR com cafeína em células Y1 tratadas ou não com FGF2	72
Figura 13: Efeito da inibição específica de ATR ou ATM em células Y1 tratadas ou não com FGF2	73
Figura 14: A depleção de K-Ras previne a toxicidade do FGF2 sobre células Y1, bem como sua sensibilidade à inibição do <i>checkpoint</i> dependente de ATR	77
Figura 15: Caracterização das sublinhagens de Y1 Resistentes ao FGF2 (Y1FRs)	81
Figura 16: Análise do padrão de expressão de isoformas do receptor de FGF2 em células Y1 e Y1- Resistentes ao FGF2 (Y1FRs)	84 e 85
Figura 17: As sublinhagens Y1FR estritamente eliminaram o cromossomo M1 e conservaram o M2	89 e 90
Figura 18: Análise dos níveis de K-Ras-GTP e de expressão dos mRNAs dos RasGEFs nas células parentais Y1 e nas três sublinhagens Y1FR-C, -F e -I...93 e 94	
Figura 19: Contagem do número de cromossomos total e fusionados nas células Y1 e Y1FRs	98
Figura 20: Análise de expressão de proteínas marcadoras de DDR e <i>checkpoint</i> em células Y1 e Y1FRs	100
Figura 21: Efeito da inibição específica de ATR ou ATM em células Y1 e Y1FR-C	102

Figura 22: FGF2 ativa de forma sustentada a via de MAPK-ERK1/2 e sensibiliza letalmente células humanas ESFT para a inibição do *checkpoint* dependente de ATR 106

Figura 23 (apêndice): Teste da concentração dos inibidores específicos de ATM e ATR 137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR 55

Tabela 2: Sequência das sondas de DNA utilizadas para construção da curva padrão de cada isoforma de FGFR analisada 56

Tabela 3: Frequência dos cromossomos M1 e M2 nas células parentais Y1 e suas sublinhagens resistentes ao FGF2 87

Tabela 4: Contagem do número de cromossomos das células Y1 e de cada sublinhagem Y1FR 96

Tabela 5: Frequência da fusão entre os cromossomos, possivelmente, 5 e 18 nas células Y1 e em cada sublinhagem Y1FR 97

SUMÁRIO

1. Introdução	22
1.1. Origens históricas dos conceitos de célula e ciclo celular	22
1.2. O sistema de controle do ciclo celular	23
1.3. FGFs: origem histórica, receptores e sinalização molecular	26
1.4. <i>Checkpoints</i> celulares, Estresse Replicativo e a via de Resposta a Dano no DNA (DDR)	32
1.5. As proteínas Ras e a via de sinalização de Ras-MAPK	36
1.6. Modelos de estudo: a linhagem celular Y1, suas sub-linhagens resistentes ao efeito antiproliferativo de FGF2, e as linhagens humanas ESFT	39
2. Motivação	44
3. Objetivos	46
1.1. Objetivo geral	46
1.2. Objetivos específicos	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1. Linhagens celulares e cultura de células	47
4.2. Ensaio Clonogênico, Curvas de Crescimento e Ensaio de Proliferação não aderentes	47

4.3. Extração e Quantificação de Proteínas Totais	48
4.4. SDS-PAGE e Imunoblot	49
4.5. Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	51
4.6. Quantificação da exposição de Simples-fita de DNA	52
4.7. Extração de RNA total e Transcrição reversa	53
4.8. Real-Time qPCR	53
4.9. Imunoprecipitação	56
4.10. Produção e purificação de GST-RBD (Glutathione-S-transferase - Ras Binding Domain)	57
4.11. Análises citogenéticas	59
4.12. CRISPR-CAS9	61
4.13. Substâncias Químicas	62
4.14. Análises Estatísticas	62
5. RESULTADOS	63
5.1. Investigação do mecanismo molecular responsável pelo bloqueio no ciclo celular provocado por FGF2	63
5.1.1. O FGF2 exacerba o estresse replicativo basal de células Y1.....	63
5.1.2. O FGF2 ativa a Resposta de Dano de DNA e o <i>checkpoint</i> dependente de ATR em células Y1	67
5.1.3. A inibição química de ATR é letal para as células Y1, e o FGF2 tem efeito multiplicativo sobre a letalidade da inibição de ATR	70

5.1.4. Eliminação das cópias amplificadas de K-Ras torna as células Y1 imunes à toxidez de FGF2 e, também, à dependência de ATR	74
---	----

5.2. Investigação do mecanismo de resistência ao FGF2 78

5.2.1. As sublinhagens resistentes ao FGF2 apresentam morfologia mais saudável na presença de FGF2, e dependem deste fator para proliferar em cultura	79
---	----

5.2.2. As sublinhagens resistentes ao FGF2 apresentam o mesmo padrão de expressão de isoformas de receptores de FGFs das células parentais Y1	82
---	----

5.2.3. As sublinhagens Y1FR perderam a expressão elevada de K-Ras por eliminação completa do cromossomo M1, e mantêm estritamente o cromossomo M2, cujas cópias de K-ras estão silenciadas	85
--	----

5.2.4. As sublinhagens resistentes ao FGF2 mostraram baixíssimos níveis basais de K-RAS-GTP e eliminaram a expressão da principal RasGEF que as células parentais expressam	91
---	----

5.2.5. As sublinhagens Y1FR são estáveis cariotipicamente, embora apresentem aneuploidia mais severa do que as células parentais e apresentem mais cromossomos fusionados	95
---	----

5.2.6. Os clones resistentes ao FGF2 também são propensos à hiperativação da Resposta a Dano no DNA e à dependência da sinalização de ATR para proliferar e sobreviver	99
--	----

5.3. FGF2 ativa de forma sustentada a via de MAPK-ERK1/2 e sensibiliza células de Sarcoma de Ewing a inibidores do *checkpoint* de ATR

103

6. DISCUSSÃO	108
6.1. O Mecanismo molecular do efeito citotóxico do FGF2 em células murinas Y1 e humas ESFT, dirigidas pela sinalização de Ras	108
6.2. O fenótipo resistente ao efeito citotóxico FGF2, selecionado à partir de células Y1	119
7. CONCLUSÕES	123
7.1. Conclusão geral	123
7.2. Conclusões específicas	124
8. REFERÊNCIAS.....	126
APÊNDICES.....	137

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origens históricas dos conceitos de célula e ciclo celular

Na segunda metade do século XVII, a *Royal Society* de Londres era um ou o centro mundial de registro e divulgação histórica das descobertas científicas e progressos tecnológicos. Seu curador de experimentos, Robert Hooke, ficou conhecido pela descoberta da Lei da elasticidade (Lei de Hooke) e da bomba de ar, pelo aperfeiçoamento do telescópio, e também, pela invenção do microscópio composto. A invenção destes instrumentos para observação e análise experimental representa bem a fronteira do avanço tecnológico dessa época, que propiciou saltos históricos importantes no conhecimento científico. Um bom exemplo desses saltos ocorreu em 15 de abril de 1663, quando Hooke colocou um pedaço de cortiça sob as lentes do seu recém inventado microscópio composto, cuja imagem microscópica mostrou a seus colegas da *Royal Society*, com as seguintes observações: “*Estes poros ou células não muito fundos consistem de um grande número de caixas microscópicas, separadas ao longo do comprimento dos tubos por um tipo de diafragma*” (Moore, J.A. 1966). Esta foi a primeira descrição de uma dimensão microscópica da natureza biológica até então desconhecida: a célula. Mas, o progresso nesta área do conhecimento biológico foi muito lento, como mostra a linha do tempo esquematizada na figura 1. Levou-se mais de três séculos para se chegar ao conceito de organização e dinâmica do ciclo celular como o conhecemos atualmente. Porém, desde então, o avanço desta área acelerou-se vertiginosamente até atingir o estado do conhecimento de hoje, pelo qual o controle do ciclo celular

obedece a uma complexa rede molecular de sinalização, cuja organização e dinâmica está ainda em estudo e no qual está tese se inclui (Figura 1).

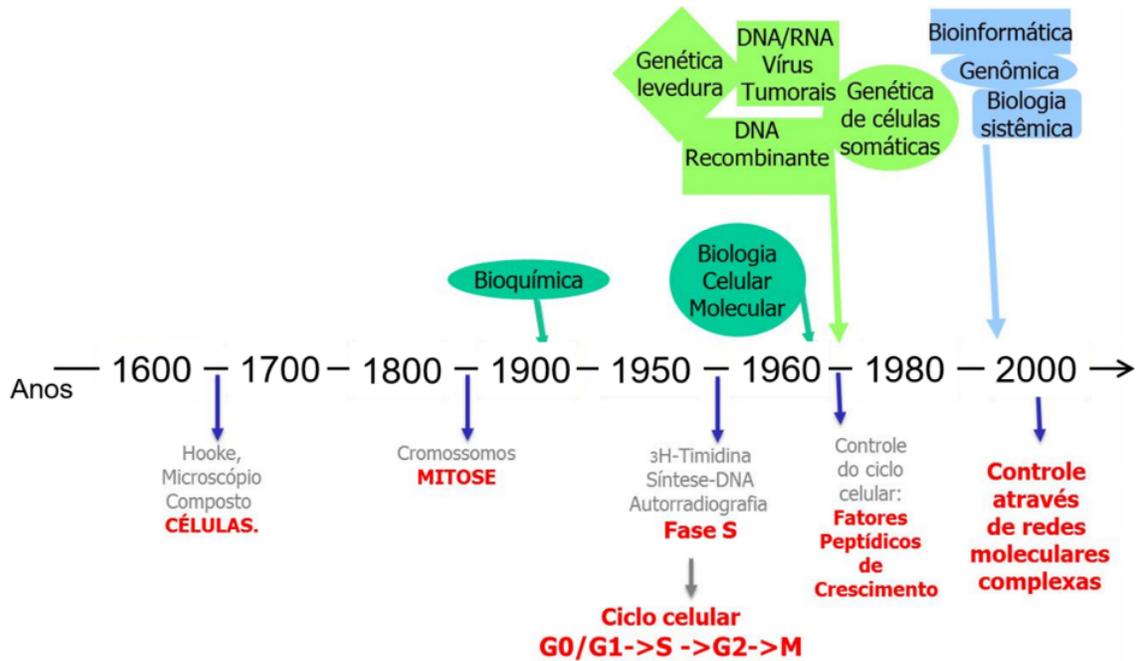


Figura 1: Esquema arbitrariamente reducionista evidenciando a evolução do tema “ciclo celular”: organização, dinâmica e controle biológico” ao longo do tempo. Obviamente, o conhecimento biológico evoluiu de maneira intensa e revolucionária no período entre 1600 e 1900, neste esquema mostrado arbitrariamente “vazio”.

1.2. O Sistema de Controle do Ciclo Celular:

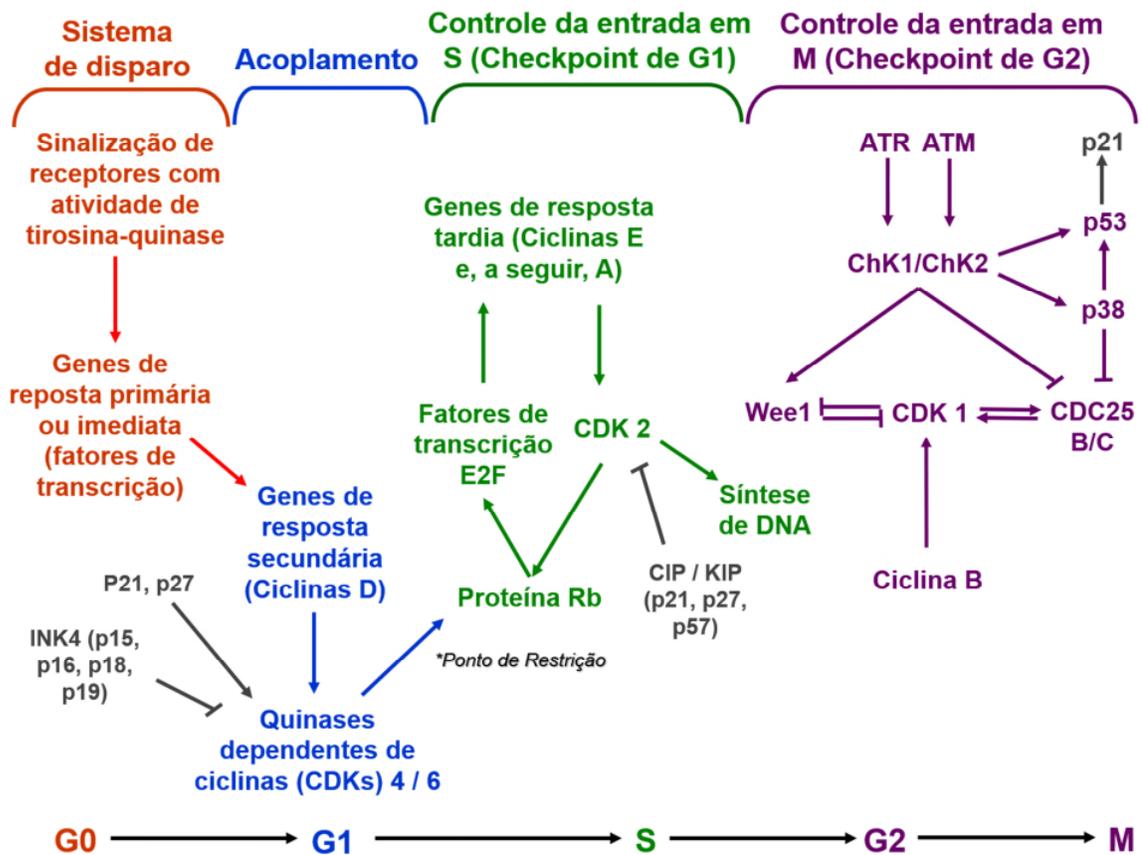


Figura 2: Esquema simplificado dos módulos de sinalização que controlam a entrada e progressão no ciclo celular (Pardee, 1974; Sherr and Roberts, 1999; Bulavin, Amundson and Fornace, 2002).

Para proliferar com sucesso, uma célula precisa crescer, duplicar alguns de seus componentes internos e dividi-los entre as células-filhas. O sistema de controle do ciclo celular consiste de módulos de reações químicas que ordenam rigidamente o tempo e a sequência destes eventos chave. Nos anos 1950 (Figura 1), a descoberta que DNA era sintetizado em um período de tempo definido (fase S) levou à separação do ciclo celular em fases discretas. Assim, as fases de síntese (fase S) e a mitose (fase M) são antecedidas, respectivamente, por 2 intervalos ou *gaps* (G1 e G2). Hoje, sabemos que nestes “intervalos” ocorrem crescimento celular, síntese de componentes estruturais e importantes eventos regulatórios que contribuem para

a ordenação rígida das diversas etapas do ciclo celular. Além disso, antes de comprometer-se com o ciclo celular, as células com capacidade proliferativa passam por um período de transição, denominado G₀, no qual influências regulatórias, como mitógenos e outros sinalizadores extracelulares, podem governar a entrada no ciclo, induzindo a expressão de genes de resposta primária e secundária, conforme detalhado na figura 2. No final de G₁, existe um ponto denominado Ponto de Restrição (em mamíferos), após o qual a célula independe da sinalização de fatores de crescimento para progredir no ciclo celular e completar a mitose (Pardee, 1974).

A figura 2 apresenta uma simplificação dos módulos de sinalização regulatórios que coordenam a progressão ao longo do ciclo celular. Obviamente, níveis adicionais de regulação, que extrapolam o objetivo desta introdução, compõem o sistema geral. A progressão através das fases do ciclo é controlada pelos complexos ciclina-CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*). As diversas CDKs, cujas expressões são constantes ao longo do ciclo, são ativadas sequencialmente e em períodos específicos, quando o balanço entre a expressão e a degradação de suas sub-unidades regulatórias, as ciclinas, é favorável. A ligação das ciclinas às CDKs obedece certo grau de especificidade (figura 2), embora tenha sido relatado certo grau de redundância funcional, promiscuidade e mecanismos compensatórios (Santamaria and Ortega, 2006).

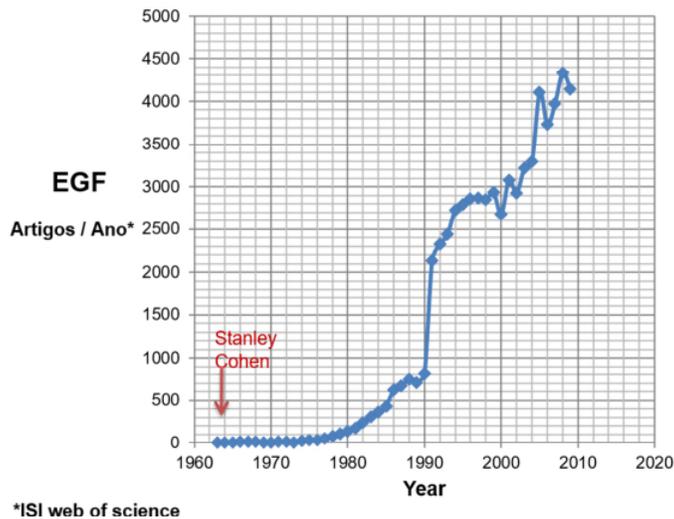
Além das ciclinas, a atividade das CDKs também é controlada por reguladores negativos, denominados CKIs (*CDK inhibitor proteins*). Os CKIs geralmente são expressos em G₁, em resposta a sinais extracelulares antiproliferativos, ou como parte da resposta a dano no DNA. Eles compõem duas

famílias (INK4 e CIP/KIP) com especificidades definidas para as diversas CDKs, conforme apresentado na figura 2.

1.3. FGFs: origem histórica, receptores e sinalização molecular.

No início da década de 70, Hugo Armelin (Armelin, 1973; Armelin, 1975) propôs o seguinte conceito para fator peptídico de crescimento: fator similar a hormônio endócrino que dispara a transição G0 → G1 do ciclo celular. Como prova experimental, tomou a linhagem imortalizada 3T3 de fibroblastos de camundongo e demonstrou que EGF [(*Epidermal Growth Factor*, originalmente descoberto e isolado por Stanley Cohen durante a década de 60 (Cohen, 1962)] tinha a atividade biológica esperada para o conceito proposto, isto é, estimulava fibroblastos 3T3 arrestados na fase G0 do ciclo celular a progredir em G1 e entrar na fase S, sintetizando DNA (Armelin, 1973). Além disso, usando o mesmo ensaio biológico, descobriu que extratos de hipófise bovina continham um fator peptídico desconhecido com atividade de fator de crescimento de fibroblastos ou FGF - *Fibroblast Growth Factor* (Armelin, 1973).

Nos anos que se seguiram, Stanley Cohen, através de uma série de artigos pioneiros, fixou definitivamente o EGF como o protótipo de fator peptídico de crescimento (Carpenter and Cohen, 1979), e por isso dividiu o prêmio Nobel de 1986 com Rita Levi-Montalcini. Com isso, na década de 90, a área de pesquisa sobre “*Peptide Growth Factors-PGFs*” explodiu na literatura científica, inclusive com a descoberta de novas famílias de PGFs (*Peptide Growth Factors*) e respectivos receptores, conforme ilustrado na figura 3.



**Receptores com atividade de
tirosina-quinase (RTK)
>50 Famílias**

**Ligante / RTK ativam a transição
Quiescência → Proliferação**

Artigos publicados em 2009

<i>Epidermal Growth Factor – EGF</i>	4849
<i>Fibroblast Growth Factor – FGF</i>	2427
<i>Platelet Derived Growth Factor – PDGF</i>	1031
<i>Vascular Endothelial Growth Factor – VEGF</i>	5383
<i>Receptor Tyrosine Kinase – RTK</i>	3393

Figura 3: Levantamento do número de artigos publicados por ano sobre o EGF, desde a sua descoberta por Stanley Cohen, e do número de artigos publicados sobre o tema “*Peptide growth-factors*” em 2009.

No caso dos FGFs, nosso maior interesse, eles só ganharam identidade definitiva nos anos 80, com a clonagem e sequenciamento dos mRNAs do FGF1 e FGF2 (Abraham *et al.*, 1986; Jaye *et al.*, 1986), que progressivamente expandiram-se para uma vasta família de 23 proteínas, compreendendo diversas subfamílias de FGFs com diferentes atividades biológicas (Figura 4).

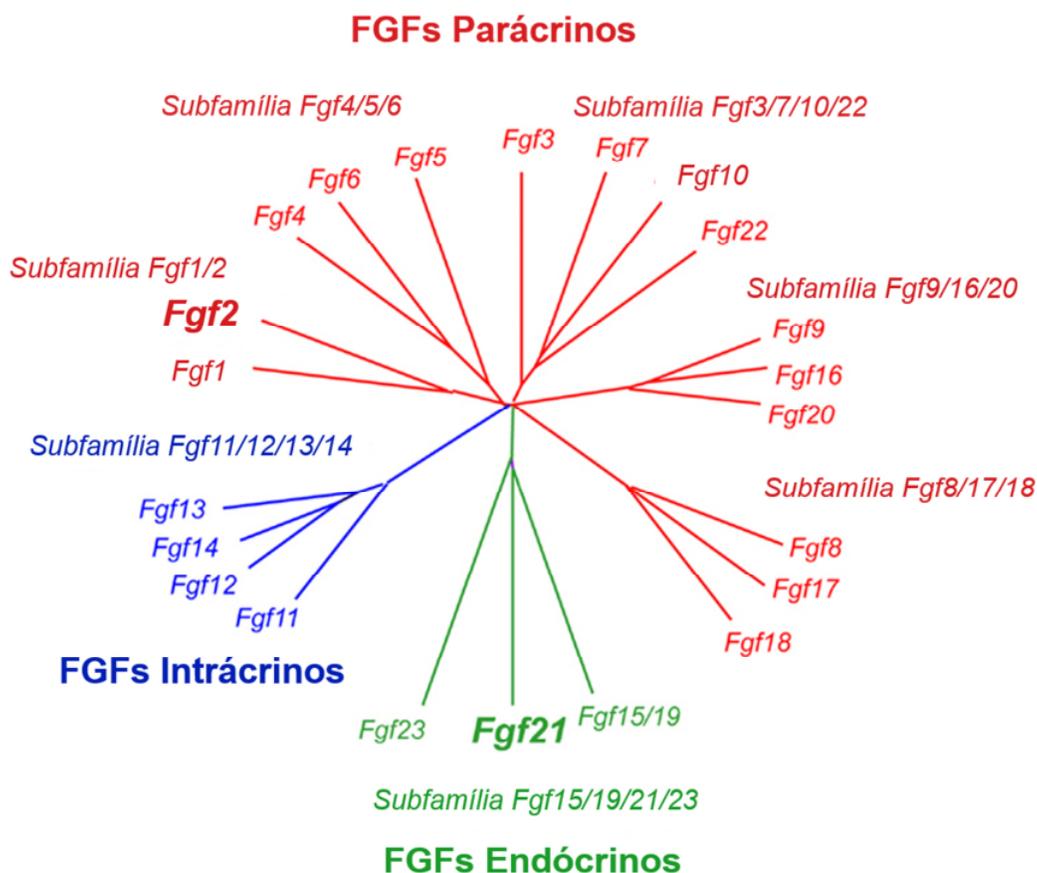


Figura 4: Relações evolutivas entre a família gênica de FGFs, estabelecida por análise filogenética. O comprimento dos ramos é proporcional à distância evolutiva entre cada gene. Modificado de (Ohta and Itoh, 2014).

O FGF2, principal foco desta tese, é um dos mais complexos FGFs, envolvendo proteínas de tamanho e atividades biológicas diferentes, podendo ser agentes parácrinos, autócrinos e intrácrinos (Figura 5). No trabalho experimental desta tese só foi utilizada a forma recombinante do FGF2 de 18,5 kD, que foi adicionado ao meio de cultura para agir paracrinamente através de seus respectivos receptores (FGFRs, Figura 6), ativando as vias mitogênicas intracelulares.

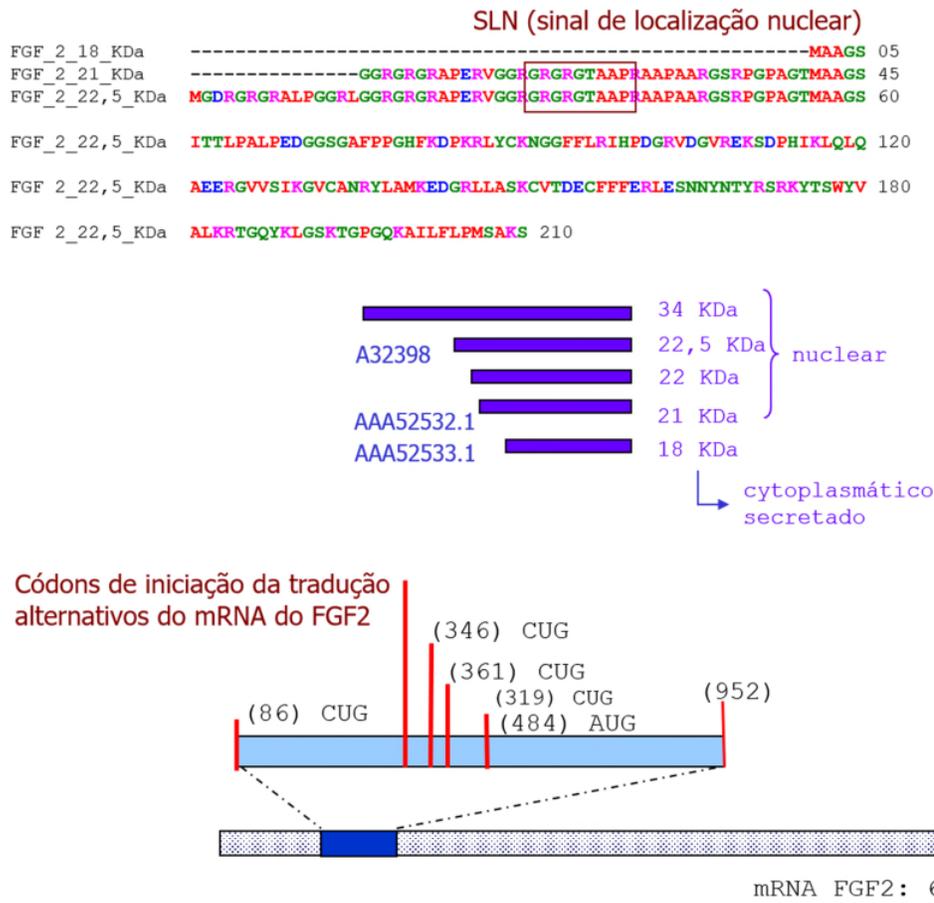


Figura 5: Isoformas de FGF2 expressas em humanos. As diversas formas peptídicas do FGF2 são traduzidas a partir de diversas origens, uma canônica (AUG) e diversas outras não canônicas (CUG), resultando em formas peptídicas com C-terminal comum de tal maneira que as moléculas poliméricas menores estão contidas nas formas peptídicas maiores que se seguem na sequência. Por outro lado, o extenso mRNA contém um segmento codificante relativamente pequeno (85% do mRNA não é processado). O mRNA é transcrito a partir de um longo gene (Arnaud *et al.*, 1999).

A ativação dos receptores de FGF (FGFRs) depende da interação do FGF2 e do próprio FGFR com heparan sulfato, que compõe as cadeias laterais de proteoglicanos de membrana ou que fazem parte da matriz extracelular (Mohammadi, Olsen and Ibrahimi, 2005). Os FGFRs pertencem a uma diversificada família de receptores com atividade de tirosina-quinase. Os transcritos de quatro diferentes genes (FGFR1-4) são alvos de um processo de *splicing* bastante variável

que inclui o uso alternativo dos éxons 8 e 9 (Figura 6). Estes éxons codificam parte do terceiro domínio de imunoglobulina dos FGFR1-3, dando origem, respectivamente, às isoformas IIIb (predominantemente epitelial) e IIIc (predominantemente mesenquimal), com afinidades específicas pelos diferentes FGFs, enquanto o FGFR4 é expresso apenas com o exon 8 (Eswarakumar, Lax and Schlessinger, 2005).

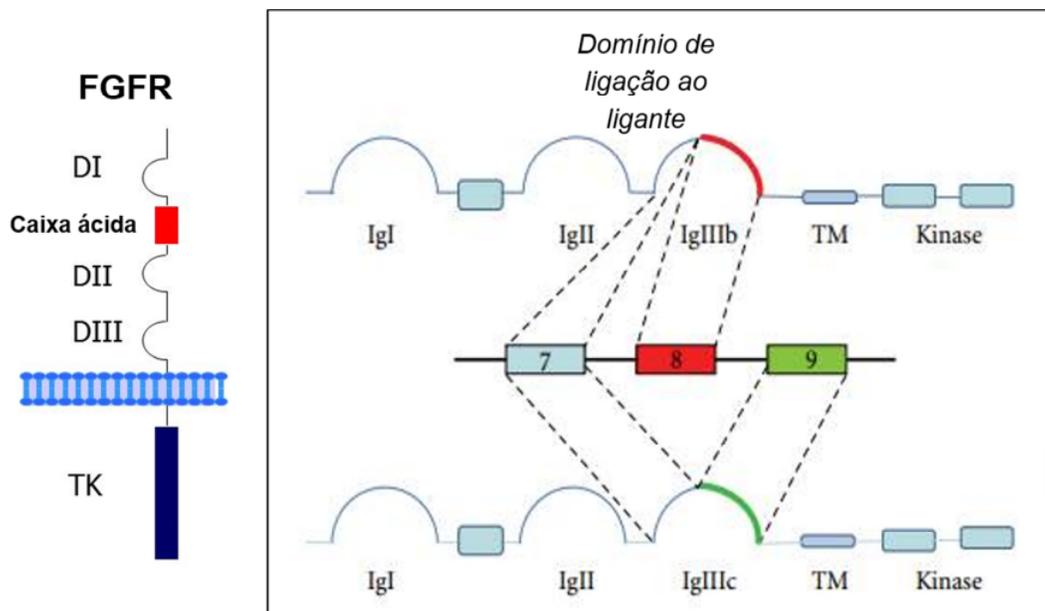


Figura 6: Estrutura dos receptores de FGF (FGFRs). O quadro à esquerda esquematicamente mostra a inserção na membrana plasmática de uma sub-unidade representativa dos FGFRs, destacando os 3 domínios extracelulares (DI, DII e DIII) que são estruturalmente semelhantes a domínios de imunoglobulina e o domínio intracelular de tirosina quinase (TK). À direita, esquema do *splicing* que origina as formas alternativas IIIb e IIIc de cada um dos FGFR1, 2 e 3, enquanto o FGF4 é único. Modificado de (Holzmann *et al.*, 2012).

O FGF ligante promove a dimerização das sub-unidades de FGFR e autofosforilação de múltiplos resíduos de tirosina nos domínios intracelulares dos FGFRs, criando sítios de ligação para moléculas adaptadoras que acoplam o sinal

às vias de sinalização RAS-MAPK (Figura 7), PI3K-AKT, PLCγ e STAT (Ornitz and Itoh, 2015). Dependendo do tipo celular e contexto de sinalizações intracelulares e microambientais, os FGFs podem desencadear proliferação, sobrevivência, migração ou diferenciação celular. Tal diversidade de funções mostra bem a importância biológica da família dos FGFs em diversos processos ontogenéticos e na homeostase do organismo adulto. Mutações de ganho ou perda de função nos FGFRs e alterações nas vias de sinalização dos FGFs estão na etiologia de doenças metabólicas, câncer e diversas síndromes congênitas graves, que geralmente envolvem má formações neurológicas, ósseas ou craniofaciais (Mcmahon, Zijl and Gilad, 2009; Belov and Mohammadi, 2013).

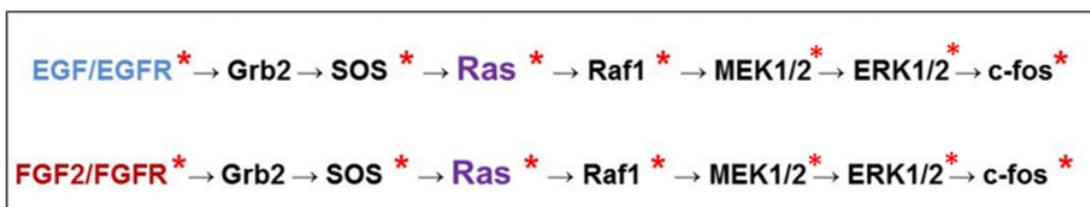


Figura 7: Esquema resumido da principal via mitogênica ativada tanto por EGF/EGFR como por FGF/FGFR; os asteriscos indicam as proteínas reconhecidas como oncogênicas.

Por estimular sobrevivência, migração e proliferação celular, o eixo FGF2/FGFRs tem sido implicado na origem e manutenção de múltiplos processos cancerosos. Por exemplo, a ativação da via de FGF2/FGFR-Erk suporta a manutenção de células tumorais pluripotentes em carcinoma de células escamosas esofágicas (Maehara *et al.*, 2017); FGF2 induz proliferação e invasão de células de melanoma intraoculares (Wang *et al.*, 2017); a amplificação ou mutação de ganho de função em FGFRs foi relatada em tumores com origens em diversos tipos de órgãos

(Kwabi-Addo, Ozen and Ittmann, 2004; Grose and Dickson, 2005; Liu *et al.*, 2014; Ranieri *et al.*, 2017); o FGF2 é encontrado super expresso em diversos tipos de tumores humanos (revisado por Ornitz & Itoh, 2015); entre outros relatos de grande aceitação geral.

Por outro lado, um número crescente de publicações tem reportado atividade anti-proliferativa de FGF2 em células malignamente transformadas, *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, alguns autores demonstraram que o FGF2 inibe a proliferação e promove apoptose em células de tumor de mama MDA-MB-134 e MCF-7 (McLeskey *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1998); bloqueia a proliferação de células de neuroepitelioma (Smits *et al.*, 2000; Higgins *et al.*, 2009) e induz morte celular em sarcomas de Ewing (Sturla *et al.*, 2000; Westwood *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 2004). No entanto, estas publicações ainda não tiveram impacto importante na literatura especializada.

Nesta última linha de publicações, nosso grupo mostrou que o FGF2 tem efeitos antagônicos na proliferação da linhagem Y1 de células murinas tumorigênicas adrenocorticais dependentes de amplificação do oncogene K-ras. Neste caso, o FGF2 estimula a transição G0 → G1, mas bloqueia irreversivelmente a transição G2 → M do ciclo celular (Costa *et al.*, 2008; Salloti *et al.*, 2013). Estes trabalhos inspiraram o desenvolvimento desta tese, cujo objetivo central foi elucidar o(s) mecanismo(s) molecular(es) do bloqueio no ciclo celular de células transformadas por K-Ras, causado pelo FGF2.

1.4. Checkpoints celulares, Stress Replicativo e a via de Resposta a

Dano no DNA (DDR)

Os organismos vivos respondem a perturbações internas e externas orquestrando interações complexas entre um grande número de moléculas intracelulares. Os conjuntos de reações em resposta a cada tipo de stress que uma célula pode sofrer são organizados e coordenados como subsistemas, que podem ser ativados de forma modular. Uma série de análises de rede revelou que estes subsistemas em levedura estão organizados em estruturas de gravata borboleta, em que variados estímulos convergem para uma ou poucas moléculas centrais, que então transmitem sinais regulatórios para diversas moléculas efetoras da resposta celular. Esse tipo de organização foi proposta como subsistemas universais para uma regulação biológica robusta, embora dependa estritamente da estabilidade da molécula central (Kawakami *et al.*, 2016), como bem ilustra o subsistema de sinalização que congrega estímulos variados receptores de fatores de crescimento em direção à Ras, que então transmite o sinal a diversas vias a jusante: uma vez que a regulação da ativação de Ras é perdida, todo o sistema fica comprometido.

Esse tipo de mecanismo molecular, do tipo *switch*, pode assegurar a estabilidade da resposta por incluir mecanismos que ativam moléculas efetoras quando os estímulos atingem uma concentração limiar específica. Os pontos de checagem do ciclo celular, ou *checkpoints*, são subsistemas moleculares de resposta a estresses que são regulados desta mesma maneira. Eles asseguram a ocorrência sequencial correta dos eventos-chave do ciclo celular (Figura 2) e provêm às células uma resposta protetora contra danos no DNA causados por agentes exógenos ou mesmo aqueles inerentes ao processo de replicação do genoma. A ausência da sinalização dos *checkpoints* em uma célula provoca o acúmulo de danos em seu DNA e no de suas possíveis linhagens descendentes, inviabilizando-

as ou alterando a regulação de seus genes de modo a favorecer a transformação maligna.

Existem 3 pontos de checagem clássicos ao longo do ciclo celular, o *checkpoint* de G1, o de G2 e o *checkpoint* da montagem do fuso mitótico. O *checkpoint* de G2 previne a entrada na mitose até que a replicação do genoma tenha ocorrido completamente e eventuais danos no DNA tenham sido reparados. Muitos autores empregam o termo “*Checkpoint* intra-S” para referir-se à sinalização que regula o disparo de origens, estabiliza as forquilhas de replicação e ativa a correção de danos no DNA durante a fase S (Iyer and Rhind, 2017).

Como apresentado na figura 2, a base molecular dos *checkpoints* intra-S / G2 consistem em: a) proteínas sensoras de simples fita de DNA e de modificações em sua estrutura decorrentes de dano (ATM / ATR), b) proteínas ativadoras do *checkpoint* (ChK1 / ChK2), e c) proteínas efetoras da resposta (Wee1, p53, p21, p38 e outras), que compõem vias de sinalização que interrompem a progressão no ciclo celular. Em mamíferos, modificações na estrutura do DNA decorrentes de dano geralmente desencadeiam a ativação da via de ATM → ChK2, bloqueando a progressão através de G1 e de G2. Por outro lado, a exposição de DNA na forma de simples fita, em pequena escala em decorrência do processo normal de replicação do DNA, ou em moderada / grande escala em decorrência de stress replicativo e empacamento de forquilhas de replicação, provoca a ativação da via de ATR → ChK1 (Figura 2), que estabiliza forquilhas e regula o disparo de origens de replicação., inibindo aquelas próximas às forquilhas ativas e ativando o disparo de origens dormentes quando há empacamento de forquilhas previamente disparadas. A incapacidade de restaurar o processo normal de replicação do DNA, com persistência do stress replicativo, causa quebra na dupla-fita de DNA, sinalizada

pela fosforilação do resíduo S139 da variante de histona H2AX (γ H2AX) (Xu *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2016).

Naturalmente, uma vez que a sinalização de ATR é desencadeada pela exposição de DNA simples fita, ela acontece em níveis baixos mesmo em condições normais de replicação do genoma. No entanto, nestas condições a fosforilação das proteínas efetoras do bloqueio no ciclo permanece indetectável, refletindo a ativação do *checkpoint* intra-S com ausência de ativação da Resposta a Dano no DNA. Existe um limiar de stress que ativa tal resposta, e este processo é essencial para o reparo e possível re-entrada no ciclo de divisão (Gelot, Magdalou and Lopez, 2015).

A Resposta a Dano no DNA consiste em diferentes vias, que bloqueiam as células em G2 ou em G1. Os principais eixos desta resposta são os formados pelas vias de ATM \rightarrow ChK2 \rightarrow p53 e ATR \rightarrow ChK1 \rightarrow Wee1 / p53. A p53 também pode ser ativada por ChK1 e ChK2, e participa da resposta ativando a expressão de p21, que inibe as ciclinas e induz a degradação de ciclina B1, essencial para a entrada na mitose (Figura 2). Como ressaltado inicialmente, ativação da DDR provoca a degradação de ciclina B1 apenas quando um limiar de dano no DNA é atingido (Krenning *et al.*, 2014; Müllers *et al.*, 2014). A quinase Wee1 contribui para a inatividade dos complexos ciclina B1-CDK1 ao fosforilar dois resíduos de tirosina (Y14 e Y15) localizados no sítio ativo da CDK1. Além disso, com a participação de proteínas da família 14-3-3, a p53 também estimula a exportação para o citoplasma dos complexos ciclina B1-CDK1 e da CDC25C, responsável pela remoção dos fosfatos inibitórios da CDK1. Dessa forma, uma vez que o limiar de dano é ultrapassado, diferentes eixos de sinalização que compõem a Resposta a Dano no DNA cooperam para bloquear a progressão do ciclo celular.

1.5. As proteínas Ras e a via de sinalização de Ras-MAPK

As proteínas da subfamília Ras são pequenas GTPases que atuam como transdutoras dos sinais de ativação de variados receptores de membrana, transmitindo-os para vias múltiplas, entre as quais a principal via envolvida na estimulação da proliferação ou da diferenciação celular, a via de MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). Atualmente, sabemos que ras é a família de oncogenes mais frequentemente mutada em tumores humanos. Suas mutações ativadoras resultam em elevados níveis de atividade de suas vias efetoras independentemente de estimulação mitogênica. A incidência de mutações em *ras* varia muito, a depender do tipo do órgão e tipo celular que originou o tumor. A maior incidência é encontrada em tumores pancreáticos, mais de 80% dos quais portam mutação em K-ras. Também é alta a incidência, próxima de 50%, em carcinomas colorretais, tireoidianos e pulmonares. De forma geral, 30% de todos os tumores em humanos apresentam mutação em *ras*, entre os quais aproximadamente 85% portam a mutação em K-ras (Bos, 1989b).

