

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

TATIANA GUIMARÃES DE FREITAS MATOS

**Mecanismos anti-proliferativos disparados
por FGF2 e éster de forbol em células
de camundongos transformadas por Ras.**

**São Paulo
25/07/2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TATIANA GUIMARÃES DE FREITAS MATOS

**Mecanismos anti-proliferativos disparados por FGF2 e
éster de forbol em células de camundongos
transformadas por Ras.**

*Dissertação/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
2007**

Tatiana Guimarães de Freitas Matos
Mecanismos anti-proliferativos disparados por FGF2 e éster de forbol em células de camundongos transformadas por Ras.

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

**Para meu grande amor,
meu companheiro
e melhor amigo, Marcelo**

Para meu pais, Carlos e Nazaré

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Hugo, pela orientação e paciência. Pelas histórias na hora do almoço, que tornavam o dia mais divertido.

À Celina K. Yoshihara, pela ajuda fundamental para a realização deste trabalho, pelo seu espírito crítico e pelo carinho e dedicação.

Às minhas amigas e companheiras de IQ, Jac e Parô, pelo apoio, incentivo e amizade verdadeira.

Aos amigos do Laboratório, presentes ou passados, Gilson, Alê, Matheus, Mari, Carla, Fábio Nakano. Fábio Forti, Érico, Paula, Ivan, Kátia, Carol e Miriam, pelas ajudas, dicas e pelos momentos (alegres ou difíceis) compartilhados.

Aos técnicos do Laboratório, que permitiram a realização desse trabalho, Maria, Cleusa, Débora e Eva.

Às amigas Paula e Tati pela agradável convivência fora dos portões da USP

À minha família, pais e irmãos e meu marido, pelo apoio incondicional.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

RESUMO

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.

Mutações com ganho de função do proto-oncogene Ras se encontram entre umas das mais freqüentes modificações em cânceres humanos, além disso, tumores com essas características possuem, em geral, mau prognóstico. O objetivo inicial desta tese foi estudar novos mecanismos anti-proliferativos disparados por dois agentes mitogênicos, FGF2 (“Fibroblast Growth Factor 2”) e PMA (“Phorbol-12-Myristate-13-Acetate”, um diéster de forbol), sobre células de camundongos transformadas por Ras e refratárias a apoptose. Para isso utilizamos duas linhagens celulares: uma linhagem naturalmente transformada por uma amplificação do gene K-Ras, que é derivada de um tumor de córtex adreno-cortical de camundongo e é denominada Y1, e uma sublinhagem, derivada de Balb/c 3T3, transformada em laboratório com o oncogene H-RasV12 humano. A fim de se elucidar o mecanismo de ação de FGF2, foram selecionadas, isoladas e caracterizadas múltiplas sublinhagens clonais resistentes a FGF2, derivadas das linhagens parentais Y1 e B61. Mostramos assim, que o FGF2 exerce um forte efeito seletivo negativo, de forma que os clones resistentes ao mesmo tendem a perder os altos níveis de expressão da proteína Ras. Mostramos ainda que essas células passam a ser dependentes de FGF2 para crescer em cultura, perdem a capacidade de crescimento em suspensão e são menos tumorigênicas quando comparadas às células parentais. Em uma segunda etapa, caracterizamos o efeito citotóxico de PMA sobre células transformadas por Ras, e vimos que esse efeito é mais acentuado para células transformadas por K-Ras, mas é nulo sobre células imortalizadas não tumorigênicas. Mostramos ainda que esse efeito passa pela ativação da via de PKC. A inibição da proliferação por PMA se deve, ao menos parcialmente, à indução de senescência nessas células. De forma semelhante ao que foi adotado para o estudo com FGF2, foram selecionados clones resistentes a PMA, derivados de Y1. Os clones obtidos se mostraram muito instáveis, pouco resistentes a PMA e dependentes de FGF2 para crescer. Todos os clones testados se mostram tumorigênicos, entretanto, apresentaram maior tempo de latência, estatisticamente diferente da célula parental, Y1. Assim, neste trabalho, mostramos que duas substâncias, com caráter mitogênico e potencialmente oncogênico, são capazes de inibir seletivamente a proliferação de células transformadas por Ras, uma vez que elas não têm efeito sobre células não transformadas. Desvendar os mecanismos que causam a citotoxicidade dessas substâncias deve trazer informações relevantes com possibilidades de impacto em terapia de tumores dependentes dos oncogenes ras.

Palavras-chave: FGF2, PMA, Ras, transformação celular, tumorigênese

ABSTRACT

Matos, TGF. **Anti-proliferative mechanisms induced by FGF2 and phorbol ester in murine cell lines transformed by Ras.** 2007. 155p. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

Amplification and gain of function mutations in ras proto-oncogenes are frequent genetic lesions in human cancers of bad prognostic. This thesis aimed to investigate novel anti-proliferative mechanisms induced by two mitogens, FGF2 (“Fibroblast Growth Factor 2”) and PMA (“Phorbol-12-Myristate-13-Acetate”, a phorbol diester), in murine cell lines transformed by ras and highly resistant to apoptosis. To this end, we took two different mouse malignant cell lines: Y1, a cell line derived from an adrenal tumor, naturally transformed by K-ras amplification and another one, 3T3-B61, obtained by transformation of Balb-3T3 fibroblasts with the H-rasV12 oncogene. To elucidate FGF2 mechanisms of action, we selected, isolated and characterized clonal sublines resistant to FGF2 from both Y1 and 3T3-B61 parental lines. FGF2-resistant clones are rare normal-like revertant sublines that no longer display Ras over expression, are dependent on FGF2 for growth, do not grow in suspension cultures and exhibit low tumorigenicity in Nude mice. These results show that FGF2 exerts a strong selective pressure against ras-transformed cells, inducing senescence and irreversibly blocking proliferation. Differently from FGF2, PMA cytotoxic effect is completely dependent on PKC activity. In addition, PMA is highly toxic to K-Ras transformed Y1 cells, poorly toxic to H-Ras-transformed 3T3-B61 cells and not toxic to immortalized non tumorigenic cell lines. Attempts to select PMA-resistant cells from the Y1 parental line have yielded very rare, highly unstable clonal sublines, dependent on FGF2 for proliferation. In conclusion, two mitogens, FGF2 and PMA, can selectively inhibit Ras-driven proliferation, a phenomenon of great interest for biology and therapy of tumors dependent on ras oncogenes.

Key-words: FGF2, PMA, Ras, cell transformation, tumorigenesis

SUMÁRIO

1. Introdução.....	9
1.1. Observações Preliminares.....	10
1.2. Definições importantes	11
1.3. Ciclo Celular. Transição G0/G1→S	12
1.4. Motivações iniciais deste projeto	17
1.4.1. Modelos Celulares de Estudo.....	17
1.4.2. Efeito do FGF 2 na Célula Y1.....	19
1.5. FGFs	21
1.5.1. Sinalização por FGFs	21
1.5.2. Papel Biológico dos FGFs e seus receptores	23
1.5.3. Via de PKC	24
1.5.4. Briostatina e Esteres de forbol	26
1.6. Proliferação celular, apoptose e senescência	28
1.6.1. Proliferação X Mecanismos anti-proliferativos	28
1.6.2. Papel das proteínas da família Bcl-2 na apoptose.....	29
1.6.3. Caspases e apoptose	31
1.6.4. Senescência	33
1.6.5. Senescência e beta-galactosidase.....	38
1.7. Oncogenes Ras.....	40
1.7.1. Via de Ras/MAPK.....	40
1.7.2. Proteínas Ras e câncer.....	40
1.7.3. Fosforilação de K-Ras por PKC leva a apoptose.....	43
2. Objetivos	45
2.1. Objetivo geral	46
2.2. Objetivos Específicos.....	46
2.3. Resumo dos Motivos principais que fundamentaram a escolha destes objetivos	46
3. Materiais e Métodos	48
3.1. Materiais.....	49
3.1.1. Anticorpos.....	49
3.1.2. Meio, soro e soluções para cultura de células de mamífero.....	49
3.1.3. Soluções Tampões, fixadores e corantes	49
3.1.4. Reagentes diversos, kits e outros materiais.....	50
3.1.5. Inibidores enzimáticos	53
3.1.6. Fatores de crescimento	54
3.1.7. Primers	54
3.1.8. Equipamentos.....	55
3.2. Métodos	55
3.2.1. Cultura de Células	55
3.2.2. Ensaio clonogênico (substrato sólido).....	56
3.2.3. Ensaio de Proliferação Celular.....	58
3.2.4. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose.....	58
3.2.5. Isolamento de clones resistentes	59
3.2.6. Western Blot	61
3.2.7. PCR em Tempo Real	62
3.2.8. Ensaio de tumorigênese in vivo.....	63
3.2.9. Ensaio SA-β-galactosidase	64
3.2.10. Análise estatística.....	65

4. Resultados	66
4.1. Parte I	67
4.1.1. Citotoxicidade de FGF2	67
4.1.2. Seleção de clones derivados de Y1 resistentes a FGF2. Tratamento sustentado	67
4.1.3. Pressão seletiva de FGF2 gera células com baixa expressão de K-Ras	73
4.1.4. Citotoxicidade de FGF2 em células que superexpressam Ciclina D1	75
4.1.5. Seleção de clones resistentes a FGF2 a partir de células Y1-D1G	77
4.1.6. Citotoxicidade de FGF2 em fibroblastos transformados por Ras	79
4.1.7. Seleção de clones derivados de B61 resistentes a FGF2	82
4.1.8. Potencial de Crescimento em Suspensão de Células Y1 e derivadas	84
4.1.9. Potencial de Crescimento em Suspensão de Células B61 e B61-FR	91
4.1.10. Células resistentes a FGF2 derivadas de Y1 são pouco tumorigênicas	95
4.1.11. Tumorigenicidade de células Y1-D1G e derivadas	97
4.1.12. Efeito de FGF2 in vivo em células B61 e derivadas	99
4.2. Parte II	102
4.2.1. Ativação da via de PKC inibe a proliferação de células transformadas por K-Ras	102
4.2.2. Morte celular induzida por PKC é específica para células transformadas	109
4.2.3. Morte celular induzida por PKC é não apoptótica	113
4.2.4. O tratamento com PMA induz senescência em células Y1	114
4.2.5. Seleção de clones resistentes a PMA	116
4.2.6. Tumorigenicidade das Células Y1-PR	121
5. Discussão	122
5.1. Efeito citotóxico de FGF2 sobre células transformadas por Ras	123
5.2. Células resistentes a FGF2 perdem a superexpressão de Ras	127
5.3. Terapias de tumores transformados por Ras	131
5.4. Mecanismos antiproliferativos	132
5.5. Inibição da Proliferação de Células com K-Ras ativado	134
6. Conclusões	138
7. Referências Bibliográficas	141
Anexo	156

1. Introdução

1.1. Observações Preliminares

Ciclo celular, apoptose, senescência e diferenciação terminal são processos celulares fundamentais controlados por uma complexa rede sinalizadora, cuja estrutura é ainda desconhecida, embora muitas vias de sinalização celular tenham sido descritas nos últimos anos. Uma parte importante da fronteira da pesquisa em biologia celular e molecular está atualmente voltada para o estudo da rede (ou sub-redes) de sinalização celular através de múltiplas abordagens experimentais (Gilman et al., 2002; Sambrano et al., 2002a & 2002b).

Este trabalho irá contemplar a proliferação e morte ou inibição da proliferação celular de células de camundongos transformadas por Ras. O que torna esse trabalho surpreendente e, por isso mesmo, muito importante, é a aparente contradição observada nos resultados obtidos, uma vez que essa inibição da proliferação ou morte celular das linhagens estudadas é disparada pelo tratamento com substâncias que geram uma sinalização considerada primordialmente mitogênicas, quais sejam, um fator de crescimento bem conhecido, o FGF2 e, um ester de forbol, o PMA, reconhecidamente co-carcinogênico. No entanto, conforme será demonstrado, o resultado obtido é oposto ao que seria esperado. Observamos que o tratamento com FGF2 ou PMA resulta na inibição da proliferação de células transformadas por Ras, mas não de outras células apenas imortalizadas, porém não tumorigênicas. Assim, para que este estudo seja bem compreendido, serão levantadas nas próximas seções algumas informações a respeito das vias de sinalização relevantes para o entendimento deste trabalho.

1.2. Definições importantes

Este trabalho se baseia, principalmente, em experimentos realizados *in vitro*, com cultura de células. Assim, torna-se importante salientar o significado de alguns termos comumente utilizados nesse tipo de experimentação e que serão freqüentemente empregados durante a descrição desse trabalho, retirados de Cooper, 2000 e Alberts et al., 2002.

Cultura de células primárias: cultura preparada diretamente a partir de tecidos animais, sem que tenha ocorrido proliferação *in vitro*. A maioria das culturas primárias tem uma **capacidade de proliferação e um tempo de vida finito** e não muito prolongado.

Imortalização: diz-se que uma célula é imortalizada quando apresenta capacidade de **proliferação infinita**, gerando uma **linhagem celular**. Células de roedores podem espontaneamente sofrer modificações genéticas que inativam mecanismo de bloqueio de ciclo celular, gerando linhagens imortalizadas.

Transformação celular: a transformação celular pode ser inferida a partir de algumas características observadas nas células, dentre elas destacam-se modificações morfológicas e **perda de inibição de contato**, o que faz com que essas células atinjam uma **densidade de saturação muito maior** quando comparada a uma célula imortalizada não transformada. Além disso, elas comumente apresentam capacidade de crescimento sem estarem aderidas a nenhum substrato (**crescimento em suspensão**) e **capacidade de formar tumor** quando injetadas em animais suscetíveis. É importante lembrar que toda linhagem de célula transformada é também imortalizada.

1.3. Ciclo Celular. Transição G0/G1→S

A primeira fase do ciclo celular é a fase G1, que é disparada pela ativação de vias sinalizadoras por fatores mitogênicos. Esses fatores disparam uma sinalização mitogênica que resultará na ativação de fatores de transcrição, tais como c-Fos e c-Jun, que juntos formam o complexo AP-1, assim como c-Myc. Esses fatores darão início à transcrição de diversas proteínas necessárias para a síntese de DNA (fase S), crescimento celular (fase G2) e divisão celular (fase M). Dentre tais proteínas podemos destacar os complexos Ciclina/CDK (quinase dependente de ciclina), que desempenham papel fundamental durante as diferentes fases do ciclo celular. As CDKs são constitutivamente expressas nas células e são reguladas por diferentes Ciclinas que tem sua expressão e degradação reguladas de acordo com a fase do ciclo celular em que células se encontra, daí o nome ciclina. Diferentes complexos Ciclina/CDK são ativados durante as diferentes fases do ciclo celular.

A primeira metade da fase G1 culmina com a ativação do complexo CiclinaD/CDK4/6, que é ativado em diferentes níveis, incluindo transcrição gênica, estabilização de ciclina D, formação e estabilização do complexo CiclinaD/CDK4/6 e migração para o núcleo. Assim, as ciclinas D funcionam como sensores de fatores de crescimento e fazem a conexão entre mitógenos e a maquinaria autônoma do ciclo celular (Sherr et al, 1992; Sherr e Roberts, 1999).

Até recentemente, o único alvo de fosforilação de CiclinaD/CDK4/6 conhecido eram as proteínas da família pRb (pRb, p107, p130). Essas proteínas são da classe de genes anti-tumor, e reprimem o fator de transcrição E2F quando hipofosforiladas. O fator E2F controla a atividade de vários genes necessários para o metabolismo do DNA

e sua replicação (Trimarchi e Lees, 2002). O mecanismo proposto é que Ciclina/CDK4/6 inicia a fosforilação de pRb na metade de G1, tornando ativo o complexo CiclinaE/CDK2, que completa o processo de fosforilação de pRb, gerando um “feed-back” positivo. A posterior ativação das CDKs dependentes de ciclina A e B permite a manutenção de Rb na forma hiperfosforilada, ou seja, inativa, até que a célula termine o processo de mitose (Sherr e Roberts, 1999).

Estudos mais recentes mostraram que o complexo CiclinaD/CDK4 também é capaz de fosforilar Smad3, um agente que é intermediário na inibição do ciclo celular por TGF β . Assim, a fosforilação de Smad 3 por CiclinaD/CDK4 torna esse agente inativo, permitindo a progressão do ciclo celular (Matsuura et al, 2004). Alguns outros substratos têm sido descritos com sendo alvo de ciclina D/CDK, são eles: UBF (“nucleolar transcription factor upstream binding factor”) (Voit et al., 1999), Cdt1 (“replication licensing factor”) (Liu et al., 2004), Runx2 (“bone-specific transcription factor”) (Shen et al., 2006).

O complexo CiclinaD/CDK também exerce uma segunda função, não catalítica, que é o seqüestro de proteínas da família Cip/Kip, incluindo p21 e p27, inibidores de CDK2, que serão mostrados posteriormente. A ligação de Cip/Kip ao complexo CiclinaD/CDK também estabiliza o complexo e facilita a importação nuclear, sem inibir o mesmo (Sherr e Roberts, 2004). É importante lembrar que esses inibidores não tem qualquer efeito sobre a atividade quinásica de CDK 4 e 6. De fato, a interação com tais inibidores até mesmo facilita a montagem do complexo CiclinaD/CDK4/6 (LaBaer et al., 1997; Cheg et al., 1999). O seqüestro dos inibidores p21 e p27 por CiclinaD/CDK4/6,

permite a ativação de CiclinaE/CDK2, que é alvo desses inibidores. Assim, a ativação de CiclinaD/CDK4/6 é importante para a ativação de CiclinaE/CDK2.

O complexo CiclinaD/CDK4/6 ativo vai sendo acumulado progressivamente durante a fase G1. Após o início da replicação do DNA, esse complexo não é mais necessário e Ciclina D é degradada, e assim permanece até que a célula termine seu processo de divisão e entre novamente na fase G1.

A atividade de CiclinaE/CDK2 atinge o seu pico máximo na transição G1-S. As ciclinas E1 e E2 têm sua expressão e atividade reguladas, ao menos parcialmente, por mitógenos e alguns de seus alvos moleculares são também alvos de CiclinaD/CDK4/6, especialmente pRb e p27. Os sítios de fosforilação de pRb reconhecido por CiclinaE/CDK, no entanto, diferem daqueles reconhecidos por CiclinaD/CDK4/6. É possível, dessa forma, que a atividade de pRb seja regulada diferentemente por esses dois complexos (Harbour e Dean, 2000). Da mesma forma, a regulação de p27 por CiclinaE/CDK2, é diferente da que ocorre com CiclinaD/CDK4/6. Enquanto o primeiro complexo fosforila p27, o que vai resultar em sua degradação (Sheaff et al, 1997; Vlach et al., 1997), o segundo complexo seqüestra essa proteína, permitindo a atividade do primeiro. Esses dados sugerem que as atividades de CiclinaD/CDK4/6 e CiclinaE/CDK2 em relação a esses substratos devem ser complementares e não apenas redundantes (Sherr e Roberts, 2004). Além disso, o complexo CiclinaE/CDK2 também fosforila uma segunda categoria de substratos, que estão envolvidos com a duplicação do DNA tais como histonas, genes envolvidos com montagem da origem de replicação e início da replicação e também duplicação dos centrômeros (Yu e Sicinski, 2006). Assim, após a ativação de CiclinaE/CDK2, a célula se torna comprometida com a

entrada na fase S, um processo que agora se tornou irreversível. A atividade de CiclinaE/CDK2 cai abruptamente após o início da fase S, devido à degradação de ciclina E (Clurman et al., 1996; Welkcer et al., 2003). A degradação de Ciclina E após o término da fase S juntamente com a degradação de ciclina A durante G2 levam a célula de volta ao estado basal.

A atividade das CDKs é regulada pelos inibidores de CDK, ou CDKIs. Os CDKIs se dividem em duas famílias baseadas na estrutura dessas proteínas e nas CDKs sobre as quais essas proteínas atuam. Assim, a primeira classe compreende as proteínas INK4 (inibidores de CDK4), que inibem especificamente a porção catalítica de CDK 4 e 6. Pertencem à essa família: p16 (INK4A), p15 (INK4B), p18 (INK4C) e p19 (INK4D) e as mesmas são compostas por múltiplas repetições de anquirina e se ligam apenas à CDK4 e 6, e não às demais CDKs. A segunda classe de inibidores pertence à família Cip/Kip e inclui p21 (WAF1/Cip1), p27 (kip1) e p57 (kip2). Essas proteínas têm papel mais abrangente e modulam a atividade de diferentes complexos ciclina/CDK, como aqueles dependentes de ciclina A, D e E (Sherr e Roberts, 1999).

Estudos mais recentes têm colocado em jogo a necessidade das diferentes Ciclinas para a proliferação e progressão do ciclo celular.

Animais em que apenas 1 tipo de Ciclina D é inviabilizado (Ciclina 1, 2 ou 3), são viáveis e mostram pequenos defeitos, geralmente em tecidos em que apenas o tipo de ciclina deletado é expresso (Fantl et al., 1995; Sicinski et al, 1995 e 1996; Huard et al., 1999; Sicinska et al., 2003 e 2006). Por outro lado, o nocaute das três Cilinas D ao mesmo tempo, resulta em morte embrionária, no dia 16,5 pós-fertilização. Esses animais sofrem de uma anemia severa, provavelmente a causa da sua morte

prematura. Esses dados mostram que, embora as Ciclinas D sejam necessárias para o correto desenvolvimento embrionário, elas não são necessárias para a progressão do ciclo celular (Kozar et al., 2004). Os animais nocautes para CDK 4 ou CDK6, apresentam defeitos muito semelhantes para aqueles encontrados para as diferentes Ciclinas D (Rane et al., 1999; Tsutsui et al., 1999; Malumbres et al., 2004), enquanto que o nocaute para as duas CDKs, ao mesmo tempo, apresenta fenótipo semelhante, embora um pouco mais brando, do que é observado para as três Ciclinas D (Malumbres et al., 2004). Esse fenótipo mais brando parece ser devido a uma compensação por CDK2.

Animais nocaute para uma das duas Ciclina E (1 ou 2) se desenvolvem normalmente, embora alguns animais deficientes em Ciclina E2 sejam estéreis (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). A deleção de ambos os genes resulta em morte embrionária por volta do dia 11,5 pós-fertilização devido a problemas na endoreplicação de trofoblastos da placenta. Assim, conclui-se que as Ciclinas E desempenham papel fundamental em ciclos endoreplicativos, mas não em ciclos mitóticos (Geng et al., 2003; Parisi et al., 2003). De forma semelhante, animais nocaute para CDK2 também se desenvolvem normalmente e podem viver por até 2 anos, sendo o único defeito encontrado a infertilidade, causada por defeitos na meiose (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003).

Deve-se salientar, no entanto, que embora os resultados sejam positivos em geral, ou seja, a maior parte das deleções não acarretam em grandes problemas de desenvolvimento, isso não quer dizer que essas proteínas não desempenhem papéis importantes durante o ciclo celular. Um resultado positivo se deve, em geral, a

redundâncias e/ou compensações que podem correr na ausência de determinados componentes. Assim, os dados acima apenas nos informam que o papel desempenhado pelos complexos Ciclina D/CDK4/6 e Ciclina E/CDK2, quando estes estão ausentes, pode ser desempenhado por outros complexos, provavelmente da mesma família, sejam eles conhecidos ou não.

1.4. Motivações iniciais deste projeto

1.4.1. Modelos Celulares de Estudo

Nosso laboratório está trabalhando na definição dos mecanismos moleculares que controlam o ciclo celular de células de mamíferos, especialmente aquelas transformadas por Ras.

Utilizaremos nesse trabalho linhagens celulares de camundongos que servem como ótimo modelo de estudo para mecanismos de tumorigênese de células de mamíferos em geral e de humanos, em particular. O trabalho de Maser e colaboradores (2007) mostra que a instabilidade cromossômica observada em células tumorais de camundongos gera uma série de situações que são muito similares às encontradas nos cânceres humanos. Os autores utilizam como modelo uma célula de um linfoma de células-T, com defeitos no sistema de “checkpoint” e manutenção dos telômeros. Assim, eles mostram que essas células apresentam instabilidade cromossômica e que defeitos decorrentes desse processo, tais como deleções, translocação e ampliações gênicas são muito semelhantes àqueles observado em células provenientes de tumores humanos.

A linhagem de células adrenocorticais Y1 é derivada de um tumor de camundongo e apresenta uma amplificação do gene c-K-Ras (Schwab et al, 1983), o que faz com que essas células apresentem uma grande quantidade da proteína K-Ras ativada, na forma Ras-GTP. A alta expressão e atividade de Ras é provavelmente a causa ou uma das causas da transformação maligna dessa célula. Entretanto, apesar das características de transformação apresentadas por essa célula, ou seja, capacidade de evitar apoptose, potencial de replicação ilimitado e capacidade de formação de tumor, ela mantém as principais características do córtex da adrenal, sendo utilizada como modelo para o mecanismo de ação do ACTH. Além disso, ela mantém um controle importante da transição G0/G1→S, o que torna essa linhagem um modelo válido para o estudo do controle do ciclo celular, tanto para células adrenais como para as células de mamíferos em geral.

As células da linhagem Y1 são bastante estáveis em cultura e podem ser estudadas em diferentes fases do ciclo celular de acordo com as condições em que são cultivadas. Células em crescimento exponencial são obtidas quando as mesmas são cultivadas com meio contendo 10% soro fetal bovino (SFB). Por outro lado, o carenciamento para soro por 48 h faz com que as células permaneçam na fase G0. Nessa fase, as células estão quiescentes e não ocorre replicação ou síntese de DNA. Entretanto, é importante ressaltar que uma porcentagem das células escapa ao carenciamento e continua a se dividir, o que deve ser levado em consideração na hora de avaliar os dados obtidos. Para que uma célula que se encontra na fase G0 possa progredir para as fases G1 e S é necessário um estímulo exógeno, tal como adição de soro ou fatores de crescimento.

Neste trabalho também estudamos a linhagem celular imortalizada e não tumorigênica de fibroblastos Balb/c 3T3 (clone A31), proveniente de embrião de camundongo Balb/c. Também utilizamos a sublinhagem 3T3-B61, derivada de Balb/c 3T3 por transformação com o oncogene humano EJ-ras, forma mutada do gene c-H-Ras 1 humano. O clone 3T3-B61 possui elevado número de cópias do oncogene EJ-Ras, mostra relaxamento no controle do ciclo celular e é altamente tumorigênico quando injetado em camundongos Balb/c (Kovary et al., 1989).

1.4.2. Efeito do FGF 2 na Célula Y1

Em células Y1 sincronizadas na interface G0/G1, o estímulo com FGF 2 é capaz de gerar uma série de respostas claramente mitogênicas. FGF 2 estimula a cascata das MAPKs, levando a uma rápida fosforilação das proteínas ERK 1 e 2, o que se observa entre 2 e 10 min após o estímulo. Além disso, entre 30 min e 2 h após o estímulo, observa-se a expressão dos fatores de transcrição, c-jun, c-fos e c-myc, os quais estão intimamente relacionados com a indução da síntese de DNA e, conseqüentemente, com a progressão do ciclo celular (Lofti et al., 1997; Lepique et al.2000). Observa-se também a expressão de ciclina D1, 5 h após o estímulo (Schwindt et al., 2003), culminando com início da síntese de DNA cerca de 8 h após o estímulo com FGF 2 (Lofti et al., 1997; Armelin e Lofti, 1999).

Apesar do FGF2 disparar sinais claramente mitogênicos nas primeiras horas do ciclo celular de Y1, após a entrada na fase S, as células sofrem um bloqueio no ciclo celular e a proliferação é inibida (Costa, 2005). Em sua tese de doutorado, Costa (2005), mostra que esse efeito é mais acentuado para FGF2 e pouco acentuado para

FGF1, mas é nulo para outros FGFs testado (4 e 5). Ele mostra ainda que esse resultado é dependente dos níveis de K-Ras-GTP e que esse efeito inibitório também é observado *in vivo*, ou seja, o tratamento com FGF2 diminui o ritmo de crescimento de tumores derivados de Y1, inclusive prevenindo o surgimento de tumores em alguns animais. Por outro lado, ele mostra que células Balb/c 3T3, imortalizadas, mas não tumorigênicas, não são inibidas por FGF2. Esse efeito inibitório foi observado em duas linhagens independentes transformadas por Ras, seja pela expressão elevada de K-Ras, o que garante níveis elevados de K-Ras-GTP, no caso de Y1 e também em linhagens derivadas de fibroblastos normais Balb 3T3 transformadas pelo oncogene EJ-Ras humano (H-RasV12), as sublinhagens EJA e B61.

Dessa forma, o trabalho desenvolvido em nosso laboratório nos últimos anos tem demonstrado que o FGF2 está agindo de forma antagônica ao que é esperado, ou seja, ele tem agido de fato, como uma molécula antitumor quando adicionado exógenamente a células imortalizadas transformadas com o oncogene ras.

Há evidência de que a célula entra em senescência (marcação β -galactosidase), embora seja uma senescência atípica, uma vez que a célula fica bloqueada em S e não em G1 (Costa, 2005; Forti et al., dados não publicados).

O mecanismo de ação do FGF2 ainda não é conhecido, mas sabe-se que há a participação da proteína RhoA uma vez que a expressão do dominante negativo RhoA N19 torna a célula Y1 resistente ao efeito citotóxico de FGF2 (Forti et al., dados não publicados). Sabe-se que, dentre outras funções, a proteína RhoA induz o aparecimento de fibras tensionais composta de feixes de actina e miosina, auxilia nos contatos focais (locais onde a célula se fixa ao substrato) e é necessária na

organização do anel contrátil durante a divisão celular. Assim, RhoA é responsável por regular actina, miosina e microtubulo que compõe o citoesqueleto da célula regulando a morfogênese e envolvendo assim a estabilidade da polaridade da célula, fator importante para interações entre células, movimentos e migrações. (Jaffe e Hall, 2005).

Dessa forma, este trabalho foi proposto inicialmente com o objetivo de esclarecer os mecanismos ativados por FGF2 que levam a inibição de linhagens celulares transformadas por Ras. Para responder a tal pergunta, nos propomos a selecionar e caracterizar células resistentes a FGF2 derivadas de Y1 e B61. Além disso, estudamos outras substâncias que inibem a proliferação de Y1, tais como Aginina-Vasopressina (AVP), cujos resultados não foram incluídos neste trabalho, e o éster de forbol, PMA. O trabalho com PMA surgiu da idéia de tentar correlacionar efeitos dessa droga com os de FGF2. Eles se mostraram independentes, porém, não menos importantes e bastante promissores.

1.5. FGFs

1.5.1. Sinalização por FGFs

O primeiro FGF a ser descoberto foi o bFGF (FGF básico) também conhecido como FGF2, que foi identificado como um fator de crescimento para fibroblastos (3T3) por Armelin em 1973. Desde então a família vem crescendo e, atualmente, já existem 22 membros dessa família identificados. Os membros dessa família desempenham diferentes papéis, tanto em organismos em desenvolvimento quanto no organismo adulto. Assim, durante o desenvolvimento, eles têm papel importante no controle da proliferação, migração e diferenciação celular. Por outro lado, no organismo adulto, os

FGFs desempenham papéis importantes no sistema nervoso, no processo de cicatrização e reparo tecidual e na angiogênese (Ornitz e Itoh, 2001),

A sinalização por FGF se dá através de uma família de receptores, composta por 5 membros, os FGFRs 1-5 (Eswarakumar et al., 2005; Kim et al., 2001; Sleeman et al., 2001). Os FGFRs 1 a 4 são proteínas transmembranares contendo 2 ou 3 domínios extracelulares (onde se liga o FGF), um domínio transmembranar e um duplo domínio intracelular de tirosina quinase, responsável pela transdução de sinal (Schlessinger, 2000). Portanto, os FGFRs pertencem à superfamília de receptores do tipo tirosina quinase, ou RTKs (Lee et al., 1989; Givol et al., 1992; Jaye et al., 1992).

O FGF também é capaz de se ligar a heparina ou proteoglicanas heparan sulfato, que agem como receptores de baixa afinidade que não transmitem sinal biológico, mas funcionam como moléculas acessórias que regulam a ligação a FGF e a ativação dos receptores (Yayon et al, 1991; Rapraeger et al., 1991; Ornitz et al., 1992).

Quando os FGFRs são ativados pelo ligante juntamente com o co-receptor tipo heparina ou heparan sulfato, o receptor sofre uma dimerização e se autofosforila de forma cruzada. Assim, tem início uma cascata de sinalização no ambiente intracelular. A sinalização é mediada pelas proteínas FRS α e β , as quais também são fosforiladas pelo receptor, tornando-se ativas. Essas proteínas recrutam complexos Grb2/Sos, que podem ser recrutados diretamente e indiretamente, via Shp2, resultando na ativação da via de Ras e MAPK (Kouhara et al., 1997).

A fosforilação de FRS α também leva a fosforilação de Gab1, a qual se liga ao domínio SH2 C-terminal de Grb2. A fosforilação de Gab1 recruta proteínas que contém

domínios SH2, incluindo PI3K (fosfoinositol-trifosfato quinase), que acaba resultando na ativação da via anti-apoptótica de Akt (Schlessinger, 2000).

A autofosforilação do receptor cria também sítios para ligação do domínio SH2 da fosfolipase C γ (PLC γ), a qual se torna ativa após sua fosforilação pelo receptor, resultando na hidrólise do PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato) e geração dos segundo mensageiros DAG (diacilglicerol) e IP3 (fosfatidilinositol trifosfato). DAG ativa a via de PKC (proteína quinase C) e IP3 ativa a liberação de Ca^{+2} (Schlessinger, 2000).

1.5.2. Papel Biológico dos FGFs e seus receptores

O papel biológico dos FGFs e seus receptores pode ser mais bem compreendido através do estudo de camundongos nocautes para essas proteínas. Um exemplo é o nocaute de FGF2, que produz animais viáveis, porém com problemas neuronais, esqueléticos e de pele. (Dono et al., 1998). Alguns nocautes, entretanto, aparentemente, não apresentam nenhum fenótipo definido, como é o caso do FGF1. Isso se deve, possivelmente, a uma compensação por parte de outros membros da família (Miller et al., 2000). Outros membros, por exemplo 4, 9 e 10, por sua vez, desempenham papéis tão relevantes e importantes, que os mesmos não podem ser compensados, uma vez que os animais nocautes para esses membros não são viáveis (Feldman et al., 1995; Colvin et al., 2001; Min et al., 1998; Sekine et al., 1999).

Os nocautes dos receptores de FGF, por sua vez, apresentam diferentes fenótipos de acordo com o gene mutado ou, ainda, de acordo com a isoforma afetada. O nocaute de FGFR1 produz embriões inviáveis, que morrem no dia embrionário 9,5. Esses embriões apresentam um defeito de migração das células através da linha

primitiva (Deng et al, 1994; Yamagushi et al., 1994). Esse mesmo fenótipo é observado quando se realiza o nocaute apenas da isoforma 1c, mas quando o alvo é apenas 1b, não se observa nenhum fenótipo (Partanen et al., 1998).

O nocaute de FGFR2 leva à morte embrionária no dia 10,5 devido a defeitos na placenta (Xu et al., 1998). O nocaute da isoforma 2b causa defeitos severos nos pulmões e membros (De Moerlooze et al., 2000), enquanto o da isoforma 2c causa defeitos na formação de ossos e esqueleto, mas os embriões são viáveis (Eswarakumar et al., 2002). Por outro lado, o nocaute de FGFR3 gera um crescimento exagerado dos ossos (Deng et al., 1996; Colvin et al., 1996), enquanto o de FGFR4 não apresenta fenótipo evidente (Weinstein et al., 1998).

Na seção seguinte chamaremos atenção para uma das vias mitogênicas que pode ser ativada por FGF e seus receptores. Trata-se da via de PKC, cujo conhecimento é de grande relevância para o entendimento deste trabalho.

1.5.3. Via de PKC

As proteínas quinases C (PKC) são proteínas do tipo serina/treonina quinase e compreendem uma família de 12 membros. Elas podem ser divididas em 3 grupos: a) PKCs convencionais (α , β I, β II e γ), as quais são ativadas por DAG, Ca^{+2} e fosfatidilserina; b) novas PKCs (δ , ϵ , θ , η e μ), são independentes de Ca^{+2} e são ativadas por DAG, fosfatidilserina e ácidos graxos insaturados; c) PKCs atípicas (ζ , λ e ι), as quais não se ligam a ésteres de forbol ou briostatina e são ativadas por fosfatidilserina, fosfatidilinosítídeos e ácidos graxos insaturados (Liu e Heckman, 1998). PKC α , β I, β II,

δ , ζ e ϵ tem expressão ubíqua e são encontradas em todos os tecidos (Schaap e Parker, 1991; Wetsel et al., 1992;), as demais isoenzimas têm expressão tecido-específica.

As PKCs consistem de uma porção regulatória e um domínio catalítico. Elas são constituídas de 4 domínios conservados denominados C1 a C4, entremeados por alças variáveis, de função ainda desconhecida, denominadas V1 a V5 (Coussens et al., 1986).

O domínio regulatório pode ser dividido em dois domínios ricos em cisteína (C1 e C2). Esses dois sítios podem se ligar a diferentes ativadores (Ono et al., 1989). O domínio C1 possui uma região inicial que é semelhante ao substrato de PKC que, provavelmente, atua como um pseudo-substrato de caráter regulatório (Soderling, 1990). Além disso, nessa região estão domínios semelhantes a “zinc-fingers” que são especialmente importantes para a ligação a DAG e PMA (Pan e Coleman, 1990; Bell e Burns, 1991; Nishizuka, 1995). Os sítios de ligação ao Ca^{+2} ficam na região C2. A fosfatidilserina, por sua vez, pode se ligar a vários pontos das PKCs (Bell e Burns, 1991; Lee e Bell, 1991). As novas PKCs assim como as PKCs atípicas não possuem sítios para ligação a Ca^{+2} e, assim, não dependem do mesmo para se tornarem ativas (Ohno et al., 1988; McGlynn et al., 1992; Hug e Sarre, 1993).

O domínio catalítico fica na posição C-terminal e é composto pelas regiões C3 e C4 e V3 a V5. Na região C4 fica o sítio de ligação ao substrato assim como o sítio de transferência de fosfato (Nishizuka, 1992; Hug e Sarre, 1993). Em $\text{PKC}\alpha$ há também nessa região uma seqüência para translocação para o núcleo.

A ativação de PKC depende não só da ligação de DAG e Ca^{+2} , mas também da fosforilação da mesma e da sua ligação à membrana plasmática. O ligante de C1 assim

como a fosfatidilserina parecem ser os responsáveis pela manutenção dessa ligação promovendo, assim, a atividade enzimática máxima (Newton, 1995; Pear et al., 1992; Dietrich et al., 1989; Bazzi e Nelsestuen, 1988; Bazzi e Nelsestuen, 1993).

