

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

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

JACQUELINE SALOTTI

**Mecanismos moleculares e celulares
de citotoxicidade de FGF2 parácrino
em células tumorais dependentes de Ras**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
30/04/2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JACQUELINE SALOTTI

**Mecanismos moleculares e celulares de
citotoxicidade de FGF2 parácrino em células
tumorais dependentes de Ras**

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

Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

São Paulo
2009

Ficha Catalográfica

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

Salotti, Jacqueline
S175m Mecanismos moleculares e celulares de citotoxicidade de
FGF2 parácrino em células tumorais dependentes de Ras /
Jacqueline Salotti. -- São Paulo, 2009.
1v. (paginação irregular)

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

1. Biologia molecular 2. Ciclo celular : Fisiologia
3. Neoplasmas 4. Receptores : Membrana : Célula : Biologia
I. T. II. Armelin, Hugo Aguirre, orientador.

574.88 CDD

Jacqueline Salotti

Mecanismos moleculares e celulares de citotoxicidade de FGF2 parácrino em células tumorais dependentes de Ras

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

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, Valquíria e Antônio.

Agradecimentos

Ao Prof Hugo Armelin, por me orientar, ensinar, incentivar e sempre me surpreender, por me dar liberdade de criar e fazer, por enxergar os resultados sob diferentes pontos de vista, por ser a memória da bioquímica e biologia molecular e por contar histórias divertidas e insólitas, das mais diversas naturezas.

Aos meus orientadores de Iniciação Científica, Prof^a Edna Kato (FCF-USP), Prof Paulo Moreno (IQ-USP) e Prof Pio Colepicolo (IQ-USP), por me introduzirem à pesquisa.

Ao Prof Bayardo Torres, que tive o prazer de conhecer desde a graduação, por seus conselhos sempre sábios e prudentes.

Aos professores do IQ e seus colaboradores, de forma geral, por cederem equipamentos, reagentes ou tempo, em especial, aos laboratórios da Prof^a Bianca Zingalez, Prof^a Mari Sogayar, Prof Henning Ulrich e Prof^a Ohara Augusto.

Ao Departamento de Bioquímica, ao Instituto de Química e seus funcionários.

Ao apoio financeiro do CNPq e da FAPESP.

Às pessoas queridas que conheci no IQ, ao longo destes anos: Sérgio Galdino (lab Paulo Moreno); Teresa Kutner, Patrícia Lopes, Antonieta Leitão, Ernani Pinto, Karina Cardozo, Adriana Carvalho e Angela Tonon (lab Pio Colepicolo); Paromita Majumder (lab Henning Ulrich); Juliana Luz (lab Carla Columbano), Fernanda Cerqueira (lab Ohara Augusto) e Noboru Sakabe (lab Bayardo Torres).

Ao pessoal do nosso laboratório, atuais e antigos membros: Alexandre Dermargos, Carla Moreira, D. Cleuza da Costa, Celina Yoshihara, Débora da Costa, Érico Costa, Eva Souza, Fábio Forti, Fábio Nakano, Gilson Murata, D. Maria Moraes, Matheus Dias, Juliana Galvão, Julianna Zeidler, Paula Asprino, Regiane dos Santos, pelos ótimos meses ou anos de convívio e colaboração. Em especial, ao Ivan Rebutini, pelo treinamento intensivo e dedicação no início do meu doutoramento, à Tatiana Matos, minha amiga, companheira de laboratório e de apartamento; à Marianna Koga, aluna de Iniciação Científica, que me acompanhou nesta jornada.

A toda minha família, que eu amo muito, pelo amor que me deram. À minha mãe Valquíria, pelo seu carinho, por me ensinar a ser persistente e determinada; e ao meu pai Antônio (*in memoriam*), por ter explicações para todas as minhas perguntas, por me mostrar a beleza da ciência e por seu grande interesse pelos mistérios da vida. Aos meus irmãos Danilo e Leonardo, por serem irmãos e me ensinarem tanto. À minha tia Adair, pela compreensão e incentivo.

Às minhas amigas, Thaís Dols, Karina Garcia e respectivas famílias, por sempre estarem ao meu lado.

Aos pais do meu namorado, Thereza e Antônio Redígolo, pelo grande afeto com que me receberam.

Ao meu namorado Marcelo, por tudo, pelo carinho, companheirismo, paciência, amizade e por ser meu amor.

Science cannot solve the ultimate mystery of nature. And that is because, in the last analysis, we ourselves are a part of the mystery that we are trying to solve.

Max Planck

Science is wonderfully equipped to answer the question 'How?' but it gets terribly confused when you ask the question 'Why?'

Erwin Chargaff

We must not forget that when radium was discovered, no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium, a benefit for humanity.

Marie Curie

Resumo

Salotti, J. **Mecanismos moleculares e celulares de citotoxicidade de FGF2 parácrino em células tumorais dependentes de Ras.** 2009. 198 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Descrevemos, recentemente, que FGF2 parácrino dispara senescência nas linhagens celulares murinas Y1 e 3T3-B61, transformadas malignamente por Ras, mas sem ativação das vias apoptóticas (Costa *et al.*, 2008). Nesta tese, estudamos os mecanismos celulares e moleculares desta resposta de estresse irreversível, disparada por FGF2. Focalizamos, principalmente, a linhagem Y1, que carrega uma amplificação do oncogene *Kras*, mas apresenta um controle parcial da transição G0/G1 → S do ciclo celular. Por estas características fenotípicas, as células Y1 foram utilizadas no estudo dos mecanismos das ações antagônicas de FGF2, isto é, a atividade mitogênica clássica e a nova ação citotóxica que causa senescência. Análises de citometria de fluxo e marcação com BrdU mostraram que FGF2 promove a transição G0/G1 → S (atividade mitogênica), mas bloqueia a progressão através de S e G2/M (atividade antimitogênica). Ensaio de viabilidade celular (MTS e Cyto-Tox) demonstraram que, durante o bloqueio do ciclo celular por FGF2, as células permanecem íntegras e metabolicamente ativas, embora exibam alterações morfológicas, que sugerem estresse celular. Além disso, experimentos de tomada de ³H-timidina em DNA evidenciaram que, já nas primeiras horas de G1, FGF2 dispara um processo antimitogênico que só tardiamente vai se manifestar na fase S, bloqueando a síntese de DNA. Verificamos ainda, que o inibidor específico da Tyr-quinase dos receptores de FGF, PD173074, abole completamente, tanto os efeitos mitogênicos como os antimitogênicos de FGF2 nas células Y1, demonstrando que ambos os processos iniciam-se com a ativação da Tyr-quinase dos FGFRs. Por outro

lado, inibidores específicos das vias de sinalização de MEK/ERK, PI3K/AKT e PKC (todas mitogênicas e à jusante dos FGFRs) bloqueiam a progressão no ciclo celular, sem proteger as células Y1 de FGF2, evidenciando que estas vias mitogênicas não participam dos mecanismos moleculares citotóxicos disparados por FGF2. Entretanto, inibidores das Tyr-quinases Src protegem parcialmente as células Y1 de FGF2, implicando a família Src na transformação maligna destas células. Para buscar novos genes pertinentes à ação citotóxica de FGF2 analisamos expressão gênica por RT-qPCR, dando continuidade a estudos anteriores desenvolvidos no laboratório, através de microarranjos de cDNA (Asprino & Armelin, 2006). Desta busca, resultaram genes codificantes de proteínas envolvidas no controle de ciclo celular, adesão e citoesqueleto, com destaque para proteínas reguladoras de RhoGTPases e os receptores de FGF. Procuramos também examinar especificidades entre os FGFRs, quanto ao disparo das ações antagônicas de FGF2. As células Y1 expressam FGFR1IIIc, FGFR2IIIc e FGFR5 enquanto as 3T3-B61 expressam FGFR1IIIc e FGFR5. A redução da expressão de FGFR2 por RNAi, em células Y1, não impediu a ação citotóxica de FGF2, mas a redução de FGFR1 protegeu as células da ação morfológico-estressante de FGF2. Como FGFR5 não possui domínio de Tyr-quinase, concluímos que o FGFR1 é o receptor mais relevante para o efeito citotóxico de FGF2, em ambas as células. Em conclusão, FGF2 ativa a Tyr-quinase dos FGFRs, disparando mecanismos moleculares antagônicos, paralelos e independentes, onde o efeito final é o bloqueio do ciclo celular nas fases S e G2/M e, conseqüentemente, senescência celular.

Palavras-chave: FGF2, receptores de Tyr-quinase de FGF, Ras, Src, linhagens celulares malignas, controle do ciclo celular.

Abstract

Salotti, J. **Molecular and cellular mechanisms of paracrine FGF2 cytotoxicity in Ras-driven tumor cells.** 2009. 198 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

We have recently described that paracrine FGF2 triggers senescence in Ras-driven murine cell lines Y1 and 3T3-B61, without activation of apoptotic pathways (Costa *et al.*, 2008). On this thesis, we studied the molecular and cellular mechanisms of this irreversible stress response triggered by FGF2. We have mainly focused on the Y1 cell line, which carries *Kras* oncogene amplification, but presents a certain control of the G0/G1 → S cell cycle transition. Because of these phenotypic features, the Y1 cells were utilized to study the mechanisms of FGF2 antagonistic actions, i. e., the classical mitogenic activity and the new cytotoxic action, which causes senescence. Flow cytometer analysis and BrdU labeling have shown that FGF2 promotes the G0/G1 → S transition (mitogenic activity), but arrests the progression through S and G2/M (antimitogenic activity). Viability assays (MTS and Cyto-Tox) have shown that, during the cell cycle arrest by FGF2, cells remain intact and metabolically active, although exhibiting morphologic alterations, which suggested cellular stress. Moreover, ³H-thymidine uptake into DNA has evidenced that, within the first hours of G1, FGF2 triggers an antimitogenic process that only lately will manifest in S phase, blocking DNA synthesis. We have further verified that the specific Tyrosine kinase inhibitor, PD173074, completely abolishes both FGF2 mitogenic and antimitogenic effects, showing that both processes start at FGFRs Tyrosine-kinase. On the other hand, specific inhibitors of MEK/ERK, PI3K/AKT and PKC signaling pathways (all mitogenic and downstream of FGFRs) block the cell cycle progression, but do not protect cells from FGF2, showing that these pathways do not participate

of the cytotoxic molecular mechanisms triggered by FGF2. However, Src Tyr-kinases inhibitors partially protect Y1 cells from FGF2, implicating the Src family on malignant transformation of these cells. To search new genes pertinent to the cytotoxic action of FGF2, we analyzed gene expression by RT-qPCR, continuing previous studies developed in our laboratory through cDNA microarrays (Asprino & Armelin, 2006). This search revealed protein-coding genes involved on cell cycle control, cellular adhesion and cytoskeleton, in which we highlighted regulatory proteins of RhoGTPases and FGF receptors. We also examined specificities among FGFRs in relation to FGF2 antagonistic actions. Y1 cells express FGFR1IIIc, FGFR2IIIc and FGFR5 whereas 3T3-B61 cells express FGFR1IIIc and FGFR5. In Y1 cells, the knockdown of FGFR2 expression by RNAi do not stop FGF2 cytotoxic actions, but knockdown of FGFR1 expression protects cells from the FGF2 morphologic-stressing action. Since FGFR5 lacks Tyr-kinase domain, we concluded that FGFR1 is the most relevant receptor for FGF2 cytotoxic effect in both cells. In conclusion, FGF2 activates FGFRs Tyr-kinase, triggering parallel and independent antagonistic molecular mechanisms, in which the final effect is the S and G2/M cell cycle arrest and, consequently, cellular senescence.

Palavras-chave: FGF2, FGF Tyr-kinase receptors, Ras, Src, malignant cell lines, cell cycle control.

Lista de abreviaturas

- ACTH: hormônio adrenocorticotrópico (*adrenocorticotrophic hormone*)
- AKT: homólogo do oncogene viral v-akt de timoma murino (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*)
- AVP: arginina-vasopressina (*arginine-vasopressine*)
- BrdU: bromodeoxiuridina (*bromodeoxyuridine*)
- cAMP: AMP cíclico (*cyclic AMP*)
- CDK: quinase dependente de ciclina (*cyclin-dependent kinase*)
- CDKN: inibidor de quinase dependente de ciclina (*cyclin-dependent kinase inhibitor*)
- ddNTP: trifosfato de didesoxinucleosídeo (*dideoxynucleoside triphosphate*)
- DMEM: meio de cultura DME (*Dulbeco modified Eagle medium*)
- DNase: desoxirribonuclease (*desoxirribonuclease*)
- dNTP: trifosfato de desoxinucleosídeo (*deoxynucleoside triphosphate*)
- DTT: ditioneitol (*dithiothreitol*)
- ERK: quinase regulada por sinais extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*)
- FCS: soro fetal bovino (*fetal calf serum*)
- FGF: fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor*)
- FGFR: receptor de FGF (*FGF receptor*)
- GAP: Proteínas de ativação de GTPase (*GTPase-activating proteins*)
- GEF: fatores de troca de guanossina (*guanosine nucleotide exchange factors*)
- GFP: proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*)
- GTP: guanossina tri-fosfato (*guanosine 5'-triphosphate*)
- HRP: peroxidase de raiz-forte (*horseradish peroxidase*)
- HSPG: proteoglicanos sulfato de heparan (*heparan sulfate proteoglycans*)
- Ig: imunoglobulina (*immunoglobulin*)
- MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen activated protein kinase*)
- MEK: ERK quinase ou MAP quinase quinase (*mitogen activated protein kinase kinase*)
- PBS: solução salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*)
- PCR: reação de polimerização em cadeia (*polymerase chain reaction*)
- PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta (*platelet-derived growth factor*)
- PI: iodeto de propídio (*propidium iodide*)
- PI3K: fosfoinositídeo-3-quinase (*phosphoinositide-3-kinase*)
- PKC: proteína quinase dependente de Ca²⁺ (*protein kinase C*)
- PMA: diéster de forbol (*12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*)
- Ras: homólogo do oncogene viral de sarcoma de rato (*rat sarcoma viral oncogene homolog*)
- RNAi: interferência de RNA (*RNA interference*)
- RI: repetição invertida (*inverted repeat*)
- RT: transcrição reversa (*reverse transcription*)
- SDS: dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)
- Src: homólogo do oncogene viral v-src de sarcoma aviário (*v-src avian sarcoma - Schmidt-Ruppin A-2 - viral oncogene homolog*)
- shRNA: pequeno grampo de RNA (*small hairpin RNA*)
- siRNA: pequeno interferente de RNA. (*small interfering RNA*)
- TBS: solução salina tamponada com tris (*tris buffered saline*)

Índice de Tabelas

Tabela 1.1	30
Tabela 1.2	33
Tabela 3.1	50
Tabela 3.2	53
Tabela 3.3	59
Tabela 3.4	60
Tabela 3.5	65
Tabela 3.6	72
Tabela 3.7	72
Tabela 4.1	132
Tabela 4.2	146
Tabela 4.3	148
Tabela 4.4	152

Índice de Figuras

Figura 1.1.....	21
Figura 1.2.....	22
Figura 1.3.....	29
Figura 1.4.....	31
Figura 1.5.....	37
Figura 1.6.....	38
Figura 1.7.....	45
Figura 1.8.....	47
Figura 3.1.....	54
Figura 3.2.....	55
Figura 4.1.....	85
Figura 4.2.....	86
Figura 4.3.....	87
Figura 4.4.....	88
Figura 4.5.....	89
Figura 4.6.....	91
Figura 4.7.....	94
Figura 4.8.....	96
Figura 4.9.....	102
Figura 4.10.....	103
Figura 4.11.....	106
Figura 4.12.....	107
Figura 4.13.....	108
Figura 4.14.....	109
Figura 4.15.....	112
Figura 4.16.....	114
Figura 4.17.....	118
Figura 4.18.....	119
Figura 4.19.....	120

Figura 4.20.....	122
Figura 4.21.....	124
Figura 4.22.....	125
Figura 4.23.....	128
Figura 4.24.....	131
Figura 4.25.....	134
Figura 4.26.....	143
Figura 4.27.....	144
Figura 4.28.....	147
Figura 4.29.....	149
Figura 4.30.....	152
Figura 4.31.....	153
Figura 4.32.....	154
Figura 4.33.....	155
Figura 4.34.....	156
Figura 4.35.....	157
Figura 4.36.....	160
Figura 4.37.....	161
Figura 6.1.....	177

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs).....	19
1.1.1 FGF2	23
1.1.2 Receptores de FGF (FGFRs)	26
1.2 Via de sinalização de FGF	35
1.2.1 Ras	35
1.2.2 ERK 1/2.....	38
1.2.3 PI3K/AKT.....	40
1.2.4 PKC	41
1.2.5 Src.....	42
1.3 Ciclo celular e câncer	44
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Plasmídeos	49
3.1.1 Subclonagem dos plasmídeos pSUPER para RNAi	52
3.2 Extração e purificação de RNA total	56
3.3 Transcrição reversa (RT)	57
3.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)	58
3.5 PCR quantitativo (qPCR)	60
3.6 Sequenciamento	62
3.6.1 MegaBACE 1000	64
3.6.2 Big Dye®	64
3.7 Extração de proteínas	65
3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)	66
3.9 <i>Immunoblot</i>	67
3.10 Culturas celulares	68
3.10.1 Sincronização em G0/G1 de células Y1 e derivadas	74
3.10.2 Sincronização em G0/G1 de células Balb 3T3	75
3.10.3 Sincronização em G0/G1 de células 3T3-B61	75
3.10.4 Sincronização em G0/G1 de cultura primária de adrenocórtex de rato.....	75
3.11 Transfecções celulares.....	76
3.11.1 Transfecção estável de plasmídeos	76
3.11.2 Transfecção transiente de siRNAs	77
3.12 Ensaios de viabilidade celular	78

3.13 Incorporação de timidina tritiada (síntese de DNA)	79
3.14 Ensaio clonogênico ou de formação de colônia.....	80
3.15 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo	81
3.16 Inibidores	82
4 RESULTADOS	83
4.1 FGF2 inibe a proliferação de células malignas dependentes de Ras, através da ativação das Tyr-quinases dos receptores de FGF.	83
4.2 As células malignas dependentes de Ras permanecem íntegras e metabolicamente ativas na presença de FGF2.....	90
4.3 FGF2 mostra atividade mitogênica por mecanismos mediados pelas Tyr-quinases dos receptores FGFRs.....	92
4.4 No início da fase G1, FGF2 dispara um processo antimitótico, mediado pelas Tyr-quinases dos receptores de FGF, que só tardiamente inibirá a síntese de DNA induzida por soro.	101
4.5 A ativação de Src está envolvida no processo de citotoxicidade disparado por FGF2 em células Y1.	104
4.6 A ação citotóxica do FGF2 é independente das vias MEK/ERK, PI3K/AKT e PKC.	113
4.7 Genes de controle de ciclo celular, migração, adesão e citoesqueleto são expressos diferencialmente na linhagem parental Y1 e na sublinhagem Y1-FRes3, parcialmente resistente a FGF2.....	129
4.8 FGFR1IIIc é o receptor dominante na ação antitumoral de FGF2 em células Y1.....	141
4.9 FGFR1IIIc também é o receptor dominante na ação antitumoral de FGF2 em células 3T3-B61.	156
5 DISCUSSÃO	162
6 CONCLUSÃO	176
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
8 LISTA DE ANEXOS	198

1 Introdução

Os organismos multicelulares possuem mecanismos sistêmicos de coordenação das vias metabólicas e das vias moleculares de sinalização, internas às múltiplas células do organismo. A base desta coordenação é a comunicação intercelular. Os mecanismos de comunicação intercelular envolvem moléculas “mensageiras” e/ou impulsos elétricos, que são detectados e integrados por módulos da rede intracelular de sinalização, levando a fenótipos distintos em resposta a conjuntos específicos de sinais extracelulares.

Entretanto, apesar da especificidade celular, os componentes fundamentais de muitas vias de sinalização, assim como do metabolismo, são comuns a todas as células. Estes componentes incluem os receptores transmembranares, que se ligam às moléculas extracelulares “mensageiras”, e uma variedade de proteínas intracelulares de sinalização, que distribuem os sinais a determinados compartimentos celulares. Ao final de cada via de sinalização, estão alvos, que podem ser proteínas regulatórias de expressão gênica, canais iônicos, componentes de vias metabólicas, partes de citoesqueleto, entre outros. A ativação ou perturbação de determinada via sinaliza para a célula dividir-se, crescer, diferenciar-se, migrar ou até mesmo morrer.

Mais de uma década na era genômica e contínuos avanços tecnológicos de análise em larga escala, envolvendo expressão gênica de genoma total, sequenciamento de DNA ultrarrápido e RNAi, produzem cada vez mais dados. Além disso, o conceito de “gene” está mudando continuamente e, recentemente,

novas formas de regulação e transcrição gênicas foram descritas (Reis *et al.*, 2004; The ENCODE Project Consortium, 2007; Core *et al.*, 2008; Seila *et al.*, 2008). Entretanto, apesar desta imensa quantidade de informação sobre genes, transcritos, proteínas, metabólitos etc., pouco se progrediu no discernimento das redes sistêmicas que conectam todas estas biomoléculas. A literatura disponibiliza bancos de dados (Kanehisa *et al.*, 2006; Schlessinger, 2008; Krupa *et al.*, 2008) e mapas estáticos de vias de sinalização, que não permitem a visualização da dinâmica dose-tempo-espaço, necessária para se interpretar corretamente a complexidade da fisiologia celular.

Assim, entender como uma célula orchestra esta elaborada sinfonia de interações moleculares necessária para o desenvolvimento, sobrevivência, doenças, envelhecimento e morte, é objetivo primordial na fronteira da pesquisa em biologia celular e molecular (Alliance for Cellular Signaling, 2002; Alon, 2007; Besson *et al.*, 2008).

Há quase 40 anos, nosso laboratório trabalha na definição de mecanismos moleculares envolvidos no controle do ciclo celular (Armelin, 1973). Os resultados que obtivemos nos últimos anos nos permitiram elaborar um módulo de rede de sinalização que integra sinais iniciados nos receptores transmembranares de FGF2, ACTH e AVP (Costa *et al.*, 2008; Forti & Armelin, 2007; Forti *et al.*, 2006a; Forti *et al.*, 2006b; Costa *et al.*, 2004; Lepique *et al.* 2004; Rocha *et al.* 2003; Schwindt *et al.* 2003; Forti *et al.*, 2002; Lotfi & Armelin, 2001; Lotfi *et al.*, 2000; Lepique *et al.*, 2000; Lotfi *et al.* 1997; Armelin *et al.* 1996). Estes trabalhos apresentaram FGF2 como um forte mitógeno para as células Y1, enquanto ACTH e AVP, antagonistas da ação mitogênica de FGF2. FGF2 induz a progressão da fase G0/G1 para a fase S, o que nos

permitiu observar através de ensaios de incorporação de BrdU ou ativação/expressão de proteínas envolvidas na resposta primária, como ativação de ERK 1/2, indução de Fos, indução da ciclina D1 e fosforilação de Rb. Entretanto, recentemente demonstramos que FGF2 inibe a proliferação celular nas linhagens Y1 e 3T3-B61, ambas transformadas por Ras, induzindo senescência (Costa *et al.*, 2008).

O módulo ampliado da via disparada pelos receptores de FGF2, que regula a transição do ciclo celular $G_0/G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2/M$, inclui hipóteses, cuja validação experimental é a meta de um amplo projeto temático da FAPESP. Dentre os subprojetos deste temático, está esta tese de doutoramento, cujo objetivo foi explorar as vias de sinalização iniciadas por FGF2 em células tumorais transformadas por Ras.

1.1 Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs)

A ideia de fatores de crescimento surgiu há mais de 50 anos, com o descobrimento de NGF (*nerve growth factor*) e EGF (*epidermal growth factor*) (Levi-Montalcini *et al.*, 1954; Levi-Montalcini & Cohen, 1960; Cohen, 1965). Devido ao trabalho pioneiro na identificação dos primeiros fatores, Rita Levi-Montalcini e Stanley Cohen compartilharam o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina em 1986.

Ao longo destes anos, foram descobertos outros fatores de crescimento, dentre eles, a família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs). Originalmente, FGF1, ou FGF ácido, e FGF2, ou FGF básico, estavam presentes em extrato de hipófise bovina e, foram assim denominados por, inicialmente, serem capazes de

estimular a proliferação de fibroblastos murinos 3T3 (Armelin, 1973; Gambarini & Armelin, 1982).

Após 35 anos, a família de FGF, tanto em humanos como em camundongos, compreende 22 membros, que variam de 17 a 34 kDa e compartilham de 13-71% de identidade. Os FGFs estão envolvidos em diferentes processos celulares e são encontrados em diversos organismos, de nematódeos a humanos (revisado por Itoh, 2007). Entre as espécies de vertebrados, os FGFs são altamente conservados tanto na estrutura gênica quanto na sequência de aminoácidos. Análises filogenéticas subdividem os FGFs de humanos e camundongos em 7 subfamílias (figura 1.1). As subfamílias FGF1, FGF4, FGF7, FGF9, FGF8 são chamadas de canônicas; a subfamília FGF19 é chamada de hormonal e a subfamília FGF11 é chamada de intracelular ou de FHF (*Fibroblast growth factor Homologous Factors*) (revisado por Itoh & Ornitz, 2004, 2008).

Estruturalmente, os FGFs formam um “barril” cilíndrico de fitas β anti-paralelas (figura 1.2) (Eriksson *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1991) e possuem uma alta afinidade por glicosaminoglicanos, como heparina e sulfato de heparan, presentes na matriz extracelular. Os FGFs necessitam destes glicosaminoglicanos para se ligarem eficientemente aos receptores transmembranares, promovendo dimerização e consequente ativação da Tyr-quinase e o disparo de cascatas de transdução de sinais intracelulares (revisado por Faham *et al.*, 1998; revisado por Mohammadi *et al.*, 2005b).

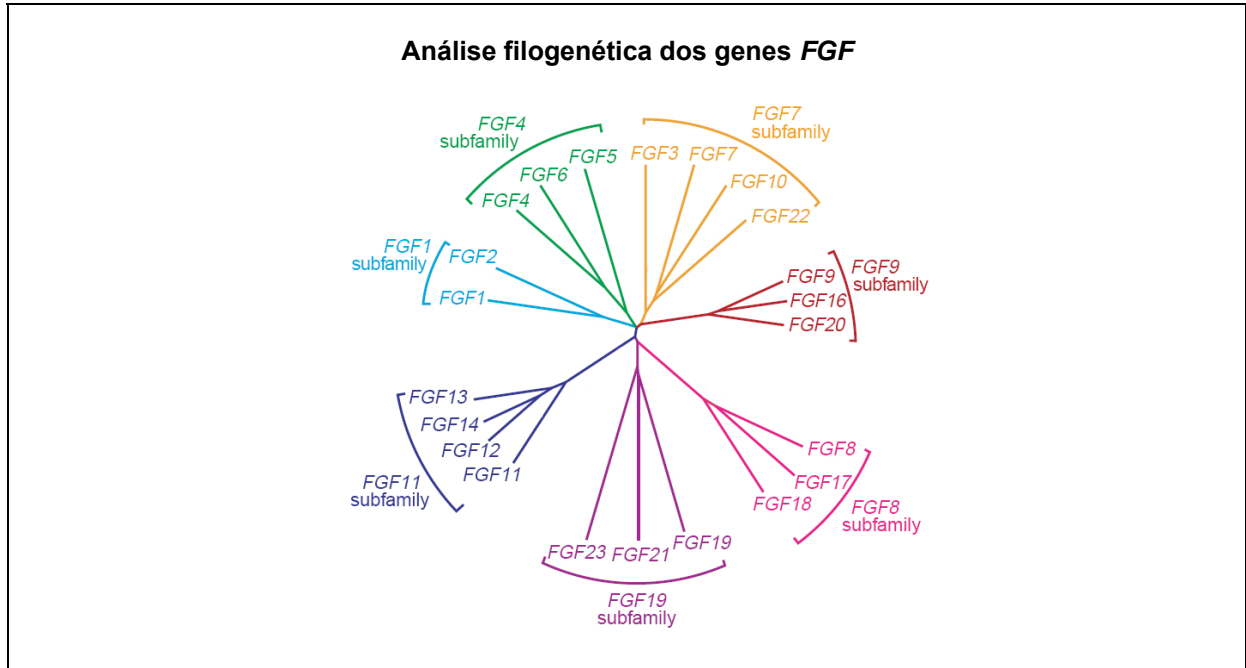


Figura 1.1| Análise filogenética dos 22 genes membros da família FGF em humanos. Estas análises sugerem que estes genes podem se agrupar em 7 subfamílias. O *Fgf15* de camundongo é ortólogo do gene humano *FGF19*. Figura extraída do artigo de revisão de Itoh & Ornitz, 2004.

A maioria dos FGFs (FGF3-8, FGF10, FGF17-19, FGF21 e FGF23) possui sequência de sinalização na região N-terminal, sendo prontamente secretados. FGF9, FGF16 e FGF20 são secretados, mas não possuem peptídeos sinais cliváveis, e sim, uma sequência N-terminal hidrofóbica. FGF1 e FGF2 também não possuem sequência sinal e não são secretados, mas ambos podem ser liberados de células danificadas ou podem ser exocitados por um mecanismo independente da via retículo endoplasmático/complexo de Golgi. FGF22 se mantém vinculado à superfície celular, apesar de possuir uma sequência sinal de secreção putativa (revisado por Powers *et al.*, 2000; revisado por Itoh & Ornitz, 2001). Os FGF11-14 não possuem sequência sinal, mantendo-se intracelularmente e funcionando de maneira independente de receptor. Estes FGFs, ou FGFs, são homólogos estruturais, mas não funcionais, dos demais FGFs (revisado por Goldfarb, 2005).

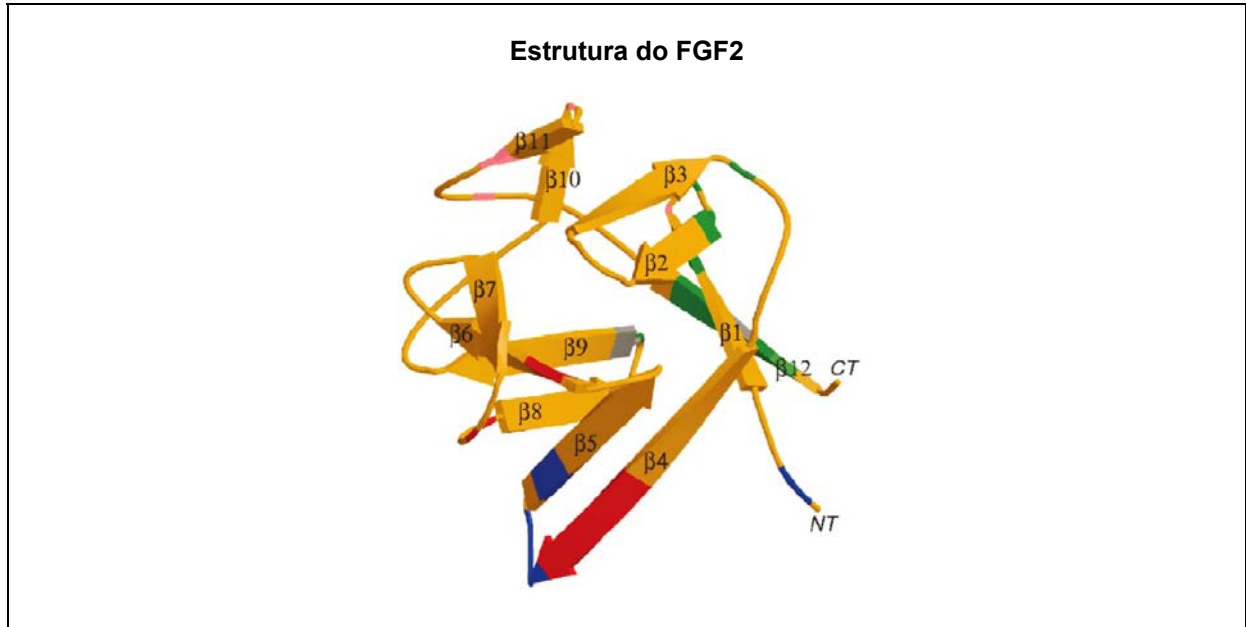


Figura 1.2] Estrutura tridimensional do FGF2, protótipo da família dos FGFs, representada por diagrama de fitas. Todos os FGFs contêm uma região central com resíduos de aminoácidos e motivos estruturais conservados. Estão ordenadas e numeradas as fitas β dentro da região central ($\beta 1$ a $\beta 12$). A região dos resíduos de aminoácidos de ligação à heparina está em rosa. Os resíduos de contato com o receptor FGFR (item 1.1.2) estão em verde (região IgII do FGFR), em azul (região IgIII do FGFR), em vermelho (região de *splicing* alternativo de IgIII do FGFR) e em cinza (região *linker*, entre IgII e IgIII). Figura de M. Mohammadi, extraída do artigo de revisão de Ornitz & Itoh, 2001.

Durante o desenvolvimento embrionário, os FGFs possuem funções essenciais na regulação de proliferação, migração e diferenciação celular (revisado por Böttcher & Niehrs, 2005). No organismo adulto, os FGFs são fatores homeostáticos e funcionam no reparo tecidual e resposta à injúria (Tsuboi & Rifkin, 1990; Watanabe *et al.*, 1998; revisado por Huang & Stern, 2005). A sinalização de FGF também atua na angiogênese e tumorigênese (revisado por Presta *et al.*, 2008; revisado por Grose & Dickson, 2005).

Embora a maioria dos FGFs atue de forma parácrina e/ou intrácrina, alguns FGFs possuem papéis importantes no metabolismo, atuando de forma endócrina. É o

caso da subfamília hormonal dos FGF15 ou 19/FGF21/FGF23, que, ultimamente, tem se destacado por suas atribuições na regulação do metabolismo de ácidos biliares, fosfato, vitamina D, lipídeos e glicose (Shimada *et al.*, 2004; Inagaki *et al.*, 2005; Inagaki *et al.*, 2007; Badman *et al.*, 2007). Estes FGFs hormonais necessitam de correceptores, Klotho ou β -Klotho, expressos especificamente em certos tecidos, para ativação dos receptores de FGF (item 1.1.2) (Ogawa *et al.*, 2007; Urakawa *et al.*, 2006).

1.1.1 FGF2

O FGF2 possui uma isoforma de 18 kDa (figura 1.2), chamada de LMM-FGF2 (*Low Molecular Mass*), resultado do início da tradução no códon de iniciação AUG, e outras isoformas não-canônicas, chamadas de HMM-FGF2 (*High Molecular Mass*), que variam de 22,5 a 34 kDa, formadas a partir do mesmo mRNA com início da tradução à montante, *in-frame*, de códons CUG (Florkiewicz & Sommer, 1989; Prats *et al.*, 1989; revisado por Sørensen *et al.*, 2006).