Três genes transcrevem as quatro isoformas conhecidas da proteína (K-Ras4a, K-Ras4b, H-ras e N-ras; Figura 8) , que têm 21 kDa e compartilham grande homologia. Os primeiros 85 aminoácidos das proteínas são idênticos e compõem a região de ligação ao GTP e GDP e também as regiões que interagem com as moléculas reguladoras e efetoras de Ras. A região C-terminal é variável e alvo de modificações pós-traducionais, como farnesilação, palmitoilação e geranilgeranilação, que ancoram Ras à face interna da membrana plasmática ou ainda a membranas de organelas intracelulares (Karnoub and Weinberg, 2008).

Ras-GTPases parálogas

 G1
 G2
 G3

H-Ras MTEYK**L**VVV**G**AGG**V**GKSALTIQLIQNHVDEYD**P**T**I**EDSYRKQVVIDGETCLLDIL**D**T**A**G**Q**EEYSAMR
N-Ras MTEYK**L**VVV**G**AGG**V**GKSALTIQLIQNHVDEYD**P**T**I**EDSYRKQVVIDGETCLLDIL**D**T**A**G**Q**EEYSAMR
K-Ras MTEYK**L**VVV**G**AGG**V**GKSALTIQLIQNHVDEYD**P**T**I**EDSYRKQVVIDGETCLLDIL**D**T**A**G**Q**EEYSAMR

 G4

H-Ras DQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHQYREQIKRVKSDDDVPMVL**V****G****N****K**CDLAA
N-Ras DQYMRTGEGFLCVFAINNSKSFADINLYREQIKRVKSDDDVPMVL**V****G****N****K**CDLPT
K-Ras DQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVKSDSDVPMVL**V****G****N****K**CDLPS

 G5

H-Ras RTVESRQAQDLARSYGIPY**I****E****T****S****A****K**TRQGVEDAFYTLVREIRQH**^**ESG**P****G****C****M****S****C****K****C****V****L****S**
N-Ras RTVDTKQAHELAKSYGIPFI**E****T****S****A****K**TRQGVEDAFYTLVREIRQY**^**DGT**Q****G****C****M****G****L****P****C****V****V****M**
K-Ras RTVDTKQAQDLARSYGIPFI**E****T****S****A****K**TRQGVDDAFYTLVREIRKH**^****K****K****K****K****K****S****K****T****K****C****V****I****M**

Variantes de splicing de K-Ras:

K-Ras4B (C-terminal): KKKKKK**S****K****T****K****C**********V****I****M*******

K-Ras4A (C-terminal): K**T****P****G****C*********V****K****I****K****K****C**********I****I****M*******

**** Sítio de Farnesilação**

*** Sítio de Palmitoilação**

*** Três resíduos C-terminais eliminados por proteólise.**

Figura 8: Estrutura primária das isoformas parálogas das proteínas Ras-GTPases.

As proteínas Ras-GTPases possuem dois estados conformacionais distintos – ligadas a GTP são ativas e ligadas a GDP são inativas. Tanto a atividade GTPásica como a permutação dos nucleotídeos de Guanina são dependentes de ativação, tornando as Ras-GTPases interruptores moleculares sujeitos a regulação dependente das necessidades da rede de sinalização na qual estão inseridas. Duas classes de proteínas sinalizadoras regulam a atividade de Ras, influenciando sua transição entre o estado ativo e o inativo. Os Fatores Permutadores de Nucleotídeos de Guanina (GEFs) promovem a permuta dos nucleotídeos pela estimulação da dissociação do GDP e da ligação do GTP do citosol. As proteínas ativadoras da GTPase (GAPs) aumentam a velocidade de hidrólise do GTP pela Ras, inativando-a

(Figura 9). As mutações ativadoras em Ras tornam a proteína resistente à estimulação da GTPase mediada por GAPs, de modo que ela permanece constitutivamente na forma ativa, contribuindo para a transformação maligna. A amplificação do gene selvagem tem efeito similar, uma vez a maior disponibilidade de Ras total resulta em níveis constitutivamente elevados de Ras ativa.

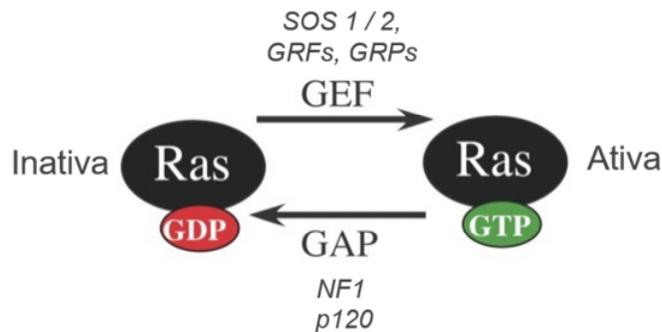


Figura 9: Núcleo de ativação das Ras-GTPases. Modificado de (Sundaram, 2006).

O principal GEF envolvido na ativação de Ras por receptores com atividade de tirosina-quinase é SOS (*Son of Sevenless*), mas membros de outras duas famílias de GEFs também podem ser expressos e desempenhar papéis importantes, dependendo do contexto e tipo celulares: RasGRF 1 / 2 (*Ras Guanine Releasing Factor*), que são expressos preferencialmente no sistema nervoso central (Fernández-Medarde and Santos, 2011), e RasGRP 1-4 (*Ras Guanine Releasing Protein*), que são ativados por diacilglicerol e participam do processo de maturação, resposta e regulação de alguns tipos de células sanguíneas (Ebinu *et al.*, 2000).

Como mencionado anteriormente, uma das vias ativadas por Ras é MAPK, uma cascata de fosforilação serina/treonina, altamente conservada desde leveduras até humanos, e que constitui a principal via de estímulo da proliferação e diferenciação celulares. Três serinotreonino-quinases constituem o módulo central

dessa cascata. A última delas é chamada **proteína-quinase ativada por mitógeno (MAP-quinase ou MAPK)**, também denominada ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). As ERKs são ativadas por uma MAP quinase-quinase, conhecida como MEK em mamíferos (*Mitogen-activated Protein Kinase*), que por sua vez é ativada pela Raf (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*). A Raf quinase é ativada pela Ras ativa (Alberts *et al.*, 2004; Figura 7).

ERK, quando ativada, além de agir no citoplasma, entra no núcleo e ativa a transcrição de um grupo de *genes de resposta rápida* (Figura 2). Alguns desses genes regulam a expressão de outros genes. Dessa forma, a via de sinalização da Ras-MAPK transporta sinais desde a superfície celular até o núcleo, alterando de forma significativa a expressão gênica. Entre os genes ativados dessa forma estão aqueles necessários para a proliferação celular, como as ciclinas de G1 (Figura 2). De modo geral, a via da MAPK é ativada transitoriamente, e o período de tempo em que permanece ativa influencia profundamente a natureza da resposta (Alberts *et al.*, 2004).

1.6. Modelos de estudo: a linhagem celular Y1, suas sub-linhagens resistentes ao efeito antiproliferativo de FGF2, e as linhagens humanas ESFT.

Ao longo de décadas, no Departamento de Bioquímica do IQUSP, o Laboratório de Hormônios, Fatores de Crescimento e Ciclo Celular, liderado por Hugo Armelin e atualmente localizado no Laboratório Especial de Ciclo Celular do Instituto Butantan, tem estudado os mecanismos de controle do ciclo celular em resposta à estimulação de hormônios e fatores de crescimento. Foi assim que entre 2004 e 2008 nosso grupo identificou as atividades antagônicas (mitogênica e anti-

proliferativa) do FGF2 sobre a linhagem Y1 de células murinas adrenocorticais tumorigênicas dependentes de amplificação do oncogene selvagem K-ras. Posteriormente, este efeito foi confirmado em outras linhagens murinas com alta expressão de Ras. A linhagem Y1, isolada há mais de 50 anos, é muito estável tanto funcional como geneticamente, inclusive frente a manipulações genéticas, o que a tornou, por muitos anos, o modelo celular mais importante nos estudos dos mecanismos bioquímicos das vias produtoras de hormônios esteroides sob controle do hormônio hipofisário ACTH (Rainey, Saner and Schimmer, 2004).

Empregando a linhagem Y1 como modelo, mostramos que o FGF2 atua como mitógeno ao estimular a entrada no ciclo celular, mas também bloqueia irreversivelmente o ciclo na fase G2 (Costa *et al.*, 2008; Salotti *et al.*, 2013). As células que estão em S sofrem atraso para completar a replicação do DNA, e análises de citometria de fluxo mostraram que uma parte da população em S, apesar de ter iniciado a replicação, não apresenta síntese ativa de DNA, indicando e causando atraso na progressão de células pela fase S.

A linhagem celular Y1 foi isolada a partir de um tumor funcional do córtex da glândula adrenal de um camundongo macho nos anos 1960 (Yasumura, Buonassisi and Sato, 1966). Cerca de 20 anos depois, seu cariótipo sub-diploide foi rigorosamente descrito e seu fenótipo maligno foi atribuído a uma grande amplificação do proto-oncogene K-ras, recentemente descoberto e cuja função bioquímica era ainda desconhecida (Schwab *et al.*, 1983). A extensa amplificação gênica de K-ras foi localizada em 2 cromossomos marcadores da linhagem Y1, chamados M1 e M2 (George *et al.*, 1982, 1984). Ambos os cromossomos, M1 e M2, mostram uma grande região homogeneamente corada (*Homogeneously Stained Region-1* ou HSR-1 e HSR-2, respectivamente) quando submetidos à técnica de

bandeamento G, na época recentemente desenvolvida e utilizada como método de fronteira para identificação de cromossomos em geral; as cópias amplificadas de K-ras foram localizadas nas HSR-1 e HSR-2 de, respectivamente, M1 e M2 (George *et al.*, 1982). É oportuno mencionar que regiões “HSR” começaram a ser encontradas em cromossomos corados por bandeamento G por volta de 1980, como estruturas esporádicas e estranhas ou anormais, cuja origem e função eram desconhecidas. Logo, diversos citogeneticistas começaram a notar que HSRs eram mais comuns em cromossomos de células malignas, gerando a hipótese de que se tratavam de marcadores de anomalias estruturais genéticas subjacentes à transformação maligna. De fato, a descoberta de cópias amplificadas do oncogene K-ras nas HSRs dos cromossomos M1 e M2 das células tumorais Y1 foi historicamente muito importante por localizar pela primeira vez amplificação oncogênica em uma estrutura cromossômica HSR. Nos anos que se seguiram ficou bem estabelecido que regiões cromossômicas do tipo HSR em geral carregam grandes amplificações gênicas, comumente encontradas em tumores.

Os cromossomos M1 e M2 das células Y1 são facilmente distinguíveis entre os pequenos cromossomos acrocêntricos de *Mus musculus* por seu tamanho maior e morfologia submetacêntrica. M2 apresenta, ainda, uma grande constrição secundária em seu braço maior, uma característica indicativa da presença de genes ribossomais. O cariótipo normal de *Mus musculus* não inclui nenhum cromossomo com constrição secundária, e apresenta as regiões que transcrevem genes ribossomais (Regiões Organizadoras de Nucléolo, ou RONS) distribuídas em diversos cromossomos, especialmente entre os menores (Suzuki *et al.*, 1990).

Mesmo com a presença adicional dos cromossomos M1 e M2, as células Y1 são sub-diplóides, apresentando em média apenas 38 cromossomos, em contraste

com os 40 cromossomos que compõem o cariótipo normal de *Mus musculus* (Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, 1972). Não existem na literatura trabalhos que avaliaram quão homogêneas são as células desta linhagem com relação aos cromossomos que aparecem em monossomias.

Também foram empregadas neste trabalho sub-linhagens clonais resistentes ao FGF2 derivadas de Y1, que foram selecionadas anteriormente em nosso laboratório por tratamento sustentado com FGF2 (T.G.F. Matos, Tese de doutorado, 2007). Cada uma dessas sub-linhagens foi denominada Y1FR-X, um acrônimo para Y1-FGF2 Resistente. Trabalhos prévios de nosso grupo mostraram que um dos clones isolados (Y1FR-10.3) cresce melhor com a presença de FGF2 no meio de cultura do que sem ela. Além disso, Tatiana Matos demonstrou que todos os clones isolados perderam a alta expressão constitutiva de K-Ras, característica das células Y1 parentais, com apenas uma exceção (Y1FR-I) dentre os mais de 10 clones isolados (T.G.F. Matos, Tese de doutorado, 2007), dando crédito à hipótese prévia de que a alta expressão de Ras condiciona a susceptibilidade ao efeito antiproliferativo do FGF2.

Finalmente, alguns experimentos foram realizados com linhagens tumorais humanas cuja sensibilidade ao efeito tóxico do FGF2 está descrita na literatura. Essas linhagens humanas pertencem ao grupo dos tumores familiares de sarcoma de Ewing (*Ewing's Sarcoma Family Tumors*, ou ESFTs), que são um grupo de tumores pouco diferenciados que ocorrem principalmente na infância e adolescência, e derivam de tecidos ósseos e moles (Biswas and Bakhshi 2016). Os efeitos citostáticos e citotóxicos do FGF2 sobre células ESFT foram relatados por alguns pesquisadores nas últimas décadas, com aspectos dos mecanismos moleculares específicos desta toxicidade variando entre esses estudos

(Schweigerer, Neufeld and Gospodarowicz, 1987; Williamson *et al.*, 2004; Passiatore *et al.*, 2011). Efeitos proliferativos sobre células ESFT também foram atribuídos à sinalização de FGF2, freqüentemente sob condições de crescimento com baixo teor de soro (Grünewald *et al.*, 2015; Cidre-Aranaz *et al.*, 2017). As linhagens celulares de sarcoma de Ewing empregadas nesta tese foram A673, RD-ES, SK-N-MC e TC-32.

Assim como os tumores dirigidos por Ras, os tumores da família de sarcomas de Ewing apresentam um mau prognóstico no estágio metastático (taxa de cura de 20 - 40%) e falta de terapias direcionadas clinicamente efetivas (Gaspar *et al.*, 2015). A principal lesão oncogênica das células ESFT é a translocação cromossômica (11;22) (q24; q12), que codifica o fator de transcrição fundido EWS-FLI1. Este fator de transcrição está presente em aproximadamente 85% de todos os espécimes de sarcomas de Ewing (Toomey *et al* 2010), e dirige o fenótipo tumoral destas células tanto por ativar quanto por reprimir a transcrição de genes alvo. Um dos genes reprimidos por EWS-FLI1 é SPRY1, que codifica a proteína Sprouty1, uma supressora tumoral que atua por feedback negativo sobre a ativação de Ras em resposta à ativação específica de receptores de FGF2 (Cidre-Aranaz *et al.*, 2017). Isso explica porquê as células ESFT são particularmente susceptíveis à hiperativação de Ras e de suas vias a jusante em resposta à ativação de FGFRs.

2. MOTIVAÇÃO

O efeito do FGF2 na progressão do ciclo celular de células Y1 foi previamente estudado em nosso laboratório por citometria de fluxo (M.H.S Dias, Tese de doutorado, 2012). Como as células Y1 não respondem bem à sincronização por carenciamento de soro, as análises do efeito do FGF2 em fases específicas do ciclo celular foram realizadas com a sub-linhagem Y1-D1G, um clone de Y1 que foi engenheirado para superexpressar ciclina D1 e que apresenta controle estrito da transição quiescência ↔ proliferação. Essas análises evidenciaram que o FGF2 perturba a progressão ao longo do ciclo celular, atrasando tanto na entrada quanto a progressão pela fase S. 24 horas após a estimulação da população sincronizada em G0/G1, as células estimuladas apenas com soro completaram o ciclo de divisão e iniciaram uma nova fase G1, enquanto as células estimuladas na presença de FGF2 ainda estavam restritas às fases G1 e S do primeiro ciclo.

Além disso, na presença de FGF2, foi identificada uma população de células com conteúdo de DNA correspondente à fase S, mas que não incorporou BrdU durante o pulso de 30 minutos que foi dado antes da coleta, indicando parada de síntese de DNA em células que entraram em S, possivelmente devido a problemas na replicação. O efeito do FGF2 na fase S também foi avaliado por ensaios de tomada de timidina tritiada, em que o FGF2 foi adicionado a células Y1 em diferentes períodos após sincronização e reestimulação com soro. Essas análises revelaram que o FGF2 é capaz de inibir a tomada de timidina apenas quando é adicionado nas primeiras horas do ciclo celular, sugerindo que o mecanismo

molecular de seu efeito antiproliferativo envolve as primeiras vias de sinalização ativadas na reentrada do ciclo de divisão.

Embora muito atrasadas em S, as células tratadas com FGF2 que saíram de G1 passaram a se acumular em G2. O tratamento com colchicina foi incapaz de induzir acúmulo de células em metáfase nas amostras tratadas com FGF2, mostrando que elas estavam impedidas de iniciar a mitose. Assim como observado para o efeito sobre a fase S, o acúmulo de células em G2 ocorreu de forma pronunciada apenas quando o FGF2 foi adicionado entre 0 e 4 horas após a reentrada no ciclo (M. H. S. Dias, Tese de doutorado, 2012).

Considerando esse cenário previamente conhecido, o objetivo desta tese foi desvendar o mecanismo molecular deste efeito citotóxico que o FGF2 exerce seletivamente em células transformadas por Ras. Para isso, investigamos algumas vias de sinalização e alvos moleculares modificados pela atividade do FGF2 em células Y1 e também exploramos clones resistentes ao tratamento sustentado de FGF2, que foram previamente isolados em nosso laboratório (T.G.F. Matos, Tese de doutorado, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desvendar o(s) mecanismo(s) molecular(es) do efeito citotóxico que o FGF2 exerce em algumas células transformadas pela atividade de Ras.

3.2. Objetivos Específicos

1. Identificar as vias de sinalização responsáveis pelo bloqueio da entrada na mitose induzido pelo FGF2 em células Y1.
2. Identificar o mecanismo responsável pela resistência ao FGF2 nas sublinhagens Y1FRs.
3. Analisar se os mecanismos identificados como responsáveis pelo efeito tóxico do FGF2 em células Y1 também se aplicam a linhagens celulares humanas derivadas de sarcomas de Ewing, cuja inibição do crescimento e indução de morte por FGF2 estavam previamente caracterizadas na literatura.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens celulares e cultura de células

A linhagem celular de carcinoma adrenocortical murino Y1 (Yasumura, Buonassisi and Sato, 1966) foi obtida da ATCC e cultivada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Invitrogen) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (FCS) (CultiLab), 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina.

Para sincronização da população celular em G₀/G₁, o meio de cultura foi removido e substituído por DMEM fresco sem soro, após lavagem da placa com PBS (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM ;KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,2). Após 48 horas de privação sérica, as células foram estimuladas com soro (10% v/v) ou soro + 10 ng/mL FGF2, pelo período adotado em cada experimento. Para subcultivo ou plaqueamento, as células foram lavadas PBSA e, após adição de tripsina (Sigma) e total descolamento da superfície da garrafa, as células foram ressuspendidas em DMEM + 10% soro (v/v).

As sublinhagens resistentes ao FGF2 (Y1FRs) foram previamente selecionadas e isoladas em nosso laboratório (T.G.F. Matos, Tese de doutorado, 2007). Elas foram mantidas em cultura nas mesmas condições que a linhagem parental Y1, acrescidas de 10 ng/mL de FGF2.

4.2. Ensaio Clonogênico, Curvas de Crescimento e Ensaio de Proliferação não aderentes

Para ensaios clonogênicos, foram plaqueadas 10^4 células por placa de 35 mm de diâmetro, de poliestireno (Corning). No dia seguinte, os tratamentos indicados em cada experimento foram adicionados ao meio de cultura nas concentrações indicadas, e o meio de cultura com tratamentos foi renovado a cada dois dias. Após incubação (16-22 dias), as colônias foram fixadas em formaldeído a 4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS), coradas com cristal violeta a 0,1% e contadas manualmente.

Para analisar a proliferação celular, $5 \cdot 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 35 mm (Corning). No dia seguinte, os tratamentos foram adicionados conforme indicado em cada experimento. A cada 2 dias, as células das amostras a serem coletadas foram lavadas com PBS, tratadas com tripsina e fixadas com formaldeído 4% em PBS. As concentrações das suspensões celulares foram medidas com o contador de partículas Z Coulter (Beckman).

Para ensaios de proliferação não aderentes, $1 \cdot 10^4$ células de cada uma das linhagens celulares empregadas foram plaqueadas em placas de 96 poços de fixação ultra baixa em meios completos. A viabilidade / proliferação celular relativa foi medida após 1 dia, para estabelecer uma linha de base e após 10 dias para medir a proliferação usando CellTiter 96 AQueous (Promega). Pelo menos 10 poços por célula foram ensaiados em cada ponto de tempo.

4.3. Extração e Quantificação de Proteínas Totais

Após plaquamento e tratamento das células nas condições indicadas em cada experimento, elas foram lavadas com PBS gelado, e coletadas em tampão de

lise RIPA (Sigma #R0278), com inibidores de proteases (1 mM de ortovanadato de sódio, 1 mM de PMSF, 2 mg/mL de aprotinina, 2 mg/mL de pepstatina A, 2 mg/mL de leupeptina, 1mM Fluoreto de sódio e 1mM Ditioneitol). As placas foram deixadas sobre gelo por 5 minutos e então raspadas para coleta dos lisados celulares com o auxílio de um raspador de células. Após completa homogeneização, os lisados foram transferidos para tubos eppendorf® e incubados no gelo por 10 minutos. As amostras foram congeladas a -20°C por 24 horas. A seguir, foram centrifugadas a 12.000g durante 13 minutos a 4°C, e o sobrenadante de cada amostra, contendo as proteínas solúveis, foi transferido para um novo tubo eppendorf® e quantificado por espectrofotometria (Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 pro) utilizando o reagente de Bradford (BioAgency).

4.4. SDS-PAGE e Imunoblot

30-50 mg de proteínas foram resolvidas por electroforese em gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, 12% de acrilamida / bis-acrilamida) e transferidas para membranas de Nylon (Hybond C +, Amersham Biosciences). As membranas foram bloqueadas durante 1 hora em tampão TBS-T (cloreto de sódio 150 mM, Tris 50 mM [pH 8] e Tween 20 a 0,1%) contendo 5% de leite desnatado e depois incubadas com o anticorpo primário na concentração indicada pelo fabricante, por 12 horas a 4°C sob leve agitação. As membranas foram, então, lavadas por 3 ciclos com TBS-T 5 minutos. Após incubação por 1 hora com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (KPL), as membranas foram expostas ao substrato quimioluminescente SuperSignal West Pico (Thermo Fisher #34080) e o sinal foi imediatamente captado pelo transiluminador Alliance 4.7

(Uvitec). A quantificação de bandas foi feita com o software Alliance mini4 (Uvitec), e a normalização baseou-se nos genes housekeeping Actina ou HPRT de cada membrana.

Anticorpos Primários:

- Anti pH2AX-S139 (ab11174 Abcam)
- Anti ATR (2790 Cell Signaling); Anti Fosfo-ATR S428 (2853 Cell Signaling)
- Anti ChK1 (ab47574 Abcam); Anti Fosfo-ChK1 S345 (sc-17922 Santa Cruz)
- Anti ChK2 (ab47433 Abcam); Anti Fosfo-ChK2 T383 (ab59408 Abcam)
- Anti Wee (ab2315 Abcam); Anti Fosfo-Wee S642 (4910 Cell Signaling)
- Anti CDK1 (ab18 Abcam); Anti Fosfo-CDK1 Y15 (sc-54 Santa Cruz)
- Anti p38 (9212 Cell Signaling); Anti Fosfo-p38 T180/Y182 (sc-15852-R Santa Cruz)
- Anti p53 (sc-55476 Santa Cruz); Anti Fosfo-p53 S15 (9284 Cell Signaling)
- Anti p21 (sc-397 Santa Cruz)
- Anti Actina (ab8227 Abcam)
- Anti Hprt (sc-20975 Santa Cruz)
- Anti K-Ras (sc-30 Santa Cruz)
- Anti ERK (4695 Cell Signaling); Fosfo-ERK T202/204 (4370 Cell Signaling)
- Anti FGFR1 (sc-121 Santa Cruz)
- Anti FGFR2 (sc-122 Santa Cruz)

- Anti FGFR3 (sc-123 Santa Cruz)
- Anti FGFR4 (sc-9006 Santa Cruz)
- Anti BrdU conjugado a *Alexa Fluor® 488* (B35130 Invitrogen)

Anticorpos Secundários:

- *Goat anti-rabbit* conjugado a peroxidase (474-1506 KPL)
- *Goat anti-mouse* conjugado a peroxidase (04-18-06 KPL)

4.5. Análise do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

Após sincronização em G0/G1, as células foram tratadas com soro ou soro + FGF2, adicionadas ou não a inibidores químicos por períodos específicos, conforme descrito em cada experimento. As células foram, então, tripsinizadas, lavadas com PBS gelado e fixadas em etanol a 75% em PBS gelado overnight a 4°C. Após lavagem com PBS gelado, as células foram tratadas com 10 mg/mL de RNase A e coradas com iodeto de propídio a 50 mg/mL em PBS durante 20 minutos antes da análise em um citômetro de fluxo (Attune NxT, Life Technologies). Para medida da população celular positiva para γ H2AX, antes do tratamento com Rnase e iodeto de propídeo, as células foram incubadas com o anticorpo pH2AX-S139 conjugado a Alexa-488 (Thermo Fisher) na concentração indicada pelo fabricante, por 1 hora a temperatura ambiente e sob leve agitação; e a seguir, lavadas 2 vezes com PBS gelado antes da adição de Rnase e iodeto de propídeo. Os dados foram analisados com o software FlowJo V.10 (Treestar, INC.), e a fluorescência basal de amostras controle não incubadas com as substâncias fluorescentes foi descontada de todas as amostras.

4.6. Quantificação da exposição de Simples-fita de DNA

Para a detecção de fragmentos longos de DNA fita simples (ssDNA), característicos de estresse replicativo (Syljuåsen *et al.*, 2005), células em crescimento exponencial foram cultivadas em lamínulas de vidro, e 50 mM de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) foi adicionado ao meio de cultura durante 48 horas, para permitir a sua incorporação ao DNA. O meio de cultura foi, então, removido, e as células lavadas com PBS. Meio DMEM fresco foi adicionado com ou sem 10 ng/mL de FGF2 durante 24 horas. Para garantir que todas as células incorporaram BrdU, 1 lamínula adicional para cada condição analisada foi preparada para ser submetida a desnaturação de DNA usando HCl 2 M. Em seguida, as células foram fixadas usando 4% de paraformaldeído em PBS durante 15 minutos em temperatura ambiente. As células foram então lavadas novamente com PBS e permeabilizadas com 0,2% de Triton-X 100 em PBS durante 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, todas as amostras foram lavadas e incubadas com anticorpo de rato anti-BrdU (Abcam) diluído 1: 250 em solução bloqueadora de albumina de soro bovino a 4% (p / v) durante 3 horas em temperatura ambiente. Seguiu-se incubação por mais 3 horas com anticorpo secundário de cabra anti-rato conjugado a Alexa Fluor 555 (Thermo Scientific). Depois disso, as lamínulas foram lavadas com PBS e depositadas em lâminas. O meio de montagem VECTASHIELD® com DAPI (Vector Labs) foi usado para marcar o DNA e conservar a fluorescência. As lâminas foram, então, seladas com esmalte de unha incolor. As imagens foram capturadas usando o microscópio de fluorescência Olympus BX51 acoplado a uma câmera digital (XM10, Olympus) e foram analisados usando Software Olympus - Cell F (versão 5.1.2640).

4.7. Extração de RNA total e Transcrição reversa

O RNA total das células foi extraído com kit Illustra RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare #25-0500-72) seguindo as indicações do fabricante. As amostras foram tratadas com DNase I. Imediatamente após a extração, as frações de RNA foram quantificadas espectrofotometricamente (Nanodrop, ThermoFisher Scientific) em comprimentos de onda de 280 nm e 260 nm e armazenadas a -80°C até o momento de uso. A seguir, o DNA complementar (cDNA) ao conjunto de RNAs mensageiros das células foi sintetizado por transcrição reversa com o kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific), e utilizado como molde para a reação de PCR em tempo real.

4.8. Real-Time qPCR

A fim de quantificar de forma absoluta e específica as várias isoformas existentes de receptores de FGF, foram desenhados primers específicos (Invitrogen) para cada isoforma (IIIb ou IIIc) de cada receptor de FGF (FGFR1-4). O receptor 5 não foi incluído na análise por não apresentar um domínio transmembranar. Além disso, trechos específicos da sequência de cDNA de cada isoforma de receptor foram sintetizados e utilizados como sondas para serem reconhecidas pelos mesmos pares de primers desenhados para cada isoforma. Essas sondas foram utilizadas na construção de uma curva padrão para cada isoforma de receptor, o que nos permitiu calcular o número absoluto de moléculas de transcritos de cada isoforma presente em 40 ng do RNA celular total. Assim como para as amostras experimentais, cada ponto da curva padrão foi preparado em triplicata e na mesma placa de cada respectivo gene, de forma que a amplificação

da curva e das amostras experimentais ocorreu na mesma corrida. Com exceção das isoformas de FGFR, todas as demais análises de transcrição aqui apresentadas foram quantificadas de forma relativa, tomando como comparação a condição não tratada. HPRT foi utilizado como controle endógeno normalizador para os dados de expressão de RNAm.

Os primers foram desenhados utilizando a ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), de acordo com sequências consenso de cDNA depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Primeiramente, foi realizada uma PCR *in silico* para verificar a especificidade dos primers à sequência de interesse. Para esse fim, foi utilizada a ferramenta desenvolvida por Jim Kent e disponível on-line no portal da University of California Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu>).

A reação de PCR foi preparada da mesma forma independentemente do método de quantificação (absoluto ou relativo). Para cada reação, foi adicionado o mix do kit SYBR® GREEN PCR Master Mix (10 µL, (ThermoFisher Scientific #4309155), alíquotas das reações de transcrição reversa (40 ng de RNA da RT), soluções de oligonucleotídeos *primers forward* e *reverse* (2,5 µL de cada, 300 nM). As amplificações foram realizadas em ciclos de reações de desnaturação (95 °C, 15 seg), de anelamento e de polimerização (60 °C, 60 seg) em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) e os dados foram coletados pelo programa StepOne (Applied Biosystems). Para cada reação foi determinada a eficiência dos primers (software LinRegPCR v. 12.17), que foi usada para a quantificação relativa dos dados obtidos pelo método de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Tabela 1: Sequência dos primers utilizados nas reações de PCR

Alvo	Forward Primer	Reverse Primer
FGFR1-IIIb	TGGAGGTGCTTCATCTACGG	TAGAGTTACCCGCCAAGCAC
FGFR1-IIIc	TCCTGCATGTTGGGCTCTG	CTGGCTATGGAAGTCGCTCT
FGFR2-IIIb	GTGACGGAGATGGATGCTGG	GGCAGACTGGTTGGCCTG
FGFR2-IIIc	CGGACAAAGAGATTGAGGTTCTC	CCAAGCACGTATATTCCCCAG
FGFR3-IIIb	CCAATGTGTCTCGGAGCGGG	CCTTCTCAGCCACGCCTATG
FGFR3-IIIc	CCGACAAGGAGCTAGAGGTTC	CCAGGCAGGTGTACTCCCC
FGFR4-IIIc	TTTCTACCAGTCAGCGTGG	CCTCAGGGGTTGCTGTTGTC
K-ras	TGGATGAGTACGACCCTACGAT	CTTGACCTGCTGTGTCGAGAAT
HPRT	GTTGGATATGCCCTTGACTATAATGAG	GGCTTTGTATTTGGCTTTTCCAG
SOS1	AGG TTCAGGGGCAAGTTCAC	AACACGTTCTCCACATCTGA
SOS2	AGTCCATTGCTGACGGCTTT	CTTCACTGCATGCCTTCAACTTT
GRF1	CGAGAAACAGCGTCATAGCA	AGACTTCAAGGGTGGCTGTC
GRF2	ACCAGCAGCCAAAGGTCATA	GCAGGGAGTCGAGGTTCAAT
GRP1	GTGTTTCGAGTGCAAGAAGCG	ATCCTTCTTCGGGTGCATGG
GRP2	AAAGGACTTGGGGGTCCGAA	CAGAGTGCTCGTCATGGTCG
GRP3	GCCATCTTGAGGGGTTTCAGG	AGAATGCTCCGAATCCGC
GRP4	GAAAGCCCACGTTCTGTCAC	CCACAGTCCCGACAGCGATA

Tabela 2: Sequência das sondas de DNA utilizadas para construção da curva padrão de cada isoforma de FGFR analisada.

Alvo	Sequência da sonda utilizada para curva padrão
FGFR1-IIIb	ATACCACCGACAAGGAAATGGAGGTGCTTCATCTACGGAATGT CTCCTTTGAGGATGCGGGGGAGTATACGTGCTTGGCGGGTAAC TCTATCGGACTCTC
FGFR1-IIIc	ACTGCACCGGGGCCTTCCTGATCTCCTGCATGTTGGGCTCTGT CATCATCTATAAGATGAAGAGCGGCACCAAGAAGAGCGACTTC CATAGCCAGATGGC
FGFR2-IIIb	GCTGGCTCTGTTCAATGTGACGGAGATGGATGCTGGGGAATAT ATATGTAAGGTCTCCAATTATATAGGGCAGGCCAACAGTCTGC CTGGCTCACTGTC
FGFR2-IIIc	CGGTGTTAACACCACGGACAAAGAGATTGAGGTTCTCTATATTC GGAATGTAACTTTTGAGGATGCTGGGGAATATACGTGCTTGGC GGGTAATTCTATC
FGFR3-IIIb	CGCCTCCGCCTGGCCAATGTGTGCGGAGCGGGACGGGGGCGA GTACCTCTGTGAGCCACCAATTTTCATAGGCGTGGCTGAGAAG GCCTTTTGGCTGCGTG
FGFR3-IIIc	GCAGGCGCTAACACCACCGACAAGGAGCTAGAGGTTCTGTCC TTGCACAATGTCACCTTTGAGGACGCGGGGGAGTACACCTGCC TGGCGGGCAATTCTA
FGFR4	GCAACTCCATCGGCCTTTCCTACCAGTCAGCGTGGCTCACGGT GCTGCCAGAGGAAGACCTCACGTGGACAACAGCAACCCCTGA GGCCAGATACACAGA

4.9. Imunoprecipitação

Beads magnéticos ligados à proteína A (Protein A Dynabeads – Invitrogen) foram ressuspensos por rotação por cinco minutos. 50 µl foram transferidos para um tubo eppendorf de 1,5 ml, o qual foi colocado em suporte magnético (DynaMag – Invitrogen) para permitir a separação dos beads da solução. O pellet foi lavado uma vez em PBS e foi adicionado 1-10 µg do anticorpo de interesse diluído em 200 µl de TBS-T. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, sob leve agitação. A seguir, os tubos foram transferidos para o suporte magnético para formação do pellet, o sobrenadante foi removido e os beads foram ressuspensos em 200 µl de TBS-T. O pellet foi novamente formado com auxílio do suporte magnético, o sobrenadante foi removido e então foi adicionado o lisado celular contendo 500 µg de proteínas totais. A mistura foi novamente incubada sob leve agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. Os beads foram separados com auxílio do suporte magnético e lavados três vezes em PBS antes de serem ressuspensos em 100 µl de PBS. Eles foram, então, transferidos para novo tubo, novamente separados da solução e ressuspensos em 50 µl de tampão de amostra. A seguir, foram fervidos por 5 minutos e aplicados em gel de poliacrilamida. A corrida foi seguida por *Western blotting*.

4.10. Produção e purificação de GST-RBD (Glutathione-S-transferase - Ras Binding Domain)

A produção e purificação de GST-RBD foram realizadas conforme descrito por Juliana D. Zeidler (Tese de doutorado, 2012): Bactérias BL-21 competentes foram transformadas com o plasmídeo pGEX-GST-RBD e plaqueadas em LB-ágar suplementado com 100 µg/ml de ampicilina (LB/amp). Uma colônia foi coletada e

cultivada em 200 ml de LB com 100 µg/ml de ampicilina (LB/Amp) por 16h a 37°C sob agitação. Esses 200 ml foram diluídos em 2L de LB/Amp, incubados a 37°C sob agitação até atingir a densidade óptica de 0,84 (600 nm), o que levou cerca de 1 a 2h. Para indução da proteína de fusão foi adicionado IPTG a 0,5 mM nos 2L de meio com bactérias, sendo incubado por mais 2h a 37°C sob agitação. A suspensão de bactérias foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sedimento de bactérias foi posto em gelo e ressuscitado com 20 ml de tampão de lise (50 mM de Tris pH 7.5, 1% de triton X-100, 150 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml de leupeptina e aprotinina). As bactérias foram então lisadas com auxílio de sonicador (10 sonicações de 1 minuto, com intervalo de 1 minuto, com o tubo imerso em gelo). A suspensão resultante foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante coletado e congelado a -80°C com 10 % de glicerol ou imediatamente usado para purificação da proteína de fusão. Meio mililitro de beads Glutathiona-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) previamente lavados por 3 x com PBS gelado, foi incubado com 12 ml do extrato de bactérias, obtido no procedimento anterior, por 1,5h a 4°C sob rotação. O tubo foi centrifugado por 3 minutos a 3.000 rpm e os beads foram transferidos para eppendorf de 1,5ml e resuscitado com 1ml de tampão de lavagem (50 mM de Tris pH 7.5, 0,5 % de Triton 65 X-100, 150 mM de NaCl, 5mM de MgCl₂, 1 mM de PMSF, 1 µg/ml de leupeptina e aprotinina), lavados por 6x e ressuscitados em 5ml do mesmo tampão na presença de glicerol a 10%. Cem microlitros dessa suspensão contendo a proteína de fusão e beads foram aliquotados em tubos eppendorf e armazenados a -80°C até o momento do uso.

3.7.2 Precipitação de Ras-GTP

Uma alíquota de preparação de GST-RBD com beads de glutathiona-sepharose foi centrifugada (2.000 rpm por 4 minutos) e lavada seis vezes com tampão de lise RIPA mais inibidores (PSFM a 1 mM, 1 mg/ml de

aprotinina, 1 ml/ml de pepstatina A, leupeptina a 10 mg/ml e DTT a 1 mM). A seguir, essa preparação foi incubada com 600 µg de lisado protéico de células por 1 hora a 4°C, centrifugada e lavada três vezes com tampão RIPA mais inibidores, sendo os beads ressuspensos em tampão de amostra de proteínas. Estas foram fracionadas em gel de 10-15% de SDS-poliacrilamida e submetidas a *Western blotting* para Ras.

4.11. Análises Citogenéticas

Em uma garrafa com células em confluência entre 50-60%, foram adicionadas 16 µg / mL de colchicina por 1 hora e 40 minutos. A seguir o meio de cultura foi retirado, a superfície aderente da garrafa foi lavada com PBS e as células foram resuspensas em 10 mL de meio de cultura fresco após tratamento com tripsina. Este volume foi dividido entre 2 tubos de 15 mL, que foram centrifugados a aproximadamente 120 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células em cada tubo foram resuspensas em 5 mL de uma solução de KCL a 0,075M (pH 7.0 – 7.5) e incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. A seguir, os tubos foram recentrifugados, o sobrenadante descartado e as células resuspensas em 5 mL do fixador Carnoy (3 partes de metanol para cada parte de ácido acético). Este ciclo foi repetido 3 vezes. Com o auxílio de uma pipeta pasteur, gotas desta suspensão celular foram pingadas em lâminas de vidro limpas a uma distância aproximada de 70 cm. As lâminas secaram à temperatura ambiente por um dia antes dos cromossomos serem corados. Para coloração convencional, sem bandeamento, foi utilizado o corante Giemsa (Merck) diluído em água a 2%. As lâminas ficaram imersas no corante por 2-3 minutos, lavadas com água, e no dia

seguinte analisadas ao microscópio para registro fotográfico dos conjuntos cromossômicos.

Para montagem de cariótipos, foi utilizada a técnica de bandeamento G: as células foram preparadas como descrito acima e as lâminas ficaram secando por 48 horas à temperatura ambiente. A seguir, foram imersas em uma solução de tripsina (Sigma) diluída em PBS 1:1000 por 4-8 segundos, e então foram lavadas com PBS. A coloração foi feita com o corante Wright, diluído uma parte para cada três partes de PBS, por 2 minutos. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com água e deixadas em temperatura ambiente para secagem até o dia seguinte, quando o registro microfotográfico foi realizado.

Para análise das regiões de heterocromatina constitutiva (nas linhagens celulares aqui utilizadas, exclusivamente regiões centroméricas), foi utilizada a técnica de bandeamento C: a preparação citogenética foi feita conforme detalhado acima e as lâminas foram deixadas em estufa (37°C) por 2 dias. A seguir, foram imersas em uma solução de HCl 0,2N por 10 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram, então, lavadas com água e imersas em uma solução de hidróxido de bário [Ba(OH)₂, 5% em água] a 60°C, por aproximadamente 8 segundos, seguido de lavagem com água e imersão rápida (1 segundo) em HCl 1N a 60°C, e lavagem com água novamente. A seguir, as lâminas ficaram imersas em uma solução de SSC 2x a 60°C por 20 minutos, foram lavadas com água e imersas na solução do corante (Giemsa, 2% em tampão fosfato) por 5 minutos.