PKC só é ativada quando tanto o domínio C1 quanto C2 são ativados. Quando apenas um dos sítios está ocupado, o sítio C2 fica bloqueado pelo pseudosubstrato e a enzima fica inativa. O DAG, que ativa PKC intracelularmente pode ser produzido de duas maneiras. A primeira dela se dá através da ativação de PLC, que hidrolisa PIP₂ para formar DAG e IP₃. No entanto, o DAG produzido dessa maneira é rapidamente metabolizado, resultando em uma sinalização muito rápida (Nishizuka, 1992). Uma segunda onda de DAG é iniciada com a ativação de PLD (fosfolipase D), que promove a degradação de fosfatidilcolina, produzindo ácido fosfatídico e colina. O ácido fosfatídico é então convertido a DAG pela ação de uma monoesterase. A segunda onda de DAG é mais persistente, podendo estender os efeitos de um fator de crescimento por algumas horas (Nishizuka, 1992, Liscovitch, 1992). A fosfatidilcolina também pode ser convertida diretamente a DAG através de uma PLC específica (Zeisel, 1993).

A atividade de PKC pode ser estimulada por diferentes agonistas. A seguir, será descrito o mecanismos de ação de dois desses agonistas, os quais serão utilizados neste trabalho.

1.5.4. Briostatina e Esteres de forbol

Briostatina, ésteres de forbol e DAG competem pelo mesmo sítio de ligação à PKC. No entanto, embora ésteres de forbol e briostatina aparentemente se liguem ao mesmo sítio, os primeiros têm ação co-carcinogênica ou de promotores de tumor,

enquanto a briostatina tem ação anti-neoplásica. Parece, no entanto, que C1 e C2 se ligam aos dois ligantes com afinidades diferentes e que PKC δ é uma enzima chave, que responde de forma diferente aos dois ligantes.

A briostatina 1 apresenta uma variedade de funções biológicas que incluem estímulo do sistema imune, inibição do crescimento, indução da diferenciação e aumento da sensibilidade a outras drogas (Watters e Parson, 1999).

Os ésteres de forbol, dentre eles o PMA (12-misristato-13-acetato-forbol) exercem dois efeitos antagônicos sobre PKC. Em um primeiro instante, o PMA ativa PKC, através do mecanismo descrito anteriormente. Por outro lado, tratamentos longos com PMA levam a uma inibição da atividade de PKC. Esse fato se deve, provavelmente, à degradação da enzima. As enzimas presentes no citoplasma são degradadas por proteassomas, enquanto aquelas ligadas à membrana plasmática são degradadas via vacúolos ou lisossomos (Kishimoto et al., 1989; Hug e Sarre, 1993, Pryer et al., 1992). As isoformas μ e ζ , no entanto, possuem pouca afinidade a PMA e, por isso, não sofrem inibição pelo mesmo (Chen, 1993; Johannes et al., 1994; Parker et al., 1995; Olivier e Parker, 1992).

Assim como o PMA, a Briostatina I também pode levar a inibição de PKC, que se deve, provavelmente, a ubiquitinação da enzima seguida por sua degradação por proteassoma (Lee et al., 1996; Lee et al., 1997). PKC δ novamente, parece responder de forma, não sendo sensível à degradação induzida por briostatina, mas é sensível a PMA (Keenan et al., 1997). No entanto, ela pode ser inibida por PMA, mas essa inibição é revertida por altas concentrações de briostatina, mesmo na presença de PMA (Lu et

al., 1997). Essa resposta diferenciada de PKC δ pode ser a responsável pelas as respostas diferenciadas aos tratamentos com briostatina e PMA.

PMA também pode se ligar a PKD uma proteína quinase também do tipo serina/treonina, mas que possui estrutura e função distintas em relação a PKC (Valverde et al. 1994).

Além disso, PKC α e β estimulam a atividade de PLD. Por outro lado, os ésteres de forbol demoram mais para serem degradados que DAG, e dessa forma, além de ativarem PKC, eles também estimulam PLD por períodos longos, sendo essa atividade limitada pela degradação de PKC. Assim, pode-se explicar, ao menos parcialmente, alguns efeitos vistos após o tratamento com PMA e que não passam por PKC (Liu e Heckman, 1998; Hedberg et al. 1994).

1.6. Proliferação celular, apoptose e senescência

1.6.1. Proliferação X Mecanismos anti-proliferativos

A homeostase de um organismo é garantida por diversos mecanismos de controle da fisiologia e do metabolismo celular desse organismo. Além disso, o controle do tempo de vida dos diferentes tipos celulares é essencial para o desenvolvimento e sobrevivência dos organismos pluricelulares. Esse controle é mantido através de um equilíbrio dinâmico que controla proliferação e morte ou senescência celular. Durante o desenvolvimento embrionário esse controle é fundamental para o correto desenvolvimento dos diferentes tecidos e órgãos. Por outro lado, no organismo adulto esse controle mantém a homeostase do organismo. Podemos citar como exemplos a constante troca de epitélio que são continuamente agredidos, como a epiderme ou

epitélio do trato intestinal, mantendo assim o tecido saudável. Também são importantes esses mecanismos para processos inflamatórios e de cicatrização. Esse balanço entre mecanismos proliferativos e anti-proliferativos tem ainda um papel fundamental como mecanismo anti-tumoral, uma vez que o crescimento desordenado das células pode trazer conseqüências devastadoras para o organismo como um todo.

Nas próximas seções estudaremos algumas vias envolvidas em mecanismos anti-proliferativos, que serão importantes para a compreensão deste trabalho.

1.6.2. Papel das proteínas da família Bcl-2 na apoptose

A liberação de proteínas da região intramembranar da mitocôndria para o citoplasma exerce um importante papel na ativação da apoptose. Essa liberação ocorre devido a permeabilização da membrana mitocondrial externa, que é regulada por proteínas da família Bcl-2.

Algumas proteínas da família Bcl-2 encontram-se constitutivamente associadas a algumas membranas intracitoplasmáticas (retículo endoplasmático e mitocôndria), enquanto outras se apresentam na forma solúvel, no citoplasma.

As proteínas da família Bcl-2 possuem um ou mais domínios BH (“Bcl-2 homology”) e são divididas em dois grandes grupos, de acordo com o seu papel de ativação ou inibição da apoptose. As proteínas pró-apoptóticas podem apresentar vários domínios BH, constituindo a classe de proteínas multidomínios (representada por Bax, Bak, Bok) ou apenas um, sendo esse último grupo representado pela classe de proteínas “BH3-only”. Alguns membros dessa classe são: Bid e Bim, que ativam diretamente Bax e Bak, e Bad e Bik, que agem indiretamente, inativando Bcl-2 e Bcl-x_L.

A princípio, uma ou mais proteínas do grupo “BH3-only” são responsáveis pela resposta apoptótica a diferentes estímulos. Algumas delas podem ser ativadas por modificações pós-traducionais (ex.: Bim, Bmf) enquanto outras são ativadas por aumento de expressão (ex.: Noxa, PUMA, Hrk) (Kuwana e Newmeyer, 2003) .

A maneira como as proteínas da família Bcl-2 modificam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa ainda não foi totalmente resolvida. Alguns autores acreditam que a permeabilidade é mediada pela abertura de canais aniônicos voltagem-dependente, através da interação com tais proteínas (Tsujimoto et al., 1998). Por outro lado, outros acreditam que as próprias proteínas são capazes de formar um canal, seja através da formação de homomultímeros (Saito et al., 2000; Epand et al., 2002) ou de heteromultímeros com proteínas BH3-only (Kwana et al., 2002). Há ainda trabalhos que mostram que proteínas pró-apoptóticas poderiam desestabilizar a membrana externa (Basanez et al., 1999) ou ainda que a curvatura da membrana mitocondrial é importante para facilitar a formação de poros por Bax (Basanez et al., 2002).

Também não se conhece ainda exatamente mecanismo de ação das proteínas antiapoptóticas, Bcl-2 e Bcl-xL. Há autores que propõem que elas sequestram proteínas BH3-only, co-fatores necessários para a ação de Bax e Bak sobre a permeabilização da membrana mitocondrial externa (Cheng et al., 2001; Kwana et al. 2002). Por outro lado, outros autores argumentam que embora essas proteínas pró-apoptóticas inibam a ação de proteínas BH3-only, elas não interferem com a ligação dessas proteínas aos seus parceiros, Bax e Bak (Ruffolo e Shore, 2003).

Outro mecanismo de apoptose envolve a participação de Ca^{+2} . Nesse caso, o Ca^{+2} é liberado do retículo citoplasmático, causando um sobrecarregamento da

mitocôndria. Dessa forma, ocorre uma transição de permeabilidade, o que faz com que a matriz mitocondrial se torne inchada, resultando na ruptura da membrana mitocondrial externa. Assim, proteínas que estavam no espaço intramembranar são liberadas. Nesse mecanismo, Bcl-2, associada ao retículo citoplasmático, tem papel importante na regulação da liberação do cálcio, evitando a saída do mesmo quando ocorre estímulo de morte por C2-ceramida. Por outro lado, Bax e Bak aumentam a liberação de Ca^{+2} (Nutt et al., 2002; Pinton et al., 2002; Scorrano et al., 2003). Esse mecanismo parece ser particularmente importante nos sinais apoptóticos disparados por ROS (espécies reativas de oxigênio), ceramidas e ácido aracdônico (Nutt et al., 2002; Scorrano et al., 2003).

A liberação de proteínas do espaço intramembranar da mitocôndria no citoplasma, especialmente do Citocromo c (Liu et al., 1996), resulta na ativação de uma cascata de proteases, as caspases, que será descrita a seguir.

1.6.3. Caspases e apoptose

Até o momento, onze caspases já foram descritas para humanos e dez para camundongos (Kumar , 2007). Nem todas elas exercem função apoptótica como, por exemplo, a caspase 1, que está envolvida na maturação do $IL1\beta$ (Thornbery et al., 1992).

As caspases estão presentes nas células na forma de proenzimas, que estão na sua forma inativa e são muitas vezes chamadas de zimógenos de caspases. Após a ativação, a proenzima sofre uma proteólise, que vai resultar em duas subunidades que formam a enzima ativa (Kumar, 2007; Fuentes-Prior e Salvese, 2004). Além disso, as

caspases possuem ainda um prodomínio N-terminal de tamanho variável e que é utilizado para classificá-las em duas classes diferentes: uma em que o prodomínio é longo e uma em que o prodomínio é curto. O prodomínio longo é importante para interação com outras proteínas, exercendo papel no recrutamento dessas proteínas por complexos sinalizadores de morte e está envolvido também com a ativação autocatalítica (Kumar, 2007; Fuentes-Prior e Salvese, 2004). Essas caspases são chamadas inicializadoras, uma vez que fazem a ligação entre a sinalização de morte à execução do processo em si. As principais caspases inicializadoras em mamíferos são as caspases 2, 8, 9 e 10. As caspases que possuem um prodomínio curto não possuem capacidade de auto-ativação e, por isso, requerem ativação por parte de uma caspase inicializadora. (Kumar, 2007). Após se tornarem ativas elas são capazes de clivar vários substratos celulares e, por isso, são chamadas de caspases efetoras (Timmer e Salvesen, 2007). As principais caspases efetoras em mamíferos são Caspase 3, 6 e 7 (Kumar, 2007).

A Caspase-9 está envolvida com a morte celular intrínseca, que é disparada pela mitocôndria e regulada por proteínas das famílias Bcl-2 e BH3-only. Nesse tipo de morte, o Citocromo c é liberado da mitocôndria e assim, ele se liga e facilita a montagem do apoptossomo, que recruta e ativa a Caspase-9. Ativação da Caspase-9 é mediada por Apaf-1. A Caspase-9, ligada ao apoptossomo agora ativa a Caspase-3, uma caspase efetora (Kumar, 2007).

A Caspase-8, por sua vez, é a mediadora da morte celular extrínseca, disparada por membros da família TNF. Após a ativação dos receptores de morte por membros da família TNF, a Caspase-8 é recrutada ao complexo DISC ("death-inducing signalling

complex” ou complexo sinalizador indutor de morte), através da proteína adaptadora FADD. Assim, a Caspase-8 se torna ativa, ativando em seguida a Caspase-3, o que resulta em morte celular (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996; Kang et al., 2004).

A Caspase-3 é a principal caspase efetora e ela é ativada por proteólise mediada pelas Caspase-8 ou -9. A Caspase-3 é a principal responsável pela quebra dos substratos celulares durante a apoptose. A Caspase-7 é muito semelhante a Caspase-3, tanto em estrutura quanto em função (Porter e Janicke, 1999; Fuentes-Prior e Salvese, 2004).

Algumas caspases, embora bastante estudadas, não possuem uma função fisiológica muito bem definida, portanto, as mesmas não serão exploradas nessa revisão bibliográfica. São elas Caspase-2 e -10, que são estruturalmente semelhantes a Caspase-9 e -8, respectivamente, e também Caspase-6, que é estruturalmente semelhante a Caspase-3 e -7.

1.6.4. Senescência

O fenômeno hoje conhecido como senescência replicativa foi primeiro observado por Hayflick e Moorhead em 1961, quando notaram que fibroblastos humanos quando cultivados *in vitro*, apresentavam uma quantidade de replicações limitadas. Essas células, após um determinado período em cultura, paravam de se multiplicar e apresentavam uma morfologia diferenciada, caracterizada por alargamento e achatamento. Elas células podiam permanecer em cultura por longos períodos sem apresentarem sinais de morte celular. Sabe-se hoje que esse processo representa um

mecanismo mais geral de bloqueio estável e irreversível do ciclo celular, denominado senescência celular.

Algumas características de uma célula senescente são: a) bloqueio do crescimento na fase G1 (não entram em S mesmo quando na presença de mitógenos); b) alguns genes responsivos a mitógenos se mantêm responsivos, porém outros, necessários para a proliferação são bloqueados; c) mudanças seletivas de função; d) mantêm-se metabolicamente ativas e resistem a apoptose por longos períodos de tempo (Stanulis-Praeger, 1987; Goldstein, 1990).

A senescência do tipo replicativa, descrita por Hayflick e Moorhead (1961), é causada, primariamente, pelo encurtamento dos telômeros, que resulta em uma resposta de dano ao DNA, ativando p53 (Itahana et al., 2004). Esse fenômeno é denominado senescência intrínseca e é observado em culturas primárias de fibroblastos humanos. Acredita-se que esse mecanismo ocorra também *in vivo* e seria o responsável pelo bloqueio da replicação, de forma a evitar que os telômeros adquiram um tamanho crítico, o que favoreceria a instabilidade cromossômica, gerando mutações e possivelmente, transformação neoplásica. Acredita-se também que o processo de senescência celular seja o responsável pelo envelhecimento celular (e tecidual) que ocorre *in vivo*.

Culturas primárias de fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) também apresentam um número finito de replicações e apresentam o fenótipo de senescência após o seu tempo de vida útil (replicativo). Entretanto, os camundongos de laboratório apresentam um telômero maior e muitas de suas células somáticas expressam a telomerase, enzima responsável pela síntese do telômero, que garante a

manutenção do tamanho do mesmo (Sherr e DePinho, 2000; Wright and Shay, 2000). Portanto, o mecanismo que dispara a senescência em MEFs é diferente do que é observado para fibroblastos humanos, ou seja, não é dependente do encurtamento de telômeros, e sim de fatores extrínsecos, muito provavelmente devido a danos oxidativos (Itahana et al., 2004).

Sabe-se que células senescentes apresentam maior atividade de p53 (Atadja et al., 1995; Itahana et al., 2002), e de p21, um alvo direto de p53 (Noda et al., 1994). De fato, o nocaute de p21 em fibroblastos humanos é suficiente para evitar a entrada em senescência (Brown et al., 1997). Uma das possíveis proteínas responsáveis pela sinalização para p53 é ATM quinase, que parece estar envolvida no reconhecimento de telômeros danificados e, assim, fosforilar p53 que, dessa forma, pode disparar o processo de senescência. Outra proteína envolvida é p14/ARF (ou p19/ARF em camundongos), que estabiliza p53, via MDM2 (Pomerantz et al., 1998; Zhang et al., 1998). Entretanto, há evidências de que o efeito de ARF pode ser independente de p53, MDM2 e p21 (Korgaonkar et al., 2002).

Até o momento, foi descrito o que ocorre em casos de senescência intrínseca, ou aquela provocada pelo encurtamento dos telômeros. Por outro lado, sabe-se que fatores externos podem desencadear um processo de senescência cujo mecanismo molecular varia, mas de fenótipo semelhante. Dentre alguns fatores que podem contribuir para a senescência extrínseca podemos destacar irradiação por raios X ou UV, espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de certos tipos de oncogenes e genes supressores de tumor. Esse tipo de senescência ocorre quando a célula ainda

possui telômeros funcionais e potencial para se multiplicar em condições normais de cultura (Itahana et al., 2004).

Atualmente, a senescência celular é vista também como mecanismo de supressão de tumor, uma vez que ela previne a instabilidade cromossômica causada pelo encurtamento dos telômeros. Ela também pode ser disparada por diferentes estímulos, que não estão relacionados ao encurtamento dos telômeros, dentre os quais podemos destacar danos ao DNA, remodelamento da cromatina e estímulos hipermitogênicos. Esses fatores determinam a senescência do tipo extrínseca. Esses estímulos têm em comum o fato de causar danos que podem, potencialmente, causar um desequilíbrio no controle do ciclo celular e, assim, contribuir para a formação de tumor.

Gostaríamos de destacar a senescência induzida por fatores hipermitogênicos, especialmente aquela causada pelo oncogene Ras. Conforme demonstrado por Serrano e colaboradores (1997), a expressão de Ras constitutivamente ativado (H-Ras-V12) em culturas primárias de fibroblastos humanos e de camundongos leva a uma alteração na morfologia dessas células, que se tornam achatadas e mais espalhadas, mas que não se descolam da placa. Paralelamente, a proliferação celular diminui assim como a incorporação de BrdU, indicativa da diminuição da síntese de DNA ou bloqueio da entrada na fase S, indicando que as células ficam bloqueadas na fase G1. Por outro lado, os autores observam também um aumento na expressão de p53, p21 e p16. Concomitantemente, ocorre também um declínio na atividade de ciclina A e CDK2 e aumento da atividade repressora de pRB, que permanece na forma hipofosforilada. Os autores mostram também aumento da atividade de β -galactosidase nas células

transformadas por H-Ras-V12, um indicativo de senescência, conforme mostrado na seção abaixo (Dimri et al., 1995). Assim, os autores concluem que a atividade constitutiva de Ras em culturas primárias humanas e de camundongos dispara um processo de senescência celular. Os autores mostram, ainda, que atividade diminuída de p53 e p16 em fibroblastos de camundongos e ratos é capaz de proteger essas células contra a senescência induzida por Ras. O mesmo, entretanto, não é verdadeiro para os fibroblastos humanos, indicando que a senescência disparada por Ras é dependente de p53 e p16 em fibroblastos de roedores, mas não em fibroblastos humanos (Serrano et al., 1997).

O estudo de Lin e colaboradores (1998) demonstra que a senescência induzida por Ras, é mediada, ao menos parcialmente, pela atividade constitutiva da via de MAPK, desencadeada pela presença de Ras constitutivamente ativo. Essa é a mesma via responsável pela transformação celular induzida por Ras. Assim, os autores propõem que mecanismos anti-tumorigênicos ou de transformação celular são disparados concomitantemente quando na presença de Ras constitutivamente ativo e a escolha entre um caminho ou o outro depende da presença ou ausência de proteínas repressores de tumor, como p53 e p16/p19.

Recentemente, um importante estudo mostrou que a senescência induzida por Ras é dependente da quantidade de Ras expressa pela célula (Sarkisian et al., 2007). Utilizando-se de modelos celulares provenientes de glândulas mamárias de camundongos transgênicos, os autores mostram que a baixa expressão de Ras constitutivamente ativado promove a proliferação celular, mas não é suficiente para tornar as células transformadas. Quando os autores aumentam o nível de expressão de

Ras, eles mostram que a célula agora passa a apresentar marcadores indicativos de senescência celular. Essas células permanecem com o ciclo celular bloqueado indefinidamente e entram em apoptose após a expressão de Ras ser “desligada”. Por outro lado, alguns tumores aparecem após a indução da expressão de baixos níveis de Ras. Os autores observam, no entanto, que as células desses tumores passam a expressar Ras em um nível mais alto, porém, essas células possuem defeitos em proteínas envolvidas com a indução da senescência, p53 e Ink4a-ARF. Assim, os autores mostram a que a promoção do caráter transformado por Ras necessita de 3 etapas, a primeira consiste na proliferação induzida pela expressão de baixos níveis de Ras constitutivamente ativo. No entanto, para que essa proliferação se torne descontrolada e resulte no surgimento de um tumor, é necessário que Ras passe a ser expresso em altos níveis (2ª etapa) e que a célula burle seu “sistema de segurança” (3ª etapa), que, do contrário, levaria a célula a entrar em senescência e impediria o crescimento e avanço desse tumor (Sarkisian et al., 2007).

1.6.5. Senescência e beta-galactosidase

As células senescentes apresentam uma baixa marcação nuclear com timidina marcada radiotivamente, ³H-Timidina, visto que as mesmas não mais replicam o DNA. Entretanto, essa marcação é de difícil manipulação *in vivo*. Assim, Dimri e colaboradores (1995) desenvolveram um método para marcação de células humanas senescentes *in vitro* e *in vivo*, que mais tarde passou a ser utilizado como um marcador geral de senescência (Serrano et al., 1997, Bodnar et al., 1998, Ramirez et al., 2001) Nesse trabalho, os autores utilizam-se de dois artifícios para diferenciar células

senescentes de células jovens e pré-senescentes. Eles mostram, fazendo-se o uso de duas marcações diferentes, incorporação de timidina tritiada e atividade de β -galactosidase no pH 6, que é possível diferenciar esses tipos celulares. Eles mostram que, em geral, células que têm marcação para timidina não tem atividade de β -gal em pH 6, somente no pH 4, que é a enzima lisossomal, presentes em todas as células. Por outro lado, a medida em que a cultura envelhece, as células deixam de incorporar timidina e passam a apresentar uma alta atividade da β -gal em pH 6. Nesse trabalho, os autores mostram também que a marcação para β -gal, pH 6, está relacionada à idade replicativa ou fisiológica da célula, e não necessariamente, à idade cronológica do doador. Os autores mostram ainda que a atividade de β -gal, pH 6, não é detectada em células saudáveis, em estado quiescente, seja por privação de soro ou inibição de contato, nem em células imortalizadas. Por último, os autores mostram que é possível marcar células senescentes *in vivo*, a partir de amostras de pele de diferentes indivíduos em diferentes idades. Eles mostram que marcação, tanto na derme quanto epiderme, só é positiva para indivíduos em idade avançada (acima de 69 anos).

Embora os autores deixem claro que desconhecem a razão pela qual a atividade β -gal em pH 6 esteja aumentada, eles propõem que esse efeito seja devido a um aumento de atividade da β -gal lisossomal, que costuma estar associado a senescência. Assim, parte da proteína poderia ainda estar ativa em pH 6.

1.7. Oncogenes Ras

1.7.1. Via de Ras/MAPK

A ativação de receptores do tipo tirosina quinase, dos quais fazem parte os receptores de FGF2, recruta a proteína Grb2, que se liga ao mesmo através do domínio SH2. A proteína Grb2 ativa por sua vez, a proteína Sos, um fator de troca de nucleotídeos G (GEF), através da ligação ao seu domínio SH2 e trazendo Sos para a membrana citoplasmática que, dessa forma, entra em contato com Ras e pode ativá-lo. Dessa forma, Sos estimula a atividade da proteína Ras, catalizando a troca do GDP, inicialmente ligado à mesma, por GTP. Após sua ativação, Ras passa a interagir com uma série de proteínas disparando diferentes cascatas de sinalização como as que passam pelas proteínas Raf e PI3K. Raf por sua vez faz parte de uma cascata de sinalização composta basicamente por proteínas quinases. Assim, Raf ativa MEK (MAPKK), que por sua vez ativa MAPK (ERK). A ativação de ERK resulta na fosforilação de uma série de substratos citoplasmáticos e ligados à membrana e então ERK é rapidamente translocada para o núcleo, onde vai ativar a transcrição de diferentes fatores de transcrição necessários para dar início ao ciclo celular (Schlessinger, 2000).

1.7.2. Proteínas Ras e câncer

A proteínas da família Ras são freqüentemente encontradas mutadas em cânceres humanos. A maior incidência é encontrada em tumores do pâncreas exócrino, onde mais de 80% dos casos apresentam mutações no gene K-ras. Em carcinomas de

colon, carcinomas foliculares e carcinomas indiferenciados da tireóide são encontradas mutações em uma das proteínas Ras em cerca de 50% dos casos (Bos, 1989).

Alguns tumores apresentam um dos genes da família preferencialmente mutados. Como exemplo temos os carcinomas de pulmão, pâncreas e colon, em que o gene preferencialmente mutado é o K-ras. No caso do carcinoma de colon, esse gene pode ser encontrado mutado nos três estágios de desenvolvimento do tumor, sendo principalmente encontrado na forma mutada nos estágios 2 e 3 (50% dos casos). Em pólipos benignos (estágio 1) as mutações são relativamente raras (menor que 20%). Esse fato pode ser interpretado de duas formas: a) as células que possuem a mutação serão aquelas que são importantes para a progressão da doença; b) a mutação de Ras é um evento vantajoso para a fase inicial do tumor, permitindo sua expansão e, posteriormente, sua transformação maligna (Bos, 1989).

O gene K-ras também aparece mutado em 30% dos casos de adenocarcinoma de pulmão, sendo todas as mutações encontradas no códon 12 (Bos, 1989). Parece haver, nesse caso, uma relação entre o uso de cigarro e mutação em K-ras (Rodenhuis, et al., 1988). No caso dos adenocarcinomas de pâncreas exócrino, o K-ras é encontrado em quase 90% dos casos. Em todos eles a mutação se dá no códon 12 e esse tumor é de péssimo prognóstico, com taxa de mortalidade próxima de 100% e taxa de sobrevivência por 5 anos menor que 5% (Eckel et al., 2006)

Outros tipos de cânceres, por sua vez, apresentam mutações nas diferentes proteínas da família Ras. Temos como exemplo os casos de melanoma, que apresentam 20% dos casos com mutações em N-ras. Nas desordens mielóides,

observamos uma taxa de mutação em ras em 1/3 dos casos, nos quais , as mutações podem afetar qualquer um dos genes da família ras (Bos, 1989).

De forma geral, conclui-se que as mutações em Ras estão associadas especialmente com cânceres hematológicos derivados de células de origem mielóide assim como em carcinomas, especialmente adenocarcinomas. Por outro lado, essas mutações não são importantes para o desenvolvimento de tumores de origem neuroectodérmica e malignidades de origem linfóide (Bos, 1989).

Embora tenha sido observado que mutações em Ras são capazes de levar a transformação celular, sabe-se que a amplificação do mesmo também pode resultar em um fenótipo semelhante. Pulciani e colaboradores (1985) descrevem a transformação celular de células NIH-3T3 pela inserção de múltiplas cópias do proto-oncogene H-ras nessas células. Eles mostram também que amplificação de K-Ras pode ser encontrada em amostras de tumores humanos. Por outro lado Chang e colaboradores (1982) mostram também que a superexpressão do proto-oncogene H-Ras dirigida por um promotor forte é suficiente para transformar células de camundongos. Além disso, Schwab e colaboradores (1983) mostraram que as células Y1 derivadas de um tumor do córtex da adrenal de camundongo carregam uma amplificação do gene K-ras, provavelmente responsável pela gênese e/ou manutenção desse tumor.

O trabalho de Lim e Counter (2005) mostra, de forma muito elegante, o papel da proteína Ras no desenvolvimento e progressão de tumores. Através de uma série de construções e animais transgênicos que expressam a proteína Ras de forma induzível e uma combinação dessa construção com construções em que as diferentes vias ativadas por Ras estão constitutivamente ativadas (são elas: via de ERK, via de

PI3K/Akt e via de RalGEF), eles demonstram que a proteína Ras é essencial para a iniciação de um tumor mas, uma vez o tumor estabelecido, Ras e as vias de ERK ou RalGEF não são mais necessárias. Portanto, a manutenção de um tumor formado a partir da atividade descontrolada de Ras é garantida apenas com a atividade da via de PI3K/Akt. Dessa forma, os autores demonstram o importante papel de Ras na formação do tumor e da via de PI3K/Akt na sua manutenção.

1.7.3. Fosforilação de K-Ras por PKC leva a apoptose

A proteína K-Ras pode ser encontrada em duas isoformas diferentes, as quais são denominadas K-Ras 1 (ou 4A) e K-Ras 2 (ou 4B), devido ao “splicing” alternativo do mRNA (Capon et al., 1983; George et al., 1985; McGrath et al., 1983; Shimizu et al., 1983). A isoforma mais abundante de K-Ras (2 ou 4B) encontra-se ancorada à membrana plasmática através de modificações pós-traducionais que incluem lipídeos associados, os quais se inserem na bicamada lipídica, e uma região rica em aminoácidos básicos, ou região polibásica, localizada na porção C-terminal, a qual interage com as cabeças polares dos fosfolipídios de membrana (Leventis and Silvius, 1998). Dentro da região polibásica de K-Ras encontram-se 3 sítios potenciais para fosforilação (resíduos de serina). Por outro lado, sabe-se que essa região polibásica é fosforilada por PKC (Ballester et al., 1987). Assim, Bivona e colaboradores (2006) hipotetizaram que a fosforilação da região polibásica de K-ras poderia regular a sua interação com a membrana plasmática, uma vez que a carga negativa do fosfato adicionado iria desestabilizar a interação com as cabeças polares dos lipídeos de membrana, através de um mecanismo que eles denominaram de “farnesyl-electrostatic

switch”, em analogia ao “myristoil eletrostatic switch”, descrito anteriormente, que ocorre em proteínas MARCKs (McLaughlin and Aderem, 1995).

Nesse trabalho, Bivona e colaboradores (2006) mostram que um agonista de PKC (briostatina) induz translocação de K-ras para membranas intracelulares e que esse efeito é específico para a ativação de PKC uma vez que um tratamento prévio com um inibidor de PKC inibe essa translocação. Esse mecanismo é dependente da ativação de K-Ras, ou seja, o mesmo deve estar na forma K-Ras-GTP. O efeito é também dependente da fosforilação do sítio S181, presente na região polibásica. Esse mecanismo é reversível, consistente com o modelo proposto de “farnesyl-eletostatic switch”. Por outro lado, eles mostram também, que essa migração não é possível para outras proteínas da família tais como H-Ras e Rac.

Eles mostram também que K-Ras interage, na membrana mitocondrial externa, com a proteína Bcl-x_L, e isso ativa a via apoptótica, resultando em massiva morte celular. Também fica demonstrado que o tratamento com briostatina inibe formação de colônias em meio semi-sólido assim como limita o crescimento de tumores com K-Ras ativado com a região polibásica selvagem, mas não com a região polibásica mutada no sítio de PKC (S181 para A 181).

Desse trabalho, conclui-se que: a) K-Ras é alvo direto de PKC e sua translocação é mediada pelo sítio S 181; b) sua fosforilação é necessária e suficiente para provocar a translocação de K-Ras; c) internalização de Ras para a MME é necessária e suficiente para promover apoptose, mas Ras tem que estar ativado; d) Bcl-x_L é necessária para indução de apoptose por K-Ras.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Desvendar os mecanismos moleculares pelos quais FGF2 dispara senescência e inibe proliferação celular em células murinas transformadas por Ras e altamente refratárias a apoptose.

2.2. Objetivos Específicos

- Seleção e caracterização fenotípica de clones resistentes a FGF2 a partir das linhagens celulares de camundongo Y1 de células adrenocorticais malignas e 3T3-B61 de fibroblastos transformados pelo oncogene humano H-ras-V12.
- Seleção e caracterização fenotípica de sublinhagens clonais de células Y1 resistentes ao miristato-acetato de forbol (PMA).

2.3. Resumo dos Motivos principais que fundamentaram a escolha destes objetivos

Costa (2005), em sua tese de Doutorado, observou os seguintes resultados: a) somente 50% dos camundongos Balb/c Nude inoculados com células Y1 e injetados com FGF2 desenvolveram tumores, mas sublinhagens derivadas desses tumores se mostraram tão ou mais sensíveis a FGF2 que a linhagem parental, sugerindo que durante o desenvolvimento desses tumores não houve seleção de clones Y1 resistentes a FGF2; b) ensaios clonogênicos mostraram que uma porcentagem relativamente alta de células Y1 sobreviviam a 24h de FGF2; mas, colônias sobreviventes coletadas geraram sub-linhagens cujo fenótipo de resistência a FGF2 era instável, revertendo ao padrão de sensibilidade a FGF2 da linhagem parental. Dado

Objetivos

o enorme interesse potencial do fenômeno de indução de senescência por FGF2 em células malignas altamente refratárias a apoptose, tornou-se muito atraente estudar a seleção de células Y1 resistentes ao FGF2, dadas as seguintes razões:

1. Sabidamente, células malignas são geneticamente muito instáveis, o que leva ao rápido aparecimento de resistentes a drogas terapêuticas em testes de cultura e animais de laboratório e, também, no tratamento de pacientes com câncer. As observações de Costa (2005) citadas acima não se ajustavam bem a esse modelo, sugerindo que o surgimento de resistentes a FGF2 em populações de Y1 era diferente e merecia ser estudado a fundo. Esse raciocínio levou à exploração de protocolos para seleção e isolamento de clones Y1 resistentes a FGF2 em cultura.

2. Classicamente, em genética microbiana seleção e caracterização de mutantes resistentes a substâncias tóxicas foram abordagens extremamente profícuas, também aplicadas com sucesso em genética somática de células de mamífero em cultura. Por outro lado, apesar de o fenômeno de inibição de proliferação por FGF2 ter sido visto por múltiplos laboratórios em diferentes tipos de células, não temos notícia de que a abordagem de seleção de resistentes a FGF2 tenha sido alguma vez explorada. Por tudo isso aplicamos conceitos e procedimentos clássicos à seleção de resistentes a FGF2 associados às técnicas analíticas atuais da chamada genética reversa.

3. Os resultados iniciais desta abordagem foram suficientemente intrigantes e promissores para estimular o desenvolvimento de um projeto mais ambicioso. Conforme os resultados descritos nesta tese, esta abordagem foi muito bem sucedida revelando muitos dados inesperados, cuja interpretação sugerem mecanismos de grande relevância teórica e prática para a biologia celular de células malignas dependentes dos oncogenes ras.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Anticorpos

K-Ras (F234) – Santa cruz

H-Ras (C20) – Santa Cruz

ERK 1/2 total (9102) – Cell signaling

ERK 1/2 fosforilada – Thr202, Tyr 204 (9101L) – Cell signaling

Anti-rabbit e anti-mouse (conjugados com peroxidase de “horseradish”) –

GE Health Care

3.1.2. Meio, soro e soluções para cultura de células de mamífero

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Médium (Invitrogen) + 1,2g/ml NaHCO₃.

FCS - Fetal Calf Serum – Cultilab.

PBS - KCl 2,7mM, NaCl 137mM, Na₂PO₄ anidro 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM, CaCl₂.2H₂O 0,68mM e MgCl₂.6H₂O 0,49mM (pH 7,2).

PBSA - NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂PO₄ anidro 8mM, KH₂PO₄ 1,5mM.

Tripsina - solução 0,1% em PBSA e 1 mM de EDTA.

3.1.3. Soluções Tampões, fixadores e corantes

Fixador para ensaio de β -galactosidase associada à senscência – 2% formaldeído, 0,2% glutaraldeído.

Corante Ponceau - 0,1% Ponceau, 10% ácido acético glacial.

MOPS (5X) – 200mM MOPS, 50mM NaAc, 5mM EDTA, pH7,0.

Materiais e Métodos

Solução corante para ensaio de β -galactosidase – 1 mg/ml 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactosídeo (X-gal) (solução estoque: 20 mg/ml em dimetilformamida), 40 mM ácido cítrico/fosfato de sódio pH 6,0, 5 mM ferricianeto de potássio, 5 mM ferrocianeto, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂.

TBST - 10mM Tris base pH8,0, 150mM NaCl, 0,2% Tween-20.

Tampão de amostra para RNA – 10% formaldeído, 50% formamida, 10% glicerol, 2 mM EDTA, 0,025% azul de bromofenol, 0,025% xileno cianol, 1X MOPS.

Tampão de transferência para SDS-PAGE – 25 mM Tris-base, 0,2 M glicina, 20% metanol (pH 8,5).

Tampão de corrida para SDS-PAGE - 25m M Tris-base, 250 mM glicina, 0,1% SDS, pH 8,3.

Tampão de lise “RIPA” – 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% deoxicolato de sódio, 1% NP-40, 0,1% SDS.

Tampão de amostra para proteína (2X) – 100 mM Tris-HCl, 200 mM ditiotreitol, 4%SDS, 0,2% azul de bromofenol, 20%glicerol.

3.1.4. Reagentes diversos, kits e outros materiais

Applied Biosystems

- SYBR green

Baker

- Ácido cítrico

Bio Rad

- Bradford

GE Health Care

- Membrana de Nitrocelulose Hybond-C Extra
- Kit “ECL Western Blot Enhanced Chemiluminescence”

Gibco/Invitrogen

- Agarose
- DMEM
- Geneticina
- Glicina
- Bisacrilamida

Kodak

- Filme para Raio-X
- Revelador
- Fixador

Invitrogen

- Acrilamida
- DNase I
- Super Script III (Transcriptase reversa)
- Trizol

Merck

- Acido acético glacial
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Etanol
- Formaldeído em solução (37%)

Materiais e Métodos

- Formamida
- Glutaraldeído
- Glicerol
- HCl
- KCl
- KH_2PO_4
- NaCl
- NaHCO_3
- Na_2PO_4 anidro
- Metanol
- MgCl_2 .
- Ponceau
- SDS (ácido dodecil sulfato)
- Tween-20
- Violeta genciana

Riedel

- Acetato de sódio

Sigma

- Azul de bromofenol
- Ampicilina
- Brometo de etídeo
- Briostatina I
- Brometo etídeo

- Deoxicolato de sódio
- DTT (Ditiotreitol)
- EDTA
- MOPS
- NP-40
- PMA (miristato-acetato de forbol)
- Soro-Albumina Bovina (BSA)
- Tris base
- X-Gal
- Xileno cianol

3.1.5. Inibidores enzimáticos

Inibidores de proteases: Sigma

- Aprotinina (2 µg/ml)
- Leupetina (2 µg/ml)
- Pepstatina (2 µg/ml)
- PMSF (1 mM),
- DTT (ditiotreitol) (1 mM)

Inibidor fosfatase: Sigma

- Ortovanadato de sódio (1 mM)

Inibidores de quinases de vias de sinalização

Inibidor de PKC:

Calbiochem

- Bisindolylmaleimide I 10 μ M

Sigma

- Gö 6983 10 μ M

3.1.6. Fatores de crescimento

Sigma

- FGF1, FGF4, FGF5

Laboratório

- FGF2 (recombinante, produzido e purificado no laboratório do Prof. Ângelo Gambarini, IQ-USP)

3.1.7. Primers

Gene	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	Fragmento (pb)
Hprt1	GTTGGATATGCCCTTGA CTATAATGAG	GGCTTTGTATTTGGCTTT TCCAG	90
H-Ras (h)	GGCCCCTGAGGAGCGA T	CACAAAATGGTTCTGGA TCAGCT	102

3.1.8. Equipamentos

Amersham biosciences

- Espectrofotômetro UV/visível - Ultraspec 3100 pro

Applied biosystems

- AB 5700
- Software – SDS 5700

Biorad

- Cuba de transferência - Transblot

Eppendorf

- Microcentrífugas

Forma Scientific

- Estufas de CO₂ para cultura de células

Nikon

- Microscópio óptico de fluorescência (Nikon Fluophot)
- Microscópio invertido - Diaphot

3.2. Métodos

3.2.1. Cultura de Células

As células foram cultivadas em meio DEM suplementado com 10% SFB. A subcultura era realizada, suspendendo-se as células em uma solução de tripsina. O meio de cultura era renovado a cada 2 ou 3 dias. As células foram utilizadas entre a 3^a e a 20^a passagem.