FGF2 não possui uma sequência sinal para secreção e seu mecanismo de liberação das células é uma das mais intrigantes questões deste sistema. Recentemente, foram propostos dois mecanismos. Um deles envolve a transposição de FGF2 através da membrana plasmática, via HSPGs extracelulares situados próximos à membrana (Zehe *et al.*, 2006), e o outro propõe que o FGF2 é liberado das células por vesículas formadas na membrana (Taverna *et al.*, 2003). Após estímulo com soro em células carenciadas, o FGF2 acumula-se em região próxima à membrana

plasmática, colocalizando com β 1-integrina, uma proteína presente em vesículas de membrana (revisado por Taverna *et al.*, 2008).

O FGF2 de 18 kDa exógeno pode ser internalizado ao citoplasma ligado aos receptores e HSPGs, translocando-se ao núcleo, para interagir e ativar alvos nucleares (Baldin *et al.*, 1990; Roghani & Moscatelli, 1992; Bonnet *et al.*, 1996; Soulet *et al.*, 2005; revisado por Sørensen *et al.*, 2006), através de um mecanismo (Małeck *et al.*, 2004; Wesche *et al.*, 2006) distinto daquele utilizado para as isoformas HMM-FGF2, que possuem uma sequência de localização nuclear N-terminal (Patry *et al.*, 1994). Além disso, foi identificada uma proteína de interação com FGF2, chamada de transloquina, envolvida no tráfego intracelular de FGF2 exógeno ao núcleo (Bossard *et al.*, 2003). A ativação artificial da quinase do receptor de FGF, na ausência de FGF2 (Kudla *et al.*, 1998) ou a ativação do receptor com o mutante FGF2^{S117A} (Bailly *et al.*, 2000) levam à diferenciação, mas não à proliferação celular. Portanto, é possível que, além da ativação dos receptores e MAPKs, a proliferação induzida pelo FGF2 se deva a sua atividade no núcleo.

Foi observado que o FGF2 é substrato de fosforilação pela proteína quinase C (PKC), porém não há alteração na capacidade em se ligar à heparina ou ao receptor, e também pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA), resultando em maior capacidade de ligação ao receptor (Feige *et al.*, 1989; Feige & Baird, 1989). Entretanto, ainda hoje, não está claro como a fosforilação do FGF2 é regulada e qual o seu papel fisiológico.

Um antissenso do FGF2 foi relacionado à regulação pós-transcricional da expressão do mRNA do FGF2. Este transcrito é complementar ao mRNA do FGF2, gerado a partir do gene GFG/NUDT6, codificante para uma hidrolase “nutix”, que utiliza os éxons 4 e 5 do FGF2, mas na fita oposta. (Kimelman & Kirschner, 1989; Knee *et al.*, 1997; Baguma-Nibasheka *et al.*, 2007).

Camundongos nocauteados para FGF2 (-/-) são viáveis e férteis, apesar de apresentarem um fenótipo moderado, com deficiências no desenvolvimento cardiovascular, neuronal, esquelético e dérmico (Dono *et al.*, 1998; Ortega *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2000; Naganawa *et al.*, 2006). O FGF2 está envolvido no desenvolvimento embrionário (revisado por Böttcher & Niehrs, 2005) e no tecido adulto, em funções como proliferação, migração, diferenciação e adesão celulares, apoptose, quimiotaxia, reparo tecidual, angiogênese, hematopoiese, miogênese, espermatogênese, entre outros, atuando nos sistemas nervoso central, circulatório, respiratório, digestivo, reprodutivo, esquelético, muscular e pele (revisado por Bikfalvi *et al.*, 1997, revisado por Sørensen *et al.*, 2006).

Por ser um fator mitogênico e angiogênico, o FGF2 é considerado uma oncoproteína em potencial. Não existe nenhuma evidência de mutações de ativação no FGF2, mas dados na literatura descrevem-no como um fator promotor de tumores, seja através da sua superexpressão, ou, indiretamente, por suas propriedades supracitadas (Neufeld *et al.*, 1988; Maret *et al.*, 1995; Polnaszek *et al.*, 2003; Ribatti *et al.*, 2007; Sahni *et al.*, 2008; Giulianelli *et al.*, 2008; revisado por Grose & Dickson, 2005). Além disso, por ser também um fator antiapoptótico, o FGF2 pode tornar as células tumorais quimiorresistentes (Pardo *et al.*, 2006).

Os resultados recentes de nosso laboratório mostram o FGF2 como um fator antitumoral, pois inibe a proliferação de tumores transformados por Ras, por vias não-apoptóticas (Costa *et al.*, 2008). Outros trabalhos também indicam que o FGF2 bloqueia a proliferação, mas através da indução da apoptose (Sahni *et al.*, 2001; Westwood *et al.*, 2002) ou através de uma parada no ciclo em G1 (Aikawa *et al.*, 2001; Krejci *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2006) ou em G2 (Smits *et al.*, 2000).

Desta forma, podemos observar que o FGF2 modula uma variedade de processos biológicos aparentemente paradoxais. Contudo, é importante considerar, que a forma como estes processos acontecem depende de como cada célula responde, especificamente, a um dado sinal. No caso da via de FGF2, podemos citar a presença/atividade dos diferentes tipos de receptores e suas isoformas, das moléculas de transdução de sinal e proteínas-alvo à jusante. Este assunto será discutido nos próximos itens.

1.1.2 Receptores de FGF (FGFRs)

Foi no final da década de 70 que surgiu a primeira evidência de que FGF era capaz de fosforilar uma proteína transmembranar e iniciar uma resposta mitogênica de síntese de DNA (Nilsen-Hamilton & Hamilton, 1979).

A partir de então, foram descritos cinco receptores de FGF, denominados FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 e FGFR5 (Lee *et al.*, 1989; Mansukhani *et al.*, 1992; Sleeman *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001). Na presença de sulfato de heparan (HS), os

FGFs se ligam estavelmente aos seus receptores, na proporção 2:2:2 (HS:FGF:FGFR) (McKeehan *et al.*, 1998; Mohammadi *et al.*, 2005a, revisado em Mohammadi *et al.*, 2005b).

Há muitos tipos de FGF e cada um deles guia diversos efeitos em diferentes células-alvo. A fim de alcançar este tipo de diversidade, o sistema de sinalização de FGF demanda uma variação nos seus receptores (Johnson *et al.*, 1990; Miki *et al.*, 1992; Chellaiah *et al.*, 1994).

As diferentes formas do receptor de FGF são geradas pela expressão de variantes de *splicing* de um dado gene de *Fgfr* ou, propriamente, pela expressão de diferentes genes de *Fgfr*. Através de variantes de *splicing*, é possível o mesmo gene de *Fgfr* codificar uma variedade de isoformas de receptores. Estes receptores contêm três domínios extracelulares similares à imunoglobulina (Ig), designados Ig I, Ig II e Ig III, uma região ácida entre Ig I e Ig II, um domínio transmembranar e domínios intracelulares de Tyr-quinases (figura 1.3A). Estes domínios de Tyr-quinases não estão presentes no FGFR5. Os receptores FGFR1 ao FGFR4 possuem de 55 a 72% de homologia no nível proteico. O uso de diferentes éxons permite a tradução de proteínas, que podem ser prematuramente truncadas, ou não ter algum dos domínios Ig ou, ainda, ter diferentes regiões para o mesmo domínio de Ig. Por exemplo, variações no *splicing* resultam em receptores secretados que são truncados após Ig I ou Ig III pela introdução de códons de terminação prematuros. Alternativamente, o *splicing* diferencial pode resultar na perda de Ig I, que não altera significativamente a ligação do FGF2 ao FGFR1. A forma de *splice* Ig IIIa codifica para uma proteína truncada que, sendo secretada e não transmembranar, não pode

transduzir um sinal extracelular, embora possa agir como sequestradora de FGFs liberados e inibir a sinalização de FGF. Finalmente, um dos mecanismos mais importantes, no qual os receptores de FGF determinam especificidade para diferentes FGFs, é o uso alternado do éxon das formas de Ig III. Os éxons que codificam para os três domínios possíveis de Ig III, designados de Ig IIIa, Ig IIIb, Ig IIIc, estão situados contiguamente e na mesma ordem no *Fgfr1*, *Fgfr2* e *Fgfr3*. Os genes *Fgfr4* e *Fgfr5* possuem só uma forma de Ig III. A expressão diferencial de Ig IIIb e Ig IIIc é muito importante para determinar a especificidade da sinalização de FGF (figura 1.3B). É interessante notar que a expressão da isoforma Ig IIIb é restrita às células epiteliais, enquanto que a isoforma Ig IIIc, às células mesenquimais (revisado por Ornitz *et al.* 1996; Powers *et al.*, 2000). FGF2 tem alta afinidade pelos seguintes receptores: FGFR1IIIc, FGFR3IIIc e FGFR4 > FGFR2IIIc e FGFR1IIIb, enquanto que FGF1 possui alta afinidade por todos os receptores, isoformas IIIb ou IIIc, (Ornitz *et al.*, 1996).

Através de experimentos de genética reversa, podemos entender melhor a função dos FGFRs. Os animais com perda de função dos genes dos receptores FGFRs estão na tabela 1.1.

As mutações dos receptores são largamente estudadas, pois são responsáveis por diversas doenças humanas genéticas (figura 1.4), dentre elas: displasias esqueléticas, síndrome de Kallman, síndrome lácrimo-aurículo-dento-digital (LADD) (revisado por Passos-Bueno *et al.*, 1999; revisado por Wilkie, 2005; revisado por Beenken & Mohammadi, 2009).

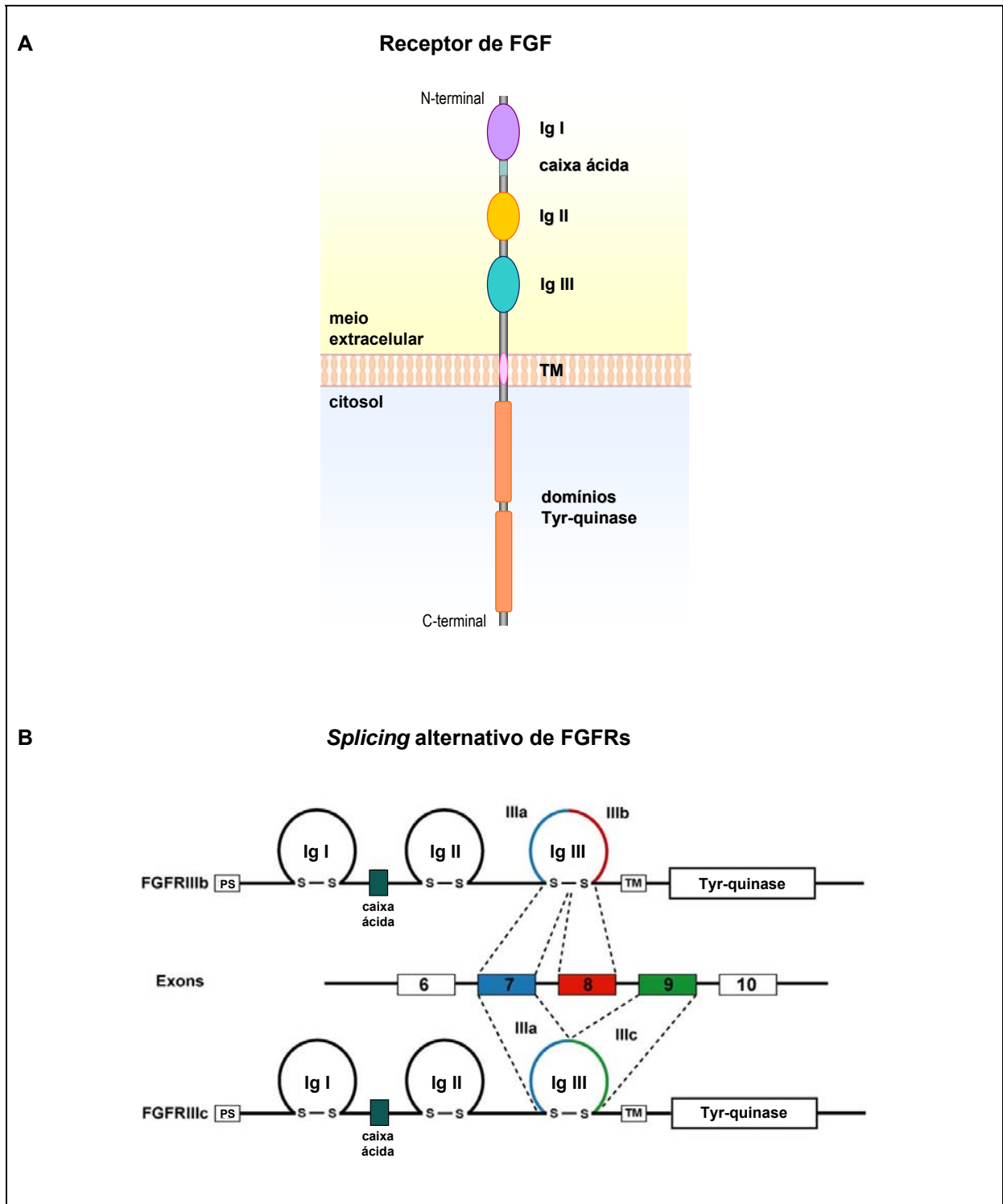


Figura 1.3| A| Esquema da estrutura do receptor de FGF. No sentido N-terminal a C-terminal do receptor, podemos observar os domínios Ig I (lilás), Ig II (em amarelo), Ig III (em azul), domínio transmembranar (em rosa) e o domínio de Tyr-quinase (em laranja). Ig II e Ig III são os domínios de contato do FGF2. **B|** Esquema do *splicing* alternativo dos receptores FGFRs. As isoformas dos receptores IIIb ou IIIc devem-se ao *splicing* alternativo no domínio Ig III, em destaque. Siglas: PS, peptídeo sinal; Ig, domínio semelhante à imunoglobulina; TM, região transmembranar. Figura B adaptada, extraída do artigo de revisão de Eswarakumar *et al.*, 2005.

Tabela 1.1| Fenótipo dos animais com perda de função dos FGFRs.

Receptor	Fenótipo em camundongos	Referência
FGFR1	Letal (E9,5 – E12,5), antes ou durante a gastrulação, como resultado de problemas na migração celular. Quando os efeitos da deleção do FGFR1 foram atenuados, os animais apresentaram defeitos no desenvolvimento do tubo neural e dos membros.	Yamaguchi <i>et al.</i> , 1994b Deng <i>et al.</i> , 1994 Deng <i>et al.</i> , 1997 Ciruna <i>et al.</i> , 1997
FGFR1IIIc	Fenótipo idêntico ao anterior.	Partanen <i>et al.</i> , 1998
FGFR1IIIb	Nenhum fenótipo aparente foi observado.	Partanen <i>et al.</i> , 1998
FGFR2	Letal (E10,5), pois o embrião não se implanta adequadamente no útero. Problemas na pré-gastrulação e no brotamento dos membros.	Arman <i>et al.</i> , 1998 Xu <i>et al.</i> , 1998
FGFR2IIIc	Viáveis. Prejudicial ao desenvolvimento do crânio e dos ossos.	Eswarakumar <i>et al.</i> , 2002
FGFR2IIIb	Letal imediatamente após o nascimento. Os animais possuem agênese de pulmões, membros, dentes, hipófise anterior e tireóide, além de danos no desenvolvimento de folículos capilares e timo.	De Moerlooze <i>et al.</i> , 2000 Revest <i>et al.</i> , 2001 Petiot <i>et al.</i> , 2003
FGFR3	Viáveis. Crescimento excessivo de ossos e defeitos no ouvido interno.	Deng <i>et al.</i> , 1996 Colvin <i>et al.</i> , 1996
FGFR4	Viáveis. Não exibem nenhuma anormalidade, mas um estudo de duplo nocaute FGFR3/FGFR4 mostrou que os animais apresentam deficiências pulmonares e retardo no crescimento.	Weinstein <i>et al.</i> , 1998
FGFR5	Letal no nascimento, devido à falha na respiração, por alterações severas no diafragma.	Baertschi <i>et al.</i> , 2007

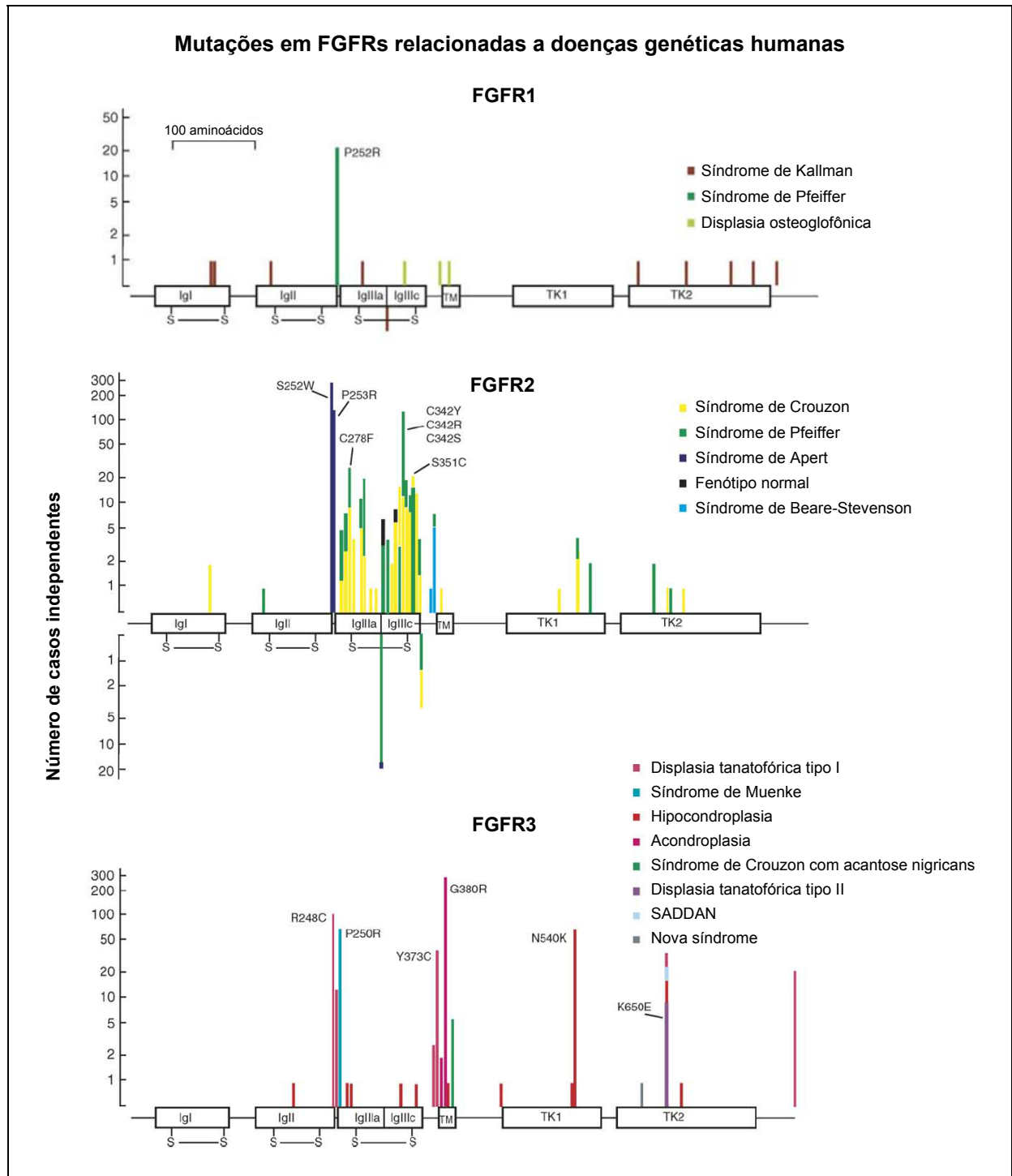


Figura 1.4| Distribuição das mutações em FGFR1, FGFR2 e FGFR3 que causam substituições de aminoácidos (proteínas acima) ou prováveis alterações no *splicing* (proteínas abaixo). A prevalência das mutações está indicada em escala logarítmica e fenótipos distintos estão em cores diferentes (como indicado). Está mostrada a isoforma de *splicing* alternativo IIIc de cada receptor, pois nenhuma mutação foi descrita em nenhum dos éxons para IIIb. Abreviações: SADDAN, acondroplasia severa com desenvolvimento tardio e acantose nigricans (*Severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans*); Ig, domínio semelhante à imunoglobulina; TM, região transmembranar; TK, domínio de Tyr-quinase. Figura adaptada, extraída do artigo de revisão de Wilkie, 2005.

Os receptores de FGF fazem parte da “assinatura” do processo oncogênico. É o que foi demonstrado num estudo genômico que buscou mutações nas regiões codificantes de éxons e junções de *splicing* de 518 genes de proteínas-quinases em 210 amostras de tumores humanos, incluindo câncer de mama, de pulmão, colorretal, gástrico, de testículo, de ovário, renal, melanoma, glioma e leucemia linfoblástica aguda (Greenman *et al.*, 2007).

No câncer, além de mutações, podem ocorrer, por exemplo, ampliações ou translocações, resultando no aumento da atividade dos receptores FGFRs. Há uma vasta literatura que analisa os receptores de FGF em linhagens celulares tumorigênicas e tumores primários derivados de diversas origens, que está apresentada na tabela 1.2.

Tanto no desenvolvimento como no tecido adulto, os FGFs são um sinal de comunicação epitélio-mesênquima. Além disso, a desregulação deste sistema de sinalização pode promover a transição epitélio-mesênquima em células tumorais (Chaffer *et al.*, 2006; Acevedo *et al.*, 2007). Alguns exemplos estão na tabela 1.2, quando a isoforma FGFR IIIc passa a ser expressa em células de origem epitelial, onde são expressas especificamente as isoformas IIIb.

Estas alterações genéticas de ativação de FGFR em certos tipos de tumores evidenciam o papel oncogênico da sinalização por FGF. O PD173074 (Mohammadi *et al.*, 1998) utilizado nesta tese, SU5402 (Mohammadi *et al.*, 1997), NDGA e Sunitinib são inibidores da atividade de Tyr-quinase. Além disso, em ensaios clínicos fase II, a talidomida se provou eficaz no tratamento de câncer renal e de próstata (revisado

por Beenken & Mohammadi, 2009). Por outro lado, é importante considerar que, às vezes, alguns receptores exercem um efeito antitumorigênico. Assim, ter como alvo terapêutico os receptores FGFRs pode trazer algum benefício clínico somente para aqueles tumores onde a incidência de ganho de função foi relatada. Deste modo, melhorar nosso entendimento da biologia dos FGFs e seus receptores pode provar-se de grande valor no desenvolvimento de terapias para certos tipos de câncer.

Tabela 1.2| Alterações genéticas de FGFRs em câncer.

Câncer	Alteração genética	Referência
Células escamosas da cabeça e pescoço	Polimorfismos de FGFR4 (G388R) em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.	Streit <i>et al.</i> , 2004.
Mama	Os genes de FGFR1 e FGFR2 estão amplificados e superexpressos em alguns tumores de mama. Estudos em larga escala revelaram que SNPs em um íntron do gene do <i>FGFR2</i> correlacionam com uma predisposição para o câncer de mama, provavelmente, através de transcritos não codificantes regulatórios da expressão deste gene.	Adnane <i>et al.</i> , 1991; Yoshimura <i>et al.</i> , 1998; Moffa <i>et al.</i> , 2004; Giulianelli <i>et al.</i> , 2008; Hunter <i>et al.</i> , 2007; Easton <i>et al.</i> , 2007.
Pâncreas	Aumento da expressão da isoforma com 2 domínios Ig de FGFR1 e aumento da expressão de FGFR4 em adenocarcinoma pancreático.	Kobrin <i>et al.</i> , 1993; Shah <i>et al.</i> , 2002.
Pele	Mutação no FGFR3 (S249C) foi associada a tumor benigno de pele.	Logié <i>et al.</i> , 2005.
Sistema gastrointestinal	Mutação no FGFR3 (E322K) e deleção de um nucleotídeo (284delC) em carcinoma colorretal. FGFR1 é superexpresso em carcinoma colorretal e a redução do FGFR1 por RNAi aumenta a expressão de FGFR3 e das atividades supressoras de tumor, além disso a expressão destes dois receptores é mutuamente exclusiva. Mutação no FGFR2 num local de <i>splicing</i> (940-2A→G) e mutação S267P em carcinoma gástrico.	Jang <i>et al.</i> , 2001; Jang, 2005. Jang <i>et al.</i> , 2001.

Sistema linfático	<p>Em síndrome mieloproliferativa 8P11 (EMS): translocação e fusão do FGFR1 com ZNF-198 t(8;13), fusão de FOP com FGFR1 t(6;8); fusão do FGFR1 com CEP 110 t(8;9); fusão do FGFR1 com sequência retroviral humana endógena t(8;19) e fusão do FGFR1 com BCR t(8;22).</p> <p>No mieloma múltiplo também foi encontrada mutação de ativação em FGFR3 (Lys650Glu, Lys650Met). 20-25% dos mielomas múltiplos são devido a uma translocação que envolve a ativação de FGFR3 t(4;14).</p> <p>Translocação e fusão do FGFR3 com ETV6 t(4;12) foram encontradas em linfoma de células T periféricas.</p>	<p>Popovici <i>et al.</i>, 1998; Smedley <i>et al.</i>, 1998; Xiao <i>et al.</i>, 1998; Reiter <i>et al.</i>, 1998; Popovici <i>et al.</i>, 1999; Guasch <i>et al.</i>, 2000; Guasch <i>et al.</i>, 2003; Fioretos <i>et al.</i>, 2001; Demiroglu <i>et al.</i>, 2001.</p>
Sistema nervoso	<p>FGFR1 apresenta ganho de função no domínio de Tyr-quinase N546K e R576W em glioblastomas.</p> <p>FGFR2 abundante em massa branca normal e todos os astrocitomas de baixo grau e ausente em alto grau de malignidade. FGFR1 ausente ou baixa expressão em massa branca normal (isoforma com 3 domínios Ig), mas elevada expressão em astrocitomas malignos (isoforma com 2 domínios Ig).</p>	<p>Rand <i>et al.</i>, 2005.</p> <p>Yamaguchi <i>et al.</i>, 1994a.</p>
Sistema reprodutor feminino	<p>Mutação no FGFR3 (S249C) em tumores de colo de útero.</p> <p>Alteração na expressão do FGFR5 foi correlacionada com tumores de ovário.</p>	<p>Cappellen <i>et al.</i>, 1999; Wu <i>et al.</i>, 2000.</p> <p>Schaner <i>et al.</i>, 2003; Schild & Trueb, 2005.</p>
Sistema urológico	<p>Mutações de ativação de FGFR3 (R248C, S249C, G372C, S373C, Y375C, G282R, A393E, K652M, K652Q, K652E, K652T) são encontradas com maior frequência em tumores benignos uroteliais, reduzindo conforme aumenta o grau de malignidade ou alternando a isoforma expressa (IIIb para IIIc).</p> <p>A expressão de FGFR1 e de FGFR4 está associada à progressão do câncer de próstata, enquanto que o papel do FGFR2 depende da isoforma expressa (IIIb ou IIIc).</p>	<p>Knowles, 2007 (revisão).</p> <p>Kwabi-Addo <i>et al.</i>, 2004 (revisão).</p>
Tireóide	<p>FGFR2 foi o único receptor detectado em tecidos normais de tireóide humana e sua expressão está reduzida nos cânceres e carcinomas de tireóide, sugerindo um papel supressor de tumor. FGFR1 e FGFR3 correlacionam com graus mais diferenciados destes tumores, enquanto que FGFR4 está predominantemente mais expresso nos tumores mais agressivos de tireóide.</p>	<p>Onose <i>et al.</i>, 1999; St Bernard <i>et al.</i>, 2005; Ezzat <i>et al.</i>, 2005.</p>

1.2 Via de sinalização de FGF

Podemos observar que a sinalização por FGF2 modula uma variedade de processos celulares básicos, que podem variar de acordo com o tipo celular. A sinalização por FGF2 inicia-se após a autofosforilação dos resíduos de tirosina pelas Tyr-quinases na cauda citoplasmática dos FGFRs. A primeira etapa é o recrutamento de proteínas efetoras que se ligam aos sítios de autofosforilação, como a fosfolipase C gama (PLC γ) e os substratos de FGFR 2 (FRS2). Simultaneamente, esta etapa inicia múltiplas cascatas de vias de sinalização, que estão simplificadaamente esquematizadas na figura 1.5, representadas pelas vias de Ras/MAPK, PI3K/AKT, PKC, Src e Rho (revisado por Eswarakumar *et al.*, 2005; revisado por Katz *et al.*, 2007).

1.2.1 Ras

As proteínas K-Ras4a, K-Ras4b, H-Ras e N-Ras têm 21 KDa, com grande homologia entre si na região do domínio G (região N-terminal). Os primeiros 85 aminoácidos são idênticos e especificam a ligação do GDP e GTP, incluindo o *loop P* (ligação do grupo fosfato) e a região que controla os reguladores e efetores de Ras (figura 1.6). A região C-terminal contém domínio hipervariável, que especifica a localização através de modificações pós-traducionais, que incluem farnesilação, geranilgeranilação e palmitoilação. As proteínas Ras estão situadas na porção interna da membrana plasmática, onde atuam como GTPases na sinalização celular (figura 1.6). A ativação de receptores de membrana por fatores de crescimento leva ao

recrutamento e ativação de GEFs, como os membros da família SOS. A forma ativa Ras-GTP pode ligar-se a mais de 20 efetores, incluindo Raf, PI3K e Rac. As proteínas Ras regulam respostas celulares a diversos estímulos extracelulares, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação (revisado por Malumbres & Barbacid, 2003; revisado por Mitin *et al.*, 2005).

Mutações de ativação nos genes de Ras e mutações em reguladores e efetores das proteínas Ras são comuns no desenvolvimento do câncer. Mutações de ativação de Ras estão presentes em mais de 20% de todos os cânceres humanos, mais frequentemente em K-Ras, (aproximadamente 85% do total), seguido do N-Ras (aproximadamente 15%) e H-Ras (menos que 1%) (revisado por Downward, 2003; revisado por Janssen *et al.*, 2005). No câncer, são encontradas mutações somáticas em Ras que introduzem substituições nos aminoácidos 12, 13 e 61 (revisado por Schubbert *et al.*, 2007). Ras torna-se oncogênico com a mutação G12V, por exemplo, que mantém a proteína na sua forma ativa, ligada a GTP (revisado por Downward, 2003).

As células tumorais tornam-se dependentes de oncogenes e a perda leva à regressão do tumor (Giuriato *et al.*, 2004). Embora Ras ative diversas proteínas para iniciar o crescimento tumoral, apenas PI3K, através da ativação de AKT, deve permanecer ativada pelo Ras oncogênico para manter o crescimento (Lim & Counter, 2005). Mais recentemente, foi demonstrado que a iniciação e manutenção do tumor dependem da fosforilação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), um substrato de AKT. Além disso, eNOS é capaz de aumentar a nitrosilação e ativação de Ras selvagem endógeno. (Lim *et al.*, 2008).

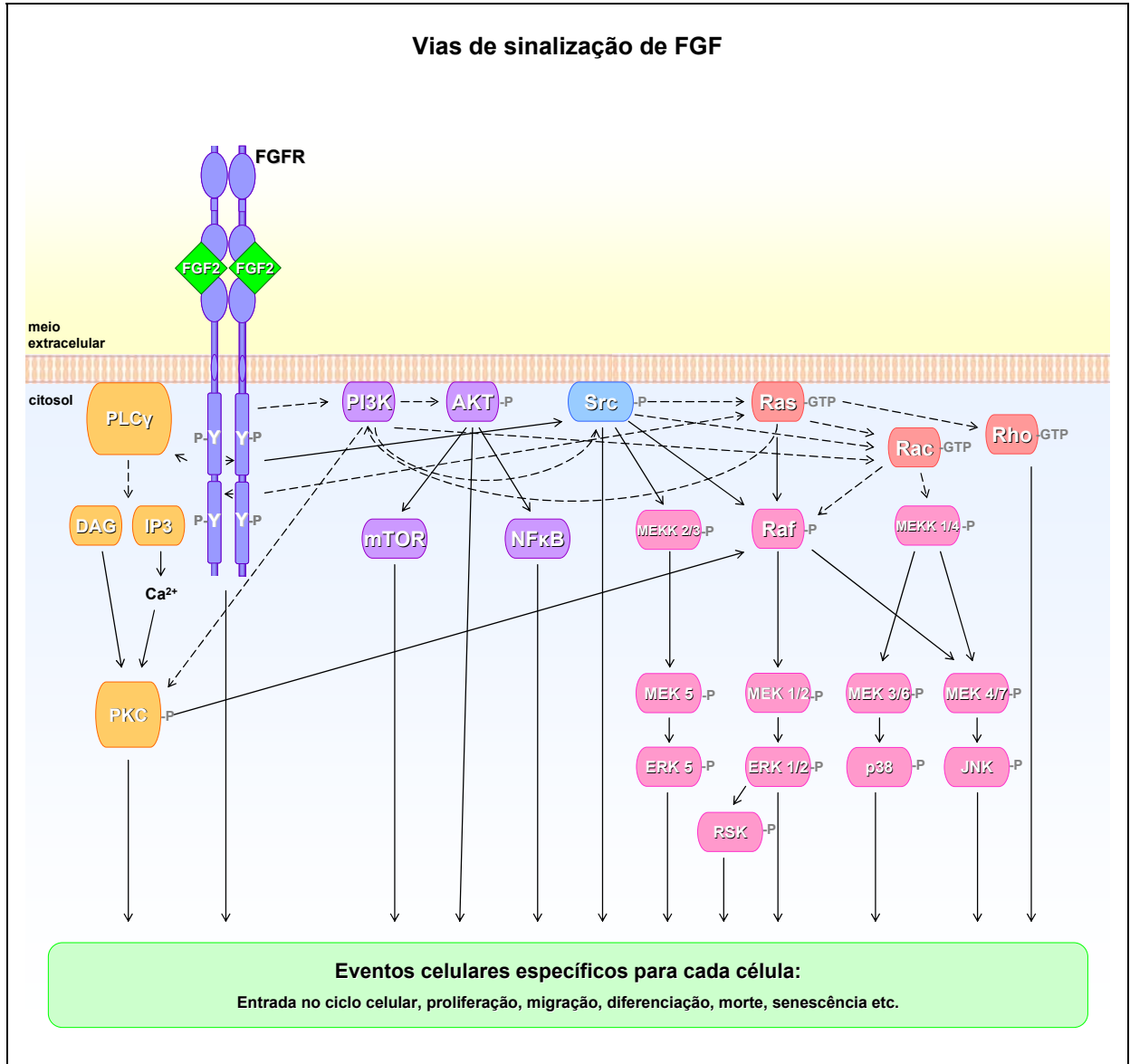


Figura 1.5] Vias de sinalização de FGF. As setas indicam ativação/interação direta (seta cheia) ou indireta (seta descontinua). Somente alguns exemplos estão apontados nesta figura.