Para análise das regiões organizadoras de nucléolo ativas, foi utilizada a técnica de bandeamento Ag-NOR: a preparação citogenética foi feita conforme já descrito e pingada sobre a lâmina 2 ou 3 dias antes do tratamento para

bandeamento. As lâminas foram colocadas em uma câmara úmida (placa de petri com papel umedecido), e sobre elas foi feito um filme de uma solução coloidal [2% de gelatina em pó (Sigma #G9136), 1% de ácido fórmico, em água] com nitrato de prata (50%). As lâminas foram, então, cobertas com lamínulas e levadas ao forno (70°C) por aproximadamente 5 minutos. As lamínulas foram removidas e as lâminas foram lavadas com água e secas em temperatura ambiente até o dia seguinte.

4.12. CRISPR-CAS9

Quatro RNAs guias (gRNAs) específicos contra K-ras foram desenhados usando a ferramenta de design CRISPR (<http://crispr.mit.edu/>). Uma sequência de codificação aleatória (SCR) também foi desenhada para controle. As seqüências são mostradas abaixo.

K-Ras (1) - AAGAGGAGTACAGTGCAATG

K-Ras (2) - CTGAATTAGCTGTATCGTCA

K-Ras (3) - AGATATTCACCATTATAGGT

K-Ras (4) - CAATGAGGGACCAGTACATG

SCB – GCACTACCAGAGCTAACTCA

Os oligonucleotídeos foram clonados no plasmídeo LentiCRISPR v2 (Addgene # 52961) de acordo com descrito em Sanjana et al., 2014. Para a produção de partículas lentivirais, as construções LentiCRISPR v2, psPAX2 (Addgene # 12260), pCMV-VSV-G (Addgene # 8454) foram transfectadas em

células HEK293T usando o reagente lipofectamina 3000 (ThermoFisher # L3000001), de acordo com o protocolo do fabricante. 48 horas após a transfecção, o sobrenadante viral foi coletado, filtrado e adicionado ao meio de cultura de células Y1, após a adição de 8 ug / ml de polibreno. 48 horas após a transfecção de Y1, as células foram selecionadas com 3 ug / ml de puomicina durante 7 dias antes de testar a eficiência de eliminação de K-ras por *Western blotting*.

4.13. Substâncias Químicas

O FGF2 foi produzido no laboratório por tecnologia recombinante e usado sempre na concentração de 10 ng/mL. Cafeína foi obtida da Sigma (#C0750), KU55933 foi obtido da Tocris (#3544), e VE-821 foi obtido da Selleckchem (#S8007). Essas três substâncias foram usadas na concentração de 2mM.

4.14. Análises Estatísticas

Experimentos com dois grupos em comparação foram analisados com teste *t* de Student pareado, e experimentos com três ou mais grupos em comparação foram analisados por *one-way* ANOVA seguido de pós-teste de comparação múltipla. As curvas de crescimento foram analisadas por *two-way* ANOVA seguido de pós-teste de comparação múltipla. A correlação entre a ordem de expressão dos FGFRs foi analisada pela correlação da ordem de posto de Spearman. Todos os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando os softwares R 3.2.5 e GraphPad Prism 7.

5. RESULTADOS

5.1. Investigação do mecanismo molecular responsável pelo bloqueio no ciclo celular provocado por FGF2

5.1.1. O FGF2 exacerba o estresse replicativo basal de células Y1.

A presença de células na fase S sem síntese ativa de DNA em amostras tratadas com FGF2, observada previamente em nosso laboratório por Matheus Dias, sugeriu empacamento de forquilhas e estresse replicativo como parte do mecanismo de citotoxicidade do FGF2. Como estresse replicativo não resolvido gera quebra de dupla fita no DNA (Yajima *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011; Tiwari *et al.*, 2016), analisamos por *Western blotting* os níveis de histona H2AX fosforilada (γ -H2AX) (Rogakou *et al.*, 1998; Podhorecka, Skladanowski and Bozko, 2011) em células Y1 estimuladas com soro (FCS) ou soro + FGF2 (FCS + FGF2). Os resultados mostraram que as células Y1, mesmo quando estimuladas apenas com soro, exibiram um nível basal de dano no DNA, o que foi relatado para diversas amostras de tumores humanos (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005). Contudo, a adição de FGF2 provocou grande aumento nesses níveis, que foram mantidos mesmo após 36 horas de estimulação com soro + FGF2 (Figura 10, A e B).

Para confirmar que a fosforilação de γ H2AX era consequência de estresse replicativo exacerbado, sincronizamos as células Y1 em G0/G1 por carenciamento de soro e reestimulamo-as com soro ou soro + FGF2 por 12, 18 e 24 horas, correspondentes, respectivamente, ao início da fase S, fim da fase S e um ciclo celular completo. A seguir, analisamos a distribuição das células positivas para γ -

H2AX ao longo das fases do ciclo celular por citometria de fluxo. Corroborando os resultados de *Western blotting*, as amostras estimuladas apenas com soro exibiram marcação basal de γ -H2AX, sugerindo estresse replicativo constitutivo em parte da população de células Y1, mesmo em condições normais de crescimento. Nas amostras estimuladas por soro + FGF2, observamos que o FGF2 provocou grande incremento à população de células positivas para γ -H2AX (figura 10, C e D). Em todas as amostras, as células positivas para dano no DNA foram quase exclusivamente encontradas nas fases S e G2 do ciclo (figura 10, C e D), indicando que tanto o basal de dano no DNA destas células quanto o aumento provocado pelo FGF2 são consequência de estresse replicativo.

Para obter uma evidência mais direta da intensificação do estresse replicativo causado por FGF2 em células Y1, contamos o número de foci de DNA exposto na forma de fita simples (ssDNA), um forte indício de estresse replicativo (Syljuåsen *et al.*, 2005; Dobbstein and Sørensen, 2015), em células tratadas ou não com FGF2. Para este fim, incorporamos BrdU ao DNA de células Y1 em crescimento exponencial durante 48 horas, tempo correspondente a dois ciclos de divisão. A seguir, adicionamos FGF2 ao meio de cultura por 24 horas e fixamos as amostras. Tirando proveito do fato de que o anticorpo anti-BrdU pode acessá-lo eficientemente apenas em condições desnaturantes ou em regiões de DNA em simples fita, contamos o número de foci de BrdU por célula em condições não desnaturantes, de modo que os foci visualizados correspondiam a regiões de ssDNA expostas em decorrência do tratamento com FGF2, ou naturalmente ocorrentes nas células Y1. Estas regiões resultam do empacamento de forquilha de replicação e desacoplamento da DNA polimerase III e da helicase, que continua abrindo a dupla fita de DNA, embora a DNA polimerase III não esteja incorporando novos

nucleotídeos. Esta abordagem mostrou que, sob condições normais de crescimento, as células Y1 apresentaram apenas alguns foci de ssDNA por célula, enquanto que a estimulação com FGF2 aumentou muito a quantidade de foci de DNA exposto na forma de simples fita por célula (Figura 10, E).

Este conjunto de resultados indica que as células Y1, mesmo em condições normais de crescimento, lidam com níveis basais significativos de estresse replicativo, e que o FGF2 exacerba estes níveis como parte dos seus efeitos citotóxicos nessas células, provocando elevados níveis de dano no DNA.

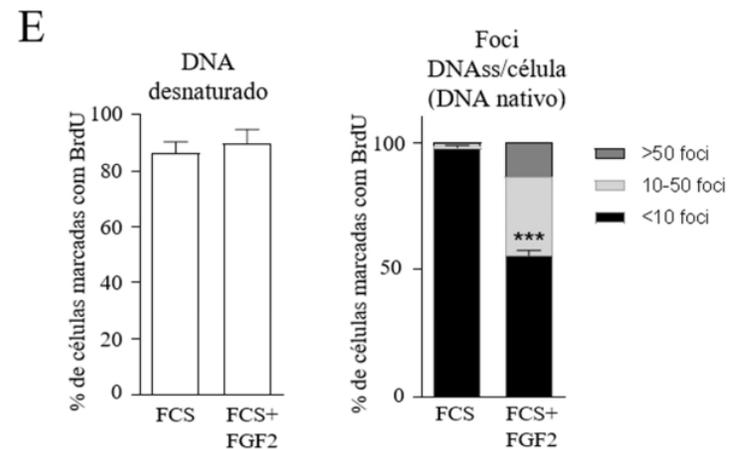
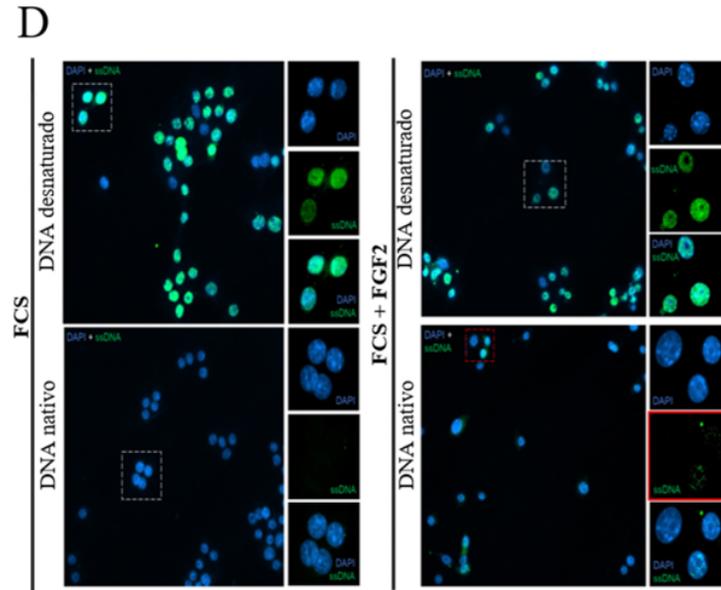
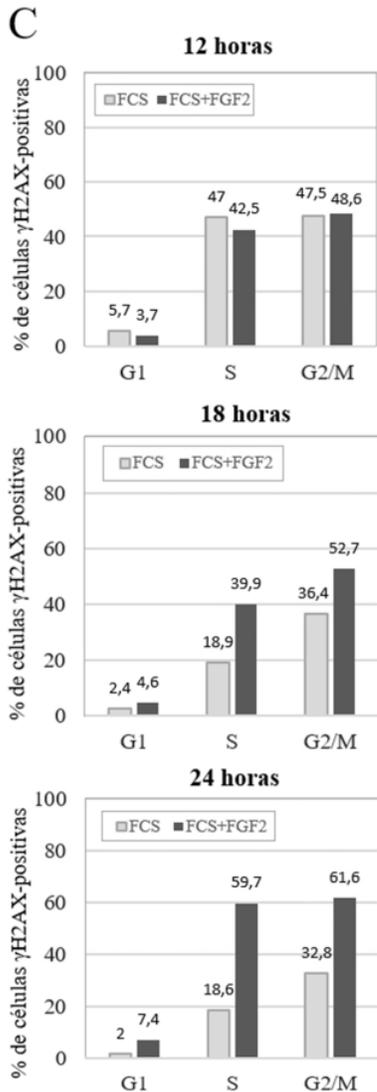
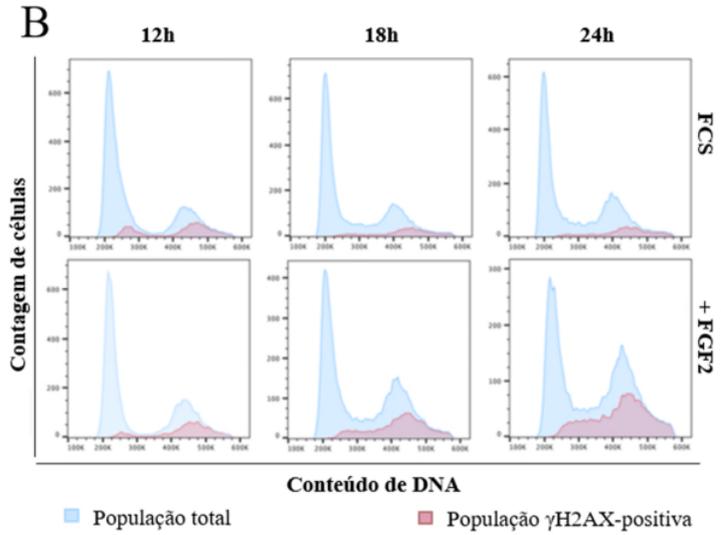
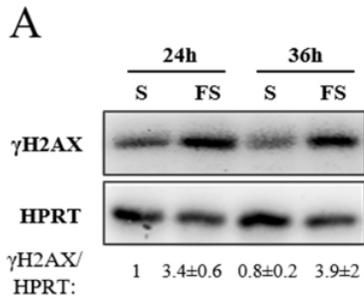


Figura 10: O FGF2 exacerba o estresse replicativo basal de células Y1. **A:** *Western blotting* para γ H2AX em células Y1 sincronizadas e reestimuladas com soro ou soro + 10 ng/mL FGF2 por 24 e 36 horas (Média \pm Desvio padrão de dois experimentos independentes). **B:** Citometria de fluxo com dupla marcação (iodeto de propídeo + γ H2AX) em células Y1 sincronizadas e reestimuladas por 12, 18 e 24 horas, com soro ou soro + 10 ng/mL FGF2. **C:** Quantificação da população positiva para γ H2AX em cada uma das fases do ciclo celular. **D:** Imunofluorescência com anticorpo anti-BrdU em células Y1 em crescimento exponencial ou tratadas com 10 ng/mL FGF2 por 24 horas. O quadrado vermelho destaca a formação de foci de DNA simples fita expostos nas células tratadas com FGF2 em condições de DNA nativo. A exposição de BrdU em condições desnaturantes foi medida como controle positivo. **E:** Quantificação de foci de DNA simples fita por célula dos experimentos apresentados em D. As barras de erros indicam média \pm Desvio Padrão. Ensaio realizado em triplicata com medida de no mínimo 65 células por replicata ($n = 65/\text{ensaio}$). Os asteriscos (***) indicam diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0.001$).

5.1.2. O FGF2 ativa a Resposta de Dano de DNA e o *checkpoint* dependente de ATR em células Y1.

A observação de que o FGF2 aumenta o estresse replicativo basal e provoca dano no DNA nas células Y1 (Figura 10) levou-nos a investigar o engajamento da Resposta ao Dano do DNA (DDR) e possível ativação de vias de *checkpoint*, que poderiam ser as responsáveis pelo bloqueio do ciclo celular provocado pelo FGF2. Inicialmente, avaliamos o estado de ativação de proteínas efetoras clássicas de DDR e *checkpoint*, como Chk1, Chk2, Wee1, p53, p21 e p38 (Niculescu *et al.*, 1998; Lee, Kumagai and Dunphy, 2001; Rothblum-Oviatt, Ryan and Piwnica-Worms, 2001; Bulavin, Amundson and Fornace, 2002; Reinhardt and Yaffe, 2009; Toledo *et al.*, 2013), por *Western blotting*. Os resultados mostraram que o FGF2 não alterou os níveis de Chk2 ativa, indicando que a via de ATM-Chk2 provavelmente não está envolvida na resposta ao FGF2 (Figura 11, A e B). Entretanto, encontramos níveis basais de Chk1, Wee1 e CDK1 fosforiladas, os quais foram aumentados pelo tratamento com FGF2. Os eixos p53-p21 e p38-MK2-CDC25B/C também foram fortemente ativados pelo FGF2 (Figura 11, A e B). Estes

resultados indicaram que o FGF2 provoca a ativação da Resposta a Dano no DNA e do *checkpoint*, envolvendo os eixos de sinalização de ChK1: Chk1→Wee1/CDC25B/C, ChK1→p38/ p53→p21 e ChK1→p38→CDC25B/C (Figuras 2 e 11, C). ChK1, por sua vez, é diretamente ativada pela proteína sensora ATR, classicamente envolvida na resposta a estresse durante a replicação do DNA (Tibbetts *et al.*, 1999; Bulavin, Amundson and Fornace, 2002; Nghiem *et al.*, 2002; Do, Doroshov and Kummar, 2013).

Tendo em vista os níveis constitutivos de estresse replicativo e dano no DNA encontrados em células Y1, a presença de níveis basais de ativação de proteínas efetoras de *checkpoint* não surpreende. No entanto, estes resultados nos levaram a especular se os níveis constitutivamente altos de RAS-GTP, característicos das células Y1, estariam provocando algum nível de estresse mitogênico, e se seria essa a causa da ativação constitutiva de vias de *checkpoint* nestas células. Para testar esta hipótese, inibimos a atividade da via de MAPK com inibidor químico de MEK, U0126. Em células Y1 não tratadas com FGF2, a inibição de MEK por 24 horas suprimiu a ativação basal do *checkpoint*, como mostrou a redução dos níveis de fosforilação de ChK1 e CDK1. A adição de FGF2, contudo, recuperou os níveis elevados de ativação do *checkpoint*, mesmo na presença do inibidor de MEK (Figura 11, C e D). Este resultado sugere que a estimulação constitutiva de MAPK em células Y1, provavelmente condicionada por seus níveis de Ras-GTP constitutivamente elevados, condiciona a ativação basal do *checkpoint*, e a estimulação proliferativa adicional de FGF2 sobre a via de MAPK aumenta o estresse oncogênico das células Y1, induzindo a hiperativação da Resposta a Dano no DNA e do *checkpoint* dependente de ATR, constatados nos experimentos de *Western blotting*.

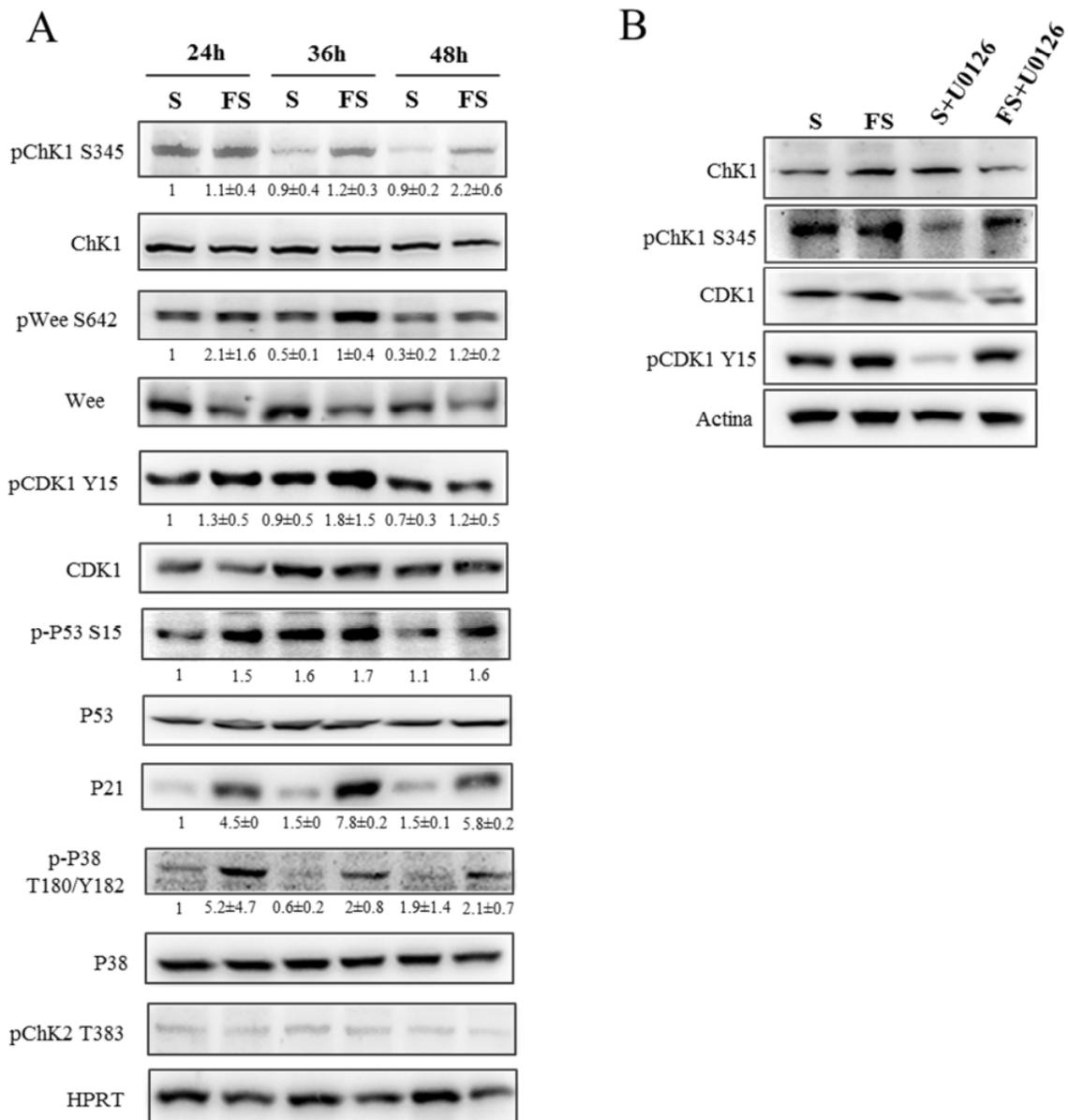


Figura 11: O FGF2 ativa a Resposta de Dano de DNA e o *checkpoint* dependente de ATR em células Y1. **A:** *Western blotting* para proteínas marcadoras da Resposta a dano no DNA e para proteínas efetoras de *checkpoint*, em células Y1 sincronizadas e reestimuladas com soro ou soro + 10 ng/mL FGF2 por 24, 36 e 48 horas. Quantificação de dois experimentos realizados com amostras independentes. **B:** *Western blotting* para proteínas efetoras de *checkpoint*, em células Y1 tratadas ou não com 10 ng/mL FGF2 ± U0126 (inibidor específico da atividade de MEK) por 24 horas.

5.1.3. A inibição química de ATR é letal para as células Y1, e o FGF2 tem efeito multiplicativo sobre a letalidade da inibição de ATR.

Para confirmar que o bloqueio no ciclo celular que observamos em células tratadas com FGF2 é provocado pela ativação de vias de *checkpoint*, inibimos a função de ATM/ATR com 2 mM de cafeína 30 minutos antes da adição de FGF2. Os perfis de ciclo celular em citometria de fluxo 48 horas após a adição de FGF2 indicaram que a cafeína aliviou o acúmulo de células em G2 que o FGF2 provoca (Figura 12, A). Curiosamente, na presença de cafeína, o FGF2 significativamente induziu morte celular. Nenhuma alteração no perfil do ciclo celular foi encontrada nas amostras controle tratadas apenas com cafeína (Figura 12, B). Corroborando estas observações, ensaios clonogênicos mostraram que o FGF2 diminuiu a viabilidade em longo prazo das células Y1, tal como anteriormente demonstrado por nosso grupo (Costa *et al.*, 2008), e que a associação com a cafeína potencializou os efeitos tóxicos de FGF2 nestas células (Figura 12, C e D).

A ativação de ChK1, mas não de ChK2 (Figura 11, A) sugeriu que a ativação do *checkpoint* induzida por FGF2 é mediada essencialmente por ATR, e não por ATM. Como a cafeína inibe ambas as quinases sensoras (Sarkaria *et al.*, 1999), utilizamos inibidores químicos específicos para ATR (VE-821) (Reaper *et al.* 2011; Prevo *et al.* 2012), e ATM (KU55933) (Hickson *et al.*, 2004), para avaliar o efeito tóxico sinérgico entre o tratamento com FGF2 e a inibição do *checkpoint*. Os inibidores foram adicionados à cultura 30 minutos antes da adição do FGF2, na concentração de 2 μ M. Essa concentração é inferior à comumente usada na literatura, 10 μ M (Gole *et al.*, 2015; Mateos-Gomez *et al.*, 2015), e foi a mais eficaz entre as testadas em prevenir a fosforilação, induzida pelo FGF2, de proteínas alvo

de ATM (H2AX-S139 e ChK2-T383) e ATR (ChK1-S345) (Figura 23 - apêndice). Após 48 horas de tratamento com os inibidores na presença ou ausência de FGF2, a intensidade de morte celular em cada amostra foi avaliada por citometria de fluxo, através da marcação de anexina-PI; e, após 96 horas, medindo-se a porcentagem de células com conteúdo de DNA inferior ao de G1. O FGF2 aumentou modestamente a morte celular em comparação com as amostras controle estimuladas apenas por soro. A inibição de ATM não teve efeito significativo sobre a morte celular com ou sem FGF2. A inibição de ATR aumentou moderadamente a morte celular, enquanto a associação de VE-821 e FGF2 induziu mais de 40% da morte celular. A comparação da quantidade de células mortas nas amostras tratadas com FGF2, VE-821 ou FGF2 + VE-821 mostrou que a combinação dos dois agentes, FGF2 + VE-821, teve efeito sinérgico na indução de morte celular (Figura 13, A, B e C). Novamente, os resultados de citometria de fluxo foram corroborados por ensaios clonogênicos, que indicaram que a inibição de ATM é inócua para a viabilidade celular de Y1 em longo prazo, enquanto a inibição de ATR inibe fortemente a formação de colônias, independentemente da estimulação de FGF2 (Figura 13, D). Estes resultados indicam que as células Y1 são viciadas na sinalização de ATR, provavelmente devido ao seu estresse replicativo constitutivo. Conforme os dados de citometria de fluxo mostraram, o estímulo proliferativo adicional de FGF2 antecipou o efeito altamente letal da inibição de ATR evidenciado no ensaio clonogênico (Figura 13, A-D).

Em conjunto, esses resultados mostraram que as células Y1, como anteriormente relatado por outros em amostras de tumores e lesões pré-malignas (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005), exibem níveis basais significativos de estresse replicativo e ativação constitutiva de vias de *checkpoint*. Na medida em que

o FGF2 aumenta o estresse replicativo, ele agrava a dependência de ATR, antecipando a letalidade que a inibição de ATR tem sobre células Y1.

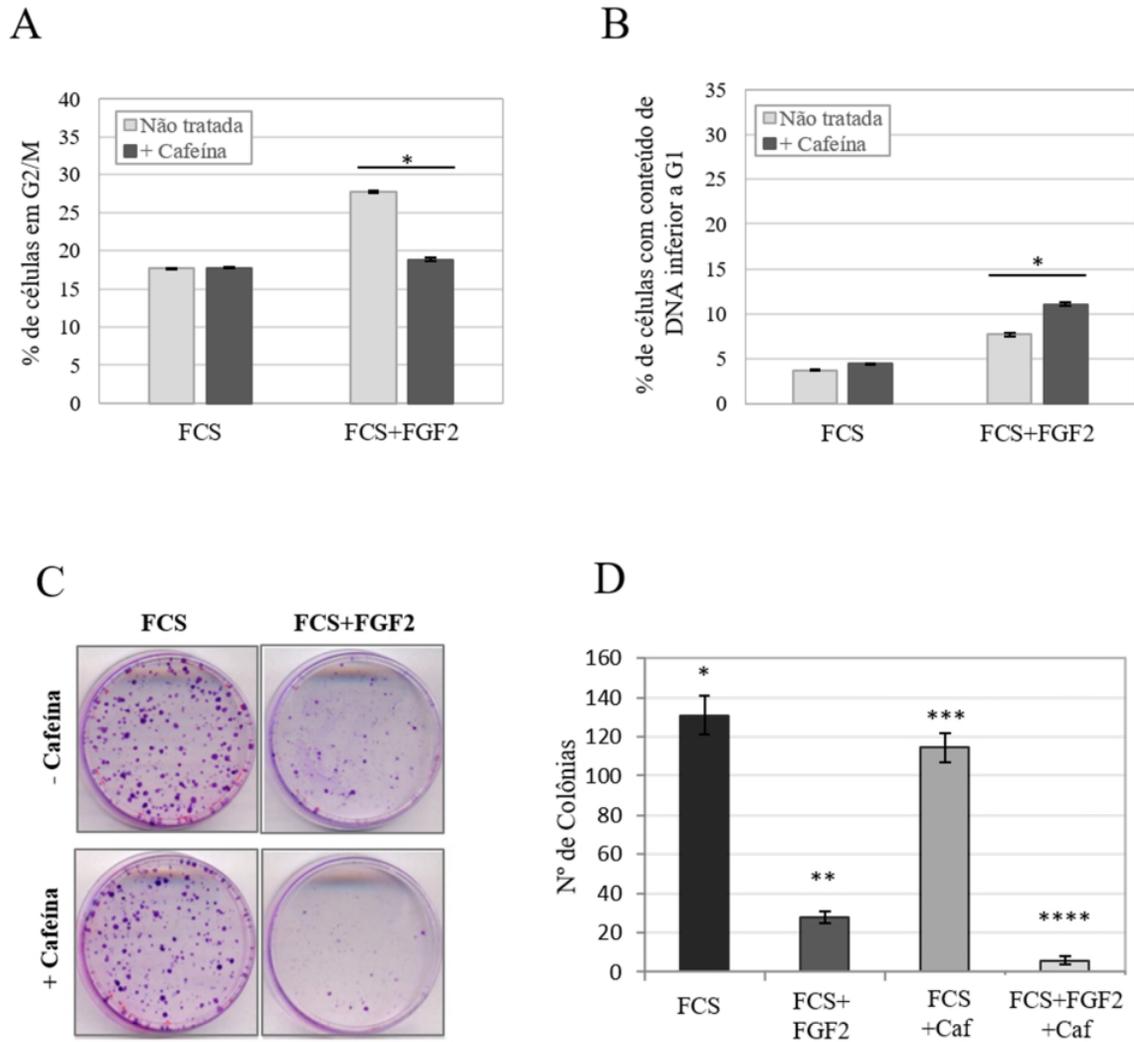


Figura 12: Efeito da inibição do *checkpoint* de ATM/ATR com cafeína em células Y1 tratadas ou não com FGF2. **A:** Quantificação de células acumuladas em G2/M por citometria de fluxo, 48 horas após adição ou não de 10 ng/mL de FGF2. 2mM de cafeína foi adicionada 30 minutos antes da adição de FGF2. Experimento realizado em triplicata. $p < 0.01$. **B:** Quantificação de células com conteúdo de DNA inferior ao de G1, por citometria de fluxo, 48 horas após adição ou não de 10 ng / mL de FGF2. 2mM de cafeína foi adicionada ou não 30 minutos antes da adição de FGF2. Experimento realizado em triplicata. $p < 0.01$. **C:** Ensaio clonogênico de células Y1 tratadas com não com 10 ng / mL de FGF2 \pm 2mM cafeína. **D:** Quantificação do ensaio clonogênico apresentado em C. Asteriscos indicam diferença estatística entre todos os tratamentos, com $p \leq 0,05$.

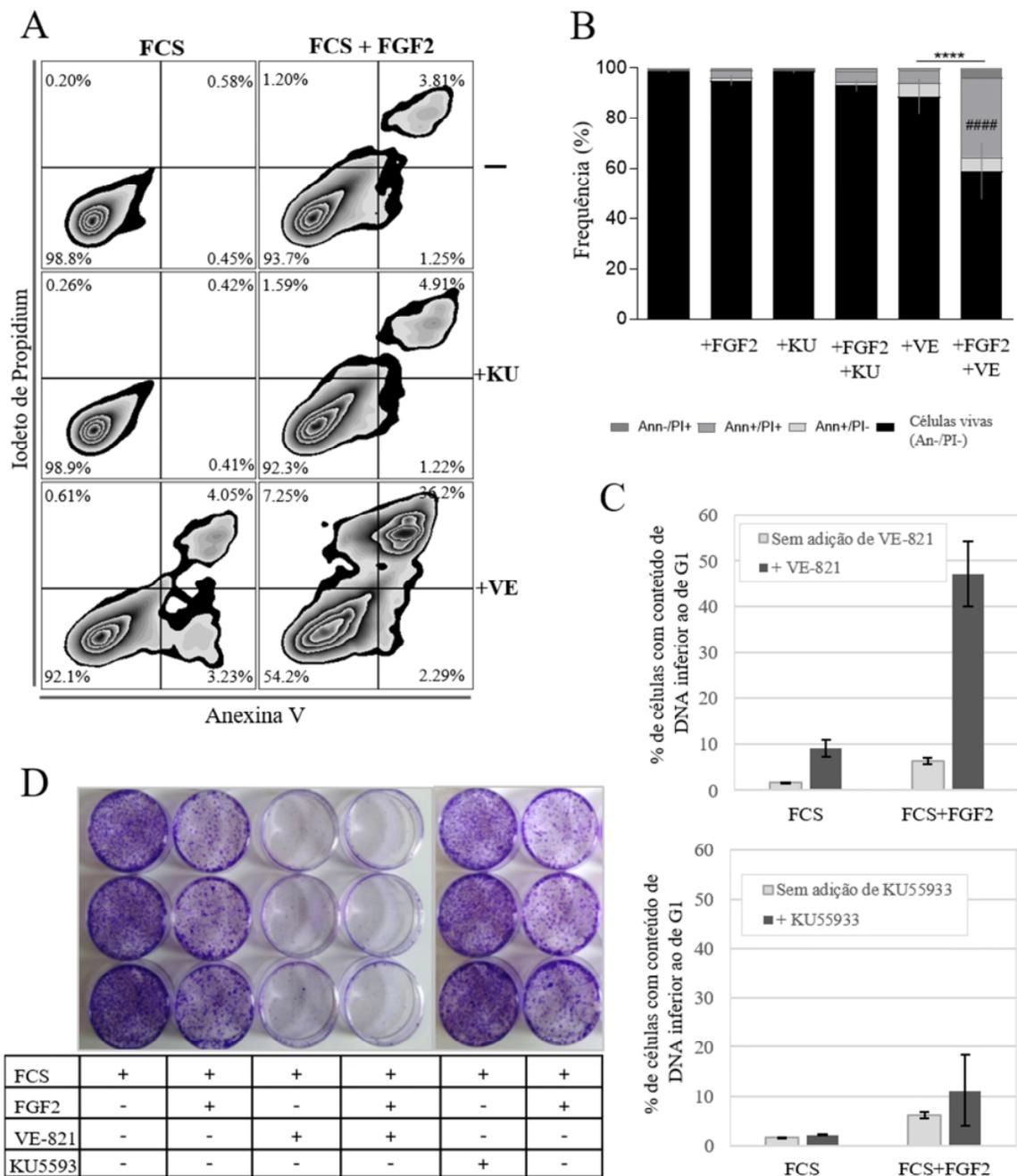


Figura 13: Efeito da inibição específica de ATR ou ATM em células Y1 tratadas ou não com FGF2. **A:** Gráfico representativo de 3 experimentos independentes de citometria de fluxo com células Y1 em crescimento exponencial \pm 10 ng/ml FGF2 por 48h \pm 2 μ M do inibidor de ATM, KU-55933 (KU), ou do de ATR, VE-821 (VE). A marcação dupla de Anexina V e Iodeto de propidium (PI) foi usada como indicativo de morte celular. **B:** Quantificação dos experimentos descritos em A. As barras de erro indicam média \pm Desvio padrão de células vivas (n=3, experimentos independentes). (***) indica $p \leq 0,001$. (####) refere-se a diferenças significativas em relação à amostra controle tratada com FGF2. **C:** Quantificação de células com conteúdo de DNA inferior ao de G1, por citometria de fluxo, 96h após adição ou não de

10 ng/mL FGF2 ± 2µM VE-821 ou KU55933. Duplicatas técnicas. D: Ensaio clonogênico de células Y1 ± 10 ng/mL FGF2 ± 2µM de VE-821 ou KU55933.

5.1.4. Eliminação das cópias amplificadas de K-Ras torna as células Y1 imunes à toxidez de FGF2 e, também, à dependência de ATR.

A amplificação do oncogene K-ras selvagem e a superexpressão da respectiva oncoproteína K-Ras foram descritas pela primeira vez nas células Y1 por Schwab *et al.* (1983), implicando esta lesão genética na origem do fenótipo maligno destas células. Pouco tempo depois, nosso grupo encontrou e descreveu sublinhagens de Y1 que eliminaram a amplificação de K-ras através da perda espontânea dos cromossomos M1 e M2, portadores das cópias de K-ras (Kimura and Armelin, 1988). Estas sublinhagens de Y1 revelaram-se incapazes de gerar tumores quando implantadas em camundongos Nude, nos quais a linhagem parental Y1 originou tumores agressivos em poucos dias (Kimura & Armelin, resultados não publicados de 1988-91); o conjunto destas observações experimentais sugeriram que o fenótipo maligno das células Y1 é dependente da amplificação de K-ras. Duas décadas depois, colegas de nosso grupo, dos quais não fui contemporânea, utilizaram uma construção induzível do mutante dominante-negativo Ras-N17, conhecido há décadas por bloquear a atividade de todas as formas de Ras (Feig and Cooper, 1988), para demonstrar experimentalmente que a toxicidade de FGF2 em células Y1 dependia de altos níveis de K-Ras-GTP (Costa *et al.*, 2008). A razão deste resumo é lembrar que a linhagem Y1 de células malignas foi por um breve momento histórico um modelo celular de notório valor heurístico na biologia do câncer, no laboratório pioneiro de Bishop e Varmus (Schwab *et al.*, 1983). Mas, nos 25 anos seguintes, permaneceu sendo explorada apenas em nosso grupo, no qual

sucessivas levas de doutorandos e pós-doutorandos fizeram progressos suficientes para embasar os avanços moleculares mecanísticos agora alcançados neste trabalho.

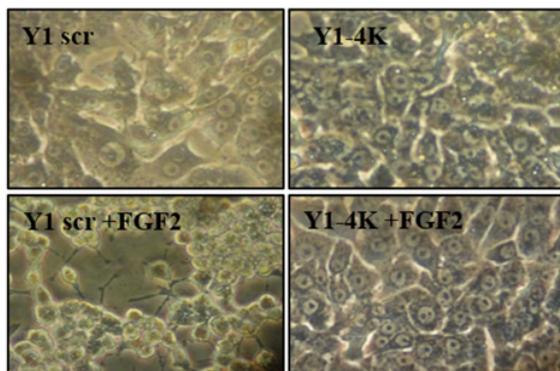
Assim, nessa sequência de abordagens, editamos o genoma de Y1 para remover as cópias amplificadas de K-Ras, usando a técnica de edição genômica mediada por Cas9 (CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Após a seleção com puromicina, a sublinhagem policlonal resultante (Y1-4K) apresentou morfologia semelhante a das células parentais e a das células controle transduzidas com uma sequência randômica (Y1-SCB) (figura 14, A). Apesar desta grande semelhança morfológica, a edição do genoma mediada por Cas9 reduziu eficientemente os altos níveis constitutivos da proteína K-Ras encontrados nas células controle Y1-SCB e nas células Y1 parentais (Figura 14, B). Portanto, é razoável concluir que a ação de Cas9 levou, nas células Y1-4K à eliminação das múltiplas cópias do proto-oncogene selvagem K-ras, sabidamente amplificado nas parentais Y1.

Em seguida, investigamos se a expressão sumariamente reduzida de K-Ras afetou a viabilidade ou a proliferação das células Y1, bem como seu potencial efeito protetor contra a toxicidade do FGF2. Ensaio clonogênicos mostraram que a viabilidade das células Y1-SCB e Y1-4K foi a mesma das células parentais Y1. Além disso, a depleção de K-Ras impediu os efeitos tóxicos de FGF2 na viabilidade de Y1-4K (Figura 14, C). Quanto à proliferação celular, curvas de crescimento indicaram que as células Y1-4K proliferaram significativamente mais rápido do que as células Y1 e Y1-SCB, e o FGF2 não afetou a proliferação celular nesta sublinhagem sem expressão de K-Ras (Figura 14, D). Em contraste com estas observações em

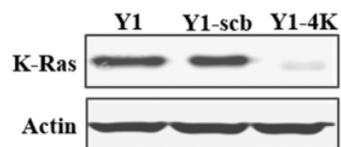
substrato sólido, a depleção de K-Ras restringiu a proliferação de células Y1-4K sob condições de crescimento não aderentes (Figura 14, E). Este conjunto de resultados mostra que a depleção de K-Ras favorece a viabilidade e proliferação celulares em substrato sólido, mas compromete o potencial maligno neste modelo celular indicado pela incapacidade desta sublinhagem de crescer em suspensão (Figura 14, E).

Em seguida, investigamos se a depleção de K-Ras teria sido suficiente para prevenir a morte celular induzida pela combinação de FGF2 com a inibição de ATR nessas células. Para este fim, tratamos células Y1-SCB e Y1-4K com FGF2 e VE-821 por 72 horas e medimos a morte celular por citometria de fluxo. Os resultados das células Y1-SCB, conforme esperado, foram semelhantes aos mostrados para células parentais Y1, com a combinação de FGF2 e VE-821 induzindo mais de 30% de morte celular. Por outro lado, em células Y1-4K, a depleção de K-Ras teve grande efeito protetor sobre a morte celular induzida pela combinação de FGF2 e VE-821 (Figura 14, F). Os ensaios clonogênicos corroboraram esses resultados, mostrando que a depleção de K-Ras protege as células Y1-4K do efeito tóxico da combinação de FGF2 + inibição de ATR (Figura 14, G). Em conjunto, esses dados indicam que a elevada expressão constitutiva de K-Ras condiciona as células Y1 à toxicidade de FGF2 e à sensibilização à inibição do *checkpoint* de ATR.