Nesta tese utilizamos células adrenocorticais de camundongos, Y1 (Yasumura et al., 1966) e também o clone Y1-D1G, transfectado com o vetor psVK3D1 juntamente

Materiais e Métodos

com um marcador genético (neo), que foi mantido em meio seletivo 10% SFB-DME, adicionado de 100 µg/ml G418.

Também utilizamos células Balb/c 3T3, clone A31, que é uma linhagem imortalizada de fibroblastos embrionários de camundongo, não tumorigênica (Aaronson e Todaro, 1968). Além disso, utilizamos a sublinhagem Balb/c-B61, que é derivada de Balb/c 3T3, transformada com oncongene EJ-Ras humano (H-Ras-V12), que foi inserido juntamente com um marcador genético (neo) (Armelin et al., 1988; Kovary et al., 1989). Esta sublinhagem foi mantida em meio seletivo 10% SFB-DME, adicionado de 100 µg/ml G418.

Para o carenciamento para soro, as células eram plaqueadas, e deixadas em repouso por 24 h. Após esse período, o meio contendo 10% SFB é removido e lavado com uma vez com PBSA e uma vez com meio DME sem SFB. As células são então mantidas em meio DME sem SFB por 48 h. Dessa forma, as células são sincronizadas nas fases G0/G1 e se mantêm viáveis e responsivas aos diferentes tratamentos.

3.2.2. Ensaio clonogênico (substrato sólido)

Para verificar a sensibilidade das linhagens estudadas a FGF2 e PMA, realizamos ensaios clonogênicos. Nesse ensaio as células são contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal e plaqueadas em baixa densidade (100 a 500 células por cm²) em meio de cultura completo (DMEM + 10% FCS). O FGF2 (2ng/ml) é adicionado imediatamente após o plaqueamento das células e deixado por 24 horas, quando então a placa é lavada com meio soro e um meio fresco contendo 10% FCS é adicionado.

Materiais e Métodos

Para células Balb/c e B61 também foram utilizados os FGFs recombinantes 1, 4 e 5 na concentração de 2 ng/ml.

O tratamento com PMA foi realizado seguindo-se dois diferentes protocolos. No protocolo de 24 h a droga era adicionada imediatamente após o plaqueamento, deixada por 24 h, quando então o meio era removido, lavado e trocado. No protocolo de 2 h, as células foram contadas e plaqueadas, deixadas em repouso por 4 h, quando então o PMA foi adicionado e deixado por 2 h. Após esse período, o meio foi removido, lavado e trocado por meio fresco. Paralelamente, também são plaqueadas células controle que não recebem nenhum tratamento, mas são lavadas e o meio é trocado juntamente com as células tratadas. Para o ensaio em que foram utilizados inibidores de PKC, eles foram adicionados imediatamente após o plaqueamento e o PMA só foi adicionado 1 hora após o início do tratamento com os inibidores. A quantidade de PMA variou entre 2 a 10 ng/ml nos ensaios de 24 h com e sem inibidores e foi de 10 ng/ml nos ensaios de 2h. Além do PMA foi utilizado um segundo ativador de PKC, Briostatina I, que foi utilizado na concentração de 100 μ M por 24 h.

Após o período de tratamento, o meio das placas foi trocado e então foi renovado a cada 3 ou 4 dias até o aparecimento de colônias visíveis a olho nu, cerca de 15 dias após o plaqueamento. As colônias são então fixadas com 3,7% paraformaldeído (15 min), coradas com violeta genciana (10 min) e contadas. Cada condição é realizada em triplicata.

3.2.3. Ensaio de Proliferação Celular

Nesse ensaio são plaqueadas $2,5 \cdot 10^4$ ou $5 \cdot 10^4$ células por placa (P35). Para cada condição, as células foram contadas em duplicata, por 4 vezes em dias alternados, portanto num total de 8 placas por experimento. Após o plaqueamento as células são mantidas em repouso por 24 h. Após esse período, as células de duas placas são tripsinizadas e contadas em hemocitômetro (Câmara de Fuchs-Rosenthal) para estabelecer o número de células/placa no dia 0. Nesse dia também são acrescentadas as drogas de interesse, FGF2 (2 ng/ml), PMA (10 ng/ml) ou uma combinação de ambas. O tratamento é sustentado, ou seja, as drogas são novamente adicionadas cada vez que o meio de cultura é trocado, a cada dois dias. As células são tripsinizadas, suspendidas em PBS e então contadas nos dias 1, 3, 5 e 7.

3.2.4. Ensaio de crescimento em suspensão de agarose

Para que as células cresçam em suspensão a primeira etapa é isolar o fundo da placa com uma agarose “dura”, para evitar que as células adiram no fundo da placa. Para isso, uma solução de agarose 1,2% em água destilada é diluída em meio DME 2 vezes concentrado contendo 20% FCS, gerando uma solução de agarose 0,6% em DME + 10% FCS.

Após a tripsinização e contagem das células, elas foram suspensas em uma matriz de meio semi-sólido contendo 0,3% agarose dissolvida em meio DME + 10% SFB, o qual é preparado a partir de soluções estoque de 0,6% agarose e DMEM 2 vezes concentrado + 20% SFB. Tanto o meio de cultura concentrado quanto a solução estoque de agarose são mantidos a 42°C e são misturados imediatamente antes do

Materiais e Métodos

uso. As células são contadas, suspendidas no meio semi-sólido e plaqueadas, variando de 300 a 5000 células por cm^2 . O ensaio é realizado em placa com 6 poços, sendo utilizados 3 poços para cada condição. A droga que se deseja estudar é acrescentada à suspensão de células imediatamente antes do plaqueamento. Após 24 h, o meio líquido (10% SFB-DME) é colocado sobre o meio semi-sólido e esse meio líquido é renovado três vezes por semana. Nos poços correspondem à condição tratada, a substância cujo efeito se deseja estudar é também adicionada, diluída no meio líquido. Assim, o tratamento é mantido sustentado durante todo o período experimental. Neste trabalho foram realizados tratamentos com FGF2 (20 ng/ml) e PMA (20 ng/ml).

As células são crescidas por 4 a 5 semanas até que apareçam colônias visíveis a olho nu. Elas são então fixadas com 3,7% formaldeído, coradas com violeta genciana e contadas.

3.2.5. Isolamento de clones resistentes

Nesta tese foram a isolados clones a partir da linhagem Y1 resistentes a FGF2 e PMA. Também foram isolados clones resistentes a FGF2 derivados de Y1-D1G. As concentrações usadas foram: FGF2 – 2 ng/ml e PMA – 10 ng/ml e o tratamento foi mantido sustentado conforme será explicado abaixo. O isolamento de clones resistentes a FGF2 derivados de B61 foram realizados em duas etapas. O clone B61-FR4 foi isolado anteriormente em nosso laboratório e seguiu o protocolo descrito em Costa, 2005. O clone B61-FRA foi isolado pela aluna Marianna Koga, com tratamento de FGF2 a 10 ng/ml, com tratamento sustentado.

Materiais e Métodos

Para o isolamento de clones resistentes as células foram plaqueadas em média densidade, sendo que a quantidade de célula variou em função do tipo celular estudado e do tratamento utilizado. Assim, para células Y1 foram plaqueadas 640 células/cm² para o isolamento de clones resistentes a FGF2 e 3.10³ células/cm² para o isolamento de clones resistentes a PMA. As células Y1-D1G também foram plaqueadas na densidade de 3.10³ células/cm² para a seleção de resistentes a FGF2. Todas as células foram plaqueadas em triplicata.

Após o plaqueamento, as células foram mantidas em repouso por 24 h, quando foi adicionado o tratamento (FGF2 ou PMA). O meio de seleção era renovado três vezes por semana, mantendo-se os tratamentos desejados. Após 24 h do início do tratamento já se observava uma intensa morte celular e também durante os próximos dias, até que começaram a surgir colônias derivadas de células resistentes. Após 15 a 20 dias foi possível isolar clones derivados de tais colônias. Para isso, o meio retirado, a placa foi então lavada com PBSA e as colônias escolhidas foram isolados com anéis de clonagem. Elas foram tripsinizadas e passadas para uma placa de 12 poços, sendo que cada poço recebeu células de apenas uma colônia, ou clone. Essas células foram expandidas ainda na presença do agente seletivo e uma alíquota foi separada para posteriores estudos, enquanto outra alíquota foi congelada.

Os clones de Y1 resistentes a FGF2 foram denominados Y1-FR (FGF2-resistentes). Em uma primeira seleção foram isolados 127±15 clones, sendo que apenas 1 permaneceu saudável e foi congelado. Em uma segunda seleção foi possível isolar mais dez clones (Tabela 1 – Resultados).

Os clones de Y1 resistentes a PMA foram denominados Y1-PR (PMA-resistentes). Em uma primeira seleção foi possível obter apenas um clone saudável, que foi congelado. Na segunda seleção foram obtidos mais sete clones.

No caso dos clones de Y1-D1G resistentes a FGF2 foi coletado um total de 10 clones, sendo que 6 deles foram capazes de proliferar ativamente e foram expandidos e congelados. Os clones foram denominados Y1-D1G-FR.

Todos os clones resistentes obtidos, inclusive os selecionados para resistência a PMA, são mantidos em FGF2 (2ng/ml) quando subcultivados ou quando o meio é renovado.

3.2.6. Western Blot

Para a detecção da quantidade de proteína Ras foram realizados ensaios de Western blot. Para isso, células crescidas exponencialmente por 48 h foram lisadas com tampão RIPA adicionado de inibidores de protease e a quantidade de proteína presente nos diferentes lisados foi quantificada utilizando-se o método Bradford e fazendo-se a leitura em um espectrofotômetro.

Aos extratos celulares (100 µg de proteína total) foi adicionado o tampão de amostras e eles foram então submetidos a um SDS-PAGE (gel 12% acrilamida), que foi submetido a eletroforese por toda a noite. No dia seguinte, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se um tampão de transferência em sistema semi-úmido. Após a transferência a membrana foi corada com solução de Ponceau, para monitorar a eficiência de transferência e a qualidade do extrato celular.

Materiais e Métodos

A membrana foi então bloqueada com 5% leite desnatado diluído em TBS-T por 45 min a 2 h. Após o bloqueio a membrana foi incubada com o anticorpo primário por 1 a 4 horas, à temperatura ambiente, ou por toda a noite, em 5% leite desnatado em TBS-T, à 4°C. Ela foi então lavada com TBS-T por 3 vezes de 8 min e incubada com anticorpo secundário por 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens de 8 min a membrana foi incubada com o produto quimioluminescente ECL por 1 min e exposta em um cassete com filme para raio X. O filme foi posteriormente revelado e fixado para análise.

Para o ensaio de atividade de MAPK/ERK, as células foram plaqueadas e carenciadas para soro por 48 h. Após esse período, elas foram tratadas com inibidores de PKC (Go 6983 ou Bisinmaleimida I) por 1 hora. As células controle não foram tratadas. Após esse período, as células foram estimuladas com 5 ou 10 ng/ml PMA por 5 minutos. O controle foi formado por células não tratadas e células tratadas apenas com os inibidores de PKC. Após o tratamento com PMA todas as células foram lisadas com tampão RIPA adicionado de inibidores de proteases. Os lisados foram então quantificados pelo método Bradford e submetidos ao ensaio de Western Blot, conforme descrito acima.

3.2.7. PCR em Tempo Real

Para o ensaio de PCR em tempo real as células foram plaqueadas e mantidas em crescimento exponencial por 48 h, quando foram então lisadas com o reagente Trizol para a extração de RNA, seguindo-se as orientações do fabricante, que será explicado de forma simplificada. O lisado celular, em Trizol, é incubado com clorofórmio

Materiais e Métodos

e posteriormente centrifugado. Forma-se então um líquido trifásico, onde a fase mais superior, límpida, é a fase rica em RNA. O sobrenadante é então isolado e incubado com 2-propanol. Posteriormente ele é centrifugado, o pellet é lavado com etanol 70% por duas vezes e ressuspenso em água, após a sua secagem completa.

O RNA é então tratado com DNase I por 10 min, conforme instruções do fabricante. O RNA tratado é então submetido a uma reação de transcrição reversa fazendo o uso da enzima Super Script III, seguindo-se as orientações do fabricante.

Após a obtenção do cDNA, as amostras serão submetidas ao ensaio de PCR em tempo Real. Para esse ensaio as amostras são submetidas a uma reação de PCR na presença do reagente Cybergreen conforme indicações do fabricante. Foram utilizados primers para a detecção de H-Ras e como controle, para normalização dos resultados, foi utilizado um par de primers para detecção de HPRT1, um “housekeeping gene”.

3.2.8. Ensaios de tumorigênese in vivo

Nesse ensaio foram utilizados animais *Mus domesticus domesticus* da linhagem Balb/c Nude, imunocompetentes e imunodeficientes, e, em alguns casos, Balb/c, imunocompetentes e isogênicos. Os animais utilizados tinham entre 4 e 10 semanas, criados e fornecidos pelos biotérios da Faculdade de Ciências Farmacêutica e Instituto de Química (IQ) -USP. Os animais foram mantidos a 22°C, umidade 55% e luminosidade 12h luz/12h escuro. A nutrição é comercial extrusada e esterilizada. O tratamento dos animais está de acordo com as normas da comissão de ética em cuidados e uso animal – CECUA - do IQ.

Materiais e Métodos

Foram injetadas 500 mil células por animal, na região dorsal posterior, do lado esquerdo. O desenvolvimento do tumor foi acompanhado a cada dois dias. O estabelecimento do tumor é determinado por exame visual e as medidas são realizadas com o auxílio de um paquímetro, tirando-se as medidas de comprimento e largura. O volume do tumor foi calculado assumindo-se que eles apresentavam formato elipsóide ou esférico. Os animais são sacrificados em uma câmara de gás carbônico quando ao menos uma das medidas atinge 10 mm ou quando os tumores estão próximos de sofrer necrose.

Alguns grupos de animais foram subdivididos em um grupo controle e um grupo tratado. O subgrupo tratado, recebia injeções subcutâneas locais de FGF2 (200 ng/animal, diluído em meio DME sem soro) e o subgrupo controle recebia injeções locais contendo apenas o meio DME. As injeções era realizadas a cada 48h. O crescimento dos tumores foi acompanhado visualmente e o volume do tumor foi estimado conforme descrito anteriormente. Os animais eram sacrificados quando ao menos uma das medidas do tumor atingia 10 mm ou quando o tumor estivesse próximo de sofrer necrose.

3.2.9. Ensaio SA- β -galactosidase

Células em crescimento exponencial foram tratadas com 10 ng/ml PMA ou mantidas na ausência dele (controle) e foram então lavadas com PBSA e fixadas por 10 min a temperatura ambiente. O material fixado foi então incubado com tampão de coloração, contendo X-gal, a 37°C, por 8 h. O ensaio foi realizado em duplicata. Para cada réplica foi contato cerca de 500 células, e o percentual de células que se coraram

em azul, evidenciando atividade de β -galactosidase associada à senescência (SA- β -galactosidase), foi obtido e plotado em gráfico.

3.2.10. Análise estatística

A análise estatística de tratamentos em ensaios clonogênicos e ensaios de crescimento em suspensão foi realizada utilizando-se o Teste t de Student, não pareado, assumindo variâncias diferentes.

A análise das curvas de sobrevivência foi realizada aplicando-se os testes log-rank especificando conforme Mantel-Haenszel, Peto & Peto e Callaert (StatXact). São todos testes não paramétricos – no sentido que não se assume modelo probabilístico para a probabilidade de sobrevivência. Na comparação entre diferenças nas taxas de sobrevivência é aplicado um teste Chi-quadrado sobre estatísticas ligeiramente diferentes.

4. Resultados

4.1. Parte I

4.1.1. Citotoxicidade de FGF2

O peptídeo FGF2 dispara resposta claramente mitogênica nas primeiras horas do ciclo celular de células Y1, levando-as a entrar na fase S (Rocha et al., 2003) Entretanto, conforme demonstrado por Costa et al., 2004, após esse estímulo inicial, o FGF2 promove um bloqueio no ciclo celular de células Y1, resultando na inibição irreversível da proliferação. Esse efeito se assemelha ao “oncogene stress response” observado quando ocorre ganho de função de oncogenes em culturas de células primárias, o que leva tais células a entrarem em senescência. O FGF2 parece recuperar esse efeito em células imortalizadas transformadas pelo oncogene Ras. Portanto, em analogia ao efeito observado em células primárias, denominamos o efeito inibitório de FGF2 em células Y1 de “FGF2 stress response” ou resposta de stress a FGF2. Esse efeito como demonstrado por Costa (2005) é específico para o FGF2 e não para outros membros testados dessa família (FGFs 1, 3 e 4).

4.1.2. Seleção de clones derivados de Y1 resistentes a FGF2. Tratamento sustentado.

Neste trabalho temos como objetivo principal desvendar os mecanismos envolvidos na resposta de stress a FGF2. Uma das formas que temos para entender tais mecanismos é através da seleção de clones resistentes a FGF2. Através da comparação de clones resistentes a FGF2 com as células parentais podemos encontrar

Resultados

diferenças relevantes para o efeito inibitório de FGF2, que permitam inferir hipóteses de mecanismos.

Para a seleção de clones resistentes a FGF2 derivados de Y1, as células foram plaqueadas em uma densidade de cerca de 640 células/cm² e deixadas em repouso por 24 h. O plaqueamento foi feito em triplicata. No dia seguinte, o FGF2 (2ng/ml) foi adicionado ao meio e era adicionado sempre que o meio era renovado, 3 vezes por semana. Após 18 dias, as colônias sobreviventes eram visíveis a olho nu e foram isolados 12 clones resistentes a FGF2. Após o isolamento, os clones foram expandidos em meio 10% SFB, complementado com FGF2 2 ng/ml, para gerar estoques que foram imediatamente plaqueados para extração de proteínas e congelamento em nitrogênio líquido. A manutenção desses clones em cultura era realizada com meio 10% SFB, acrescido de 2 ng/ml FGF2.

Conforme observado na tabela 1, no primeiro experimento foram obtidas 127±15 colônias por placa, a partir de 5.10⁴ células plaqueadas. Assim, concluímos que tratamentos longos com FGF2 matam cerca de 99,75% das células Y1. A partir dessa primeira seleção foram isolados 12 clones resistentes a FGF2, entretanto, apenas um deles conseguiu sobreviver após o isolamento da colônia. A denominação do clone foi dada de acordo com o número de clones isolados e número da placa a partir do qual o mesmo foi isolado. Assim, o clone resistente obtido foi denominado Y1-FR 10.3 S (“**Y1-FGF2 Resistente clone 10 placa 3, tratamento sustentado**”).

Uma segunda seleção para clones resistentes foi realizada, utilizando-se o mesmo protocolo adotado na primeira seleção. A partir dessa segunda seleção foram isolados 16 clones resistentes a FGF2, e 10 deles proliferaram normalmente. Conforme observamos na tabela 1 foram obtidas 34 ± 6 colônias por placa, a partir de 5.10⁴

Resultados

células plaqueadas, uma quantidade muito inferior a que havia sido obtida anteriormente. No entanto, foi possível isolar alguns clones que foram expandidos e congelados. Os clones provenientes dessa segunda seleção foram identificados com letras para diferenciar das células que foram isoladas na seleção anterior. Portanto, a partir da segunda seleção, foram isolados os clones Y1-FR A a J (“Y1-FGF2 Resistente clone X”). A partir dessa seleção foram escolhidos três clones aleatoriamente, cada um proveniente de uma placa diferente, para serem estudados. Na figura 1, vemos as placas que foram utilizadas para a seleção de clones resistentes, tanto para o experimento 1 (A) quanto para o experimento 2 (B).

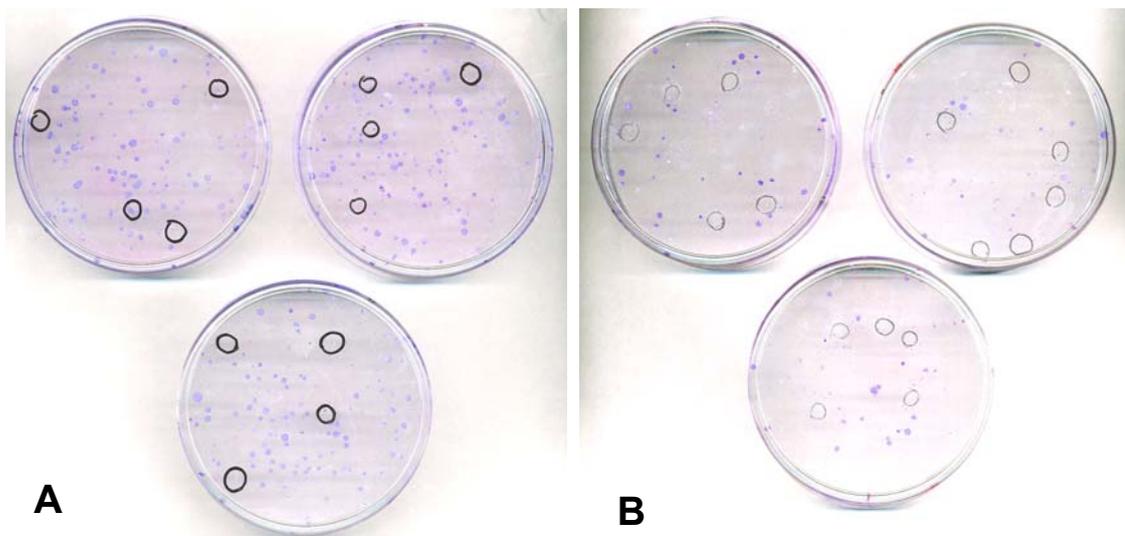


Figura 1. Seleção de clones resistentes a FGF2 com tratamento sustentado. Foram plaqueadas 5.104 células em placas P100 em triplicata. Os círculos pretos destacam os clones que foram isolados originalmente. (A) O rendimento foi de 127 ± 15 colônias por placa. (B) O rendimento foi de 33 ± 6 colônias por placa

Tabela 1. Seleção de células Y1 resistentes a FGF2

Experimento	Plaqueamento	Número de placas	Colônias sobreviventes	Clones isolados	Sublinhagens clonais obtidas
1	5.10 ⁴ cels/placa	3	127 ± 15/placa	12	Y1-FR 10.3S (única)
2	5.10 ⁴ cels/placa	3	33 ± 6/placa	16	Y1-FR A a J

Foram plaqueadas 5.10⁴ células em placas P100 em triplicata. O FGF2 (2ng/ml) foi adicionado ao meio no dia seguinte ao plaqueamento. As células foram mantidas em meio DME contendo 10% FCS, suplementado com 2ng/ml FGF2, até o aparecimento de colônias visíveis a olho nu. O meio era trocado três vezes por semana.

Para determinar a sensibilidade de determinado tipo celular a uma droga, adotamos como ensaio padrão em nosso laboratório, o ensaio de crescimento de colônia em substrato sólido ou ensaio clonogênico. Nesse ensaio as células são plaqueadas em baixa densidade e somente as células viáveis serão capazes de se proliferar, gerando colônias visíveis a olho nu. Cada colônia é derivada de uma única célula e, por isso, também é chamada de clone. Dessa forma, nesse tipo de ensaio, podemos estudar a resposta de células individuais a diferentes tratamentos. Além disso, esse experimento nos permite analisar a resposta das células aos diferentes tratamentos quando cultivadas em baixa densidade. Como ensaio padrão para o FGF2 adotamos o tempo de tratamento de 24h, sendo o FGF2 adicionado ao meio imediatamente após o plaqueamento, na concentração de 2 ng/ml.

Conforme observado nas figuras 2 A e B, as células Y1 são bastante sensíveis a FGF2, sendo que 91% das células se tornam inviáveis, após tratamento com FGF2. A tabela 2 mostra um resumo dos diferentes ensaios clonogênicos realizados com Y1. Já as células Y1-FR 10.3S e Y1-FR A, D e H, selecionadas para resistência a FGF2 são, de fato, bastante resistentes, apresentando uma baixa sensibilidade, que varia entre 10 e 26% (Fig. 2 C a J).

Resultados

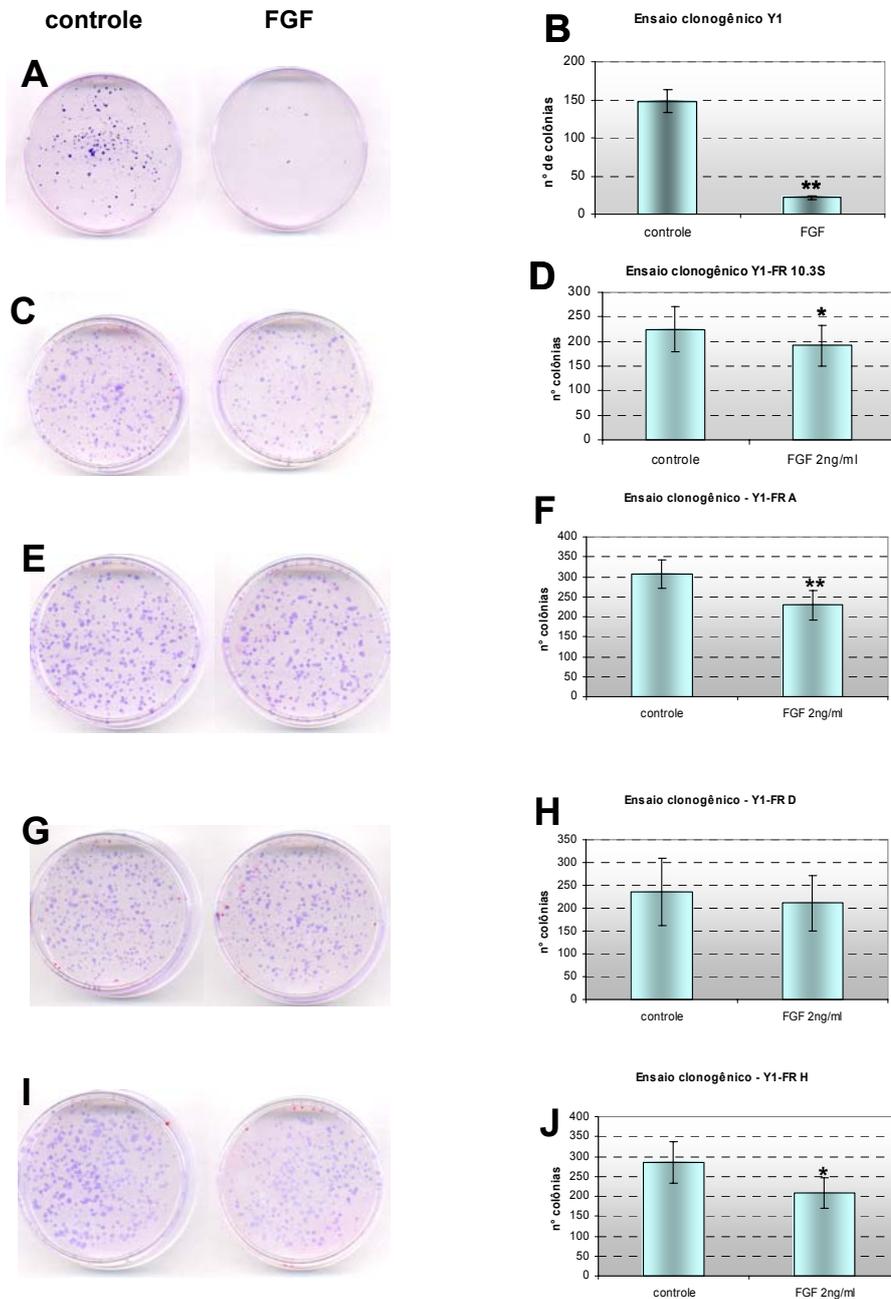


Figura 2. FGF2 inibe o crescimento de células Y1, mas não de células Y1-FR. As células foram plaqueadas em baixa densidade e tratadas com FGF2 (2ng/ml), em cima de 10% SFB, por 24h. As placas controle foram mantidas apenas com 10%SFB, sem FGF2. Após esse período, as células eram mantidas em cultura (DMEM 10% SFB) até o aparecimento de colônias visíveis a olho nu, quando então as placas foram fixadas e coradas. (A, C, E, G, I) Duas placas representantes de ensaios clonogênicos realizados com os as diferentes linhagens celulares. (B, D, F, H, J) Média do número de colônias obtido em para cada sublinhagem. A barra de erros representa o desvio padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e para cada tipo celular foram realizados pelo menos dois experimentos. Células Y1 (A e B), Y1-FR 10.3 S (C e D), Y1-FRA (E e F), Y1-FRD (G e H), Y1-FRH (I e J). Observar a alta sensibilidade da célula Y1 a FGF2 e a resistência apresentada pelas células Y1-FR. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Resultados

A sensibilidade dessas sublinhagens a FGF2 também pode ser verificada em curvas de crescimento, onde são cultivadas na presença ou ausência de FGF2 ao longo de 7 dias e o número de células é estimado ao longo desse período. Esse ensaio permite que se estude o efeito de uma droga sobre a proliferação de determinada população de células e a resposta dessas células a determinada droga quando cultivadas em alta densidade. Quando comparamos o crescimento de células Y1 e Y1-FR 10.3 S na presença ou ausência de FGF2, observamos que o padrão de crescimento se apresenta invertido para as duas células ou seja, Y1 parental cresce pobremente na presença de FGF2, enquanto Y1-FR 10.3 S não só é resistente, como cresce muito melhor na presença de FGF2 (Fig. 3). Nessas células, portanto, o FGF2 está agindo como fator de crescimento, assim como é observada para fibroblastos 3T3, célula sobre as quais o efeito mitogênico foi primeiro observado, conforme será mostrado posteriormente.

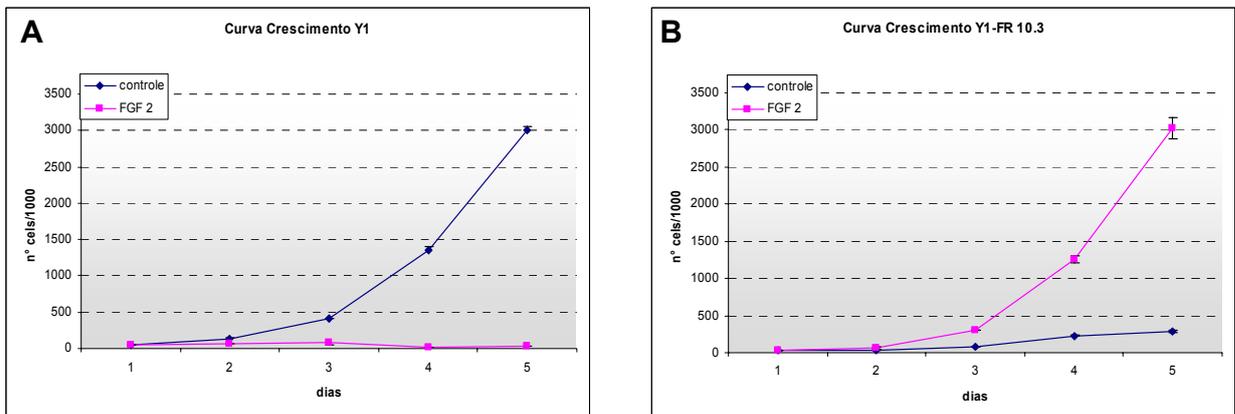


Figura 3. Células Y1-FR 10.3 S crescem melhor na presença de FGF2. Foram plaqueadas $5 \cdot 10^4$ células em placas P35 e as células foram mantidas em FGF2 durante todo o experimento ou na ausência do mesmo (controle). As células eram coletadas em duplicatas a cada 2 dias, contadas e os valores foram plotados em um gráfico. (A) Y1; (B) Y1-FR 10.3 S. Nota-se que a célula Y1-FR não só tornou-se resistente a FGF2, como seu crescimento agora é favorecido pela sua presença. Resultados representativos de dois experimentos, cada. Barras representam desvio padrão.

4.1.3. Pressão seletiva de FGF2 gera células com baixa expressão de K-Ras

Conforme descrito anteriormente, a célula Y1 possui uma amplificação do gene K-ras, o que garante elevados níveis basais da proteína K-Ras e um basal constitutivo da proteína K-Ras na sua forma ativa, ou seja, na forma K-Ras-GTP. Esse é, provavelmente, o principal componente da transformação maligna dessa célula.

Na figura 4 observamos “western blots” realizado para a detecção da proteína K-Ras total. Nessa figura, foi comparado o padrão de expressão de K-Ras entre a célula parental Y1 e seus derivados selecionados para resistência a FGF2, tanto o clone FR3, isolado anteriormente em nosso laboratório, com tratamento de FGF2 por 24h, quanto os clones FRs isolados durante esse trabalho, selecionados com tratamento sustentado de FGF2 (Tabela 1). Observamos que os clones resistentes a FGF2 selecionados com tratamento sustentado expressam um nível muito reduzido da proteína K-Ras (proteína total) quando comparados com a superexpressão da célula parental com exceção de apenas um clone dentre os onze selecionados. Esse resultado é contrário ao que é observado para o clone FR3 e os demais clones FRs selecionados anteriormente com tratamento de FGF2 por 24 horas, que apresentam elevados níveis de expressão da proteína Ras.

Dessa forma, concluímos que o FGF2 exerce um forte efeito seletivo contra as células parentais Y1, ou seja, só são capazes de resistir ao tratamento prolongado com FGF2 aquelas células que possuem baixos níveis de expressão de K-Ras. Outro fato observado, embora não fosse esperado, é que todas as linhagens estudadas são dependentes de FGF2 para o crescimento e sua sobrevivência. Cabe ressaltar, que quando as células são mantidas em culturas sem adição de FGF2 a proliferação é

Resultados

visivelmente diminuída e suas características morfológicas vão se modificando, apresentando-se mais arredondadas e refringentes, emitindo finas projeções, adquirindo um formato aracnóide. Se essas células são mantidas por períodos prolongado na ausência de FGF2 (30 a 40 dias), elas tornam-se inviáveis.

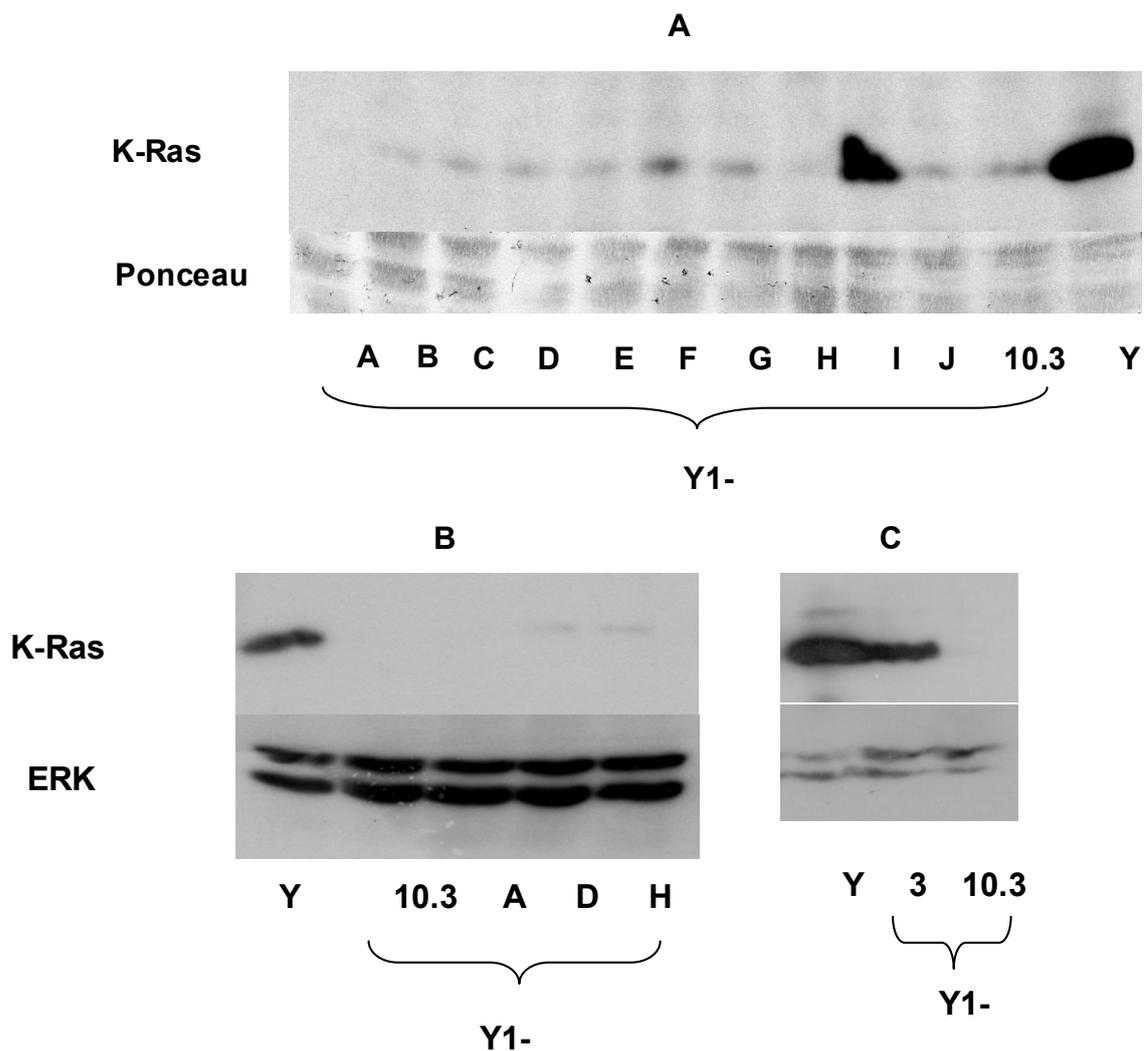


Figura 4. Células selecionadas para resistência a FGF2 com tratamento sustentado perdem a superexpressão de K-Ras. Western Blot para a detecção de K-Ras total. Lisados de células em crescimento exponencial. (A) Y1 e suas derivadas selecionadas para resistência a FGF2 com tratamento sustentado, listadas na tabela 1. Observar o alto nível de expressão de Ras em Y1 e o baixo nível nos clones Y1-FR, com exceção do clone Y1-FR- I. (B) Repetição do experimento anterior, com a células Y1 e clones resistentes, Y1-FR 10,3S, A, D e H, com lisados obtidos a partir de uma nova cultura de células. (C) Observar que o clone Y1-FR3, que foi selecionado com tratamentos de 24h com FGF2, possui elevado nível de expressão de Ras, semelhante à célula parental e ao contrário do clone Y1-FR 10,3S, que foi selecionado com tratamento sustentado de FGF2. A marcação da membrana com Ponceau ou a quantidade de de ERK total foram utilizadas apenas para normalização dos resultados.