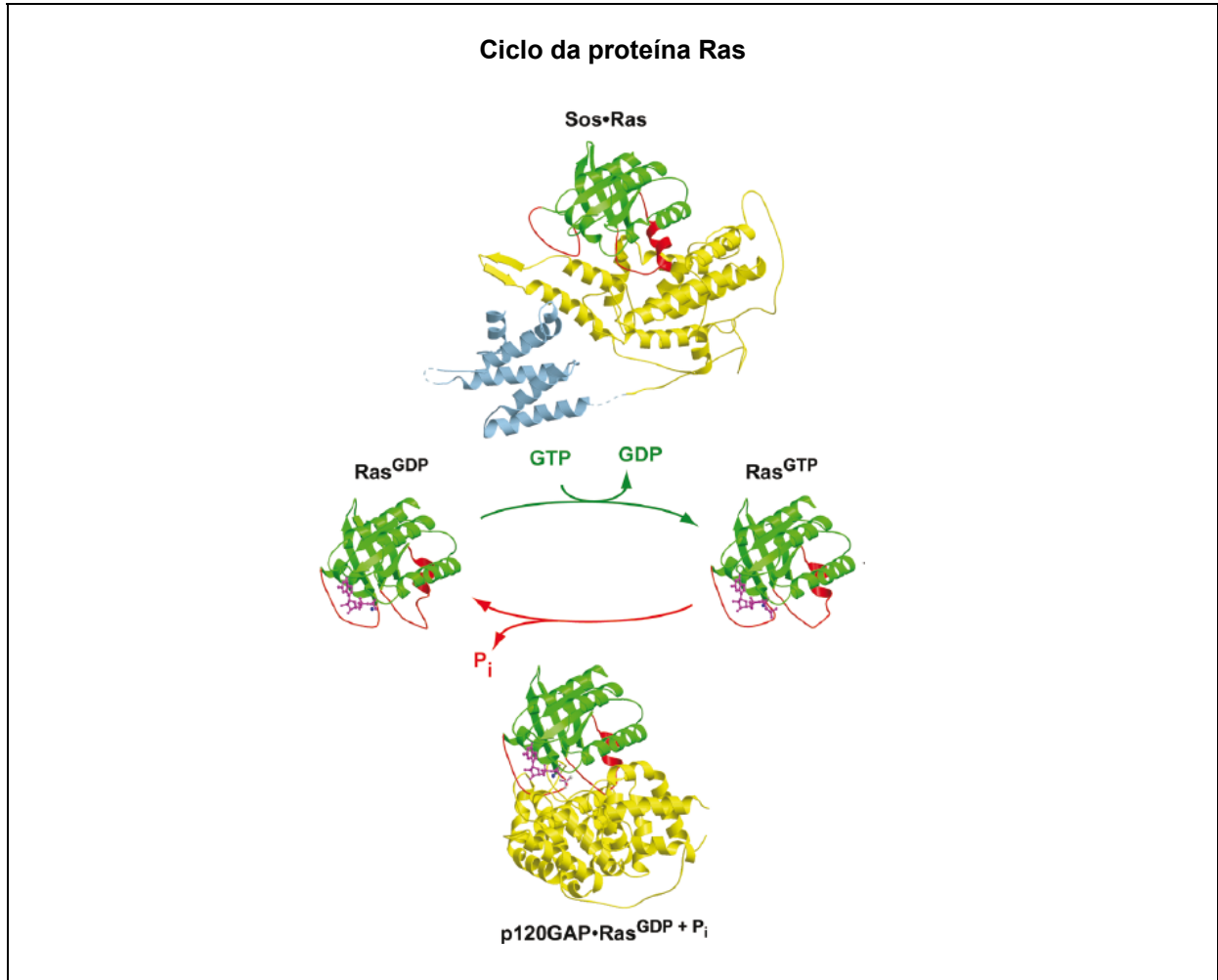


Figura 1.6| Regulação do ciclo Ras-GDP/GTP. As diferenças estruturais entre os estados de ligação ao GDP ou GTP estão localizadas em duas regiões da proteína (vermelho), denominadas switch I (resíduos 32-38) e switch II (resíduos 59-67). A conformação Ras-GTP exibe maior afinidade pelos efetores à jusante. Está mostrada a interação de Ras com a Ras-GEF SOS (acima) e com a Ras-GAP (abaixo). Figura modificada, retirada do artigo de revisão Mitin *et al.*, 2005.

1.2.2 ERK 1/2

A ligação de fatores de crescimento a receptores transmembranares de Tyr-quinase inicia uma cascata de eventos envolvendo a ativação sequencial de Ras, Raf, MEK 1/2 e ERK 1/2. As vias das MAPKs são cascatas de sinalização, nas quais quinases MAPKKKs fosforilam e ativam MAPKKs, que, por sua vez, fosforilam e ativam MAPKs. Em humanos e camundongos, foram identificados 7 homólogos de

MAPKKs (MEK1, MEK2, MKK3, MKK4/SEK, MEK5, MKK6 e MKK7) e 4 famílias “convencionais” de MAPKs (ERK 1/2, JNK, p38 e ERK5).

No núcleo, ERK 1/2 (44 e 42 kDa, respectivamente) ativam fatores de transcrição Jun e Fos, proteínas que formam o complexo da proteína ativadora 1 (AP1). A ativação destes reguladores transcricionais pode levar à expressão de proteínas que controlam a progressão do ciclo celular, como ciclinas D. No citossol, as famílias Rsk, Msk e Mnk estão dentre as quinases ativadas por ERK 1/2 (revisado por Shaul & Seger, 2007; revisado por Chambard *et al.*, 2007).

Foi demonstrado por Yamamoto e colaboradores (2006) que a progressão do ciclo depende da ativação sustentada de ERK 1/2 na fase G1, que induz e mantém os níveis reduzidos de expressão de genes antiproliferativos e, assim, permite a entrada da fase S, enquanto que a ativação transiente de ERK não leva à entrada em S. Por outro lado, foi demonstrado que a alta intensidade de ativação de ERK sustentada, que pode ser conseguida através de alta expressão de Raf1 ativo, induz a parada do ciclo celular através de indução de Cdkn1a (Sewing *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 1997).

As fosfatases de MAPK (conhecidas como MKP, *MAP kinase phosphatases*, ou Dusp, *dual-specificity phosphatases*) desfosforilam as MAPK ativas, controlando a magnitude e duração da atividade das MAPK. Dusp6 é uma fosfatase reguladora de ERK 1/2, mas não de JNK e p38, enquanto que Dusp8 regula negativamente JNK e p38, mas não ERK 1/2 (revisado por Owens & Keyse, 2007). Ainda não está claro se a redução de expressão de Dusp é a causa ou contribui para o fenótipo maligno ou se é simplesmente uma consequência da transformação celular.

1.2.3 PI3K/AKT

A classe I de PI3K é composta de uma subunidade regulatória e uma catalítica (110 kDa), na qual há 4 isoformas. Três delas, p110 α , p110 β e p110 δ associam-se a subunidades regulatórias como p85 α , p55 α , p50 α , p85 β , p55 β , sendo ativadas por Tyr-quinases (classe I_A). A quarta isoforma, p110 γ (classe I_B), possui contrapartes regulatórias distintas (p101 ou p84), sendo ativadas por receptores acoplados à proteína G. p110 α e p110 β são expressos ubiquamente, enquanto que p110 δ e p110 γ são mais abundantes em células hematopoiéticas. A autofosforilação dos receptores de Tyr-quinase induz o recrutamento de subunidades regulatórias p85, levando à ativação de PI3K. Uma vez ativadas, as subunidades catalíticas p110 fosforilam fosfoinosítídeos acoplados à membrana: PI-4-P (*phosphatidylinositol-4-bisphosphate*) e PI-4,5-P₂ (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*), para produzir PI-3,4-P₂ (*phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*) e PI-3,4,5-P₃ (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) respectivamente. PI-3,4,5-P₃, por sua vez, é um substrato para o PTEN (*phosphoinositide 3-phosphatase*), um inibidor endógeno da via de PI3K. PI-3,4-P₂ e PI-3,4,5-P₃ ligam-se aos domínios PH de moléculas intracelulares, dentre elas PDK1 (3-*phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) e AKT (também chamada de PKB). Além disso, a ativação de PI3K também leva à ativação de Rac, um membro da família Rho, envolvida com alterações de citoesqueleto (revisado por Vivanco & Sawyers, 2002; revisado por Franke, 2008).

As células de mamíferos expressam 3 isoformas de AKT (60 kDa): AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) e AKT3 (PKB γ), todas codificadas por genes distintos. Todas as isoformas são similares estruturalmente, compartilham o domínio N-terminal

regulatório, que inclui o domínio de homologia à *pleckstrin* (PH), uma região de “dobra” que conecta o domínio PH ao domínio de Ser- e Thr-quinases e uma região C-terminal, necessária para indução e manutenção da atividade de quinase. Alterações em receptores de fatores de crescimento e/ou Ras resultam em uma hiperatividade de AKT em células tumorais, protegendo-as da apoptose (revisado por Franke, 2008).

A ativação de AKT tem como consequência diversas respostas biológicas, como transporte de glicose, glicólise, síntese de glicogênio, supressão da gliconeogênese, síntese proteica, aumento do tamanho celular, progressão G0/G1 → S do ciclo celular e inibição da apoptose (revisado por revisado por Franke, 2008).

1.2.4 PKC

PLC γ ativa cliva PI-4,5-P₂ (*phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphate*) em IP₃ (*inositol trisphosphate*) e DAG (*diacylglycerol*). PLC γ é uma fosfoproteína de 150 kDa, associada à ativação do receptor de FGF (Mohammadi *et al.*, 1991). IP₃ facilita a liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático para o citossol. PKC é ativada por DAG e Ca²⁺.

Proteínas quinases C (PKC) são uma família de Ser- e Thr-quinases. As isoformas da família de PKC fosforilam uma grande variedade de proteínas-alvo e são conhecidas por estarem envolvidas em diversas vias de sinalização. PKC também atua como receptor para ésteres de forbol (por exemplo, PMA), uma classe de

promotores de tumor. Cada isoforma da família de PKC possui um perfil de expressão específico e acredita-se que cada uma tenha papéis distintos nas células. As diferentes isoformas podem ser divididas em 3 grupos: as isoformas clássicas α , β I, β II e γ ; as novas isoformas δ , ϵ , θ , μ e η ; e as isoformas atípicas λ e ξ . As isoformas clássicas (cPKC) necessitam fosfolipídeos carregados negativamente (como fosfatidil-serina), DAG e cálcio para atividade ótima. As novas isoformas (nPKC) também necessitam de fosfolipídeos carregados negativamente e DAG, mas não necessitam de cálcio. As isoformas atípicas (aPKC) não necessitam de DAG nem cálcio, somente fosfolipídeos carregados negativamente para sua atividade ótima (revisado por Griner & Kazanietz, 2007).

1.2.5 Src

A família de Src são Tyr-quinases solúveis, de 60 kDa, presentes no citoplasma. Esta família inclui 9 genes: Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck e Lyn. Na porção N-terminal, estas proteínas possuem domínios SH2 e SH3 (*Src homology*, homologia à Src) e na porção C-terminal possuem um domínio de quinase. A atividade de Src é regulada pela fosforilação em duas posições de tirosina, levando a efeitos opostos: a fosforilação na Tyr416 no *loop* de ativação no domínio de quinase aumenta a sua atividade enzimática, enquanto que a fosforilação na Tyr527 na cauda C-terminal por Csk (*carboxy-terminal Src kinase*) leva a uma redução desta atividade. Src inativa está localizada na região perinuclear, mas a ativação de Src leva à associação indireta do domínio SH3 à actina. Src ativa transloca-se à periferia celular,

locais de adesão celular, onde se prende à membrana, permitindo uma interação com receptores de Tyr-quinase. A localização, nesta interface membrana-citoesqueleto em adesões focais, lamelipódeos e filopódeos, parece ser regulada pelas GTPases RhoA, Rac1 e Cdc42 (revisado por Yeatman, 2004).

Src é recrutado para os complexos do receptor FGFR ativo, através da proteína adaptadora FRS2. Recentemente, foi demonstrado que a atividade de Src é crucial para a regulação da dinâmica do FGFR1 (Sandilands *et al.*, 2007). Neste estudo, Src colocaliza com o FGFR1 ativo na membrana e a internalização do receptor está associada com a liberação de complexos contendo Src, num processo dependente de RhoB e do citoesqueleto de actina. A inibição química e genética de Src foi capaz de atenuar a via PI3K/AKT, e atrasar, mas não atenuar, a via de ERK 1/2.

Por suas funções relacionadas à migração, invasão, adesão, proliferação, angiogênese e antiapoptose, Src é frequentemente relacionada ao câncer. Src é capaz de ativar alvos *downstream* tanto pela sua ativação por mutação dominante positivo quanto por altos níveis proteicos. Src foi estudado mais extensivamente em câncer colorretal, mediando a progressão destes tumores. Também foi relacionado ao câncer pancreático, de mama, pulmonar, epidermoide de cabeça e pescoço e de próstata. Desta forma, diversos inibidores das quinases Src estão sendo desenvolvidos (revisado por Johnson & Gallick, 2007).

1.3 Ciclo celular e câncer

O câncer é a terceira maior causa de morte no mundo (14,0% das mortes), segundo estimativa da OMS para 2008 (em primeiro lugar estão as doenças cardiovasculares com 30,4%, seguidas das doenças infecciosas e parasíticas com 14,4%). Além disso, o estudo do câncer é de fundamental importância no contexto da biologia celular, pois esta doença é o reflexo da perturbação da “harmonia” no controle dos sinais que modulam o comportamento celular num organismo multicelular. Frequentemente, as células apresentam proliferação descontrolada (independência de sinais externos para proliferação, insensibilidade a sinais inibitórios, evasão à apoptose), instabilidade genômica e cromossômica (aumento de mutações no DNA, aberrações cromossômicas e alterações no número de cromossomos), indução de angiogênese e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000; revisado por Malumbres & Barbacid, 2009).

Está bem estabelecido que o câncer, essencialmente, é uma doença genética ou epigenética. O acúmulo sequencial de mutações em oncogenes e genes supressores de tumor, levando ao fenótipo maligno, é um paradigma aceito e largamente utilizado na pesquisa do câncer.

Esta transformação celular é um processo que causa a perturbação de diversos genes, dentre eles, aqueles envolvidos com ciclo celular (figura 1.7). Algumas classes de proteínas e vias de sinalização são mais frequentemente encontradas com mutações oncogênicas. Em estratégias terapêuticas para tratamentos de câncer, o mais comum é ter como foco as proteínas quinases, já que,

aproximadamente, 50% das 518 quinases do genoma humano estão envolvidas com câncer (Manning *et al.*, 2002; revisado por Manning, 2009). Além disso, somente nas últimas décadas, foi demonstrado que pequenos RNAs não codificantes desempenham papéis importantíssimos em diversas vias de sinalização envolvidas em doenças, como o câncer (revisado por Calin & Croce, 2006).

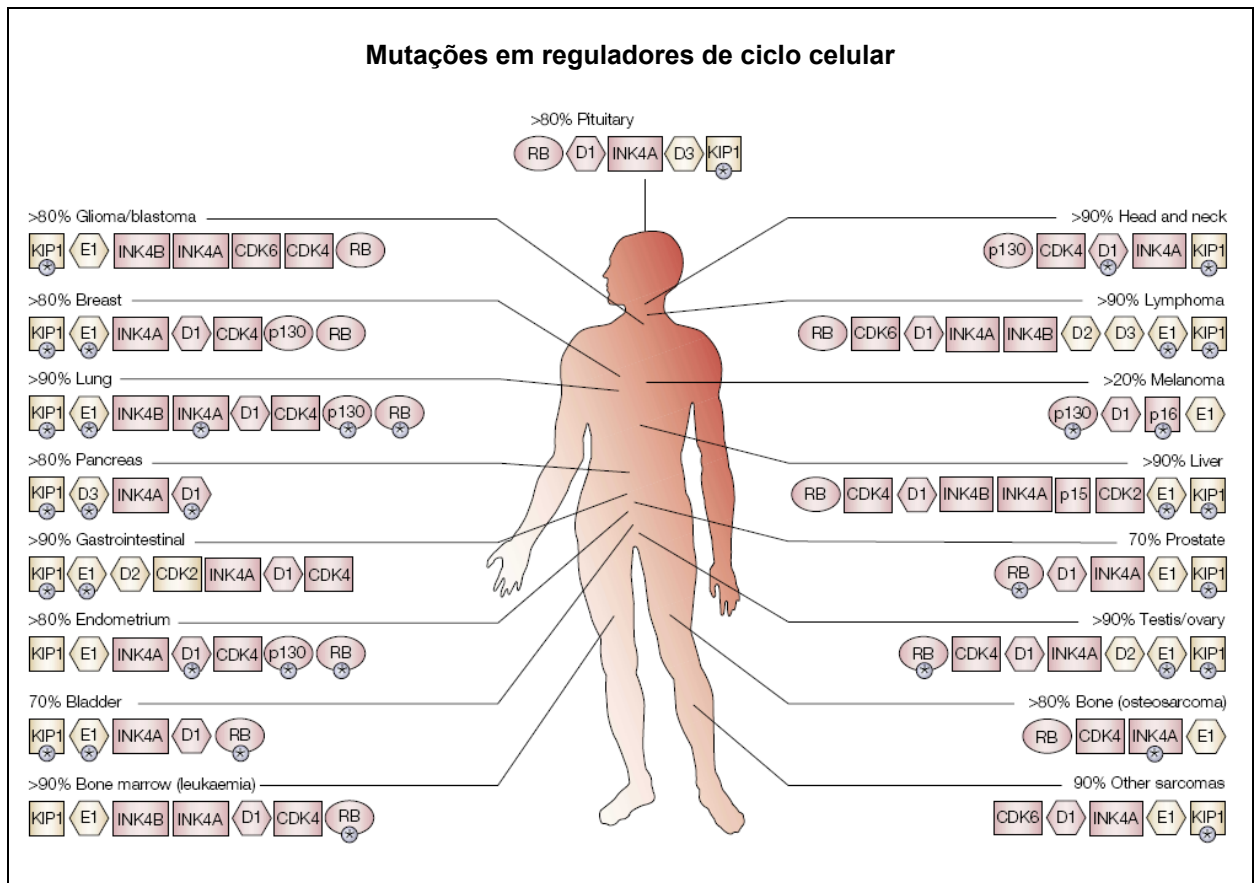


Figura 1.7| Mutações em reguladores de G1/S em câncer humano. Somente as alterações que ocorrem em mais de 10% de tumores primários foram consideradas. Os números representam a porcentagem de tumores com alterações em qualquer um dos reguladores de ciclo celular listados. Em rosa, estão aqueles cujas alterações genéticas ou epigenéticas foram já definidas. Em amarelo, estão aqueles cuja explicação mecanística ainda não está definida. As alterações relevantes para prognose de tumores estão indicadas com asteriscos. Figura retirada do artigo de revisão Malumbres & Barbacid, 2001.

O ciclo celular de mamíferos é controlado por uma subfamília de quinases dependentes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*), cuja atividade é modulada por diversos ativadores (ciclinas) e inibidores (CDKNs, *cyclin-dependent kinases inhibitors*) (revisado por Malumbres & Barbacid, 2005). As vias de sinalização envolvidas no ciclo celular garantem que as células se dividam e, se necessário, arrestam a divisão celular. Em pontos de checagem (*checkpoints*), a célula pode parar ou prosseguir no ciclo, dependendo de certos fatores presentes naquele momento do ciclo (revisado por Kastan & Bartek, 2004). Na figura 1.8 está esquematizado o controle da transição $G0 \rightarrow G1 \rightarrow S$ do ciclo celular.

A comparação da rede regulatória do ciclo celular de células normais e células tumorigênicas é essencial para entender as perturbações que levam à transformação maligna e de fundamental importância para o futuro das pesquisas no tratamento de certos tipos de câncer.

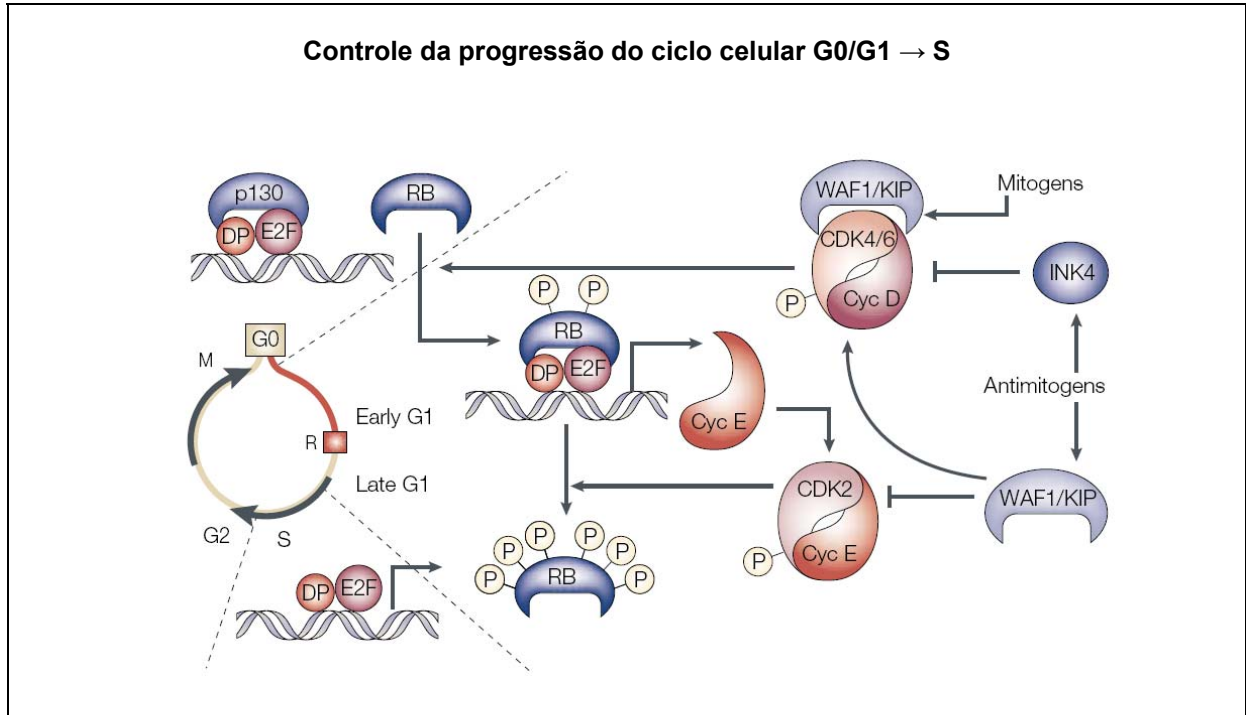


Figura 1.8| Regulação da transição do ciclo celular G0 → G1 → S de mamíferos, por complexos ciclinas-CDKs e fosforilação de RB. Nas células quiescentes (em G0), os fatores de transcrição E2F–DP estão ligados a p130, que os mantêm inativos. Em G1, os complexos RB–E2F–DP predominam. A sinalização mitogênica resulta na síntese de ciclina D, formação dos complexos ativos CDK4/6–ciclina D e início da fosforilação de RB. RB parcialmente fosforilada ainda se liga a E2F–DP, mas o fator de transcrição é capaz de transcrever ciclina E, que se liga e ativa CDK2. É aceito que a fosforilação de RB por CDK2 resulta na sua inativação completa, que permite a indução de genes responsivos a E2F, necessários para a progressão G1 → S, iniciando a replicação do DNA. As proteínas INK4 e WAF1/KIP (CDKN1B) pode inibir as quinases CDK4/6 ou CDK2, respectivamente, dependendo de sinais antimitóticos. R representa o ponto de restrição, que separa a fase inicial de G1 (dependente de mitógenos) da fase G1 tardia (independente de mitógenos). Figura retirada do artigo de revisão Malumbres & Barbacid, 2001.

2 Justificativa e Objetivos

A superativação da oncoproteína Ras condiciona as células a uma suscetibilidade à toxidez de FGF2, em duas células diferentes, Y1 e 3T3-B61, cujos fenótipos transformados são distintos. Esta observação não é a esperada, uma vez que a transformação maligna por Ras deveria tornar as células independentes de FGF2 para proliferar ou transitar de G0/G1 para S. De fato, as células 3T3-B61 independem de fatores de crescimento para progressão no ciclo celular, diferentemente das células Y1.

Esta sensibilidade ao FGF2, condicionada por Ras ativo, é um novo fenômeno. Assim, o foco desta tese foi a relação entre Ras, na forma de oncogene ativo, e FGF2 parácrino. Neste contexto, os objetivos da tese foram determinar a ação citotóxica de FGF2 ao nível celular (proliferação, sobrevivência, progressão no ciclo celular) e seus mecanismos moleculares (vias de sinalização).

A linhagem Y1 foi utilizada como material de estudo nesta tese, por apresentar o controle do ciclo celular parcialmente preservado, pois a transição quiescência/proliferação é dependente da ativação da via de MEK/ERK por FGF2 ou soro, permitindo a análise do papel das vias de sinalização mitogênicas bem conhecidas nos mecanismos moleculares da citotoxicidade de FGF2, condicionada por K-Ras-GTP constitutivamente elevado.

3 Materiais e Métodos

3.1 Plasmídeos

A amplificação dos plasmídeos é realizada em bactérias *E. coli*, cepa DH5 α , provenientes de nossos bancos de bactérias, que foram tornadas quimicamente competentes para transformação celular. As bactérias crescem a 37 °C em meio de cultura LB (Luria-Bertani, 50 mL, triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 10 g/L). O crescimento é acompanhado, espectrofotometricamente, até a suspensão atingir um valor de densidade ótica entre 0,6 e 0,8 (medido a um comprimento de onda de 600 nm). Após aliquotar as suspensões (20 mL) em tubos estéreis para centrífuga, as suspensões são resfriadas em gelo (5 min) e as bactérias, sedimentadas por centrifugação branda numa centrífuga Sorval (5000 rpm, 4 °C, 5 min), e ressuspensas em CaCl₂ (5 mL, 0,1 M). Repete-se este procedimento mais uma vez, e as suspensões obtidas são utilizadas diretamente para transformação das bactérias ou imediatamente estocadas em glicerol 30% (-80 °C) em alíquotas de 20-50 μ L.

A transformação de bactérias é feita através de choque térmico, utilizando-se plasmídeos e bactérias quimicamente competentes. Adiciona-se uma alíquota de solução contendo plasmídeos (10-40 μ L, 20-500 ng) à suspensão de bactérias competentes. As suspensões são resfriadas em gelo (5 min), em seguida aquecidas em banho-maria (42 °C, 40 seg) e imediatamente resfriadas em gelo (30 min), seguindo-se da adição de meio LB (1 mL). As suspensões são incubadas sem agitação (37 °C, 1 h). Alíquotas (50-100 μ L) são aplicadas em placas contendo meio LB sólido

(1%, em ágar) e antibióticos adequados (kanamicina ou neomicina 50 µg/mL, Invitrogen; ampicilina 100 µg/mL, USB) para seleção de bactérias, contendo os plasmídeos de interesse (tabela 3.1).

Tabela 3.1 | Plasmídeos utilizados em transfecção celular.

Plasmídeo	Uso	Região promotora	Antibiótico para seleção em bactérias	Antibiótico para seleção em eucariotos	Referência
pcDNA3.1	Controle de transfecção	pCMV	ampicilina	higromicina B	Invitrogen
pcDNA1-FGFR2IIIc	Obtenção de população policlonal expressando FGFR2IIIc	pCMV	kanamicina	neomicina/G418	Gentilmente cedido pelo laboratório do Prof. Wallace McKeehan (IBT, Texas, EUA)
pEGFP-N1	Controle de eficiência de transfecção, via expressão de GFP	pCMV	kanamicina	-	Prasher <i>et al.</i> , 1992; Chalfie <i>et al.</i> , 1994; Inouye & Tsuji, 1994
pSUPER	Expressão de shRNA	H1-RNA pol III	ampicilina	-	Brummelkamp <i>et al.</i> , 2002
pX343	Cotransfecção para seleção de população policlonal expressando FGFR2IIIc.	SV40	ampicilina	higromicina B	Gritz & Davies, 1983; Blochlinger & Diggelmann, 1984

Após o crescimento das bactérias nas placas de LB/ágar (37 °C, 12 h), as colônias, contendo os plasmídeos de interesse, são separadas e inoculadas em meio LB líquido (15 mL) com o antibiótico específico para a seleção. As bactérias são

incubadas, sob agitação, utilizando-se um agitador Uniscence (37 °C, 12 h) e coletadas por centrifugação numa centrífuga Sorval (5000 rpm, 4 °C, 5 min).

As extrações de plasmídeos a partir das bactérias são feitas, utilizando-se os kits Perfect-Prep Plasmid Midi ou Perfect-Prep Plasmid Mini (Eppendorf). As suspensões de bactérias são centrifugadas (10000 x g, 5 min) e o sobrenadante é descartado. As bactérias são ressuspensas em solução I gelada (glicose 50 mM, Tris.Cl 25 mM e EDTA 10 mM, pH 8), devendo incubar-se a 25 °C (10 min), e em seguida, no gelo (5 min). Adiciona-se a solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1%) para lisar as bactérias, mistura-se completamente, mas gentilmente e incuba-se no gelo (5 min). Adiciona-se a solução III gelada (KCH₃COO 5 M) para neutralização, agita-se cuidadosamente, incubando no gelo (10 min). Após centrifugação (15500 x g, 4 °C, 15 min), o sobrenadante é transferido para tubos e adiciona-se a solução *Perfectprep DNA Binding Matrix* gelada. Após agitar os tubos repetidamente por inversão, coloca-se esta mistura numa coluna acoplada a um novo tubo. Centrifuga-se (2000 x g, 5 min), o filtrado é descartado, e adiciona-se a solução de purificação à coluna e centrifuga-se novamente (2000 x g, 5 min). Adiciona-se mais solução de purificação à coluna e centrifuga-se (2000 x g, 5 min). Após a certificação de que a coluna está completamente seca, adiciona-se água ultrapura aquecida (65 °C) na coluna, e centrifuga-se (2000 x g, 5 min). O plasmídeo é armazenado a -20 °C.

Os plasmídeos purificados são quantificados espectrofotometricamente (Espectrofotômetro U3000, Hitachi; Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences). Para quantificação, alíquotas das soluções de plasmídeos são diluídas em tampão TE (Tris.Cl 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,5) e as medidas são feitas em comprimentos de

onda de 280 nm e 260 nm. A quantificação também pode ser feita em gel de agarose (0,7-1,5%, Gibco) em tampão TBE (Tris 9 mM, ácido bórico 9 mM e EDTA 0,2 mM, pH 8,0, brometo de etídio 1 µg/mL), utilizando-se cubas para eletroforese horizontal (Horizon, Gibco). Alíquotas do DNA são diluídas em tampão de amostra (tampão TE, azul de bromofenol e xilenocianol 0,1% e glicerol 30-50%). Para estimar a concentração dos plasmídeos, são utilizados marcadores de massa molecular para quantificação de DNA (High DNA Mass Ladder, Invitrogen).

3.1.1 Subclonagem dos plasmídeos pSUPER para RNAi

Devido a sua especificidade e eficiência, a técnica de interferência de RNA (RNAi) está sendo largamente utilizada como ferramenta experimental para redução da expressão gênica. Diversos vetores foram desenvolvidos para RNAi, permitindo aplicar esta técnica de análise genética a linhagens de células de mamíferos (Brummelkamp *et al.*, 2002; Paddison *et al.*, 2002; Tuschl, 2002) e em escala genômica (Tuschl, 2003; Berns *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2005; Moffat & Sabatini, 2006). Na presente tese, o vetor pSUPER foi utilizado para transfecção estável e expressão de shRNA em células Y1 (item 3.11.1).

Para a formação do shRNA intracelularmente, é necessário que o plasmídeo tenha repetições invertidas (RI). Foram desenhados oligonucleotídeos (Invitrogen), fitas *sense* e *antisense*, contendo uma sequência pequena (19-22 nucleotídeos) complementar ao mRNA-alvo, uma sequência *linker* "GGGCCC" e uma sequência invertida, complementar, correspondente à sequência pequena (19-22 nucleotídeos),

flanqueados por sítios adaptadores para enzimas de restrição Bgl II e Hind III (tabela 3.2). O desenho dos oligonucleotídeos foi feito, utilizando-se como ferramenta computacional o programa OligoEngine para otimização dos mesmos (Sui *et al.*, 2002).

O anelamento dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense* (10 μ L, 1 μ M, Invitrogen) é realizado com a incubação em tampão de anelamento (NaCH₃COO 100 mM, Mg(CH₃COO)₂ 2 mM e HEPES-KOH 30 mM, pH7,4, volume final de 100 μ L), a 95 °C, 4 min, seguindo-se a 70 °C, 10 min e, finalmente, com resfriamento gradual até 25 °C. As duplas-fitas aneladas estão na figura 3.1A.

Tabela 3.2| Sequências das duplas-fitas sintéticas de DNA, contendo as repetições invertidas para formação de shRNA.

mRNA alvo	Sequência da Repetição Invertida*
FGFR1A	5' GATCCCGAATGAGTACGGCAGCATCAACCCCGGGTTGATGCTGCCGTACTCATCTTTTGGAA 3' 3' GGGCTTACTCATGCCGTCGTAGTTGGGGCCCACTACGACGGCATGAGTAAGAAAAACCTTTCGA 5'
FGFR1B	5' GATCCCGGCTGTGATGACCTCACCGCTCTGGGCCAGAGCGGTGAGGTCATCACAGCTTTTGGAA 3' 3' GGGCGACACTACTGGAGTGGCGAGACCCGGGTCTCGCCACTCCAGTAGTGCGAAAAACCTTTCGA 5'
FGFR2A	5' GATCCCGAAGCAGGAGCATCGCATTGGACCCGGTCCAATGCGATGCTCCTGCTTCTTTTGGAA 3' 3' GGGCTTCGTCCTCATGGCGTAACCTGGGCCAGGTTACGCTACGAGGACGAAGAAAAACCTTTCGA 5'
FGFR3A	5' GATCCCGGCTGTTCTGGCCAATGTTTCTGGGCCAGAAAACATTGGCCAGAACAGCTTTTGGAA 3' 3' GGGCGACAAGACCGGTTACAAAGACCCCGGGTCTTTGTAACCGGTCTTGTGCGAAAAACCTTTCGA 5'

* Em azul, extremidade coesiva Bgl II e, em vermelho, extremidade coesiva Hind III.

O plasmídeo pSUPER é, então, submetido à digestão com as enzimas de restrição Bgl II e Hind III (figura 3.1B) para posterior ligação com oligonucleotídeos dupla-fita, contendo as repetições invertidas.