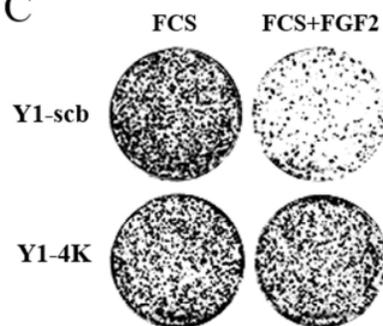
A



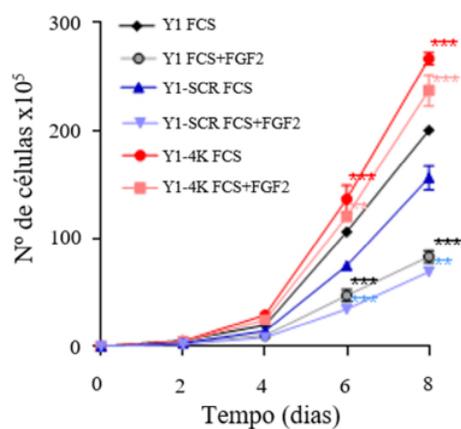
B



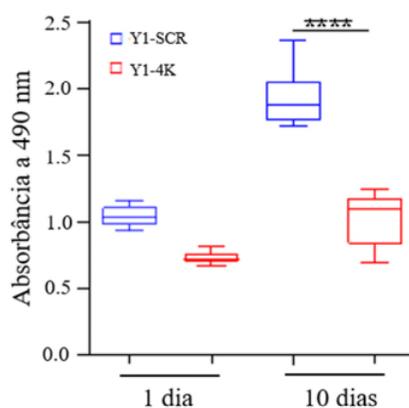
C



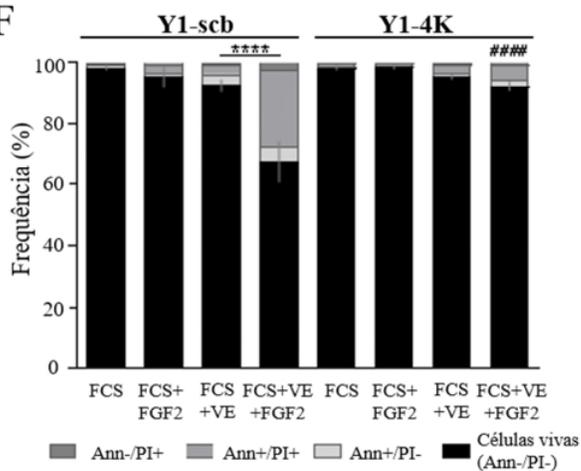
D



E



F



G

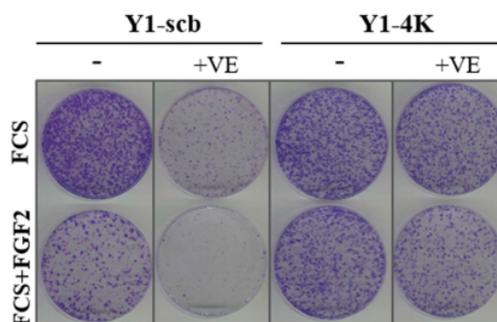


Figura 14: A depleção de K-Ras previne a toxicidade do FGF2 sobre células Y1, bem como sua sensibilidade à inibição do *checkpoint* dependente de ATR. **A:** Morfologia das células Y1-scr e da sublinhagem policlonal Y1-4K em cultura, após seleção com puromicina, tratadas ou não com FGF2. **B:** *Western blotting* evidenciando a eliminação da expressão de K-Ras na sublinhagem Y14K. **C:** Ensaio clonogênico indicando que a depleção de K-Ras nas células Y1-4K as protege do efeito citotóxico do FGF2. **D:** Curvas de crescimento representativas comparando a proliferação de Y1 parental, Y1-scb como controle e células Y1-4K, depletadas de K-Ras, tratadas ou não com FGF2. As barras de erro indicam média \pm Desvio padrão de triplicatas técnicas. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação à condição controle de Y1. (**) indica $p < 0,01$ e (***) indica $p \leq 0,001$. **E:** Ensaio de proliferação em condições não aderentes comparando células Y1-scb e Y1-4K, (***) indica $p \leq 0,001$. **F:** Citometria de fluxo para análise da intensidade de morte celular induzida por FGF2, VE-821, ou a combinação de ambos, sobre células Y1-scr e Y1-4K. As barras de erro indicam média \pm Desvio padrão de células vivas ($n = 3$, experimentos independentes). (****) indica $p \leq 0,001$. (#) refere-se a diferenças significativas em relação à amostra controle tratada com FGF2. **G:** Ensaios clonogênicos representativos comparando a viabilidade a longo prazo das células Y1-scb e Y1-4K tratadas com FGF2, VE-821 ou a combinação de ambos. As células foram tratadas por 48 horas e, após este período, os tratamentos foram lavados e as placas foram cultivadas em meio completo durante 10 dias adicionais e depois fixadas e coradas.

5.2. Investigação do mecanismo de resistência ao FGF2

Buscando entender o mecanismo de citotoxicidade do FGF2, adotamos como estratégia complementar neste trabalho a investigação dos fenótipos e genótipos de sub-linhagens clonais resistentes ao FGF2, a partir de informações previamente descobertas em nosso grupo e detalhadas adiante. A emergência de resistência por seleção clonal representa o que talvez seja o maior desafio enfrentado clinicamente para as terapias disponíveis contra tumores. Nos perguntamos quais seriam os processos envolvidos na emergência de resistência ao FGF2 em uma população celular frente à resposta de estresse provocada por ele e descrita nos resultados até agora apresentados. Para esta investigação, elegemos como modelos 2 sublinhagens que eliminaram a alta expressão de K-Ras (Y1FR-C e Y1FR-F), bem como a única que manteve a alta expressão desse oncogene (Y1FR-

l). Primeiramente, verificamos se estes padrões de expressão de K-Ras nessas sublinhagens estavam conservados (Figura 15, A).

5.2.1. As sublinhagens resistentes ao FGF2 apresentam morfologia mais saudável na presença de FGF2, e dependem deste fator para proliferar em cultura.

Para manter a pressão seletiva, as sublinhagens Y1FR sempre foram cultivadas com 10 ng / mL de FGF2 no meio de cultura. A exclusão do FGF2 mostrou que elas não apresentam morfologia saudável em meio suplementado apenas com soro. Quando crescem com FGF2, as sublinhagens resistentes apresentam morfologias semelhantes à das células parentais Y1, exceto por apresentarem muitas projeções citoplasmáticas curtas e finas. Sem FGF2, as culturas apresentaram sinais de fragmentos celulares, indicativo de morte, e as células sobreviventes apresentaram uma quantidade notável de grânulos citoplasmáticos (Figura 15, B).

As curvas de crescimento das sublinhagens Y1FR-C, Y1FR-F e Y1FR-I mostraram que elas não só são resistentes ao efeito antiproliferativo do FGF2, como também dependem de sua sinalização para proliferar. O crescimento da população, contudo, se dá em velocidade 4 vezes menor, no caso da Y1FR-C e Y1FR-I, ou 2 vezes menor, no caso da Y1FR-F, em relação à velocidade de proliferação das células parentais Y1 (Figura 15, C).

Também avaliamos se as sublinhagens resistentes ao FGF2 mantiveram o fenótipo diferenciado das células parentais. As células Y1 derivam do córtex da

glândula adrenal e mantêm conservadas as características funcionais de seu tecido de origem, ou seja, são responsivas ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), produzindo hormônios esteroides (Yasumura, Buonassisi and Sato, 1966; Rainey, Saner and Schimmer, 2004). SF1 (*steroidogenic factor-1*) é um fator de transcrição cujos alvos incluem genes de enzimas esteroidogênicas e o receptor de ACTH (Bertherat, 1998), sendo determinante, portanto, para a identidade funcional das células. A expressão de SF1 é restrita à glândula adrenal, gônadas, pituitária e núcleo ventromedial do hipotálamo (Ingraham *et al.*, 1994; Bertherat, 1998). Por isso, para avaliar se as sublinhagens Y1FR mantiveram o fenótipo especializado das células parentais, comparamos o nível de expressão de SF1 entre as células Y1 e os clones Y1FR, com e sem suplementação de FGF2. Verificamos que, apesar das intensas mudanças cariotípicas que ocorreram durante o processo de seleção com FGF2, as quais serão descritas adiante, os clones Y1FR continuam expressando SF1, sugerindo a manutenção do fenótipo especializado nessas sublinhagens (Figura 15, D).

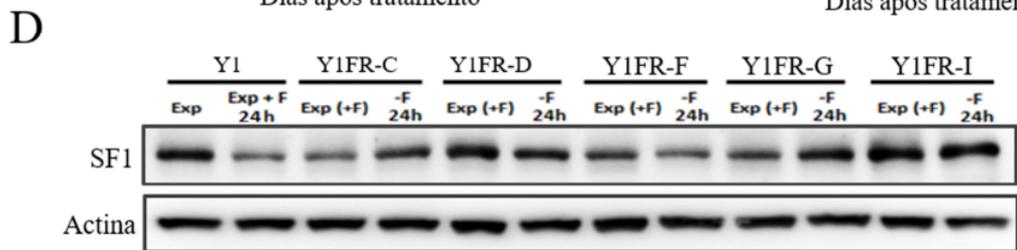
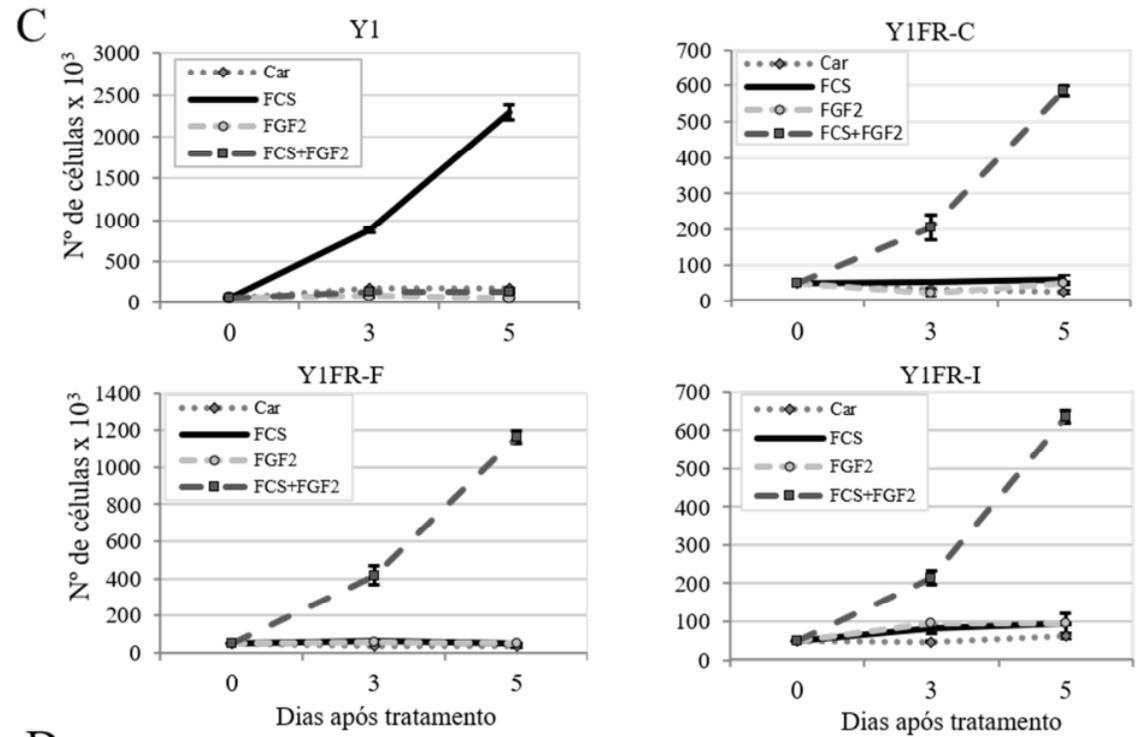
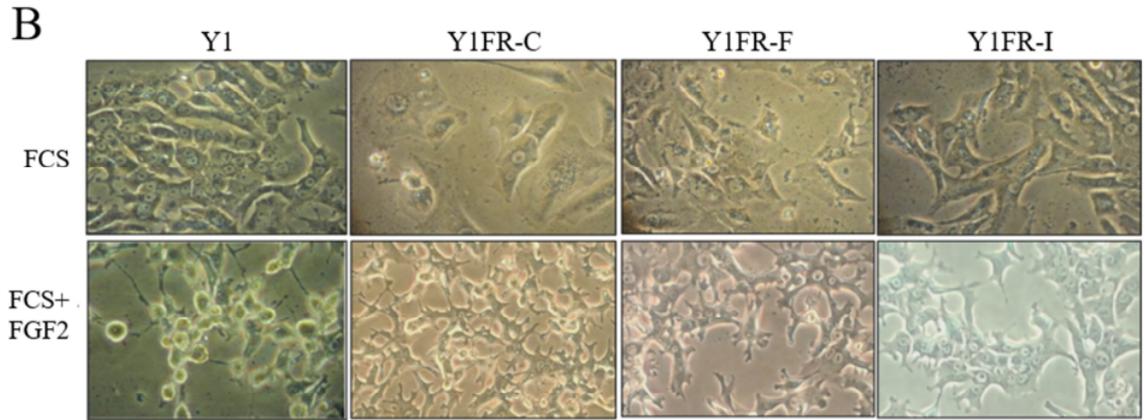
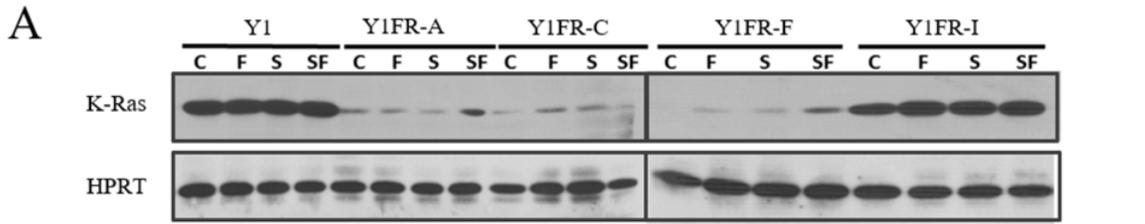


Figura 15: Caracterização das sublinhagens de Y1 Resistentes ao FGF2 (Y1FRs). **A:** Expressão de K-Ras total em Y1 e sublinhagens Y1FR-, carenciadas (C), estimuladas com soro (S), com FGF2 apenas (F), ou com soro+FGF2 (SF). **B:** Morfologia de Y1 e Y1FRs em cultura, com e sem FGF2. **C:** Curvas de crescimento das linhagens indicadas, tratadas ou não com 10 ng / mL de FGF2, experimento realizado em triplicatas. **D:** *Western blotting* para o Steroidogenic factor 1, marcador da função do córtex adrenal.

5.2.2. As sublinhagens resistentes ao FGF2 apresentam o mesmo padrão de expressão de isoformas de receptores de FGFs das células parentais Y1.

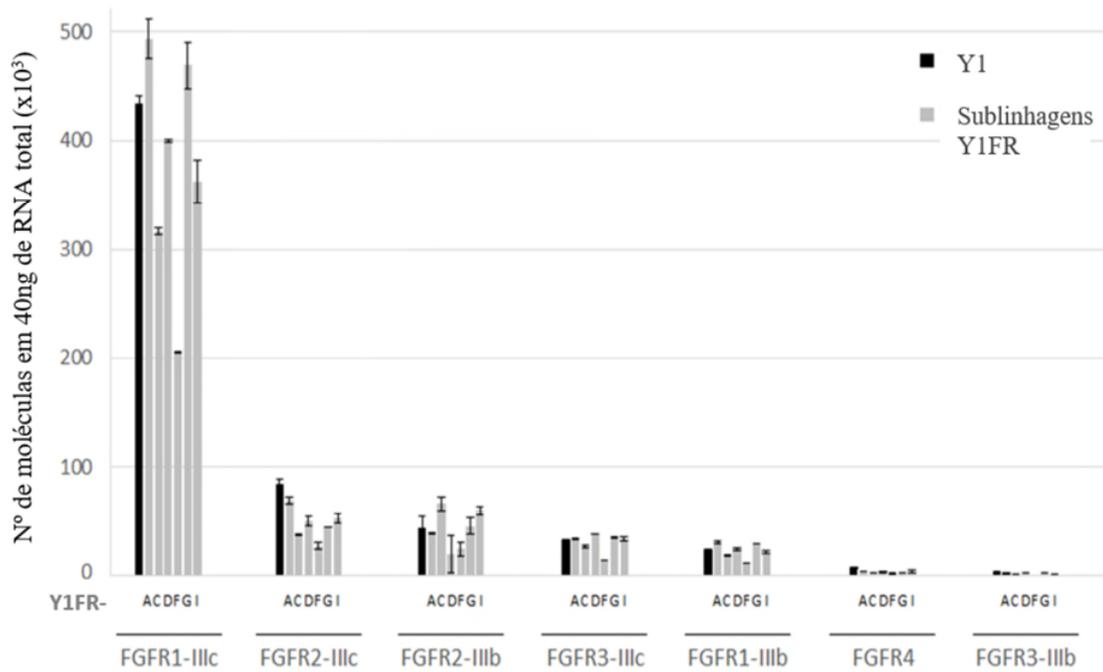
Dados anteriores do laboratório sugeriam que o FGF2 exercia o seu efeito citotóxico em células murinas transformadas com Ras através do receptor 1 de FGF (FGFR1) (Salotti *et al.*, 2013). Dado que o FGF2 apresenta afinidades específicas às diferentes isoformas traduzidas a partir de cada gene FGFR (Holzmann *et al.*, 2012), tornou-se importante conhecer o conjunto de isoformas de FGFR expressas pelas sublinhagens resistentes, de modo a obter evidências sobre a possível alteração do padrão de receptores expressos durante a emergência do fenótipo resistente. Além disso, a mudança do conjunto de isoformas de FGFR expressas poderia explicar o fenótipo resistente do clone Y1FR-I, apesar da manutenção dos altos níveis de K-Ras.

Primeiramente, quantificamos de forma absoluta os transcritos das isoformas III-b e III-c de FGFR1, FGFR2 e FGFR3, e também de FGFR4, que não sofre splicing alternativo entre os exons 8 e 9, existindo apenas com o exon 9 (isoforma III-c) (Eswarakumar, Lax and Schlessinger, 2005). Essa quantificação foi feita nas células Y1 e nos clones Y1FR por RT-qPCR. Adotamos uma abordagem que nos permitiu distinguir as isoformas III-b e III-c de cada FGFR porque desenhamos primers complementares às regiões do exon 8 (isoformas III-b) ou 9 (isoformas III-c).

O gráfico do item A da figura 16 apresenta o padrão de expressão das isoformas de FGFR na linhagem parental Y1 e em 6 de seus clones resistentes ao FGF2, incluindo o clone Y1FR-I, que manteve a alta expressão de K-Ras. Coerentemente com a sua origem mesenquimal (Zhang *et al.*, 2006), as células Y1 expressaram principalmente as isoformas III-c dos FGFRs-1, 2 e 3. FGFR1 foi o receptor mais expresso, e FGFR4 foi o menos expresso. Esse padrão de expressão de isoformas de FGFR foi mantido em todas as sublinhagens Y1FR analisadas (Figura 16, A). O Item B da figura 16 apresenta o ranqueamento da ordem de expressão das isoformas dos receptores e análise da correlação entre a ordem de expressão das isoformas na linhagem parental Y1 e em cada sublinhagem resistente ao FGF2. Essa análise deixou claro que todas as sublinhagens resistentes apresentam a mesma ordem de expressão das isoformas de receptores de FGF, com apenas uma ou outra inversão entre as isoformas menos expressas (Figura 16, B), constituindo uma evidência consistente de que não houve mudança do padrão de expressão de isoformas de receptores de FGF durante a seleção com FGF2.

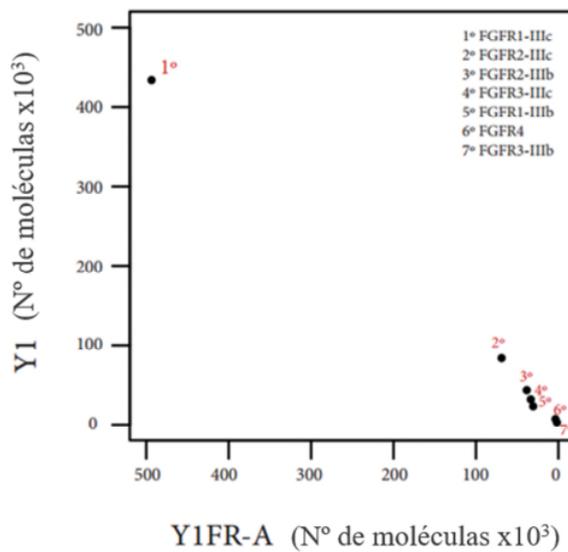
A análise ao nível protéico por imunoprecipitação seguida por *Western blotting* não pôde distinguir entre as isoformas III-b e III-c de cada FGFR, devido à inexistência de anticorpos específicos para as isoformas. A análise de expressão dos FGFRs-1 a 4 sugere que as sublinhagens resistentes expressam quantidades totais menores dos receptores testados (Figura 16, C). O aparecimento de múltiplas bandas no *blotting* é normal, uma vez que existem diversas isoformas de cada receptor, que podem variar em tamanho por diversos motivos, como glicosilação e existência de isoformas truncadas (Ueno *et al.*, 1992; Duchesne *et al.*, 2006). Como controle negativo, aplicamos o protocolo da imunoprecipitação sem adição das proteínas celulares.

A



B

Ranqueamento da expressão de isoformas de FGFR



Correlação do ranqueamento da ordem de expressão de isoformas de FGFR:

Test 1: Y1 x Y1FR-A	$r_s = 1.00$	$p < 0.001$
Test 2: Y1 x Y1FR-C	$r_s = 0.96$	$p < 0.007$
Test 3: Y1 x Y1FR-D	$r_s = 0.89$	$p < 0.001$
Test 4: Y1 x Y1FR-F	$r_s = 1.00$	$p < 0.001$
Test 5: Y1 x Y1FR-G	$r_s = 0.96$	$p < 0.001$
Test 6: Y1 x Y1FR-I	$r_s = 0.96$	$p < 0.001$

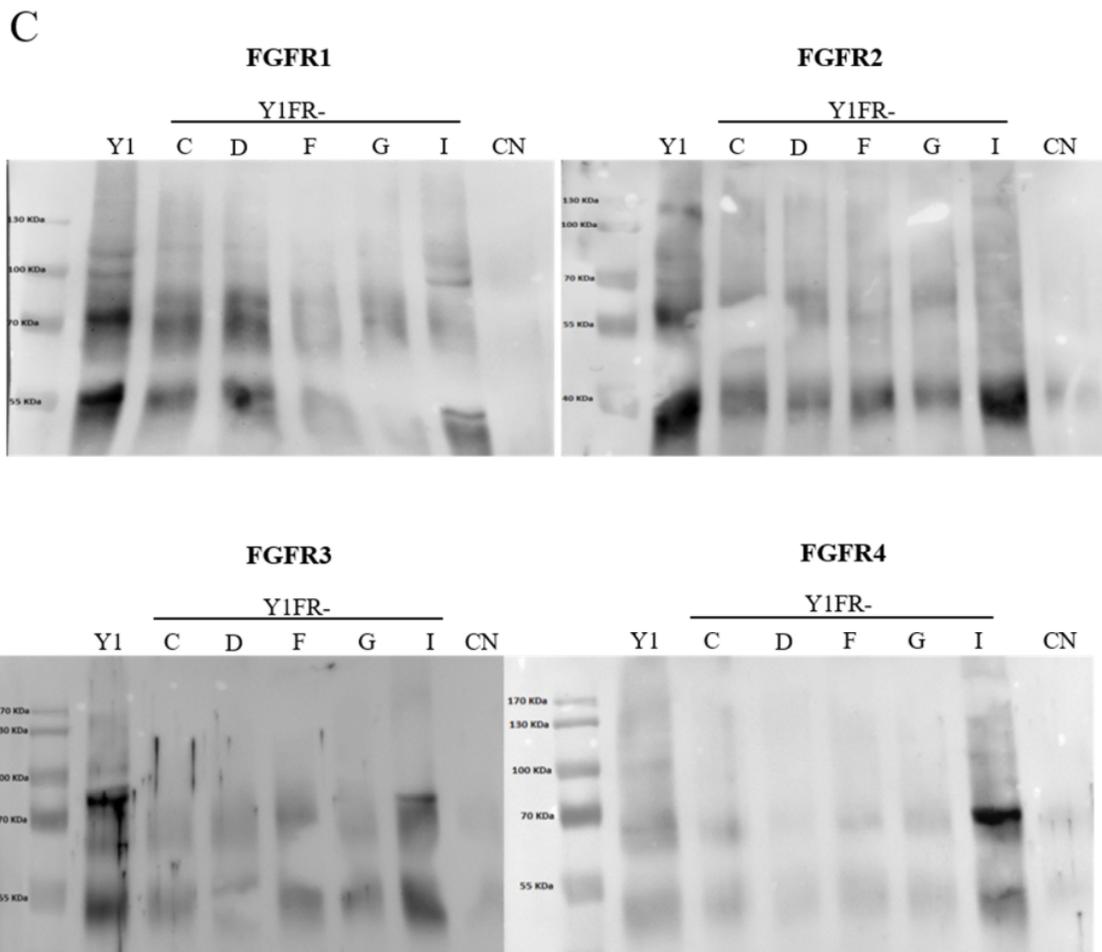


Figura 16: Análise do padrão de expressão de isoformas do receptor de FGF2 em células Y1 e Y1- Resistentes ao FGF2 (Y1FRs). **A:** Quantificação absoluta dos transcritos das isoformas III-b e III-c de cada FGFR por RT-qPCR. Experimento realizado em triplicata com amostras independentes, sendo que cada uma delas foi realizada com triplicatas técnicas. **B:** Análise do grau de correlação entre a ordem de expressão das isoformas de FGFR, entre as células parentais e cada um dos clones Y1FR- analisados. *rs* indica o coeficiente de correlação de *Spearman*. **C:** Imunoprecipitação + *Western blotting* de cada receptor de FGF na linhagem Y1 e cinco sublinhagens resistentes ao FGF2, inclusive a Y1FR-I, com altos níveis de K-Ras. CN: controle negativo.

5.2.3. As sublinhagens Y1FR perderam a expressão elevada de K-Ras por eliminação completa do cromossomo M1, e mantêm estritamente o cromossomo M2, cujas cópias de K-ras estão silenciadas.

A eliminação da alta expressão de K-Ras nas sublinhagens Y1FR levou-nos a investigar os níveis de transcrição do gene K-ras nessas células. Ensaios de RT-qPCR mostraram que as sublinhagens Y1FR transcreveram o gene K-ras a uma taxa de 10^3 a 10^2 vezes menor do que a das células parentais Y1 (Figura 17, A e B), sugerindo que a pressão seletiva de FGF2 favoreceu células que eliminaram a expressão das cópias amplificadas do oncogene. O clone Y1FR-I, que manteve elevada a expressão protéica de K-Ras, apresentou uma taxa de transcrição do gene equivalente a aproximadamente o dobro de Y1FR-F, e a 10 vezes maior que a das células Y1FR-C, embora ainda assim sua taxa de transcrição de K-ras tenha sido aproximadamente 10^2 vezes menor que a das células parentais Y1 (Figura 17, A e B), sugerindo que a expressão elevada da proteína K-Ras nestas células pode dever-se a mecanismos pós-transcricionais.

A observação de que as sublinhagens resistentes ao FGF2 eliminaram a alta expressão de K-ras levantou a hipótese de eliminação dos cromossomos marcadores das células Y1 (M1 e M2), que carregam a amplificação de K-ras. Por isso, analisamos citogeneticamente as células Y1, Y1FR-A, Y1FR-C, Y1FR-F e Y1FR-I. Também analisamos um clone de Y1 que foi engenheirado em nosso laboratório para atender a outros propósitos e que superexpressam ciclina D1 (Y1D1-G), e duas sublinhagens resistentes ao FGF2 que foram isoladas a partir dele, Y1D1G-FR5.3 e Y1D1G-FR10.4.

Nas células parentais, M1 foi encontrado em 97% das placas metafásicas analisadas, e M2, em 100 % (n=135), indicando que os cromossomos marcadores estão conservados na população. Em todas as sublinhagens resistentes, no entanto, o cromossomo M1 não foi encontrado em nenhuma do total de 153 placas

metafásicas analisadas (Tabela 3; Figura 17, C), indicando que a seleção com FGF2 favoreceu as células que eliminaram o cromossomo M1.

Apesar da eliminação estrita do cromossomo M1, o outro cromossomo que carrega aproximadamente metade das cópias amplificadas de K-ras, M2, foi consistentemente mantido nas sublinhagens resistentes, estando presente em 94% das 153 placas metafásicas amostradas (Tabela 3; Figura 17, C). Os níveis muito baixos da proteína K-Ras observados nas sublinhagens Y1FR (Figura 12, A), no entanto, sugerem que as cópias do gene K-ras carregadas por M2 estão silenciadas nas sublinhagens resistentes. Esses resultados não permitem avaliar se o silenciamento das cópias de K-ras do cromossomo M2 ocorreu durante a seleção com FGF2, ou se as cópias já estavam silenciadas nas células parentais. Entretanto, elas permanecem ativáveis pelo menos na sublinhagem Y1FR-I, que manteve os altos níveis de expressão de K-Ras, apesar de ter eliminado o cromossomo M1, restando apenas o M2 como fonte de cópias do oncogene.

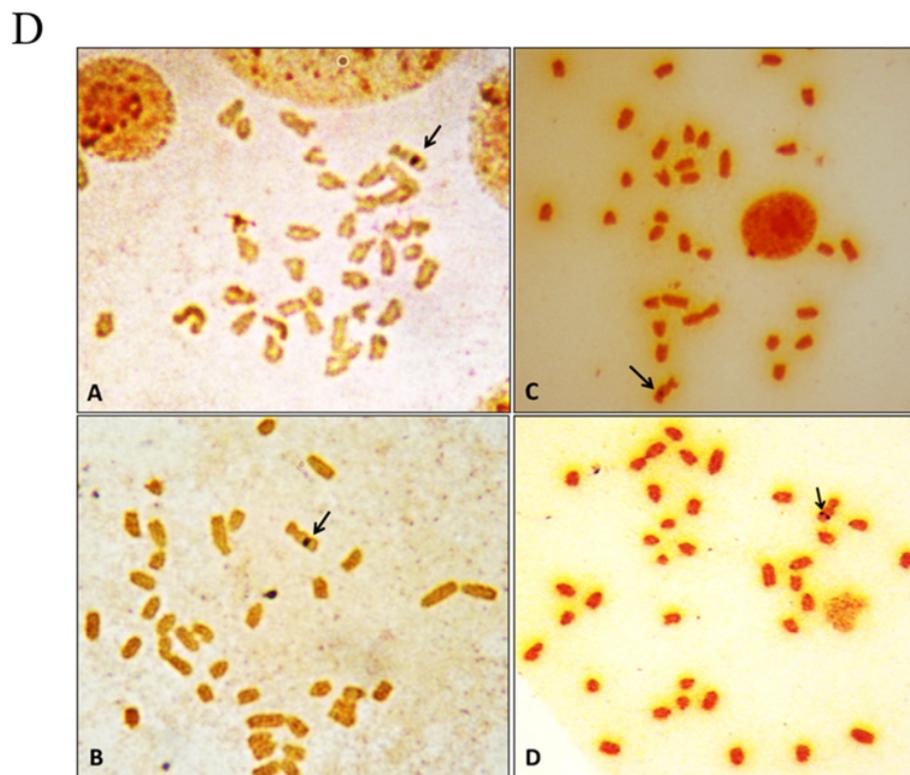
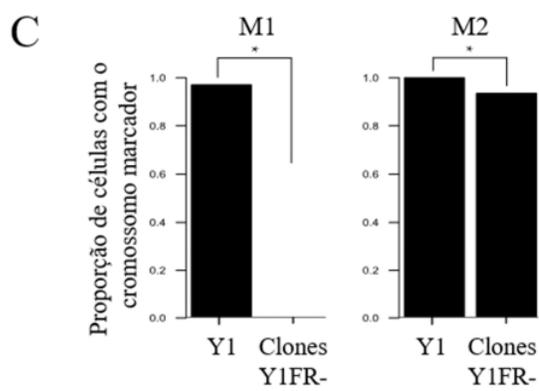
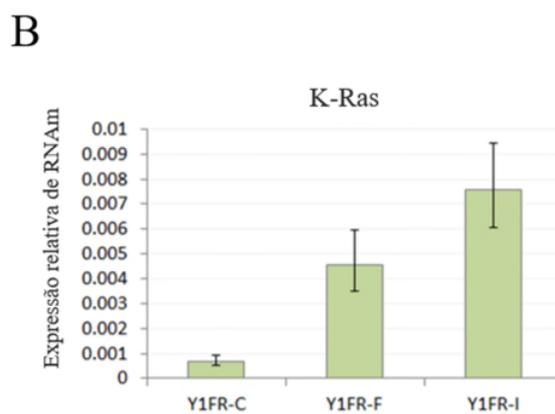
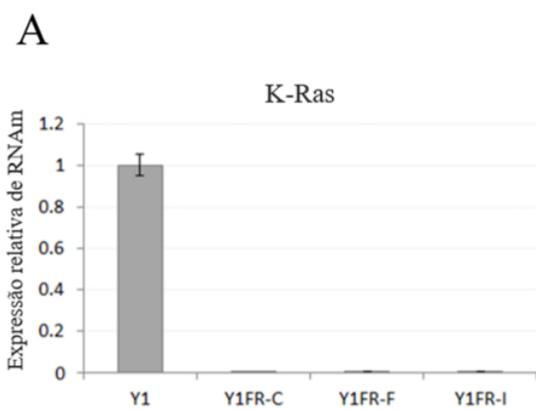
Tabela 3: Frequência dos cromossomos M1 e M2 nas células parentais Y1 e suas sublinhagens resistentes ao FGF2.

	Frequência de M1 	Frequência de M2 
Células Parentais (n=135)	97.0%	100%
Clones Y1FR (n=153)	0.0%	94.1%

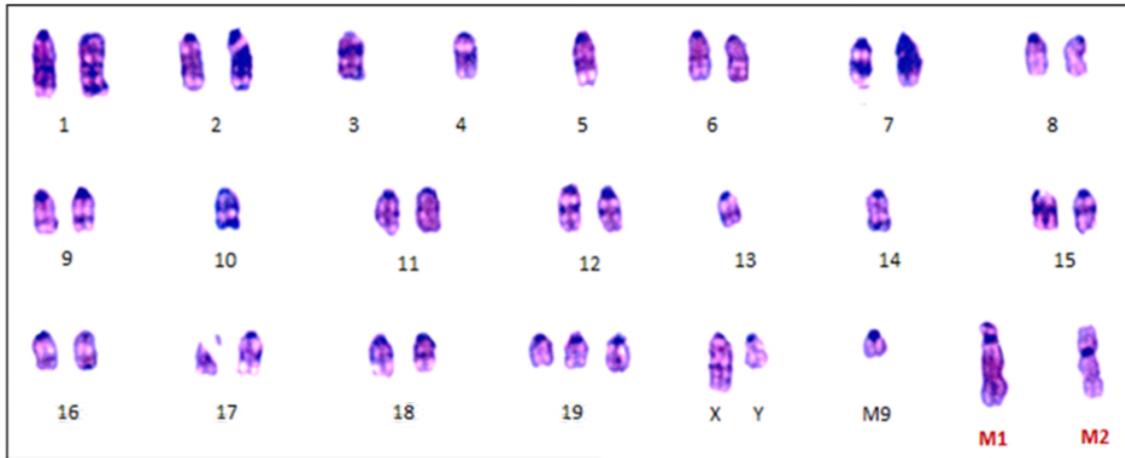
Perguntamo-nos o que poderia explicar a altíssima prevalência de M2 frente à pressão seletiva do FGF2 para eliminação das cópias de K-ras, como sugeriu a

eliminação completa de M1. A marcação dos genes ribossomais transcricionalmente ativos com a técnica de bandeamento Ag-NOR (Nucleolar Organizing Regions) (Goodpasture and Bloom, 1975) revelou que todas as regiões organizadoras de nucléolo descritas para *Mus musculus* (Henderson, Eicher and Harbor, 1974; Henderson *et al.*, 1976; Dev *et al.*, 1977) estão desligadas nas células Y1 e Y1FR. O único cromossomo que transcreve RNA ribossômico é o M2, tornando-o essencial para a sobrevivência celular (Tabela 3, Figura 17, C e D). Esses resultados indicam que a eliminação das cópias amplificadas de K-ras é um pré-requisito para a emergência do fenótipo resistente ao FGF2.

Os itens E e F da figura 17 apresentam cariótipos representativos das linhagens Y1 e Y1FR, respectivamente, nos quais pode-se observar a presença de ambos cromossomos marcadores nas células parentais, e apenas de M2 nas células resistentes. Todos os cariótipos construídos durante o estudo citogenético dessas linhagens celulares estão apresentados como apêndices a esta tese.



E



F

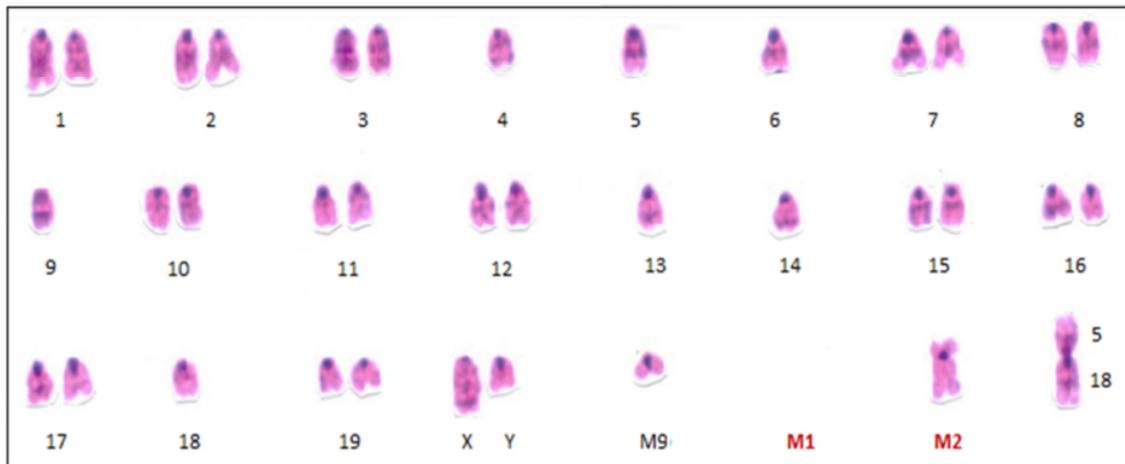


Figura 17: As sublinhagens Y1FR estritamente eliminaram o cromossomo M1 e conservaram o M2. **A:** Quantificação relativa dos transcritos de K-Ras nas células Y1 e 3 clones Y1FR-, inclusive Y1FR-I, que manteve a alta expressão da proteína K-Ras. **B:** Mesmo experimento apresentado em A, em outra escala, de modo a permitir a visualização das diferenças de expressão entre as sublinhagens Y1FR-. **C:** Frequência dos cromossomos M1 e M2 nas células Y1 *versus* Y1FRs. $p < 0,002$. **D:** Placas metafásicas de células parentais (a,b) e de sublinhagens resistentes ao FGF2 (c, d), coradas pela técnica Ag-NOR, evidenciando as únicas regiões organizadoras de nucléolo ativas nessas células localizadas no cromossomo M2. **E:** Cariótipo representativo das células Y1, corado pela técnica de banda-G. **F:** Cariótipo representativo das células Y1FR (Y1D1G-FR10.4 é mostrado como modelo), corado pela técnica de banda-G, evidenciando a ausência do cromossomo M1.

5.2.4. As sublinhagens resistentes ao FGF2 mostraram baixíssimos níveis basais de K-RAS-GTP e eliminaram a expressão da principal RasGEF que as células parentais expressam.

Nossos resultados anteriormente publicados (Costa *et al.*, 2008) mostraram que as células parentais Y1 mantêm altos níveis basais da forma ativada de K-Ras, isto é, K-Ras-GTP. Estes altos níveis de K-Ras-GTP correlacionaram-se com os seguintes traços fenotípicos das células parentais Y1: a) potencial tumorigênico em camundongos Nude; b) características de célula transformada em cultura; c) sensibilidade à ação citotóxica de FGF2. Obviamente, as sublinhagens Y1FRs com reduzidíssima expressão de K-Ras total não poderiam expressar níveis basais altos de K-Ras-GTP, fato que explicaria sua resistência a FGF2. Por outro lado, não sabíamos quais os níveis de K-Ras-GTP nas Y1FR-I, que também é resistente a FGF2, mas exibe elevados níveis de expressão de K-Ras total. Para resolver estas dúvidas, medimos quantitativamente os níveis de K-Ras-GTP nas três sublinhagens de Y1 que elegemos como modelo, através do conhecido ensaio de *pull down*, que utiliza a associação de K-Ras-GTP ao domínio de ligação a RAS da proteína RAF, que é substrato específico natural de RAS-GTP.