4.1.4. Citotoxicidade de FGF2 em células que superexpressam Ciclina D1

Conforme demonstrado anteriormente em nosso laboratório, células Y1-D1, que expressam constitutivamente a proteína Ciclina D1, são resistentes ao efeito inibitório de vasopressina (Schwindt et al., 2003). Entretanto, a sensibilidade dessas células a FGF2 ainda não havia sido testada.

Neste projeto foi utilizado o clone Y1-D1G, anteriormente caracterizado e amplamente estudado em nosso laboratório. Submetemos essas células a ensaios clonogênicos e ensaios de proliferação em massa.

No ensaio clonogênico mostramos que as células D1G são extremamente sensíveis a FGF2, em cuja presença por 24 h, cerca de 95% das células morrem (Fig. 5 A e B, Tabela 2). Em ensaios de proliferação celular, nota-se que as células D1G não proliferam na presença de FGF2 (Fig 5 C), ocorrendo inclusive uma diminuição no número de células ao longo dos dias, caracterizando morte celular induzida por FGF2. O resultado é semelhante, e até mesmo, mais drástico, ao que é observado para a célula parental, Y1 (Fig. 5 D). Esses resultados, juntos, demonstram que a presença de Ciclina D1 constitutiva não é capaz de tornar a célula Y1 resistente ao efeito inibitório de FGF2. Ao contrário, a superexpressão de Ciclina D1 parece tornar essas células ainda mais sensíveis ao FGF2.

Resultados

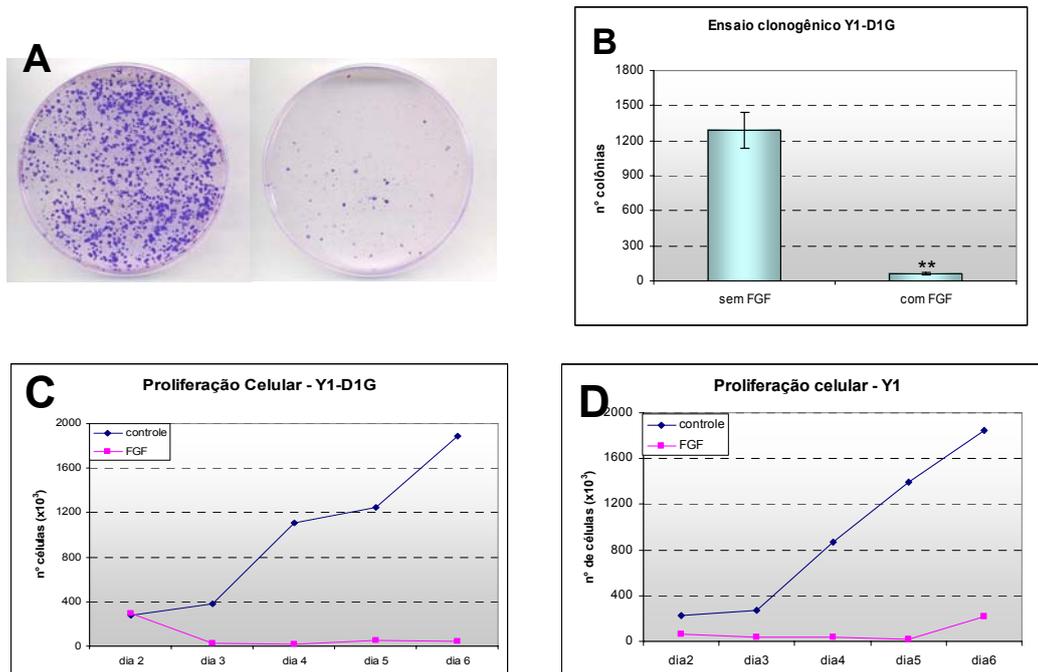


Figura 5. Sensibilidade de células Y1-D1G a FGF2. (A e B) Foram plaqueadas 104 células em placas P60 e as células foram mantidas em FGF2 por 24h ou na ausência do mesmo (controle). Após esse período o meio foi trocado e as placas foram mantidas até o surgimento de colônias visíveis a olho nu. As colônias foram fixadas, coradas e contadas e os valores obtidos plotados em um gráfico. Resultado de um experimento realizado em triplicata (** $p < 0,01$). (C e D) Curva de crescimento. Foram plaqueadas $2,5 \cdot 10^4$ células em placas P35 e as células foram mantidas em FGF2 durante todo o experimento ou na ausência do mesmo (controle). As células eram coletadas em duplicata a cada 2 dias, contadas e os valores foram plotados em um gráfico. (C) Y1, (C) Y1-D1G. Barras representam desvio padrão.

Tabela 2. Tratamento FGF2

Tipo celular	Número de células plaqueadas	Nº médio de colônias obtidas				
		controle	FGF2 2ng/ml	% inibição	n	p
Y1	10^3	72 ± 16	25 ± 12	65	2	0
	$3 \cdot 10^3$	256 ± 64	102 ± 35	60	2	0,003
	$5 \cdot 10^3$	148 ± 15	22 ± 2	85	1	0,004
	$5 \cdot 10^3$	82 ± 14	22 ± 15	74	1	0,02
Y1-D1G	10^4	276 ± 47	14 ± 6	95	1	0,01
	$5 \cdot 10^4$	1293 ± 153	61 ± 12	95	1	0,005

* Tratamento FGF2 24 h

** Experimentos realizados em triplicata

*** $p < 0,0001$ considerado $p = 0$.

4.1.5. Seleção de clones resistentes a FGF2 a partir de células Y1-D1G

A seleção de clones resistentes a FGF2 a partir de células Y1-D1G foi realizada de acordo com o protocolo descrito anteriormente. No entanto, a maior sensibilidade das células Y1-D1G ao FGF2 nos levou a trabalhar com um inóculo inicial de 3.10^5 células ao invés de 5.10^4 , como foi utilizado para Y1. Doze colônias resistentes foram isoladas a partir de 4 placas. As células foram expandidas na presença de FGF2 e foram denominadas D1G-FR X.Y (clone X, placa Y). Quando em cultura, todas essas células são mantidas continuamente na presença de FGF2. Dos doze clones selecionado, 6 foram capazes de crescer e proliferar normalmente.

Em um primeiro momento foram escolhidos dois clones para estudo. Foram escolhidos os clones D1G-FR 5.3 e 10.4 que proliferaram muito bem após a clonagem e apresentavam morfologia semelhante à célula parental.

Os clones foram testados em ensaios clonogênicos na presença e ausência de FGF2. Nota-se nesses ensaios que o clone 10.4 ainda apresenta uma certa sensibilidade a FGF2 (38%)(Fig. 6 A e B), enquanto o clone 5.3 é totalmente resistente (Fig. 6 C e D).

Em um ensaio de proliferação celular, as células Y1-D1G-FR 5.3 exibem um fenótipo de revertente normal, proliferando melhor na presença de FGF2 (Fig. 6 E e F).

Na figura 7 observamos um “western blot” realizado para a detecção da proteína K-Ras total. Nessa figura foi comparado o padrão de expressão de K-Ras entre as células parentais Y1 e Y1-D1G e seus derivados selecionados para resistência a FGF2. Para resistentes derivados de D1G (Fig. 7) foram comparados quatro clones diferentes, originários de placas diferentes, o que garante que esses clones não são irmãos. Assim

Resultados

como foi observado para células Y1, os clones resistentes a FGF2 derivados de D1G também apresentam uma expressão muito baixa de K-Ras, quando comparados à célula parental. Esse resultado reforça o que foi obtido anteriormente e mostra, mais uma vez, o forte efeito seletivo negativo de FGF2.

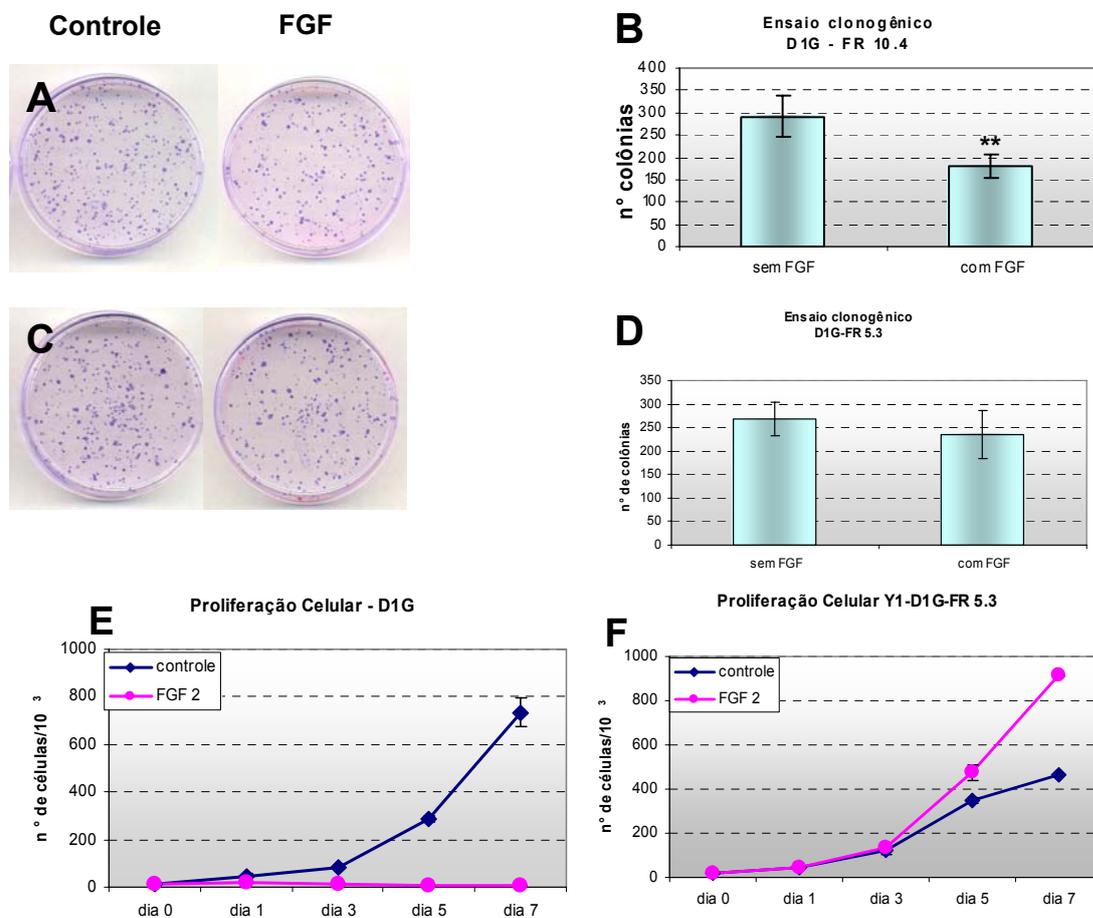


Figura 6. Sensibilidade de células Y1-D1G-FR a FGF2. Foram plaqueadas 103 células em placas P35 e as células foram mantidas em FGF2 por 24h ou na ausência deste (controle). Após esse período, o meio foi trocado e as placas foram mantidas até o surgimento de colônias visíveis a olho nu. As colônias foram fixadas, coradas e contadas e os valores obtidos plotados em um gráfico. (A) D1G-FR 510.4, resultado de dois experimentos em triplicata; (B) D1G-FR 5.3, resultado de dois experimentos, cada um em triplicata. (C e D) Curvas de crescimento para Y1-D1G (C) e D1G-FR 5.3 (D). Foram plaqueadas $2,5 \cdot 10^4$ células em placas P35 e as células foram mantidas em FGF2 durante todo o experimento ou na ausência do mesmo (controle). As células eram coletadas em duplicatas a cada 2 dias, contadas e os valores foram plotados em um gráfico. A, Y1-D1G; D1G-FR 5.3. nota-se que as células D1G-FR não só tornaram-se resistentes a FGF2, como seu crescimento agora é favorecido pela presença do mesmo. A barra nos gráficos indica o desvio padrão. ** $p < 0,01$

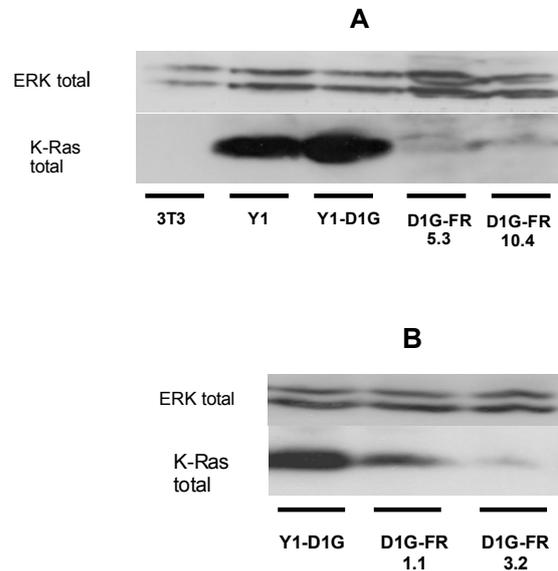


Figura 7. Células D1G-FR perdem a superexpressão de K-Ras. Western Blot para a detecção de K-Ras total. Lisados de células em crescimento exponencial. (A) Y1, Y1-D1G e duas de suas derivadas resistentes a FGF2. Os clones resistentes a FGF2 foram selecionados com tratamento sustentado. Na primeira linha foi aplicada a mesma quantidade de proteína de células Balb/c 3T3, que não possui amplificação de K-Ras para comparação. (B) Y1-D1G e dois outros resistentes derivados. A proteína ERK total foi utilizada para normalização dos resultados.

4.1.6. Citotoxicidade de FGF2 em fibroblastos transformados por Ras

Tornou-se importante saber se o efeito citotóxico de FGF2 é específico para células Y1 ou se também vale para outras linhagens celulares transformadas por Ras. Para isso, resolvemos testar o efeito de FGF2 sobre a célula B61, que é uma linhagem celular derivada de Balb/c 3T3 que foi transformada com oncogene EJ-Ras humano, uma variação de H-Ras onde ocorreu uma substituição no aminoácido 12, que agora apresenta uma valina ao invés de uma glicina, ficando constitutivamente ativo. Costa, em sua tese de Doutorado, havia demonstrado que o efeito citotóxico de FGF2 se estendia sobre essa linhagem. No entanto, não foram estudados os efeitos dos

Resultados

diferentes FGFs sobre essa linhagem. Esse trabalho confirma e expande os resultados observados anteriormente.

Para testar o efeito citotóxico de FGF2 em células crescendo exponencialmente, realizamos um ensaio de proliferação celular. Notamos nesse ensaio (Fig. 8), que as células Balb/c 3T3, que são células imortalizadas, não tumorigênicas, proliferam muito bem na presença de FGF2, tendo inclusive sua taxa de proliferação acelerada na presença do mesmo, conforme o esperado (Fig. 8 A). Entretanto, o experimento mostra que FGF2 inibe fortemente o crescimento de células B61 (Fig. 8 B). Esse mesmo efeito é observado para Y1 (Fig.2 A). Assim, concluímos que o efeito de FGF 2, nesse caso, é comum para diferentes linhagens celulares de camundongos transformadas por Ras.

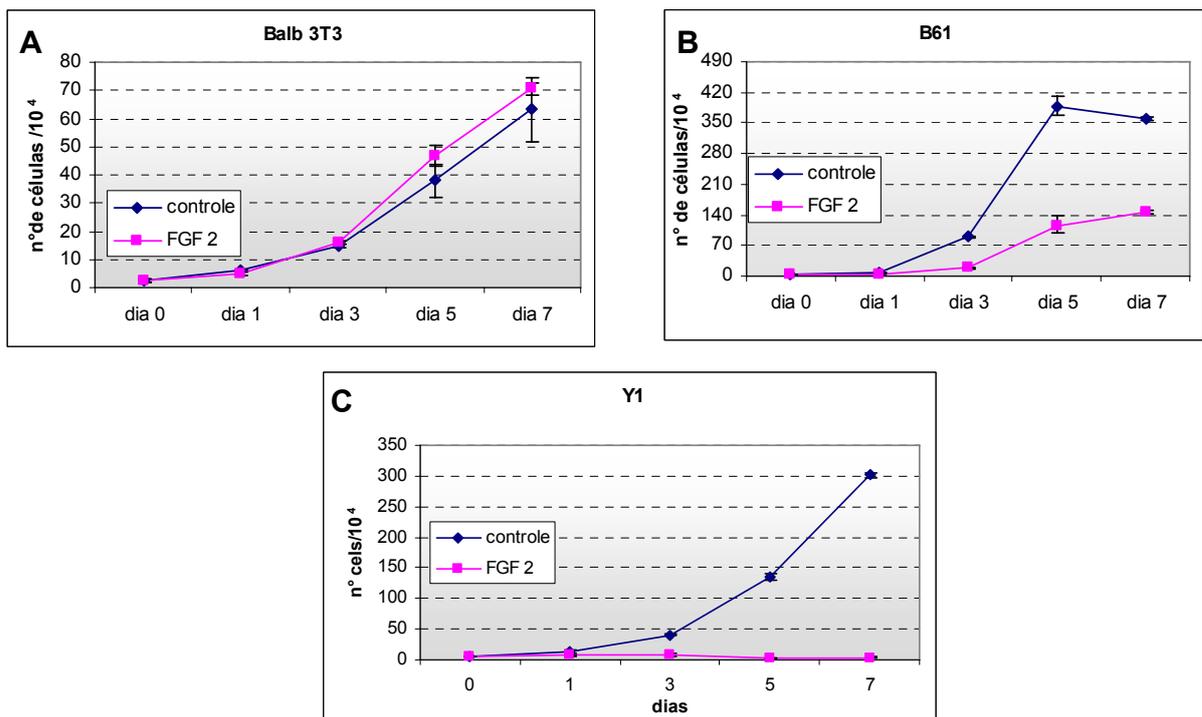


Figura 8. Fibroblastos transformados com H-Ras são bastante sensíveis a FGF2. Foram plaqueadas $2,5 \cdot 10^4$ células em placas P35 e as células foram mantidas em FGF2 durante todo o experimento ou na ausência do mesmo (controle). As células eram coletadas em duplicatas a cada 2 dias, contadas e os valores foram plotados em um gráfico. (A) Balb/c 3T3; (B) B61, (C), Y1. Observar que o FGF2 age como uma fator de crescimento de células Balb/c 3T3, mas inibe o crescimento de Y1 e B61, células transformadas por Ras. Barras representam desvio padrão.

Resultados

Na figura 9 A e B observamos, através de ensaios clonogênicos, que as células B61 são bastante sensíveis ao FGF2 resultando em 78% de morte em relação ao controle. O FGF 1, por sua vez, provocou também um efeito de morte significativo (56%). Esse fato, no entanto, não é surpreendente, dada a grande semelhança do FGF1 com o FGF2. Vale ressaltar, no entanto, que os outros membros da família estudados, FGF4 e FGF5 apresentaram pouco ou nenhum efeito. Assim, concluímos que o efeito de morte para células B61 é específico apenas para os dois membros mais próximos da família, sendo ainda mais forte para o FGF2. As células Balb/c 3T3, por sua vez, apresentam uma baixa sensibilidade à morte induzida por FGF2 ou qualquer outro membro da família testado nesse tipo de ensaio (Fig. 9 C e D).

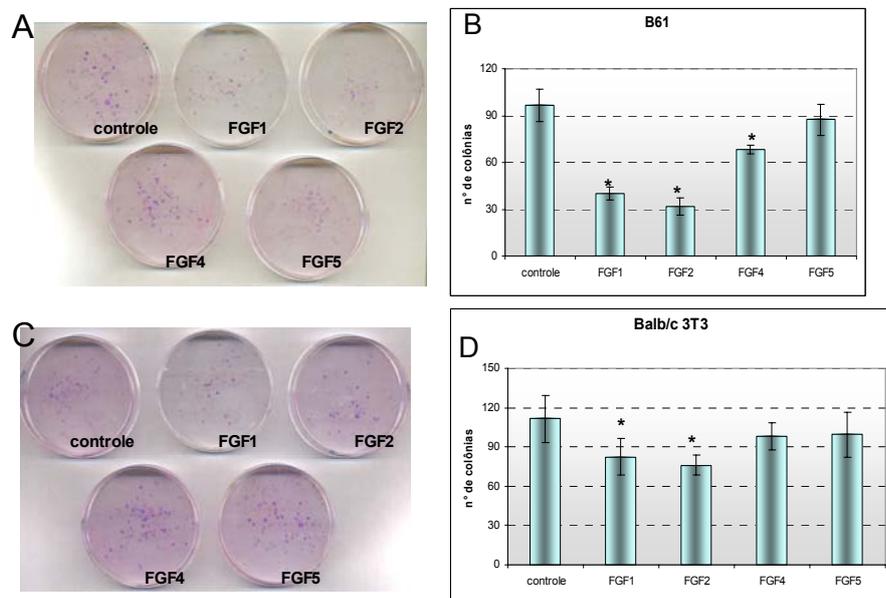


Figura 9. FGF2 inibe a proliferação de B61. Ensaios clonogênicos para B61 (A e B) e Balb/c 3T3 (C e D). Foram plaqueadas 500 células/placa em triplicata e foram realizados tratamentos com 4 membros da família FGF, FGF1, 2, 4 e 5. Notar o grande efeito inibitório de FGF 1 e 2, principalmente, sobre as células B61, enquanto esse efeito é muito menor sobre as células Balb/c 3T3. Os demais FGFs testados produzem pouco ou nenhum efeito sobre as células testadas. Os tratamentos foram realizados por 24 h e os diferentes FGFs foram utilizados a 2ng/ml. Resultados de um experimento (B61) e dois experimentos (Balb/c3T3). A barra nos gráficos indica o desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01

4.1.7. Seleção de clones derivados de B61 resistentes a FGF2

Em nosso laboratório foram realizadas diversas tentativas de se isolar clones de B61 resistentes a FGF2. Na primeira seleção, realizada por Costa, células em baixa densidade foram tratadas por 24 h e então o meio foi trocado e as células foram mantidas até o aparecimento de colônias visíveis a olho nu. Nessa ocasião, as células foram mantidas em meio de cultura, sem geneticina, que é o agente seletivo para o qual essa linhagem transgênica apresenta resistência. A partir dessa seleção foi obtido um baixo número de colônias, que foram clonadas. Alguns desses clones foram testados e mostraram perda do transgene EJ-Ras, passando a se comportar à semelhança da linhagem parental, Balb/c 3T3. Neste trabalho, estudamos um desses clones, o clone número 4, que apresenta a expressão de Ras bastante reduzida em relação à célula B61 (Fig.10). Uma segunda seleção foi realizada em nosso laboratório (pela aluna Marianna Koga), onde o tratamento com FGF2 foi sustentado, ou seja, o FGF2 era adicionado periodicamente ao meio de seleção. Essa seleção foi realizada também na presença de geneticina, forçando a manutenção do transgene, e resultou na clonagem de apenas uma sublinhagem, que mantém a expressão do transgene EJ-Ras elevada e foi denominada B61-FRA (Fig.10).

Conforme podemos observar na figura 11, essas linhagens isoladas como resistentes a FGF2 apresentam, de fato, uma alta resistência ao seu efeito citotóxico. O clone B61-FR4 não apresentou nenhuma sensibilidade a FGF2 (Fig. 11 A). Esse clone, inclusive, apresenta um crescimento lento quando cultivado em meio contendo 10% SFB, sendo esse crescimento acelerado quando o FGF2 é adicionado a esse meio, conforme mostrado no ensaio de proliferação celular. (Fig. 11 B). O ensaio clonogênico

Resultados

com o clone A, por sua vez, apresentou cerca de 30% de sensibilidade a FGF2 (Fig. 11 C). No entanto, quando analisamos o ensaio de proliferação celular, notamos que esse clone cresce muito bem na presença de FGF2. Diferentemente do clone anterior, no entanto, o crescimento não é dependente de FGF2 (Fig. 11 D).

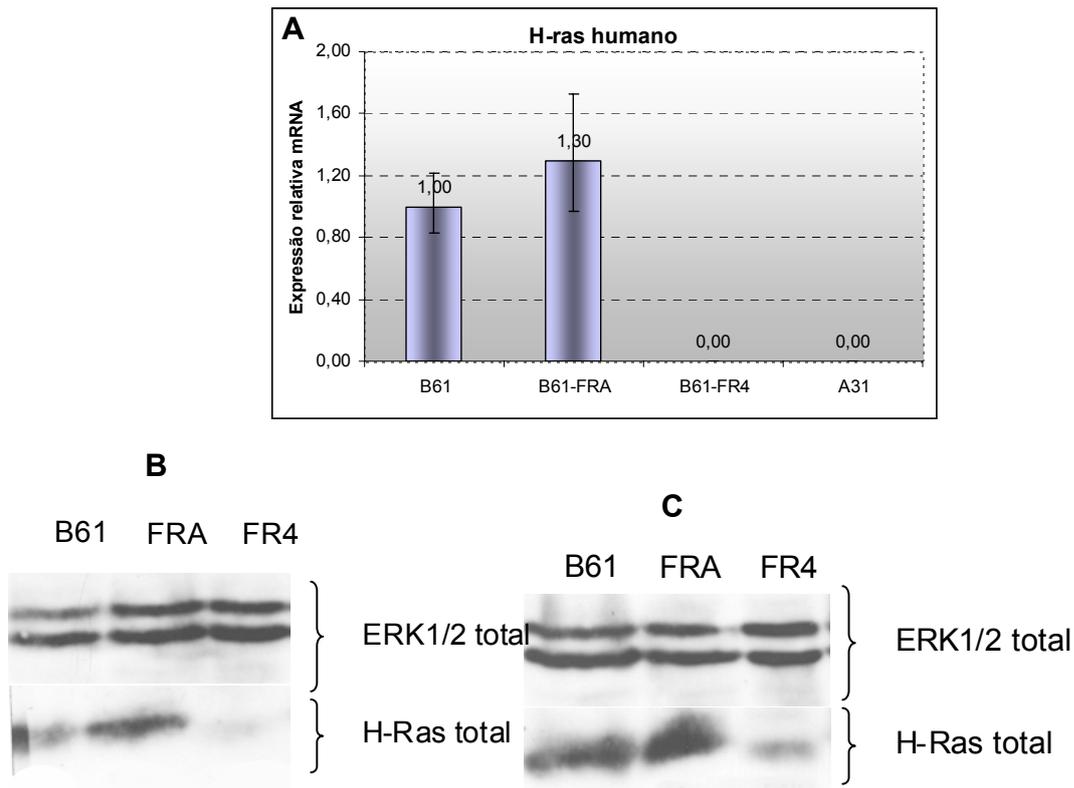


Figura 10. Padrão de expressão de H-Ras em células B61-FR. (A) Real-time PCR realizado para quantificação relativa da expressão de H-ras. Observar que, enquanto o clone B61-FRA apresenta elevados níveis de H-ras, assim como B61, o clones B61-FR4 apresenta níveis indetectáveis, semelhante à célula parental original, Balb/c 3T3. A barra no gráfico indica o desvio padrão (B e C) Western blots, para H-Ras total, realizados a partir de dois lisados diferentes para cada célula. A quantidade de ERK total foi utilizada para normalização dos resultados.

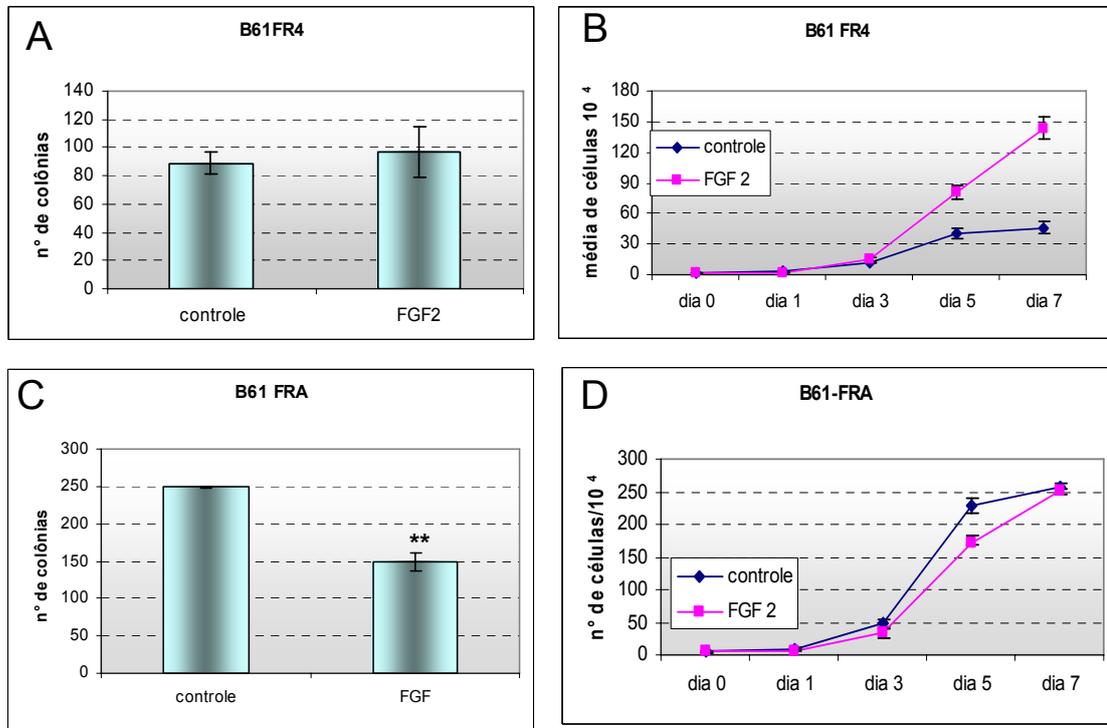


Figura 11. Sensibilidade de células B61-FR a FGF2. (A e C) ensaios clonogênicos para B61-FR 4 e B61-FRA, respectivamente. (B e D) Curvas de crescimento para B61-FR 4 e B61-FRA, respectivamente. Para os ensaios clonogênicos foram plaqueadas 500 células e o tratamento com FGF2 foi realizado por 24 h com 2 ng/ml FGF2. Observar a alta resistência do clone B61-FR4 a FGF2 (A e B) e a resistência parcial de B61-FRA a FGF2 em ensaios clonogênicos (C), porém quando analisamos o crescimento da população como um todo, notamos que essas células também são resistentes a FGF2 (D). (A), resultado de dois experimentos, realizados em triplicata. (B) Resultado representativo de dois experimentos realizados em duplicata. (C) Resultado de um experimento em triplicata ** $p < 0,01$. (D). As barras nos gráficos representam o desvio padrão.

4.1.8. Potencial de Crescimento em Suspensão de Células Y1 e derivadas

Tornou-se importante em nosso projeto verificar a capacidade de crescimento em suspensão de células Y1 e sublinhagens derivadas e verificar a sensibilidade a FGF2 nessas condições. Sabe-se que a capacidade de uma célula crescer em suspensão (meio semi-sólido) se correlaciona bem com o seu grau de transformação neoplásica. Além disso, o crescimento em suspensão pode nos fornecer dicas importantes a respeito do grau de tumorigenicidade das células estudadas. Sabe-se

Resultados

que, em geral, há uma correlação entre a capacidade de uma célula de crescer em suspensão e a capacidade da mesma de formar tumor quando inoculada em animais.

No primeiro momento, observamos que as células Y1 são capazes de crescer em suspensão, fato já esperado uma vez que se trata de uma célula tumoral capaz de gerar tumor *in vivo* (Fig. 12). Também foi observado que quando as células são cultivadas na presença de FGF2 há uma diminuição considerável no número de colônias obtido, independente do número de células plaqueadas e da quantidade de FGF2 adicionada ao meio (Tabela 3). Dessa forma, concluímos que a sensibilidade da célula Y1 ao FGF 2 é independente da adesão a um substrato sólido.

Cabem aqui algumas ressalvas a respeito do crescimento das células em suspensão de Y1. Observamos que o plaqueamento com um maior número de células ($5 \cdot 10^4$) resultou no aparecimento de um grande número de colônias, mas que eram bem menores e tinham tamanho mais uniforme que as colônias obtidas com o plaqueamento com menor número de células ($3 \cdot 10^3$ ou 10^4). Isso se deve, provavelmente, à competição por nutrientes, que se esgotam rapidamente, o que impediria um maior crescimento das colônias. Outro fato que nos chama a atenção é que as colônias que se desenvolvem na ausência de FGF2 acidificam o meio de cultura rapidamente, indicando uma alta atividade metabólica dessas células. Por outro lado, nas placas onde o FGF2 é adicionado não se observa tal fenômeno, indicando uma baixa atividade metabólica das células, provavelmente resultante da inibição do crescimento por FGF2. Além disso, notamos que o plaqueamento com um maior número de células, ou seja, maior densidade, resulta em um número de colônias desenvolvido proporcionalmente muito maior do que aquele observado para o plaqueamento com menor número de células. Sabemos que as células em cultura condicionam o meio em que são cultivadas

Resultados

e, provavelmente, o crescimento e proliferação dessas células depende de fatores secretados por essas células no meio de cultura. Portanto, acreditamos que quando essas células são plaqueadas em baixa densidade, a distância entre elas assim como a maior dificuldade de difusão de nutrientes no meio semi-sólido, prejudique a comunicação entre as células e, assim, torna-se mais difícil o crescimento das colônias. Dessa forma, temos o resultado observado, que é uma número proporcionalmente muito maior de colônias obtidas quando se parte de um inóculo inicial maior.

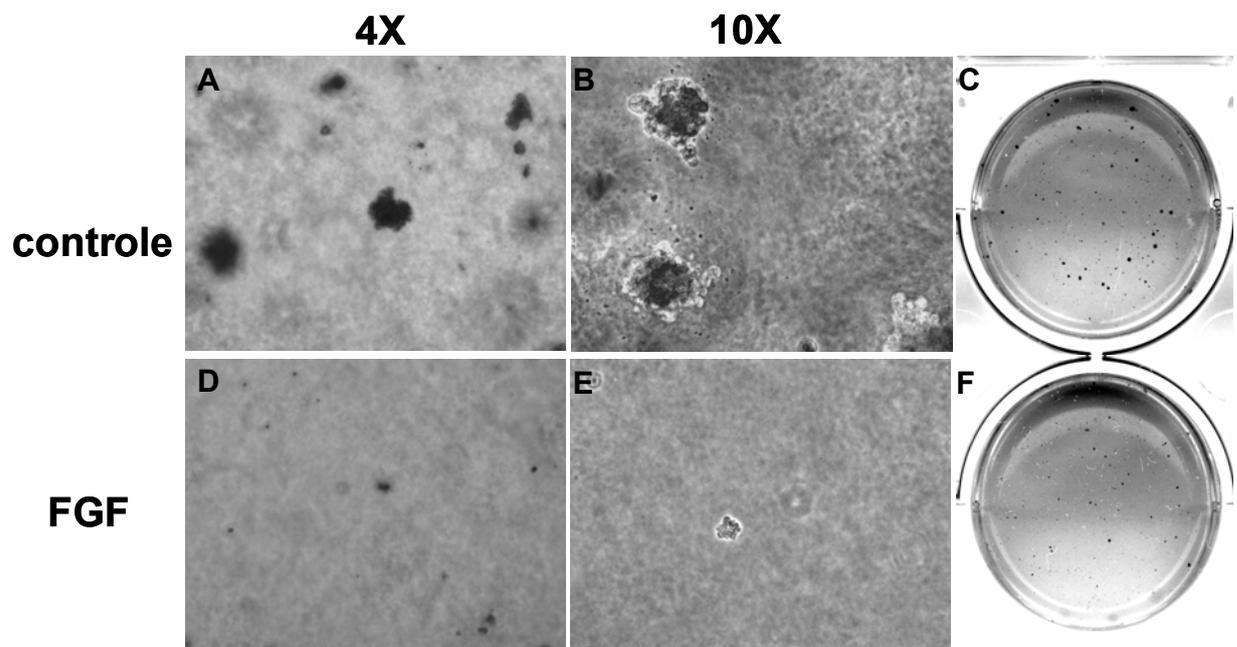


Figura 12. Células Y1 são sensíveis a FGF2 quando crescem em suspensão. Foram plaqueadas 104 células por poço em placa de 6 poços e as células foram cultivadas por 25 dias na ausência de FGF2, A, B e C, ou na presença do mesmo, D, E e F. Observar uma diminuição no número de colônias observadas quando as células são cultivadas na presença de FGF2. A e D, micrografia, aumento 4X; B e E, micrografia, aumento 10 X; C e F, visão macroscópica, onde se pode observar as colônias visíveis a olho nu, coradas com cristal violeta.

Tabela 3. Crescimento suspensão de agarose Y1

Tipo celular	Número de células plaqueadas	Nº médio de colônias obtido			% inibição			n	p	
		Controle	FGF2 2 ng/ml*	FGF2 10ng/ml*	FGF2 20 ng/ml*	70	62			65
	0,3.10 ⁴	94 ± 16	28 ± 4	35 ± 9	32 ± 1	70	62	65	1**	NA ****
Y1	10 ⁴	497 ± 81	-	-	95 ± 1	81			1***	0,03
	5.10 ⁴	4632 ± 72	-	-	1920 ± 266	58			1**	0 *****
Y1-FR 10.3 S	10 ⁴	12 ± 13	-	-	309 ± 93	-			1**	0
Y1-FR A	10 ⁴	0	-	-	86 ± 13	-			1**	NA
Y1-FR D	10 ⁴	0	-	-	10 ± 6	-			1**	0,09
Y1-FR H	10 ⁴	0	-	-	43 ± 9	-			1***	0,01
Y1-D1G	10 ⁴	281 ± 93	-	-	20 ± 11	93			1***	NA
D1G-FR 5.3	10 ⁴	9 ± 7	-	-	226 ± 30	-			1***	NA
D1G-FR 10.4	10 ⁴	8 ± 2	-	-	785 ± 90	-			1***	NA

* Tratamento sustentado com FGF2

**Experimento realizado em triplicata

*** Experimento realizado em duplicata

**** teste não aplicável, baixo número de réplicas

***** p < 0,0001 considerado p=0.

Na fig. 13 vemos o crescimento em suspensão de agarose de quatro clones Y1-FR testados. Vemos na figura que essas células não crescem bem em suspensão de agarose, entretanto, elas são capazes de formar colônias quando crescem em suspensão de agarose na presença de FGF2. O resultado é semelhante para todos os clones testados (Tabela 3). Portanto, essas células apresentam um fenótipo contrário ao observado para a célula parental, Y1 e parecem restabelecer, ao menos parcialmente, um fenótipo normal o que se deve, provavelmente, à diminuição no nível de expressão da proteína K-Ras nesses clones resistentes. Entretanto, esse fato não é suficientemente forte para tornar as células totalmente normais, uma vez que elas crescem em suspensão na presença de FGF2.