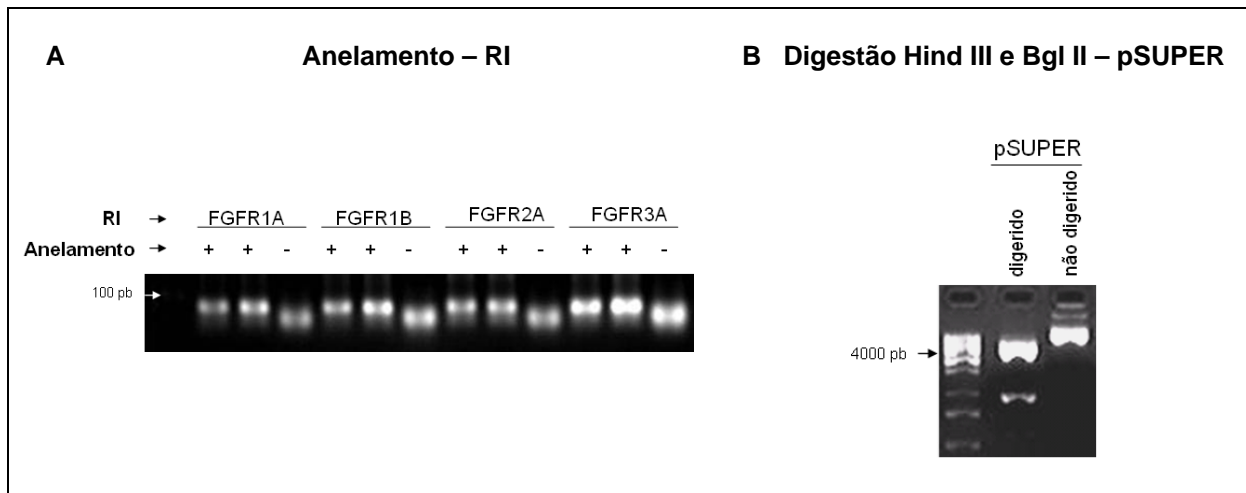


Figura 3.1| A| Anelamento das fitas *sense* e *antisense* (gel de agarose 2%). As fitas aneladas formam uma banda de 64-66 pb (+) e as fitas não-aneladas (apenas uma mistura dos oligonucleotídeos *sense* e *antisense* em água) formam uma banda difusa abaixo das bandas dupla-fita (-). **B|** Digestão do plasmídeo pSUPER com as enzimas de restrição Hind III e Bgl II e pSUPER não digerido (gel agarose 2%).

Após a purificação em gel de agarose do pSUPER digerido com Bgl II e Hind III e anelamento dos oligonucleotídeos com as repetições invertidas, é realizada a reação de ligação dos mesmos. Além da ligação do pSUPER com os oligonucleotídeos, também foi feita a ligação do pSUPER digerido somente com Hind III (controle positivo) e pSUPER digerido sem oligonucleotídeo (controle negativo).

Bactérias *E. coli* DH5 α , competentes quimicamente, foram transformadas com os pSUPER subclonados, pSUPER controle positivo de ligação, pSUPER controle negativo de ligação e pSUPER sem digestão (controle positivo para a transformação), além dos controles de crescimento de bactérias: bactérias sem transformação no meio sem ampicilina (controle positivo) e bactérias sem transformação no meio com ampicilina (controle negativo). Os plasmídeos obtidos foram submetidos a uma digestão com Hind III e EcoR I para análise do fragmento gerado contendo o oligonucleotídeo de interesse. A digestão do plasmídeo circular com Hind III e EcoR I gera um fragmento de 229 pb e o plasmídeo com o inserto gera um fragmento de 293-295 pb (figura 3.2).

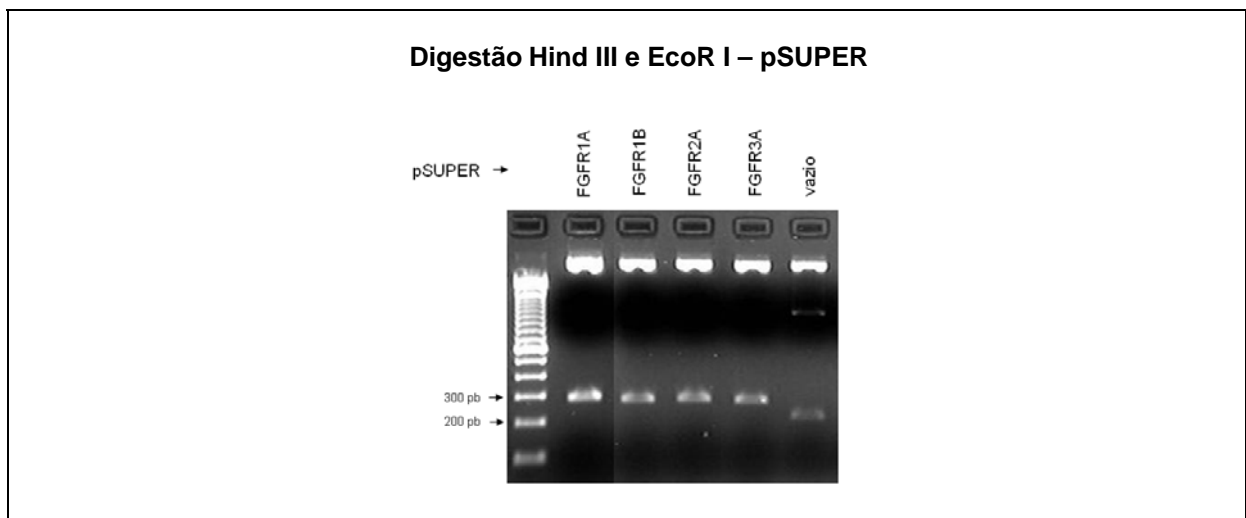


Figura 3.2| Digestão com Hind III e EcoR I dos plasmídeos pSUPER subclonados com RI para expressão de shRNA tendo como alvo FGFR1 (pSUPER-FGFR1A e -FGFR1B), FGFR2 (pSUPER-FGFR2A) e FGFR3 (pSUPER-FGFR3A).

Os plasmídeos subclonados foram sequenciados, utilizando-se o *primer* T7 (sítio de ligação em 627-643) e o *primer* T3 (sítio de ligação em 989-1005) para confirmação da sequência do inserto (item 3.6). Em sequenciamentos de repetições invertidas em plasmídeos utilizados para RNAi, há formação de um grampo na região “GGGCCC” durante o anelamento na PCR. Assim, antes do sequenciamento, utiliza-se a enzima de restrição Sma I, que cliva em “GGGCCC”.

3.2 Extração e purificação de RNA total

As frações de RNA total são obtidas através de extração com o reagente Tryzol (Invitrogen). As células são rompidas com Tryzol (0,4-0,8 mL) e os lisados obtidos são homogeneizados e transferidos para tubos estéreis (Eppendorf). Após a adição de clorofórmio (0,1-0,2 mL para cada tubo), a suspensão é homogeneizada e incubada (15 min, 25 °C). Os tubos são centrifugados (10000 rpm, 10 min, 4 °C) e a fase aquosa (sobrenadante) é removida. A fração de RNA total é precipitada da fase aquosa com isopropanol (0,2-0,4 mL) e coletada através de centrifugação (10000 rpm, 15 min, 4 °C). Em seguida, é lavada com solução gelada de etanol (0,5-1,0 mL, solução a 75% em água ultrapura), coletada por centrifugação (14000 rpm, 15 min, 4 °C), seca à temperatura ambiente, ressuspensa em água ultrapura (10-20 µL), desnaturada (5 min, 65 °C) e armazenada (-20 °C).

As frações de RNA total são quantificadas espectrofotometricamente (Espectrofotômetro U3000, Hitachi; Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences; Nanodrop, Thermo Scientific). Quando necessário, alíquotas das soluções de RNA

são diluídas em tampão TE (Tris.Cl 1 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,5). As medidas são realizadas em comprimentos de onda de 280 nm e 260 nm. Para acompanhar a purificação do RNA, são realizadas também medidas a 230 nm.

Alíquotas de RNA total (1-5 μ g) são incubadas com DNase I (1,0 U/ μ g RNA, 10 min, 25 °C, Invitrogen) em tampão de reação para DNase (Tris.Cl 40 mM, MgCl₂ 6 mM, EDTA 25 mM, em pH 7,5). Em seguida, a enzima é inativada (65 °C, 15 min) e o RNA total é utilizado na RT (item 3.3).

3.3 Transcrição reversa (RT)

As frações de RNA total, quantificadas e tratadas com DNase, são divididas em alíquotas (1-5 μ g de RNA total). São adicionados oligonucleotídeos de politimidina contendo 12-18 bases (Oligo dT 25 ng/ μ L, Invitrogen), solução de dNTPs (0,5 mM cada: dATP, dCTP, dTTP e dGTP, Invitrogen) num volume final de 12 μ L. As frações de RNA são aquecidas em banho-maria (65 °C, 5 min) para desnaturação e imediatamente resfriadas em gelo. São adicionados tampão para reação de transcrição reversa (Tris.Cl 62,5 mM, KCl 93,8 mM, MgCl₂ 3,8 mM, pH 8,3, Invitrogen) e DTT (10 ou 5 mM, Invitrogen). Para garantir o anelamento dos oligonucleotídeos de timidina com a cauda de poliA dos mRNAs, as reações são incubadas (42 °C ou 50 °C, 2-3 min), em seguida é adicionada transcriptase reversa SuperScript II 10 U/ μ L ou SuperScript III 10 U/ μ L, Invitrogen). As reações são incubadas (42 °C ou 50 °C, 1 h). A enzima é inativada por aquecimento (65 °C ou 85

°C, 15 min) e as soluções de cDNA são utilizadas diretamente em reações de PCR (item 3.4 e 3.5).

3.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

As reações de PCR são feitas, utilizando-se oligonucleotídeos para serem *primers* específicos (Invitrogen; IDT) dos respectivos mRNAs (tabela 3.3). Os *primers* são desenhados, utilizando os programas Primer Express V2.0 (Applied Biosystems) ou GeneRunner V3.05 (Hastings Softwares Inc), de acordo com sequências consenso de cDNAs, depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). São selecionadas regiões em éxons diferentes com o auxílio da ferramenta de alinhamento BLAT (<http://genome.ucsc.edu/>; Kent, 2002). Para garantir a especificidade dos *primers* na sequência de cDNA de interesse, é utilizada a ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>; Altschul *et al.*, 1997) e Eletronic PCR (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/e-pcr/>; Schuler, 1997), que verificam a similaridade dos oligonucleotídeos com demais sequências de cDNAs depositadas no GenBank.

Para cada reação de PCR, adiciona-se tampão para PCR (Tris.Cl 7,5 mM, MgCl₂ 0,2 mM, KCl 5,0 mM, (NH₄)₂SO₄ 2,0 mM e BSA 1 ng/μL, pH 9,0), solução de dNTPs (0,2 mM cada: dATP, dCTP, dTTP e dGTP, Invitrogen), alíquotas das reações de transcrição reversa, contendo cDNAs (a partir de 1-5 ng/μL de RNA), soluções de *primers forward* e *reverse* (0,5 μM cada) e a enzima Taq DNA Polimerase (0,05 U/μL, Invitrogen) num volume final de 20-100 μL. As amplificações através de PCR são

realizadas em ciclos de reações de desnaturação (94 °C, 45 seg), de anelamento (50-60 °C, 45 seg) e de polimerização (72 °C, 1 min), num termociclador (GeneAmp® PCR System, Applied Biosystems; Mastercycler epgradient S, Eppendorf).

Os produtos das reações de PCR são separados e analisados através de eletroforese em gel de agarose (agarose 0,7-2,5%, Gibco) em tampão TBE (Tris 9 mM, ácido bórico 9 mM e EDTA 0,2 mM, pH 8,0, brometo de etídio 1 µg/mL), utilizando-se cubas para eletroforese horizontal (Horizon, Gibco). Alíquotas das reações de PCR são diluídas em tampão de amostra para DNA (tampão TE, azul de bromofenol e xilenocianol 0,1% e glicerol 30-50%). Para determinar o peso molecular aproximado dos produtos de PCR amplificados, foram utilizados marcadores de massa molecular para DNA (100 pb e 1000 pb, MBI-Fermentas ou Invitrogen).

Tabela 3.3| *Primers* utilizados em PCR.

cDNA	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	Fragmento (pb)
CEP57	CGCCTGGAAGTGGAAAGGATTC	CAGCTACCAACTGGGATGCCAG	163
FGFR1	TCAACCACACCTACCAGCT	AGAACGGTCAACCATGCA	361
FGFR2	ATGTCGTTGAACGTTTCACC	GAAGCCGTGATCTCCTTCT	376
FGFR3	TGTGCCACTTCAGGTGC	GTTTCCTACAGCTCCTCC	733
FGFR4	GAAGTCTCTGGGTAGCATTCG	CACGCTGACTGGTAGGAAAGG	360
FGFR5	TGAAGGTGAAGGAGGTGG	TTGTAGGTGGCGTTGATGG	454
GAPDH	GCACCACCAACTGCTTAGC	CCTGCTTCACCACCTTCTT	339
PDGFR α	CCTCTACACCACGCTGAGTG	CCAGTCCTTCAGCTTATCC	400
PDGFR β	AGGACAACCGTACCTTGG	GGATGATGAGAGAGATGACG	600

3.5 PCR quantitativo (qPCR)

O desenho dos oligonucleotídeos para *primers* em qPCR são feitos da mesma forma que em PCR convencional. Os *primers* utilizados em qPCR estão na tabela 3.4.

Para cada reação de qPCR, adiciona-se o mix do kit SYBR® GREEN PCR Master Mix (10 µL, Applied Biosystems), soluções de *primers forward* e *reverse* (75 nM cada) e alíquotas das reações de transcrição reversa (0,5-2,0 ng/µL de RNA da RT, contendo cDNAs) num volume final de 20 µL. As amplificações são realizadas em ciclos de reações de desnaturação (95 °C, 15 seg), de anelamento e de polimerização (60 °C, 60 seg) num termociclador (AB5700, AB7300, Applied Biosystems), através do programa SDS5700 ou SDS7300 (Applied Biosystems).

O método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para análise dos dados obtidos por qPCR (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 3.4| Primers utilizados em qPCR.

cDNA	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	Fragmento (pb)
ARHGEF3 ^m	CTTCGAGAAATCCTGAGGCATAC	TGGTGTGATTTCTGCCACAAT	103
CALD1 ^m	TATCTGGCAAGCGGAACCTC	GAGATGGCTTGCAGTTGGGT	104
CAV1 ^m	GACGCGCACACCAAGGA	CTGGTTCTGCAATCACATCTTCA	100
CDC42 ^m	ACGACCGCTAAGTTATCCACAGA	TCTCAGGCACCCACTTTTCTTT	101
CDKN1A ^m	ATCCCCTTTGCCACTCCTG	GAAAAGAGCAGCAGATCACCAGAT	99
CDKN1B ^m	GACTTGGAGAAGCACTGCCG	TCCTGCCACTCGTATCTGCC	104
CDKN2A ^m	CAGGTGATGATGATGGGCAAC	CGGGCGGGAGAAGGTAGT	96
CDKN2D ^m	ACGCTTCCGGTCTCACTCC	CTTGGGTCACATTGGGATCAT	101

CHN2 ^m	CTGATGCTGCTGCCTCCTG	TCGGCATTTCATTAATTTGTCCCTTT	101
DUSP8 ^m	GCATGTCTTCTGACGACGCAT	GACTCCTCTCATACTCCAGCAACTG	102
ETFDH ^m	GTTGGTGCCTAACCAAGCT	TGAAGAACATCTTGGAGCACACA	100
FGF1 ^m	GAAACGTCCACAGTCAGGGAAA	TGTCTCCTTGCTCCTACGCC	101
FGF2 ^m	CGGCTGCTGGCTTCTAAGTG	ACCAACTGGAGTATTTCCGTGAC	103
FGF2 ^r	CCACACGTCAAACCTACAGCTCC	TCCATCTTCCTTCATAGCCAGG	96
FGFR1 ^m	GCTGAAGGAGGGTCATCGAA	GTCTCTGAGAGGGCACTGCAT	98
FGFR1 ^r	CCTGTGAAGTGGATGGCACC	TGAATATCTCCCATAAGAGCACCC	97
FGFR2 ^m	GTTGCCAGAGGATCCAAAGTG	CATGACTACTTGCCCCAAGCA	91
FGFR2 ^r	TAAGTGGACAGCCGCAAGC	AAGGAAGGCAGAACAGCGGT	100
FGFR3 ^m	ACCGTACTGCCAAGCCTGTC	TCTCCATCTCAGATAACCAGGTCC	93
FGFR3 ^r	CCCACCTTCAAGCAGTTGGTAG	GTAAGTTCAAATGGCACCAGG	96
FGFR4 ^m	CGGTGGAGGAGCTCTTCTCAC	AGCACTCCCTCATTAGCCCAT	96
FGFR4 ^r	AAGAGTACCTTGACCTCCGCC	GGCTGAAAACCGAGTCGCT	96
FGFR5 ^m	AGGTGCAAATACCATGGGCTA	GAAGAAGCCATAGGAGGCCCT	90
FGFR5 ^r	GGCTCATTTCATCTCAACCAC	AAGCCAGAGCAACACCGTG	97
GAPDH ^{m,r,h}	CTCCACTCACGGCAAATTC	GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT	96
GLB1 ^m	TTTCTGACCTGACTTGACCATC	GCTGTGCTCCCCAAGGCT	97
GRM1 ^m	GAAGTGATGGATGGGCAGACA	CGACCTGACCTCTGGAGACTG	101
HPRT1 ^m	GTTGGATATGCCCTTGACTATAATGAG	GGCTTTGTATTTGGCTTTTCCAG	90
HPRT1 ^r	GTTGGATATGCCCTTGACTATAATGAG	GGCTTTGTACTTGGCTTTTCCAC	90
HRAS ^m	CAGCCAAGACCCGGCAG	CATCGGGTGGGTTTCAGTTTC	93
HRAS ^h	GGCCCCGAGGAGCGAT	CACAAAATGGTTCTGGATCAGCT	102
HSP60 ^m	TCCTCAGAAGTTGGTTATGACGC	CATCCAGTAAGGCAGTTCTCACAA	103
KRAS2 ^m	TGGATGAGTACGACCCTACGATAG	CTTGACCTGCTGTGTGAGAAT	99
MAD1L1 ^m	TGAGCACCAGACGGACTGC	TCAGGCACAGACCGTGAGAAC	96
MAD2L1 ^m	AAAGTGGTGAAGTCTTGAAGATG	TGGCTTTCTGGGACTTTTCTCT	96
MAD4 ^m	CAGTGCAGAGTGTAGAGCGTGTG	GCCAACTCCATGCCCTCTAT	101
MAPK9 ^m	TGGAGCCCAAGGAATTTGTTT	TCTTTGCGTGCCTTTGGTT	104
MAPK14 ^m	CGCAAGGTCACCTGGAGGAAT	GTGGTCGTCGGTCAGCTTCT	103
MEK3 ^m	CCACCTGTGTCCAACCC	GTCACCAAGTCATCAGCCTCC	101
MORF4L1 ^m	GGATGAATGGGTGCCAGAAA	CCCTCTGCATATTGTTCTGATT	102
NFKB1 ^m	GGACATGGGATTTTCAAGATAACC	TCCCCCGTCACTGCGTAG	96
NGFR ^m	AGCGTGAGGAGGTCGAGAAG	GCCTCGTGGGTAAGGAGTCTA	103
PDGFA ^m	CAGCAGCGTCAAGTGCCA	CCTGGACCTCTTCAATTTTGG	101
PDGFA ^r	CGGGAGTTGATCGAGCGA	AAGGCATCCTCAGCCCCTAC	98
PDGFB ^m	CCTCTCTGCTGCTACCTGCG	TCATCAAAGGAGCGGATGG	101
PDGFB ^r	CCTCTCTGCTGCTACCTGCG	AAAGGAGCGGATGGAGTGG	96
PDGFC ^m	CACCCCTTCTTTCTCCCTC	GCAAAACCTGGACCTGAACC	100
PDGFC ^r	CTTCAGTGTGCCCCCTTCA	TGGCTCTAGGAACCGAATCAG	98

PDGFD ^m	TCGGACTAGAGGAAGCAGAAAATG	GCCACACCATCTTCCCTCTGAC	101
PDGFD ^r	CTCAACTGGAAGTCCCTGCACG	GCCCCCTCTTTTGGAAATGTCC	96
PDGFR α ^m	TGCTGTTGGTGATTGTCATTGTC	GGCTGATTGACTCGATAACCCT	102
PDGFR α ^r	GGTCTTATGGCGTTCTGCTCTG	TCCGCTCTTGATCTTATTGTAGAAAG	101
PDGFR β ^m	GTCTGGTCTTTTGGGATCCTACTCT	CCCTCTTGATGGCATTGTAGAAC	103
PDGFR β ^r	AGGCTTCTGGGTGAAGGCTATA	GCGGGCTTGGGACCTC	96
RAC1 ^m	ATTGCGTCCCCTCTCCTACC	TCAGGATACCACTTTGCACGG	102
RAN ^m	TGGCAGCACAGTACGAGCAT	TCTGACGCAGGGCTCCAG	102
RAP2A ^m	TGTTGGGTTGCTTAGTCGCTTAG	ATGGTCTTCAACATCTGATTGGCT	106
RGN ^m	CGATTCAATGATGGGAAGGTG	CCCTTGGTGCCGCTCA	96
RHOA ^m	CGAGGTGGATGGGAAGCA	AACATCGGTGTCTGGATAAGAGAGA	100
RHOB ^m	CCTTATGTGCTTCTCGGTGGA	ACCAGGATGATGGGCACATT	105
RPS28 ^m	CGGTTTCGCAGGGACAGTG	CGTCACCCTCTCGAACGG	101
SOD3 ^m	AACTTCACCAGAGGAAAGAGCT	GCCGCCAGTAGCAAGCC	97
SVI1 ^m	CGGAAACCAAGACGCTATCTTT	CCTATCCGACTCCTTTTCGCTCT	102
TBX2 ^m	ACAAGCTGGGCACCGAGA	TATTTGGCTTTCTTGTCCAGGC	97
TNR ^m	GGTGAACAGTACCACGAAGTGCT	TTCCAACCTCCATACTCTGTGCCT	100
TRP53 ^m	GCATGAACCGCCGACCTAT	GCAGGCACAAACCGAACCT	98
VIM ^m	GGACATTGAGATCGCCACCTA	GGTTAGTTTCTCTCAGGTTTCAGGGA	104

m: específico para camundongo; h: específico para humano; r: específico para rato.

3.6 Sequenciamento

Os plasmídeos pSUPER recombinantes e os fragmentos de PCR dos receptores FGFRs e PDGFRs foram sequenciados, utilizando-se os kits MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) ou Big Dye (Applied Biosystems).

As regiões do gel de agarose correspondentes aos fragmentos de PCR amplificados ou plasmídeos são separadas, e o DNA é purificado, utilizando-se o kit GFX (Amersham-Pharmacia Biotech). Fragmentos do gel são tratados com solução de extração (1 μ L/ μ g de gel, 65 °C, 15 min). Após a dissolução da agarose, as frações são aplicadas em microcolunas de separação e centrifugadas em microcentrífuga

Eppendorf (10000 rpm, 1 min). As colunas são eluídas com solução de lavagem, contendo etanol (70%, 500 μ L) e centrifugadas novamente (10000 rpm, 1 min), secas sob centrifugação adicional (10000 rpm, 2 min) e os fragmentos de PCR purificados são coletados das colunas com água ultrapura, pré-aquecida em banho-maria (20-50 μ L, 65 °C).

Todos os fragmentos de PCR ou plasmídeos purificados são analisados quanto à presença de contaminantes por gel de agarose (agarose 0,7-2,5%, Gibco) em tampão TBE (Tris 9 mM, ácido bórico 9 mM e EDTA 0,2 mM, pH 8,0, brometo de etídio 1 μ g/mL), utilizando-se cubas para eletroforese horizontal (Horizon, Gibco). O DNA é diluído em tampão de amostra (tampão TE, azul de bromofenol e xilenocianol 0,1% e glicerol 30-50%). Para estimar a concentração dos produtos de PCR ou plasmídeos, são utilizados marcadores de massa molecular para quantificação de DNA (Low DNA Mass Ladder e High DNA Mass Ladder, Invitrogen).

As sequências obtidas com os sequenciamentos são analisadas, utilizando-se o programa Chromas V2.33 (Technelysium) e as ferramentas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>; Altschul *et al.*, 1997), Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Clustalw/>; Thompson *et al.*, 1994) e BLAST 2 sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>; Tatusova & Madden, 1999).

3.6.1 MegaBACE 1000

Os *primers* (5 μL /reação, 5 μM), listados na tabela 3.5, e as amostras, produtos de PCR (5 μL /reação, 20 ng/ μL) ou plasmídeos (5 μL /reação, 100-200 ng/ μL), são entregues para o sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP (<http://genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento.php>). Utiliza-se o kit DYEnamic ET Dye Terminator (Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase, GE Healthcare) e as sequências são analisadas pelo programa Sequence Analyser, utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

3.6.2 Big Dye®

Quantidades de DNA dos fragmentos de PCR ou dos plasmídeos de interesse são adicionados (1,5 μL /poço, 80-200 ng) ao Big Dye® (2,1 μL /poço, dNTPs não marcados; ddNTPs marcados com diferentes fluoróforos, verde para ddATP, vermelho para ddTTP, preto para ddGTP, azul para ddCTP; Taq DNA polimerase, Applied Biosystems), tampão Big Dye® (3,2 μL /poço) e *primers* listados na tabela 3.5 (3,2 μL /poço, 3,2 μM , Invitrogen, IDT) para um volume final de 15 μL /tubo. As amostras são desnaturadas (95°C, 5 min) e submetidas a 30 ciclos de PCR, que incluem a desnaturação (95 °C, 45 seg), anelamento (57 °C, 45 seg) e polimerização (72 °C, 1 min). O DNA amplificado é precipitado com etanol (23 μL /poço, 100%), glicogênio (1 μL /tubo, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e acetato de sódio (1 μL /tubo, 3 M, pH 5,2) e centrifugado (4000 rpm, 30 min, 25 °C). Após esta etapa, o DNA amplificado é lavado com etanol (50 μL , 70% em água ultrapura) e centrifugado (4000 rpm, 30 min, 25 °C).

As amostras são secas na ausência de luz (25 °C) e, posteriormente, submetidas à análise no sequenciador (ABI PRISM 3100 GeneticAnalyzer, Hitachi) pelo serviço de sequenciamento do Instituto de Química da USP (<http://www.iq.usp.br/adm/secqbq/Sequenciamento/>).

Tabela 3.5| *Primers* utilizados em reações de sequenciamento.

Nome	Sequência
FGFR1-fwd	TCAACCACACCTACCAGCT
FGFR1-rev	AGAACGGTCAACCATGCA
FGFR2-fwd	ATGTCGTTGAACGTTCCACC
FGFR2-rev	GAAGCCGTGATCTCCTTCT
FGFR3-fwd	TGTGCCACTTCAGGTGC
FGFR3-rev	GTTTCCTACAGCTCCTCC
FGFR4-fwd	GAACTCTCTGGGTAGCATTCC
FGFR4-rev	CACGCTGACTGGTAGGAAAGG
FGFR5-fwd	TGAAGGTGAAGGAGGTGG
FGFR5-rev	TTGTAGGTGGCGTTGATGG
PDGFR α -fwd	CCTCTACACCACGCTGAGTG
PDGFR α -rev	CCAGTCCTTCAGCTTATCC
PDGFR β -fwd	AGGACAACCGTACCTTGG
PDGFR β -rev	GGATGATGAGAGAGATGACG
T3	CTTTAGTGAGGGTTAAT
T7	AATACGACTCACTATAG

3.7 Extração de proteínas

As frações proteicas são obtidas a partir de células em crescimento exponencial (50-80% de densidade celular). As células são lavadas em PBS (KCl 2,7

mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM, CaCl₂ H₂O 0,7 mM e MgCl₂ 6H₂O 0,5 mM, pH 7,2) e rompidas com tampão RIPA em gelo (80-300 µL, NP-40 1%, NaCl 150 mM, Tris.Cl 50 mM, SDS 0,1% e deoxicolato de sódio 0,5%, pH 7,5), adicionado de inibidores de fosfatases (ortovanadato de sódio 1,0 mM, fluoreto de sódio 1,0 mM) e proteases (PMSF 1,0 mM, aprotinina 2 µg/mL, pepstatina A 2 µg/mL, leupeptina 2 µg/mL).

Os lisados celulares são deixados em gelo (10 min) e o sobrenadante é coletado por centrifugação numa microcentrífuga Eppendorf (14000 rpm, 10 min, 4 °C). Aliquotas (5-10 µL) dos lisados são utilizadas para quantificar, espectrofotometricamente, as proteínas totais, em comprimento de onda de 595 nm (Espectrofotômetro U3000, Hitachi; Ultrospec 3100 pro, Amersham Biosciences), com reagente de Bradford (250 µL/mL, BioRad), utilizando-se como padrão uma curva de dose com concentrações crescentes de BSA (0,5-2,5 mg/mL).

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

O gel de poliacrilamida desnaturante Tris-glicina é composto de duas partes: o gel de empacotamento 5% acrilamida/bis-acrilamida, SDS 0,1%, pH 6,8 (1,7 mL do mix acrilamida 30% [29% de acrilamida e 1% de N,N'-metil-bis-acrilamida], 1,25 mL de Tris 1,0 M, pH 6,8, 100 µL de SDS 10%, 100 µL de (NH₄)₂S₂O₈ 10%, 10 µL de TEMED, para um volume final de 10 mL) e o gel de separação 8-15% acrilamida/bis-acrilamida, SDS 0,1%, pH 8,8 (13,3-25,0 mL do mix acrilamida 30%, 12,5 mL de Tris

1,5 M, pH 8,8, 500 µL de SDS 10%, 500 µL de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 10%, 20-30 µL de TEMED, para um volume final de 50 mL).

As frações quantificadas de proteínas totais são desnaturadas (100 °C, 10 min) em tampão de amostra para proteínas (Tris.Cl 50 mM, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, pH 6,8) e aplicadas em gel de poliacrilamida desnaturante, acoplado a uma cuba vertical de eletroforese (Gibco; Whatman) com tampão para eletroforese (Tris 25 mM, glicina 250 mM e SDS 0,1%, pH 8,3). Utiliza-se um marcador de massa molecular para proteína (15-25 µL para cada gel, Rainbow, Amersham-Pharmacia; Benchmark, Invitrogen). A eletroforese é realizada a 50 V, durante 12 h.

3.9 Immunoblot

O gel de poliacrilamida contendo as proteínas totais fracionadas é embebido em tampão de transferência (glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,037% e metanol 20%, pH 8,3) e, então, as proteínas são transferidas para membranas de Nylon (Hybond C+, Amersham Biosciences), utilizando-se uma cuba de transferência semisseca (25 V, 500 mA, 50 W, 1 h, BioRad). A membrana é corada com solução de Ponceau-S (0,1%, em ácido acético 10%) para verificar a eficiência da transferência das proteínas, bloqueada com TBS-T (NaCl 150 mM, Tris 50 mM e Tween-20 0,1%), contendo 5% leite em pó (25 °C, 1 h, sob agitação). Em seguida, lavada três vezes (em TBS-T, 10 min cada lavagem) e incubada com anticorpo primário (2 µg/mL, diluído 1000-2000 vezes em TBS-T, leite em pó desnatado 5%, 4 °C, 12-24 h). A seguir, a membrana é

lavada três vezes (TBS-T, 10 min cada lavagem) e incubada com anticorpo secundário acoplado à enzima HRP (2 µg/mL, diluído 1000 vezes em TBS-T, 1 h). A membrana é lavada três vezes (TBS-T, 10 min cada lavagem) e, finalmente, incubada com os reagentes do kit ECL Plus (1 min, Amersham-Pharmacia) para autorradiografia, utilizando filmes fotográficos (Diagnostic Films, Kodak), revelador e fixador dentais (Kodak).

As imagens das bandas referentes às proteínas são quantificadas pelo programa ImageJ 1.40g (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>; Abramoff *et al.*, 2004).

Foram utilizados anticorpos primários, tendo como alvo as seguintes proteínas: FGF2 (sc-7911), FGFR2 (sc-20735), H-Ras (sc-520), p27 (sc-528), fosfo-p27 Ser10 (sc-12939R), fosfo-p27 Thr187 (sc-16324R), de procedência da Santa Cruz Biotechnology; AKT (#9272), fosfo-AKT Ser473 (#9272), ERK 1/2 (#9102), fosfo-ERK 1/2 Thr202/Tyr204 (#9101L), fosfo-Src Tyr416 (#2101), de procedência da Cell Signaling; Src (05-184), de procedência da Upstate. Utilizou-se como anticorpo secundário anti-IgG (coelho) acoplado à HRP (Amersham).

3.10 Culturas celulares

Culturas celulares de mamíferos em monocamadas são os modelos experimentais utilizados nesta tese, para o estudo do controle do ciclo, do crescimento e da proliferação celular.

As culturas celulares de monocamadas podem ser temporárias ou permanentes. Entre as temporárias, há duas possibilidades: A) Culturas de células funcionais, obtidas por procedimentos empiricamente elaborados, com duração de poucos dias e limitadíssima capacidade de proliferação. Um exemplo são as culturas de células do córtex adrenal de rato, preparadas no laboratório da Prof^a Dr^a Claudimara F. P. Lofti (Mattos & Lofti, 2005) e utilizadas nesta tese. B) Culturas primárias com boa capacidade de proliferação celular, que permitem múltiplas repicagens até alcançar a senescência replicativa. O exemplo clássico são as culturas de fibroblastos humanos extensivamente estudadas por Hayflick e colaboradores (Hayflick & Moorhead, 1961).

As culturas permanentes são obtidas pelo isolamento de linhagens celulares imortalizadas. São assim chamadas por possuírem capacidade ilimitada de proliferação, podendo ser mantidas em estoques congelados em nitrogênio líquido, que são periodicamente descongeladas para experimentação. Por razões ainda desconhecidas, células de camundongo geram espontaneamente linhagens imortalizadas em cultura. O exemplo clássico são as linhagens 3T3 de embriões (Todaro & Green, 1963; Aaronson & Todaro, 1968). Por outro lado, as células humanas não dão espontaneamente origem a linhagens imortalizadas, mas sim, exigem transfecção com transgenes específicos para se tornarem imortalizadas. Um exemplo atualmente bem conhecido são as células humanas de rim embrionário (HEK) imortalizadas pelos genes virais dos antígenos T e t de SV40 e pelo gene humano da unidade catalítica da telomerase (Hahn *et al.*, 1999). As linhagens imortalizadas, em geral, não são tumorigênicas em camundongos suscetíveis.

Tumores naturais de humanos e animais, ou tumores induzidos em animais de experimentação, não dão espontaneamente linhagens permanentes em cultura. Em geral, exigem procedimentos empíricos para o isolamento de linhagens de capacidade ilimitada de proliferação em cultura, que, na grande maioria dos casos, são tumorigênicas em camundongos suscetíveis. A linhagem Y1 usada nesta tese é um exemplo histórico desta classe.