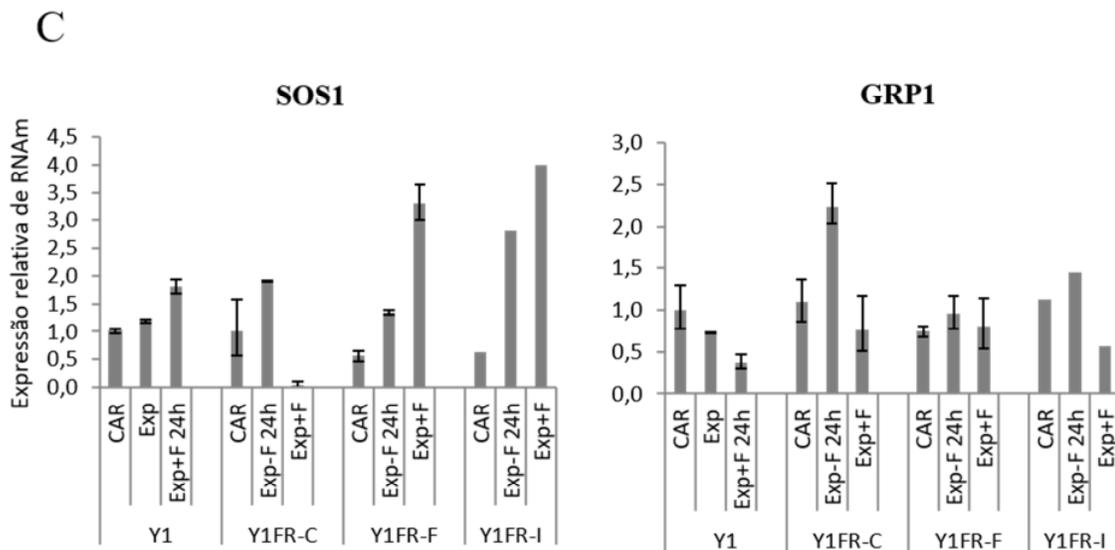
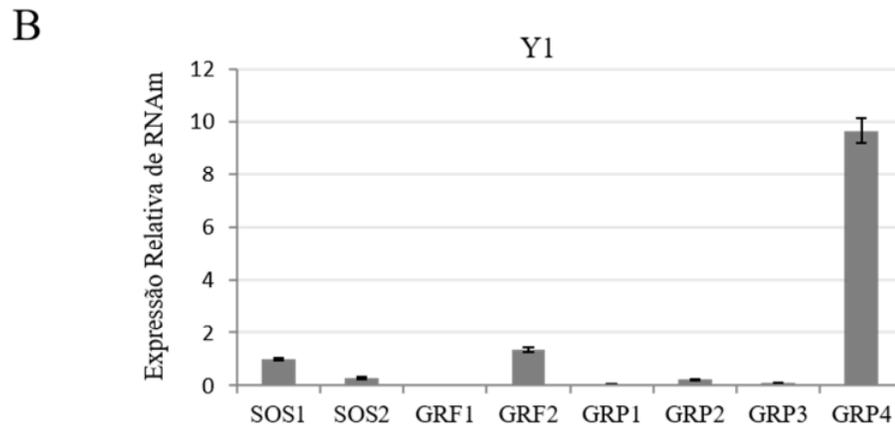
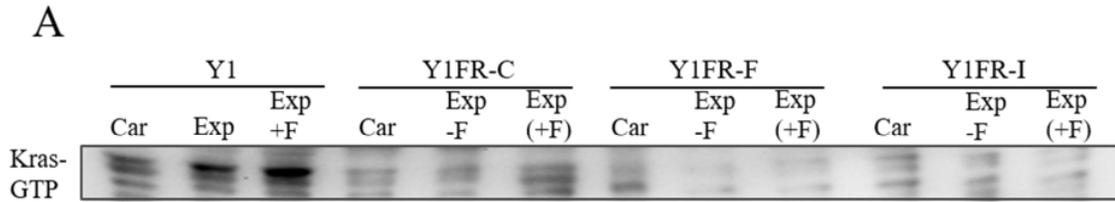
Analisamos as sublinhagens resistentes em três condições de crescimento: sem soro e sem FGF2 por 24 horas (carenciadas); estimuladas com 10% de soro, mas sem FGF2 por 24 horas; e em crescimento exponencial (10% de soro + FGF2). No caso das células parentais Y1, analisamos a condição carenciada, que corresponde à ausência de soro por 48 horas; crescimento exponencial (10% de soro), e crescimento exponencial com adição de FGF2 por 24 horas (10% de soro + FGF2). Como esperado, as sublinhagens Y1FR-C e Y1FR-F, com baixíssimos níveis

de K-Ras total, não mostraram valores detectáveis de K-Ras-GTP. Porém, as Y1FR-I, que expressam altos níveis K-Ras total, também não mostraram níveis significantes de K-RAS-GTP (Figura 18, A). Portanto, a sensibilidade das células Y1 à ação citotóxica de FGF2 depende de outros fatores além dos altos níveis de expressão de K-Ras total.

Recentemente, nosso grupo de biologia computacional (Marcelo Reis e outros, 2014 e 2016) desenvolveu um modelo dinâmico matemático-computacional do ciclo K-Ras-GDP \leftrightarrow K-Ras-GTP em células Y1. Simulações computacionais com esse modelo permitiram prever que altos níveis basais de K-Ras-GTP em células Y1 só são possíveis de existir se as células expressarem um segundo Ras-GEF (*Guanine-Exchange Factor*) independente de estimulação por FGF2, além de SOS-1 / 2, que dependem de estimulação por FGF2.

Para testar experimentalmente esta previsão computacional, investigamos os níveis de expressão dos membros das famílias de Ras-GEFs conhecidas (SOS, GRP e GRF), por RT-qPCR, nas mesmas condições em que medimos os níveis de K-Ras-GTP. Em células Y1 carenciadas, o item B da figura 18 mostra os níveis de expressão de cada GEF relativos ao nível de SOS1; GRP4 foi a GEF predominante nas células parentais, sendo transcrita 8 e 10 vezes mais que, respectivamente, GRF2 e SOS1. A figura 18, C mostra os níveis de cada GEF em todas as linhagens e condições de crescimento avaliadas, sempre relativos ao nível do respectivo Ras-GEF em células Y1 carenciadas. O destaque nestes resultados de expressão gênica é que GRP4, GEF predominante nas células Y1, está ausente em todas as sublinhagens resistentes ao FGF2, inclusive naquela com altos níveis de K-Ras total, isto é, Y1FR-I. Portanto, provavelmente, os altos níveis basais de K-Ras-GTP

encontrados nas células parentais Y1 dependem concomitantemente de alta expressão de K-Ras total e de altos níveis de atividade de GRP4.



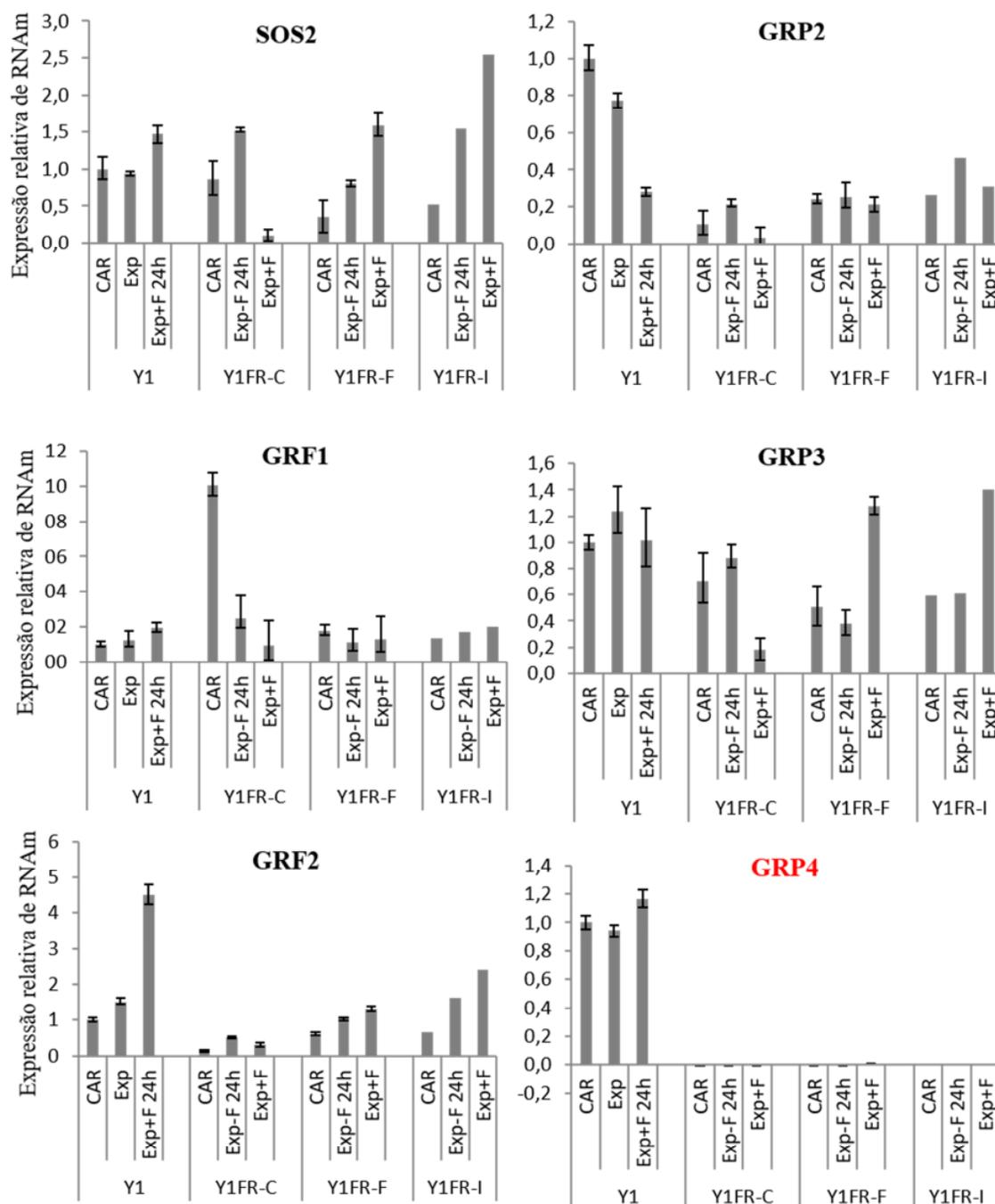


Figura 18: Análise dos níveis de K-Ras-GTP e de expressão dos mRNAs dos RasGEFs nas células parentais Y1 e nas três sublinhagens Y1FR-C, -F e -I. **A:** *Pull down assays* de K-Ras-GTP nas células Y1 e nas sublinhagens Y1FRs. Car: carenciada, Exp: crescimento exponencial (com FGF2), Exp -F: Estimulada com soro mas sem FGF2. **B:** Níveis de expressão de mRNA dos RasGEFs em Y1 carenciadas em relação a SOS1. **C:** Níveis de mRNA dos RasGEFs para todas as linhagens celulares, tendo sempre como referência os níveis do respectivo RasGEF em Y1 carenciada.

5.2.5. As sublinhagens Y1FR são estáveis cariotipicamente, embora apresentem aneuploidia mais severa do que as células parentais e apresentem mais cromossomos fusionados.

A análise citogenética das células parentais e clones Y1FR revelou outras peculiaridades dessas células que nos chamaram a atenção. A contagem de cromossomos revelou que as sub-linhagens Y1FR são mais severamente aneuplóides do que as células parentais Y1, cada clone tendo eliminado aproximadamente 5 cromossomos em média a partir do conjunto de 38 cromossomos das células parentais (Y1D1G-FR10.4 perdeu não 5, mas 3 cromossomos) (Tabela 4; Figura 19, A). Apesar de tamanha perda de material genético, o número de cromossomos por célula em cada sublinhagem é bem definido, ou seja, apresenta um desvio bastante estreito, indicando que os cariótipos das sublinhagens Y1FR são estáveis (Tabela 4). Curiosamente, a sublinhagem que manteve a alta expressão de K-Ras foi exceção: ela apresentou muito mais cromossomos do que as células parentais, e com um desvio muito grande ($2n$ variou de 31 a 79), indicando que essa sublinhagem é citogeneticamente instável (Tabela 4; Figura 19, A).

Tabela 4: Contagem do número de cromossomos das células Y1 e de cada sublinhagem Y1FR.

Linhagem	Nº amostral	Número de cromossomos (Média ± DesvPad)
Y1	74	37,5 ± 3,5
Y1-D1G	71	38,2 ± 1,4
Y1FR-A	15	33,3 ± 3,7
Y1FR-C	50	32,6 ± 4,4
Y1FR-F	17	32,4 ± 4,2
Y1D1G-FR5.3	60	33,6 ± 3,8
Y1D1G-FR10.4	16	35,1 ± 2,7
Y1FR-I (Alta expressão de K-Ras)	18	53,6 ± 15,6

Além da aneuploidia agravada nos clones resistentes ao FGF2, sua análise citogenética também revelou que eles possuem maior número de fusões cromossômicas do que as células parentais. Não existem na literatura trabalhos que avaliaram a frequência de fusões cromossômicas no cariótipo das células Y1. Nós encontramos uma fusão frequente, em 52,8% das células parentais Y1 analisadas, cujo padrão de bandas G dos cromossomos envolvidos era conservado (Figura 19, B). Pelo padrão de bandas, identificamos que os cromossomos envolvidos na fusão podem ser o 5 e 18, porém esta hipótese não foi confirmada por outro método. A mesma fusão cromossômica foi encontrada nas sublinhagens resistentes ao FGF2, em frequências variáveis, mas sempre altas (Tabela 5). Não pudemos avaliar as implicações que essa fusão possa ter tido, ou não, para o fenótipo e expressão gênica das células Y1 e Y1FR. Mas, para além desta, percebemos que outras fusões cromossômicas, com padrões de bandas variáveis, eram mais frequentes nas

placas metafásicas de sublinhagens resistentes ao FGF2 do que nas de Y1. Por isso, contamos o número de cromossomos fusionados nas células parentais e em cada sublinhagem resistente. Constatamos que algumas delas de fato apresentam mais cromossomos fundidos do que as células parentais, especialmente a sublinhagem que manteve os altos níveis de expressão de K-Ras total e cujo cariótipo é instável (Y1FR-I) (Figura 19, C).

Tabela 5: Frequência da fusão entre os cromossomos, possivelmente, 5 e 18 nas células Y1 e em cada sublinhagem Y1FR.

	Y1	Y1FR-A	Y1FR-C	Y1FR-F	Y1FR-I	Y1D1G-FR5.3	Y1D1G-FR10.4
Frequência da fusão 5-18	52.8%	50.0%	87.0%	92.3%	100.0%	96.7%	100.0%
Nº amostral	53	6	46	13	14	60	16

A fusão de cromossomos não homólogos resulta do reparo de DNA por junção de pontas não homólogas (*Non-Homologous End Joining*) em resposta a dano no DNA do tipo quebra de dupla fita (Lieber, 2011). Esse tipo de dano provoca a fosforilação do resíduo de serina 139 da histona H2AX (γ H2AX), cujas evidências constatamos nas células Y1 em resposta ao tratamento com FGF2 (Figura 10, A e B). Acreditamos que seja possível que a maior frequência de cromossomos fusionados nas sublinhagens resistentes após a seleção com FGF2 resulte do dano no DNA que este fator provocou nas células Y1, durante o processo de seleção, como resultado da exacerbação do estresse replicativo basal dessas células (Figura 10).

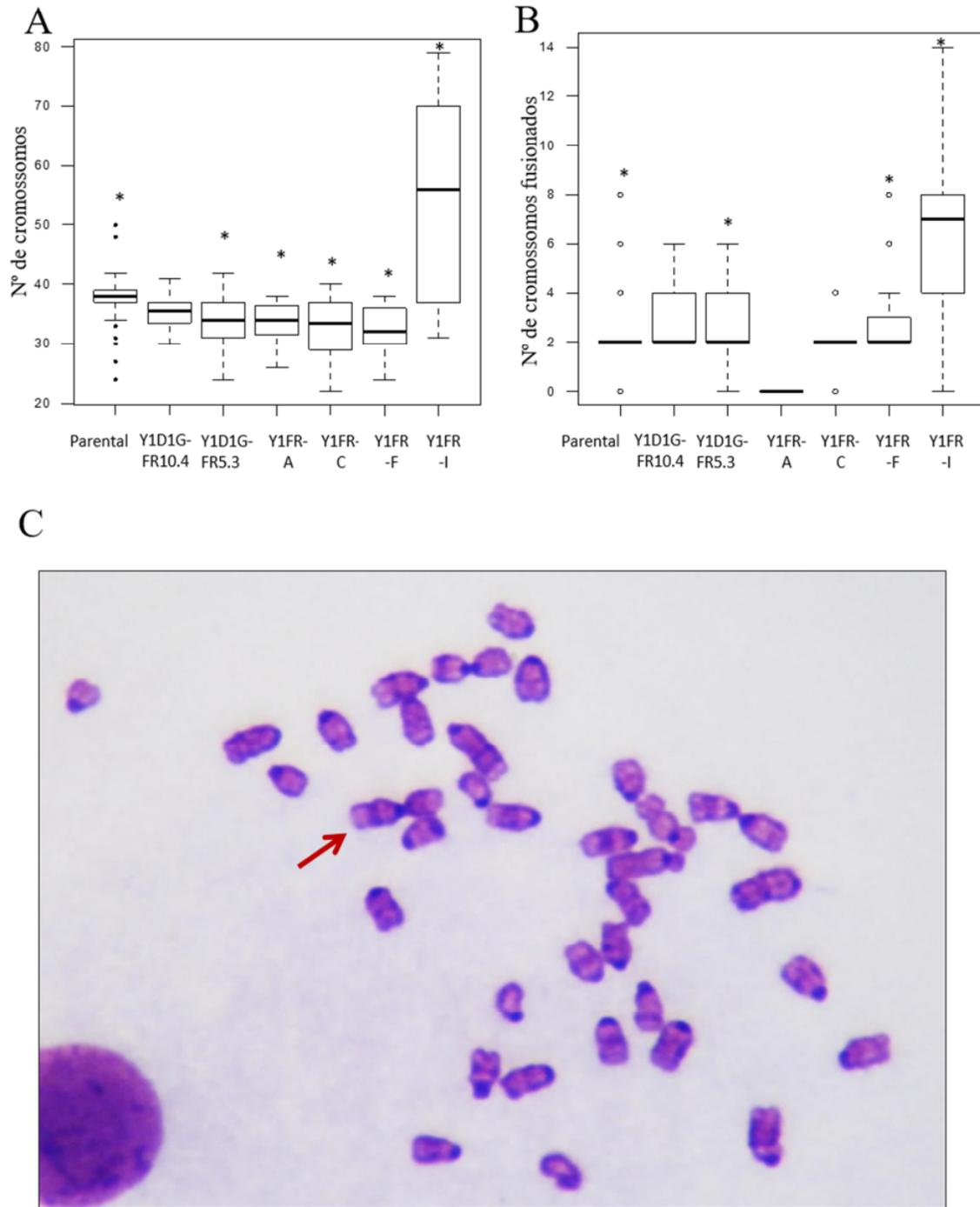


Figura 19: Contagem do número de cromossomos total e fusionados nas células Y1 e Y1FRs. **A:** Número total de cromossomos nas linhagens indicadas. $p < 0,05$. **B:** Número de cromossomos fusionados nas linhagens indicadas. $p < 0,05$. **C:** Placa metafásica de Y1. A seta vermelha indica a frequente fusão cromossômica encontrada nessas células, possivelmente entre os cromossomos 5 e 18.

5.2.6. Os clones resistentes ao FGF2 também são propensos à hiperativação da Resposta a Dano no DNA e à dependência da sinalização de ATR para proliferar e sobreviver.

Como demonstramos anteriormente, as sublinhagens selecionadas para resistência ao FGF2 dependem deste fator para proliferar (Figura 15, C). Investigamos se a eliminação da alta atividade de K-Ras nas células Y1FR (Figura 15, A) condicionou a eliminação da ativação constitutiva da Resposta a Dano no DNA e a dependência da sinalização de ATR, exibidas pelas células Y1 e agravadas na presença de FGF2 (Figuras 11 e 12). As sublinhagens resistentes também exibiram níveis basais de γ H2AX, em condições de crescimento exponencial (soro + FGF2) ou mesmo após 24 horas sem FGF2. Nas sublinhagens Y1FR-C e Y1FR-G, os níveis de γ H2AX foram praticamente os mesmos, com ou sem FGF2. A Y1FR-D, apresentou maior nível de γ H2AX na ausência de FGF2, enquanto a Y1FR-F e Y1FR-I apresentaram maiores níveis na presença de FGF2 (Figura 20). Os níveis de γ H2AX nas sublinhagens resistentes, portanto, não parecem ter relação com a presença do FGF2. É possível que eles sejam resultado da nova configuração genômica dessas células, que apresentaram significativa perda de material genético (Figura 20; Tabela 4).

Também verificamos que, como nas células parentais Y1, os níveis basais de dano no DNA das células Y1FR provocou a ativação das vias ChK1-Wee-CDK1, p53-p21 e p38-MK2-CDC25B, dependentes de ATR (Tibbetts *et al.*, 1999; Bulavin, Amundson and Fornace, 2002; Nghiem *et al.*, 2002; Do, Doroshov and Kummar, 2013). Contudo, a ativação destes três eixos de sinalização de *checkpoint* nas sublinhagens resistentes ocorreu somente, ou principalmente, no caso de p38, na

presença do FGF2 (Figura 20). Além disso, os clones Y1FR também expressaram constitutivamente níveis totais de p53 bastante elevados em relação às células parentais, os quais são fortemente ativados na presença do FGF2 (Figura 20). Como a proliferação das sublinhagens Y1FR é estritamente dependente do FGF2, esses resultados sugerem que essas células, assim como as parentais, são dependentes da sinalização de ATR.

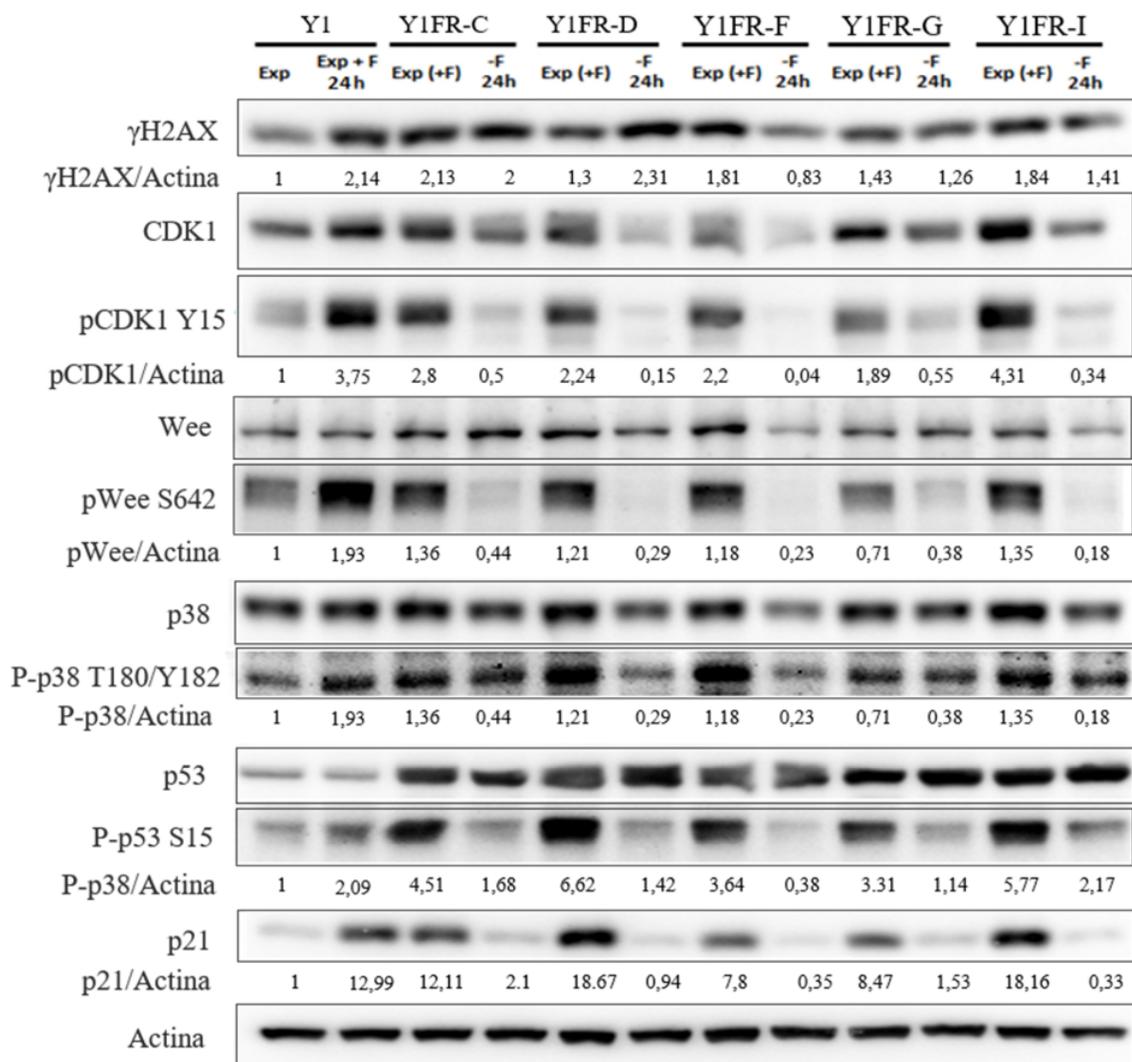
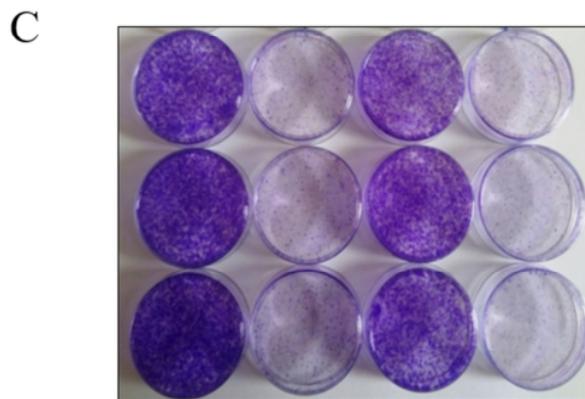
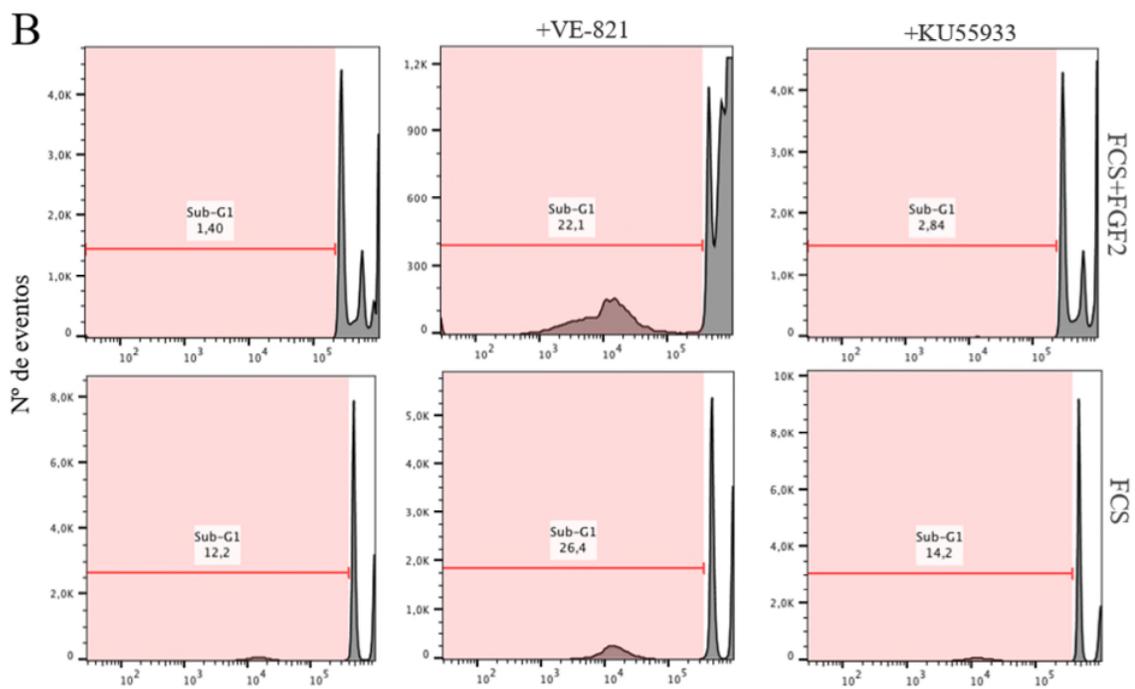
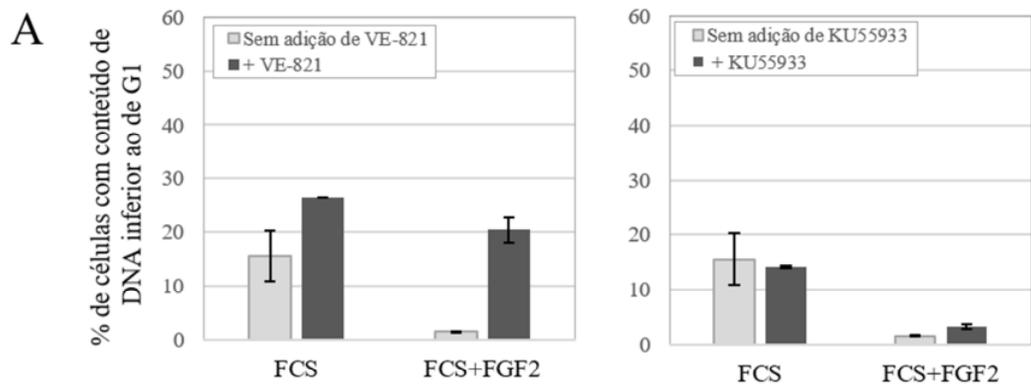


Figura 20: Análise de expressão de proteínas marcadoras de DDR e *checkpoint* em células Y1 e Y1FRs. *Western blotting* para γH2AX e marcadores de DDR e *checkpoint* nas linhagens indicadas. Em Y1: crescimento exponencial ou tratada com 10 ng/mL de FGF2 por 24 horas. Condições em Y1FRs: crescimento exponencial (soro+FGF2) ou sem FGF2 por 24 horas.

A seguir, analisamos por citometria de fluxo a porcentagem da população de Y1FR-C com conteúdo de DNA menor que o de G1, como indicativo de morte celular, em resposta à inibição química das vias de *checkpoint* ativadas por ATR (VE-821) e ATM (KU55933). A ausência de FGF2 aumentou a população sub-G1 neste clone (Figura 21, A e B), sugerindo que as sublinhagens Y1FR dependem do FGF2 primeiramente para sobreviver. Como as células parentais Y1, as células Y1FR-C ficaram viciadas na sinalização de ATR, como mostraram os altos níveis de morte celular induzidos por VE-821. A inibição química de ATM, por outro lado, não teve efeito significativo sobre a indução de morte celular (Figura 21, A e B). Esse resultado foi observado também em ensaio clonogênico, realizado com a mesma sublinhagem em condições normais de crescimento (soro + FGF2), acrescidas ou não dos inibidores de ATR e ATM. O inibidor de ATR impediu completamente a formação de colônias, enquanto o de ATM não teve efeito aparente (Figura 21, C). Esses resultados sugerem que a emergência de clones resistentes ao FGF2 a partir da linhagem Y1 envolve a fixação da Resposta a dano no DNA ativa e da sinalização de *checkpoint* dependente de ATR para lidar com o estresse replicativo induzido pelo FGF2.



FCS	+	+	+	+
+ FGF2	+	+	+	+
+ VE-821	-	+	-	+
+ KU55933	-	-	+	+

Figura 21: Efeito da inibição específica de ATR ou ATM em células Y1 e Y1FR-C. **A:** Quantificação de células com conteúdo de DNA inferior ao de G1, por citometria de fluxo, 96 horas após retirada ou não do FGF2 do meio de cultura e adição ou não de 2 uM do inibidor de ATR (VE-821) ou de ATM (KU55933). Experimento realizado em duplicata. **B:** Histogramas do ensaio apresentado em A. **C:** Ensaio clonogênico de células Y1FR-C nas condições indicadas. FGF2 aplicado a 10 ng / mL e inibidores, a 2uM. Tratamento sustentado.

5.3. FGF2 ativa de forma sustentada a via de MAPK-ERK1/2 e sensibiliza células de Sarcoma de Ewing a inibidores do *checkpoint* de ATR.

Os dados até aqui apresentados, focados na linhagem Y1 de células murinas transformadas por K-Ras, mostraram que ativação mitogênica combinada com inibição da via de resposta a estresse replicativo perturbou a homeostase destas células tumorais, resultando em morte celular. Questionamos se esta resposta seria válida para células tumorais humanas, e para o teste desta hipótese, usamos um conjunto de linhagens celulares da família de sarcomas de Ewing (ESFT): **A673, RD-ES, SK-N-MC e TC-32**. Elas foram testadas para a toxicidade da combinação de FGF2 e de inibidores de *checkpoint* celulares em condições ideais de cultura. Nós avaliamos o potencial dessa combinação de tratamentos em desencadear morte celular. Assim, para cada linhagem celular, plaqueamos um número adequado de células (indicados na legenda da figura 22) e, após os tratamentos, medimos morte celular por marcação com anexina V e/ou iodeto de propídio através de citometria de fluxo. O regime de inibição do *checkpoint* foi de 72 horas com FGF2 combinado com o inibidor de ATM (KU-55933), ATR (VE-821) ou ambos inibidores, uma vez que as funções destas quinases podem se sobrepor, mas não são completamente redundantes (Cimprich and Cortez, 2008). A

combinação de FGF2 com cada um dos inibidores reduziu o número de células vivas em maior extensão do que os respectivos tratamentos como agentes únicos em 3 dos 4 modelos de células ESFT. Em todas as células ESFT, a associação de FGF2 e VE-821 reduziu o número de células vivas para cerca de metade dos medidos usando este inibidor de ATR como agente único (figura 22, A), de acordo com o papel da ATR como a principal quinase envolvida na resposta ao estresse replicativo (Saldivar *et al.*, 2017). A associação de FGF2 e KU-55933, por outro lado, resultou em aumento significativo de toxicidade apenas nas células A673 (figura 22, A).

Em seguida, abordamos os efeitos da inibição de ATR na viabilidade celular em longo prazo com ou sem FGF2. As células A673, SK-N-MC e TC-32 foram tratadas com FGF2 e VE-821 como agentes únicos ou combinados, por 72 horas. A seguir, o meio de cultura foi removido, a placa foi lavada com PBS para remoção completa dos agentes adicionados, e as células foram cultivadas em meio de cultura fresco, renovado a cada 2 dias, por 10 dias adicionais. Os resultados mostraram que FGF2 e VE-821, como agentes únicos, têm efeitos variáveis sobre a viabilidade em longo prazo das linhagens celulares testadas. Por outro lado, a associação de FGF2 com o inibidor de ATR foi ainda mais tóxica do que o esperado pelos dados de citometria de fluxo, resultando em uma redução maciça na viabilidade celular após 10 dias (Figura 22, B). Esses dados demonstram que a ativação da sinalização de FGF2 também sensibiliza letalmente células tumorais humanas a tratamentos com inibidores de *checkpoints* do ciclo celular.

Finalmente, como tanto Ras quanto EWS-FLI1, assim como muitos outros oncogenes, causam ativação aberrante da via de MAPK-ERK para promover tumorigênese (Silvany *et al.*, 2000; Dhillon *et al.*, 2007), e motivados por nossa

observação anterior de que a ativação basal do *checkpoint* de G2 era diminuída quando a via de MAPK era inibida (Figura 11), avaliamos se a hiperativação desta mesma via faria parte do mecanismo molecular subjacente à toxicidade do FGF2. Nossos resultados mostraram que a atividade de FGF2 mantém níveis elevados de p-ERK1/2 em todas as linhagens celulares, exceto SK-N-MC, mesmo 24h após a estimulação (Figura 22, C). A depleção de K-Ras, que conforme mostrado anteriormente protege as células Y1 contra a toxicidade do FGF2 e a sensibilização à inibição de ATR, preveniu a ativação sustentada de MAPK em células Y1-4K. Além disso, usando o mesmo regime de tratamento de 72 horas, a inibição farmacológica de MEK 1 / 2, mesmo 8 horas após a estimulação com FGF2, impediu a toxicidade em longo prazo desencadeada pela combinação de FGF2 e do inibidor de ATR em células A673 e TC-32 (Figura 22, D). O conjunto desses resultados mostra que, ao sustentar a hiperativação de MAPK-ERK1 / 2, o FGF2 reforça a dependência das vias de resposta ao estresse replicativo, aumentando a toxicidade da inibição de ATR em células tumorais murinas e humanas.