Resultados

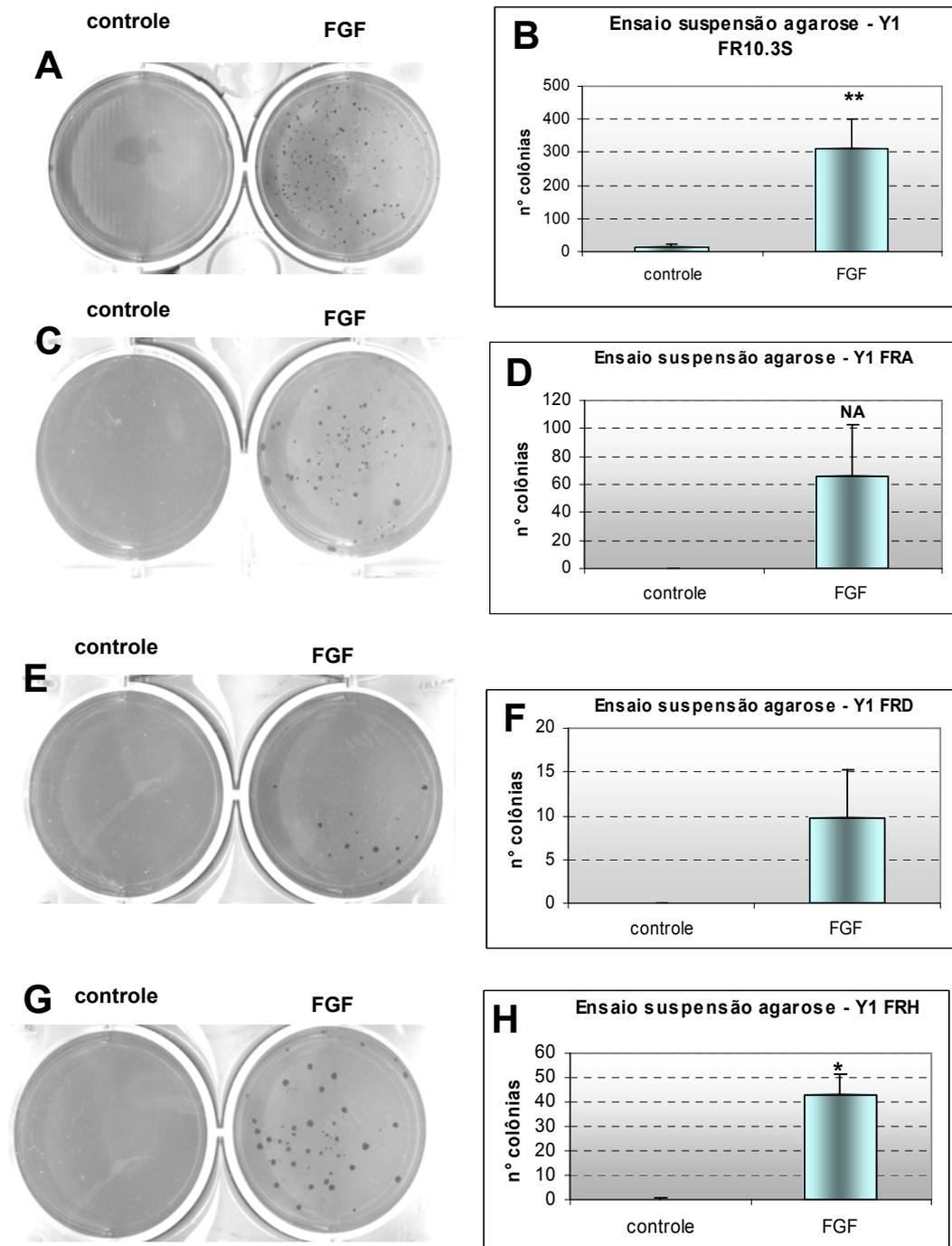


Figura 13. FGF2 estimula o crescimento de células Y1-FRs em suspensão. Foram plaqueadas 104 células por poço em placas de 6 poços e as células foram cultivadas por cerca de 35 dias na ausência ou presença de FGF2. Observar que os quatro clones testados não são capazes de crescer em suspensão, a menos que meio seja suplementado com FGF2. Placas representativas de cada experimento, colônias visíveis a olho nu, coradas com cristal violeta. (A, C, E, e G) e número médio de colônias plotados em gráfico (B, D, F e H). A barra representa nos gráficos representa o desvio padrão. (A e B) Y1-FR 10.3S, (C e D) Y1-FR A, (E e F) Y1-FR D, (G e H) Y1-FR H. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; NA, teste não aplicável devido ao baixo número de réplicas.

Resultados

As células Y1-D1G crescem muito bem em meio semi-sólido, fato já esperado uma vez que essas células são derivadas de Y1 e expressam altos níveis de Ras (Fig. 14 A a C). Quando cultivadas na presença de FGF2, no entanto, essas células crescem pobremente (Fig. 14 D), gerando algumas pequenas colônias somente visíveis ao microscópio (Fig. 14 E) e um número ainda menor de colônias visíveis a olho nu (Fig. 14 F e G). Notamos um efeito de inibição de FGF2 sobre essas células quando crescidas em suspensão de 93% (Fig. 14 H e Tabela 3). Vale destacar que aqui também as células Y1-D1G parecem mais sensíveis ao FGF2 que a célula parental, Y1.

Já as células D1G-FR não crescem bem em suspensão de agarose. Entretanto, elas são capazes de formar colônias quando crescem em suspensão de agarose na presença de FGF2 (Fig. 15 e Tabela 3). Portanto, essas células apresentam um fenótipo contrário ao observado para a célula parental, D1G, mas muito semelhante ao que foi observado para células Y1-FR.

Podemos concluir dos experimentos citados anteriormente que células com alta expressão de Ras crescem em suspensão de agarose, entretanto, o FGF2 é capaz de inibir o crescimento das mesmas. Por outro lado, a diminuição da expressão de Ras faz com que a célula se torne incapaz de crescer em suspensão. Esse resultado, no entanto, pode ser revertido quando as mesmas são cultivadas na presença de FGF2, portanto, ele sugere que as células possam formar tumores em animais quando os mesmos forem injetados com FGF2. Assim a experimentação com animais pode fornecer importantes informações a esse respeito.

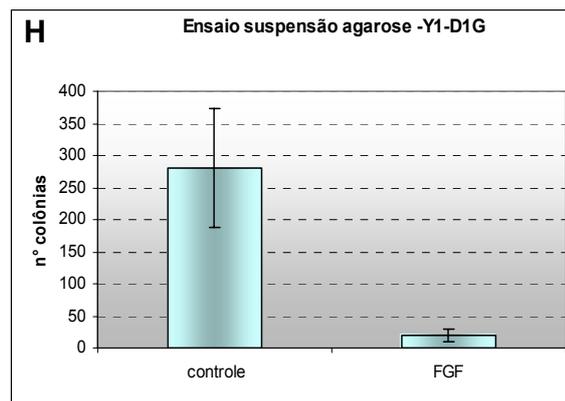
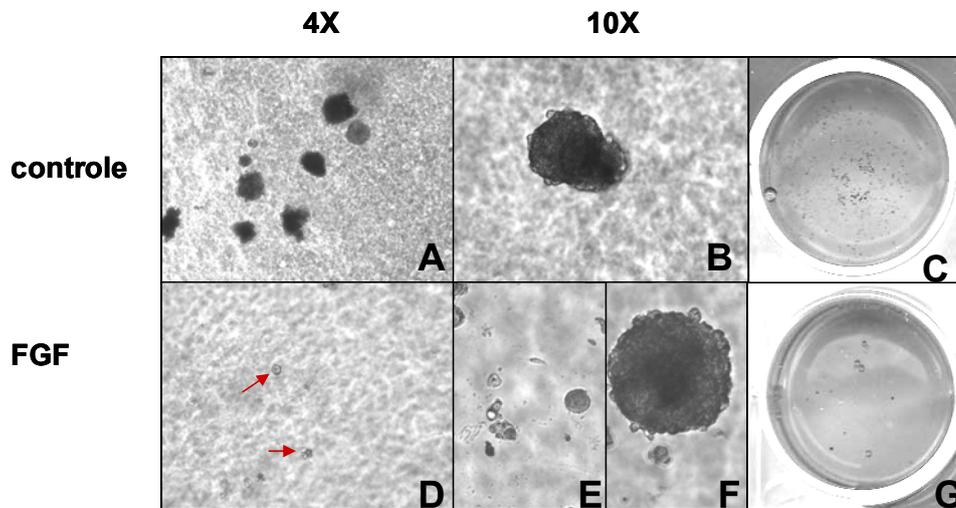


Figura 14. Células Y1-D1G são bastante sensíveis a FGF2 quando crescem em suspensão. Foram plaqueadas 104 células por poço em placas de 12 poços e as células foram cultivadas por 25 dias na ausência de FGF2, A, B e C, ou na presença do mesmo, D, E, F e G. Observar que, embora as células cresçam muito bem em suspensão (A a B), elas crescem pobremente na presença de FGF2, formando algumas colônias somente visíveis ao microscópio (setas em D e E) e algumas poucas colônias visíveis a olho nu (G). A e D, micrografia, aumento 4X; B, E e F, micrografia, aumento 10 X; C e G, visão macroscópica, onde se pode observar as colônias visíveis a olho nu, coradas com cristal violeta. (H) Resultado plotados em gráfico de um experimento em duplicata. As barras no gráfico representam o desvio padrão. Teste não aplicável devido ao baixo número de réplicas.

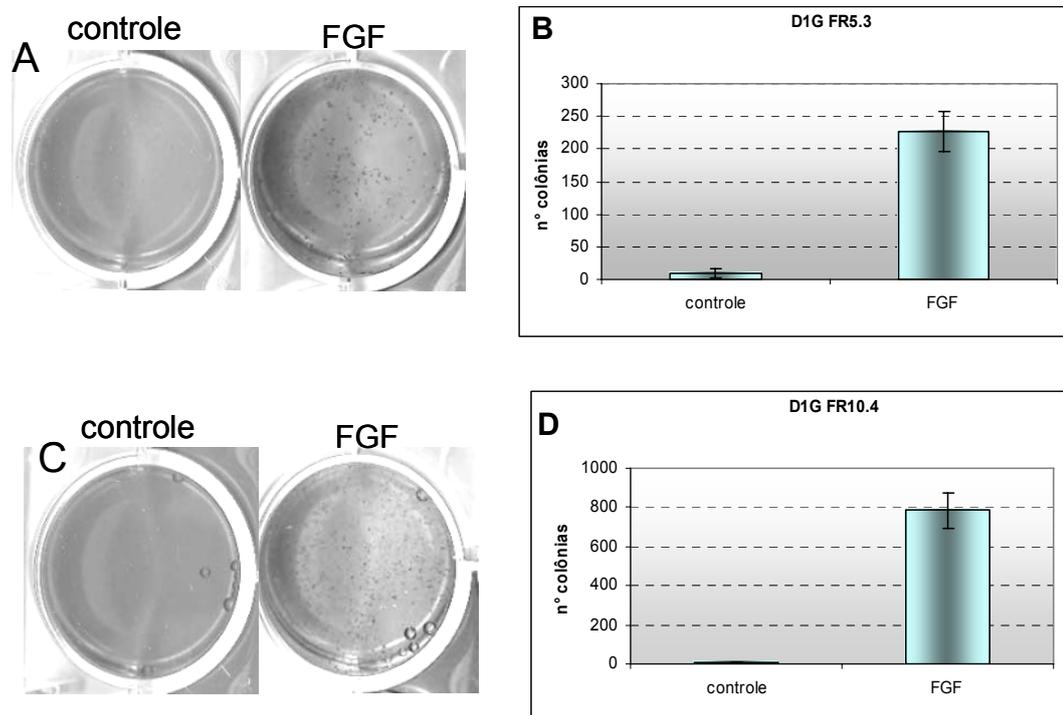


Figura 15. Células D1G-FRs só crescem em suspensão na presença de FGF2. Foram plaqueadas 104 células por poço em placa de 12 poços e as células foram cultivadas por 25 dias na ausência ou presença de FGF2. Observar o crescimento dessa células passa a ser dependente de FGF2, uma vez que não se observa formação de colônias na ausência do mesmo. (A e C) placas representativas de cada experimento onde se podem observar as colônias visíveis a olho nu, coradas com cristal violeta. (B e D) Números obtidos derivados de um experimento em duplicata. Um outro experimento com maior número de células plaqueadas resultou no mesmo padrão. As barras no gráfico representam o desvio padrão. (A e B), D1G-FR 5.3, (C e D), D1G-FR 10.4 Teste estatístico não aplicável devido ao baixo número de réplicas.

4.1.9. Potencial de Crescimento em Suspensão de Células B61 e B61-FR

Os ensaios de crescimento em suspensão mostraram que as células parentais (Balb/c 3T3) não crescem em suspensão, com exceção de um baixíssimo número de colônias observado: média de 7 colônias sem FGF2 e de 3 colônias com FGF2. Esse resultado está de acordo com o esperado, pois essas células não são tumorigênicas. O experimento foi realizado com 3.103 células/placa, em triplicata (Tabela 4).

Os ensaios de crescimento em suspensão de células B61, assim como os ensaios clonogênicos realizados em substrato sólido, mostram que essas células são

Resultados

sensíveis ao efeito citotóxico de FGF2 também quando cultivadas em substrato semi-sólido, reforçando a hipótese de que esse efeito seja dependente da proteína Ras constitutivamente ativa (Fig. 16). Nesse caso, também foram realizados dois experimentos, um com 3.103 células/placa em triplicata e outro com 104 células plaqueadas/placa em triplicata (Tabela 4). Notamos que o plaqueamento de 104 células mostrou-se mais eficiente resultando em um número proporcionalmente maior do que o observado para o plaqueamento com 3.103 células. Entretanto, em ambos os casos, a inibição do crescimento por FGF2 foi muito acentuada, atingindo 67% no primeiro caso e 75% no segundo caso. Da mesma forma com que acontece em Y1, o ensaio com 104 células B61 apresentou colônias menores em relação ao ensaio com 3.103 células. Isso se dá, possivelmente, devido à limitação de espaço e maior competição por nutrientes.

Observamos também nesse ensaio com um maior número de células, que o meio de cultura se torna rapidamente acidificado, provavelmente devido ao intenso metabolismo celular necessário para que ocorra proliferação. Por outro lado, observamos que o tratamento com FGF2 inibe o crescimento das colônias e também a acidificação de meio de cultura. Esse dado é mais um indicativo do bloqueio de crescimento por FGF2, uma vez que vemos um baixo metabolismo das células quando tratadas com FGF2.

Resultados

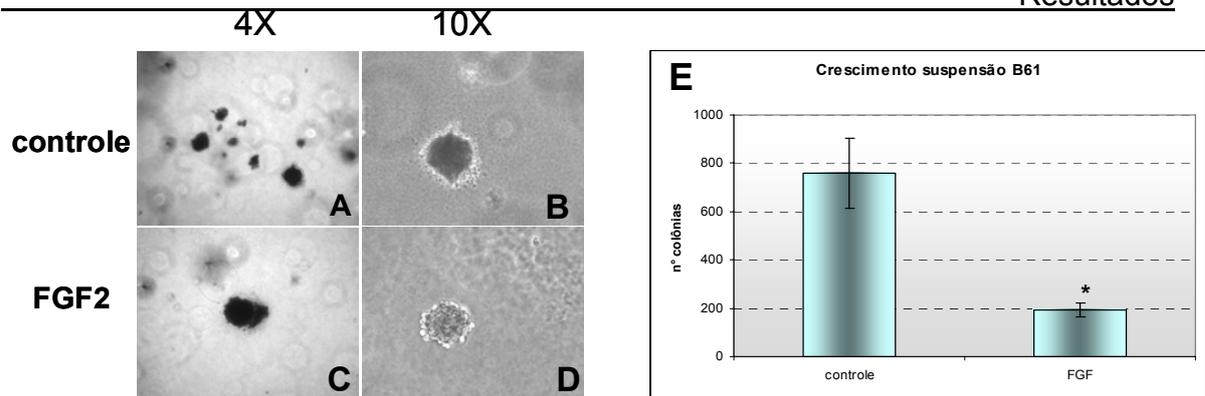


Figura 16. Células B61 são sensíveis a FGF2 quando cultivadas em suspensão. Ensaio em suspensão de agarose de B61, foram plaqueadas 104 células por poço da placa de 6 poços e as células foram cultivadas por 11 dias na ausência ou presença de FGF2. Observar a alta taxa de inibição do crescimento de colônias por FGF2. Micrografias das colônias no controle, 4x (A) e 10X (B) e tratamento com FGF2, 4x (C) e 10x (D), (E) Valores obtidos plotados em gráfico. Barras representam o desvio padrão.

As células B61-FR4, que apresentam a expressão do transgene EJ-Ras não detectável (Fig. 10), crescem pobremente em meio semi-sólido. Entretanto, o crescimento de colônias é estimulado quando as mesmas são cultivadas na presença de FGF 2. Assim, essas células dependem de FGF2 para que se desenvolvam as colônias em suspensão (Fig. 17 A e B, Tabela 4). É importante observar, no entanto, que poucas colônias são observadas quando comparamos esse ensaio com o da célula parental, B61, indicando que essas células possuem menor capacidade de crescimento em suspensão.

As células B61-FRA, por sua vez, se comportam de forma diferente. Elas crescem muito bem em suspensão na ausência de FGF2, ao contrário do que é observado para o clones FR4. Vale lembrar, no entanto, que essas células, foram selecionadas para resistência a FGF2, na presença do agente seletivo geneticina, de forma a reter o transgene EJ-RAs (H-Ras-V12). Dessa forma, essas células ainda se apresentam plenamente transformadas, o que torna essas células mais suscetíveis a crescerem em suspensão. Da mesma forma ao que foi observado em substrato sólido,

Resultados

nota-se que aqui também ocorre inibição significativa do crescimento em suspensão por FGF2 (34% de inibição) (Fig. 17 C, Tabela 4).

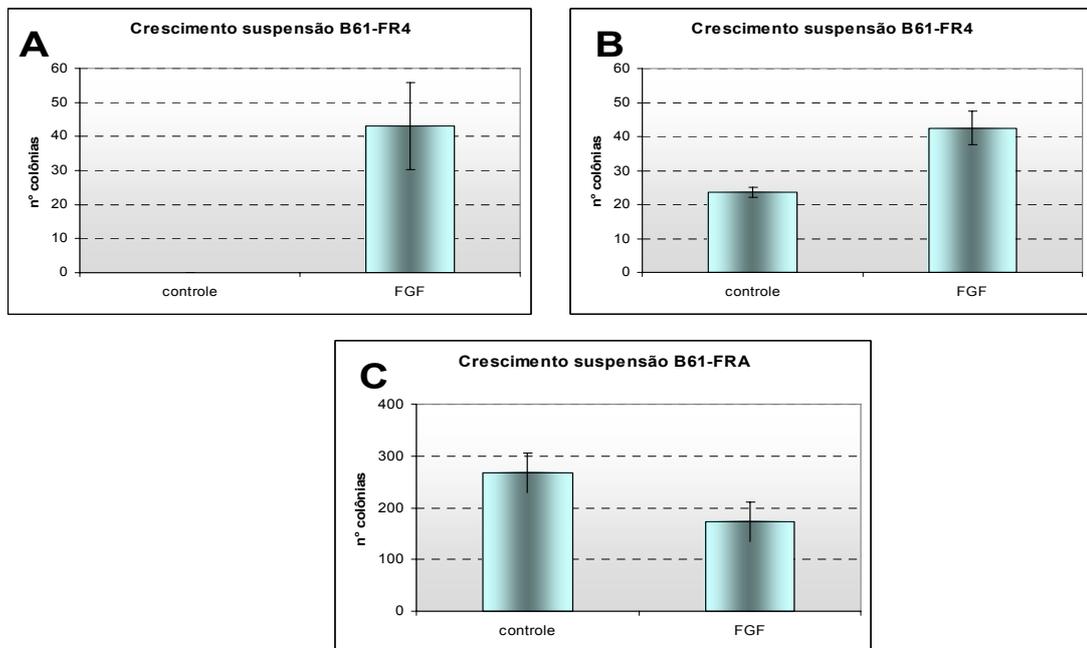


Figura 17. Células B61-FRs apresentam diferentes padrões de crescimento quando cultivadas em suspensão. Foram plaqueadas 104 células por poço em placa de 6 poços e as células foram cultivadas por 25 dias na ausência ou presença de FGF2 por 37 dias. Observar que o crescimento da célula B61-FR4 é estimulado pela presença de FGF2 (A e B), enquanto o crescimento em suspensão das células B61-FRA é inibido por FGF2 (C) Resultado de dois experimentos realizados em triplicata (C). A barra nos gráficos representa o desvio padrão.

Tabela 4. Crescimento suspensão de agarose - Balb/c 3T3 e derivadas

Tipo celular	Número de células plaqueadas	N° colônias obtido		% inibição	N **	P
		Controle	FGF2 20ng/ml*			
Balb/c 3T3	$3 \cdot 10^3$	7 ± 2	3 ± 1	-	1	-
Balb/c 3T3 - B61	$3 \cdot 10^3$	34 ± 2	11 ± 2	67	1	0
Balb/c 3T3 - B61-FR A	10^4	758 ± 143	193 ± 29	75	1	0,02
Balb/c 3T3 - B61-FR 4	10^4	268 ± 38	173 ± 38	35	2	0,002
Balb/c 3T3	$3 \cdot 10^3$		43 ± 12	-	1	0,03
Balb/c 3T3 - B61-FR 4	10^4	24 ± 2	34 ± 16	-	1	0,12

* Tratamento sustentado com FGF2

**Experimento realizado em triplicata

*** $p < 0,0001$ considerado $p=0$.

4.1.10. Células resistentes a FGF2 derivadas de Y1 são pouco tumorigênicas

Conforme demonstrado anteriormente em nosso laboratório, as células Y1 são altamente tumorigênicas e também são sensíveis a FGF2 quando tratadas *in vivo*. O trabalho de Costa mostra que a injeção de células Y1 em camundongos imunodeficientes (Balb/c Nude) leva ao rápido surgimento de tumores com um período de latência médio de 13 dias. Por outro lado, a injeção periódica de FGF2 nos animais reduz o aparecimento de tumores, sendo que dos animais tratados com FGF2, apenas 46% deles apresentam tumores (Costa, 2005).

Neste trabalho temos como objetivo saber se células derivadas de Y1, selecionadas para resistência a FGF2, são também tumorigênicas.

Para isso, células Y1-FR foram injetadas em camundongos Balb/c Nude e o aparecimento do tumor foi acompanhado por exame visual e o seu eventual crescimento foi acompanhado até que pelo menos uma das dimensões do tumor atingisse 10 mm. Cada grupo variava entre 5 e 3 animais. Para esse ensaio foram utilizadas as células Y1-FR A, FRD, FRH e FR 10.3S, os quais apresentam uma baixa expressão de K-Ras (Fig. 4).

Observamos na figura 18 que todos os 4 clones testados apresentam uma tumorigenicidade muito reduzida se comparada à célula parental Y1. De forma geral, notamos que o tempo de latência é aumentado consideravelmente para todos os clones tratados. Dois deles, apresentaram desenvolvimento de tumor em todos os animais testados (Y1-FRD e FRH). Por outro lado, os outros dois clones analisados, além de apresentarem um tempo de latência maior, também apresentaram um número reduzido de animais que desenvolveram tumor sendo que apenas 2 de 5 animais testados foram

Resultados

afetados para o clone Y1-FR 10.3 S e apenas 1 dos 3 animais testados para Y1-FRA. Esses dados nos permitem concluir que as células resistentes a FGF2 apresentam um baixo grau de tumorigenicidade, resultado que está em conformidade com os dados obtidos em ensaios de suspensão, onde essas células não são capazes de crescer ou formam pouquíssimas colônias quando cultivadas em meio semi-sólido na ausência de FGF2 (Fig. 13).

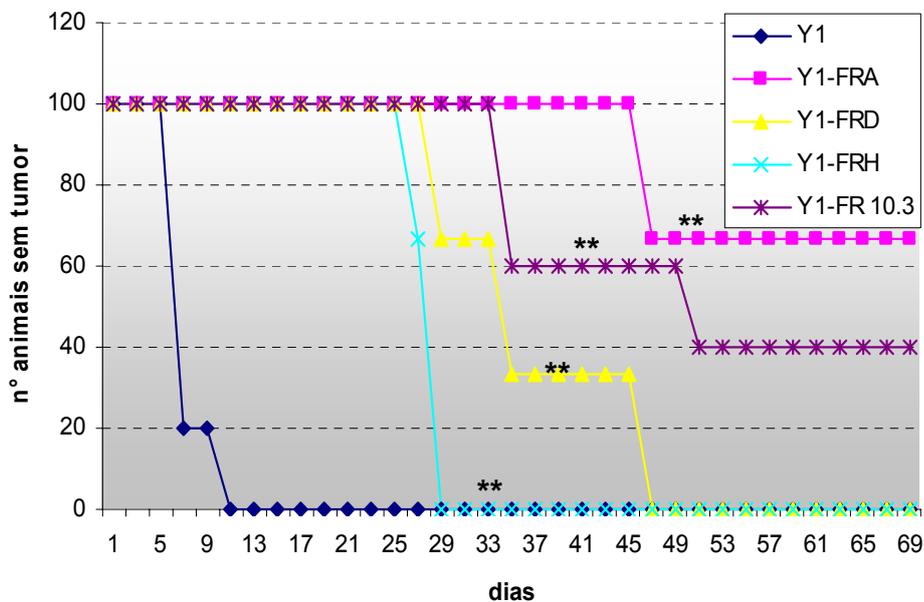


Figura 18. Células Y1-FR são menos tumorigênicas que a célula parental, Y1 Gênese de tumores em camundongos Balb/c Nude derivados de células Y1 (5 animais), Y1-FR 10.3S (5 animais), Y1-FR-A (3 animais), Y1-FR-D (3 animais) e Y1-FR-H (3 animais). Observar que as células Y1-FR apresentam maior tempo de latência para o aparecimento de tumores e que nem todos os animais desenvolvem tumor no caso de Y1-FR-H. Este último clone se destaca como sendo estatisticamente diferentes dos demais clones Y1-FR ($p < 0,05$), enquanto todos os clones resistentes são estatisticamente diferentes de Y1 ($p < 0,05$).

4.1.11. Tumorigenicidade de células Y1-D1G e derivadas

As células Y1-D1G são altamente tumorigênicas e apresentam crescimento acelerado quando injetadas em camundongos imunodeficientes Balbc/Nude. Nesse ensaio foi injetada uma suspensão de $5 \cdot 10^5$ células em meio DME sem soro por camundongo em um grupo total de onze camundongos, que foram divididos em um grupo controle (6 animais) e um grupo tratado com FGF2 (8 animais). Observamos o aparecimento de tumores em todos os animais injetados, sendo que no 11º dia começaram a aparecer os primeiros tumores e no 15º dia todos os animais já apresentavam tumores, conforme observado na figura 19 A. Observamos também que o tratamento com FGF2 não faz diferença no surgimento dos tumores, resultado contrário ao que é observado *in vitro*, onde essas células se mostraram bastante sensíveis a FGF2 tanto no crescimento em substrato sólido quanto no crescimento em suspensão, conforme mostrado no relatório anterior. Esses resultados nos causaram surpresa, porém sabemos que o tratamento no animal envolve uma série de elementos muito complexos, contidos em um microambiente que não pode ser tão facilmente controlado como em uma cultura de células *in vitro*. Os animais eram sacrificados quando pelo menos uma das medidas obtidas alcançava 10 mm. Assim, após 25 dias, o experimento pôde ser concluído (Fig. 19 B).

Nesses testes, observamos que as células resistentes a FGF2 são, de fato, menos tumorigênicas que a célula parental, Y1-D1G. Essas células apresentam um maior tempo de latência para o aparecimento do tumor em relação à célula parental, Y1-D1G, além disso, nem todos os animais desenvolvem tumor no caso das células Y1-D1G 10.4 (Fig. 19 A). Observamos também que o FGF2 exerce pouco ou nenhum

Resultados

efeito *in vivo* sobre os tumores derivados de células Y1-FR 5.3 e 10.4 (Fig. 19 C e D). Esse resultado também entra em contradição com o que foi relatado anteriormente, onde foi mostrado que as células Y1-D1-FR só crescem em suspensão quando cultivadas em meio suplementado com FGF2 (quando são cultivadas na ausência de FGF2, as mesmas não formam colônias). Os resultados em suspensão indicavam que o crescimento *in vivo* das células resistentes a FGF2 poderia ser acelerado na presença de FGF2 ou mesmo dependente de FGF2, o que seria muito desfavorável. No entanto, conforme mostrado acima, isso não ocorre. Portanto, embora esse resultado seja contrastante com o que é observado *in vitro*, ele é um resultado interessante.

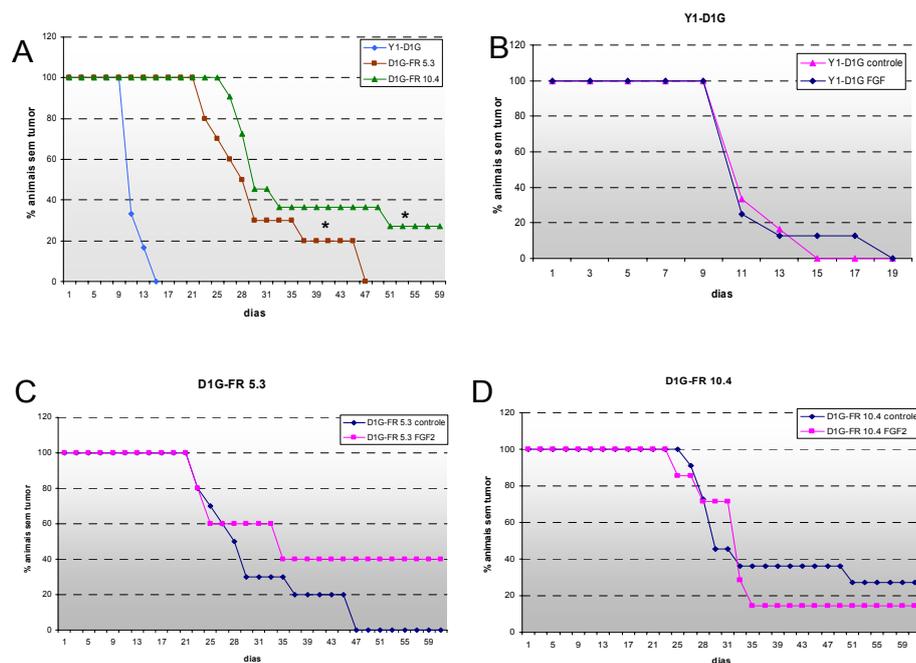


Figura 19. Células Y1-D1G-FR são menos tumorigênicas que a célula parental, Y1-D1G. (A) Gênese de tumores em camundongos Balb/c Nude derivados de células Y1-D1G (6 animais), Y1-D1G-FR 5.3 (10 animais) e 10.4 (11 animais). Observar que as células Y1-D1G-FR apresentam maior tempo de latência para o aparecimento de tumores e, para o clones Y1-D1G-FR 10.4, nem todos os animais desenvolvem tumor, embora este não seja estatisticamente diferente de Y1-D1G-FR5.3. (B) Y1-D1G com tratamento de FGF2 (8 animais) e controle (6 animais). (C) Y1-D1G-FR 5.3 com de FGF2 (5 animais) e controle (10 animais), (D) Y1-D1G-FR 10.4 com tratamento com FGF2 (7 animais) e controle (11 animais). O tratamento foi realizado com veículo apenas (DMEM sem soro) para controle e 200 ng de FGF2 diluído no veículo por animal, a cada 48 h. Em todos os casos, o tratamento com FGF2 não é estatisticamente significativo ($p < 0,05$), enquanto os clones resistentes a Fgf2 são estatisticamente diferentes da células parental, D1G ($p < 0,05$).

4.1.12. Efeito de FGF2 *in vivo* em células B61 e derivadas

Estudos anteriores e o estudo apresentado neste trabalho mostraram que as células B61 são sensíveis ao efeito citotóxico de FGF2. Para verificarmos se esse efeito era reproduzido *in vivo*, injetamos 5.10^5 células/animal em um grupo de nove animais (camundongos Balb/c), o qual foi subdividido em dois grupos. O primeiro grupo consistia de animais controle, que eram injetados apenas com veículo (DMEM) e o segundo grupo consistia de animais tratados com FGF2, no quais eram aplicadas injeções de FGF2 (200 ng, diluído em DMEM) em dias alternados.

Os resultados com B61 foram bastante animadores. Observamos que, com até 38 dias de experimento, 100% dos animais tratados com FGF2 não apresentaram crescimento de tumor (Figura 20 A), enquanto que 100% dos animais sem tratamento desenvolveram tumor, sendo que em dois desses animais o tumor atingiu o volume necessário para serem sacrificados até 25 dias (pelo menos uma das dimensões alcançou 10 mm) e o restante do grupo foi sacrificado pelo mesmo motivo com 38 dias de experimento (Figura 20 A). No grupo de tratamento, entretanto, apenas um animal dos cinco testados desenvolveu tumor cujo crescimento foi iniciado a partir do 39º dia de experimento.

Para as células B61-FRA foi utilizado um grupo de 10 animais Balb/c, que foi subdividido em dois grupos de 5 animais, um grupo com tratamento de FGF 2 e um grupo controle. Assim como para a célula B61, os tumores de B61-FRA levaram aproximadamente 13 dias para atingir o tamanho que pudesse ser visto a olho nu. Infelizmente no 13º dia 2 animais do grupo de tratamento foram perdidos (Fig. 20 B). B61-FRA mostrou ser uma célula com alto grau de tumorigenicidade, pois em 21 dias

Resultados

de experimento todos os animais foram sacrificados, devido ao crescimento acelerado dos tumores. O tratamento com FGF2, por sua vez, não apresentou nenhum efeito (Fig. 20 B). Conforme mostrado anteriormente, as células B61-FRA não perderam o Ras ativado e, provavelmente, esse é o motivo porque observamos a sua alta tumorigenicidade.

O mesmo experimento foi repetido utilizando-se as células B61-FR4. Conforme mostrado anteriormente, essas células apresentam uma expressão não detectável da construção do Ras ativado. Essas células apresentaram um maior período de latência que B61 e B61-FRA, de forma que para que o primeiro animal fosse sacrificado pelo tamanho do tumor atingido, foi necessário um mês. Para nossa surpresa, entretanto, 80% dos animais não tratados desenvolveram tumores. Além disso, o tratamento com FGF2, também agiu de forma surpreendente, inibindo o crescimento dessas células *in vivo*, sendo que apenas um dos animais tratado desenvolveu tumor, ainda assim com tempo de latência maior do que observado para os animais controle (Fig. 20 C). Esse resultado é muito contrastante com os resultados obtidos *in vitro*, e sua explicação ainda não é conhecida. Cabe aqui ressaltar que a quantidade de FGF2 utilizada para o tratamento dos animais, é muito maior do que a utilizada em experimentos *in vitro*. Tal fato poderia ser responsável, ao menos parcialmente, para o resultado encontrado. Se isso é verdade, o resultado se torna importante, pois indica que as células que resistissem a uma etapa do tratamento poderiam ser eliminadas utilizando-se uma dose maior e/ou por um período maior de tratamento.

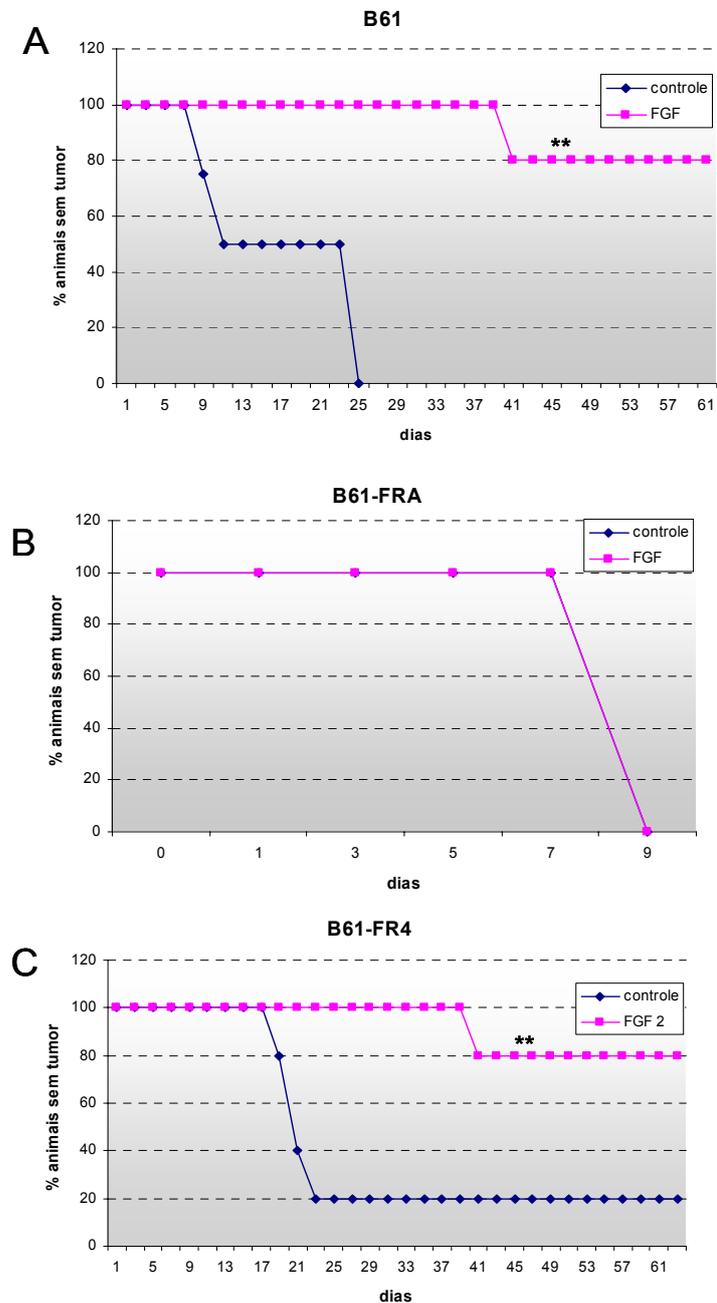


Figura 20. Células B61 e B61-FR4 são sensíveis a FGF2 *in vivo*. (A) Gênese de tumores em camundongos Balb/c derivados de células 3T3-B61: controle (4 animais), tratados com FGF2 (5 animais). Observar que a alta sensibilidade das células 3T3-B61 *in vivo* ($p < 0,01$). (B) Gênese de tumores em camundongos Balb/c derivados de células B61-FRA: controle (4 animais), tratados com FGF2 (5 animais). Observar que essas células se mostram altamente tumorigênicas e apresentaram resistência a FGF2 *in vivo*. (C) Gênese de tumores em camundongos Balb/c derivados de células B61-FR4: controle (4 animais), tratados com FGF2 (5 animais). Observar o maior período de latência para o aparecimento de tumores e a sensibilidade dessas células a FGF2 *in vivo* ($p < 0,05$).