A linhagem celular Y1 é derivada de tumor adrenocortical funcional de camundongo (Yasumura *et al.*, 1966). Possui uma amplificação do gene *Kras*, tendo uma elevada expressão da proteína K-Ras (Schwab *et al.*, 1983) e, conseqüentemente, também da sua forma ativada K-Ras-GTP (Rocha *et al.*, 2003).

O clone Y1-Ras^{N17} 3.1 é transfectante condicional de Y1, carregando o gene mutante dominante negativo *HrasN17* sob o controle do promotor de MMTV, responsivo a dexametasona (10^{-10} M), levando à redução dos níveis de K-Ras-GTP intracelulares (Forti *et al.*, 2002).

A linhagem Y1-FRes3 é um clone de Y1 e foi selecionada como resistente ao tratamento com FGF2 (FGF2-Resistente) em ensaios de formação de colônias. Esta linhagem é menos tumorigênica que a parental, depende de FGF2 para crescimento e mantém a expressão de K-Ras (Costa & Armelin, 2005).

As linhagens Y1-FResA, Y1-FResD, Y1-FResH e Y1-FRes10.3 também são clones derivados de Y1 e foram selecionadas como resistentes ao tratamento com FGF2 (FGF2-Resistente) em ensaios formação de colônias. Estas linhagens são menos

tumorigênicas que a parental, dependendo de FGF2 para crescimento e não mantêm a expressão de K-Ras (Matos & Armelin, 2007).

Estas linhagens derivadas de Y1 estão resumidas na tabela 3.6.

A linhagem Balb 3T3 (clone A31) são células mesenquimais pluripotentes de embrião de camundongos isogênicos Balb/c (Aaronson & Todaro, 1968). A partir desta linhagem, foram gerados clones estáveis (3T3-EJA e 3T3-B61) que expressam o oncogene humano *EJRAS (HRASV12)*, levando a um aumento nos níveis de H-Ras-GTP intracelulares (Kovary *et al.*, 1989, Rocha & Armelin, 1994 e dados não publicados de Rocha & Armelin).

A linhagem B61-FRes1 é um clone de 3T3-B61 e foi selecionada (Costa & Armelin, 2005) como resistente ao tratamento com FGF2 (FGF2-Resistente). Esta linhagem não é tumorigênica, depende de FGF2 para crescimento e perdeu o oncogene humano *HRASV12*.

As linhagens policlonais B61-FGFR2cA (125 colônias por placa) e B61-FGFR2cB (40 colônias por placa) foram obtidas através de transfecção estável do plasmídeo pcDNAI-FGFR2IIIc, para expressão do receptor FGFR2 isoforma IIIc (ver tabela 3.1, Plasmídeos). Além destas, também foi gerada uma linhagem policlonal denominada B61-controle, através da transfecção do plasmídeo pcDNA 3.1 vazio (ver tabela 3.1, Plasmídeos).

Estas linhagens derivadas de Balb 3T3 estão resumidas na tabela 3.7.

Tabela 3.6| Resumo das linhagens derivadas de Y1.

Nome	Amplificação do gene <i>Kras</i>	Tumorigenicidade (Camundongos Balb/c nude)
Y1	Sim	Sim
Y1-Ras ^{N17} 3.1	Sim (DN Ras ^{N17} com dexametasona)	Sim: sem dexametasona Não analisada: com dexametasona
Y1-FRes3	Sim	Parcialmente
Y1-FResA	Não	Não
Y1-FResD	Não	Não
Y1-FResH	Não	Não
Y1-FRes10.3	Não	Não

Tabela 3.7| Resumo das linhagens derivadas de Balb 3T3.

Nome	Transfecção e expressão do oncogene humano <i>HRASV12</i>	Tumorigenicidade (Camundongos Balb/c)
Balb 3T3	Não	Não
3T3-B61	Sim	Sim
3T3-EJA	Sim	Sim
B61-FRes1	Não	Não
B61-controle	Sim	Não analisada
B61-FGFR2cA	Sim	Não analisada
B61-FGFR2cB	Sim	Não analisada

Para as linhagens acima descritas, utiliza-se o meio de cultura DMEM (complementados de L-glutamina 0,3 g/L, NaHCO₃ 2,0 g/L, estreptomicina 100 mg/L e ampicilina 25 mg/L, USB), soro fetal bovino (10%, CultiLab) e, quando necessário, G418 (100 µg/mL, Invitrogen) ou Higromicina B (200 µg/mL, Invitrogen). As células são mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ (5%), em estufas para cultura de células (Forma Scientific).

Estoques de células mantidos congelados em nitrogênio líquido (-170 °C) são descongelados e as células cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura celular (25, 75 e 150 cm², Corning).

Para a expansão das células em monocamada, o meio de crescimento é removido e as monocamadas são lavadas com PBS-A (KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,0 mM e MgCl₂.6H₂O 0,5 mM, em pH 7,2) e tratadas com tripsina (0,5-2,0 mL de solução 1 mg/mL, Gibco) a 37 °C, 1-3 min. As células são diluídas em meio de cultura e divididas em garrafas de poliestireno (25, 75 e 150 cm², Corning), placas de cultura celular (35, 60 e 100 mm de diâmetro, Corning) ou placas *multiwell* (6, 12, 24 e 96 poços, Corning).

O congelamento é necessário para garantir a manutenção dos estoques das linhagens celulares. Para isso, as linhagens em monocamadas são lavadas com PBS-A e tratadas com tripsina. As células são, então, ressuspensas no meio de congelamento (DMEM complementado de DMSO 10% e FCS 20%) e distribuídas em tubos criogênicos (2 mL, Corning). Os tubos são resfriados gradativamente a 4 °C por 30

min, a -20 °C por 1 h, a -80 °C por 24 h e então armazenados em tanques de nitrogênio líquido a -170 °C.

As linhagens BaF3 de pró-linfócito B de camundongo (BaF3-WT), gentilmente cedidas pelo laboratório do Prof. David Ornitz (Washington University, EUA), são células em suspensão que foram transfectadas para expressar FGFR1 (clone BaF3-FR1c-11), FGFR2 (clone BaF3-FR2c-2) e FGFR3 (clone BaF3-FR3c1-4) (Ornitz *et al.*, 1996). Estas linhagens foram utilizadas para controle negativo e positivo de expressão dos receptores FGFRs. Para crescimento destas linhagens, utilizou-se o meio de cultura RPMI (complementados de L-glutamina 0,3 g/L, NaHCO₃ 2,0 g/L, estreptomicina 100 mg/L e ampicilina 25 mg/L, USB), FCS (10%, CultiLab), IL-3 (0,5 ng/mL, Peprotech) e, quando necessário, G418 (400 µg/mL, Invitrogen). As células foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ (5%), em estufas para cultura de células (Forma Scientific).

3.10.1 Sincronização em G0/G1 de células Y1 e derivadas

Em placas de poliestireno para cultura celular (Corning), são plaqueadas 15000 células/cm². No dia seguinte, o meio de cultura é removido, as células são lavadas com PBS, e o meio DMEM é adicionado, na ausência de soro, para sincronização das células, por carenciamento de soro, por 48 h. No tempo inicial (tempo 0 h), o estímulo é realizado com FGF2 recombinante bovino (obtido em nosso laboratório) e/ou soro fetal bovino 10% (CultiLab).

3.10.2 Sincronização em G0/G1 de células Balb 3T3

Em placas de poliestireno para cultura celular (Corning), são plaqueadas 30000 células/cm². No dia seguinte, o meio de cultura é removido, as células são lavadas com PBS, e o meio DMEM é adicionado, em 0,5% de soro, para sincronização das células por 24 h. No tempo inicial (tempo 0 h), o estímulo é realizado com FGF2 recombinante bovino (obtido em nosso laboratório) e/ou soro fetal bovino 10% (CultiLab).

3.10.3 Sincronização em G0/G1 de células 3T3-B61

Em placas de poliestireno para cultura celular (Corning), são plaqueadas 15000-25000 células/cm². No dia seguinte, o meio de cultura é removido, as células são lavadas com PBS, e o meio DMEM é adicionado (G418 100 µg/mL), para sincronização das células por 24-48 h. No tempo inicial (tempo 0 h), o estímulo é realizado com FGF2 recombinante bovino (obtido em nosso laboratório) e/ou soro fetal bovino 10% (CultiLab).

3.10.4 Sincronização em G0/G1 de cultura primária de adrenocórtex de rato

Este procedimento foi realizado por Gabriela Mattos, no laboratório da Prof^a Dr^a Claudimara F. P. Lofti. Em placas de poliestireno para cultura celular (Corning), são plaqueadas 30000 células/cm². No dia seguinte, o meio de cultura é removido, as

células são lavadas com PBS e DMEM, e o meio DMEM é adicionado, com 0,5% de soro, para sincronização das células, por carenciamento de soro, por 24 h. No tempo inicial (tempo 0 h), o estímulo é realizado com FGF2 recombinante bovino (obtido em nosso laboratório) e/ou soro fetal bovino 10% (CultiLab).

3.11 Transfecções celulares

3.11.1 Transfecção estável de plasmídeos

As células em cultura são transfectadas com plasmídeos (tabela 3.1) através da utilização de micelas obtidas com fosfolipídeos que se ligam, por interações de carga, a ácidos nucleicos em solução, formando complexos que são incorporados à célula. Foi utilizado o reagente comercial lipofectina (Invitrogen).

As células são cultivadas em placas p60 (DMEM, FCS 10%), em subconfluência (40-50%). Em seguida, são preparadas as seguintes soluções (em ambiente estéril, em fluxo laminar): solução A (DNA plasmídeo, 1-10 µg, em DMEM sem FCS e sem antibióticos, volume final de 100 µL); solução B (lipofectina 1 µg/mL, em DMEM sem FCS e sem antibióticos, volume final de 100 µL). A solução B é incubada (25 °C, 45 min). Em seguida, as soluções A e B são misturadas brandamente e incubadas (25 °C, 15 min).

As monocamadas celulares são lavadas duas vezes (DMEM sem FCS e sem antibióticos), a mistura A+B é diluída (até 1,8 mL, com DMEM sem FCS e sem antibióticos) e adicionada às células. Incuba-se (tempo de transfecção 8-16 h) e o meio

de transfecção é, então, substituído por condições normais de cultura (DMEM, 10% FCS, adicionado de antibióticos). Após 24-36 h da transfecção, as células são subcultivadas em placas p100 em confluência baixa (20%) em condições normais. Após 24 h do subcultivo, o agente de seleção apropriado é adicionado ao meio (G418 200 µg/mL ou higromicina B 400 µg/mL). A seleção dos clones estáveis é feita durante três a cinco semanas após transfecção, em presença do agente de seleção, de acordo com a resistência conferida por cada um dos plasmídeos utilizados (tabela 3.1).

3.11.2 Transfecção transiente de siRNAs

Células em cultura foram transfectadas com siRNAs, tendo como alvo mRNA de FGFR1 (siRNA ID 158530, 158531, 158532, Ambion), GAPDH (AM4624, Ambion) e siRNA controle negativo (AM4635, Ambion). Foram utilizados fosfolipídeos siPORT Amine (Ambion).

As condições descritas a seguir foram otimizadas, primeiramente, utilizando-se o siRNA para GAPDH, controle positivo. As células são cultivadas em placas *multiwell* de 12 poços (DMEM, FCS 10%), em subconfluência (30-50%, 25000-40000 células/cm²). Em seguida, são preparadas as seguintes soluções (em ambiente estéril, em fluxo laminar): solução A (siRNA, 100-200 nM, em DMEM sem FCS e sem antibióticos, volume final de 50 µL); solução B (siPORT Amine 4 µL, em DMEM sem FCS e sem antibióticos, volume final de 50 µL). A solução B é incubada (25 °C, 15 min). Em seguida, as soluções A e B são misturadas brandamente e incubadas (25 °C, 10 min).

As monocamadas celulares são lavadas duas vezes em DMEM (sem FCS e sem antibióticos), a mistura A+B é adicionada às células (100 µL), num volume final de 1 mL. Incuba-se (24 h) e o meio de transfecção é, então, substituído por condições normais de cultura (DMEM, 10% FCS, adicionado de antibióticos). Após 48-72 h da transfecção, as células são analisadas quanto à redução da expressão do mRNA alvo.

3.12 Ensaios de viabilidade celular

Mecanismos de morte celular podem ser determinados, medindo-se diferentes marcadores de viabilidade celular *in vitro*. Tanto as células apoptóticas quanto as necróticas “desligam” seu metabolismo, perdem a integridade da membrana, liberando o seu conteúdo citoplasmático no meio de cultura em até 24 h.

No ensaio de MTS (CellTiter 96[®] AQueous, Promega), o mesmo é reduzido pelas células, transformando-se em um composto colorido, formazan, que é solúvel no meio de cultura. Presumidamente, esta conversão é realizada por NADH e/ou NADPH produzido pelas desidrogenases de células metabolicamente ativas. A quantidade de formazan formado é diretamente proporcional ao número de células vivas em cultura. As células são plaqueadas numa *multiwell* de 96 poços. Após os tratamentos de interesse, com 100 µL de meio, pipeta-se 20 µL/poço da solução de CellTiter 96[®] AQueous. A placa é incubada por 1-4 h numa estufa a 37 °C, em atmosfera de CO₂ (5%) e, posteriormente, a leitura de absorbância é realizada a 490 nm, diretamente na placa num leitor de ELISA (Infinite 200, Tecan).

No ensaio de integridade de membrana (Cyto-Tox-ONE™, Promega), a lactato desidrogenase (LDH) liberada no meio de cultura é medida através de um ensaio enzimático acoplado, que resulta na conversão de resazurin em resofurin (composto fluorescente). Os reagentes deste ensaio não danificam as células saudáveis, assim as reações para medir a LDH liberada podem ser realizadas diretamente em poços contendo a população de células viáveis e danificadas. Após os tratamentos de interesse nas células, a *multiwell* de 96 poços com 100 µL de meio é retirada da estufa e aguarda-se de 20-30 min para equilibrar a temperatura a 25 °C. Nos poços de controle total de lise, adiciona-se 2 µL da solução de lise. Nos poços de interesse, adiciona-se 100 µL de reagente Cyto-Tox-ONE™ e agita-se por 30 seg, incubando-se a 25 °C, 10 min. Adiciona-se 25 µL da solução de bloqueio da reação. Agita-se a placa por 10 seg e a placa é protegida da luz até que a leitura da fluorescência seja realizada (excitação a 560 nm e emissão a 590 nm) num leitor de ELISA com fluorescência (Infinite 200, Tecan).

3.13 Incorporação de timidina tritiada (síntese de DNA)

Após sincronização em G0/G1 (item 3.10.1), as células são estimuladas com FGF2 e/ou soro por tempos determinados (normalmente numa placa de 24 poços). Após tratamentos de interesse e incorporação de timidina fria (10^{-7} a 10^{-8} M) e timidina tritiada (1,0 a 0,1 µCi/mL) durante tempos determinados, as células são lavadas com PBS gelado, fixadas com ácido tricloro acético gelado (10%, 10-20 min), lavadas novamente e lisadas com NaOH (80-100 µL/poço, 0,5 M, 60°C, 15-30 min).

Os filtros de papel são colocados nos poços para absorver todo seu conteúdo, posteriormente são lavados com ácido tricloro acético (5%, em água), etanol (70%, em água) e, finalmente, com acetona. Os filtros secos são colocados no frasco de vidro com 5 mL de líquido de cintilação (PPO 0,4%, POPOP 0,01%, em tolueno). A contagem da radiação proveniente da incorporação de timidina tritiada é realizada em cintilador líquido (Packard).

3.14 Ensaio clonogênico ou de formação de colônia

Este ensaio é baseado na habilidade de uma única célula crescer e se tornar uma colônia. Essencialmente, o ensaio testa cada célula na população pela sua habilidade de se dividir sem limitações e apenas uma fração das células plaqueadas retém a capacidade de produzir colônias. O ensaio de colônia é um método para determinar a morte celular induzida por tratamentos com agentes citotóxicos.

As células são plaqueadas em diluições apropriadas (50-250 células/cm²) em placas de poliestireno para cultura celular sob tratamento de FGF2. Após 24 h de tratamento, o meio é substituído por meio DMEM (10% FCS). Após 10-14 dias em cultura, as colônias são fixadas com formaldeído (3,7%, em PBS), coradas com cristal violeta (0,5%) e contadas manualmente ou pelo programa CellProfiler (<http://www.cellprofiler.org/>, Carpenter *et al.*, 2006). A colônia é considerada quando possui, no mínimo, 50 células.

3.15 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Após sincronização das células em G0/G1 (item 3.10.1), no tempo inicial (tempo 0 h), adiciona-se o BrdU (50 μ M). Após o período de estímulo de interesse, coleta-se o meio de cultura num tubo de fundo cônico de polipropileno de 15 mL (Corning). As células são lavadas com 2 mL PBS-A, mantendo o PBS-A junto com o meio anterior. Adiciona-se 500 μ L de tripsina e, após o tempo para as células soltarem da placa (1-2 min), com o meio já coletado anteriormente, ressuspende-se para soltar as células e manter uma solução homogênea. As células são centrifugadas (1200 rpm, 3 min), descarta-se o sobrenadante e são lavadas em 1 mL de PBS gelado. As células são centrifugadas a (1200 rpm, 3 min), despreza-se o sobrenadante e são ressuspensas em etanol gelado (75%, em PBS) para fixação (4 °C, 20 min). As células são centrifugadas (1200 rpm, 3 min), descarta-se o sobrenadante e são lavadas em 1 mL de PBS gelado. As células são centrifugadas (1200 rpm, 3 min), despreza-se o sobrenadante e são ressuspensas em 200 μ L de solução HCl (2 M) e Tween-20 (0,5%) para permear as células e desnaturar o DNA (15 min, protegidas da luz). As células são centrifugadas (1200 rpm, 3 min), descarta-se o sobrenadante e as células são ressuspensas em 200 μ L de Na₂B₄O₇ (0,1 M, pH 9,5), para neutralizá-las. As células são centrifugadas (1200 rpm, 3 min), despreza-se o sobrenadante e são lavadas em 1 mL de PBS gelado. As células são centrifugadas (1200 rpm, 3 min), descarta-se o sobrenadante e as células são ressuspensas em 80-160 μ L da solução do anticorpo anti-BrdU, conjugado com Alexa 488 (1:100, 2 μ g/mL, em PBS), e mantidas por 30 min, protegidas da luz. As células são centrifugadas (1200 rpm, 3 min), despreza-se o sobrenadante e são lavadas em 1 mL de PBS gelado. As células são centrifugadas

(1200 rpm, 3 min), descarta-se o sobrenadante e são ressuspensas em 300-700 μ L da solução de iodeto de propídio (50 μ g/mL, em PBS) e RNase (10 μ g/mL, em PBS) por 20 min, protegidas da luz, até análise em citômetro de fluxo (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter; FACScalibur Flow Cytometer, BectonDickinson; BDFACSAria, BectonDickinson). Os programas WinMDI V2.9 (<http://facs.scripps.edu/wm29w98.exe>), Cylchred V1.0.2 (<http://www.cardiff.ac.uk/medic/aboutus/departments/haematology/cytometry/cytonetuk/software/index.html>) e FlowJo 7.5 (Treestar) foram utilizados para análise dos dados.

3.16 Inibidores

Foram utilizados os seguintes inibidores:

- Receptor de FGF: PD173074 (Sigma);
- Src: PP1 e PP2 (Merck);
- MEK: U0126 (Promega);
- PI3K: Wortmannin (Sigma) e LY294002 (Promega);
- PKC: Gö6983, Staurosporin, Tamoxifen (Sigma).

4 Resultados

4.1 FGF2 inibe a proliferação de células malignas dependentes de Ras, através da ativação das Tyr-quinases dos receptores de FGF.

Na figura 4.1A, curvas de crescimento celular mostram que FGF2 (em verde) inibe a proliferação das células Y1, quando comparadas ao controle (em preto), e esta inibição é totalmente abolida na presença do inibidor específico PD173074 (em azul), que bloqueia a atividade de Tyr-quinase dos receptores FGFRs.

O FGF2 inibe também a formação de colônias de células Y1. Foram testadas concentrações crescentes de PD173074, para verificar se e qual a concentração mínima deste inibidor era capaz de inibir a sinalização do FGF2 via Tyr-quinases dos receptores FGFRs. A dose mínima de PD173074 para bloquear o FGF2 em Y1 está entre 100 e 200 nM (figura 4.1B). Experimentos subsequentes demonstraram que 150 nM é a dose mínima para Y1. Em ensaios de colônia de Y1, o inibidor PD173074 protege completamente as células quando adicionado até 15 h depois do FGF2 (figura 4.2A). Após este período, o efeito do inibidor é drasticamente reduzido até 29 h, quando, então, não bloqueia mais o FGF2 (figura 4.2B).

As microfotografias da figura 4.3 demonstram alterações morfológico-estruturais nas células tratadas com FGF2, que sugerem efeito estressante (as células se tornam arredondadas e refringentes - detalhe da condição com FGF2). É

importante destacar que o inibidor PD173074 abole este aparente efeito estressante. Há anos, é sabido que a ativação de receptores de Tyr-quinase (por EGF, FGF, PDGF e também soro) causam alteração morfológica e estimulação para migração em células quiescentes em G0/G1 (tanto em fibroblastos murinos 3T3, como em fibroblastos humanos) devido à ativação de RhoA, alterações de citoesqueleto, entre outras. Além disso, a inibição de RhoA e inibição da despolimerização de fibras do citoesqueleto, também bloqueiam a transição G1 → S e a proliferação de células normais, imortalizadas ou não. Por outro lado, células malignas, particularmente aquelas transformadas por Ras, proliferam mesmo quando a ativação de RhoA e mudanças no citoesqueleto são bloqueadas, apesar de inibição da migração.

O crescimento das células tumorais 3T3-B61, dependentes de H-Ras^{V12}, é também inibido em tratamentos de FGF2 e o inibidor PD173074 protege completamente as células do FGF2 (figura 4.4A). Fenomenologicamente, trata-se do mesmo processo observado com as células malignas Y1 (figura 4.1A), apesar de estas linhagens serem muito diferentes, quanto à desregulação do controle do ciclo celular: Y1 por K-Ras amplificado e 3T3-B61 por H-Ras^{V12}.

Em ensaios de colônia de 3T3-B61, a dose mínima do inibidor de receptor de FGF PD173074 é 300 nM (figura 4.4B), que, após 25 h, não mais protege as células do FGF2 (figura 4.5, dados não mostrados). Outro aspecto importante são as análises morfológicas, que indicam um padrão de células arredondadas e refringentes na presença de FGF2, lembrando o efeito estressante descrito acima para as células Y1.

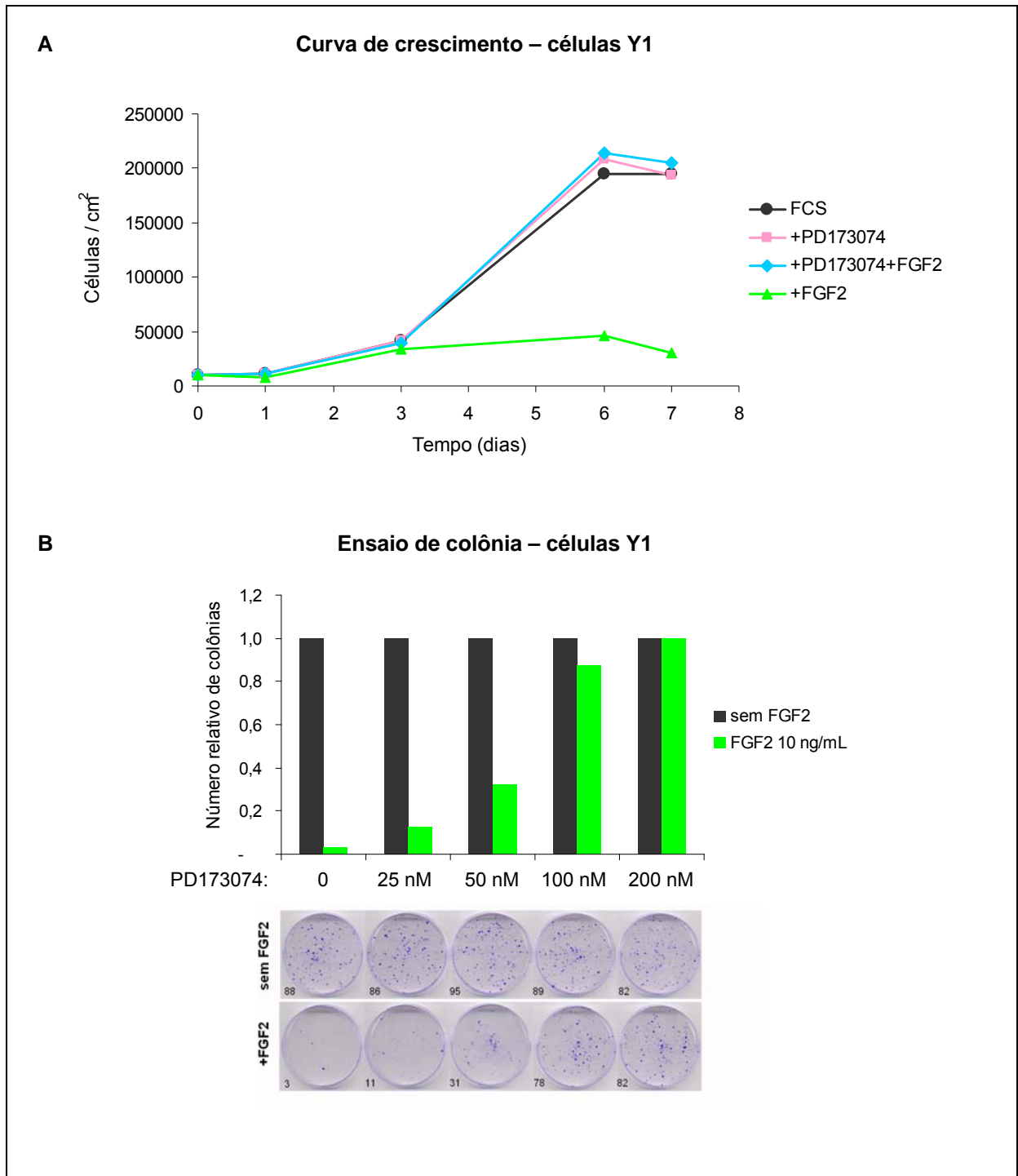


Figura 4.1| A| Curva de crescimento de células Y1, na presença de soro em todas as condições, sob tratamentos de FGF2 10 ng/mL e/ou PD173074 150 nM, adicionado 5 min antes do FGF2. Foram plaqueadas 10^4 células/cm². **B|** Curva de dose de PD173074 em ensaio de formação de colônias com FGF2 10 ng/mL, mantido por 24 h. O número de colônias por placa está indicado na porção esquerda inferior de cada placa. Foram plaqueadas 50 células/cm² e mantidas em cultura por 14 dias.

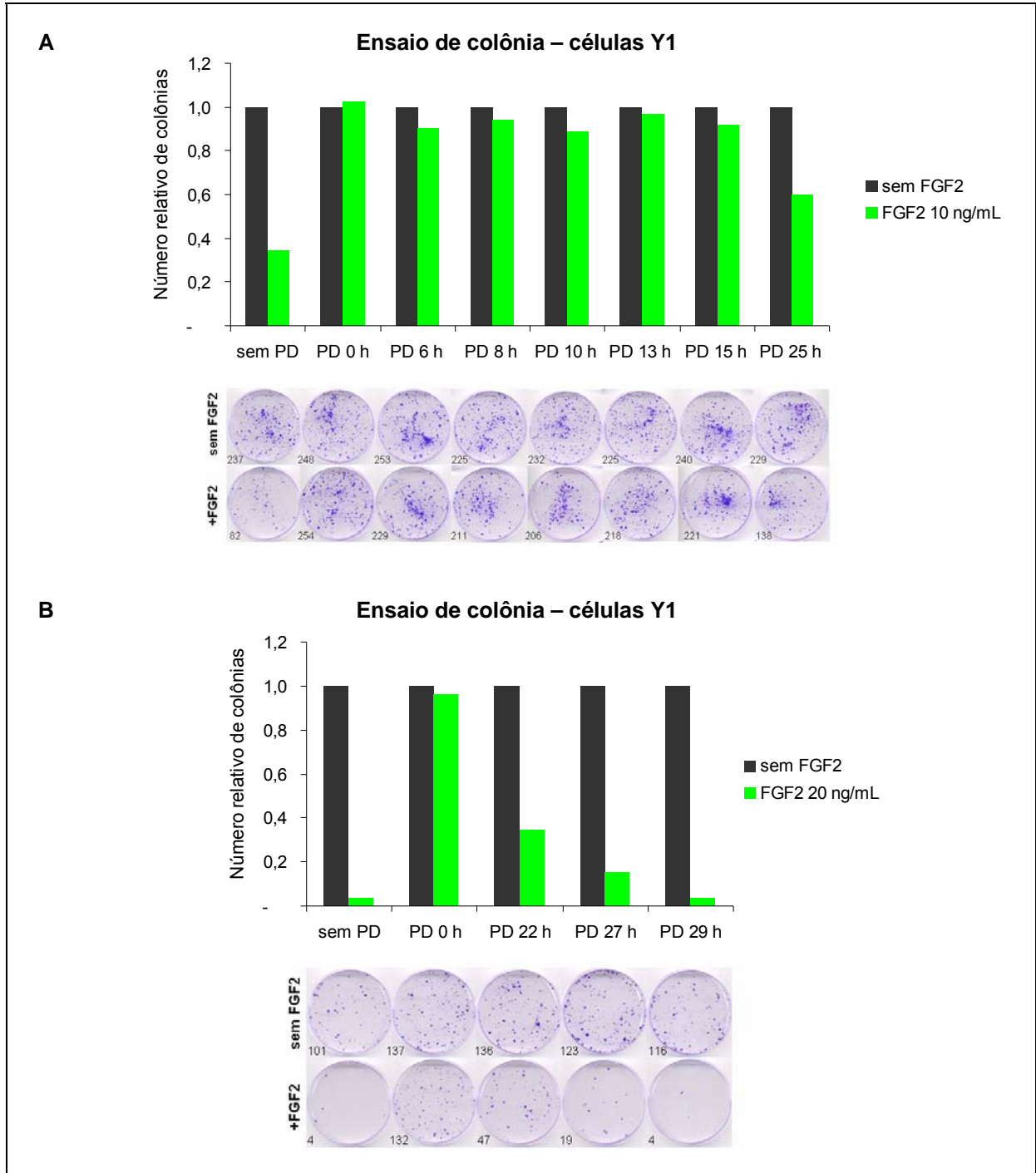


Figura 4.2| Ensaio de colônias de células Y1, na presença de PD173074 150 nM (PD) adicionado após o FGF2. Foram plaqueadas 50 a 100 células/cm² e a cultura foi mantida por 14 dias. **A|** PD173074 foi adicionado juntamente (0 h) ou 6-25 h após o FGF2 e o meio de cultura foi renovado após 48 h. **B|** PD173074 foi adicionado juntamente (0 h) ou 22-29 h após o FGF2. O meio de cultura foi renovado após 72 h.

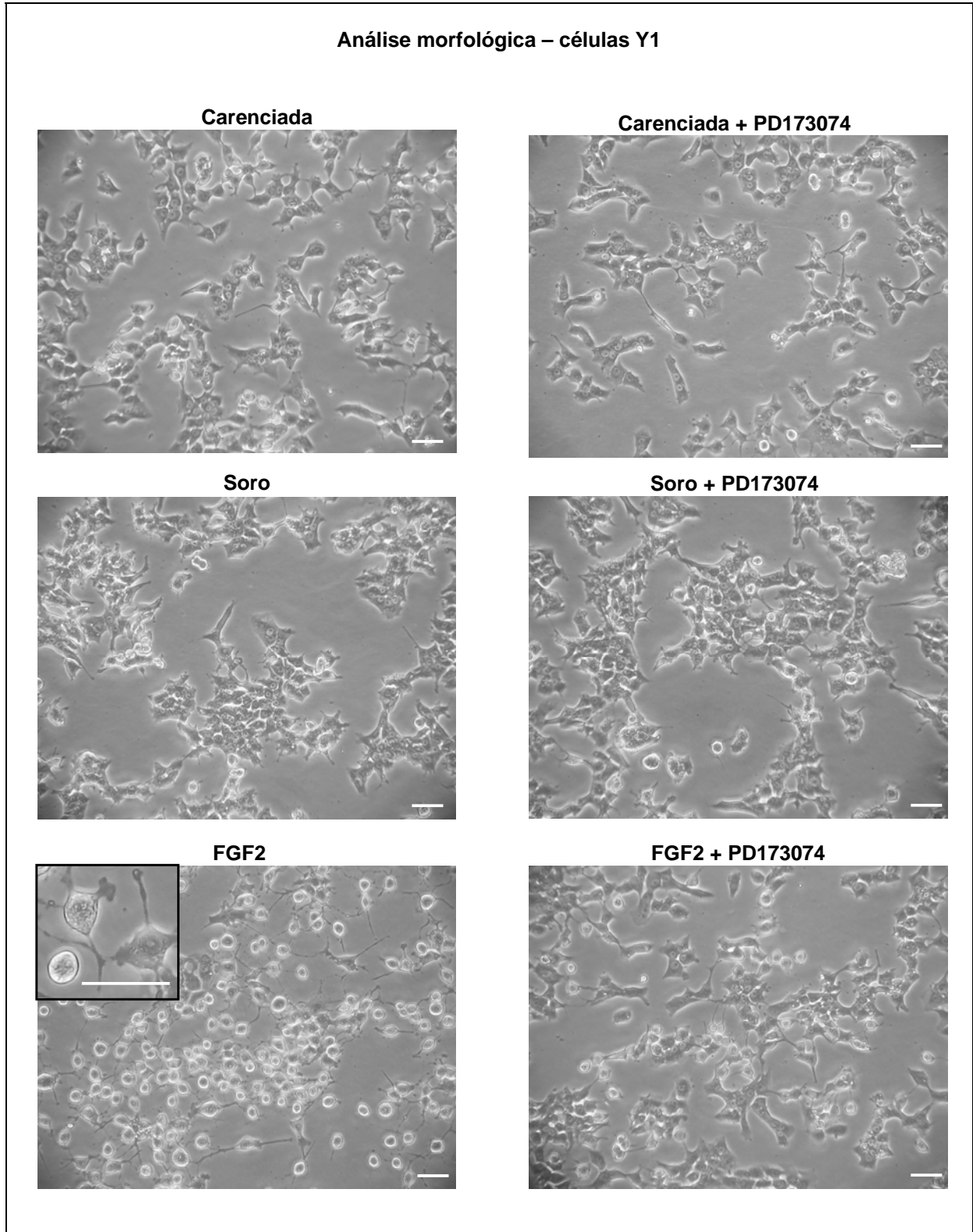


Figura 4.3| Microfotografias para análise morfológica de células Y1 sob estímulo de soro (10%) ou FGF2 (10 ng/mL) por 48 h, na presença, quando indicada, de PD173074 (150 nM). Barra de escala das fotos = 50 μ m.