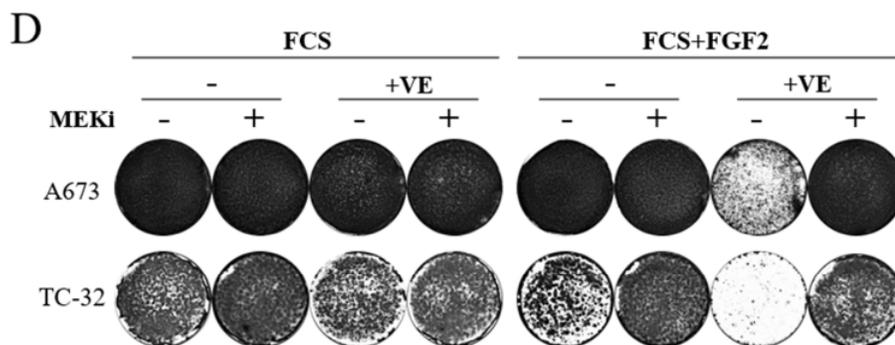
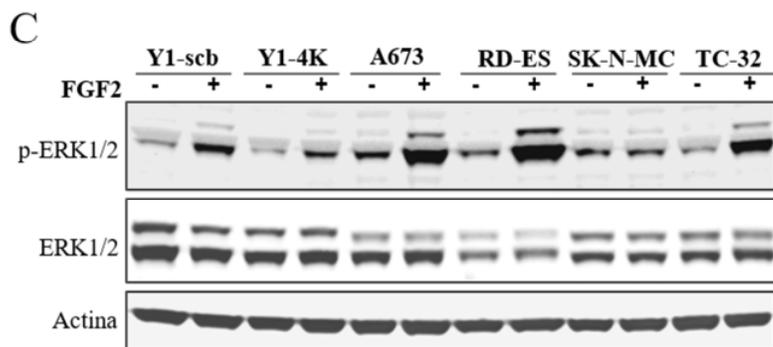
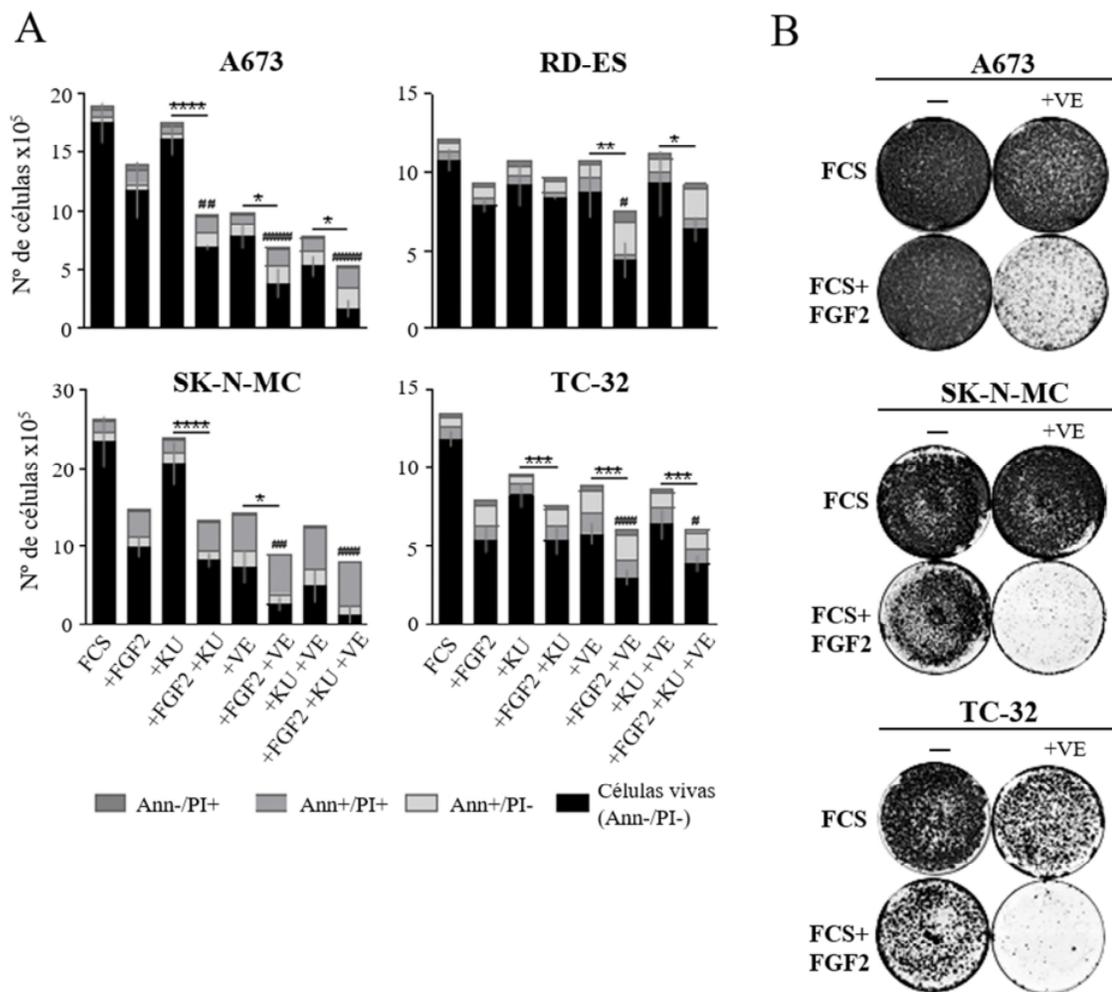


Figura 22: FGF2 ativa de forma sustentada a via de MAPK-ERK1/2 e sensibiliza letalmente células humanas ESFT para a inibição do *checkpoint* dependente de ATR. **A:** Citometria de fluxo de células ESFT crescendo em meio completa na presença ou ausência de FGF2 por 72h, com concomitante adição de KU55933 (+KU), VE-821 (+VE), ou ambos (+KU +VE) nas últimas 48h. Cada linhagem celular foi tratada e plaqueada nas seguintes concentrações: A673 - FGF2 20 ng / ml, KU 5 μ M e VE 5 μ M; 1x10⁵ células foram plaqueadas. Células RD-ES - FGF2 20ng / ml, KU 5 μ M e VE 5 μ M; Foram plaqueadas 2,5x10⁵. Células SK-N-MC - FGF2 1 ng / ml, KU 5 μ M e VE 2 μ M; foram plaqueadas 2,5x10⁵ células. Células TC-32 FGF2 5ng / ml, KU 5 μ M e VE 2 μ M; 1,5x10⁵ células foram plaqueadas. A marcação dupla de anexina V / iodeto de propídio (PI) foi utilizada como indicativa de morte celular. Os resultados são expressos em números absolutos de células por placa 72h após a estimulação. As barras de erro indicam média \pm Desvio padrão de células vivas (n = 3, experimentos independentes). (*) indica $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p \leq 0,001$. (#) refere-se a diferenças significativas da amostra tratada com FGF2. **B:** Ensaio representativo comparando a viabilidade a longo prazo das células A673, TC-32 e SK-N-MC tratadas com as combinações de FGF2 e VE-821. As células foram plaqueadas e tratadas como descrito em A. Após os tratamentos, os estímulos foram lavados, as placas foram cultivadas em meio completo durante 10 dias adicionais e depois fixadas e coradas. **C:** *Western blots* comparando os níveis de fosfo-ERK 1 / 2 (p-ERK1 / 2) entre células Y1-scb, Y1-4K e ESFT em presença ou ausência de FGF2. FGF2 (+) (10 ng / ml para Y1-scb e Y1-4K; 20ng / ml para A673 e RD-ES; 1ng / ml para SK-N-MC e 5 ng / ml para células TC-32) foi adicionado às células crescendo em meio de cultura completo e as placas foram coletadas 24 hora depois. ERK total e a actina foram utilizados como controles de *loading*. **D:** Ensaio representativo que compara a viabilidade a longo prazo das células A673 e TC-32 tratadas com as combinações de FGF2 e VE-821, com ou sem a adição do selumetinib, inibidor de MEK. As células foram plaqueadas e tratadas como descrito em A. 8h após a adição de FGF2, foram adicionados 5 μ M de selumetinib (MEKi +) às placas indicadas. 72h após a adição de FGF2, os estímulos foram lavados, as placas foram cultivadas em meio completo durante 10 dias adicionais, e então foram fixadas e coradas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Os mecanismos moleculares do efeito citotóxico do FGF2 em células murinas Y1 e humanas ESFT, dirigidas pela sinalização de Ras.

Os mecanismos moleculares do efeito citotóxico do FGF2 sobre células transformadas por Ras foram foco de alguns projetos de doutorado desenvolvidos em nosso laboratório desde 2008, quando o efeito foi descrito e inicialmente caracterizado na linhagem murina Y1 (Costa *et al.*, 2008). Ao longo desta década, identificamos que o FGF2 exerce um efeito antagônico sobre esta linhagem: ativa vias mitogênicas, estimulando a transição $G0 \rightarrow G1$, mas também perturba a progressão por S e causa um bloqueio irreversível em G2. Mais recentemente, identificamos que uma porcentagem alta da população celular, aproximadamente 40%, fica atrasada na fase G1, devido a mecanismos moleculares não esclarecidos, mas que provavelmente envolvem múltiplos efeitos; por exemplo, desequilíbrio nas vias metabólicas envolvidas na intensa atividade biossintética necessária ao crescimento celular acelerado, induzida pela hiperativação mitogênica. Também descrevemos que o efeito citotóxico do FGF2 depende da atividade de Ras, Src, e Rho-A e é processado na linhagem Y1 pelo receptor FGFR1 (Costa *et al.*, 2008; Salotti *et al.*, 2013). Estes trabalhos fundamentaram a proposição do projeto de doutorado que resultou nesta tese. Nossa hipótese inicial era que o FGF2 impedia a entrada na mitose, provocando um bloqueio do ciclo celular predominantemente em G2. Por isso, trabalhamos com o primeiro objetivo de elucidar como o FGF2 interferiria na rede de sinalização molecular que controla a transição $G2 \rightarrow M$.

Usando a linhagem celular Y1 como modelo, identificamos uma ativação basal da via de ATR-ChK1 mesmo em células estimuladas apenas por soro, enquanto a adição de FGF2 provocou uma hiperativação desta via (Figura 11). ATR e seus efetores a jusante respondem a estresse replicativo, estabilizando e ajudando a reiniciar forquilhas de replicação empacadas (Zeman and Cimprich, 2015). Por isso, essa descoberta nos remeteu a dados anteriores de nosso grupo que indicavam que o FGF2 provocava grande atraso em S e interrupção da incorporação de Brd-U em células que já haviam iniciado a replicação do DNA (bioRxiv, Preprint, Dec 3, 2017; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/227496>). Para confirmar a exacerbação de estresse replicativo como parte do mecanismo de citotoxicidade do FGF2, investigamos os níveis de dano no DNA em células tratadas ou não, procurando discriminar a fase do ciclo celular em que o aumento dos níveis de histona γ H2AX era desencadeado. Novamente, identificamos um nível basal de dano no DNA destas células, mesmo em condições normais de crescimento, enquanto o FGF2 provocou grande aumento apenas quando esteve presente durante ou após a replicação do DNA (Figura 10). A hipótese de exacerbação do estresse replicativo foi ainda corroborada pelo aumento da exposição de trechos de DNA em simples fita quando as células foram tratadas com FGF2, o que é um indicativo de parada ou colapso de forquilhas de replicação (Nam and Cortez, 2011; Marechal and Zou, 2013). É importante ressaltar que esta resposta foi dependente da hiperativação, sustentada no tempo, da principal via de sinalização mitogênica, a via de MAPK, como demonstrou o tratamento com a inibição química de MEK, que apagou a fosforilação basal de ChK1 e CDK1 nas células Y1 sem FGF2, diminuiu os níveis de fosforilação destas mesmas proteínas induzidos pelo tratamento com este fator de crescimento, e protegeu as células ESFT da letalidade induzida pela combinação de FGF2 e inibição de ATR (Figuras

11 e 22). A observação de que o efeito tóxico do FGF2 é decorrente da hiperativação de MAPK nos mostrou que na verdade o FGF2 não exerce um efeito pontual em G2, desregulando a sinalização que controla a entrada na mitose. Ao contrário, o bloqueio do ciclo celular observado em G2 é consequência de estresse mitogênico disparado em G1, que se propaga para S, causando problemas na replicação do DNA. O consequente aumento dos níveis basais de ativação do *checkpoint* de ATR bloqueia a entrada em uma mitose que seria catastrófica, dados os altos níveis de dano no DNA resultantes do estresse replicativo (Figura 10). Portanto, a ativação do *checkpoint* de ATR nas células tratadas por FGF2 é uma resposta essencialmente protetora.

O que denominamos aqui como estresse mitogênico é a hiperativação, sustentada no tempo, da via de MAPK, que normalmente já opera em níveis constitutivamente elevados em decorrência da amplificação de Ras, no caso de Y1, e da atividade suprimida de Sprouty, no caso das linhagens ESFT. Existem alguns mecanismos descritos na literatura que explicam como o estresse mitogênico pode perturbar a replicação do DNA. Notadamente, a ativação de oncogenes perturba a regulação do uso de origens de replicação: ao manter a atividade de CDK constitutivamente alta, inibe o licenciamento de origens. O licenciamento deficiente diminui o número de origens passíveis de serem ativadas, aumentando o trecho a ser coberto por cada forquilha e o risco de empacamento de forquilhas. Além disso, fica diminuída a disponibilidade de origens "*back-up*", aquelas que são ativadas por ChK1 para resgatar a replicação do DNA prejudicada pelo empacamento ou colapso de forquilhas previamente disparadas. Também existem evidências de que o aumento da atividade de CDK faz com que as origens tardias, normalmente disparadas no final de S, sejam disparadas mais cedo. A superexpressão de

diversos oncogenes, incluindo ras, reduz a distância entre origens em células humanas, indicando que mais origens estão sendo disparadas. O aumento no disparo de origens pode exaurir substratos necessários para a replicação, como dNTPs e RPA, o que diminui a velocidade de progressão das forquilhas e pode aumentar as chances de empacamento e colapso (Hills and Diffley, 2014). Outros mecanismos descritos incluem: 1) o reuso de origens e hiper-replicação do DNA, que acontecem quando ciclina E é superexpressa ou Ras é hiperativada, sendo essa a causa da resposta de senescência induzida por oncogenes (Bartkova *et al.*, 2005; Micco *et al.*, 2006); e 2) a colisão entre as maquinarias de transcrição e replicação, que também é uma causa reconhecida de estresse replicativo (Zeman and Cimprich, 2015), e pode ser parte do efeito provocado pelo FGF2 nas células Y1, uma vez que observamos aumento de síntese protéica e estresse proteotóxico nas células tratadas com FGF2 (bioRxiv, Preprint, Dec 3, 2017; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/227496>), sugerindo maior taxa de transcrição sob o tratamento. No caso das células Y1, o efeito do FGF2 sobre a replicação do DNA foi medido em nosso laboratório, quando foi identificado o atraso induzido em S. A velocidade de alongação da replicação foi estimada pelo perfil de sedimentação de DNA após ultracentrifugação em gradiente de sacarose alcalino, antecedido de um pulso de incorporação de timidina radioativa. Não houve diferença na alongação de células tratadas ou não com FGF2, e seu efeito em S foi atribuído ao bloqueio do disparo de origens ou à interrupção prematura de replicons (E.T. Costa, Tese de doutorado, 2005).

Uma vez estabelecida a participação da via de ATR na resposta ao FGF2, buscamos validar seu papel central no bloqueio do ciclo celular inibindo-a quimicamente. Como citado anteriormente, a ativação de ATR, assim como de

qualquer *checkpoint* celular, é uma resposta protetora, que dá chance para a célula reparar as condições intracelulares danosas antes de prosseguir no ciclo celular. A inibição química de ATR nas células Y1 com VE-821, mesmo sem tratamento com FGF2, aumentou significativamente a morte celular, embora não drasticamente, pelo menos nos períodos de tratamento avaliados neste trabalho. Da mesma forma, embora cause um bloqueio pronunciado na progressão do ciclo celular, não foi identificada a indução de morte celular pelo FGF2, seu efeito foi essencialmente citostático. A combinação de ambos os tratamentos, no entanto, induziu maciça morte na população de células Y1, revelando letalidade sintética entre as vias ativadas por FGF2 e a inibição de ATR em um contexto celular com hiperativação de Ras (Figuras 13 e 22). Além disso, mostramos que a depleção de K-Ras por CRISPR anula a dependência de ATR para a sobrevivência, para a toxicidade de FGF2 e para a toxicidade da combinação FGF2 + VE-821 (Figura 14). Os ensaios com CRISPR também reforçaram nossas conclusões de que os altos níveis de Ras em Y1, apesar de dirigir o fenótipo maligno, impõem um custo para a robustez celular, resultante dos estresses já descritos (mitogênico, replicativo, proteotóxico), e possivelmente, outros. A remoção das cópias de K-Ras, apesar de anular em Y1 capacidades de células transformadas, como crescimento independente de ancoragem (Figura 14) e formação de tumor *in vivo* (dados não publicados), proporcionou maior taxa proliferativa em substrato sólido e, como dito, anulou a dependência de ATR para sobrevivência, indicando melhora dos estresses celulares basais e induzidos pelo FGF2 nessa linhagem.

Os mecanismos moleculares específicos de toxicidade do FGF2 e sensibilização a inibidores de resposta a estresses possivelmente variam entre células Y1 e ESFT, além da linhagem humana UM-UC-3, derivada de um carcinoma

de bexiga com mutação ativadora em K-Ras, sobre a qual também identificamos toxicidade do FGF2 (dados não publicados). No entanto, a hiperativação sustentada do eixo Ras-MAPKs-ERK1 / 2 pelo FGF2 parece ser a intersecção das vulnerabilidades que descrevemos aqui. A depleção de K-Ras em células Y1-4K aliviou a superativação MAPK-ERK1 / 2 induzida por FGF2. Como já mencionado, essas células mostraram taxas de proliferação aumentadas em substrato sólido e insensibilidade à toxicidade do FGF2 ou à combinação de FGF2 e VE-821, mas a depleção de K-Ras também suprimiu traços malignos dessas células (Figura 14). Esses dados indicam que o equilíbrio da ativação do eixo K-Ras-MAPK, que rege a proliferação e malignidade nessas células, também é o alvo molecular da toxicidade do FGF2. Nas células ESFT, a proteína de fusão EWS / FLI-1 suprime a expressão de Sprouty 1, um regulador de feedback negativo de SOS que, à jusante dos FGFRs, inibe ativação de Ras-MAPKs. Este defeito na autorregulação do eixo FGF2/FGFR é a proposta causal da hiperativação mitogênica de FGF2 nestas células (Cidre-Aranaz *et al.*, 2017). De fato, a ativação constitutiva de MAPK foi encontrada em várias células ESFT e a expressão de um dominante negativo de Ras ou a inibição farmacológica de MAPK restringem a atividade de transformação de EWS / FLI-1 em fibroblastos imortalizados (Silvany *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, a hiperativação da via de MAPK, especificamente de p38, também foi descrita como causa para a morte celular induzida por FGF2 exógeno nestes modelos (Williamson *et al.*, 2004). Curiosamente, o próprio FGF2 induz a expressão de EWS / FLI-1 em células ESFT (Girnita *et al.*, 2000). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que o FGF2 exógeno induz uma hiperativação sustentada de MAPK-ERK1 / 2, causando devastadora toxicidade nas células ESFT. Este cenário é suportado por nossos dados mostrando, primeiro, que FGF2 induziu níveis elevados

e sustentados de ERK1 / 2 ativo e, segundo, que a inibição de MAPK, mesmo 8 horas após a adição de FGF2, resgatou as células ESFT da toxicidade sinérgica da combinação de estimulação por FGF2 e inibição de ATR (Figura 22).

Os resultados apresentados nesta tese estão alinhados com o consenso existente na literatura de que o estresse replicativo e a ativação crônica da resposta ao dano do DNA (DDR) compõem mecanismos acoplados decorrentes de um fenótipo agressivo (Dereli-Öz, Versini, and Halazonetis 2011; Gorgoulis *et al.* 2005; Jones *et al.* 2013). Foi demonstrado, especificamente para células transformadas por Ras, que o nível basal de estresse replicativo as torna dependentes de vias de *checkpoint* e de reparo de dano no DNA (Gilad *et al.*, 2010; Dietlein *et al.*, 2015).

O estresse replicativo, envolvendo ativação da DDR, é provavelmente o estresse resultante da transformação maligna melhor caracterizado e explorado na pesquisa e na clínica. Agentes genotóxicos, como radiação ionizante (IR), cisplatina e gemcitabina, são amplamente utilizados na terapia contra diversos tipos de tumores, como ferramentas para aumentar o estresse replicativo e os níveis de dano no DNA das células tumorais acima de um limiar letal (Swift and Golsteyn, 2014). Em uma abordagem complementar, demonstrou-se mais recentemente que a inibição do *checkpoint* de ATR sensibilizou um painel de células de tumores pancreáticos – 80% dos quais apresentam mutação ativadora em K-Ras (Bos, 1989) - para gemcitabina e radiação ionizante, induzindo morte celular (Prevo *et al.*, 2012). Essa estratégia terapêutica está em fase avançada de pesquisa, com inibidores de ATR e Chk1 sendo amplamente testados em ensaios clínicos, em combinação ou não com agentes genotóxicos (Qiu, Oleinick and Zhang, 2017; Rundle *et al.*, 2017).

O conjunto dessas observações aponta que a exacerbação do estresse replicativo, especialmente em combinação com a inibição da respectiva via de sensibilização e resposta protetora, pode atingir vulnerabilidades específicas de células transformadas. Neste sentido, nossos resultados sugerem que a administração exógena de FGF2 pode ser uma alternativa viável para sobrecarregar as vias de resposta a estresse replicativo em células transformadas por Ras. A essência desta abordagem é que a hiperestimulação proliferativa impõe à célula uma condição de estresse generalizada; por isso, várias vias de resposta a estresses celulares frequentemente são mobilizadas em células malignas para lidar com as altas taxas proliferativas características do fenótipo transformado, obrigando a célula a viver em um equilíbrio arriscado entre vias de sinalização moleculares antagônicas: de um lado, a hiper estimulação mitogênica, e de outro, a ativação de vias de resposta a estresses que bloqueiam a progressão do ciclo celular. A perturbação deste equilíbrio, através de estimulação mitogênica adicional e/ou de inibição de vias de resposta a estresses, pode empurrar as células tumorais para além de um limiar letal irreversível, enquanto poupa as células normais. Este é o mesmo racional por trás do exemplo de sucesso da inibição de PARP para bloquear o reparo das quebras de ssDNA, que podem então ser transformadas em quebras de dupla fita durante a fase S. Embora esta inibição tenha efeitos mínimos em células normais, em células tumorais que perderam BRCA1 / 2 e, conseqüentemente, a capacidade de reparar quebras de dupla fita, essas lesões tornam-se letais (Jackson and Bartek, 2010).

No início da tumorigênese, foi observado que a ativação de estresse replicativo, como consequência da atividade oncogênica, provoca o aumento do disparo de origens de replicação de DNA, perturbando o controle da progressão pela

fase S (Hills & Diffley, 2014). Nesse cenário, a ativação da DDR e de proteínas de *checkpoint* é uma barreira anticancerígena que deve ser superada no processo de transformação maligna (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005). As células Y1, como outras células transformadas, apresentaram níveis tônicos de ativação da DDR que são compatíveis com altas taxas de proliferação. A estimulação com FGF2, no entanto, induziu a hiper ativação do *checkpoint* dependente de ATR, reativando esta barreira anticancerígena "antiga", e restringindo a proliferação celular nos modelos celulares dirigidos por K-Ras empregados nesta tese. Além disso, um trabalho complementar de nosso grupo mostrou que o FGF2 também desencadeia estresse proteotóxico em células Y1, e que sua administração em conjunto com a inibição do proteassoma é letal para células Y1 e ESFT (bioRxiv, Preprint, Dec 3, 2017; doi: <http://dx.doi.org/10.1101/227496>). O FGF2, portanto, pode perturbar o equilíbrio homeostático de células tumorais de diferentes origens e fenótipos, aumentando a toxicidade dos inibidores de *checkpoint* e de proteassoma.

Muitos mecanismos diferentes pelos quais as vias de sinalização dos fatores de crescimento contribuem para a progressão maligna foram retratados na literatura sobre câncer e as mutações de ganho de função ao longo dessas mesmas vias são as lesões oncogênicas que dirigem a maioria dos cânceres humanos. No entanto, nossos dados somam-se às evidências já citadas e a outras que estão se acumulando na literatura e que mostram que mais sinalização mitogênica não é necessariamente melhor para o sucesso proliferativo da célula transformada. Por exemplo, os genes EGFR e KRAS são frequentemente mutados em adenocarcinomas pulmonares, mas sem sobreposição em tumores individuais. Unni e colaboradores mostraram recentemente que letalidade sintética, em vez de redundância, explica essa exclusividade mútua (Unni *et al.*, 2015). Além disso, as

mutações oncogênicas NRAS e BRAF mostram exclusividade mútua semelhante em melanoma metastático, e a coexpressão forçada dessas mutações desencadeia senescência celular (Petti *et al.*, 2006). Um subconjunto destes melanomas dirigidos por BRAF V600E torna-se resistente ao inibidor de BRAF vemurafenib através da superexpressão de BRAF V600E. Neste contexto, a retirada do inibidor resultou em regressão tumoral causada por uma via de MAPK agora ativada em níveis elevados e letais (Thakur *et al.*, 2013). Essas observações sugerem que não só a inibição, mas também a hiperativação de vias canonicamente mitogênicas pode prejudicar a aptidão de células tumorais. Nossos resultados contribuem para a compreensão de como a sinalização mitogênica pode ser manipulada para exacerbar os estresses inerentes do fenótipo maligno, prejudicando a homeostase das células transformadas e sensibilizando-as à inibição das respectivas vias de resposta a estresses.

Apesar da contribuição do FGF2 para a progressão maligna em certos contextos estar indiscutivelmente bem evidenciada na literatura (Revisado por Grose & Dickson, 2005), um número crescente de evidências demonstram que o FGF2 também pode ter um efeito antagônico ou inócuo em outros contextos. Por exemplo, camundongos transgênicos superexpressando FGF2 em todos os principais órgãos desenvolveram-se normalmente até idade avançada, não apresentando aumento da tumorigênese (Coffin *et al.*, 1995). Além disso, a administração exógena de FGF2 induziu efeitos citostáticos ou citotóxicos em tumores de mama (Wang *et al.*, 1998), tumores da família de sarcomas de Ewing (Williamson *et al.*, 2004), em modelos celulares de meduloblastomas (Fogarty *et al.*, 2007), entre outros. Mesmo *in vivo*, injeções subcutâneas regulares de FGF2 também diminuíram ou impediram o

crescimento de tumores em camundongos injetados com células tumorais, sem toxicidade visível (Sturla *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2008).

Uma de nossas conclusões é que a hiperativação da via de MAPK é parte fundamental do mecanismo molecular causador da citotoxicidade do FGF2. Seria de se esperar, portanto, que outros fatores de crescimento tivessem efeito semelhante, desde que também possam hiperativar esta via de modo sustentado. De fato, isso foi demonstrado para EGF, quando a ativação de EGFR em células de adenocarcinomas de pulmão com mutação em K-Ras desencadeou uma resposta letal dependente da ativação sustentada de ERK (Unni *et al.*, 2015).

Paralelamente ao desenvolvimento dos experimentos que embasaram as conclusões até aqui apresentadas, o grupo de modelagem computacional do ciclo celular de nosso laboratório desenvolveu um modelo dinâmico do ciclo de KRas-GTPase de células Y1, contendo apenas SOS como GEF ativador da troca de GDP por GTP. Mas, simulações computacionais com este modelo não foram capazes de gerar resultados semelhantes aos experimentais. Estes resultados negativos obrigaram o grupo a uma revisão do modelo, gerando uma nova versão com dois GEFs, SOS que é reconhecidamente ativada por FGF2/FGFR e um segundo GEF independente de FGF2. Simulações com esta nova versão do modelo com dois GEFs reproduziram muito bem resultados experimentais obtidos regularmente com células Y1, sugerindo a previsão de que essas células expressam no mínimo dois GEFs, sendo um deles SOS1/2. O teste experimental desta hipótese mostrou que Y1 expressa o Ras-GEF GRP4 em um nível 10 vezes superior à expressão de SOS1/2 (Figura 18), comprovando a previsão computacional (M. Reis, M.H. Dias, C. Fonseca e H. Armelin, resultados não publicados). Diante desta previsão

computacional experimentalmente validada, nos perguntamos como seria a expressão de GRP4 nas sub-linhagens resistentes ao FGF2, com a expectativa de não encontrar grandes diferenças em relação à linhagem parental Y1, tendo em vista que as sublinhagens Y1-FRs tinham eliminado cerca de 50% das cópias amplificadas de K-ras e as cópias que permaneceram estavam transcricionalmente inativas. No entanto, surpreendentemente, todas as sublinhagens testadas eliminaram a expressão de GRP4, inclusive a Y1FR-I, que excepcionalmente manteve alta expressão de KRas, implicando GRP4 na manutenção do fenótipo susceptível à citotoxicidade de FGF2 em células Y1 (Figura 18). Mas, ainda não está rigorosamente provado que a expressão de GRP4 e a amplificação de K-ras são obrigatórias para a emergência do fenótipo resistente à citotoxicidade de FGF2 em células Y1. É interessante, contudo, notar que de acordo com a literatura atual, as GRPs formam a única família de RasGEFs ativáveis por diacilglicerol, cuja estrutura é mimetizada por PMA (Phorbol-12-miristato-13-acetato). A ativação de GRPs por diacilglicerol ou PMA promove a ativação do eixo RAS-MAPK (Ebinu *et al.*, 2000), e PMA também foi descrito como um agente antiproliferativo em células murinas e humanas transformadas por Ras (J.D. Zeidler, Tese de doutorado, 2012; J.G. Silva, Tese de doutorado, 2014). A participação da atividade de GRP4 parece, portanto, ser uma intersecção entre os mecanismos moleculares dos efeitos antiproliferativos do FGF2 e do PMA em células transformadas por Ras.

6.2. O fenótipo resistente ao efeito citotóxico FGF2, selecionado à partir de células Y1

A compreensão dos mecanismos que conferem resistência às células tumorais contra drogas ou qualquer agente inibitório é de interesse geral na pesquisa em câncer, e um dos principais desafios para as estratégias terapêuticas atualmente aplicáveis na clínica e em fase de desenvolvimento. Em nosso laboratório, como estratégia para desvendar o mecanismo molecular do efeito citotóxico que o FGF2 exerce sobre alguns tipos de células transformadas por Ras, isolamos, à partir de Y1, clones resistentes a este efeito que sobreviveram à seleção com tratamento sustentado de FGF2. Estes clones foram expandidos em cultura, dando origem às sublinhagens Y1FRs. Esse trabalho confirmou que o efeito tóxico do FGF2 é seletivo para células com alta atividade de Ras, conforme descrevemos inicialmente (Costa *et al.*, 2008), uma vez que todas as sublinhagens resistentes, com apenas uma exceção, eliminaram a alta expressão desta oncoproteína (T.G.F. Matos, Tese de doutorado, 2007). Nesta tese, mostramos que a redução extrema da expressão de Ras total nessas sublinhagens é consequência da completa eliminação de M1, um dos cromossomos que portam as cópias amplificadas de K-ras na linhagem parental Y1. Curiosamente, o segundo cromossomo que porta cópias de K-ras, M2, foi estritamente mantido em todas as sublinhagens resistentes analisadas (Tabela 3; Figura 17), embora ensaios de RT-qPCR tenham indicado que suas cópias de K-ras estão transcricionalmente silenciosas (Figura 17). Identificamos que a manutenção estrita de M2 nas sublinhagens resistentes deve-se, provavelmente, à exclusividade deste cromossomo como fonte de genes ribossomais transcricionalmente ativos na linhagem parental (Figura 17). Não sabemos, contudo, se o silenciamento das RONS canônicas de *Mus musculus* teve algum papel no processo de transformação maligna que deu origem às células Y1.

A dependência de FGF2 exibida pelas células Y1FR para sobreviver e proliferar (Figuras 15 e 21) pode ser consequência do baixíssimo nível de expressão de K-Ras (Figura 15), que demandaria a estimulação de FGF2 para ativar o eixo mitogênico K-Ras/MAPK a níveis suficientes para garantir sobrevivência e proliferação das Y1FRs. Curiosamente, as sublinhagens Y1FR, apesar de dependerem do FGF2 para proliferarem, exibem níveis tônicos de dano no DNA e ativação da DDR (Figura 20). Estes níveis crônicos de dano no DNA podem decorrer da agravada aneuploidia observada nestas sublinhagens Y1FR (Tabela 4; Figura 19).

Aneuploidia e rearranjos cromossômicos são características proeminentes de células transformadas. Frequentemente, elas também apresentam instabilidade cromossômica e número variável de cromossomos de célula para célula. As linhagens Y1 e Y1FRs são exceções a este padrão, com número de cromossomos subdiploide e muito estável entre a população celular. A única exceção a este padrão é a sublinhagem Y1FR-I, que manteve a alta expressão de Ras total. O cariótipo desta sublinhagem é composto por um número médio muito elevado e variável (grande desvio padrão entre células), em relação à linhagem parental (Tabela 4; Figura 19). Não está claro se a manutenção da alta expressão de Ras total nesta sublinhagem está relacionada com sua variedade e instabilidade cariotípica.

O número ainda mais reduzido de cromossomos que compõem os cariótipos das demais sublinhagens Y1FR pode resultar de defeitos mitóticos decorrentes do estresse replicativo provocado pelo FGF2 nas células Y1 durante o processo de seleção dos clones resistentes. Burrell e colaboradores demonstraram, usando

linhagens celulares derivadas de tumores colorretais, que alterações cromossômicas estruturais e numéricas são causadas principalmente por mecanismos pré-mitóticos, especificamente estresse replicativo e dano no DNA não resolvidos (Burrell *et al.*, 2013). Além disso, outro trabalho demonstrou, para um painel de linhagens celulares tumorais pancreáticas, que a inibição de ChK1 sensibiliza as células a agentes causadores de dano no DNA, provocando sua morte por catástrofe mitótica. Nessa situação, as células iniciam a mitose com centrômeros fragmentados, contribuindo para a eliminação dos cromossomos afetados (Beeharry *et al.*, 2013). Aqui, demonstramos que o FGF2 aumenta os níveis de dano no DNA das células Y1, provocando níveis moderados de morte na população, e que possivelmente vão se acumulando nas células sobreviventes. Os níveis excessivos de dano no DNA, acima da suficiência da sinalização de ATR-ChK1, poderiam ter efeito similar à inibição desta via nos testes de Beeharry e colaboradores (2013), de modo a contribuir com a eliminação de cromossomos ocorrida nas sublinhagens Y1FR, devido a fragmentações centroméricas.

Finalmente, além da eliminação de alguns cromossomos nas sublinhagens resistentes, outra evidência de instabilidade genômica provocada pelo FGF2 vem da maior frequência de cromossomos fusionados pela extremidade centromérica nas preparações metafásicas das sublinhagens selecionadas do que nas preparações das células parentais Y1. Várias proteínas envolvidas na DDR, incluindo ATR, são essenciais para a manutenção de sítios frágeis no genoma. Em condições de estresse replicativo, quebras de dupla fita ocorrem nessas regiões, sendo reparadas por junção de pontas não-homólogas (Gelot, Magdalou and Lopez, 2015), podendo originar as fusões entre cromossomos de pares não homólogos observadas nas sublinhagens resistentes ao FGF2.

7. CONCLUSÕES

7.1. Conclusão geral

As células eucarióticas possuem sub-sistemas de sinalizações moleculares que controlam sua resposta aos variados estímulos microambientais. Os módulos de retro-alimentação negativa compostos por Sprouty-GRB2 e DUSPs-ERK-SOS, que regulam os níveis de ativação do eixo Ras-MAPK, são exemplos destes sub-sistemas que, nestes casos, controlam os níveis de ativação da resposta mitogênica mesmo diante de níveis altos de fatores peptídicos de crescimento. O processo de transformação maligna passa pelo desarranjo destes sistemas, de modo que células com lesão na regulação de Ras passam a ativar vias intracelulares mitogênicas em níveis mais elevados e sustentados, não encontrados em células normais. Essa tolerância à hiper ativação mitogênica torna as células tumorais vulneráveis aos diversos estresses celulares que decorrem da estimulação mitogênica exagerada, que no caso das Y1 e das EFSTs é agravado pelo FGF2. Emerge-se, então, a letalidade sintética descrita nesta tese, que difere daquela originalmente descrita por Dobzhanky em *Drosophila* (Dobzhansky, 1946), pela qual dois genes mutantes são inócuos quando expressos separadamente, mas são letais quando expressos conjuntamente. Aqui, a interação letal não é entre genes, mas entre vias moleculares regulatórias, ou seja, hiper-estimulação mitogênica de K-Ras/MAPK e inibição de vias controladoras de estresses. Nesta tese, a identificação e descrição deste fenômeno de letalidade sintética entre vias regulatórias sugere uma alternativa terapêutica para o câncer que é “paradigma shifting”, conforme proposto por M. Dias

7.2. Conclusões específicas

- O efeito inibitório do FGF2 sobre o ciclo celular de células Y1 não ocorre de forma pontual e direcionada para a perturbação da transição G2 → M, como inicialmente acreditávamos; ao contrário, ele é disparado por uma hiper ativação mitogênica no início da fase G1 que perturba a progressão celular através de G1 e S e bloqueia irreversivelmente a transição G2 → M.
- O estresse mitogênico resultante da hiperativação sustentada da via de MAPK se propaga para a fase S do ciclo celular na forma de estresse replicativo, induzindo empacamento e / ou colapso de forquilhas de replicação e dano no DNA. As células Y1, como outras células transformadas por Ras, apresentam níveis basais de estresse replicativo, dano no DNA e dependência da atividade de ATR. Todas essas condições são agravadas pela estimulação mitogênica adicional do FGF2.
- O tratamento isolado com FGF2 ou com o inibidor de ATR é pouco efetivo em induzir morte na população de células Y1, no entanto, a combinação de ambos os tratamentos é altamente letal.
- O fenótipo de sublinhagens clonais resistentes ao FGF2, derivadas de células Y1, emergiu através da eliminação de um dos cromossomos marcadores desta linhagem, que portam as cópias amplificadas de ras. O segundo cromossomo marcador foi mantido, apesar da pressão

seletiva do FGF2, por ser a única fonte de genes ribossomais ativos nas linhagens parental e resistentes. Suas cópias de ras, no entanto, estão transcricionalmente silenciadas. Além disso, a sublinhagem Y1FR-I, que manteve a alta expressão de Ras total, apresenta reduzidos níveis basais de Ras ativa.

- O principal RasGEF das células Y1, responsável pelos altos níveis constitutivos de Ras-GTP nesta linhagem parental não é SOS 1 / 2, mas sim GRP4. Todas as sublinhagens resistentes ao FGF2, inclusive a Y1FR-I, eliminaram completamente a expressão deste RasGEF. O padrão de expressão de isoformas de receptores de FGF, por outro lado, não deve ter desempenhado papel nenhum na emergência do fenótipo resistente, pois todas as sublinhagens resistentes expressam a mesma ordem ranqueada de isoformas de FGFRs encontrada nas células parentais Y1.

- As sublinhagens Y1FRs dependem de FGF2 para sobreviver e proliferar, mas não mostram hiper ativação mitogênica; apesar disso, mantêm altos níveis de dano no DNA e dependência da atividade de ATR. As sublinhagens Y1FRs sofreram perda de cromossomos e fusão entre cromossomos não homólogos ao longo do processo seletivo com FGF2, o que acreditamos resultar do estresse replicativo contínuo imposto às células parentais Y1 durante a seleção com o FGF2.

- As bases dos mecanismos moleculares descritos para sensibilidade das células Y1 ao FGF2 (hiperativação da via de MAPK e dependência de ATR) são as mesmas encontradas nas células humanas ESFT, derivadas de tumores da família de sarcomas de Ewing.

8. REFERÊNCIAS

- Alberts, B. *et al.* (2002) 'Biologia Molecular da Célula', 4.ed. – Porto Alegre, editora Artmed, 1584 p. – ISBN 978-85-363-0272-0.
- Abraham, J. A. *et al.* (1986) 'Nucleotide Sequence of a Bovine Clone Encoding the Angiogenic Protein, Basic Fibroblast Growth Factor', *Science*, 233, pp. 545–548.
- 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(9), pp. 2702–2706.
- Arnaud, E. *et al.* (1999) 'A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor.', *Molecular and cellular biology*, 19(1), pp. 505–14.
- Bartkova, J. *et al.* (2005) 'DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis', *Nature*, 434(7035), pp. 864–870.
- Beeharry, N. *et al.* (2013) 'Centromere fragmentation is a common mitotic defect of S and G2 checkpoint override.', *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(10), pp. 1588–97.
- Belov, A. a and Mohammadi, M. (2013) 'Molecular Mechanisms of Fibroblast Growth Factor Signaling in Physiology and Pathology', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(a015958), pp. 1-24.
- Bertherat, J. (1998) 'The nuclear receptor SF-1 (steroidogenic factor-1) is no longer an orphan', *European Journal of Endocrinology*, 138, pp. 32–33.
- Biswas, B. and Bakhshi, S. (2016) 'Management of Ewing sarcoma family of tumors: Current scenario and unmet need', *World Journal of Orthopedics*, 7(9), pp. 527-538.
- Bos, J. L. (1989) 'ras Oncogenes in Human Cancer : A Review', *Cancer Research*, 49, pp. 4682–4689.
- Bulavin, D. V., Amundson, S. a. and Fornace, A. J. (2002) 'p38 and Chk1 kinases: Different conductors for the G2/M checkpoint symphony', *Current Opinion in Genetics*

and Development, 12(1), pp. 92–97.

Burrell, R. a *et al.* (2013) 'Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability.', *Nature*, 494(7438), pp. 492–496.

Carpenter, G. and Cohen, S. (1979) 'Epidermal Growth Factor', *Annual Review Biochem*, 48, pp. 193–216.

Cidre-Aranaz, F. *et al.* (2017) 'EWS-FLI1-mediated suppression of the RAS-antagonist Sprouty 1 (SPRY1) confers aggressiveness to Ewing sarcoma', *Oncogene*, 36(6), pp. 766–776.

Cohen, S. (1962) 'Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal', *The Journal of biological chemistry*, 237(6), pp. 1555–1562.

Costa, E. T. Ações antagônicas de FGF2 em células tumorais de camundongo: disparo de mitogênese e de morte celular. 2005. 133p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Costa, E. T. *et al.* (2008) 'Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence.', *Cancer research*, 68(15), pp. 6215–6223.

Dereli-Öz, A., Versini, G. and Halazonetis, T. D. (2011) 'Studies of genomic copy number changes in human cancers reveal signatures of DNA replication stress', *Molecular Oncology*, 5(4), pp. 308–314.

Dev, V. G. *et al.* (1977) 'Nucleolus organizers in *Mus musculus* subspecies and in the RAG mouse cell line', *Genetics*, 86(2), pp. 389–398.

Dhillon, A. S. *et al.* (2007) 'MAP kinase signalling pathways in cancer', *Oncogene*, 26, pp. 3279–3290.

Dias, M.H.S. Mecanismos da toxidez de FGF2 em células malignas dependentes de Ras: bloqueio de divisão celular e estresse proteotóxico. 2012. 164 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Dias, M. H. *et al.* (2017) 'Fibroblast Growth Factor 2 lethally sensitizes cancer cells to stress-targeted therapeutic inhibitors', *bioRxiv* 227496; doi: <https://doi.org/10.1101/227496>.

Dietlein, F. *et al.* (2015) 'A Synergistic Interaction between Chk1- and MK2 Inhibitors in KRAS-Mutant Cancer', *Cell*, 162(1), pp. 146–159.

Do, K., Doroshov, J. H. and Kummar, S. (2013) 'Wee1 kinase as a target for cancer therapy', *Cell Cycle*, 12, pp. 3159–3164.

Dobbelstein, M. and Sørensen, C. S. (2015) 'Exploiting replicative stress to treat cancer', *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(6), pp. 405–423.

Dobzhansky, T. (1946) 'Genetics of Natural Populations. XII. Recombination and Variability in Populations of *Drosophila Pseudoobscura*.', *Genetics*, 31(3), pp. 269–290.

Duchesne, L. *et al.* (2006) 'N-Glycosylation of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 Regulates Ligand and Heparan Sulfate Co-receptor Binding', *Journal of Biological Chemistry*, 281(37), pp. 27178–27189.

Ebinu, J. O. *et al.* (2000) 'RasGRP links T-cell receptor signaling to Ras.', *Blood*, 95(10), pp. 3199–3203.

Eswarakumar, V. P., Lax, I. and Schlessinger, J. (2005) 'Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors.', *Cytokine & growth factor reviews*, 16(2), pp. 139–149.

Feig, L. a and Cooper, G. M. (1988) 'Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP.', *Molecular and cellular biology*, 8(8), pp. 3235–43.