4.2. Parte II

4.2.1. Ativação da via de PKC inibe a proliferação de células transformadas por K-Ras

Bivona e colaboradores (2006) mostraram que a ativação de PKC em células que superexpressam K-Ras na forma ativada leva essas células a entrarem a apoptose e esse efeito é dependente da fosforilação da serina S181, alvo de PKC.

Em analogia ao que foi observado por Bivona e colaboradores (2006), elaboramos a hipótese de que a ativação de PKC em células Y1 resultaria em morte celular, uma vez que essa célula apresenta elevados níveis da proteína K-Ras total, inclusive na forma ativada, K-Ras-GTP. Gostaríamos também de esclarecer se há uma correlação entre a inibição da proliferação observada para FGF2 e morte celular induzida pela ativação de PKC. Embora já seja conhecido que o tratamento com FGF2 induz senescência e não apoptose, sabemos que FGF2 é capaz de ativar a via de PKC e, dessa forma, esse mecanismo poderia ser um dos fatores contribuintes para o efeito inibitório de FGF2. Ou ainda, a fosforilação de Ras por PKC poderia desencadear uma resposta inibitória, mas não apoptótica.

Para testar a ativação de PKC e seus possíveis efeitos, utilizamos um éster de forbol, o PMA, que ativa diferentes isoformas de PKC. Primeiramente, precisamos testar se PMA realmente ativa PKC em células Y1. Para obter tal resposta utilizamos uma estratégia que responderia indiretamente tal questionamento, ou seja, testamos a indução da atividade de ERK 1/2 por PMA em célula Y1 carenciada para soro. Conforme mostrado na figura 21, PMA é capaz de promover a fosforilação de ERK 1/2 em células carenciadas para soro, e esse efeito é bloqueado quando tratamos a célula

Resultados

previamente por 1h com os inibidores de PKC Bisinmaleimida I e Go 6983, indicando que a ativação de ERK 1/2 por PMA passa pela ativação de PKC.

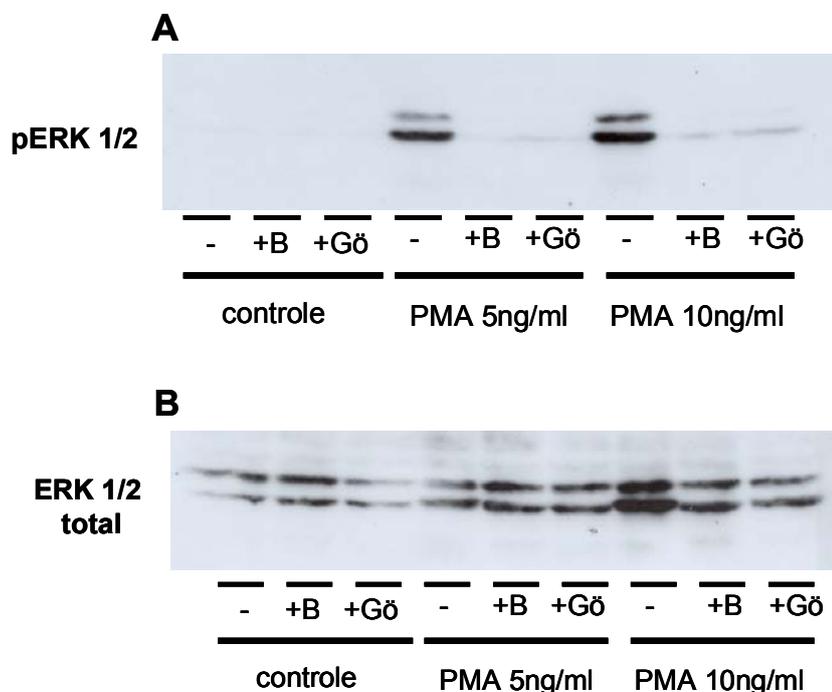


Figura 21. PMA estimula fosforilação de ERK 1/2 em células Y1. (A) Western blot para ERK 1/2 fosforilada. Células carenciadas para soro por 48 h (controle) foram estimuladas com PMA (5 e 10 ng/ml) por 10 min. O tratamento com os inibidores de PKC, Bisinmaleimida I (+B) e Gö 6983 (+Gö), foi realizado 1 h antes do tratamento com PMA. (B) Western blot para ERK 1/2 total, utilizado para controle da quantidade de proteína aplicada.

Na figura 22, observamos que o tratamento das células com PMA por 24 h promove uma intensa morte celular em células Y1, resultando em praticamente 100% de inibição (Fig. 22 A). Esse tratamento é ainda mais severo do que o observado para FGF2. Entretanto, é sabido que PMA possui um efeito duplo e antagônico. Um tratamento curto com PMA leva à ativação de PKC, entretanto, tratamentos longos levam a uma ativação inicial e posterior repressão de PKC. Portanto, testamos também a sensibilidade de células Y1 em tratamentos de 2 h com PMA, conforme o protocolo esquematizado na figura 22 B. Observamos nessa figura que o tratamento com PMA

Resultados

por apenas 2h é capaz de promover intensa morte celular em células Y1 (86%), semelhante ao que é observado para o tratamento com 24 h, assim passamos a adotar o primeiro protocolo como protocolo padrão. Na tabela 5 resumimos os efeitos de PMA sobre as células Y1 em ensaio clonogênicos.

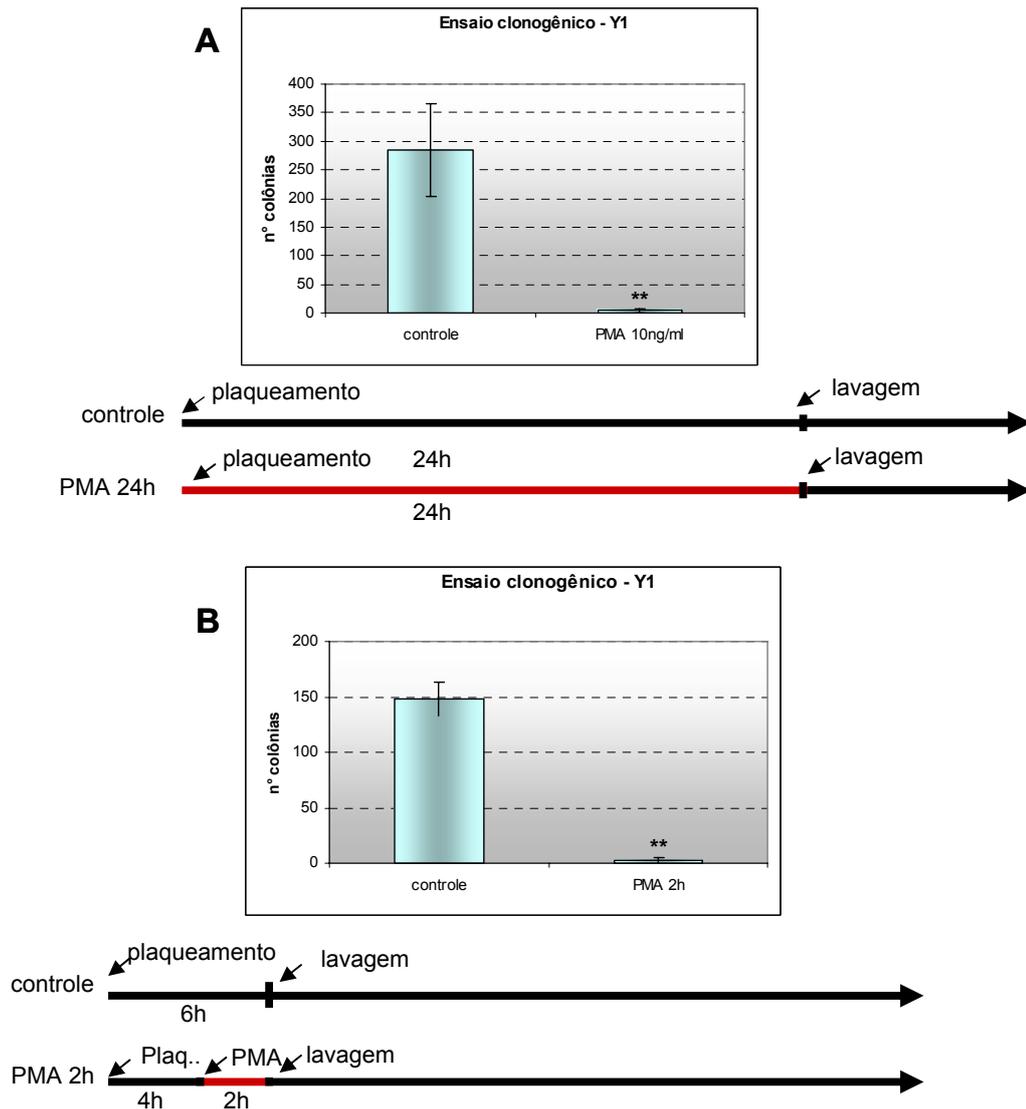


Figura 22. PMA causa morte em células Y1. Ensaios clonogênicos para células Y1 tratada com PMA (10ng/ml) conforme o protocolo esquematizado embaixo de cada figura. (A) 24h de tratamento. Média de três experimentos realizados em triplicata. Observar que as células são bastante sensíveis a PMA.(B) PMA: 2h de tratamento. Média de um experimento realizado em triplicata. Um segundo experimento, com um maior número de células plaqueadas apresentou resultado muito semelhante. Observar que um tratamento de apenas 2h com PMA é suficiente para inviabilizar 86% das células. Barras nos gráfico representam desvio padrão. **p<0,01.

Resultados

Esses dados podem ser confirmados quando submetemos as células Y1 a um ensaio de proliferação celular. Nota-se que essas células são incapazes de proliferar na presença de FGF2 (Fig. 23 A) ao contrário do que ocorre nas placas controle, onde não foi adicionado nenhum tratamento, e onde observamos intensa proliferação. Da mesma forma, a adição de PMA ao meio de cultura também inibe a proliferação celular. Como podemos observar na figura 23 B, quando plotamos os valores obtidos em gráfico semi-log, torna-se fácil concluir que enquanto o FGF2 inibe a proliferação celular, ativando um processo de senescência celular, o PMA causa um efeito ainda mais drástico, levando, inclusive, a uma diminuição no número de células observadas, indicando morte celular.

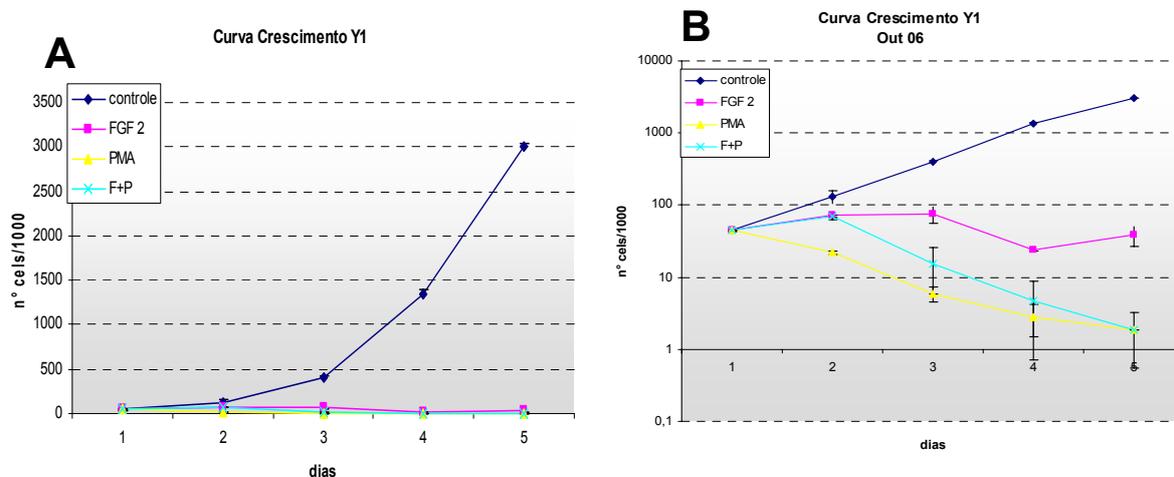


Figura 23. Células são bastante sensíveis a PMA. Foram plaqueadas $5 \cdot 10^4$ células em placas P35 e as células foram mantidas em FGF2 (2ng/ml) ou PMA (10ng/ml) durante todo o experimento ou na ausência de tratamento (controle). As células eram coletadas em duplicata a cada 2 dias, contadas e os valores foram plotados em um gráfico. (A) Curva de crescimento para Y1, (B) Y1 gráfico semi-log. Nota-se que a célula Y1 é bastante sensível a FGF2, mas se mostra ainda mais sensível a PMA ou a uma combinação das duas substâncias. No gráfico semi-log podemos observar que o tratamento com PMA ou PMA+FGF2 resulta em uma grande diminuição do número de células, indicando morte celular. Barras representam desvio padrão.

Resultados

Tabela 4. Tratamento PMA - Y1

Tipo celular	Número de células plaqueadas	N° médio de colônias obtidas				% inibição	n**	p***	
		Controle	PMA 2ng/ml*	PMA 5 ng/ml*	PMA 10 ng/ml*				
Y1	10 ³	72 ± 16	-	-	1 ± 1	-	99	2	0
	3.10 ³	243 ± 48	27 ± 19	-	2,6 ± 2	89	99	3	0/0
	5.10 ³	475 ± 45	-	-	6 ± 1	-	96	1	0,003
	10 ⁴	872 ± 24	47 ± 19	11 ± 2	23 ± 5	94	99	97	0/0/0

* Tratamento PMA 24 h

**Experimentos realizados em triplicata

*** p < 0,0001 considerado p=0.

Tornou-se importante saber se a morte celular causada por PMA era exclusiva para esse agente ou se poderia ser generalizada para agentes que ativam PKC em geral. Assim, como um segundo agente de ativação de PKC utilizamos a Briostatina I, um outro ativador de PKC, não carcinogênico (Kortmansky e Schwartz, 2003). Na figura 24, observamos o resultado de dois ensaios clonogênicos realizados com PMA e Briostatina I. Nota-se que a Briostatina I, assim como o PMA, causa praticamente 100% de inibição.

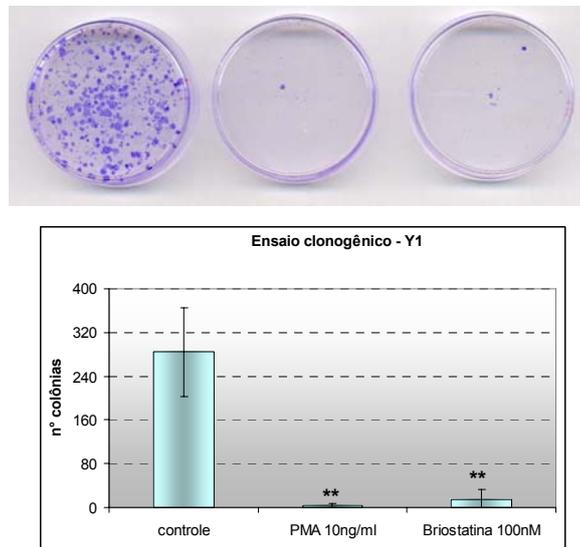


Figura 24. Briostatina causa morte em células Y1. Ensaio clonogênico para células Y1 tratada com PMA (10ng/ml) ou Briostatina I (100uM) por 24 ou não tratadas (controle). Média de dois experimentos realizados em triplicata. Observar que o tratamento com Briostatina I é suficiente para inviabilizar 97% das células. P<0,01. Barras representam desvio padrão. **p<0,01.

Resultados

Para mostrar que o efeito de PMA é específico para a ativação de PKC, fizemos um ensaio onde as células foram incubadas na presença do inibidor de PKC, Gö 6983, por 1 h antes do tratamento. Posteriormente, o PMA foi adicionado e deixado por 24 h, quando então o meio foi lavado e trocado. Como podemos ver na figura 25 A, a adição do inibidor de PKC protegeu contra a morte induzida por PMA, resultando em 82% de proteção. Na figura 25 B visualizamos o mesmo experimento realizado com FGF2, entretanto, observamos aqui que o inibidor de PKC não tem qualquer efeito protetor contra FGF2, indicando que o efeito de FGF2 não passa por PKC.

Na figura 26 podemos observar os efeitos morfológicos observados em células Y1 após tratamento com FGF2 por 24 e 48 h. Nas figuras 26 A e D, vemos células na condição controle, crescendo em meio completo, DMEM + 10% SFB. As células apresentam-se achatadas, com núcleo e nucléolo evidentes. Podemos observar também que, conforme o esperado, ocorre um aumento no número de células observadas após 24h. Por outro lado, o tratamento com FGF2 faz com que ocorra um arredondamento das células, tornando-as mais refringentes. Observamos também, que o crescimento ou aumento no número de células é mínimo ou mesmo nulo quando as células são tratadas com FGF2 (Fig. 26 B e E). Podemos observar ainda nessa figura, que o tratamento com PMA causa alterações ainda mais drásticas nas células, causando um intenso arredondamento e descolamento das mesmas, levando ainda a uma diminuição no número de células observadas (Fig. 26 C e F).

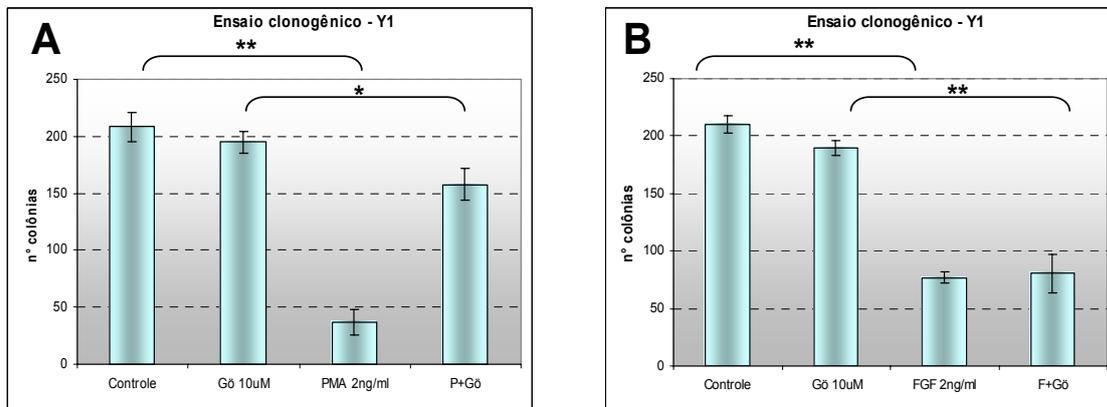


Figura 25. Inibidores de PKC protegem células Y1 contra a morte causada por PMA mas não por FGF2. Ensaios clonogênicos para célula Y1 controle ou tratadas com Gö 6983 sozinho ou em combinação com PMA (2ng/ml) (A) ou FGF2 (2ng/ml) (B). Experimentos representativos de dois experimentos realizados em triplicata. O inibidor de PKC, Gö6983, foi adicionado 1h antes de ser iniciado o tratamento com PMA ou FGF2. Notar que o inibidor de PCK protege contra a morte causada por PMA (A), mas não contra a morte causada por FGF2 (B). Barras representam desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

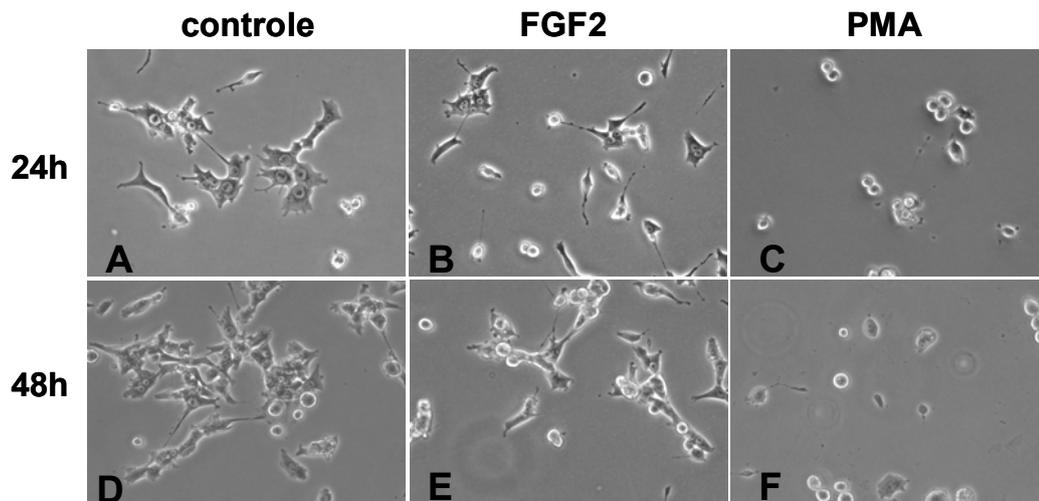


Figura 26. Efeitos morfológicos dos tratamentos com PMA e FGF2. As células forma plaqueadas no dia 0 e após 24 e 48 h de tratamento com FGF2 ou PMA, campos microscópicos representativos de cada condição foram fotografados. (A e D) controle, nenhum tratamento foi adicionado, observar que ocorre um aumento no número de células. (B e E) tratamento com FGF2 (2ng/ml), notar que o tratamento com FGF2 deixa as células mais arredondadas e refringentes, e não ocorre aumento significativo do número de células. (C e F) tratamento com PMA (10ng/ml), Observar o intenso arredondamento celular, que vai resultar em descolamento das células da placas e a diminuição do número de células observadas quando comparamos com o controle.

4.2.2. Morte celular induzida por PKC é específica para células transformadas

Tornou-se então importante saber se o efeito de PMA era específico para células transformadas com K-Ras. Assim, desenhamos experimentos com diferentes linhagens celulares que poderiam responder tal questionamento. Uma das linhagens testadas foi a AR-1, revertente não tumorigênico de Y1, que perdeu a amplificação do gene K-Ras. Conforme observamos na figura 27 A, as células AR-1 são insensíveis ao efeito negativo de FGF2 (24 h) e PMA (24 h). Notamos também que fibroblastos imortalizados não tumorigênicos Balb/c 3T3 e 3T3 Swiss são totalmente insensíveis a tratamentos com FGF2 (24 h) ou PMA (24 e 2 h, respectivamente) (Fig. 27 B e C).

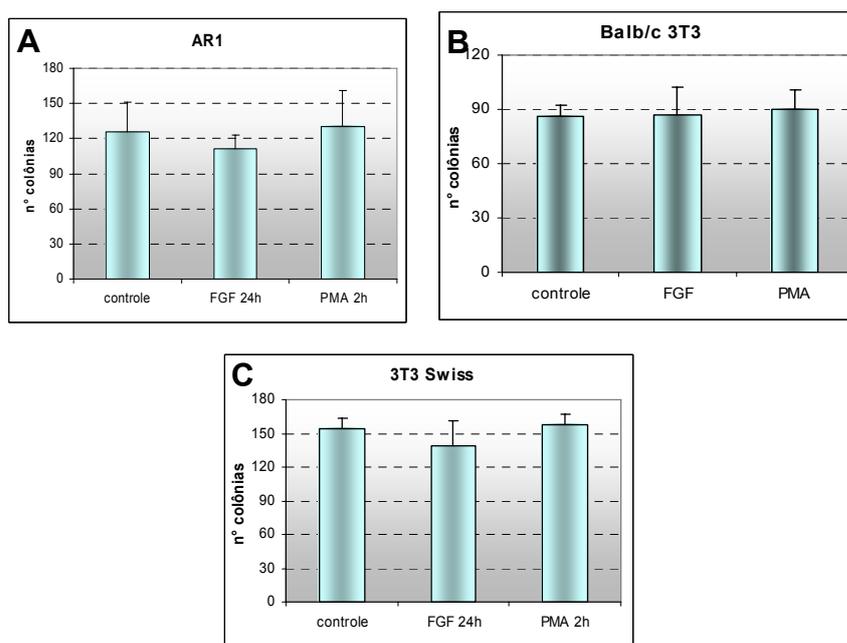


Figura 27. Células que não possuem o gene K-Ras amplificado são resistentes a PMA. Ensaio clonogênico para célula: (A) AR-1, clone revertente de Y1. FGF2 (2 ng/ml), tratamento por 24 h; PMA (10 ng/ml), tratamento por 2h. (média de dois experimentos realizado em triplicata) (B) Balb/c-3T3, (2 ng/ml), tratamento por 24 h; PMA (10 ng/ml), tratamento por 24 h (média de 1 experimento realizado em triplicata), (C) 3T3 Swiss, FGF2 (2 ng/ml), tratamento por 24 h; PMA (10 ng/ml), tratamento por 2h (média de 1 experimento realizado em triplicata). Observar que todas as linhagens acima, não tumorigênicas, não são sensíveis a PMA ou FGF2. Barras representam desvio padrão. Nenhum tratamento, em nenhum dos tipos celulares, resultou em diferença estatisticamente significativa.

Resultados

Por outro lado, notamos na figura 28 que células B61, que são derivadas de Balb/c 3T3 transformadas pelo oncogene EJ-Ras humano (H-Ras), são sensíveis à morte celular por PMA, onde observamos um efeito de cerca de 46% de morte em 24 h de tratamento (Fig. 28 A). Entretanto, se tratarmos essas células por um período menor, 2 h e 6 h, podemos observar uma maior resistência por parte dessas células, cerca de 25% de morte para tratamento de 2 h e 30% de morte para o tratamento de 6 h (Fig. 28 B). Esse resultado vai ao encontro do que é observado para Y1, onde o tratamento de apenas 2 h é eficiente para eliminar quase 90% das células (Fig. 22 B). Assim, concluímos que o efeito de morte induzido por PMA é exclusivo para células transformadas, e particularmente eficiente para aquelas transformadas por K-Ras.

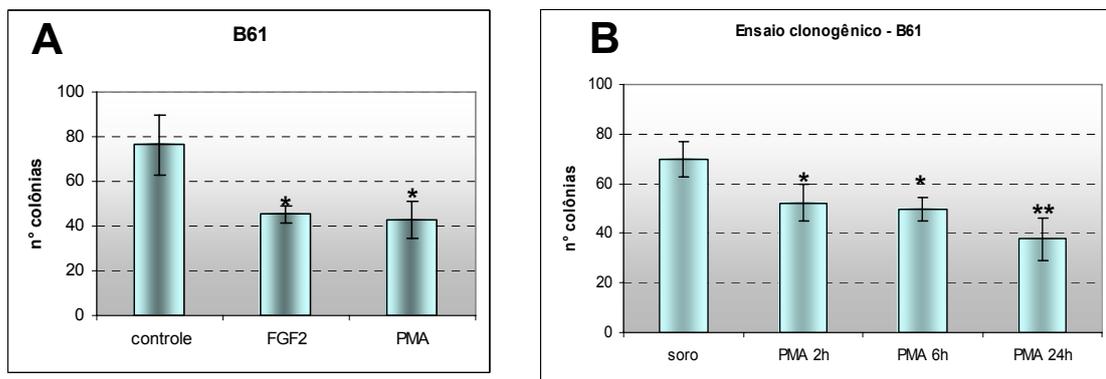


Figura 28. Células com H-Ras ativado são pouco sensíveis a PMA. Ensaio clonogênico para célula B61. Observar que as células B61 são sensíveis a PMA por 24 h, assim como a FGF2 (A), porém, tratamentos mais curtos (2 h e 6 h) mostram uma baixa sensibilidade (B) Cada um dos resultados mostrados são derivados de um experimento realizado em triplicata, onde foram plaqueadas 500 células/placa. Barras representam desvio padrão. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Gostaríamos também de saber se há uma correlação entre a morte induzida por PMA e a quantidade de K-Ras expressa. Para isso, verificamos se as células selecionadas para resistência a FGF2, que possuem a expressão de Ras extremamente reduzida, seriam resistentes também a PMA. Na figura 29 A, notamos

Resultados

que célula Y1-FR3, isolada previamente em nosso laboratório, e que mantém a alta expressão de K-Ras, inclusive altos níveis de K-Ras-GTP, é bastante sensível a PMA (94%). Por outro lado, na figura 29 B, observamos que a célula Y1-FR 10.3 S, que possui uma baixíssima expressão de K-Ras, é muito mais resistente que células Y1-FR3 e a célula parental, Y1, embora ainda seja sensível a PMA (57%). Da mesma forma, outros clones selecionados para resistência a FGF2, com baixa expressão de K-Ras (Fig. 29 C, D e E) apresentam resistência em níveis semelhantes aos observados para a célula Y1-FR 10.3 S. Assim, concluímos que a sensibilidade a PMA parece depender, ao menos parcialmente, da quantidade de K-Ras ou ainda, de K-Ras-GTP. O fato de que células resistentes a FGF2 são sensíveis a PMA juntamente com a observação anterior de que inibidores de PKC não protegem as células contra o efeito inibitório de FGF2 mas protegem contra PMA indicam que os efeitos de FGF2 e PMA são independentes e divergem em algum ponto ainda não conhecido.

Tornou-se importante saber se o efeito de PMA também era observado quando as células eram cultivadas em meio semi-sólido. Na figura 30 vemos um ensaio de suspensão de agarose em que as células foram cultivadas na presença de meio completo (10%SFB) e também na presença de meio completo adicionado de 20 ng/ml de PMA. Notamos o surgimento de muitas colônias de células Y1 quando as mesmas são cultivadas em meio semi-sólido, entretanto, a presença de PMA resulta em praticamente 100% de inibição, portanto, concluímos que PMA é tóxico para as células Y1 independente do ancoramento das mesmas a um substrato sólido.

Resultados

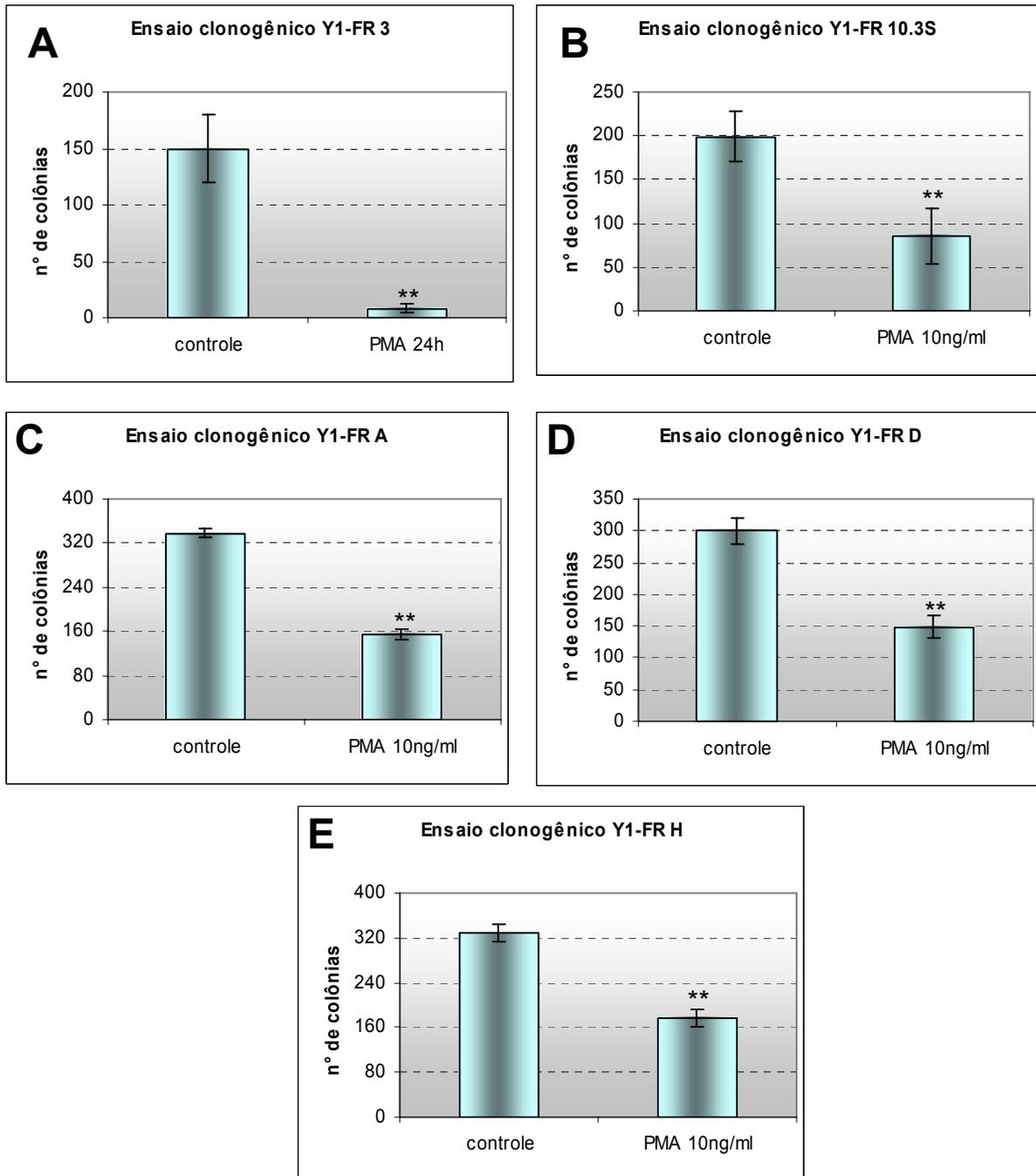


Figura 29. Células com baixa expressão de K-Ras apresentam maior resistência a PMA. Ensaios clonogênicos para célula Y1-FR. Observar que as células Y1-FR3, que possuem alta expressão de K-Ras, apresentam alta sensibilidade a PMA (A), enquanto os demais clones Y1-FRs, que possuem baixa expressão de K-Ras são menos sensíveis (B a D). PMA, 10ng/ml, tratamento 24h. A e B, resultados de dois experimentos em triplicata. C a E, resultados de um experimento em triplicata. Barras representam desvio padrão. ** $p < 0,01$.

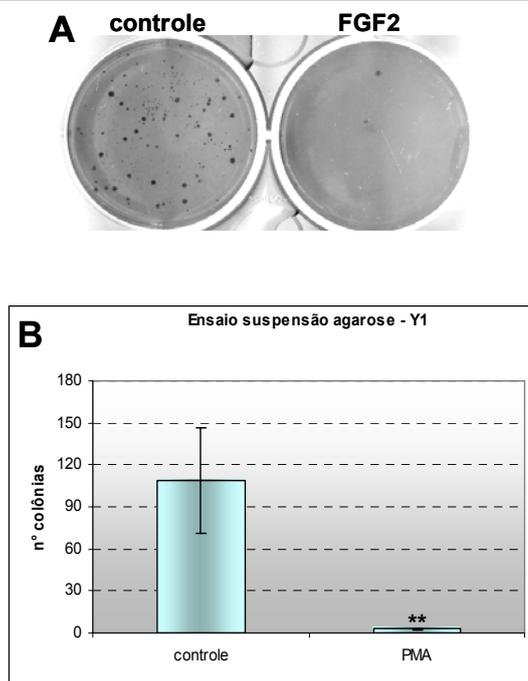


Figura 30. Células Y1 são bastante sensíveis a PMA quando cultivadas em suspensão. Observar em (A) duas placas representativas, uma de cada condição. (B) resultados de dois experimentos realizados em triplicata. Plaqueadas 104 células/placa, tratamento sustentado com PMA a 10ng/ml. Barras representam desvio padrão. ** $p < 0,01$.

4.2.3. Morte celular induzida por PKC é não apoptótica

Para saber o tipo de morte celular induzido por PMA em células Y1 realizamos alguns ensaios que poderiam responder a tal pergunta. Primeiramente, testamos a ativação de caspases, para saber se o tipo de morte celular era apoptose. Na figura 31, vemos um western blot para detecção de caspase 3 e outro para caspase 7, respectivamente. Nesse, ensaio, os anticorpos utilizados reconhecem a caspase total, ou seja, tanto a proteína na sua forma inativa, quanto a proteína clivada, isto é, ativada. Assim, espera-se o aparecimento de uma banda de maior mobilidade eletroforética quando ocorre a clivagem e conseqüente ativação da caspase. Como pode ser observado na figura 31, o tratamento com PMA por 9 horas não é capaz de ativar as caspases 3 e 7, assim como um tratamento mais longo, por 24 h. Entretanto, a ativação

das caspases é detectada quando as células são tratadas com 5% DMSO, um agente que causa, sabidamente, a entrada em apoptose.

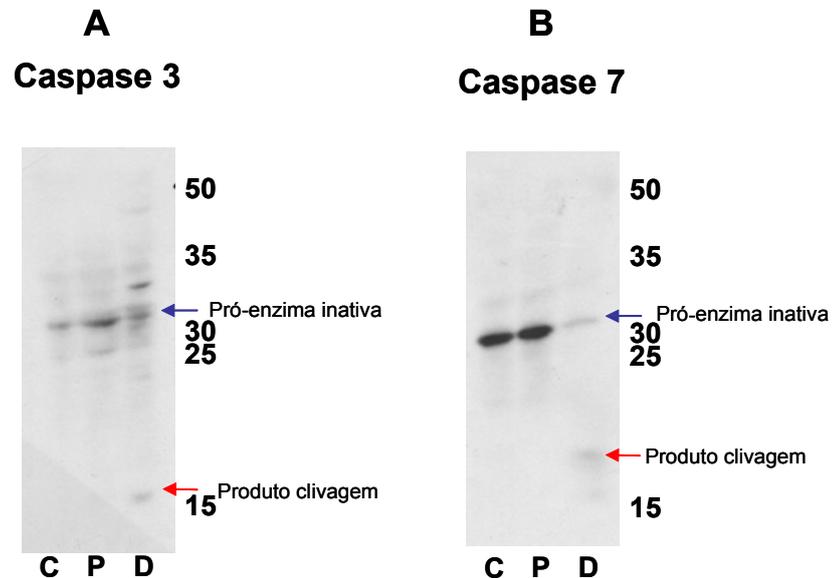


Figura 31. Tratamento com PMA não ativa caspases. Western blots para a detecção de caspase total. (A) Caspase-3, (B) Caspase-7. Observar que tanto para o controle quanto para o tratamento com PMA o anticorpo só é capaz de detectar uma banda com cerca de 33Kb, que corresponde à pró-enzima inativa. Por outro lado, no tratamento com 5%DMSO (controle positivo) observa-se a presença de uma banda de maior mobilidade eletroforética, correspondente à um produto de clivagem da pró-enzima, indicando atividade enzimática.

4.2.4. O tratamento com PMA induz senescência em células Y1

Sabemos que o efeito inibitório de FGF2 sobre as células Y1, passa, pelo menos em alguma etapa, pela indução de uma senescência atípica (bloqueio em S e não em G1) que leva essa célula a parar de se proliferar. Testamos, portanto, se ocorre a indução da senescência em células Y1 quando tratadas com PMA. Utilizamos como sinalização da indução de senescência a ativação da β -galactosidase no pH 6 que gera um precipitado azul quando na presença do substrato X-gal, marcando assim as células senescentes (Dimri et al., 1995).