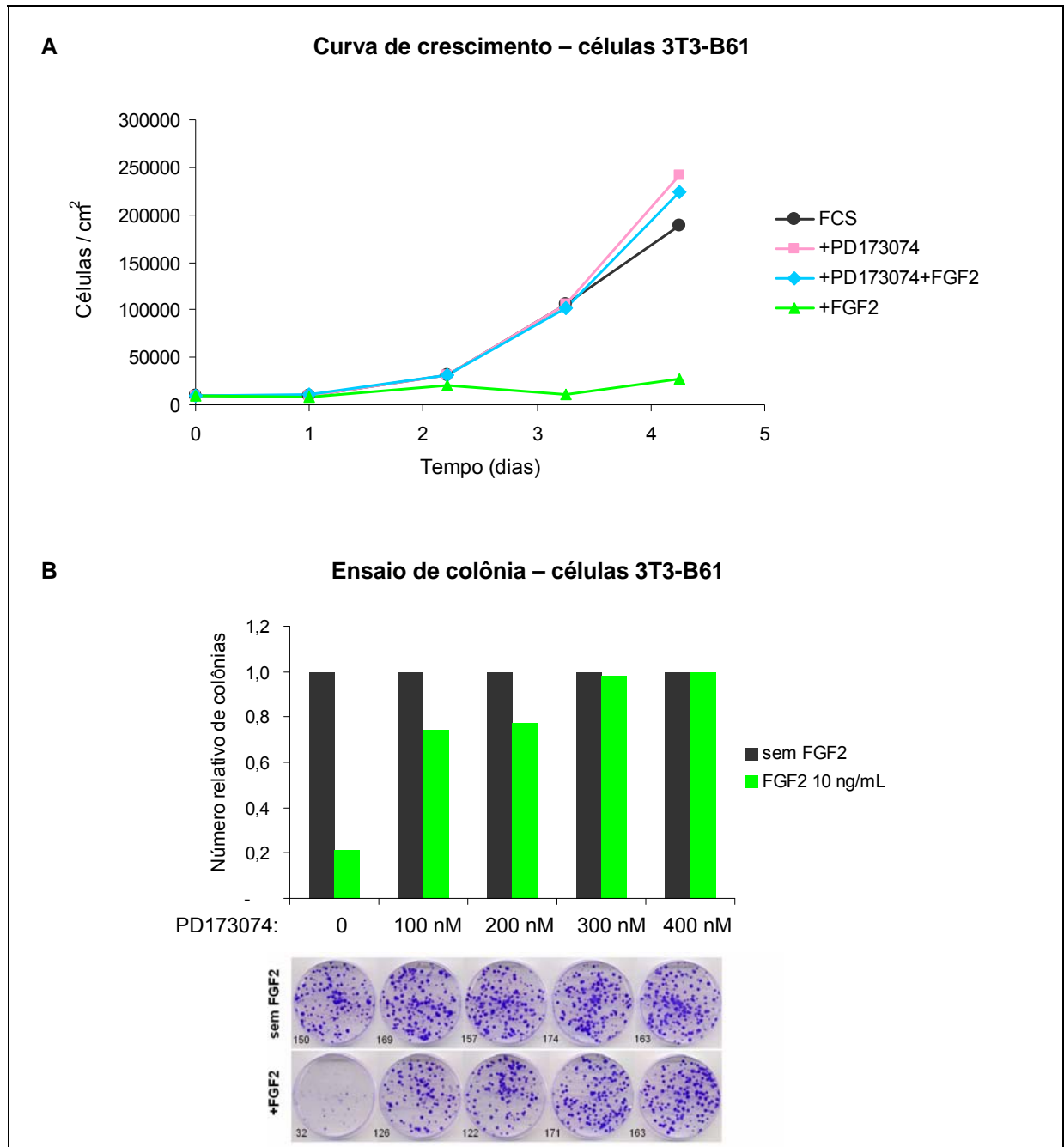


Figura 4.4| A| Curva de crescimento de células 3T3-B61, na presença de soro em todas as condições, sob tratamentos de FGF2 10 ng/mL e/ou PD173074 300 nM, adicionado 5 min antes do FGF2. Foram plaqueadas 10^4 células/cm². **B|** Curva de dose de PD173074 em ensaio de formação de colônias com FGF2 10 ng/mL, mantido por 24 h. O número de colônias por placa está indicado na porção esquerda inferior de cada placa. Foram plaqueadas 25 células/cm² e mantidas em cultura por 10 dias.

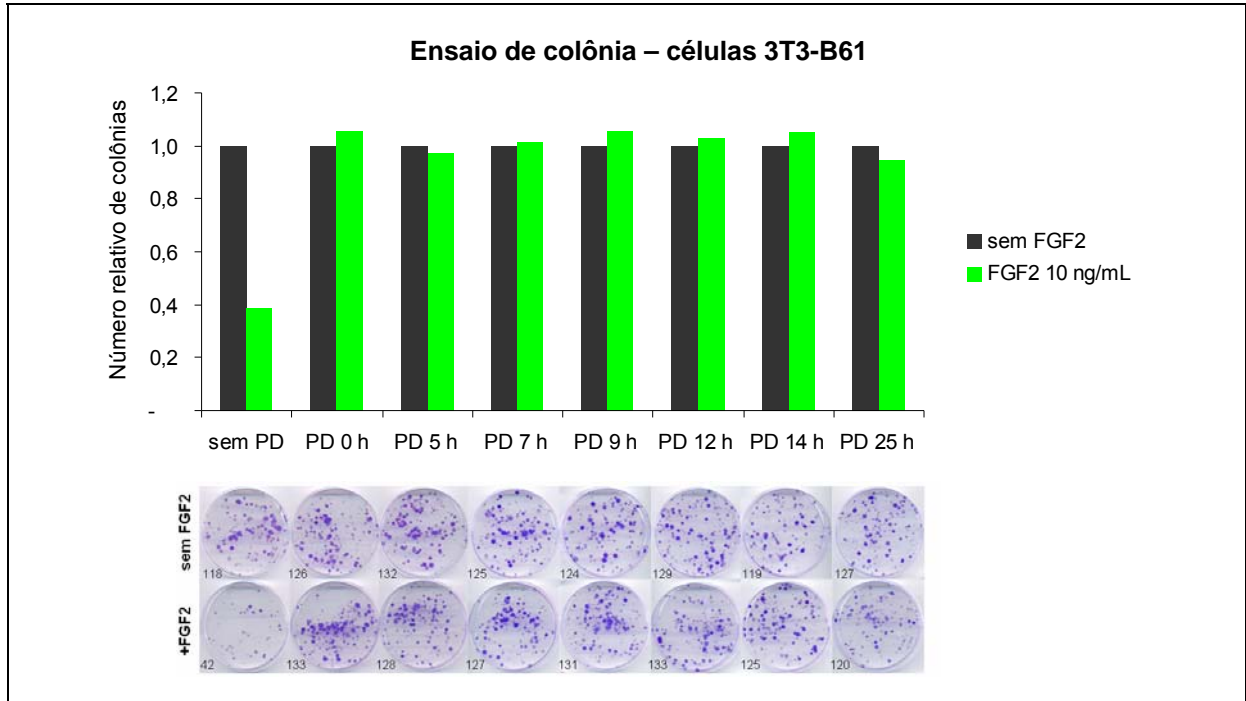


Figura 4.5| Ensaio de colônias na presença de PD173074 300 nM adicionado juntamente (0 h) ou 5 a 25 h após o FGF2 em células 3T3-B61. Foram plaqueadas 35 células/cm² e o meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 10 dias.

O fato de o inibidor PD173074 ter atividade, até um dia após a adição de FGF2, sugere que o efeito citotóxico de FGF2 pode envolver múltiplos efeitos negativos ao longo do ciclo celular. Análises da progressão das células no ciclo celular, através de citometria de fluxo e da velocidade de síntese de DNA estimada por tomada de ³H-timidina, esclarecem esta questão, como mostram os resultados da seção 4.3 e 4.4.

4.2 As células malignas dependentes de Ras permanecem íntegras e metabolicamente ativas na presença de FGF2.

Antes de analisar a progressão do ciclo celular, foi importante demonstrar que as células permanecem íntegras e com taxa metabólica normal na presença de FGF2.

Neste trabalho, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de MTS (CellTiter 96® AQueous) e a integridade de membrana pelo ensaio CytoTox-One™ em células Y1 crescendo exponencialmente. Primeiramente, foi realizada uma curva de padronização de número de células (figura 4.6A). Na presença de diferentes concentrações de FGF2 por 24 h, as células encontram-se metabolicamente ativas (figura 4.6B) e mantêm a integridade de membrana (figura 4.6C). Estes dados demonstram que a ação inibitória de FGF2 não envolve um efeito tóxico drástico que rapidamente dispara uma morte celular apoptótica ou necrótica, concordando com resultados do nosso laboratório já publicados, que mostram que FGF2 não causa apoptose ou necrose em células Y1, mas provoca uma forma de senescência celular (Costa *et al.*, 2008).

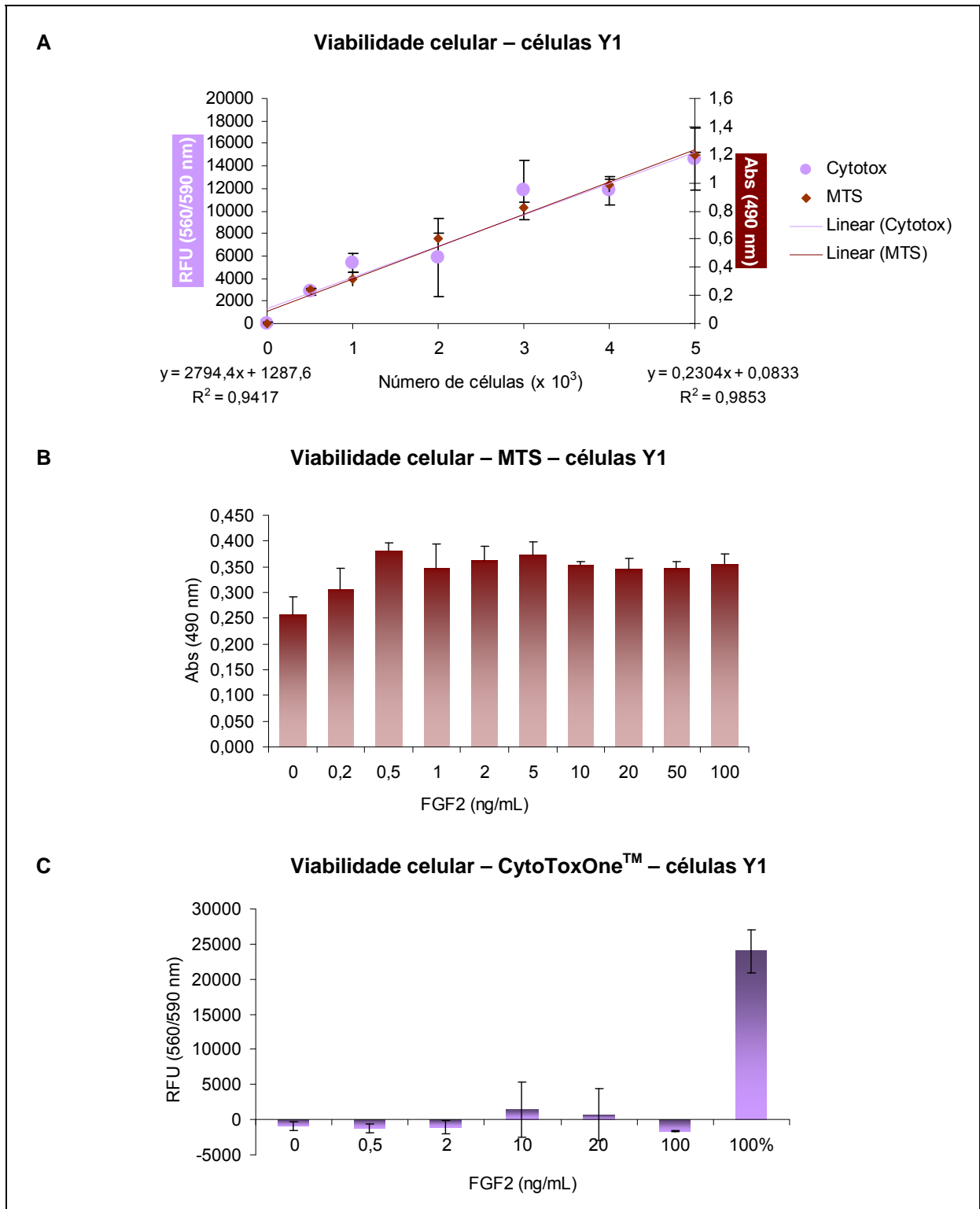


Figura 4.6| A| Efeito do número de células na análise da viabilidade de células Y1 no ensaio MTS (marrom, leitura da absorbância a 490 nm) e CytoTox-One™ (lilás, refere-se a 100% de lise celular, unidades relativas de fluorescência, excitação a 560 nm e emissão a 590 nm). Cada ponto representa a média e desvio padrão de 4 réplicas. **B|** Ensaio MTS (CellTiter 96® AQueous). **C|** Ensaio CytoTox-One™. O controle refere-se a 100% de lise celular. Cada ponto representa a média e desvio-padrão de 4 réplicas.

4.3 FGF2 mostra atividade mitogênica por mecanismos mediados pelas Tyr-quinases dos receptores FGFRs.

Para analisar os efeitos de FGF2 na progressão das células através do ciclo celular, as células foram sincronizadas em G0/G1 e induzidas, pela ação do soro ou FGF2, a percorrer $G0/G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M$. A progressão no ciclo celular foi acompanhada por citometria de fluxo e incorporação de BrdU em DNA.

Após sincronização das células em G0/G1 por 48 h na ausência de soro, as células foram estimuladas com soro ou FGF2 por 48 h (figura 4.7). O controle mostra que as células carenciadas não ficaram totalmente quiescentes e parte delas ciclou uma vez. Sob estímulo de soro, todas as células ciclaram uma vez, mantendo-se em G0/G1 ou iniciando um novo ciclo. Sob estímulo de FGF2, uma parte majoritária das células passou pela transição $G1 \rightarrow S$, mas ficou bloqueada nas fases S e G2/M. O inibidor do receptor (PD173074), adicionado juntamente com os estímulos, aboliu o efeito mitogênico de FGF2, mas não o efeito mitogênico do soro (figura 4.7).

Num experimento de 12, 24, 36, 48 e 60 h na presença de soro ou FGF2 (figura 4.8), 75-80% das células carenciadas mantêm-se em G0/G1, enquanto que a maioria das células estimuladas por soro entra na fase S já nas primeiras 12 h após o estímulo e, posteriormente, atravessam as fases seguintes e dividem-se. Por outro lado, as células estimuladas por FGF2 entram parcialmente em S numa velocidade inferior à do soro e acumulam-se, tardiamente, em S e em G2/M (figura 4.8).

Novamente, a presença de inibidor do receptor (PD173074) aboliu o efeito mitogênico de FGF2, mas não o do soro (figura 4.8).

Desta forma, concluímos que: a) há vazamento importante na transição quiescência → proliferação, provavelmente devido à desregulação parcial do ciclo celular das células Y1; b) FGF2 mostra grande estimulação da transição G1 → S, mas não leva à citocinese; c) os resultados sugerem que FGF2 bloqueia o ciclo celular maligno dependente de Ras oncogênico em duas etapas: na fase S e na transição G2/M.

Portanto, o FGF2 dispara duas ações antagônicas em células Y1 carenciadas e parcialmente quiescentes em G0/G1: a mitogênese clássica e um processo ainda desconhecido de bloqueio do ciclo celular. Para melhor analisar os efeitos de FGF2 na transição G0/G1 → S, desenhamos experimentos de tomada de ³H-timidina para medir velocidade de síntese de DNA, cujos resultados estão apresentados na próxima seção.

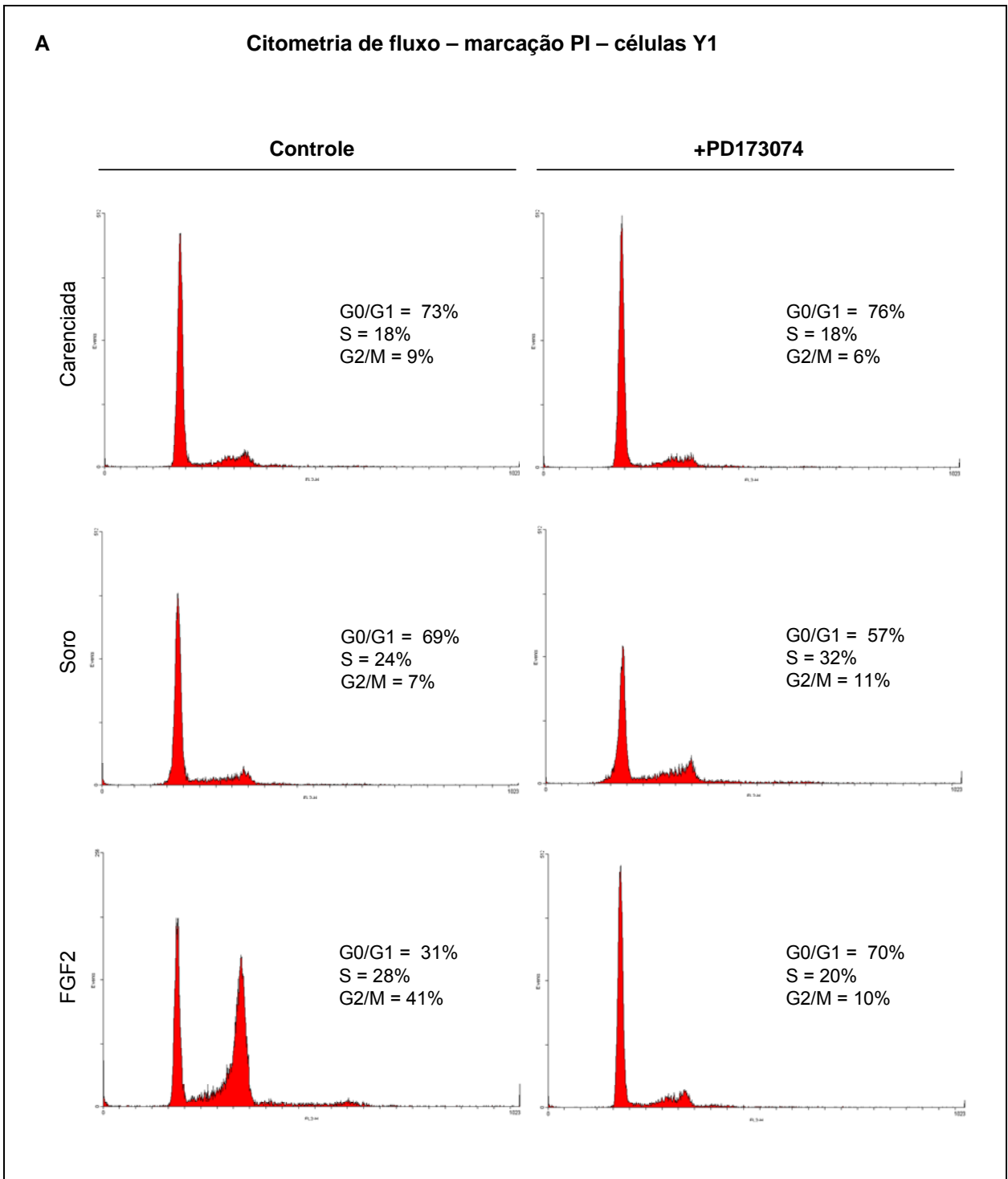


Figura 4.7 continua na próxima página.

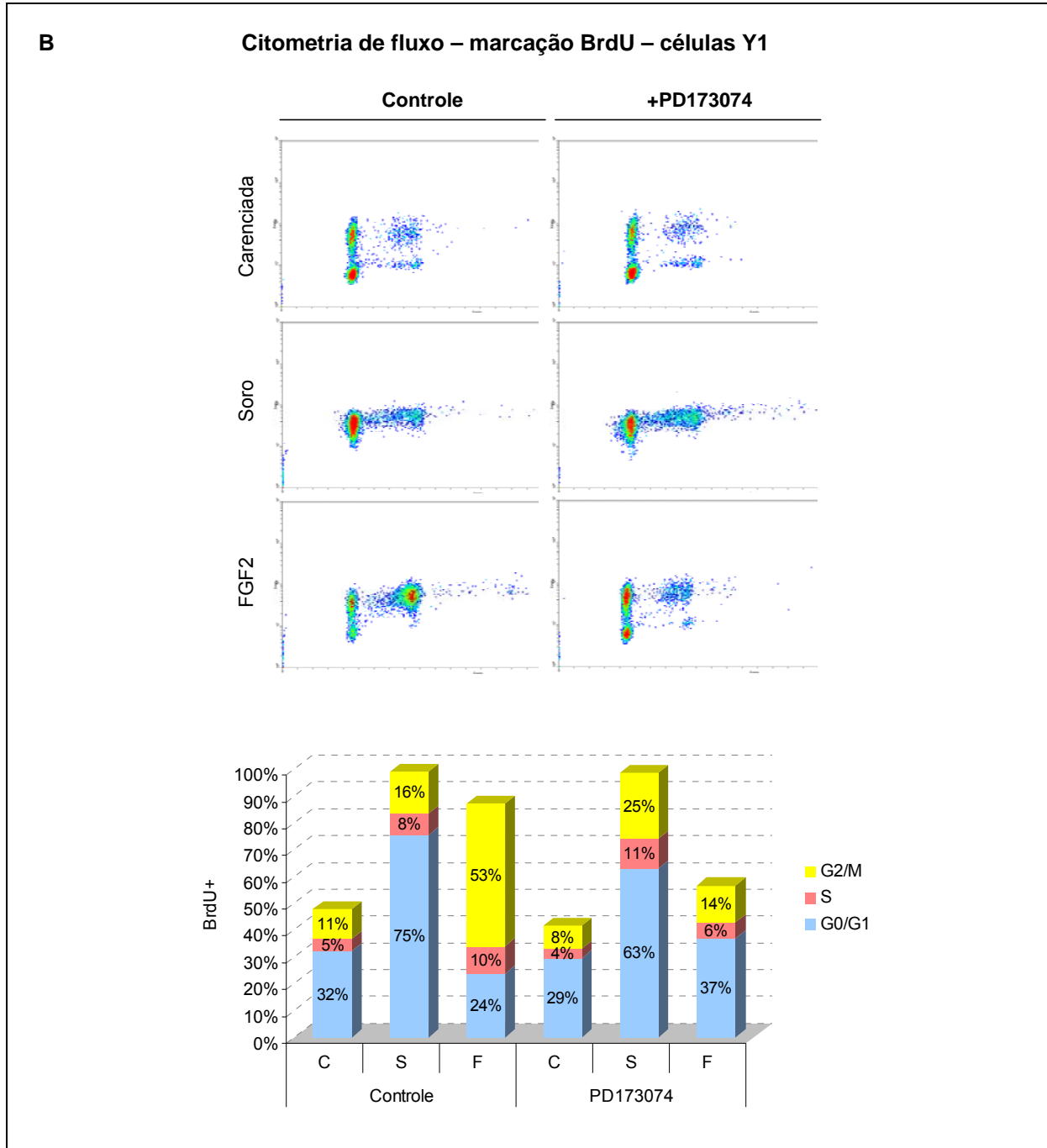


Figura 4.7| A| Análise do ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M) por citometria de fluxo de células Y1, sob estímulo de soro (10%) ou FGF2 (10 ng/mL) por 48 h, na presença, quando indicada, de PD173074 (150 nM). Os gráficos indicam o número de eventos no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio (conteúdo de DNA) no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada foi realizada pelo programa Cylchred. **B|** Incorporação de BrdU pelo mesmo período, nas mesmas condições anteriores. Os gráficos indicam: função logarítmica (base 10) da fluorescência de Alexa 488 (anticorpo anti-BrdU) no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada (positivas para BrdU) foi realizada pelo programa FlowJo. Todos os gráficos foram gerados pelo programa WinMDI 2.9. Foram analisadas 10000 células.

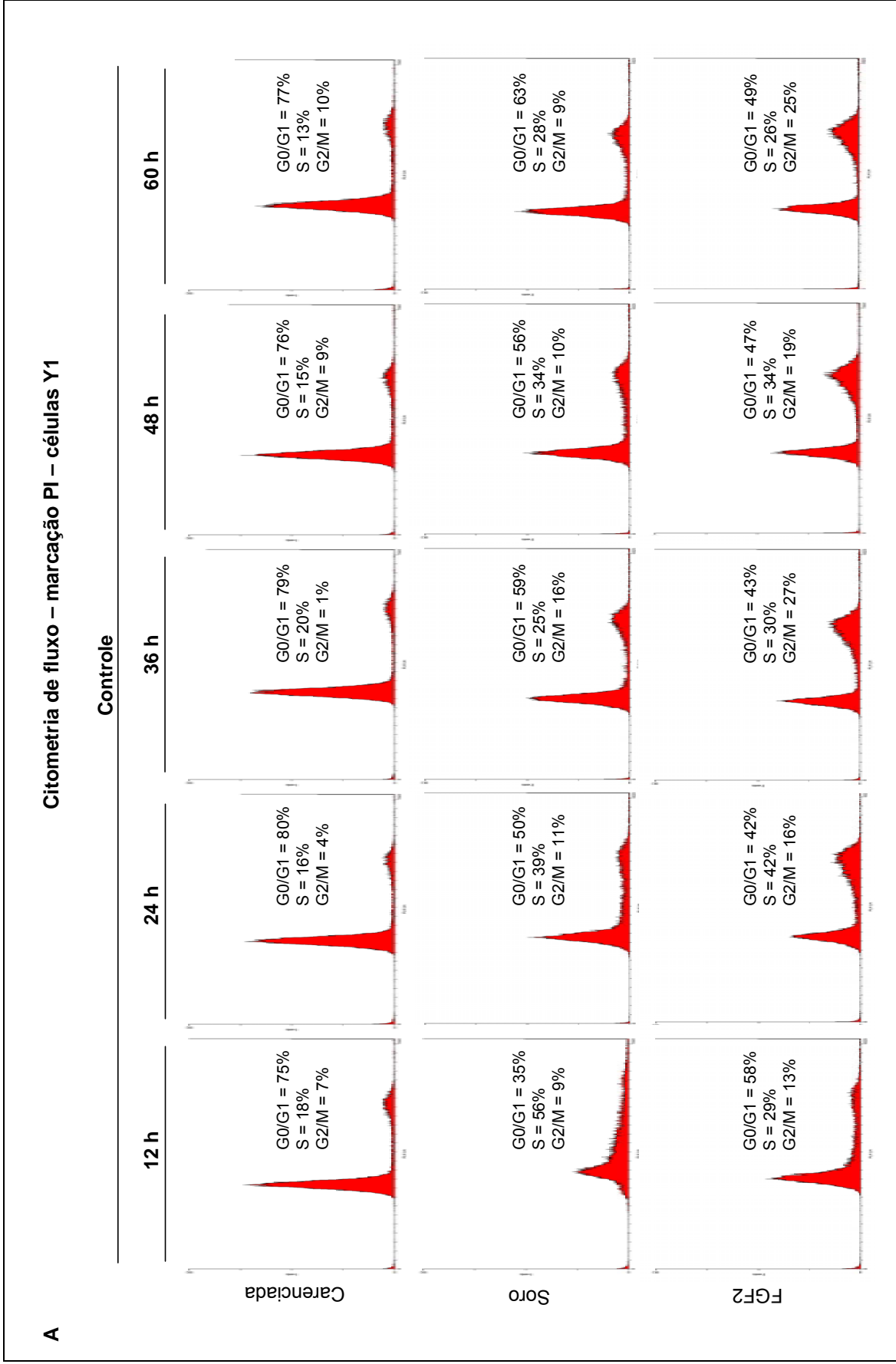


Figura 4.8 continua na próxima página.

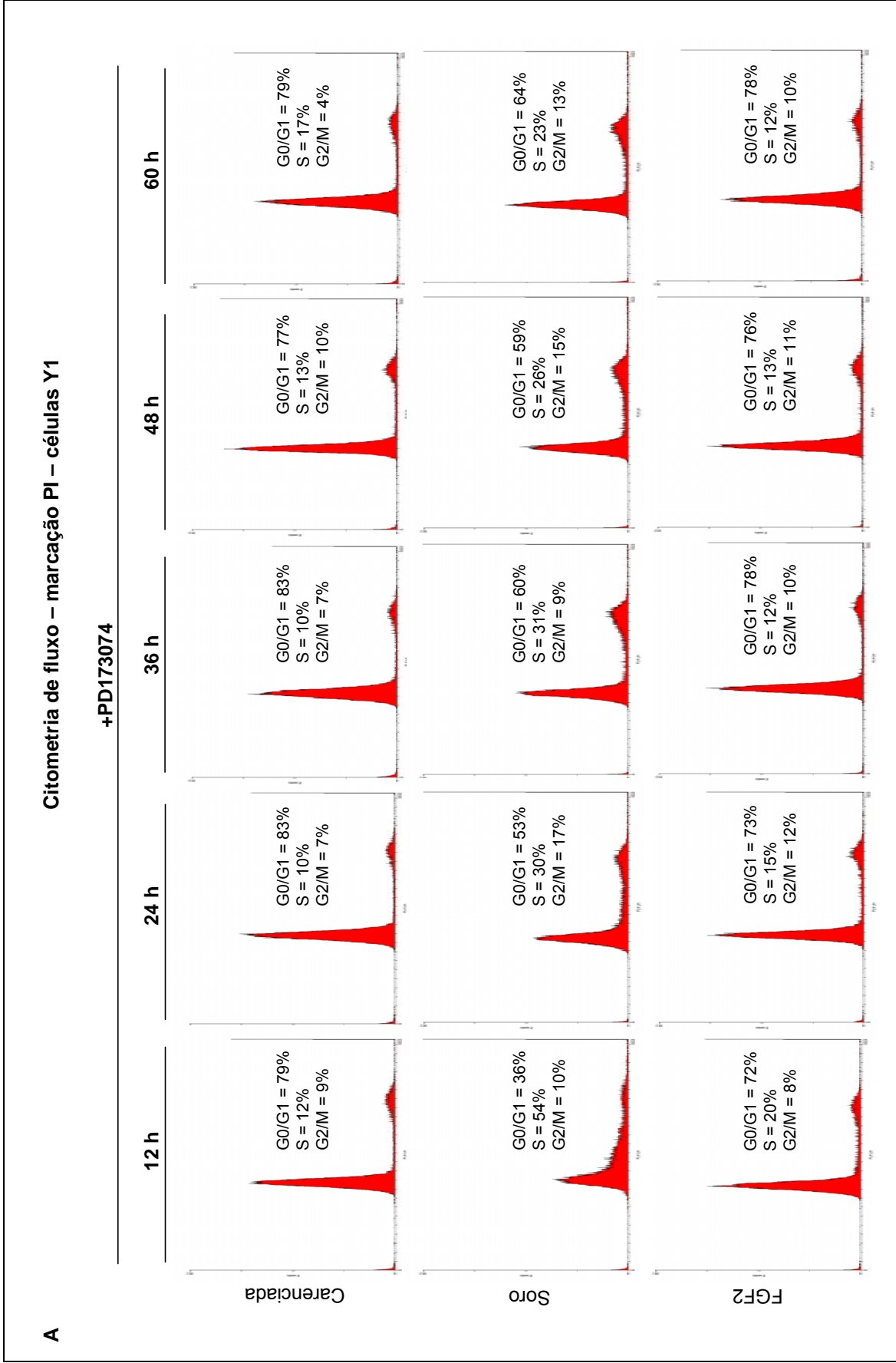


Figura 4.8 continua na próxima página.

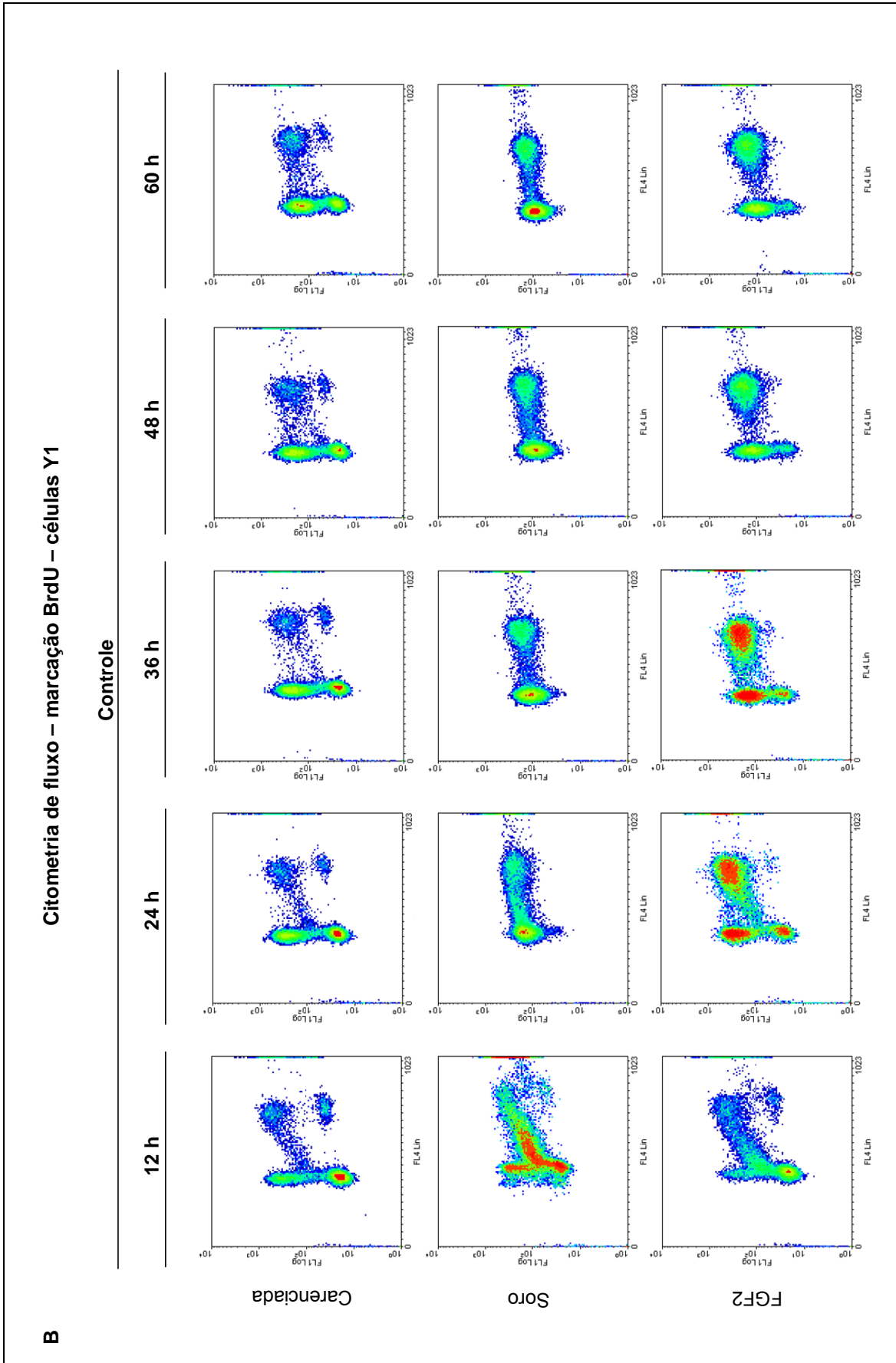


Figura 4.8 continua na próxima página.