Fernández-Medarde, A. and Santos, E. (2011) 'The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1815(2), pp. 170–188.

Gaspar, N. *et al.* (2015) 'Ewing sarcoma: Current management and future approaches through collaboration', *Journal of Clinical Oncology*, 33(27), pp. 3036–3046.

Gelot, C., Magdalou, I. and Lopez, B. S. (2015) 'Replication Stress in Mammalian Cells and Its Consequences for Mitosis', *Genes*, 6, pp. 267–298.

Gilad, O. *et al.* (2010) 'Combining ATR Suppression with Oncogenic Ras Synergistically Increases Genomic Instability, Causing Synthetic Lethality or Tumorigenesis in a Dosage-Dependent Manner', *Cancer Research*, 70(23), pp. 9693–9703.

Gole, B. *et al.* (2014) 'Endonuclease G initiates DNA rearrangements at the MLL breakpoint cluster upon replication stress.', *Oncogene*, 34(26), pp. 3391-3401.

Goodpasture, C. and Bloom, S. E. (1975) 'Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining.', *Chromosoma*, 53(1), pp. 37–50.

Gorgoulis, V. G. *et al.* (2005) 'Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions', *Nature*, 434, pp. 907–913.

Grose, R. and Dickson, C. (2005) 'Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), pp. 179–186.

Grünewald, T. G. P. *et al.* (2015) 'Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite', *Nature Genetics*, 47(9), pp. 1073–1078.

No authors listed. (1972) 'Standard Karyotype of the Mouse, *Mus musculus* COMMITTEE ON STANDARDIZED GENETIC NOMENCLATURE FOR MICE', *The Journal of Heredity*, 63(2), pp.69-72.

Henderson, A. S. *et al.* (1976) 'Variation in ribosomal RNA gene number in mouse chromosomes.', *Cytogenet. Cell Genet.*, 17, pp. 307-316.

Henderson, A. S., Eicher, E. M. and Harbor, B. (1974) 'The Chromosomal Location of Ribosomal DNA in the Mouse', *Chromosoma*, 49, pp. 155–160.

Hickson, I. *et al.* (2004) 'Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM', *Cancer Research*, 64(24), pp. 9152–9159.

- Higgins, S. *et al.* (2009) 'Fibroblast growth factor 2 reactivates G1 checkpoint in SK-N-MC cells via regulation of p21, inhibitor of differentiation genes (Id1-3), and epithelium-mesenchyme transition-like events.', *Endocrinology*, 150(9), pp. 4044–55.
- Hills, S. A. and Diffley, J. F. X. (2014) 'DNA replication and oncogene-induced replicative stress', *Current Biology*, 24(10), pp. 435–444.
- Holzmann, K. *et al.* (2012) 'Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor IgIII Loops in Cancer.', *Journal of nucleic acids*, v.2012, Article ID 950508.
- Ingraham, H. A. *et al.* (1994) 'The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis', *Genes & development*, 8, pp. 2302–2312.
- Iyer, D. R. and Rhind, N. (2017) 'The intra-S checkpoint responses to DNA damage', *Genes*, 8(74), pp. 1-25
- Jackson, S. P. and Bartek, J. (2010) 'The DNA-damage response in human biology and disease', *Nature*, 461(7267), pp. 1071–1078.
- Jaye, M. *et al.* (1986) 'Human endothelial cell growth factor: cloning, nucleotide sequence, and chromosome localization.', *Science*, 233(August), pp. 541–545.
- Jones, R. M. *et al.* (2013) 'Increased replication initiation and conflicts with transcription underlie Cyclin E-induced replication stress', *Oncogene*, 32, pp. 3744–3753.
- Karnoub, A. E. and Weinberg, R. a (2008) 'Ras oncogenes: split personalities.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, pp. 517–531.
- Kawakami, E. *et al.* (2016) 'Network analyses based on comprehensive molecular interaction maps reveal robust control structures in yeast stress response pathways', *Systems Biology and Applications*, 2, Article ID 15018.
- Koundrioukoff, S. *et al.* (2013) 'Stepwise Activation of the ATR Signaling Pathway upon Increasing Replication Stress Impacts Fragile Site Integrity', *PLoS Genetics*, 9(7), Article ID e1003643.
- Krenning, L. *et al.* (2014) 'Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence', *Molecular Cell*, 55, pp. 59–72.

- Kwabi-Addo, B., Ozen, M. and Ittmann, M. (2004) 'The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer', *Endocrine-Related Cancer*, 11(4), pp. 709–724.
- Lee, J., Kumagai, a and Dunphy, W. G. (2001) 'Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins.', *Molecular biology of the cell*, 12(3), pp. 551–563.
- Lieber, M. R. (2011) 'The mechanisms of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway', (3), pp. 181–211.
- Liu, X. *et al.* (2014) 'Clinical significance of fibroblast growth factor receptor-3 mutations in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis.', *Genetics and molecular research*, 13(1), pp. 1109–1120.
- Maehara, O. *et al.* (2017) 'Fibroblast growth factor-2–mediated FGFR/Erk signaling supports maintenance of cancer stem-like cells in esophageal squamous cell carcinoma', *Carcinogenesis*, 38(11), pp. 1073–1083.
- Marechal, A. and Zou, L. (2013) 'DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, Article ID a012716.
- Mateos-Gomez, P. A. *et al.* (2015) 'Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination', *Nature*, 518(7538), pp. 254–257.
- Matos, TGF. Mecanismos anti-proliferativos disparados por FGF2 e éster de forbol em células de camundongos transformadas por Ras. 2007. 155p. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- McLeskey, S. W. *et al.* (1994) 'MDA-MB-134 breast carcinoma cells overexpress fibroblast growth factor (FGF) receptors and are growth-inhibited by FGF ligands', *Cancer Research*, 54(2), pp. 523–530.
- Mcmahon, T., Zijl, P. C. M. Van and Gilad, A. A. (2009) 'The FGF family: biology, pathophysiology and therapy', 27(3), pp. 320–331.
- Micco, R. Di *et al.* (2006) 'Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication', 444, pp. 638-642.

- Mohammadi, M., Olsen, S. K. and Ibrahimi, O. A. (2005) 'Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation', *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(2), pp. 107–137.
- Müllers, E. *et al.* (2014) 'Nuclear translocation of Cyclin B1 marks the restriction point for terminal cell cycle exit in G2 phase', *Cell Cycle*, 13(17), pp. 2733–2743.
- Nam, E. a. and Cortez, D. (2011) 'ATR signaling: more than meeting at the fork Edward', *Biochem J*, 436(3), pp. 527–536.
- Nghiem, P. *et al.* (2002) 'ATR is not required for p53 activation but synergizes with p53 in the replication checkpoint', *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), pp. 4428–4434.
- Niculescu, a B. *et al.* (1998) 'Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication.', *Molecular and cellular biology*, 18(1), pp. 629–643.
- Ohta, H. and Itoh, N. (2014) 'Roles of FGFs as adipokines in adipose tissue development, remodeling, and metabolism', *Frontiers in Endocrinology*, 5, pp. 24–27.
- Ornitz, D. M. and Itoh, N. (2015) 'The fibroblast growth factor signaling pathway', *WIREs Developmental Biology*, 4, pp. 215–266.
- Pardee, A. B. (1974) 'A restriction point for control of normal animal cell proliferation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), pp. 1286–90.
- Passiatore, G. *et al.* (2011) 'Induction of Id-1 by FGF2 physiology involves activity of EGR-1 and sensitizes neuroblastoma cells to cell death', *J Cell Physiol.*, 226(7), pp. 1763–1770.
- Pfaffl, M. W. (2001) 'A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR', *Nucleic Acids Research*, 29(9), pp. 2002–2007.
- Podhorecka, M., Skladanowski, A. and Bozko, P. (2011) 'H2AX Phosphorylation : Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy', *Journal of Nucleic Acids*, Article ID 920161.

- Prevo, R. *et al.* (2012) 'The novel ATR inhibitor VE-821 increases sensitivity of pancreatic cancer cells to radiation and chemotherapy', *Cancer Biology and Therapy*, 13(11), pp. 1072–1081.
- Qiu, Z., Oleinick, N. L. and Zhang, J. (2018) 'ATR/CHK1 inhibitors and cancer therapy', *Radiotherapy and Oncology*, 126(3), pp. 450-464.
- Rainey, W. E., Saner, K. and Schimmer, B. P. (2004) 'Adrenocortical cell lines.', *Molecular and cellular endocrinology*, 228, pp. 23–38.
- Ranieri, D. *et al.* (2017) 'Expression of the FGFR2c mesenchymal splicing variant in human keratinocytes inhibits differentiation and promotes invasion.', *Molecular carcinogenesis*, (July), pp. 1–12.
- Reaper, P. M. *et al.* (2011) 'Selective killing of ATM- or p53-deficient cancer cells through inhibition of ATR', *Nature Chemical Biology*, 7(7), pp. 428–430.
- Reinhardt, H. C. and Yaffe, M. B. (2009) 'Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2', *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), pp. 245–255.
- Rogakou, E. P. *et al.* (1998) 'Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX phosphorylation on Serine 139', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(10), pp. 5858–5868.
- Rothblum-Oviatt, C. J., Ryan, C. E. and Piwnicka-Worms, H. (2001) '14-3-3 binding regulates catalytic activity of human Wee1 kinase.', *Cell growth & differentiation*, 12, pp. 581–589.
- Rundle, S. *et al.* (2017) 'Targeting the ATR-CHK1 axis in cancer therapy', *Cancers*, 9(41), pp. 1–25.
- Salotti, J. *et al.* (2013) 'Fibroblast growth factor 2 causes G2/M cell cycle arrest in ras-driven tumor cells through a Src-dependent pathway.', *PloS one*, 8(8), Article ID e72582.
- Sarkaria, J. N. *et al.* (1999) 'Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine', *Cancer Research*, 59(17), pp. 4375–4382.

Schweigerer, L., Neufeld, G. and Gospodarowicz, D. (1987) 'Basic Fibroblast growth factor as a Growth Inhibitor for Cultured Human Tumor Cells', *The Journal of Clinical Investigation*, 80(5), pp. 1516–1520.

Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999) 'CDK inhibitors : positive and negative regulators of G 1 -phase progression', *Genes & development*, 13, pp. 1501–1512.

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.

Silvany, R. E. *et al.* (2000) 'Interference with the constitutive activation of ERK1 and ERK2 impairs EWS / FLI-1-dependent transformation', *Oncogene*, 19, pp. 4523-4530.

Smits, V. a J. *et al.* (2000) 'Negative growth regulation of SK-N-MC cells by bFGF defines a growth factor-sensitive point in G2', *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), pp. 19375–19381.

Sturla, L. *et al.* (2000) 'Induction of Cell Death by Basic Fibroblast Growth Factor in Ewing's Sarcoma', 60, pp. 6160–6170.

Sundaram, M. V. (2006) 'RTK/Ras/MAPK signaling', WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook.

Suzuki, H. *et al.* (1990) 'Variation in the distribution of silver-staining nucleolar organizer regions on the chromosomes of the wild mouse, *Mus musculus*.', *Molecular biology and evolution*, 7(3), pp. 271–82.

Swift, L. H. and Golsteyn, R. M. (2014) 'Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), pp. 3403–3431.

Syljuåsen, R. G. *et al.* (2005) 'Inhibition of Human Chk1 Causes Increased Initiation of DNA Replication , Phosphorylation of ATR Targets , and DNA Breakage', *Molecular and cellular biology*, 25(9), pp. 3553–3562.

Tibbetts, R. S. *et al.* (1999) 'A role for ATR in the DNA damage-induced

phosphorylation of p53', *Genes and Development*, 13(2), pp. 152–157.

Tiwari, M. K. *et al.* (2016) 'Triplex structures induce DNA double strand breaks via replication fork collapse in NER deficient cells', 44(16), pp. 7742–7754.

Toledo, L. I. *et al.* (2013) 'ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA', *Cell*,155(5), pp. 1088–1103.

Toomey, EC;, Schiffman, JD; and. Lessnick, S. (2010) 'Recent Advances in the Molecular Pathogenesis of Ewing's Sarcoma', 29(32), pp. 4504–4516.

Ueno, H. *et al.* (1992) 'A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor.', *The Journal of biological chemistry*, 267(3), pp. 1470–1476.

Unni, A. M. *et al.* (2015) 'Evidence that synthetic lethality underlies the mutual exclusivity of oncogenic KRAS and EGFR mutations in lung adenocarcinoma', *eLife*, 4, pp. 1–23.

Wang, Q. *et al.* (1998) 'Basic fibroblast growth factor downregulates Bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells.', *Experimental cell research*, 238(1), pp. 177–187.

Wang, Y. *et al.* (2017) 'FGF2 promotes metastasis of uveal melanoma cells via store-operated calcium entry', *OncoTargets and Therapy*, 10, pp. 5317–5328.

Westwood, G. *et al.* (2002) 'Basic fibroblast growth factor (bFGF) -induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway', *Oncogene*, 21, pp. 809-824.

Williamson, A. J. K. *et al.* (2004) 'Basic fibroblast growth factor-induced cell death is effected through sustained activation of p38MAPK and up-regulation of the death receptor p75NTR', *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), pp. 47912–47928.

Xu, B. *et al.* (2011) 'Replication Stress Induces Micronuclei Comprising of Aggregated DNA Double-Strand Breaks', 6(4), Article ID e18618.

Yajima, H. *et al.* (2010) 'DNA double strand break formation upon UV-induced replication stress activates ATM and DNA-PKcs kinases', 385(3), pp. 800–810.

Yasumura, Y., Buonassisi, V. and Sato, G. (1966) 'Clonal Analysis of Differentiated Function in Animal Cell Cultures: I . Possible Correlated Maintenance of Differentiated Function and the Diploid Karyotype, 26, pp. 529–535.

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

Zeman, M. K. and Cimprich, K. A. (2015) 'Causes and Consequences of Replication Stress', *Nat Cell Biol.*, 16(1), pp. 2–9.

Zhang, X. *et al.* (2006) 'Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family', *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), pp. 15694–15700.

APÊNDICES

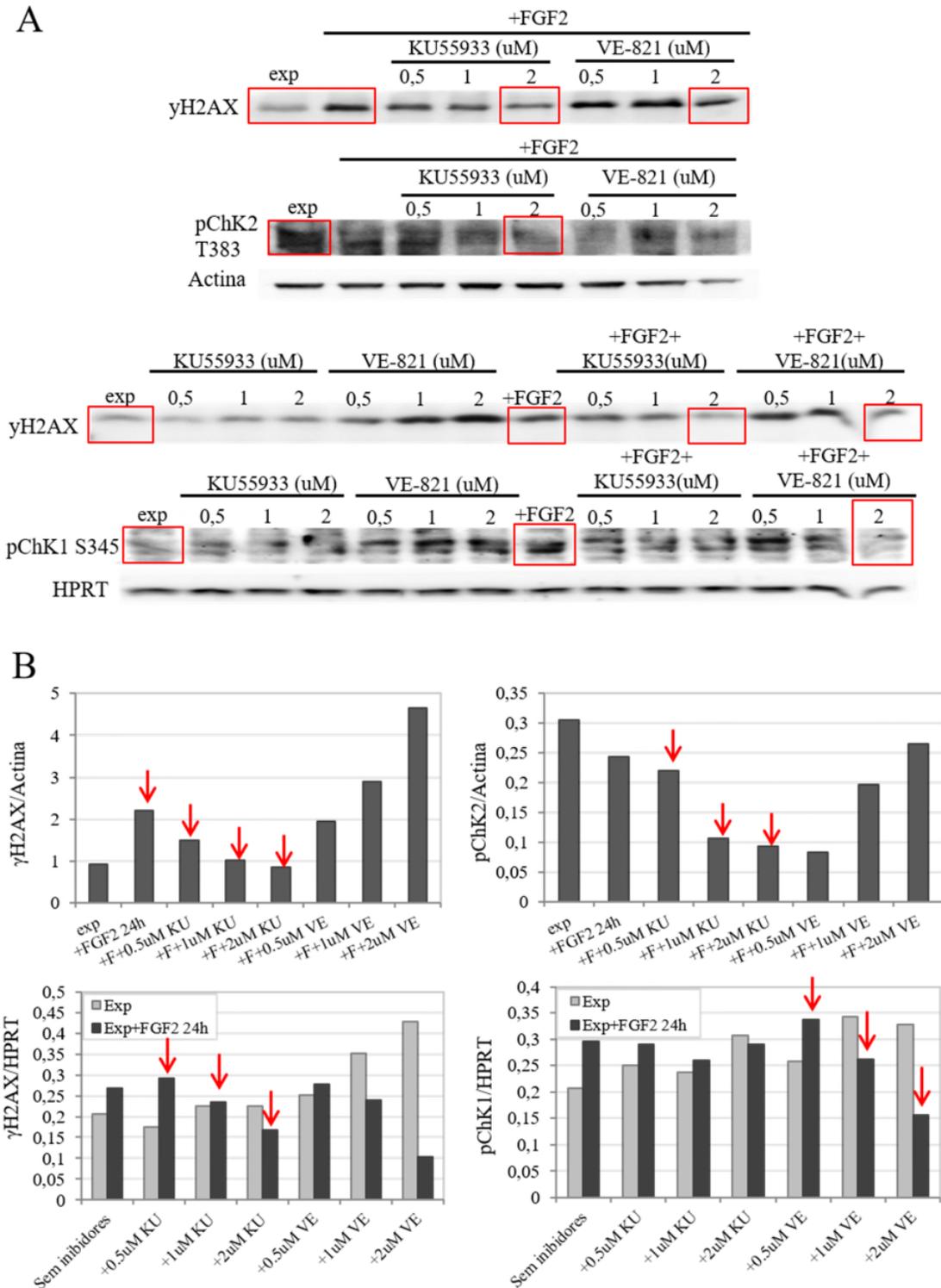


Figura 23: Teste da concentração dos inibidores ATM e ATR. **A:** *Western blotting* para substratos de ATM (γ H2AX e pChK2) e ATR (pChK1) em células Y1 tratadas ou não com FGF2 \pm KU55933 (ATM) ou VE-821 (ATR). **B:** Quantificações dos dados apresentados em A.

YA

38 cromossomos

24-01-2011

Cecilia FONSECA



1



2



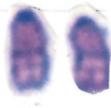
3



4



5



6



7



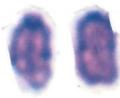
8



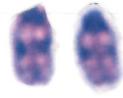
9



10



11



12



13



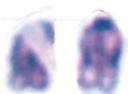
14



15



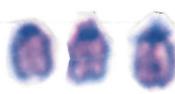
16



17



18



19



m1



x



y



m1

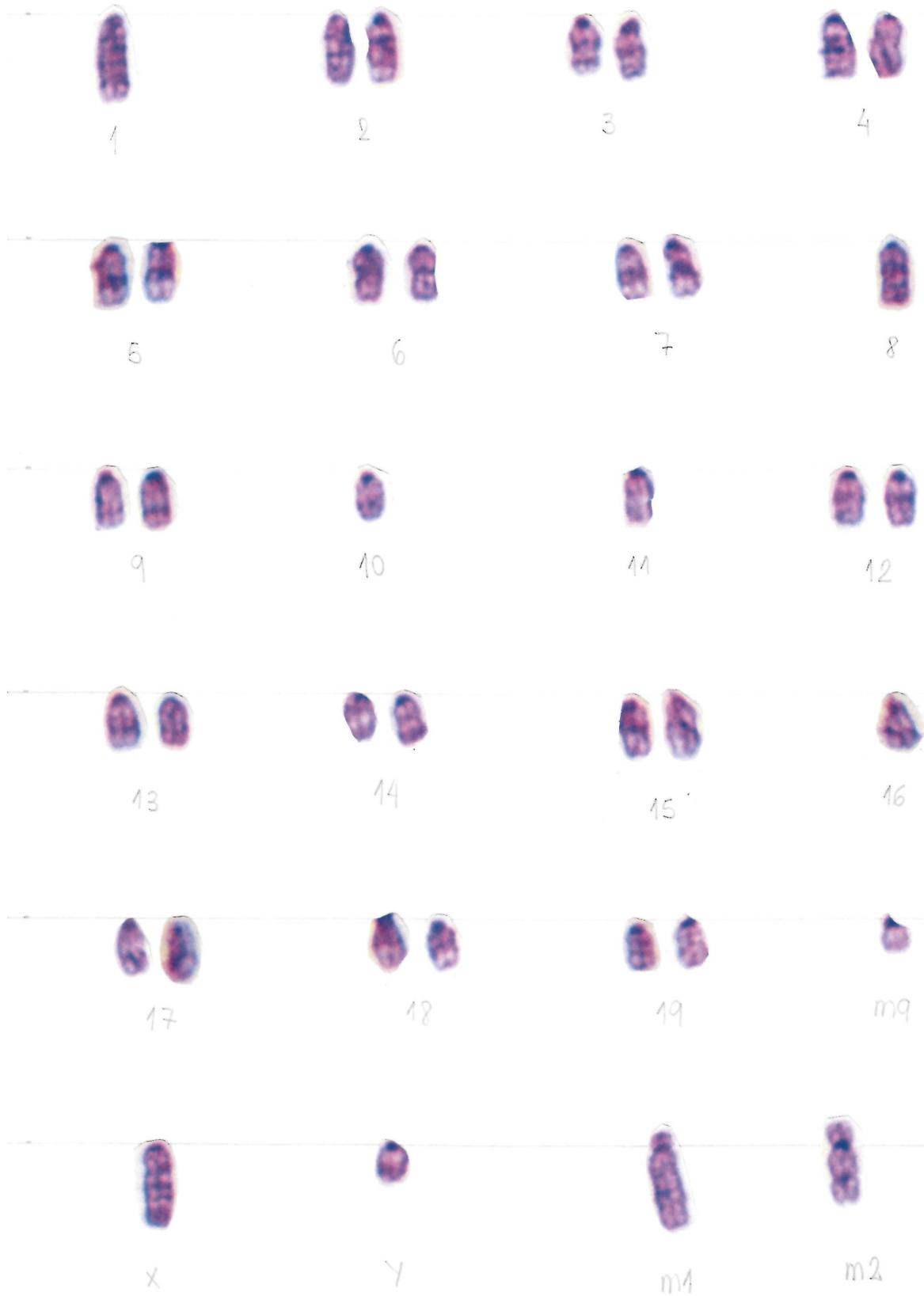


m2

Y1-D1G 38 CROMOSSOMOS
(Y1D1G_BG_0083)

26-01-2011

Cecilia Fonseca



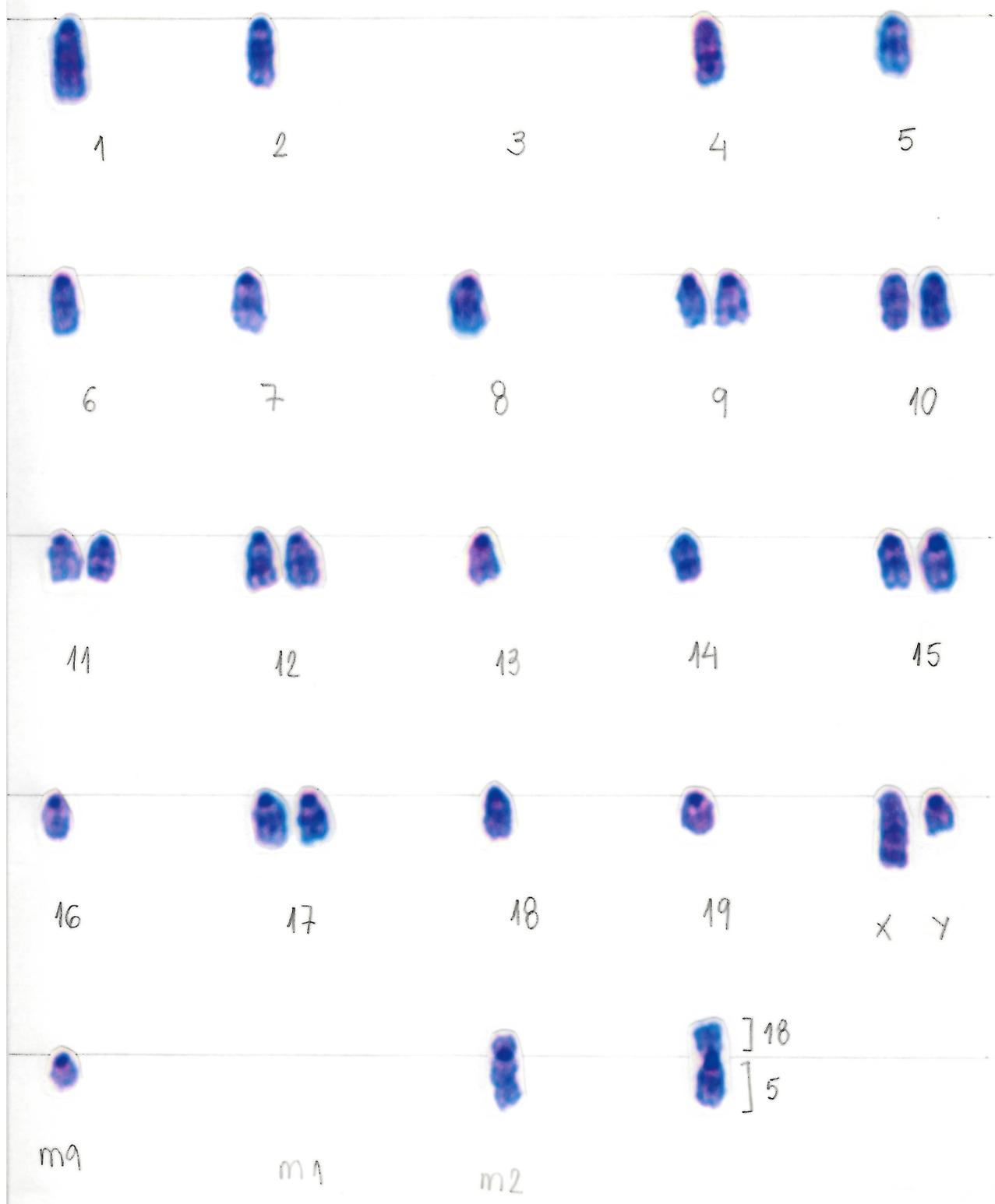
DIGFR-10.4

26/3/2014

Cecilia bonieca

(DIGFR-10.4-BG-00019)

31 cromossomos



DIGFR 10.4

25/2/2014

Pecilia funeata

(DIGFR 10.4 - BG-00017)

36 chromosomes



1

2

3

4

5



6

7

8

9

10



11

12

13

14

15



16

17

18

19

X Y



m1

m1

m1

m2

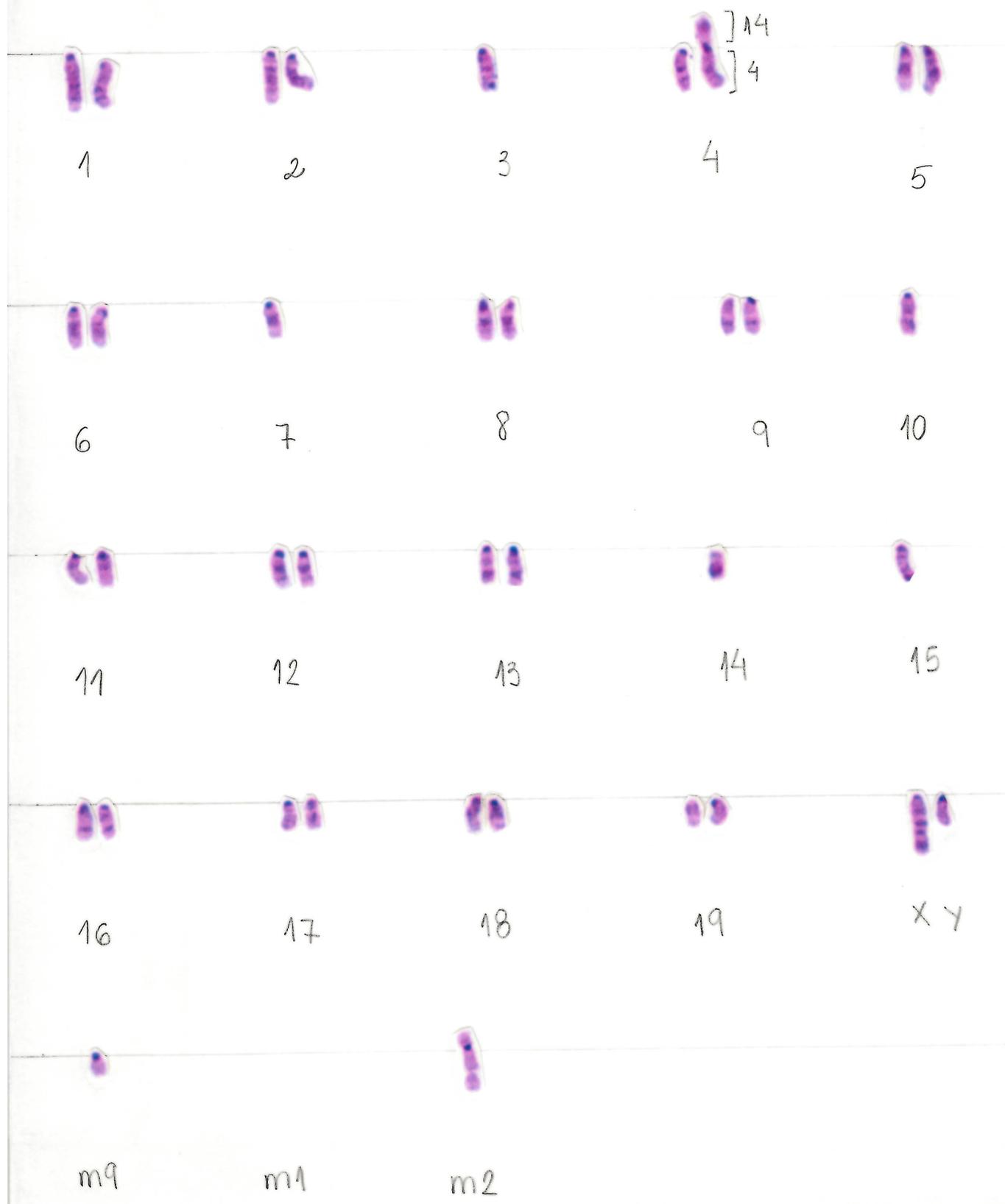
18

5

DIGFR-10.4
(DIGFR 10.4 - BG - 00013)

11/04/2014
37 cromossomos

Cecilia Fonseca



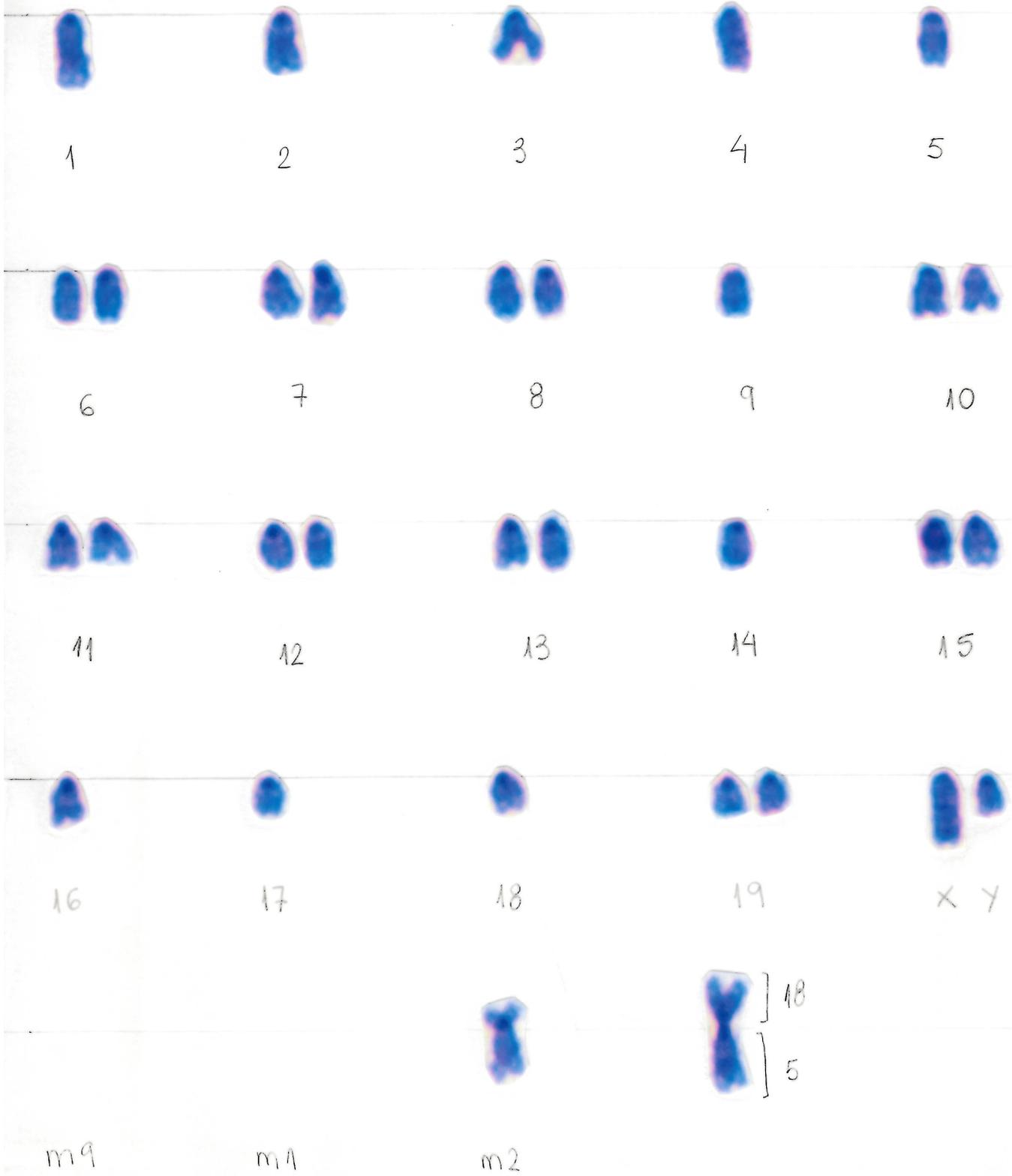
DIGFR5.3

17/04/2014

Cilia lonuca

(DIGFR5.3_B6_00009)

32 chromosomes



DIGFR-10.4

25/2/2014

Celia Fonseca

(DIGFR-10.4-BG-00018)

36 cromosomas



1



2



3



4



5



6



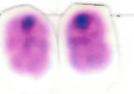
7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



X Y



m9



m1



m2



18
5

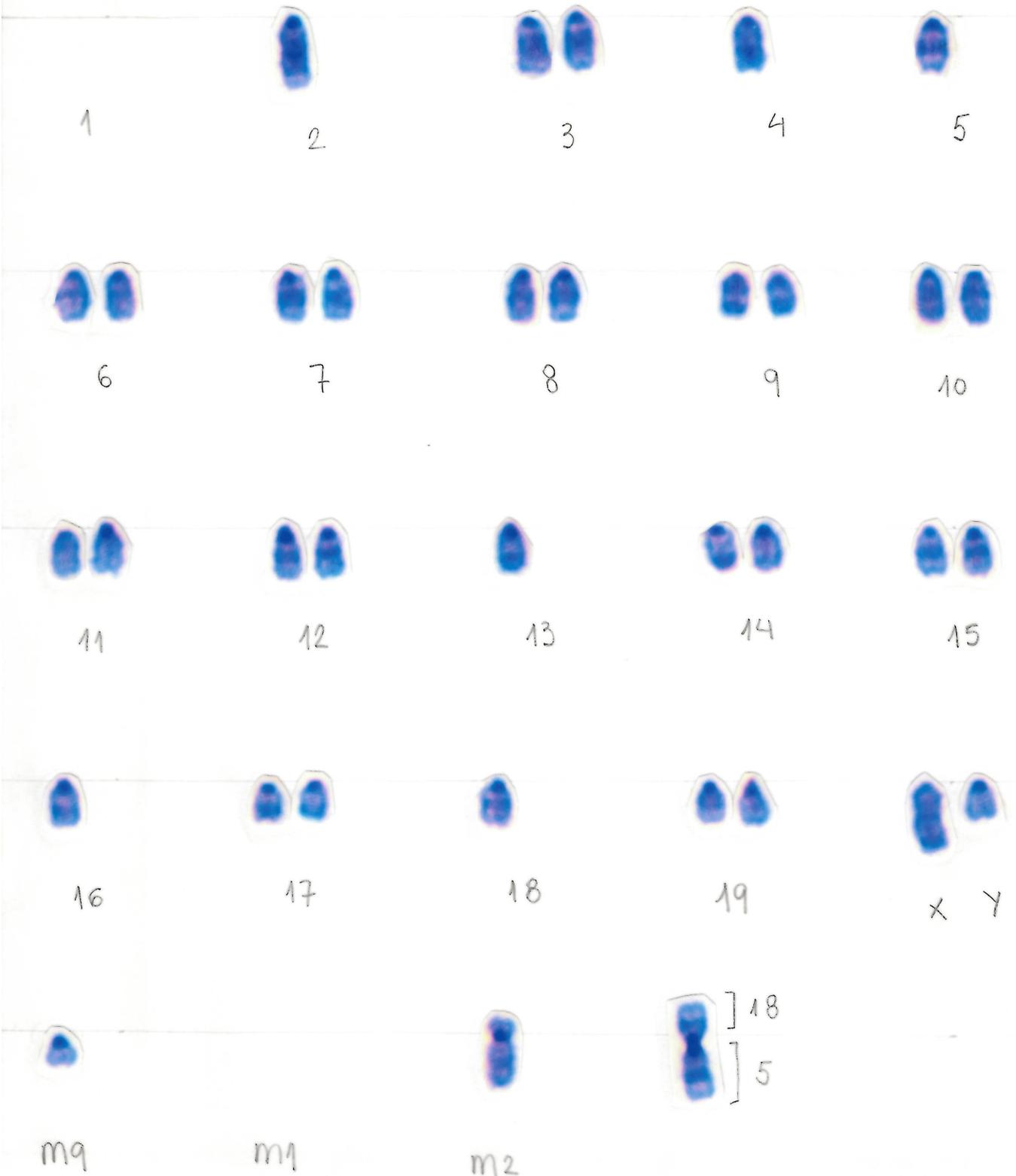
DIGFR-5.3

25/2/2014

Celia Fonseca

(DIGFR5.3_BG_00007)

35 cromosomas



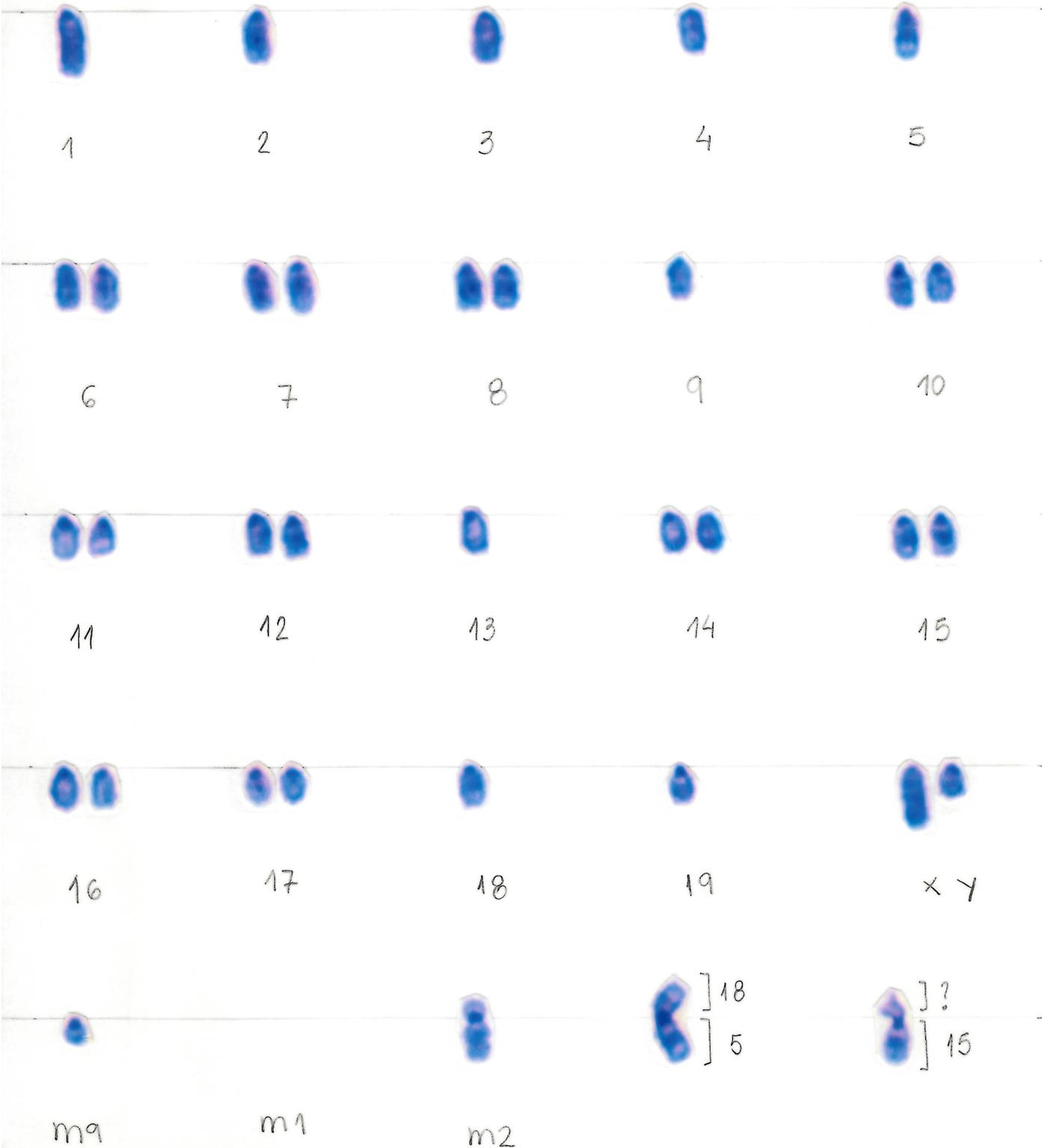
DJGFR-5 3

17/04/2014

Cecilia lousua

(DJGFR5.3_BG_00002)