Resultados

Como podemos observar na figura 32, células Y1 tratadas com PMA por 8 h mostram um grande percentual de células que apresentam coloração azulada, indicativa do estado de senescência. Esse efeito parece ser ainda mais acentuado nas células carenciadas para soro. Por outro lado, poucas células são marcadas quando as mesmas são tratadas com soro ou ainda nas não tratadas, tanto carenciadas para soro quanto para aquelas que foram mantidas em meio completo, com 10% SFB. No entanto, é importante observar que as células têm sua morfologia extremamente modificada pelo tratamento com PMA e mantê-las por um período mais longo na presença de PMA resulta em uma intensa perda de células, que se desprendem da placa e não mais proliferam. Dessa forma, ao contrário do que está descrito classicamente para indução de senescência, onde as células se tornam mais achatadas e espalhadas e se mantêm presas a placa por um período indeterminado sem se dividir, isto não parece ocorrer com a senescência induzida por PMA. Portanto, a indução do estado de senescência parece ser apenas o início de um processo que culminará com intensa morte celular, embora o mecanismo pelo qual ocorre a morte celular ainda não tenha sido definido.

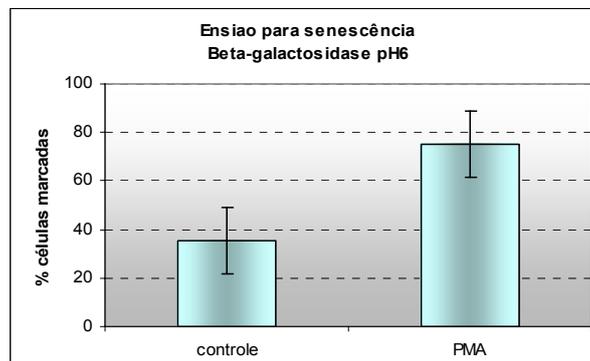


Figura 32. Tratamento com PMA induz senescência atípica. Células em crescimento exponencial, não tratadas (controle), apresentam um baixo percentual de células marcadas, enquanto que o tratamento com PMA (10 ng/ml por 8h) resulta em intensa marcação para β -galactosidase, indicativa da entrada em senescência. Observar que 75% das células tratadas encontram-se marcadas.

4.2.5. Seleção de clones resistentes a PMA

Na mesma linha de raciocínio adotada anteriormente quando foram selecionados clones para resistência a FGF2, foram realizadas tentativas de isolamento de clones resistência a PMA. Para isso, foram plaqueadas 3.10^5 células em duas placas independentes e deixadas para que se desenvolvessem colônias visíveis a olho nu. As células foram cultivadas por 30 dias e o meio era renovado 3 vezes por semana, adicionando-se 10 ng/ml PMA a cada vez que o meio era trocado. Foram obtidos cerca de 160 clones por placa. Portanto, observamos uma sensibilidade de 99.95% de células Y1 na presença de PMA em tratamento sustentado (Fig. 33 A). Foram isolados dez clones a partir de duas placas independentes, no entanto, apenas um deles sobreviveu. Ele foi denominado Y1-PR 5.1 (**Y1-“PMA resitant” clone 5, placa 1**). Uma segunda seleção foi realizada fazendo-se uso do mesmo protocolo. Nessa segunda seleção (Fig. 33 B) foram isoladas 9 colônias (3/placa), denominadas Y1-PR A, B C, D, F, G,H, I e J. Dessas, apenas 7 sobreviveram e foram expandidas e congeladas.

Sabemos que a sensibilidade a PMA está relacionada com a quantidade de proteína K-Ras presente na célula. Por isso, resolvemos investigar o padrão de expressão dessa proteína nos clones selecionados para resistência a PMA.

Conforme vemos na fig. 34 podemos observar que o nível de expressão de K-Ras é variável entre os diferentes clones, sendo que alguns deles apresentam redução na expressão de K-Ras (PR-B e H), enquanto outros mantêm elevados níveis de expressão de K-Ras (PR-C, E ,F e G). Curiosamente, notamos que após algum tempo em cultura, alguns clones que apresentaram uma quantidade de K-Ras reduzida, após algumas passagens em cultura, passaram a apresentar maiores quantidade de K-Ras,

Resultados

semelhante à quantidade apresentada para célula parental (PR-5.1 e A). Assim, o efeito de PMA sobre a expressão de K-Ras parece ser efêmero, fazendo com que os níveis de expressão de proteína variem com o tempo.

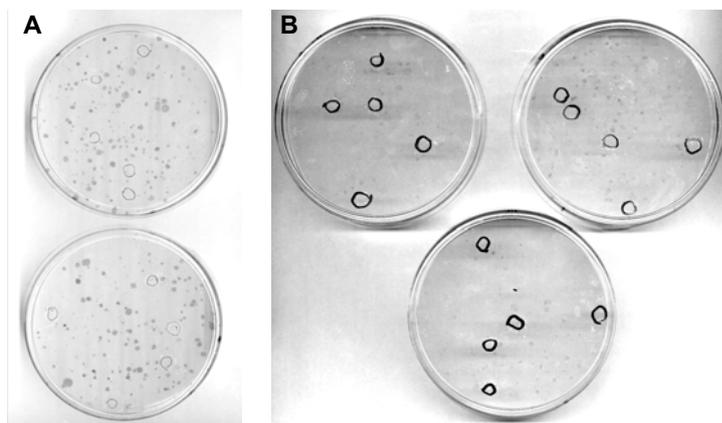


Figura 33. Seleção de clones resistentes a PMA com tratamento sustentado. Foram plaqueadas 3.105 células em placas P100 em duplicata (A) ou triplicata (B). O PMA (10 ng/ml) foi adicionado ao meio no dia seguinte ao plaqueamento. As células foram mantidas em meio DME contendo 10% SFB, suplementado com 10 ng/ml PMA, até o aparecimento de colônias visíveis a olho nu. Os círculos vermelhos e pretos destacam os clones que foram selecionados. (A), primeiro experimento, o rendimento médio foi de 160 ± 26 colônias por placa. (B) Segundo experimento, rendimento médio foi de 100 ± 31 colônias por placa

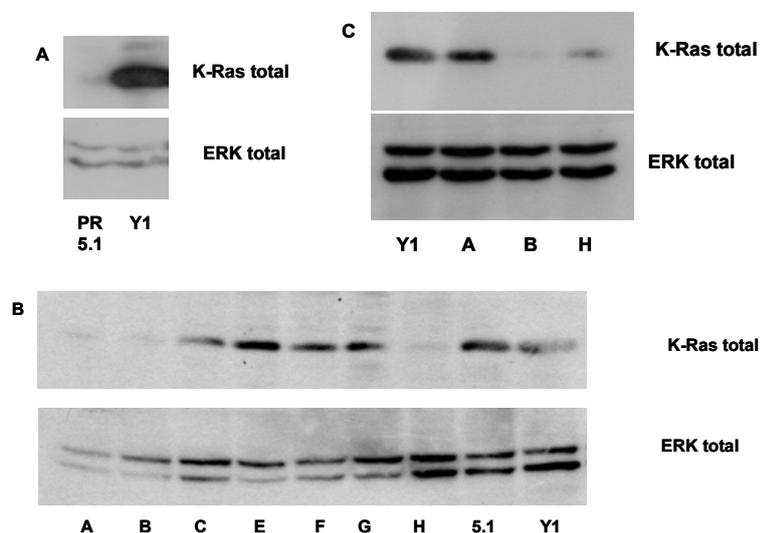


Figura 34. Células selecionadas para resistência a PMA possuem níveis variáveis de expressão de K-Ras. Western Blot para a detecção de K-Ras total. ERK total utilizada para normalização dos resultados. Lisados de células em crescimento exponencial. (A) Y1 e sua derivada resistente a PMA, Y1-PR 5.1, experimento 1, observar a baixa expressão da proteína K-Ras total (B) Y1 e suas derivadas resistentes a PMA. Observar o baixo nível de expressão de K-Ras no clones A, B e H. Nota-se que Y1-PR 5.1, nesse segundo experimento, apresenta alto nível de expressão de K-Ras. (C) Y1 e suas derivadas selecionadas para resistência a PMA. Observar que Y1-PRA apresenta, nesse segundo experimento, alta expressão de K-Ras, enquanto os clones B e H continuam expressando baixo K-Ras.

Resultados

Para verificar a sensibilidade desses clones a PMA foram testados quatro deles. Os dois primeiros apresentaram quantidades flutuantes de K-Ras quando a proteína foi medida em dois tempos distintos, ou seja, em um primeiro ensaio eles apresentaram uma baixa expressão de K-Ras, entretanto, um segundo ensaio, realizado após as células serem mantidas por algum tempo em cultura, mostrou uma expressão elevada de K-Ras. Por outro lado, os dois últimos clones, apresentaram expressão reduzida de K-ras, que permaneceu estável em dois ensaios diferentes, mesmo após essas células terem sido mantidas em cultura por um longo período.

Conforme demonstrado por ensaios clonogênicos notamos que os clones selecionados para resistência a PMA apresentam resistência variável ao mesmo e isso parece negativamente correlacionado com a quantidade de Ras que esses clones estão expressando no momento. Assim, o clone Y1-PR 5.1 mostrou-se relativamente resistente a PMA em um ensaio inicial (40% de morte), assim como a FGF2 (16% inibição) (Fig. 35 A). Esse ensaio foi realizado logo após o isolamento do clone, quando o mesmo apresentava uma baixa expressão de Ras (Fig. 34 A). Entretanto, após cerca de 60 dias em cultura, esse mesmo clone apresentou 89% de morte frente ao PMA, embora a resistência ao FGF2 tenha permanecido inalterada (Fig. 35 B). Curiosamente, na mesma época, a expressão de Ras nesse clone apresentava-se aumentada (Fig. 34 B)

Os outros clones apresentaram comportamento bastante variável. O clone PR-A se mostrou bastante sensível tanto a FGF2 quanto a PMA (74 e 88% de inibição, respectivamente) (Fig. 35 C), o clone PR-B se mostrou sensível a FGF2 (76% de inibição) e resistente a PMA (Fig. 35 D). Já o clone PR-H se mostrou pouco sensível a FGF2 (22% de inibição) e um pouco mais sensível a PMA (60%) (Fig. 35 E). Esses

Resultados

últimos três clones foram testados em uma etapa posterior ao seu congelamento, e a quantidade de Ras foi medida novamente (Fig. 34 C). Aqui também parece haver uma correlação entre sensibilidade a PMA e quantidade de Ras expresso, visto que o clone que expressa maior quantidade de Ras (PR-A) é mais sensível a PMA e aquele que expressa menor quantidade de Ras (PR-B) é o mais resistente.

A resistência a FGF2 é variável e, nesses casos, não conseguimos observar uma correlação direta com a quantidade de K-Ras expresso. Sabemos, entretanto, que a sensibilidade a FGF2 depende da quantidade de K-Ras. É possível, no entanto, que o processo de seleção por PMA ative outras proteínas em alguns desses clones que os tornem sensíveis a FGF 2, mas não a PMA. Porém, a interpretação desse resultado ainda é problemática.

Outro fato curioso que observamos é que, assim como a célula Y1-FR 10.3 S, o clone Y1-PR 5.1 também tem sua proliferação acelerada na presença de FGF2, como uma célula normal (Fig. 35 F) e ao contrário da célula parental, Y1 (Fig. 3 A). Entretanto, o crescimento na presença de PMA é reduzido, mas muito semelhante ao que é observado para o crescimento na presença de 10% SFB. Para a célula parental, Y1, ao contrário, observamos uma diminuição no número de células quando as mesmas são tratadas com PMA. Observamos que a célula “resistente” a PMA se tornou uma célula muito frágil e instável e FGF2 passa a agir agora como um fator de crescimento clássico, estimulando a proliferação da mesma.

Resultados

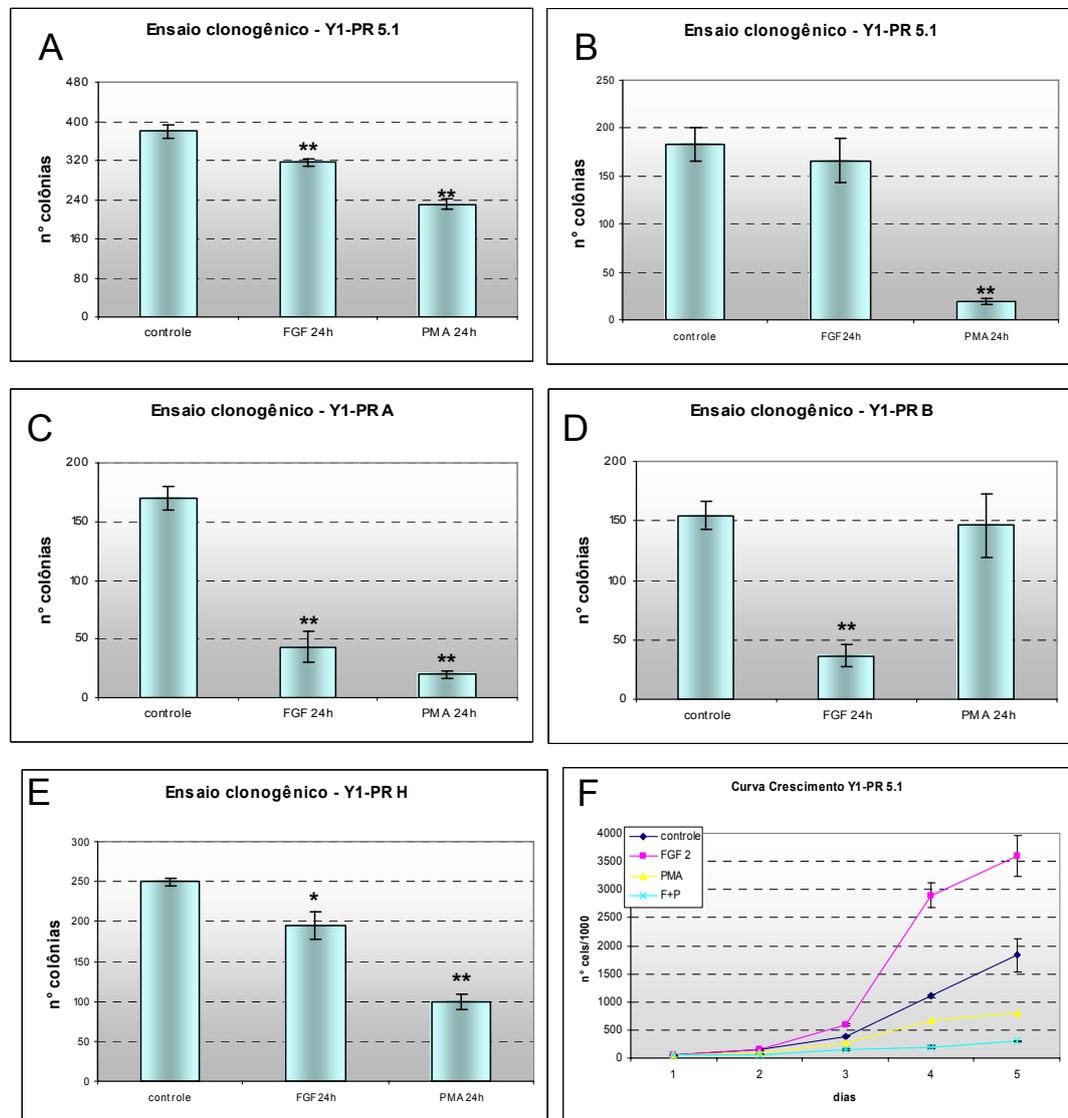


Figura 35. Células selecionada para resistência a PMA possuem resistência a FGF2 e PMA variáveis. (A) Ensaio clonogênico para células Y1-PR. 103 células plaqueadas/placa. FGF2 (2ng/ml), tratamento por 24 h; PMA (10 ng/ml), tratamento por 24h (A)Y1-PR5.1 (média de dois experimentos realizados em triplicata) (B) Y1-PR 5.1, terceiro experimento, realizado cerca de 45 dias depois (um experimento, realizado em triplicata) (C) Y1-PR-A, Y1-PR-B, (D)Y1-PR-H (para cada um dos três clones foi realizado um experimento em triplicata). (E) Curva de crescimento, Y1-PR 5.1. Foram plaqueadas 5·10⁴ células em placas P35 e as células foram mantidas sem tratamento (controle), com PMA 10ng/ml, com FGF2, 2 ng/ml ou com uma combinação de PMA+FGF2, durante todo o experimento. As células eram coletadas em duplicatas a cada 2 dias, contadas e os valores foram plotados em um gráfico. Nota-se que a célula Y1-PR 5.1 tornou-se dependente de FGF2 para crescer. As barras nos gráficos representam o desvio padrão. *p<0,05; **p<0,01.

4.2.6. Tumorigenicidade das Células Y1-PR

Conforme observamos anteriormente, as células Y1-PR apresentam a expressão de K-Ras em quantidades variáveis, tanto quando comparamos diferentes clones entre si, como quando comparamos um mesmo clone em diferentes tempos de cultura. O ensaio tumorigênico, desses clones mostrou que, em geral, o tempo de latência para o surgimento de tumor é ligeiramente aumentado em relação à célula parental, porém todos os animais desenvolvem tumor. Não conseguimos estabelecer nenhum tipo de conexão entre quantidade de Ras expressa e tumorigenicidade. Assim, concluímos que essas células são extremamente instáveis, porém mantêm a capacidade de formação de tumor, observada na célula parental, Y1 (Fig. 36).

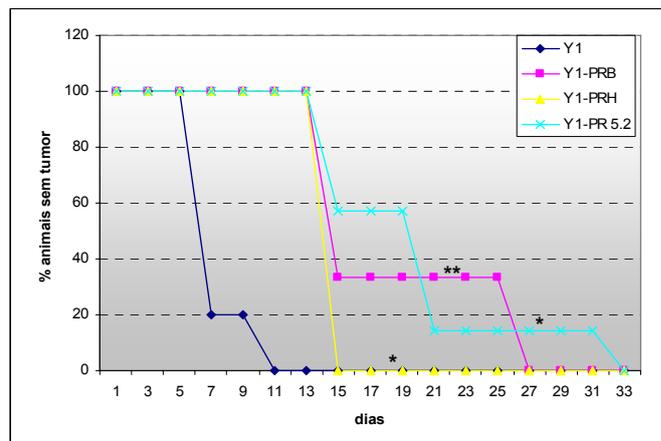


Figura 36. Células Y1-PR são tumorigênicas. Gênese de tumores em camundongos Balb/c Nude derivados de células Y1 (5 animais), Y1-PR 5.1 (7 animais), Y1-PR-B (3 animais) e Y1-PR-H (3 animais). Notamos que embora as células Y1-PR apresentem maior tempo de latência para o surgimento de tumores, todos os animais injetados desenvolveram tumor. Os clones Y1-PR são estatisticamente diferentes de Y1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

5. Discussão

5.1. Efeito citotóxico de FGF2 sobre células transformadas por Ras

O FGF2 foi descoberto em 1973 por Hugo A. Armelin como um fator que induz a proliferação celular em fibroblastos de camundongos, daí o nome “fibroblast growth factor”. Desde então essa molécula vem sendo extensivamente estudada e já foi demonstrado que ela participa de inúmeros processos biológicos, tais como angiogênese, reparo de tecidos, hematopoiese, diferenciação do sistema nervoso e do esqueleto, desenvolvimento embrionário dos pulmões, sistema reprodutivo e outros (Bikfalvi et al., 1997).

Por ser um fator de crescimento, o FGF2 se torna potencialmente, um agente de transformação maligna de determinados tipos celulares. De fato, a superexpressão de FGF2 em células imortalizadas já foi descrita como um fator de transformação celular (Neufeld et al. 1988; Seno et al, 1988) e seus receptores parecem também estar envolvidos na transformação maligna de determinados tipos celulares (Hart et al., 2000; Huang et al., 2006). Recentemente, dois trabalhos independentes, que fazem uso de técnicas de biologia molecular que permitem uma análise genética de larga escala, mostraram que uma mutação dentro do íntron 2 do FGFR2 está intimamente relacionada com uma predisposição para o desenvolvimento do câncer de mama. O significado dessa mutação, que afeta um íntron e não uma parte codificante do gene, ainda não é conhecido. Entretanto, os autores acreditam que essa mutação possa ser importante para a regulação da expressão gênica ou ainda para a regulação do “splicing alternativo” (Easton et al., 2007; Hunter et al., 2007).

Nas células Y1, o tratamento com FGF2 de células Y1 bloqueadas na fase G0/G1, dispara uma resposta mitogênica caracterizada por ativação das vias de ERK (MAPK) e PI3K. Assim, ele induz a tradução dos genes imediatamente precoces, c-fos,

c-jun e c-myc, a transcrição e tradução de ciclina D1 e culmina com a entrada em S, que pode ser medida pela quantidade de núcleos marcados com BrdU (Rocha et al., 2003). Essa resposta mitogênica pode ser inibida quando se trata a célula com inibidor da via de ERK, o PD98059, inibidor de MEK (Costa, 2005). Concomitantemente, o tratamento com FGF2 dispara uma resposta antiproliferativa, que vai terminar por se sobrepor à resposta mitogênica e resultar no bloqueio da proliferação celular, disparando um processo de senescência, por um caminho ainda não muito bem compreendido (Forti et al., dados não publicados). Algumas informações que foram importantes para compreensão e identificação desse fenômeno serão fornecidas a seguir.

Embora o tratamento com FGF2 resulte em intensa marcação nuclear por BrdU, o mesmo não é observado quando se avalia a incorporação de 3H-timidina nessas mesmas condições. A incorporação de 3H-timidina fica muito prejudicada quando se tratam as células com FGF2, seja na presença ou ausência de soro. Além disso, o tratamento com FGF2 por 24 h é capaz de inibir o crescimento de colônias em ensaios clonogênicos e curvas de crescimento. Esses resultados, juntos, indicam que, embora a célula seja capaz de entrar em S quando tratada com FGF2, ela fica bloqueada de alguma forma nessa fase e seu crescimento é inibido (Costa, 2005). Por outro lado, sabemos que o tratamento com PD98059 não protege as células contra o efeito citotóxico de FGF2 e inibidores da via de PI3K também são ineficazes perante o efeito inibitório de FGF2 (Costa, 2005). Nesta tese mostramos ainda que inibidores de PKC também são ineficazes. Assim, os resultados indicam que o FGF2 dispara concomitantemente e de forma independente duas respostas antagônicas, uma resposta mitogênica e uma resposta antiproliferativa, levando as células a entrarem em senescência.

Esse efeito foi observado em duas linhagens independentes transformadas por Ras, seja pela expressão elevada de K-Ras, o que garante níveis elevados de K-Ras-GTP, no caso de Y1 e também em linhagens derivadas de fibroblastos normais Balb 3T3 transformadas pelo oncogene EJ-Ras humano (H-RasV12), as linhagens EJA e B61 (Costa et al., 2004; Costa, 2005).

Também foi demonstrado que a sensibilidade dessas células a FGF2 é dependente dos altos níveis da proteína Ras ativada, uma vez que um dominante negativo de Ras, Ras N17, é capaz de reduzir os níveis de Ras-GTP e proteger a células de FGF2 (Costa et al., 2004). Além disso, um dominante negativo de RhoA assim como o tratamento com inibidores de FGFRs previamente ao tratamento com FGF2 mostraram um efeito protetor frente ao FGF2 (Forti et al, dados não publicados; Salotti et al., dados não publicados). Esta conclusão permite prever como poderiam ser os clones de Y1 resistentes a FGF2: a) sem FGFRs, portanto sem resposta a FGF2; b) deficientes na ativação de RhoA; c) por perda dos níveis constitutivamente altos de K-Ras-GTP e d) mudanças não previsíveis down stream dessas 3 proteínas anteriores. Nesta tese mostramos que, frente a um tratamento sustentado com FGF2, somente a classe c) foi observada, ou seja, o fenótipo $K\text{-Ras}^-$, $FGFRs^+$ e $RhoA^+$.

Na literatura encontram-se alguns outros trabalhos que mostram morte celular ou inibição da proliferação por FGF2, porém esses trabalhos têm sido marginalizados, seja porque são trabalhos de baixo impacto e/ou devido a um preconceito que impede uma análise mais objetiva de tais resultados. Grande parte desses trabalhos descreve um processo de apoptose desencadeado por FGF2 e, o que é mais importante ressaltar, em todos os trabalho trabalha-se sempre com linhagens de origem tumoral

(Schweigerer et al., 1987; Sturla et al., 2000; Raucci et al., 2004; Kim et al., 2004; Williamson et al., 2004; Hotfielder et al., 2005). Portanto, esses trabalhos, em concordância com que é mostrado nesta tese, mostram que FGF2 possui uma nova propriedade que é a capacidade de distinguir células transformadas e promover o bloqueio da proliferação destas seja através de morte celular ou outro mecanismo desconhecido.

Nesta tese, mostramos que o FGF2 é bastante tóxico não apenas para células Y1, mas também para a sublinhagem derivada, Y1-D1G, que superexpressa ciclina D1. Essa célula se mostrou resistente ao efeito inibitório de AVP (Schwindt et al., 2003) e dados recentes, de estudos realizados dentro do nosso grupo de pesquisa assim como dados obtidos durante a realização dessa tese, os quais foram omitidos da redação final por motivo de clareza, indicam que Ciclina D1, ao menos na célula Y1, não desempenha papel relevante para a progressão do ciclo celular, mas age, de fato, como um importante agente protetor e de sobrevivência para essa célula. (Forti e Armelin, dados não publicados; Matos et al., dados não publicados). Entretanto, conforme demonstrado nesta tese, a superexpressão de Ciclina D1 não é capaz de proteger a célula Y1 contra o efeito inibitório de FGF2, ela parece, inclusive, tornar a célula mais sensível a essa substância.

Mostramos que esse efeito é também observado em células em crescimento em suspensão. Esse resultado demonstra que o efeito inibitório de FGF2 é observado mesmo que a célula seja cultivada em meio semi-sólido, independente da aderência a um substrato sólido. Portanto, ele nos permite concluir que o efeito de FGF2 é de fato de inibir a proliferação e não apenas de promover um descolamento das células, que

poderia resultar na perda de células “sadias” durante a manipulação das placas de cultura, dando uma falsa impressão de morte ou inibição do crescimento.

Mostramos ainda que células B61, que expressam o oncogene H-RasV12, são também bastante sensíveis ao efeito de FGF2 tanto em crescimento em substrato sólido como quando crescidas em suspensão. Mostramos ainda que aplicações locais de FGF2 reduzem o aparecimento de tumor derivado de células B61 em camundongos Balb/c em 80%, além de aumentar o tempo de latência para o aparecimento do primeiro tumor. Por outro lado, o mesmo efeito não é observado nas células parentais, Balb/c 3T3, uma linhagem imortalizada não transformada e também é nulo sobre células AR-1, clone revertente de Y1, não tumorigênico.

Dessa forma, mostramos através de diferentes modelos celulares experimentais que FGF2 inibe, seletivamente, a proliferação de células tumorais transformadas por Ras *in vitro* e *in vivo*.

5.2. Células resistentes a FGF2 perdem a superexpressão de Ras

Neste trabalho mostramos também que o FGF2 exerce um efeito seletivo negativo muito forte sobre células transformadas. As células Y1, que possuem uma amplificação do gene K-ras, quando submetidas ao tratamento sustentado de FGF2 são eliminadas em sua maioria, porém as células que conseguem sobreviver nessas condições perdem a alta expressão da proteína K-Ras e sua tumorigenicidade é bastante reduzida. Conforme previsto anteriormente, essas células se encaixam na classe “c” (K-Ras⁻) dentro das possibilidades de possíveis fenótipos resistentes a FGF2. Observamos resultados equivalentes a Y1 quando selecionamos as células D1G-FR, ou seja, essas células também mostram uma baixa expressão de Ras e

menos tumorigências quando comparadas à células parental, Y1-D1G. Embora não sejamos capazes de afirmar, nesse momento, se a redução de Ras é um efeito de regulação da expressão gênica ou perda da amplificação desse gene que é encontrada em Y1, há indícios de que a segunda opção seja a verdadeira.

Os resultados citados anteriormente são surpreendentes e muito empolgantes pois mostram que o FGF2 age de forma muito seletiva e tem como alvo específico a superexpressão de Ras, que é a principal responsável pelo caráter patológico, tumoral, da célula Y1. Assim, o FGF2 age promovendo a “cura” dessa célula. Dessa forma, acreditamos que desvendar o mecanismo de morte e/ou inibição do crescimento por FGF2 sobre células transformadas por Ras poderá trazer importantes informações que deverão ter implicações na terapia de tumores desse tipo.

Esse potencial terapêutico pode ser de grande valia no futuro. Um dos casos em que terapias dentro desse contexto poderia ter grande importância seria no tratamento de câncer de pâncreas. Esse tipo de câncer é uma das causas mais comuns de morte relacionadas ao câncer. Menos que 5% dos pacientes sobrevivem por 5 anos e a taxa de mortalidade é muito alta. Novas combinações de drogas tem aumentado a expectativa de vida de pacientes acometidos com tal doença, mas com resultados pouco animadores, uma vez só 25% das pessoas tratadas conseguem sobreviver por 1 ano (Eckel et al. 2006). Sabe-se que em cerca de 90% dos casos de câncer de pâncreas ocorre um ganho de função de proteínas da família Ras (Bos, 1989). Assim, o uso de FGF2 no tratamento de cânceres desse tipo ou ainda de outros tipos de cânceres onde temos o envolvimento de proteínas da família Ras pode ser de grande valia.

Para células selecionadas a partir de B61 notamos dois padrões de resposta. A célula B61-FR4, que possui baixa expressão de H-RasV12, portanto, também se encaixa no padrão “c”, e é menos tumorigênica se comparada com a célula parental, B61. Observamos ainda um efeito inesperado. Sabíamos previamente que quando essas células são cultivadas em meio semi-sólido, elas não são capazes de formar colônia. Entretanto, a adição de FGF2 ao meio resulta no surgimento de colônias. Portanto, era esperado que o tratamento com FGF2 *in vivo* promovesse o surgimento de tumores, mas esse não foi o resultado obtido. Pelo contrário, essas células se mostraram sensíveis a FGF2 *in vivo*. Ainda não sabemos a explicação para esse fato, mas sabemos que o microambiente dentro do animal é muito diferente daquele observado *in vitro* e, portanto, resultados contrastantes, embora não sejam esperados, foram obtidos. No entanto, esse resultado tem implicações positivas, já que ele mostra, mais uma vez, a eficiência do tratamento com FGF2 *in vivo* sobre células B61 e derivadas. Cabe aqui lembrar que o tratamento com FGF2 dos clones D1G-FRs *in vivo*, não teve nenhum efeito, também ao contrário do que foi observado nos ensaios de crescimento em suspensão. Esse resultado, junto com o anterior, são importantes pois mostram que o FGF2 não tem atividade tumorigênica *in vivo* como era de se esperar com base nos dados de ensaio de crescimento em suspensão.

O segundo clone resistente a FGF2, derivado de células B61, B61-FRA, apresenta um padrão diferente dos anteriores. De acordo com o esperado para células resistentes esse clone se encaixa na classe “d”, ou seja, ele apresenta mudanças não previsíveis que estaria down stream às proteínas FGFR, K-Ras ou RhoA. Esse clone mantém a alta expressão do transgene H-RasV12, apesar de ser resistente a FGF2. É importante salientar aqui o tipo de seleção utilizado para o isolamento desse clone.

Discussão

Nesse caso foi utilizado, juntamente com o FGF2, o agente seletivo geneticina, para garantir a manutenção do transgene H-Ras-V12. Portanto, o objetivo era, de fato, isolar clones que mantivessem a construção e, assim, a alta expressão do transgene. Dessa forma, os dados obtidos com células B61 corroboram os resultados encontrados para Y1, uma vez que mostram que o FGF2 tem um alvo específico, Ras, e sobreviver a ele significa perder Ras. Nada impede no entanto, que outras classes de clones resistentes surjam, porém, essa situação ocorre apenas em condições restritas: a) com tratamento curto, de 24 h, com FGF2 para Y1 (Costa, 2005); b) de forma rara em clones selecionados a partir de Y1 com tratamento sustentado (1 clone dentre onze isolados); c) sob condições artificiais, em que se força a manutenção de H-Ras-V12 em sublinhagens derivadas de B61.

Observamos alguns fatos importante a respeito do clone B61-FRA. Apesar de serem selecionados para resistência a FGF2, esse clone apresenta alta tumorigenicidade. Por outro lado, Costa (2005) mostrou que o clone Y1-FR3, derivado de Y1 resistente a FGF2 (seleção com 24 h de FGF2), que mantém a expressão alta de K-Ras, é menos tumorigênico que a célula parental. Portanto, enquanto para Y1 parece haver uma correlação entre sensibilidade a FGF2 e tumorigenicidade, o mesmo não parece ocorrer para B61. Em B61, parece existir uma correlação diferente, entre tumorigenicidade e a presença dos altos níveis de H-Ras-GTP. Observamos também que o clone B61-FRA, assim como quando em cultura, se mostrou bastante resistente a FGF2 *in vivo*.

5.3. Terapias de tumores transformados por Ras

Sabemos que a proteína Ras é encontrada mutada ou superexpressa em cerca de 30% dos cânceres humanos. Dentro desse percentual, observa-se ganho de função de Ras em cerca de 30% dos casos de câncer de pulmão e 90% dos casos de câncer de pâncreas (Bos, 1989). Em geral, os cânceres onde se observa um ganho de função de Ras, são de difícil tratamento e baixa sobrevivência. Assim, diversos estudos têm sido realizados a fim de se obter tratamentos que tenham como objetivo o combate à atividade descontrolada de Ras. Esses tratamentos têm como alvo tanto a proteína Ras diretamente quanto outras proteínas relacionadas a ela. Vale ressaltar, entretanto, que até o momento nenhuma terapia anti-Ras está em prática, embora algumas já estejam em fase de pesquisa clínica.

Dentre as estratégias adotadas, algumas têm como objetivo atingir diretamente a atividade de Ras. Assim, existem pesquisas sendo realizada com dominantes negativos que inibem a atividade de Ras, vacinas contra formas mutadas de Ras e ainda terapias que objetivam resgatar a atividade GTPásica de ras. Ainda dentro dessa estratégia estão em estudo também fatores que inibem a interação de Ras com a membrana plasmática, o que é fundamental para a atividade dessa proteína (Cox e Der, 2002).

Uma outra estratégia objetiva atingir efetores de Ras, utilizando-se de inibidores da via Raf e MEK ou ainda inibidores da interação Ras/Raf. Esses testes têm se mostrado promissores, principalmente quando o tratamento é realizado em conjunto com outras drogas (Roberts e Der, 2007). Esse tipo de tratamento, entretanto, apresenta um problema, uma vez que outras vias ativadas por Ras (PIK3, por exemplo) continuam ativas (Mitin et al., 2005).

Uma outra estratégia envolve terapia gênica tais como o uso de oligos anti-sense ou RNAi contra Ras e Raf. Entretanto, ela apresenta sérias restrições, típicas de terapias gênicas. São elas: a eficiência de “entrega” da droga, a capacidade das células de absorver a droga, a seletividade e o silenciamento gênico (Andreyev et al. 2001; Cunningham et al., 2001; Monia et al., 1996; Gokhale et al., 2002; Brummelkamp et al., 2002).

Uma questão importante, que deve ser levada em conta é que Ras é uma importante proteína para diversos tipos celulares, portanto, terapias que visem à diminuição de sua atividade direta ou indiretamente, devem ser realizadas cuidadosamente para que os efeitos colaterais sejam mínimos. Acredita-se que as células tumorais necessitem mais da atividade de Ras que células normais, o que as tornariam mais sensíveis a pequenas quantidades de drogas, que teoricamente, não seriam tóxicas ou seriam pouco tóxicas para células normais, entretanto, cuidados para que as células normais não estejam sendo gravemente lesadas com terapias anti-ras são importantes e fundamentais (Cox e Der, 2002).

5.4. Mecanismos antiproliferativos

O correto balanço entre proliferação celular e apoptose ou morte celular programada é de grande relevância para a manutenção da homeostase de um organismo multicelular. Assim, a apoptose ou morte celular programada desempenha papel fundamental durante a embriogênese e organogênese, em organismos adultos, em tecidos com rápido “turn over” celular (epitélio de revestimento do intestino, linhagens hematopoiéticas), onde ocorre constante e intensamente apoptose para eliminação fisiológica de enorme quantidade de células e também para a formação e

manutenção do sistema imunológico. Além, disso, a apoptose pode ser ativada por mecanismos que causam danos ao DNA como estresses oxidativos, irradiação por UV e outros. Falhas nesse processo fisiológico podem resultar em diversas patologias e, dentre elas, contribuir para o surgimento de tumores.

Além disso, um outro mecanismo antiproliferativo, que envolve um bloqueio irreversível da progressão do ciclo celular, é a senescência celular. Ela ocorre comprovadamente em células em cultura e parece também estar relacionada com o envelhecimento celular observado *in vivo*. Nesse contexto, a senescência serviria para inibir a proliferação de células sujeitas a instabilidades cromossômicas, devido a causas variáveis como encurtamento dos telômeros, estresse oxidativo e ativação de oncogenes.

Atualmente, dentre as proteínas conhecidas, p53 pode ser considerada como uma proteína chave em processos antiproliferativos. Essa proteína está envolvida tanto em processos de apoptose como em processos de senescência celular. Entretanto, embora os mecanismos que levem a ativação do processo de apoptose por p53 seja bem conhecidos, o mecanismo de ativação de senescência, assim como elementos “downstream” à ativação de p53 durante o processo de senescência são muito pobremente compreendidos (Levine et al., 2006). Estudos com culturas de células indicam que a indução de senescência é um importante mecanismo anti-tumor (Serrano et al., 1997; Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997). Dessa forma, esclarecimentos a esse respeito se fazem urgentes e podem ter importantes implicações no tratamento clínico de tumores e cânceres humanos.

Lowe e colaboradores (2004) mostram que proliferação e morte celular são mecanismos opostos, porém interligados. Nesse trabalho, os autores propõem que

alguns fatores individuais fazem a integração desses dois fenômenos de forma a controlar se o destino de determinada célula será proliferação ou morte. Como se sabe, a superexpressão ou superatividade de muitos oncogenes também afeta a atividade desses fatores, tornando a célula mais sensível a apoptose e/ou senescência. Dessa forma, para que uma célula seja transformada ela tem que desatrelar vias de proliferação de vias de inibição de proliferação e/ou morte ou mesmo suprimir de alguma forma a ativação dessas vias antiproliferativas. Nesse trabalho os autores propõem um modelo em que as vias apoptóticas e anti-apoptóticas estariam agindo em um equilíbrio dinâmico. Assim, a morte celular ou apoptose é controlada pela capacidade da célula de integrar sinais pro-apoptóticos com sinais anti-apoptóticos. Nas células saudáveis ou normais os sinais anti-apoptóticos são mais abundantes. Nesse modelo, a apoptose ocorre quando os sinais pró-apoptóticos excedem os sinais anti-apoptóticos, atingindo um limiar que, uma vez ultrapassado, é irreversível. Por outro lado, células transformadas possuem um equilíbrio deslocado para a proliferação seja através do aumento nos sinais anti-apoptóticos ou decréscimo dos sinais pró-apoptóticos. Essa situação por sua vez tornaria a célula mais sensível a tratamentos antiproliferativos (Lowe et al., 2004).