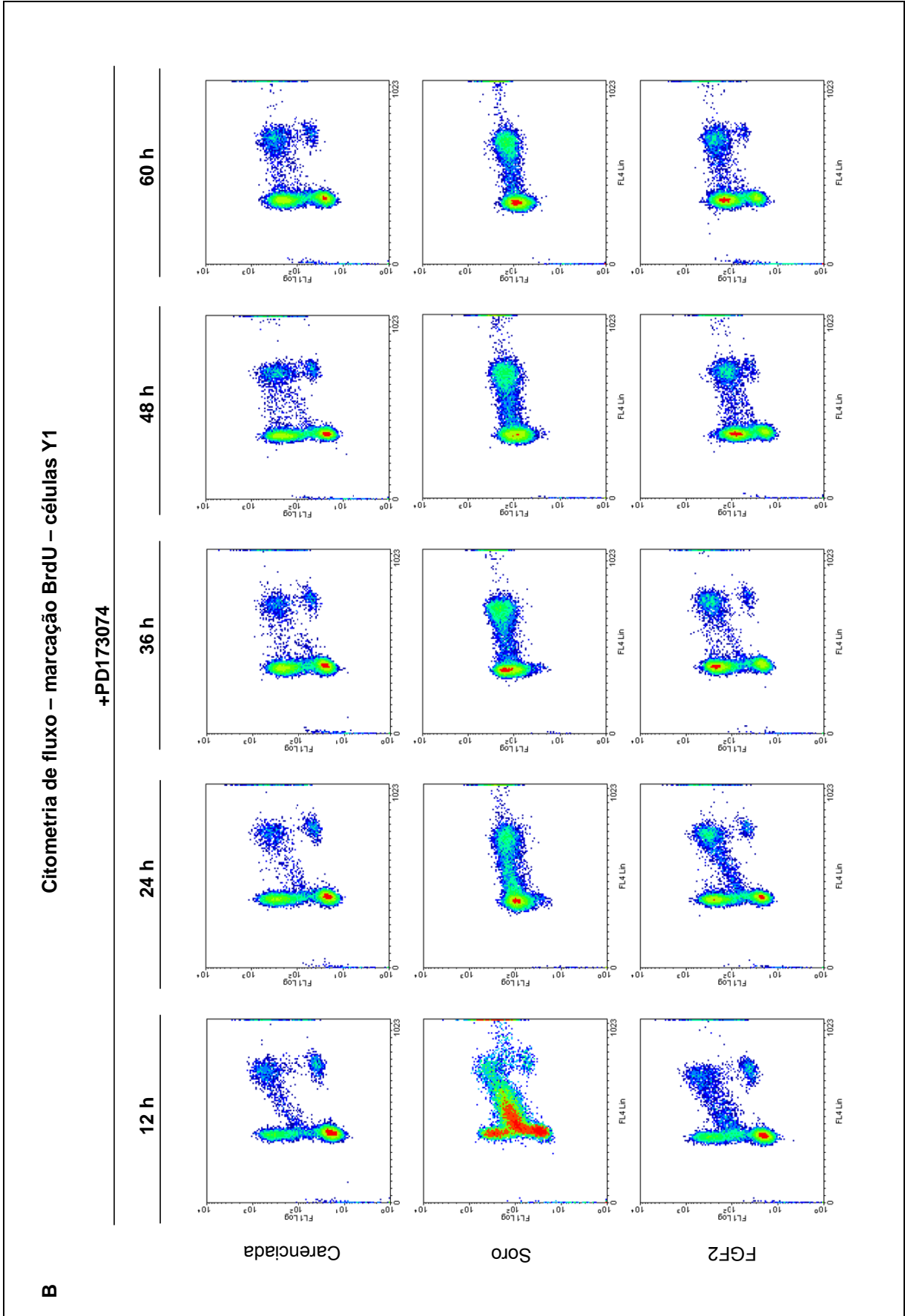


Figura 4.8 continua na próxima página.

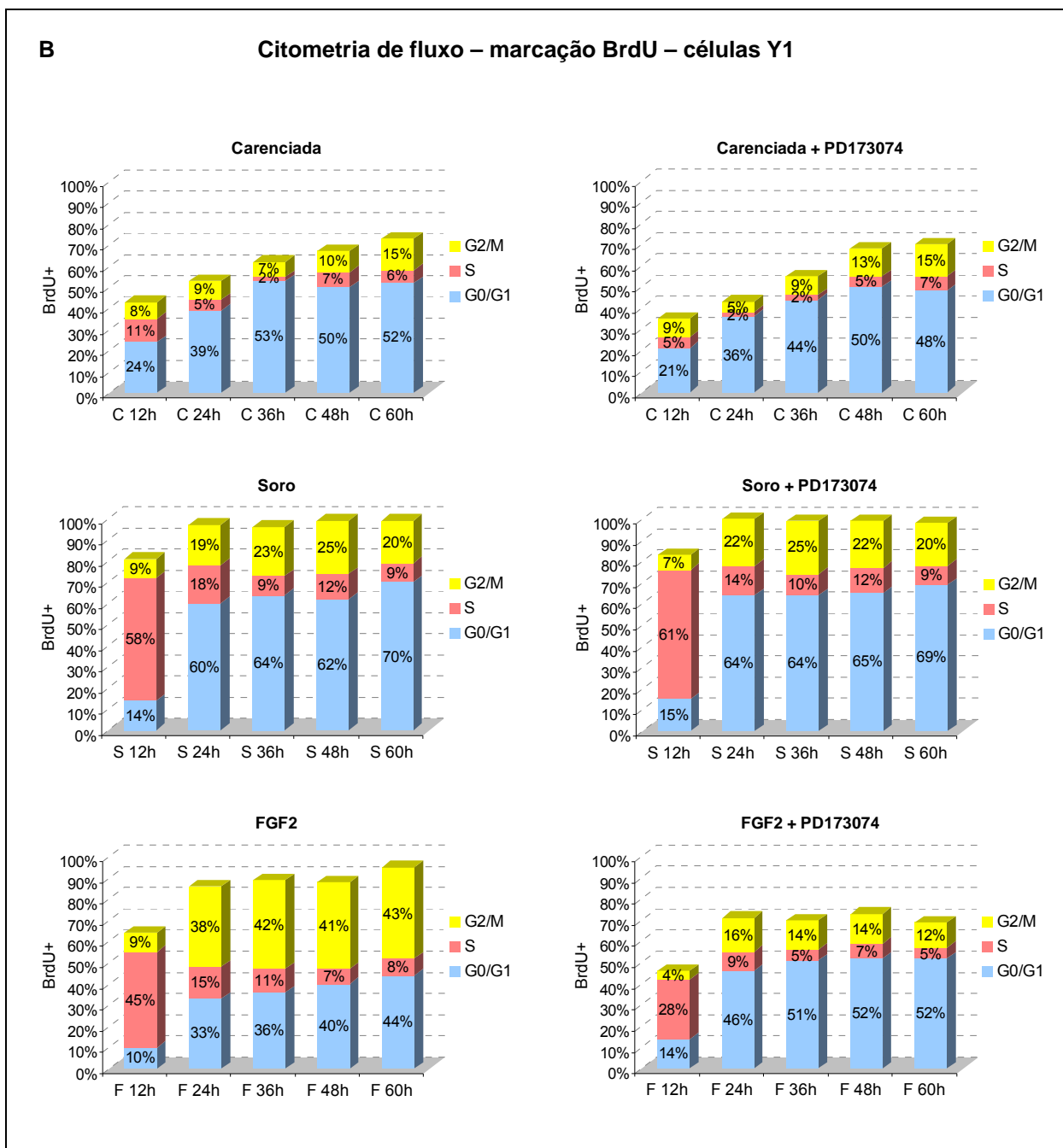


Figura 4.8| A| Análise do ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M) por citometria de fluxo de células Y1, sob estímulo de soro (10%) ou FGF2 (10 ng/mL) por 12 a 60 h, na presença, quando indicada, de PD173074 (150 nM). Os gráficos indicam o número de eventos no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio (conteúdo de DNA) no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada foi realizada pelo programa Cylchred. **B|** Incorporação de BrdU pelo mesmo período, nas mesmas condições anteriores. Os gráficos indicam: função logarítmica (base 10) da fluorescência de Alexa 488 (anticorpo anti-BrdU) no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada (positivas para BrdU) foi realizada pelo programa FlowJo. Todos os gráficos foram gerados pelo programa WinMDI 2.9. Foram analisadas 20000 células.

4.4 No início da fase G1, FGF2 dispara um processo antimitótico, mediado pelas Tyr-quinases dos receptores de FGF, que só tardiamente inibirá a síntese de DNA induzida por soro.

Células previamente sincronizadas em G0/G1 foram estimuladas com soro para entrar na fase S e a síntese de DNA foi estimada por incorporação de ³H-timidina 11 h depois. O FGF2 foi adicionado juntamente e após 4, 8 e 11 h do estímulo iniciado por soro (figura 4.9A). Este resultado mostra que após 8 h, o FGF2 não é mais capaz de inibir a síntese de DNA induzida por soro. Posteriormente, o ensaio foi realizado, expandindo-se o tempo de adição de FGF2, que foi juntamente ou 4, 5, 6, 7, 8 e 10 h após o soro (figura 4.9B). Estes resultados demonstraram que o período de 5 h é o tempo máximo para que o FGF2 ainda tenha efeito inibitório sob a velocidade de síntese de DNA induzida por soro, sugerindo que, neste período de 5 h, encontram-se as vias disparadas por FGF2 para o bloqueio da síntese de DNA induzida por soro.

Por outro lado, para verificar qual o tempo necessário para o inibidor PD173074 ainda ser capaz de impedir o efeito de FGF2 em ensaios de incorporação de ³H-timidina, o PD173074 foi adicionado até 10 h depois do estímulo soro/FGF2, e é possível observar que, após 2 h, há uma diminuição no efeito do inibidor de FGF2, sendo que após 6 h, não há mais efeito nenhum sob o FGF2, demonstrando que, somente quando adicionado juntamente com soro+FGF2, o inibidor PD173074 protege completamente as células do FGF2 (figura 4.10).

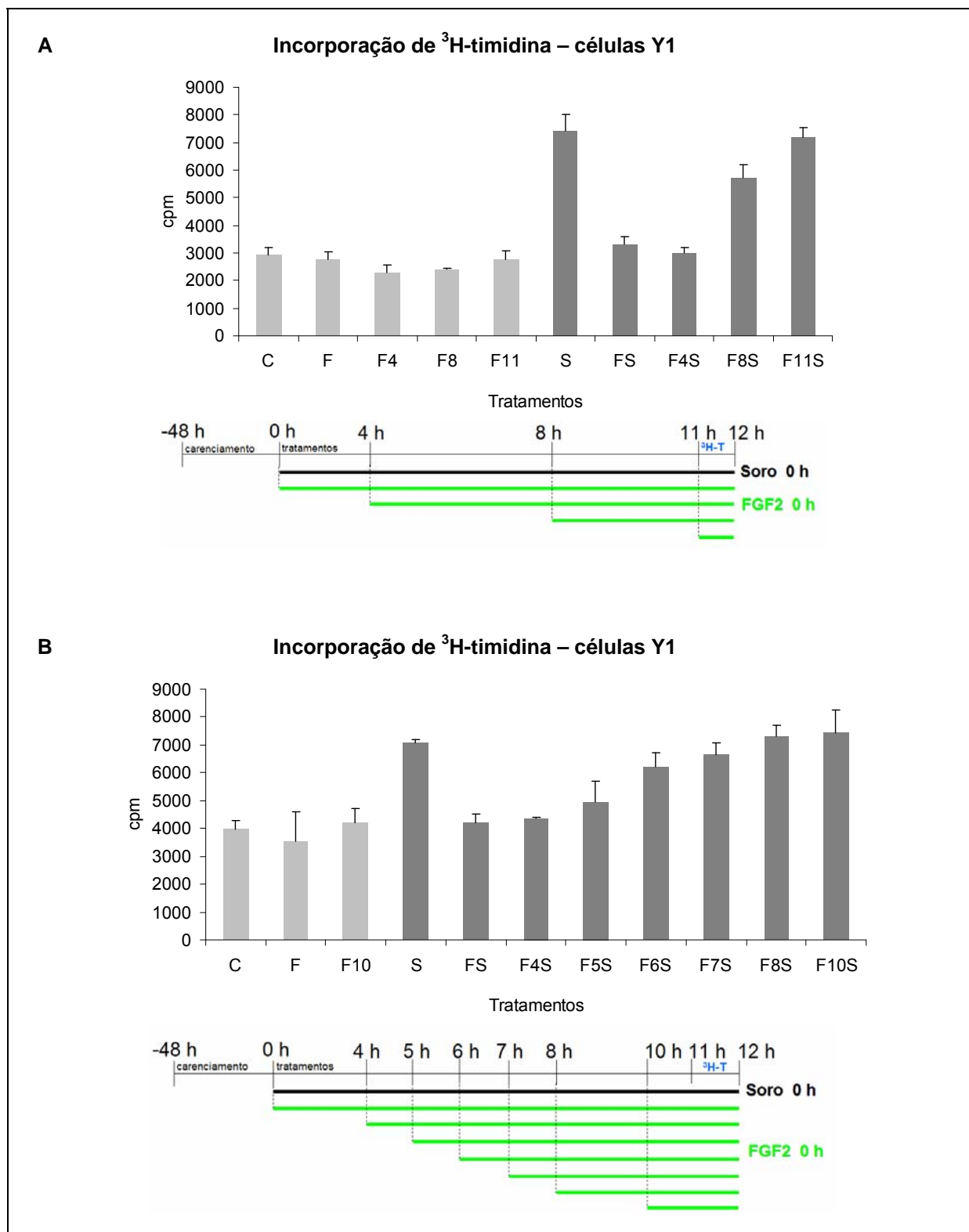


Figura 4.9 Incorporação de timidina tritiada (^3H -T, em azul), pulso de 1 h, em células Y1 estimuladas com soro 10% (S) e/ou FGF2 10 ng/mL (F) após sincronização por retirada de soro por 48 h (C). **A**) Soro foi adicionado no tempo 0 h e FGF2 foi adicionado junto ou após 4, 8 e 11 h de estímulo com soro. **B**) Soro foi adicionado no tempo 0 h e FGF2 foi adicionado junto ou após 4, 5, 6, 7, 8 e 10 h de estímulo com soro.

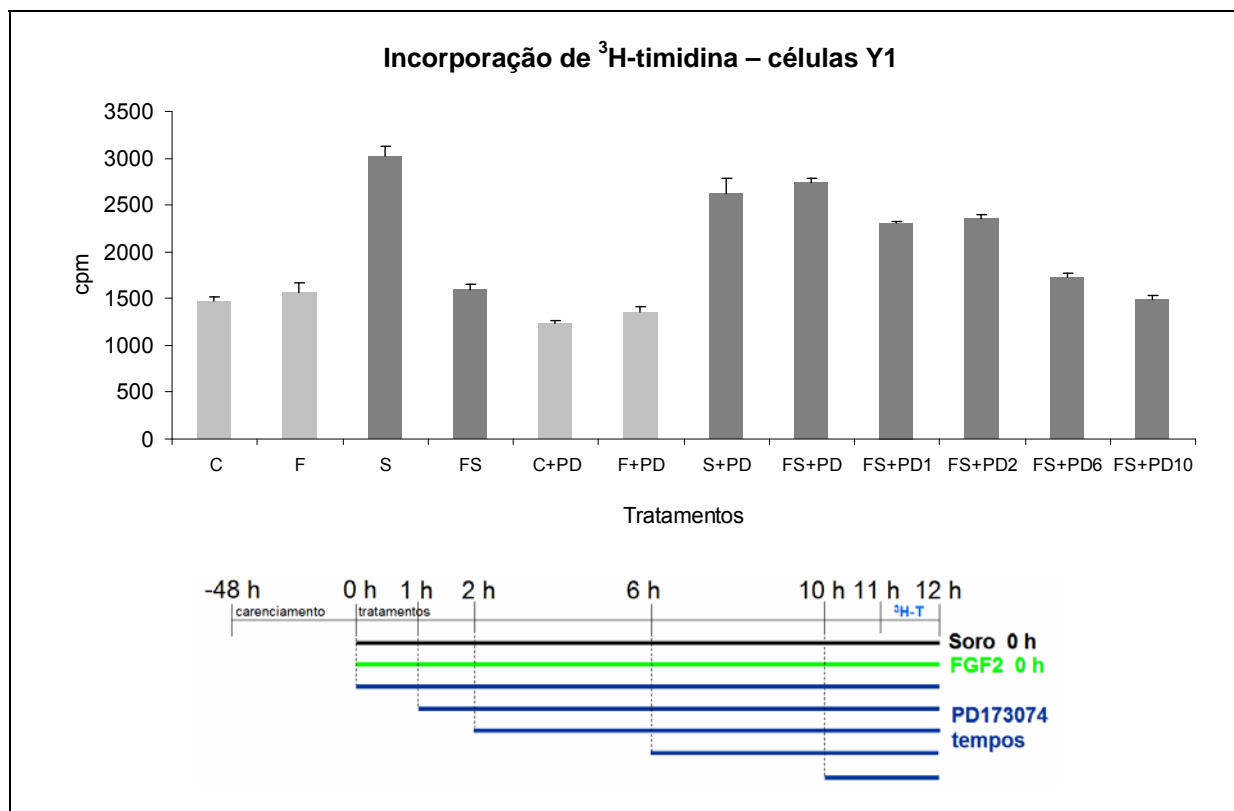


Figura 4.10 | Incorporação de timidina tritiada (^3H -T, em azul), pulso de 1 h, em células Y1 estimuladas com soro 10% (S) e/ou FGF2 10 ng/mL (F), após sincronização por retirada de soro por 48 h (C), na presença ou ausência de PD173974 150 nM (PD), adicionado em determinados tempos, juntamente ou após os tratamentos.

É importante observar que o basal de incorporação de ^3H -timidina é alto, mesmo na condição das células sem nenhum estímulo (carenciadas), coerente com os dados de citometria de fluxo (item 4.3), que indicaram quiescência parcial entre as células-controle. Além disso, no mesmo período do estímulo de soro, não observamos indução da síntese de DNA por FGF2. Entretanto, FGF2 disparou um processo, mediado pelas Tyr-quinases dos receptores de FGF, que só tardiamente bloqueou a síntese de DNA induzida por soro.

4.5 A ativação de Src está envolvida no processo de citotoxicidade disparado por FGF2 em células Y1.

Como demonstrado nos itens anteriores, a atividade quinásica dos receptores de FGF media o processo de toxicidade iniciado por FGF2. Assim, buscamos investigar proteínas de vias, como Src, que são ativadas por receptores de FGFs.

As células Y1 possuem um basal alto de fosforilação de Src, mesmo em células sincronizadas em G0/G1 e não estimuladas com soro/FGF2 (figura 4.11). O inibidor PP2 de Src reduziu, parcialmente, fosfo-Src nas células carenciadas e estimuladas com FGF2, mas não impediu a fosforilação de Src induzida por soro.

Em ensaios de formação de colônia, os inibidores de Src (PP1 e PP2) protegeram, parcialmente, as células Y1 do FGF2 (figura 4.12A). Somente na presença do inibidor, o número de colônias aumentou em aproximadamente 20%, enquanto que, com FGF2, o número de colônias dobrou com PP1 e triplicou com PP2.

As microfotografias apresentadas, na figura 4.13, mostram que o inibidor de Src, do mesmo modo que em ensaios de colônia, ameniza o efeito morfológico estressante de FGF2 previamente observado nas células Y1.

Testamos também a atividade de Src nas células 3T3-B61. Verificamos que Src é importante para o crescimento destas células, já que o inibidor reduziu em, aproximadamente, 30% o número de colônias (figura 4.12B). Entretanto, na presença de FGF2, o número de colônias reduziu proporcionalmente. Portanto, diferentemente

das células Y1, o inibidor PP1, além de ser tóxico e inibir o crescimento, não protege as células 3T3-B61 da toxicidade do FGF2.

Para analisar os efeitos Src na progressão das células Y1 através do ciclo celular, as células foram sincronizadas em G0/G1 e induzidas a percorrer G0/G1 → S → G2 → M. A progressão no ciclo celular foi acompanhada por citometria de fluxo e incorporação de BrdU em DNA.

Na presença de PP2, as células foram estimuladas com soro ou FGF2, por 24 e 48 h. O inibidor de Src reduziu o basal de entrada em S das células-controle, diminuiu a progressão no ciclo induzida por soro e, também, reduziu o acúmulo em S e em G2/M causado por FGF2 (figura 4.14).

Ainda para analisarmos a atividade Src na progressão G0/G1 → S, utilizamos o inibidor PP2 em ensaios de síntese de DNA por incorporação de ³H-timidina, onde as células foram previamente sincronizadas em G0/G1 e estimuladas com soro para entrar na fase S. O inibidor de Src protege completamente as células Y1 do FGF2 (figura 4.15) e também reduz drasticamente o basal de síntese de DNA nas células-controle (figura 4.15).

A atividade de Src contribui para o vazamento no ciclo celular, como observado em ensaios de progressão no ciclo celular, analisados por citometria de fluxo e em ensaios de síntese de DNA, analisados por tomada de ³H-timidina. Além disso, podemos concluir que, Src participa, ao menos parcialmente, do efeito citotóxico de FGF2 em células Y1.

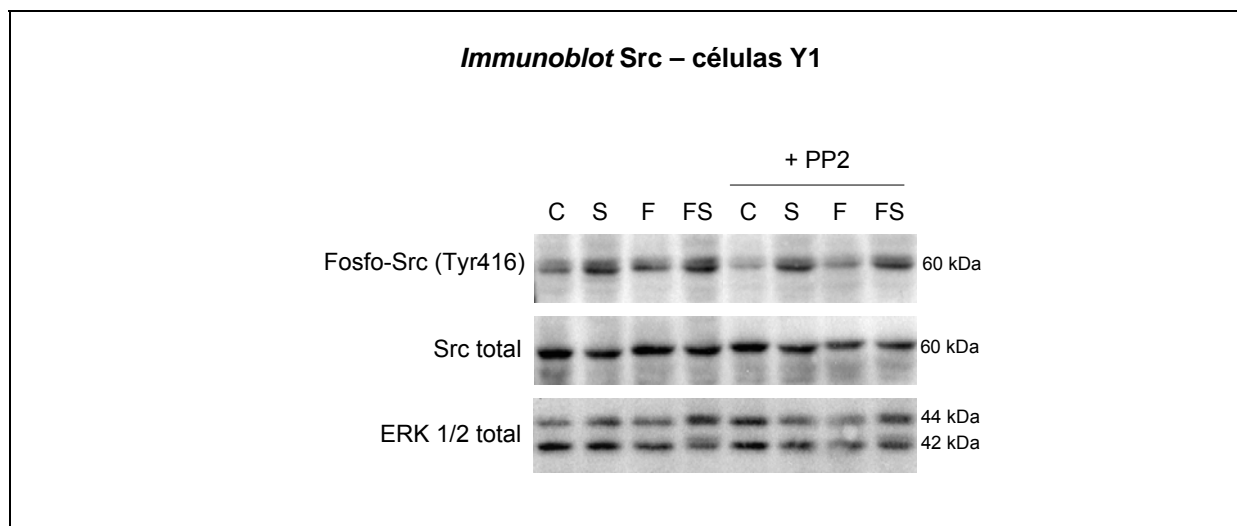


Figura 4.11| *Immunoblot* para fosfo-Src (Tyr416) e Src total, em células Y1, na presença do inibidor de Src adicionado 1 h antes do estímulo (PP2 10 μ M). As células foram estimuladas com soro 10% e/ou FGF2 10 ng/mL, por 2 h. Como controle, ERK 1/2 total.

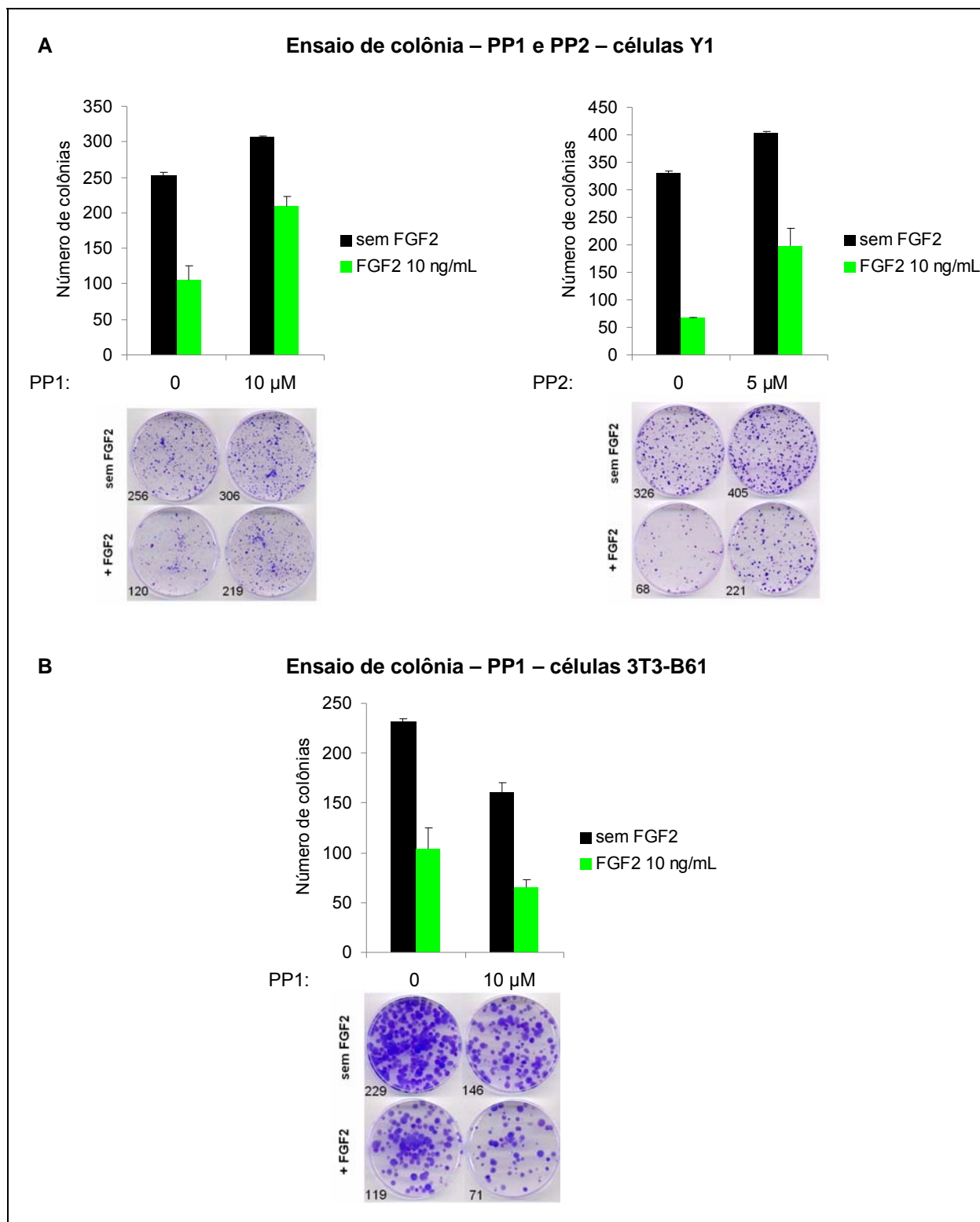


Figura 4.12| A| Ensaio de colônias em células Y1 com FGF2, na presença ou ausência de inibidores de Src (PP1 10 μ M e PP2 5 μ M), adicionados 30 min antes do FGF2. Foram plaqueadas 100 células/cm². Meio de cultura foi renovado após 24 h. **B|** Ensaio de colônias em células 3T3-B61 com FGF2, na presença ou ausência de inibidor de Src (PP1 10 μ M), adicionado 40 min antes do FGF2. Foram plaqueadas 35 células/cm². Meio de cultura foi renovado após 24 h.

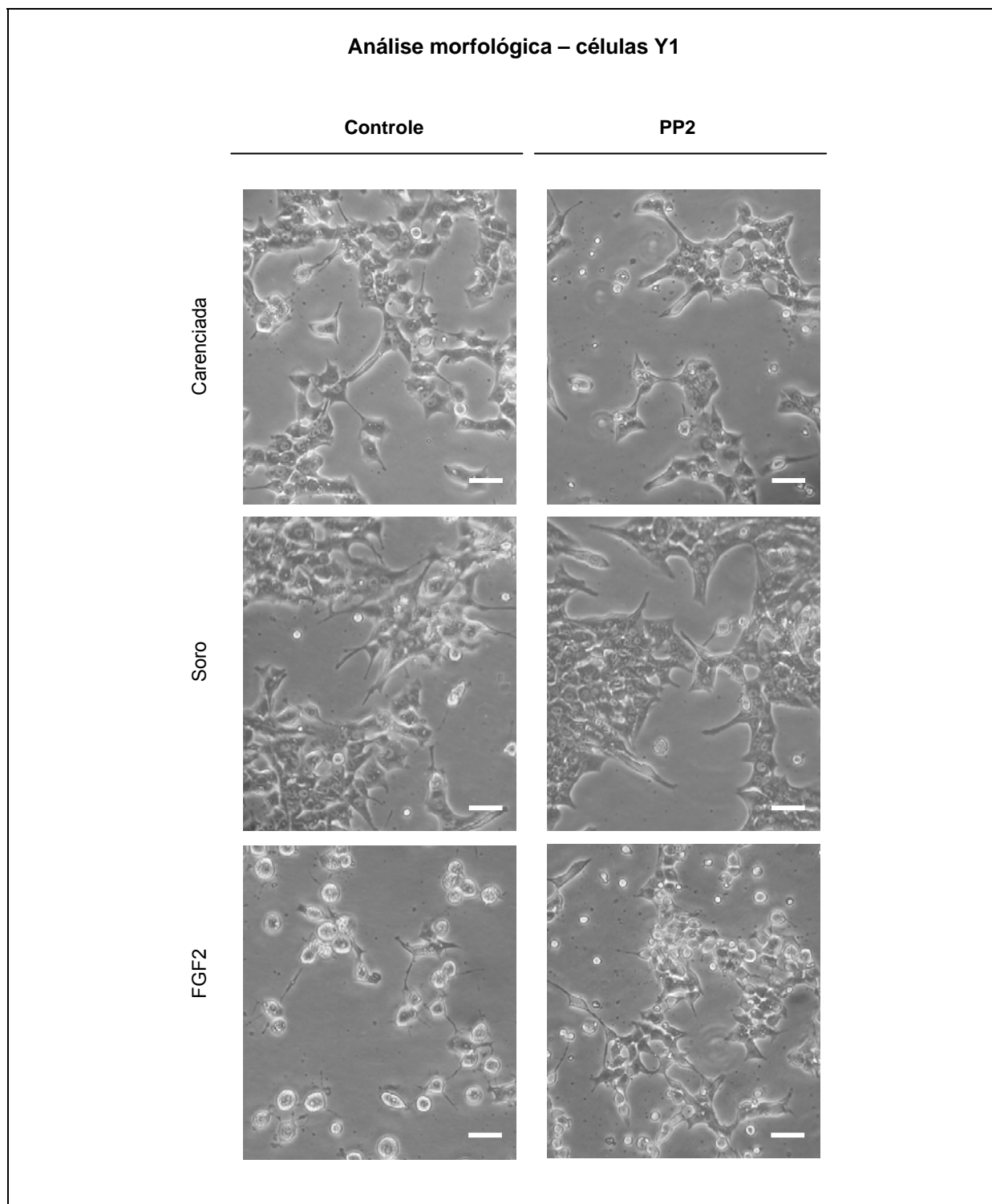


Figura 4.13| Microfotografias para análise morfológica de células Y1 sob estímulo de soro (10%) ou FGF2 (10 ng/mL) por 48 h, na presença, quando indicada, de PP2 (10 μ M). Barra de escala das fotos = 50 μ m.

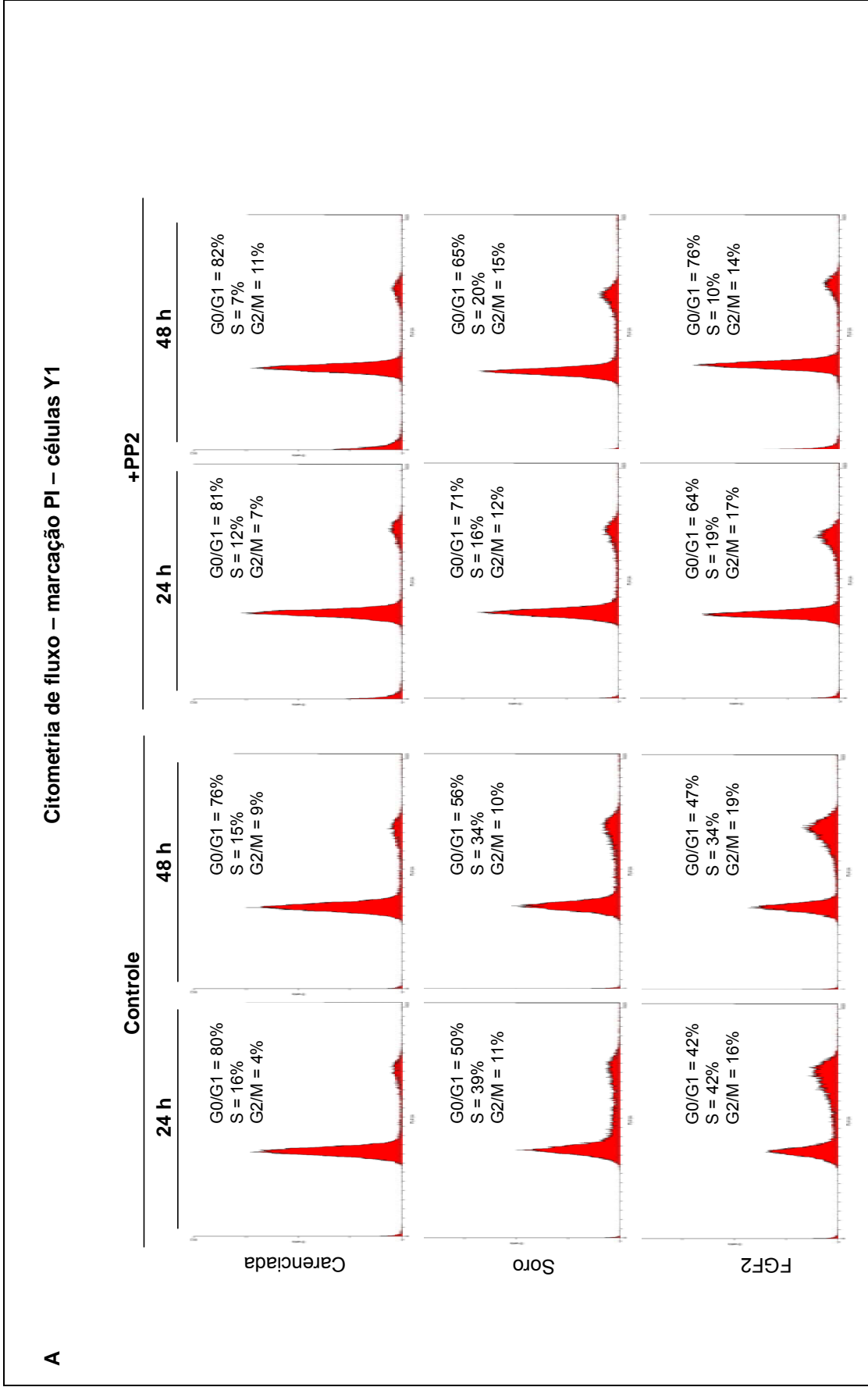


Figura 4.14 continua na próxima página.