35 chromosomes



Y1D1G
(D1G-BG-00096)

22/04/2014
39 cromossomos

Cecilia Fonseca

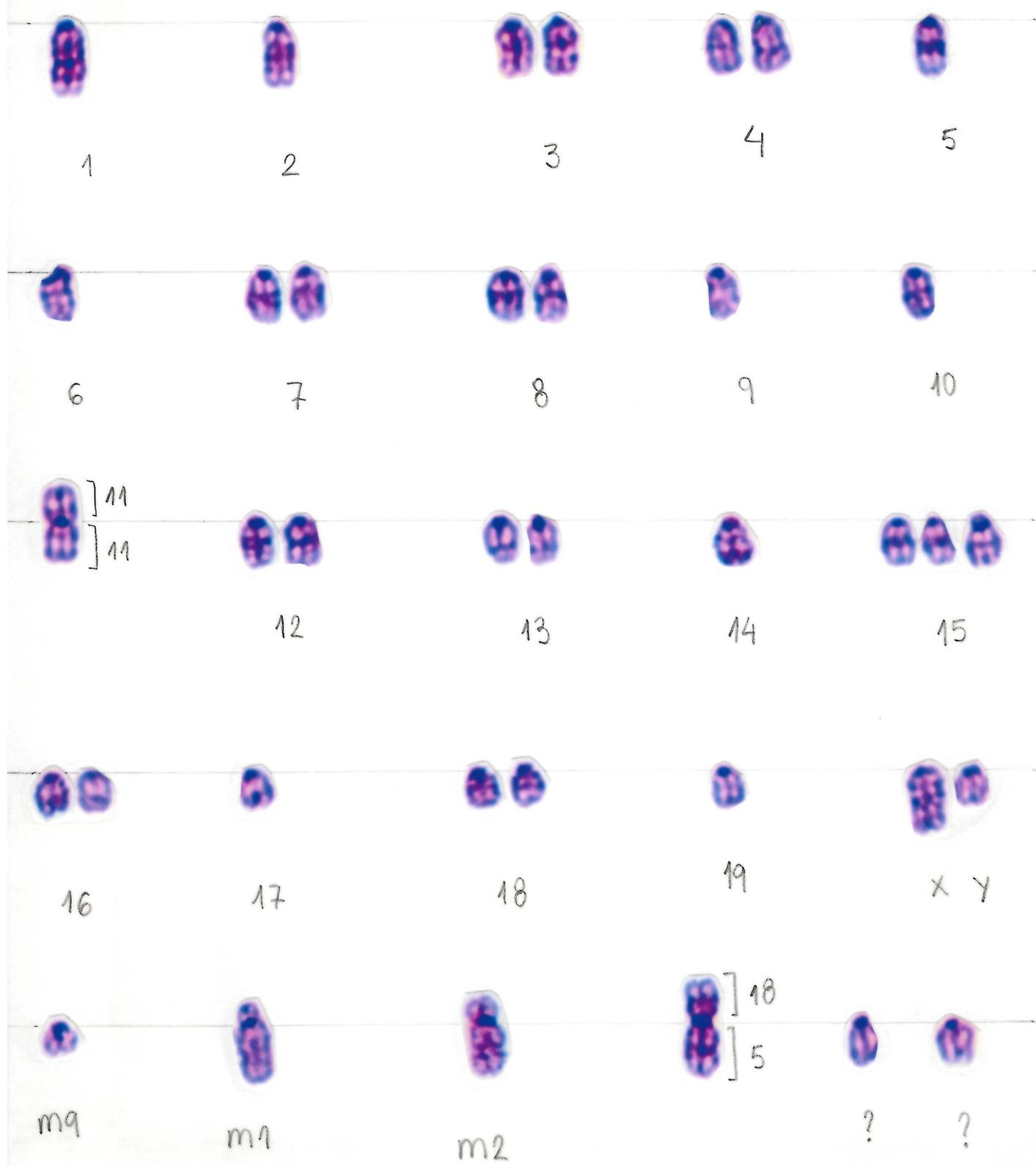


Y1 DAG
(DIG-BG-104-30)

01-04-2014

Cecilia Fonseca

37 cromossomos

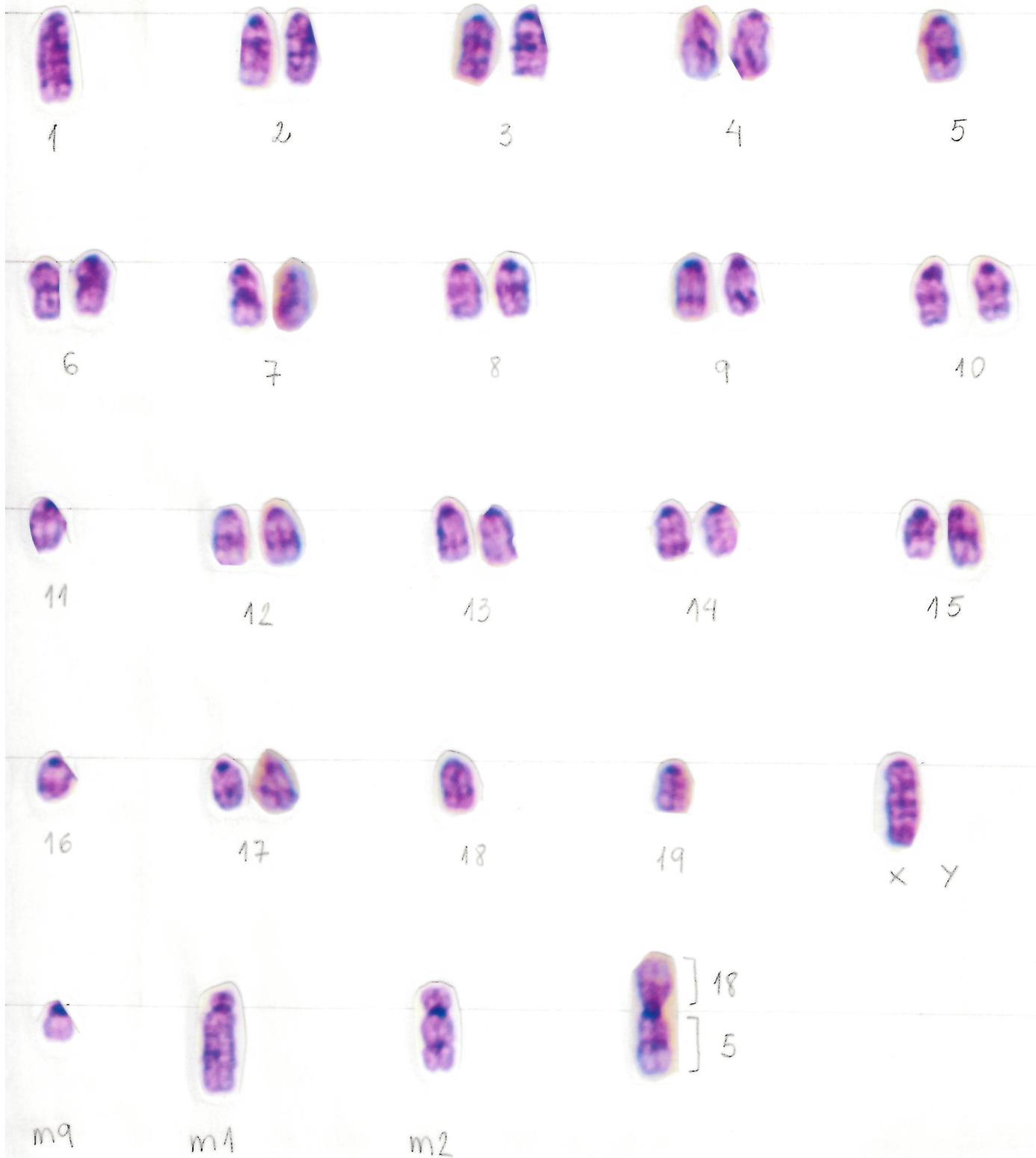


CARIÓTIPO YIDIG
(YIDIG-BG-00083)

21/2/2014

Lucia Fonseca

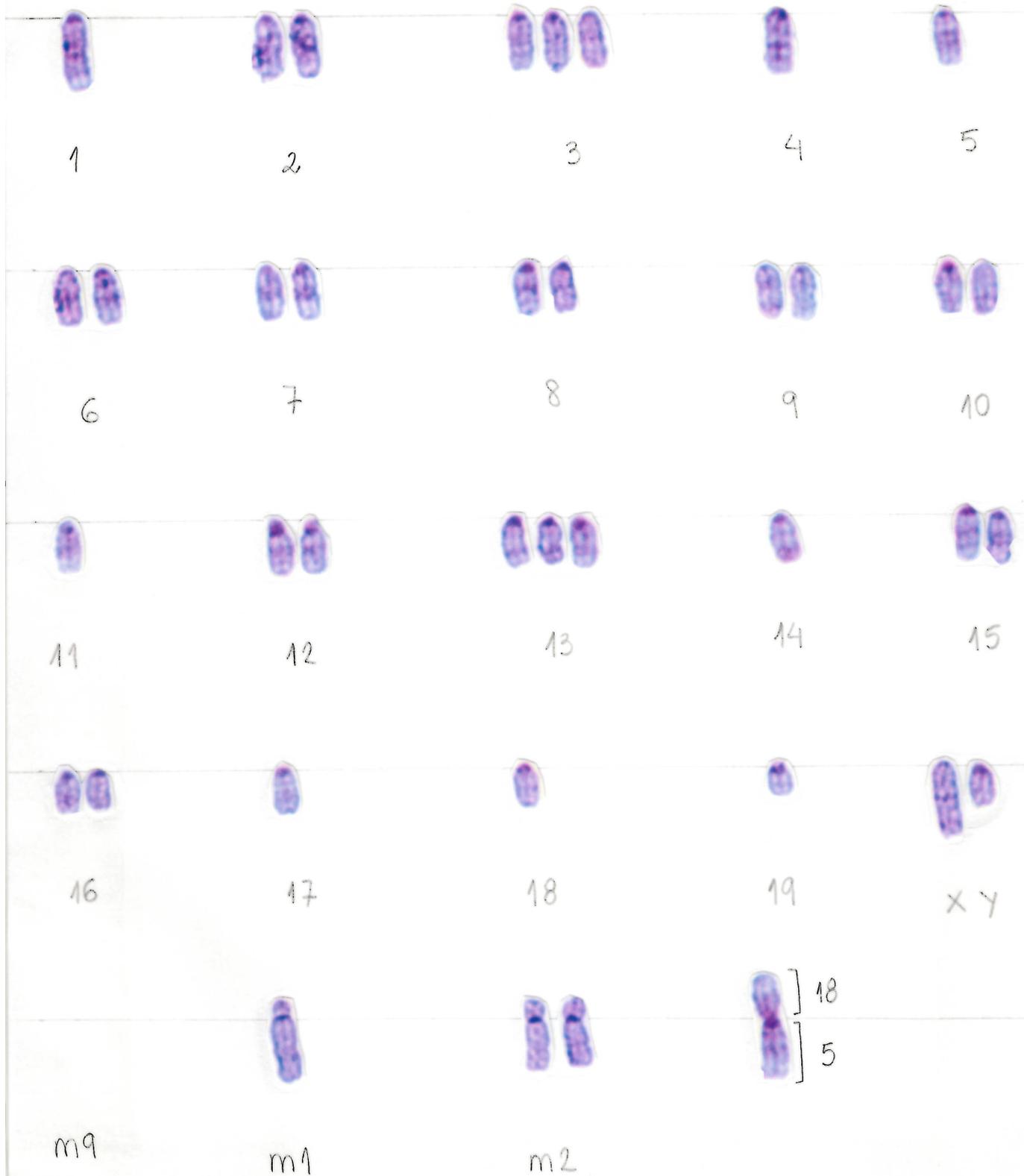
37 cromossomos



YADJG
(DJG-BG-00073)

09/04/2014
38 cromossomos

Cecilia Fonseca

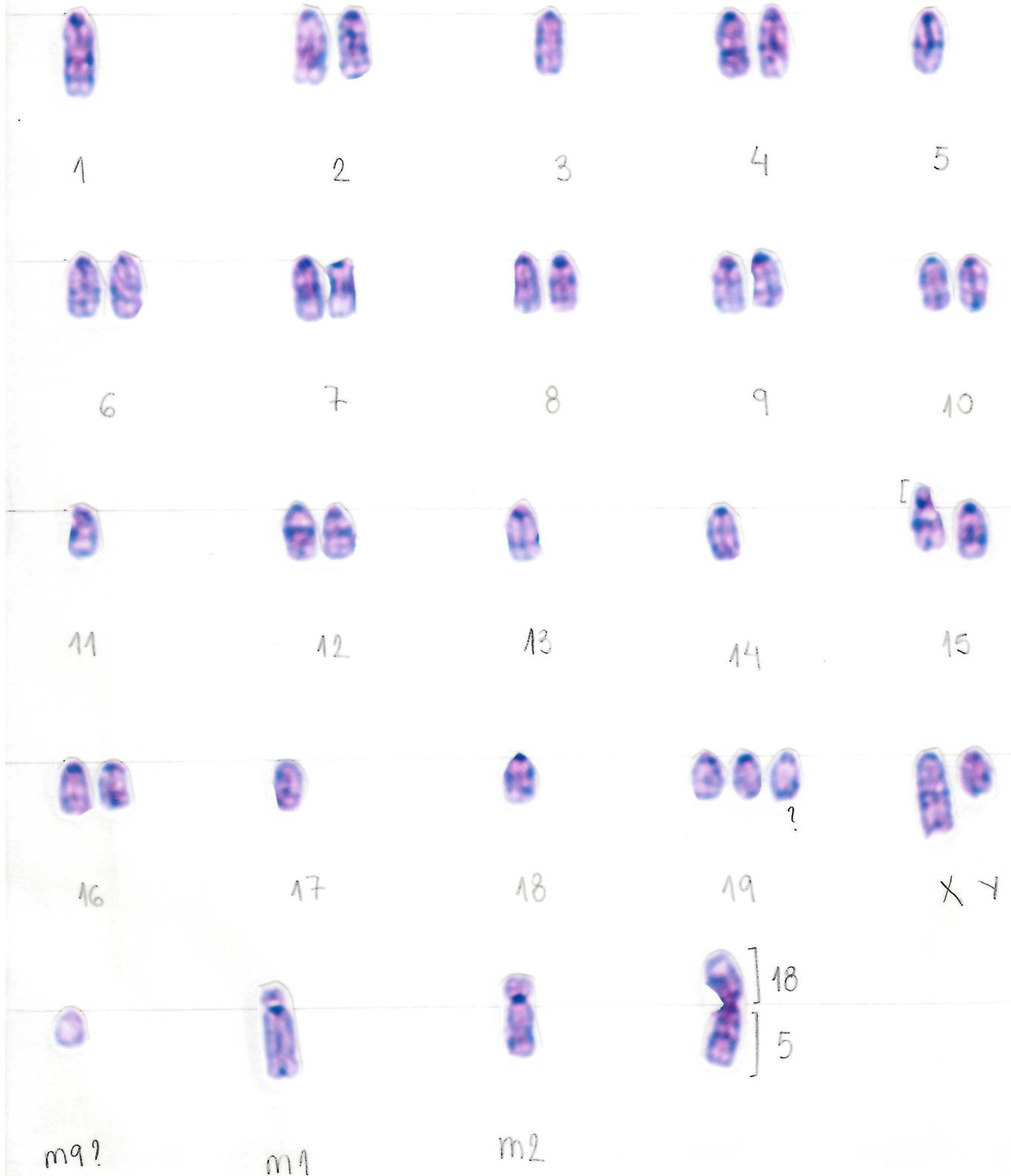


Y1DJG
(D19-BG-101)

18/04/2014

Acacia farnesiana

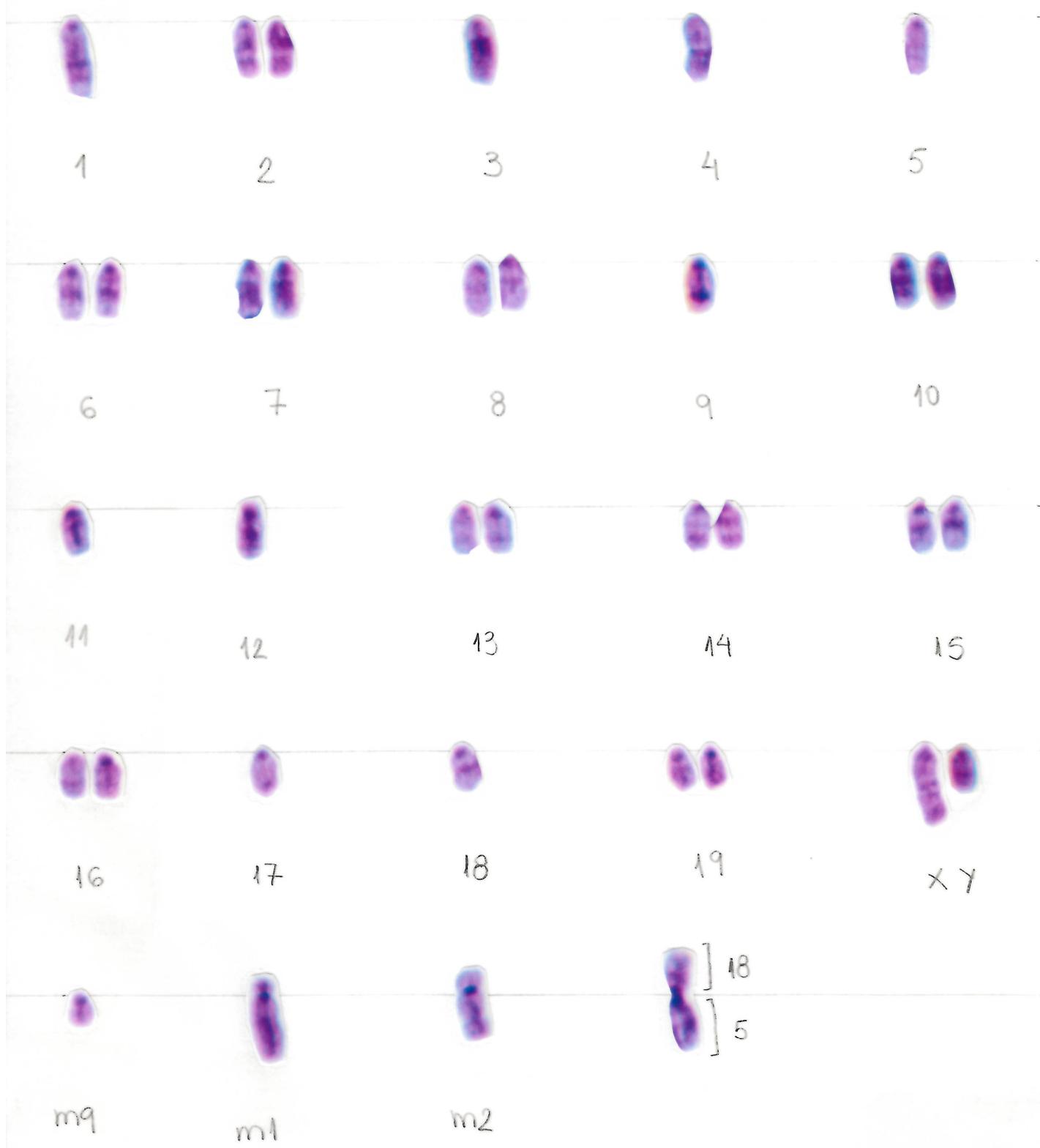
37 chromosomes



Y1 DIG
(DIG-BG-00045)

18/04/2014
35 cromosomas

Cecilia Fonseca

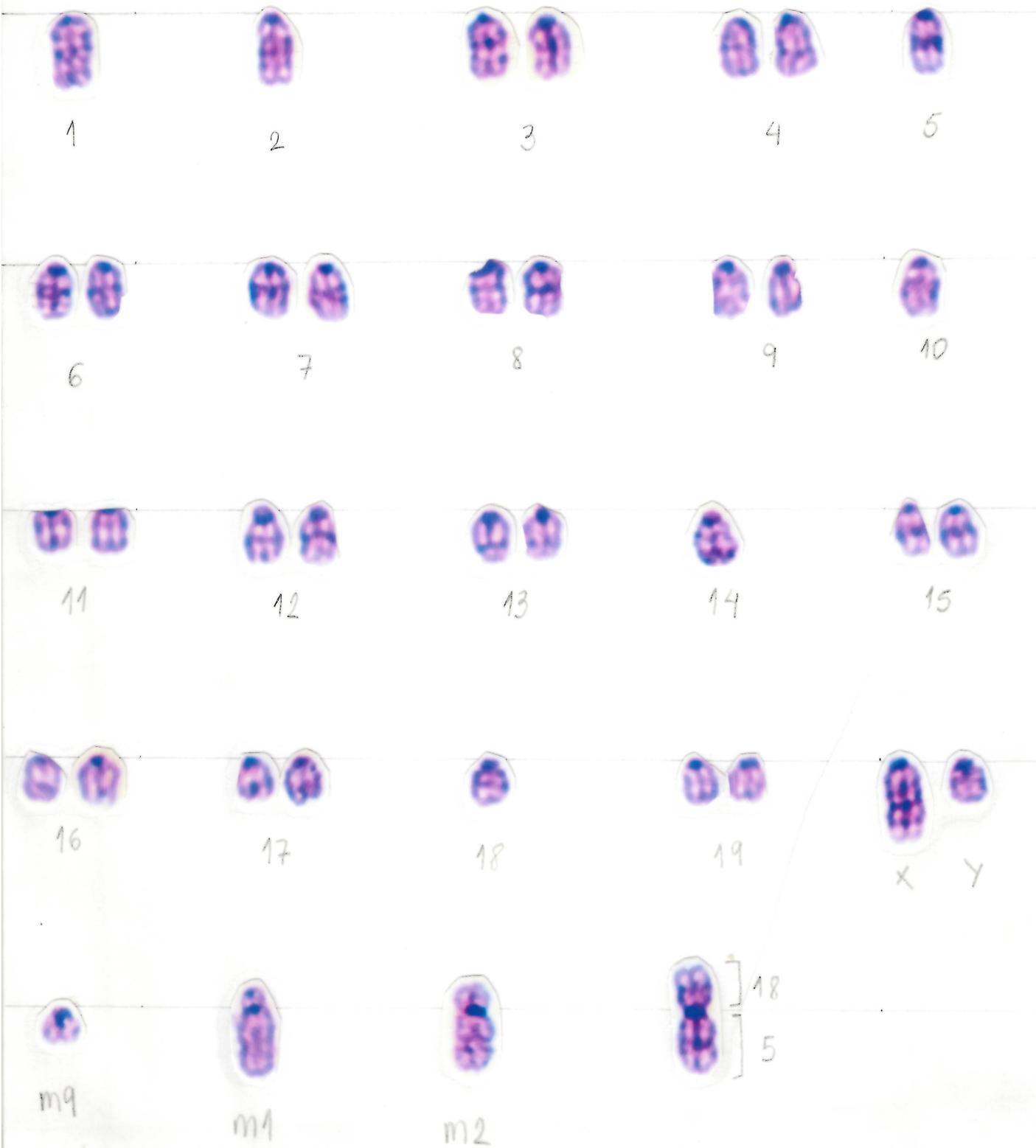


CARIÓTIPO Y1 (83)
(Y1-B9-00034(1))

21/02/2014

Cecilia Fonseca

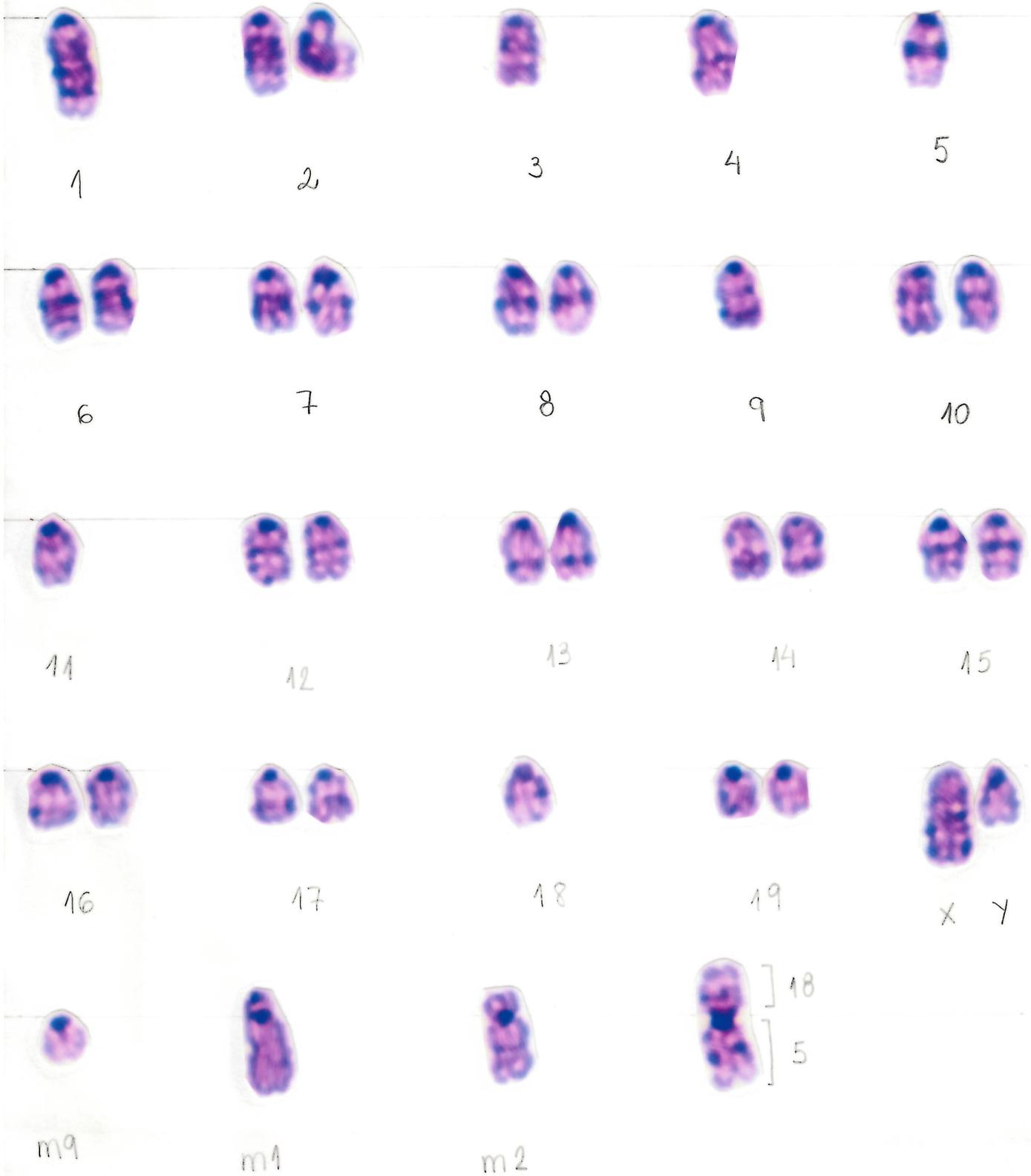
38 cromossomos



Y1
(Y1-BG-00043)

31/03/2014
37 cromossomos

Acilia Fonseca



Y1

(Y1-BG-00025)

27/02/2014

38 cromossomos

Cecilia Fonseca



Y1

27/02/2019

Cecilia Fonseca

(Y1-BG-00040)

37 cromossomos



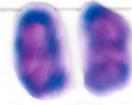
1



2



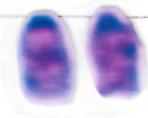
3



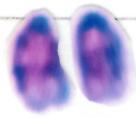
4



5



6



7



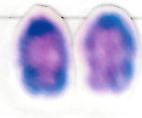
8



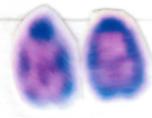
9



10



11



12



13



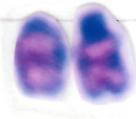
14



15



16



17



18



19



X Y



m9



m1



m2



18

5



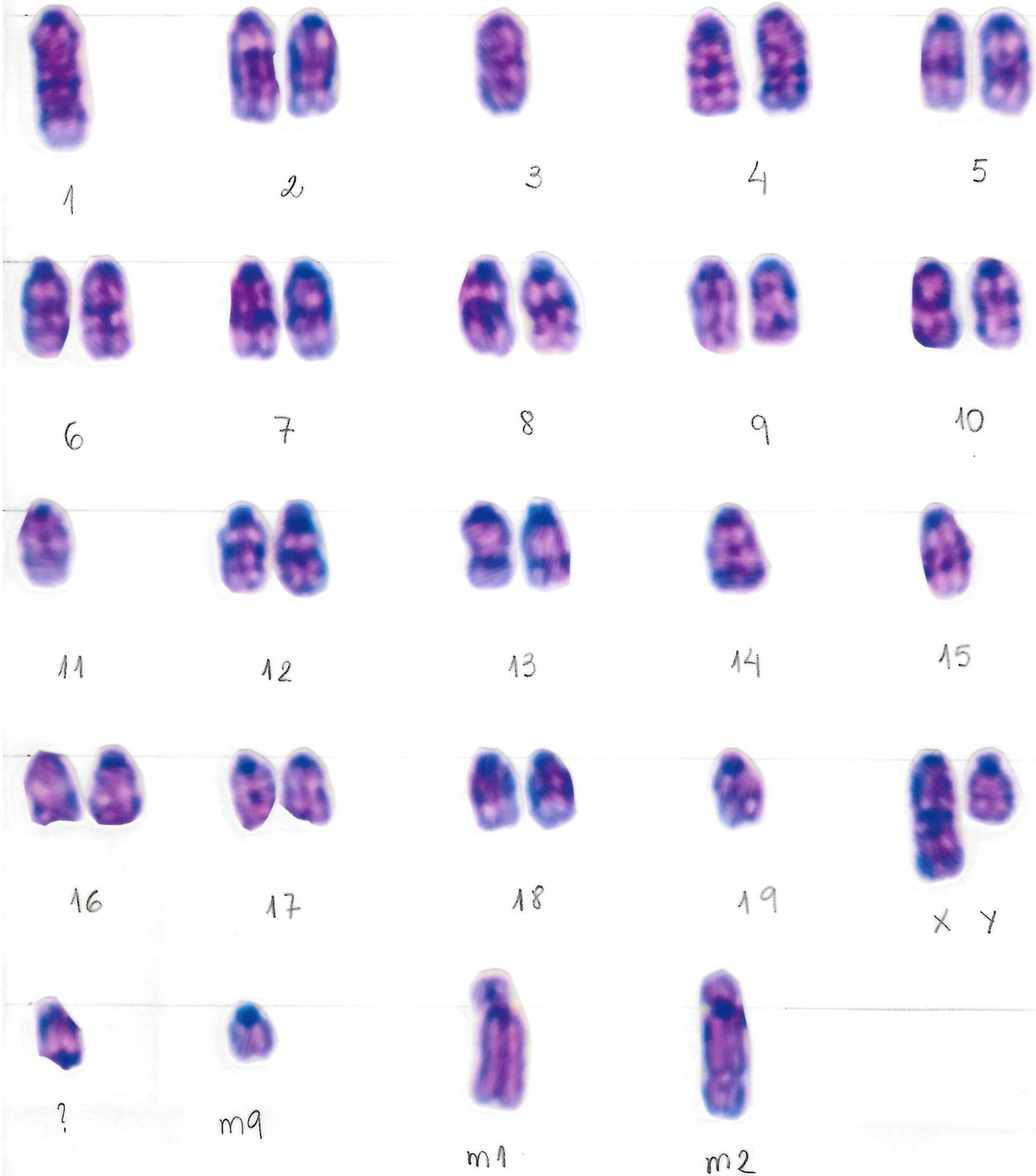
Y1

31/03/2014

Culex fusca

(YL-BG-00047(1-3))
(2-3)
(3-3)

38 chromosomes



Y1

26/03/2014

Lucilia fonsaca

(Y1-BG-00024)

40 chromosomes



1



2



3



4



5



6



7



8



9



10



11



12



13



14



15



16



17



18



19



X Y



m9



m1



m2

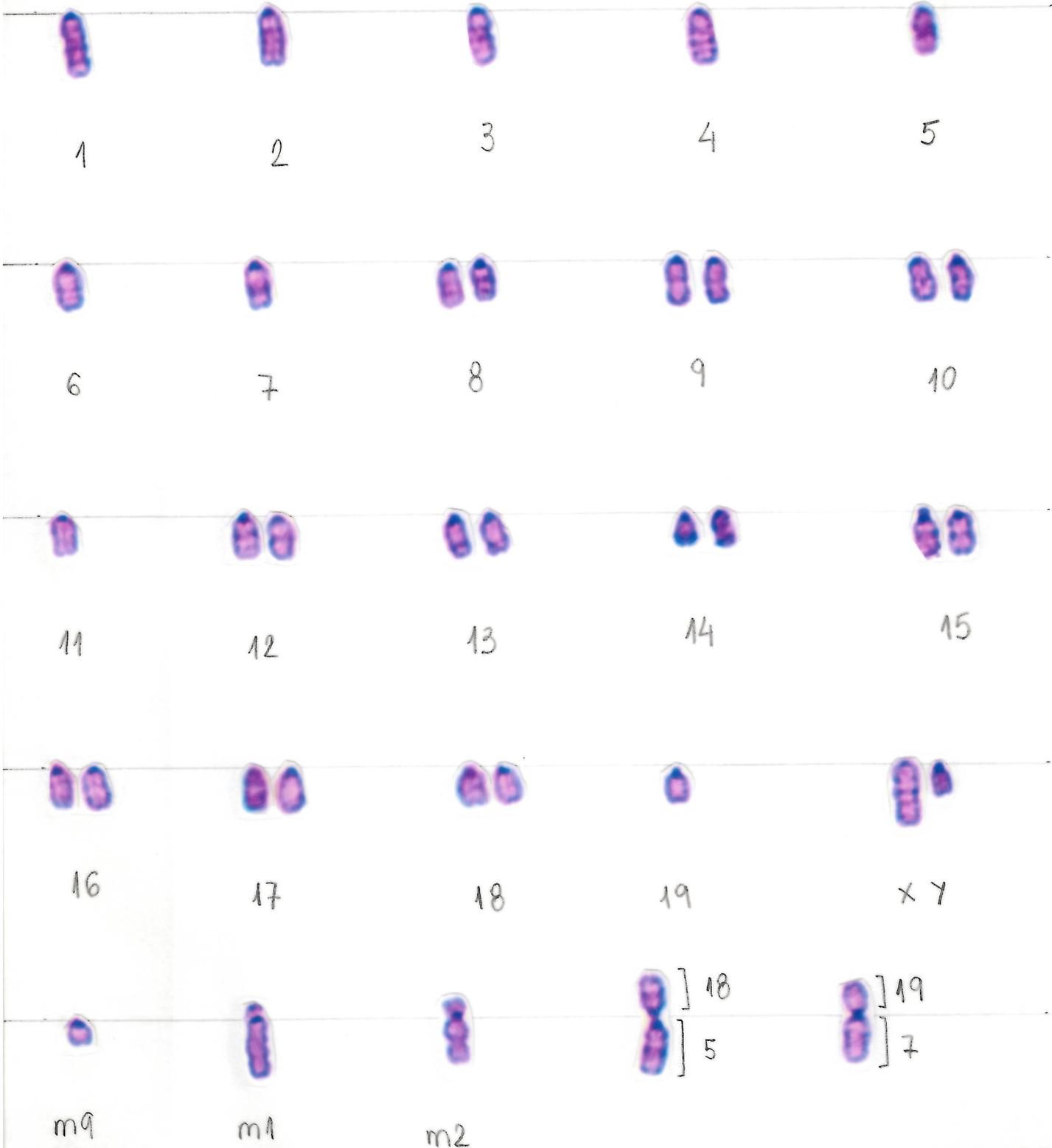
Y1

(Y1-B9-00016)

01/04/2014

36 cromossomos

Cátia Fonseca



Y1
(Y1_B6 - 00042 peg1a)
peg2a

18/04/2014
38 chromosomes

Acilia Fonseca



Y1
(Y1_BG_00012)

10/04/2014
38 chromosomes

Cecilia Fonseca



Y1

09/04/2014

Cecilia Fonseca

(Y1-BG-00048)

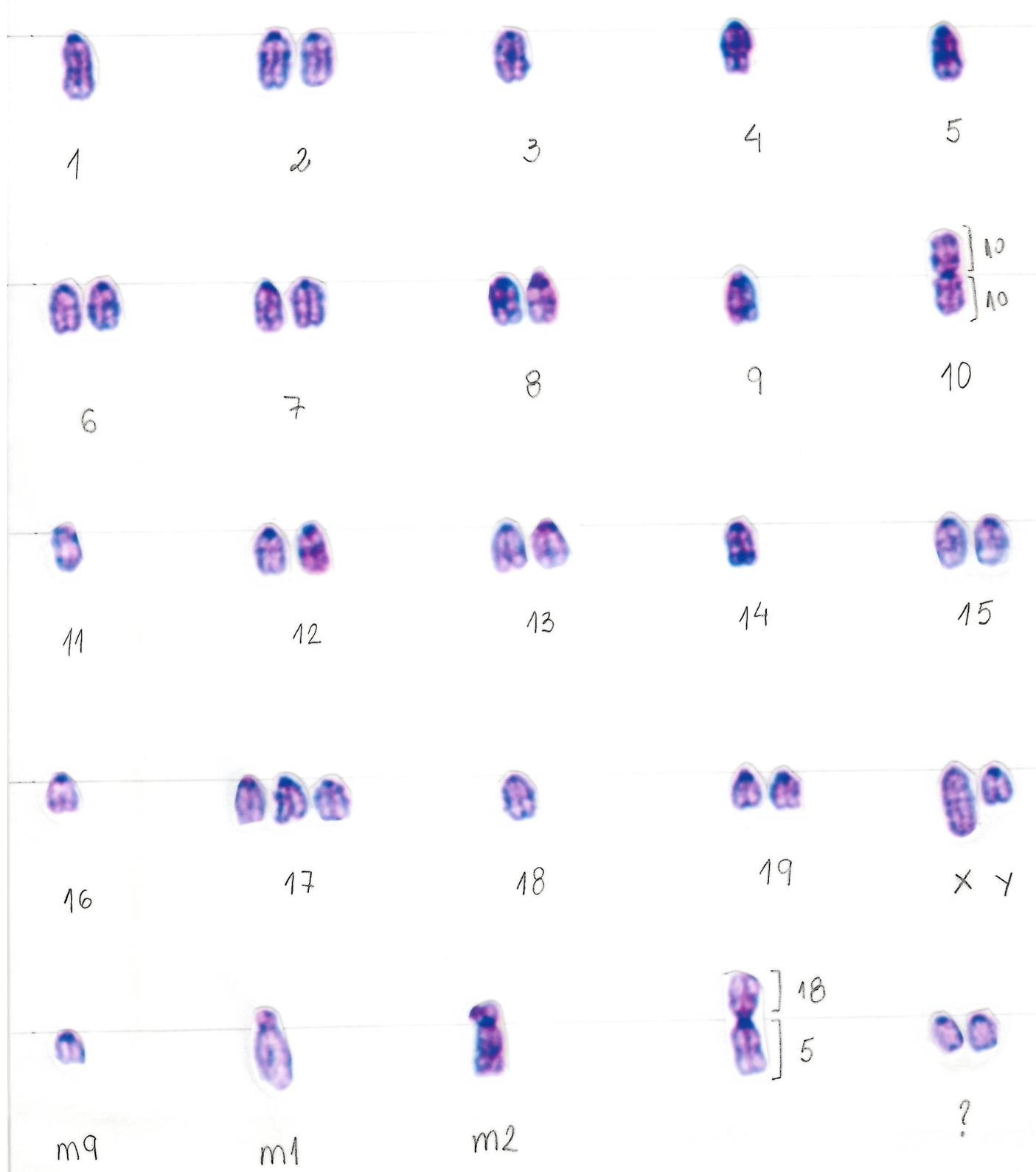
36 chromosomes



Y1
(Y1-BG-00062)

09/04/2014
37 chromosomes

Cecilia Fonseca



Y1
(Y1-BG-00056)

25/03/2014
33 chromosomes

Acilia Fonseca