5.5. Inibição da Proliferação de Células com K-Ras ativado

Neste trabalho apresentamos também uma alternativa para o tratamento de células e, possivelmente, de tumores transformados por K-Ras. Aqui nós propomos a utilização de agonistas de PKC que, conforme demonstrado nesta tese, provocam a morte celular de células transformadas por K-Ras. Mostramos ainda que a morte celular é dependente, ao menos parcialmente, dos níveis de K-Ras e que não ocorre em

Discussão

células imortalizadas não transformadas (AR-1, Balb/c 3T3 e 3T3 Swiss) e ocorre em menor grau em células transformadas por H-Ras (B61). Utilizamos principalmente o PMA como agonista de PKC, mas mostramos que Briostatina I exerce efeito semelhante nas células Y1, com K-Ras amplificado. Mostramos ainda que não foi possível detectar apoptose quando as células são tratadas com PMA. Entretanto, há indícios de que o tratamento com PMA dispara um processo de senescência nessas células, como foi detectado pela marcação de β -galactosidase (pH 6). Entretanto, a marcação com β -galactosidase é seguida por um extenso descolamento das células da placa, indicativo de morte celular. Assim, acreditamos que a indução de senescência colabore parcialmente com a inibição da proliferação dessas células e seja seguida por processo de intensa morte celular, conforme os dados de curva de crescimento indicam.

O mecanismo de ação do PMA sobre as células Y1 ainda não foi estabelecido, porém, alguns trabalhos da literatura podem nos fornecer informações relevantes a respeito de como essa droga agiria.

O trabalho de Bivona e colaboradores (2006) indica que a ativação de PKC por Briostatina I ou PMA+ionomicina leva a uma fosforilação de K-Ras em sua cauda polibásica C-terminal, provocando internalização dessa proteína para membranas intracitoplasmáticas. Esse mecanismo resulta em morte celular por apoptose que é, provavelmente, mediada pela interação de K-Ras com Bcl-x_L, que ocorre na membrana mitocondrial externa. Acreditamos que esse mecanismo possa estar ocorrendo também na linhagem Y1, embora não tenhamos detectado evidências de apoptose.

Chen e Faller (1996) mostraram que a proteína K-Ras interage com Bcl-2 e que essa interação é estimulada quando a célula é estimulada a entrar em apoptose.

Curiosamente, nesse trabalho o mecanismo utilizado para a estimular a entrada em apoptose nessas células é através da inibição de PKC através do tratamento crônico (24 h) com PMA. Os autores interpretaram esse mecanismo como sendo devido à inibição de PKC, entretanto, é possível que o efeito observado seja decorrente da ativação de PKC que ocorreria no início do tratamento, fato que não foi considerado pelos autores.

Em um outro estudo, Xia et al., 2007, mostram que a ativação de PKC é um fator necessário para proteger células transformadas por Ras da apoptose. Os autores mostram que a inibição de PKC δ , a qual pertence à subfamília de novas PKCs que é insensível à Ca⁺², é suficiente para causar apoptose em células transformadas por Ras, mas causa pouco efeito nas respectivas células controle, que não possuem Ras ativado, independentemente de transformação. Esses resultados, no entanto, são contraditórios em relação ao trabalho de Bivona e colaboradores (2006) e também em relação ao que foi mostrado nesta tese, portanto, não acreditamos que esse seja o mecanismo de inibição por PMA apresentado pela célula Y1.

Neste trabalho mostramos que tanto tratamentos curtos (2 h) quanto tratamentos mais longos (24 h) com PMA são capazes de induzir a morte celular em Y1. O tratamento curto já é suficiente para eliminar uma grande quantidade dessas células (cerca de 90%), enquanto o tratamento prolongado elimina quase 100% das células. Além disso, o tratamento prévio das células com inibidores de PKC é capaz de promover proteção contra a morte induzida por PMA. Assim, acreditamos que o mecanismo de morte induzido por PMA seja primordialmente causado pela ativação de PKC e não pela sua inibição, embora seja possível que a inibição de PKC por PMA contribua com uma pequena parcela para o efeito visto com tratamento prolongado.

Discussão

Além disso, sabemos que PMA pode ativar também PKD, diretamente, e PLD indiretamente, via PKC α e β . Assim, é possível que essas proteínas também contribuam para o efeito inibitório de PMA.

Por último, sabemos que PMA é um agente co-carcinogênico e isso é um empecilho para o possível uso terapêutico dessa droga. A Briostatina I, por sua vez, não é tumorigênica e mostrou efeito semelhante na célula estudada. Essa droga já vem sendo utilizada em testes clínicos (Kortmansky and Schwartz, 2003). Assim, essa droga poderia ser testada no tratamento de tumores transformados por K-Ras.

6. Conclusões

Conclusões

Conforme demonstram múltiplas publicações, tratamentos de tumores com Ras ativado e/ou super-expresso são difíceis, geram efeitos colaterais penosos e terminam em baixa eficácia (Boss,1989; Cox e Der, 2002, Rodriguez-Viciano et al., 2005). Por outro lado, a ocorrência de transformação maligna dependente de Ras exige que a célula obrigatoriamente escape do “Ras oncogene stress” que leva à apoptose ou senescência (Serrano et al., 1997; Lowe et al., 2004). Portanto, linhagens celulares malignas dependentes de Ras são necessariamente deficientes em vias apoptóticas, logo refratárias à morte celular programada. Assim, a melhor forma de conseguirmos tratamentos eficazes e com poucos efeitos colaterais para tumores dependentes de Ras é através da utilização de substâncias que distingam células transformadas por Ras de células normais.

Nesta tese, mostramos duas substâncias potencialmente interessantes no tratamento de tumores dependentes de Ras. A primeira delas é o FGF2, que promove proliferação de células normais (função já bem estabelecida) mas capaz de disparar senescência, bloqueando a proliferação de células transformadas por Ras (tanto K-Ras quanto H-Ras), dessa forma, distinguindo células normais de malignas. Mostramos que FGF2 apresenta uma seletividade nunca antes observada para outros agentes anti-tumorais tendo como alvo específico a expressão patológica da proteína Ras. Assim, só sobrevive ao tratamento prolongado com FGF2 aquelas células que perdem a superexpressão de Ras, e se tornam “curadas”.

Nesta tese mostramos também que a ativação de PKC por PMA e Briostatina I em células Y1, que superexpressam K-Ras é capaz de inibir a sua proliferação, enquanto que células não transformadas são insensíveis a PMA. O efeito inibitório de PMA sobre Y1 passa pela indução de um processo de senescência, possivelmente

Conclusões

seguido por um processo de morte celular. Acreditamos que o esclarecimento do mecanismo de ação dessas duas substâncias deve trazer importantes implicações para o tratamento clínico de tumores transformados por Ras.

7. Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Aaronson SA, Todaro GJ. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol*. 1968; 72(2): 141-8.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M; Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Nova Iorque e Londres: Garland Science; 2002.
- Andreyev HJ, Ross PJ, Cunningham D, Clarke PA. Antisense treatment directed against mutated Ki-ras in human colorectal adenocarcinoma. *Gut*. 2001 ;48(2): 230-7.
- Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70(9): 2702-6
- Armelin HA, Armelin MC, Kovary K. Neoplastic transformation of 3T3 mouse embryo cells with c-myc- and c-Ha-ras-1 oncogenes. *Braz J Med Biol Res*. 1988; 21(6): 1155-61
- Armelin HA, Lotfi CF. Control of the adrenocortical cell cycle: interaction between FGF2 and ACTH. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32(7): 841-3.
- Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(18): 8348-52.
- Ballester R, Furth ME, Rosen OM. Phorbol ester- and protein kinase C-mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *J Biol Chem*. 1987; 262(6): 2688-95.
- Basanez G, Nechushtan A, Drozhinin O, Chanturiya A, Choe E, Tutt S, Wood KA, Hsu Y, Zimmerberg J, Youle RJ. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(10): 5492-7.
- Basanez G, Sharpe JC, Galanis J, Brandt TB, Hardwick JM, Zimmerberg J. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J Biol Chem*. 2002; 277(51): 49360-5.
- Bazzi MD, Nelsestuen GL. Constitutive activity of membrane-inserted protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 152(1): 336-43.
- Bazzi MD, Nelsestuen GL. Protein kinase C and annexins: unusual calcium response elements in the cell. *Cell Signal*. 1993; 5(4): 357-65.
- Bell RM, Burns DJ. Lipid activation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1991; 266(8): 4661-4.
- Berthet C, Aleem E, Coppola V, Tessarollo L, Kaldis P. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol*. 2003; 13(20): 1775-85.
- Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*. 1997; 18(1): 26-45
- Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Perez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD, Philips MR. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. *Mol Cell*. 2006; 21(4): 481-93

Referências Bibliográficas

- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science*. 1998; 279(5349): 349-52.
- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85(6): 803-15.
- Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989; 49(17): 4682-9.
- Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 1997; 277(5327): 831-4.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*. 2002; 2(3): 243-7.
- Burns DJ, Bell RM. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *J Biol Chem*. 1991; 266(27): 18330-8.
- Callaert H. Comparing Statistical Software Packages: The Case of the Logrank Test in StatXact. *The American Statistician*. 2003; 57(3): 214-7.
- Capon DJ, Seeburg PH, McGrath JP, Hayflick JS, Edman U, Levinson AD, Goeddel DV. Activation of Ki-ras2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature*. 1983; 304(5926): 507-13.
- Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*. 1982; 297(5866): 479-83.
- Chen CC. Protein kinase C alpha, delta, epsilon and zeta in C6 glioma cells. TPA induces translocation and down-regulation of conventional and new PKC isoforms but not atypical PKC zeta. *FEBS Lett*. 1993; 332(1-2): 169-73.
- Chen CY, Faller DV. Phosphorylation of Bcl-2 protein and association with p21Ras in Ras-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1996; 271(5): 2376-9.
- Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, Sherr CJ. The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK "inhibitors" are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*. 1999; 18(6): 1571-83.
- Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, Korsmeyer SJ. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2001; 8(3): 705-11
- Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev*. 1996; 10(16): 1979-90.
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1996; 12: 390-7.

Referências Bibliográficas

Colvin JS, White AC, Pratt SJ, Ornitz DM. Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development*. 2001; 128(11): 2095-106.

Cooper GM. *The Cell - A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates, Inc.; 2000

Costa ET, Forti FL, Rocha KM, Moraes MS, Armelin HA. Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. *Endocr Res*. 2004; 30(4) :503-9.

Costa ET. São Paulo, 2005. 133p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science*. 1986; 233(4766): 859-66

Cox AD, Der CJ. Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther*. 2002; 1(6) :599-606.

Cunningham CC, Holmlund JT, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A, Johnston JF, Monia B, Nemunaitis J. A Phase I trial of H-ras antisense oligonucleotide ISIS 2503 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced carcinoma. *Cancer*. 2001; 92(5): 1265-71.

De Moerlooze L, Spencer-Dene B, Revest J, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal–epithelial signaling during mouse organogenesis. *Development*. 2000; 127(3) :483-92.

Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*. 1996 Mar 22;84(6):911-21.

Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen MM, Daugherty C, Ornitz DM, Leder P. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev*. 1994; 8(24): 3045-57

Dietrich A, Rose-John S, Marks F. Expression of the kinase domain of mouse protein kinase C in *E. coli*. *Biochem Int*. 1989; 19(1): 163-72.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(20): 9363-7.

Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J* 1998; 17: 4213–25.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, Struewing JP, Morrison J, Field H, Luben R, Wareham N, Ahmed S, Healey CS, Bowman R; SEARCH collaborators, Meyer KB, Haiman CA, Kolonel LK, Henderson BE, Le Marchand L, Brennan P, Sangrajang S, Gaborieau V, Odefrey F, Shen CY, Wu PE, Wang HC, Eccles D, Evans DG, Peto J, Fletcher O, Johnson N, Seal S, Stratton MR, Rahman N, Chenevix-Trench G, Bojesen SE, Nordestgaard BG, Axelsson CK, Garcia-Closas M, Brinton L, Chanock S, Lissowska J, Peplonska B, Nevanlinna H, Fagerholm R, Eerola H, Kang D, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Hunter

Referências Bibliográficas

- DJ, Hankinson SE, Cox DG, Hall P, Wedren S, Liu J, Low YL, Bogdanova N, Schurmann P, Dork T, Tollenaar RA, Jacobi CE, Devilee P, Klijn JG, Sigurdson AJ, Doody MM, Alexander BH, Zhang J, Cox A, Brock IW, MacPherson G, Reed MW, Couch FJ, Goode EL, Olson JE, Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Uitterlinden A, Rivadeneira F, Milne RL, Ribas G, Gonzalez-Neira A, Benitez J, Hopper JL, McCredie M, Southey M, Giles GG, Schroen C, Justenhoven C, Brauch H, Hamann U, Ko YD, Spurdle AB, Beesley J, Chen X; kConFab; AOCs Management Group, Mannermaa A, Kosma VM, Kataja V, Hartikainen J, Day NE, Cox DR, Ponder BA. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 2007; 447(7148): 1087-93.
- Eckel F, Schneider G, Schmid RM. Pancreatic cancer: a review of recent advances. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006; 5(11): 1395-410.
- Epand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epand RM, Yip CM. Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 298(5): 744-9.
- Eswarakumar VP, Monsonigo-Ornan E, Pines M, Antonopoulou I, Morriss-Kay GM, Lonai P. The *Il1c* alternative of *Fgfr2* is a positive regulator of bone formation. *Development*. 2002; 29(16): 3783-93.
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005; 16(2): 139-49.
- Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, and Dickson C. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev*. 1995; 9(19): 2364-72.
- Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science*. 1995; 267(5195): 246-9.
- Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*. 2004; 384(Pt 2): 201-32
- Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P. Cyclin E ablation in the mouse. *Cell*. 2003; 114(4): 431-43.
- George DL, Scott AF, Trusko S, Glick B, Ford E and Dorney DJ. Structure and expression of amplified cKi-ras gene sequences in Y1 mouse adrenal tumor cells. *EMBO J*. 1985; 4(5): 1199-203.
- Gilman AG, Simon MI, Bourne HR, Harris BA, Long R, Ross EM, Stull JT, Taussig R, Bourne HR, Arkin AP, Cobb MH, Cyster JG, Devreotes PN, Ferrell JE, Fruman D, Gold M, Weiss A, Stull JT, Berridge MJ, Cantley LC, Catterall WA, Coughlin SR, Olson EN, Smith TF, Brugge JS, Botstein D, Dixon JE, Hunter T, Lefkowitz RJ, Pawson AJ, Sternberg PW, Varmus H, Subramaniam S, Sinkovits RS, Li J, Mock D, Ning Y, Saunders B, Sternweis PC, Hilgemann D, Scheuermann RH, DeCamp D, Hsueh R, Lin KM, Ni Y, Seaman WE, Simpson PC, O'Connell TD, Roach T, Simon MI, Choi S, Eversole-Cire P, Fraser I, Mumby MC, Zhao Y, Brekken D, Shu H, Meyer T, Chandy G, Heo WD, Liou J, O'Rourke N, Verghese M, Mumby SM, Han H, Brown HA, Forrester JS, Ivanova P, Milne SB, Casey PJ, Harden TK, Arkin AP, Doyle J, Gray ML, Meyer T, Michnick S, Schmidt MA, Toner M, Tsien RY, Natarajan M, Ranganathan R, Sambrano GR; Participating investigators and scientists of the Alliance for Cellular Signaling. Overview of the Alliance for Cellular Signaling. *Nature*. 2002; 420(6916): 703-6

Referências Bibliográficas

- Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J.* 1992; 6(15): 3362-9.
- Gokhale PC, Zhang C, Newsome JT, Pei J, Ahmad I, Rahman A, Dritschilo A, Kasid UN. Pharmacokinetics, toxicity, and efficacy of ends-modified raf antisense oligodeoxyribonucleotide encapsulated in a novel cationic liposome. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(11): 3611-21.
- Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science.* 1990; 249(4973): 1129-33.
- Harbour, JW and Dean, DC. The Rb/E2F pathway: Expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 2000; 14(19): 2393-409.
- Hart KC, Robertson SC, Kanemitsu MY, Meyer AN, Tynan JA, Donoghue DJ. Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene.* 2000; 19(29): 3309-20.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25: 585-621.
- Hedberg KK, Birrell GB, Mobley PL, Griffith OH. Transition metal chelator TPEN counteracts phorbol ester-induced actin cytoskeletal disruption in C6 rat glioma cells without inhibiting activation or translocation of protein kinase C. *J Cell Physiol.* 1994; 158(2): 337-46.
- Hotfilder M, Sondermann P, Senss A, van Valen F, Jurgens H, Vormoor J. PI3K/AKT is involved in mediating survival signals that rescue Ewing tumour cells from fibroblast growth factor 2-induced cell death. *Br J Cancer.* 2005; 92(4): 705-10
- Hothorn T, Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computat Stat & Data Analysis* 2003; 43: 121 – 37
- Huang X, Yu C, Jin C, Kobayashi M, Bowles CA, Wang F, McKeenan WL. Ectopic activity of fibroblast growth factor receptor 1 in hepatocytes accelerates hepatocarcinogenesis by driving proliferation and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 2006; 66(3): 1481-90
- Huard JMT, Forster CC, Carter ML, Sicinski P, and Ross ME. Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development.* 1999; 126(9): 1927-35.
- Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J.* 1993; 291 (Pt 2): 329-43
- Hunter DJ, Kraft P, Jacobs KB, Cox DG, Yeager M, Hankinson SE, Wacholder S, Wang Z, Welch R, Hutchinson A, Wang J, Yu K, Chatterjee N, Orr N, Willett WC, Colditz GA, Ziegler RG, Berg CD, Buys SS, McCarty CA, Feigelson HS, Calle EE, Thun MJ, Hayes RB, Tucker M, Gerhard DS, Fraumeni JF Jr, Hoover RN, Thomas G, Chanock SJ. A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nat Genet.* 2007; 39(7): 870-874.

Referências Bibliográficas

- Itahana K, Dimri GP, Hara E, Itahana Y, Zou Y, Desprez PY, Campisi J. A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *J Biol Chem*. 2002; 277(20): 18206-14.
- Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*. 2004; 5(1): 1-10.
- Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21: 247-69.
- Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1135(2):185-99.
- Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P, Pfizenmaier K. PKC α is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem*. 1994; 269(8): 6140-8.
- Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogev N, Jurewicz A, Waisman A, Brenner O, Haffner R, Gustafsson E, Ramakrishnan P, Lapidot T, Wallach D. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol*. 2004; 173(5): 2976-84.
- Keenan C, Goode N, Pears C. Isoform specificity of activators and inhibitors of protein kinase C gamma and delta *FEBS Lett*. 1997; 415(1): 101-8.
- Kim I, Moon S, Yu K, Kim U, Koh GY. A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas(1).*Biochim Biophys Acta*. 2001; 1518(1-2): 152-6.
- Kim MS, Kim CJ, Jung HS, Seo MR, Juhn YS, Shin HY, Ahn HS, Thiele CJ, Chi JG. Fibroblast growth factor 2 induces differentiation and apoptosis of Askin tumour cells. *J Pathol*. 2004; 202(1): 103-12.
- Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishizuka Y. Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem*. 1989; 264(7): 4088-92.
- Korgaonkar C, Zhao L, Modestou M, Quelle DE. ARF function does not require p53 stabilization or Mdm2 relocalization. *Mol Cell Biol*. 2002; 22(1): 196-206.
- Kortmansky, J., and Schwartz, G.K. (2003). Bryostatins: a novel PKC inhibitor in clinical development. *Cancer Invest*. 2003; 21(6): 924-36.
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J. A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGFreceptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell*. 1997 May 30;89(5):693-702
- Kovary K, Armelin MC, Armelin HA. Ha-Ras-1 oncogene dosage differentially affects Balb/3T3 cells' growth factor requirement and tumorigenicity. *Oncogene Res*. 1989; 4(1): 55-64.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, Geng Y, Yu Q, Bhattacharya S, Bronson RT, Akashi K, Sicinski P. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell*. 2004; 118(4): 477-91.

Referências Bibliográficas

- Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneider R, Green DR, Newmeyer DD. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*. 2002; 111(3): 331-42.
- Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15(6): 691-9.
- Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*. 2007;14(1): 32-43.
- LaBaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS, Fattaey A, Harlow E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev*. 1997; 11(7): 847-62.
- Lee HW, Smith L, Pettit GR, Vinitsky A, Smith JB. Ubiquitination of protein kinase C-alpha and degradation by the proteasome. *J Biol Chem*. 1996; 271(35): 20973-6.
- Lee, HW, Smith L, Pettit GR, Smith JB. Bryostatin 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol Pharmacol*. 1997; 51(3): 439-47.
- Lee MH, Bell RM. Mechanism of protein kinase C activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry*. 1991; 30(4): 1041-9.
- Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*. 1989; 245(4913): 57-60.
- Lepique AP, Forti FL, Moraes MS, Armelin HA. Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocr Res*. 2000; 26(4): 825-32.
- Leventis R and Silviu JR. Lipid-binding characteristics of the polybasic carboxy-terminal sequence of K-ras4B. *Biochemistry*. 1998; 37(20): 7640-8.
- Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 2006; 13(6): 1027-36.
- Lim KH, Counter CM. Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. *Cancer Cell*. 2005; 8(5): 381-92.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*. 1998; 12(19): 3008-19.
- Liscovitch M. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *Trends Biochem Sci*. 1992; 17(10): 393-9.
- Liu E, Li X, Yan F, Zhao Q, Wu X: Cyclin-dependent kinases phosphorylate human Cdt1 and induce its degradation. *J Biol Chem*. 2004; 279(17): 17283-8.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86(1): 147-57.
- Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*. 1998 ;10(8): 529-42.

Referências Bibliográficas

- Lotfi CF, Todorovic Z, Armelin HA, Schimmer BP. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem.* 1997; 272(47): 29886-91.
- Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature.* 2004;432(7015): 307-15.
- Lu Z, Hornia A, Jiang YW, Zang Q, Ohno S, Foster DA. Tumor promotion by depleting cells of protein kinase C delta. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(6): 3418-28.
- Malumbres M, Sotillo R, Santamaria D, Galan J, Cerezo A, Ortega S, Dubus P, Barbacid M. Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell.* 2004;118(4): 493-504.
- Maser RS, Choudhury B, Campbell PJ, Feng B, Wong KK, Protopopov A, O'Neil J, Gutierrez A, Ivanova E, Perna I, Lin E, Mani V, Jiang S, McNamara K, Zaghlul S, Edkins S, Stevens C, Brennan C, Martin ES, Wiedemeyer R, Kabbarah O, Nogueira C, Histen G, Aster J, Mansour M, Duke V, Feroni L, Fielding AK, Goldstone AH, Rowe JM, Wang YA, Look AT, Stratton MR, Chin L, Futreal PA, DePinho RA. Chromosomally unstable mouse tumours have genomic alterations similar to diverse human cancers. *Nature.* 2007; 447(7147): 966-71.
- Matsuura I, Denissova NG, Wang G, He D, Long J, Liu F. Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature.* 2004; 430(6996): 226-31.
- McGlynn E, Liebetanz J, Reutener S, Wood J, Lydon NB, Hofstetter H, Vanek M, Meyer T, Fabbro D. Expression and partial characterization of rat protein kinase C-delta and protein kinase C-zeta in insect cells using recombinant baculovirus. *J Cell Biochem.* 1992; 49(3): 239-50.
- McGrath JP, Capon DJ, Smith DH, Chen EY, Seeburg PH, Goeddel DV and Levinson AD. (1983). Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene *Nature.* 1983; 304(5926): 501-6.
- McLaughlin, S., and Aderem, A. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20(7):272-6.
- Miller DL, Ortega S, Bashayan O, Basch R, Basilico C. Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(6): 2260-8.
- Min H, Danilenko DM, Scully SA, Bolon B, Ring BD, Tarpley JE, et al. Fgf-10 is required for both limb and lung development and exhibits striking functional similarity to *Drosophila* branchless. *Genes Dev.* 1998; 12(20): 3156-61.
- Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol.* 2005;15(14): R563-74.
- Monia BP, Sasmor H, Johnston JF, Freier SM, Lesnik EA, Muller M, Geiger T, Altmann KH, Moser H, Fabbro D. Sequence-specific antitumor activity of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide targeted to human C-raf kinase supports an antisense mechanism of action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(26): 15481-4.

Referências Bibliográficas

- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*. 1996; 85(6): 817-27
- Neufeld G, Mitchell R, Ponte P, Gospodarowicz D. Expression of human basic fibroblast growth factor cDNA in baby hamster kidney-derived cells results in autonomous cell growth. *J Cell Biol*. 1988; 106(4): 1385-94.
- Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*. 1995; 270(48): 28495-8
- Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*. 1992; 258(5082): 607-14.
- Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res*. 1994; 211(1): 90-8.
- Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth J, McConkey DJ, Swisher SG. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *J Biol Chem*. 2002; 277(11): 9219-25.
- Ohno S, Akita Y, Konno Y, Imajoh S, Suzuki K. A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell*. 1988; 53(5): 731-41.
- Olivier AR, Parker PJ. Identification of multiple PKC isoforms in Swiss 3T3 cells: differential down-regulation by phorbol ester. *J Cell Physiol*. 1992; 152(2): 240-4.
- Ono Y, Fujii T, Igarashi K, Kuno T, Tanaka C, Kikkawa U, Nishizuka Y. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(13): 4868-71.
- Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P. Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol*. 1992; 12(1): 240-7.
- Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001; 2(3): Reviews 3005
- Ortega S, Prieto I, Odajima J, Martine A, Dubus P, Sotillo R, Barbero JL, Malumbres M, and Barbacid M. Cyclin-dependent kinase-2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nat Genet*. 2003; 35(1): 25-31.
- Pan T, Coleman JE. GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(6): 2077-81.
- Parisi, T, Beck, A.R., Rougier, N., McNeil, T., Lucian, L., Werb, Z., and Amati, B. 2003. Cyclins E1 and E2 are required for endoreplication in placental trophoblast giant cells. *EMBO J*. 2003; 22(18): 4794-803.
- Parker PJ, Bosca L, Dekker L, Goode NT, Hajibagheri N, Hansra G. Protein kinase C (PKC)-induced PKC degradation: a model for down-regulation. *Biochem Soc Trans*. 1995; 23(1): 153-5.

Referências Bibliográficas

- Partanen J, Schwartz L, Rossant J. Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev* 1998; 12: 2332–44.
- Pears C, Stabel S, Cazaubon S, Parker PJ. Studies on the phosphorylation of protein kinase C- α . *Biochem J*. 1992; 283 (Pt 2): 515-8.
- Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. A role for calcium in Bcl-2 action? *Biochimie*. 2002; 84(2-3): 195-201.
- Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW, Cordon-Cardo C, DePinho RA The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998; 92(6): 713-23.
- Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999; 6(2): 99-104.
- Pryer NK, Wuestehube LJ, Schekman R. Vesicle-mediated protein sorting. *Annu Rev Biochem*. 1992; 61: 471-516.
- Pulciani S, Santos E, Long LK, Sorrentino V, Barbacid M. ras gene Amplification and malignant transformation. *Mol Cell Biol*. 1985; 5(10): 2836-41.
- Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev*. 2001; 15(4): 398-403
- Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nat Genet*. 1999; 22(1): 44-52..
- Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 1991; 252: 1705–8.
- Raucci A, Laplantine E, Mansukhani A, Basilico C. Activation of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J Biol Chem*. 2004; 279(3): 1747-56
- Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22): 3291-310.
- Rocha KM, Forti FL, Lepique AP & Armelin HA. Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: roles of ACTH. *Microsc Res Tech*. 2003; 61(3): 268-74
- Rodenhuis S, Slebos RJ, Boot AJ, Evers SG, Mooi WJ, Wagenaar SS, van Bodegom PC, Bos JL. Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*. 1988; 48(20): 5738-41.

Referências Bibliográficas

- Rodriguez-Viciano P, Tetsu O, Oda K, Okada J, Rauen K, McCormick F. Cancer targets in the Ras pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2005; 70: 461-7
- Ruffolo SC, Shore GC. BCL-2 selectively interacts with the BID-induced open conformer of BAK, inhibiting BAK auto-oligomerization. *J Biol Chem.* 2003; 278(27): 25039-45.
- Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(8): 553-5
- Sambrano GR, Chandy G, Choi S, Decamp D, Hsueh R, Lin KM, Mock D, O'Rourke N, Roach T, Shu H, Sinkovits B, Verghese M, Bourne H. Unravelling the signal-transduction network in B lymphocytes. *Nature.* 2002; 420(6916): 708-10.
- Sambrano GR, Fraser I, Han H, Ni Y, O'Connell T, Yan Z, Stull JT. Navigating the signalling network in mouse cardiac myocytes. *Nature.* 2002; 420(6916): 712-4.
- Sarkisian CJ, Keister BA, Stairs DB, Boxer RB, Moody SE, Chodosh LA. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(5): 493-505.
- Schaap D, Parker PJ. Expression, purification, and characterization of protein kinase C-epsilon. *J Biol Chem.* 1990; 265(13): 7301-7.
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2000; 103(2): 211-25.
- Schwab M, Alitalo K, Varmus HE, Bishop JM, George D. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature.* 1983; 303(5917): 497-501..
- Schweigerer L, Neufeld G, Gospodarowicz D. Basic fibroblast growth factor as a growth inhibitor for cultured human tumor cells. *J Clin Invest.* 1987; 80(5): 1516-20.
- Schwindt TT, Forti FL, Juliano MA, Juliano L & Armelin HA. Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry.* 2003; 42(7): 2116-21.
- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science.* 2003; 300(5616): 135-9.
- Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, et al. Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet.* 1999; 21(1): 138-41.
- Seno M, Masago A, Nishimura A, Tada H, Kosaka M, Sasada R, Igarashi K, Seno S, Yamada H. BALB/c 3T3 cells co-expressing FGF-2 and soluble FGF receptor acquire tumorigenicity. *Cytokine.* 1998; 10(4): 290-4.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997; 88(5): 593-602.

Referências Bibliográficas

- Sewing A, Wiseman B, Lloyd AC, Land H. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(9): 5588-97.
- Sheaff, R., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J., and Clurman, B. 1997. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev.* 1997; 11(11): 1464-78..
- Shen R, Wang X, Drissi H, Liu F, O'Keefe RJ, Chen D. Cyclin D1- cdk4 induce runx2 ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 2006; 281(24): 16347-53.
- Sherr CJ, Roberts JM. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 2004; 18(22): 2699-711
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999; 13(12): 1501-12.
- Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell.* 2000; 102(4): 407-10.
- Sherr CJ, Matsushime H, Roussel MF. Regulation of CYL/cyclin D genes by colony-stimulating factor 1. *Ciba Found Symp.* 1992; 170: 209-19
- Shimizu K, Birnbaum D, Ruley MA, Fasano O, Suard Y, Edlund L, Taparowsky E, Goldfarb M and Wigler M. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. *Nature.* 1983; 304(5926): 497-500.
- Sicinska E, Aifantis I, Le Cam L, Swat W, Borowski C, Yu Q, Ferrando AA, Levin SD, Geng Y, von Boehmer H, Sicinski P. Requirement for cyclin D3 in lymphocyte development and T cell leukemias. *Cancer Cell.* 2003; 4(6): 451-61.
- Sicinska E, Lee YM, Gits J, Shigematsu H, Yu Q, Rebel VI, Geng Y, Marshall CJ, Akashi K, Dorfman DM, Touw IP, Sicinski P. Essential role for cyclin D3 in granulocyte colony-stimulating factor-driven expansion of neutrophil granulocytes. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(21): 8052-60.
- Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RJ. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell.* 1995; 82(4): 621-30.
- Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, Parker SB, Gardner H, Park MY, Robker RL, Richards JS, McGinnis LK, Biggers JD, Eppig JJ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature.* 1996; 384(6608): 470-4.
- Sleeman M, Fraser J, McDonald M, Yuan S, White D, Grandison P, Kumble K, Watson JD, Murison JG. Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene.* 2001; 271(2): 171-82.
- Stanulis-Praeger BM. Cellular senescence revisited: a review. *Mech Ageing Dev.* 1987; 38(1): 1-48.
- Sturla LM, Westwood G, Selby PJ, Lewis IJ, Burchill SA. Induction of cell death by basic fibroblast growth factor in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* 2000; 60(21): 6160-70.

Referências Bibliográficas

- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 1992; 356(6372): 768-74.
- Timmer JC, Salvesen GS. Caspase substrates. *Cell Death Differ*. 2007; 14(1): 66-72.
- Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(1): 11-20.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*. 1998; 3(11): 697-707.
- Tsutsui T, Hesabi B, Moons DS, Pandolfi PP, Hansel KS, Koff A, Kiyokawa H. Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27Kip1 activity. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(10): 7011-9.
- Valverde AM, Sinnott-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(18): 8572-6.
- Vlach J, Hennecke S, Amati B. Phosphorylation dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *EMBO J*. 1997; 16(17): 5334-44.
- Voit R, Hoffmann M, Grummt I. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J*. 1999; 18(7): 1891-9.
- Watters DJ, Parsons PG. Critical targets of protein kinase C in differentiation of tumour cells. *Biochem Pharmacol*. 1999; 58(3): 383-8.
- Weinstein M, Xu X, Ohyama K, Deng CX. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*. 1998; 125(18): 3615-23.
- Welcker M, Singer J, Loeb K.R., Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman B.E., and Roberts J.M. 2003. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell*. 2003; 12(2): 381-92.
- Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, Rivera H, Halpern AE, Phung HM, Negro-Vilar A, Hannun YA. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol*. 1992; 117(1): 121-33.
- Williamson AJ, Dibling BC, Boyne JR, Selby P, Burchill SA. Basic fibroblast growth factor-induced cell death is effected through sustained activation of p38MAPK and up-regulation of the death receptor p75NTR. *J Biol Chem*. 2004; 279(46): 47912-28.
- Woods D, Parry D, Cherwinski H, Bosch E, Lees E, McMahon M. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol. Cell. Biol.*, 1997; 17(9): 5598-611.
- Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med*. 2000; 6(8): 849-51.

Referências Bibliográficas

Xia S, Forman LW, Faller DV. Protein kinase C delta is required for survival of cells expressing activated p21RAS. *J Biol Chem.* 2007; 282(18): 13199-210.

Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J. fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev.* 1994; 8(24): 3032-44.

Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991; 64(4): 841-8.

Yeh JJ, Der CJ. Targeting signal transduction in pancreatic cancer treatment. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11(5):673-94.

Yu Q, Sicinski P. Mammalian cell cycles without cyclin E-CDK2. *Cell Cycle.* 2006; 5(19): 2183-6.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell.* 1998; 92(6): 725-34.

Zeisel SH. Choline phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J.* 1993; 7(6): 551-7.

Anexo

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Tatiana Guimarães de Freitas Matos

Local e data de nascimento: Rio de Janeiro, 14 de agosto de 2007.

EDUCAÇÃO

Colégio Objetivo
Brasília – DF, 1995

UnB – Universidade de Brasília
Brasília – DF, 1999
Bacharel em Ciências Biológicas

USP – Universidade de São Paulo
São Paulo-SD, 2002
Mestrado em Ciências (Biologia Celular e Tecidual)

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Curso Avançado de Inglês
Curso completo de Inglês, desde 1982, iniciado em outras instituições e concluído na CASA THOMAS JEFFERSON de Brasília, de 1991 a 1993

Aperfeiçoamento em Língua Inglesa
80 horas
Curso intensivo de inglês, ministrado pelo HOLBORN ENGLISH LANGUAGE SERVICES, em Londres, Inglaterra, 1995

Curso Intensivo de Inglês
80 horas
Curso ministrado por ELS-English Language Service. *Campus* do Eckerd College, Saint Petersburg, Florida, USA, 1990

OCUPAÇÃO

Bolsista de Iniciação Científica
CNPq
Laboratório de Microscopia Eletrônica - UnB
Agosto/1997 a Julho/1999

Bolsista de Mestrado
FAPESP
Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular – Incor – FM-USP
Março/2000 a Outubro/2002

Bolsista de doutorado

FAPESP

Laboratório de Fatores de Crescimento, Hormônios e Ciclo Celular - USP

Junho/2003 a Maio/2007

PUBLICAÇÕES

- Periódicos

MATOS, T.G.F., Giugliano, L.G., Ribeiro, B.M. & Bão, S.N. (1999) Structural and ultrastructural studies of *Anticarsia gemmatilis* midgut cells infected with the baculovirus *A. gemmatilis* nucleopolyhedrovirus. *International Journal of Insect Morphology and Embriology* **28**, 193-199.

Xavier-Neto, J., Silva, F. A., MATOS, T. G. F., Hochgreb, T. & Linhares, V. L. F. (2001) Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis* **31**, 97-104.

- Anais de Eventos

MATOS, T.G.F., Costa, E.T., Salotti, J., Yoshihara, C.K.; Koga, M.M.& Armelin, H.A. Selection of FGF2-resistants from mouse tumor cell lines yields clonal sublines of low tumorigenic potential. Anais do Congresso "Mechanisms & Models of Cancer"

MATOS, T.G.F., Yoshihara, C.K. & Armelin, H. A. FGF2 Induced Cell Death correlates with the Transformation and Tumorigenicity in Mouse Adrenocortical Tumor Cells. Anais da "XXXV Reunião Anual da SBBq".

MATOS, T.G.F., Menezes, D. C., Ribeiro, R. C., Rosenthal, N. & Xavier-Neto, J. (2003) Search for elements controlling atrial-specific expression: a study in transgenic mice. Anais do "1st International Meeting of Latin American Society of Developmental Biology"

MATOS, T.G.F., Xavier-Neto, J. (2001) Morfogenia Atrial: Controle Molecular. Anais da "XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental"

MATOS, T.G.F., Xavier-Neto, J. & Rosenthal, N. (2001) Identification of cis elements controlling atrial-specific expression in transgenic mice. Anais do "1st international symposium "Post-genomic Developmental Genetics: The Role of Model Organisms", 20.

MATOS, T.G.F, Ribeiro, B.M., Soares, J.S., Pinedo, F. J. R. & Bão, S.N. (1999) Study of the *Anticarsia gemmatilis* midgut infected with the recombinant baculovirus vAgEGT Δ lacZ. *Acta Microscopica* **8**, 411-412.

MATOS, T.G.F., Giugliano, L.G., Ribeiro, B.M. & Bão, S.N. (1998) Análise estrutural e ultraestrutural do intestino da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, infectado com AgMNPV. Anais do VI Simpósio de Controle Biológico, 36.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)