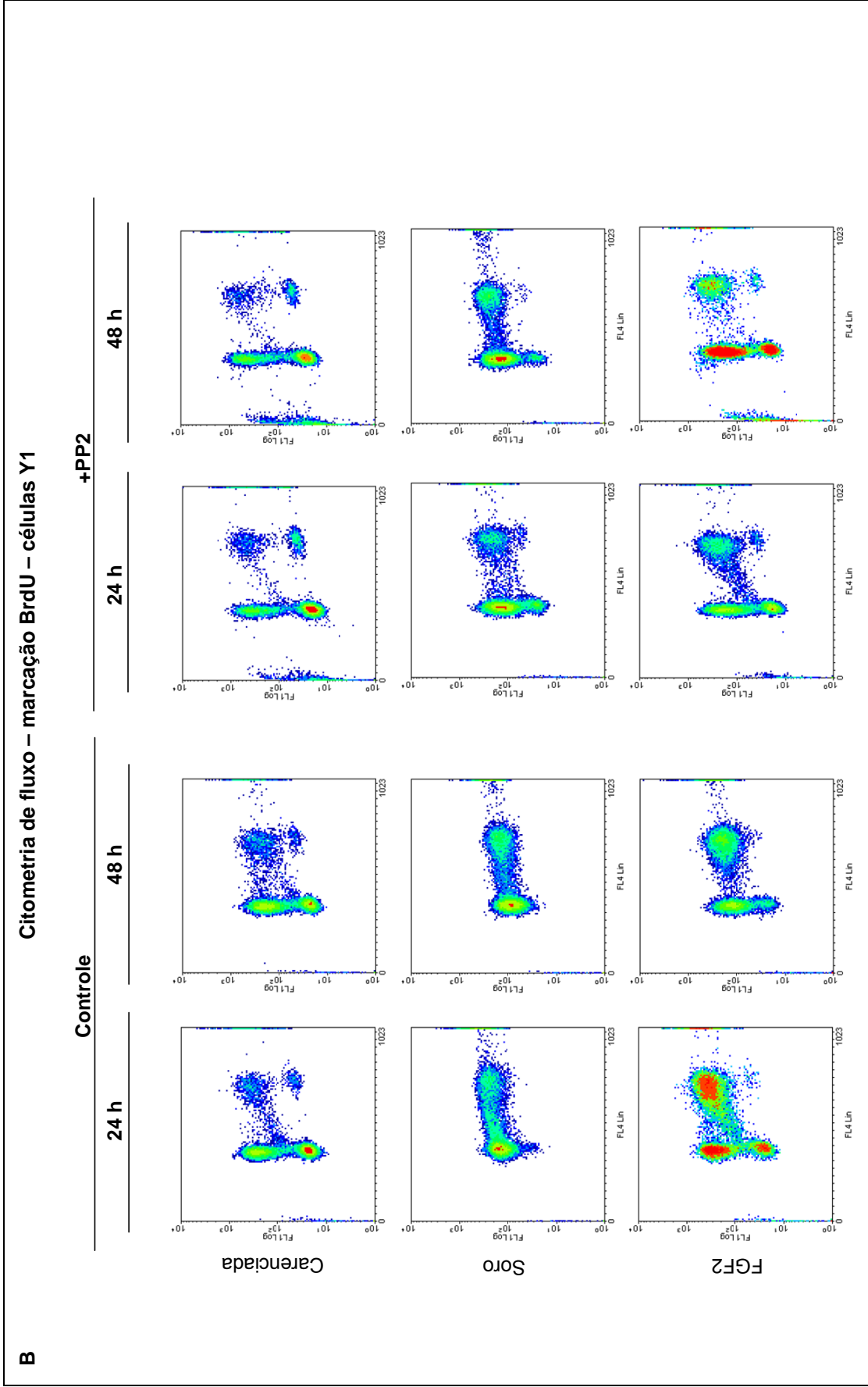


Figura 4.14 continua na próxima página.

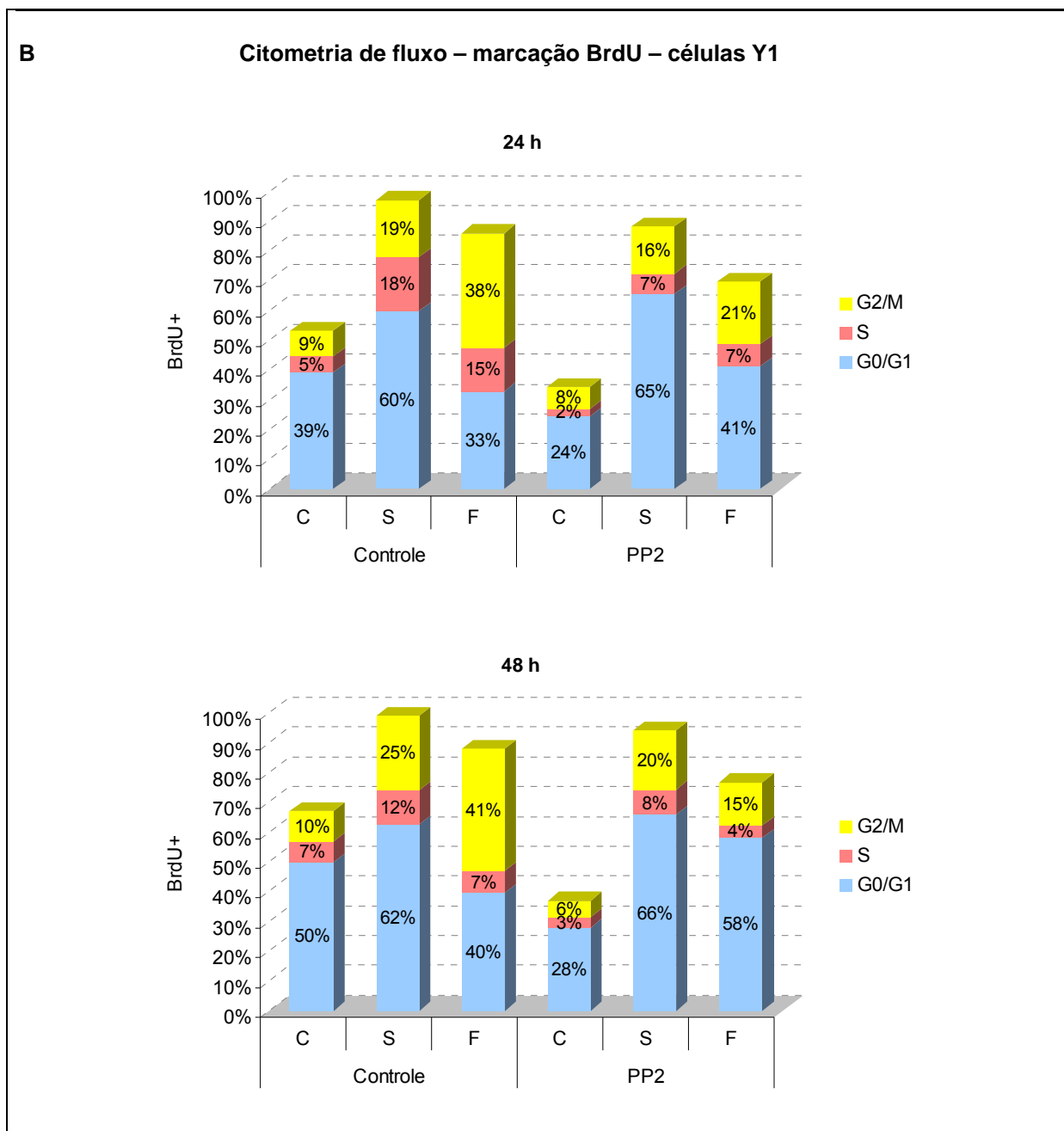


Figura 4.14| A| Análise do ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M) por citometria de fluxo de células Y1, sob estímulo de soro (10%) ou FGF2 (10 ng/mL) por 24 e 48 h, na presença, quando indicada, de PP2 (10 μ M). Os gráficos indicam o número de eventos no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio (conteúdo de DNA) no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada foi realizada pelo programa Cylchred. **B|** Incorporação de BrdU, pelo mesmo período, nas mesmas condições anteriores. Os gráficos indicam: função logarítmica (base 10) da fluorescência de Alexa 488 (anticorpo anti-BrdU) no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada (positivas para BrdU) foi realizada pelo programa FlowJo. Todos os gráficos foram gerados pelo programa WinMDI 2.9. Foram analisadas 20000 células.

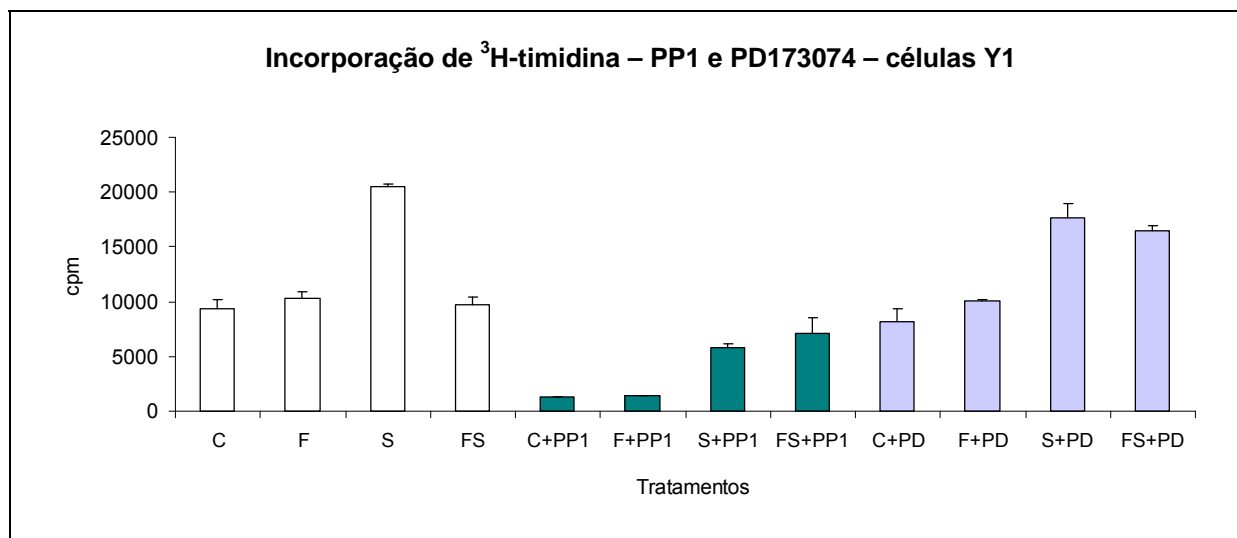


Figura 4.15] Incorporação de timidina tritiada, pulso de 1 h, em células Y1 estimuladas com soro 10% (S) e/ou FGF2 10 ng/mL (F), por 12 h, após careciamento (C). Os inibidores foram adicionados 1 h antes dos estímulos. **A]** Inibidor de Src, PP1 (15 μM), e de Tyr-quinases do FGFR, PD173074 (PD, 150 nM).

4.6 A ação citotóxica do FGF2 é independente das vias MEK/ERK, PI3K/AKT e PKC.

Como MEK/ERK, PI3K/AKT e PKC fazem parte das vias mitogênicas mais conhecidas à jusante das Tyr-quinases dos FGFRs, testamos o papel de cada uma delas através de seus inibidores específicos. A questão importante a responder é se as vias moleculares da ação mitogênica de FGF2 são independentes dos mecanismos antimitóticos de FGF2, ainda desconhecidos e focalizados nesta tese. Uma forma simples de abordar esta questão é saber se inibidores específicos dessas vias mitogênicas à jusante dos FGFRs protegem as células da ação tóxica de FGF2.

FGF2 e soro induzem a ativação de ERK 1/2. Assim, primeiramente, analisamos a eficiência de PD173074 (inibidor de FGFRs) na inibição da ativação de ERK 1/2 por FGF2. Como é longamente sabido, o FGF2 é capaz de ativar ERK 1/2 em células Y1 (figura 4.16A), em 3T3-B61 (figura 4.16B) e também nas células Balb 3T3 (figura 4.16C), modelo clássico de estímulo por FGF2 como mitógeno. Em todas as células testadas, na presença do inibidor PD173074, há inibição total da fosforilação de ERK 1/2 por FGF2, mas não por soro. Em seguida, testamos o envolvimento de Src na fosforilação de ERK 1/2. Na figura 4.17, podemos observar que o inibidor de Src não interferiu na ativação de ERK 1/2 induzida pelos estímulos de soro e/ou FGF2.

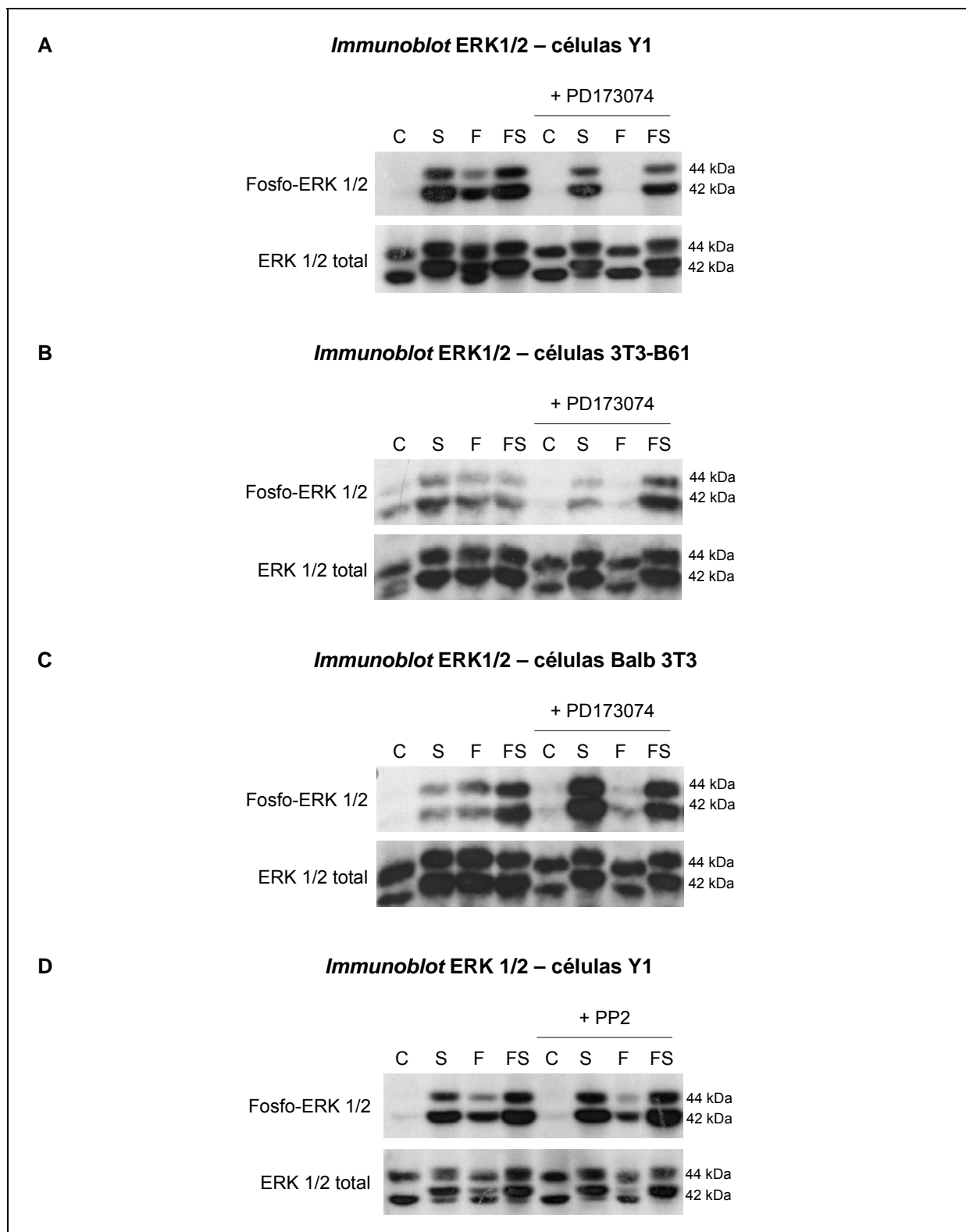


Figura 4.16| *Immunoblot* para ERK 1/2 fosforiladas (Thr202/Tyr204) e ERK 1/2 total para normalização. As células analisadas foram carenciadas para soro (C) e estimuladas com soro 10% (S) e/ou FGF2 10 ng/mL (F) por 5-15 min, na presença do inibidor PD173074 150 nM ou PP2 10 μ M, quando indicada. **A|** e **D|** células Y1; **B|** células 3T3-B61; **C|** células Balb 3T3.

ERK 1/2 são substratos de MEK 1/2 e o inibidor da atividade de MEK (U0126) na concentração de 20 μ M, coerentemente, bloqueou parcialmente a fosforilação de ERK 1/2 por soro e completamente por FGF2 (figura 4.17A).

A forma mutagenicamente ativada do oncogene *HRAS*, H-Ras^{V12}, mostra uma atividade paradoxal quando expressa ectopicamente em células normais não imortalizadas: ao invés de provocar a transformação maligna dessas células causa um estresse terminal, disparando apoptose e/ou senescência definitiva. Não há ainda uma proposta consensual de mecanismos moleculares para explicar esse fenômeno, mas existe uma hipótese com alguma aceitação, admitindo que a exagerada atividade constitutiva de H-Ras^{V12} causa uma superativação das vias mitogênicas que inviabiliza a célula definitivamente. Esta hipótese também poderia ser aventada no caso da toxidez de FGF2 em células malignas oncogenicamente dependentes de Ras, focalizada nesta tese. Mas, os resultados relatados aqui demonstram que esta hipótese não se aplica ao caso da toxidez de FGF2.

O inibidor de MEK (U0126), que bloqueia a ativação de ERK1/2, não protegeu as células do efeito tóxico do FGF2 em ensaios de colônia de Y1 e 3T3-B61, (figuras 4.18A e 4.18B, respectivamente). Além disso, observa-se nas micrografias que o inibidor de MEK também não protegeu as células Y1 do efeito de estresse morfológico induzido por FGF2 (figura 4.21 - U0126).

Entretanto, na análise do ciclo celular por citometria de fluxo, em 24 h de estímulo por soro ou FGF2, o inibidor de MEK bloqueou, generalizadamente, a

progressão G1 → S, seja nas células-controle, ou nas estimuladas por FGF2 e por soro (figuras 4.22 - U0126). Em análises de tomada de ³H-timidina em DNA, U0126 também bloqueou, generalizadamente, a síntese de DNA (figura 4.23A). Portanto, o inibidor U0126 claramente desacoplou a atividade da via mitogênica de MEK 1/2 → ERK1/2 da toxidez por FGF2 nas células malignas Y1 dependentes da ação oncogênica de K-Ras amplificado.

Analisando-se a via de PI3K/ AKT, como pode ser observado em *immunoblot*, o inibidor de PI3K (LY294002) foi capaz de inibir a fosforilação de AKT basal em células Y1 carenciadas e também a fosforilação induzida por soro e FGF2 (figura 4.17B). Nas células Y1, que mantêm altos níveis de K-Ras-GTP, esta via é mantida em níveis basais elevados, por ser antiapoptótica e fundamental para a transição G0/G1 → S do ciclo celular, contribuindo para tumorigenicidade destas células. A inibição de PI3K leva à rápida desativação de AKT e, conseqüentemente, das vias à jusante a esta quinase (Forti *et al.*, 2002).

Os inibidores de PI3K (Wortmannin e LY294002) também não foram capazes de proteger as células da toxidez de FGF2, conforme visto nos ensaios de colônia (figura 4.19A e 4.19B) na morfologia celular, onde podemos observar que as células Y1 não foram protegidas do efeito de estresse (figura 4.21 - LY294002). Por outro lado, a análise do ciclo celular em 24 h demonstrou que o inibidor de PI3K reduziu consideravelmente a transição G0/G1 → S nas células Y1 em todas as condições estudadas (figura 4.22 - LY294002) e também reduziu a síntese de DNA estimada por tomada de ³H-timidina em DNA (figura 4.23B). Portanto, os inibidores da via de

PI3K → AKT também desacoplaram esta via mitogênica dos mecanismos moleculares da ação tóxica de FGF2.

Sabe-se, há muito tempo, que PMA induz a fosforilação de ERK1/2 via ativação de PKC. Coerentemente, o inibidor de PKC (Gö6983) bloqueou eficientemente a ativação de ERK por PMA (figura 4.17C). Mas, os inibidores de PKC (Gö6983, Staurosporina, Tamoxifen) não foram capazes de proteger as células Y1 e 3T3-B61 do efeito citotóxico do FGF2 em ensaios de colônia (figura 4.20, dados não mostrados) e, também, em análise morfológica (figura 4.21 - Gö6983). Nos ensaios de citometria de fluxo, Gö6983 não interferiu em nenhuma das condições analisadas (figura 4.22 - Gö6983). Logo, PKC não está envolvida nas vias moleculares que determinam a toxidez de FGF2.

Em conclusão, a atividade mitogênica clássica de FGF2 e a toxicidade de FGF2 em células malignas, oncogenicamente dependentes de Ras, devem estar subordinadas a mecanismos moleculares (vias de sinalização) paralelos e independentes, todos à jusante da atividade de Tyr-quinase dos FGFRs.

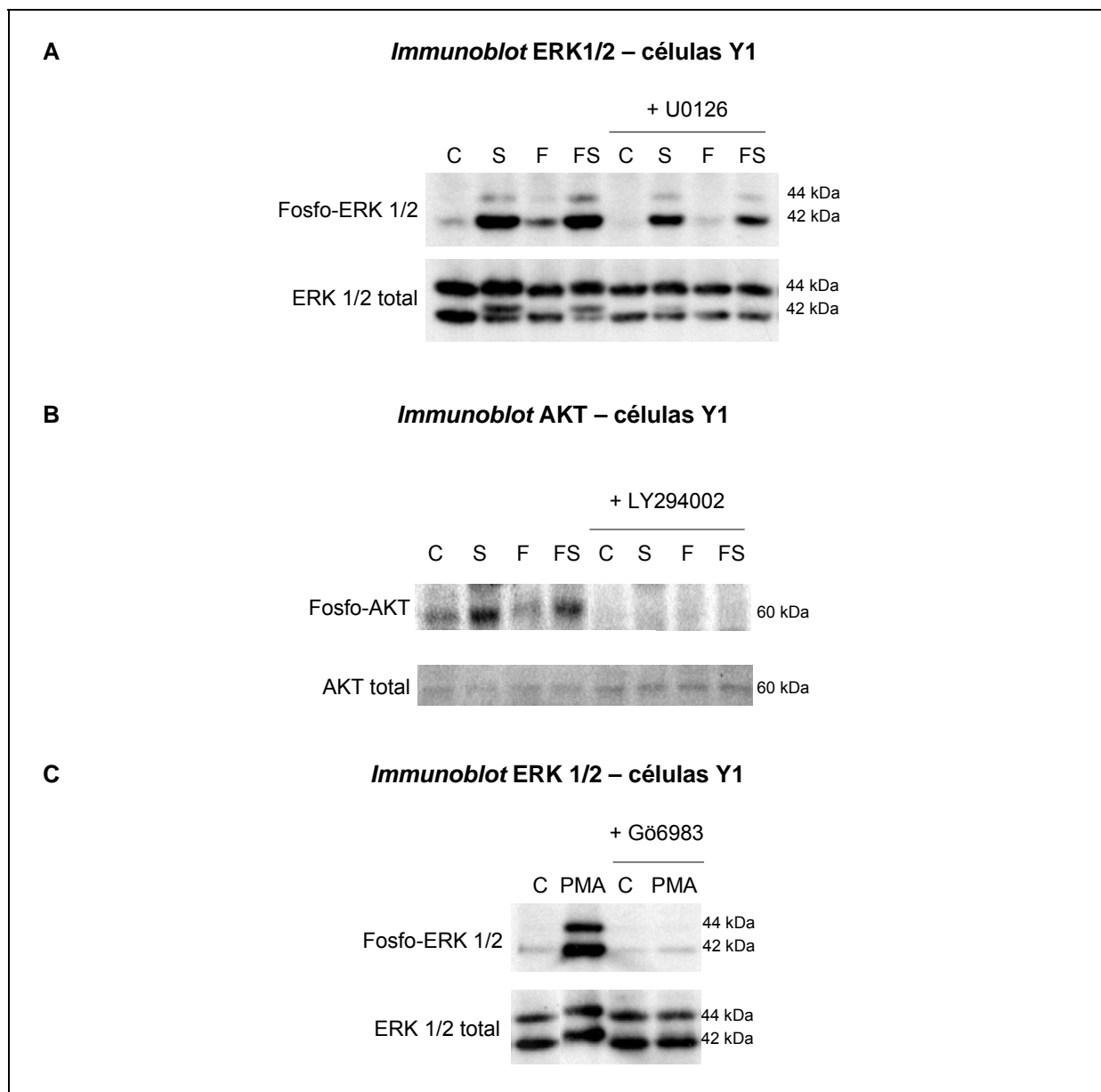


Figura 4.17| A| *Immunoblot* para fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), em células Y1, na presença do inibidor de MEK (U0126 20 μ M), adicionado 1 h antes do estímulo. Os estímulos foram feitos com soro 10% (S) e/ou FGF2 5 ng/mL (F), por 10 min. **B|** *Immunoblot* para fosfo-AKT (Ser473), em células Y1, na presença do inibidor de PI3K (LY294002 10 μ M), adicionado 1 h antes do estímulo. Após sincronização por carenciamento para soro (C), as células foram estimuladas com soro 10% (S) e/ou FGF2 10 ng/mL (F), por 10 min. **C|** *Immunoblot* para fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), em células Y1, na presença do inibidor de PKC (Gö6983 5 μ M), 1 h antes do ativador PMA 5 ng/mL, por 10 min. ERK1/2 total foram utilizadas como controle.

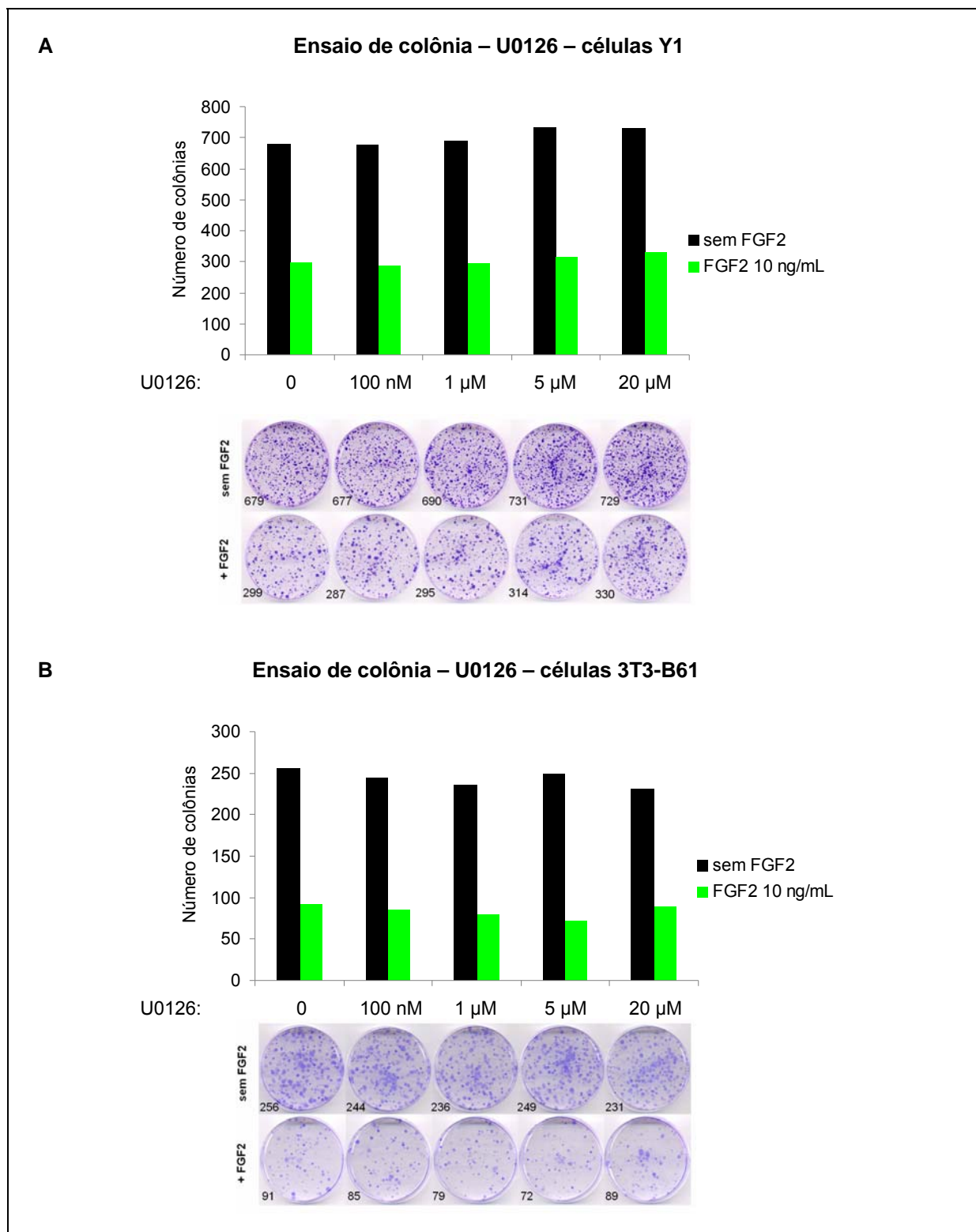


Figura 4.18| Ensaio de colônia na presença de inibidor de MEK (U0126), adicionado 1 h antes do FGF2. As concentrações utilizadas de U0126 variaram de 100 nM a 100 μ M. **A|** Células Y1. Foram plaqueadas 100 células/cm². O meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 14 dias. **B|** Células 3T3-B61. Foram plaqueadas 25 células/cm². O meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 10 dias.

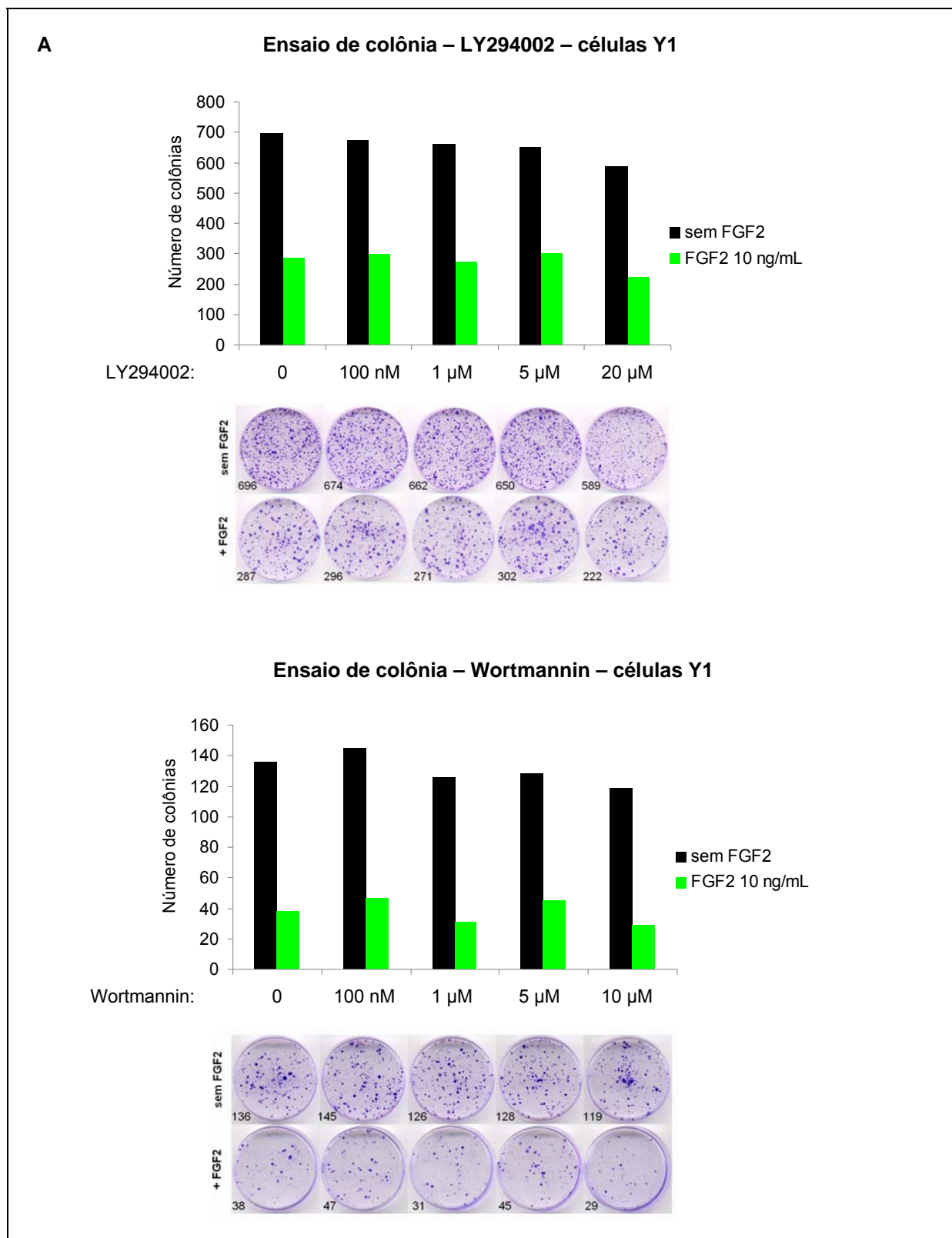


Figura 4.19 continua na próxima página.

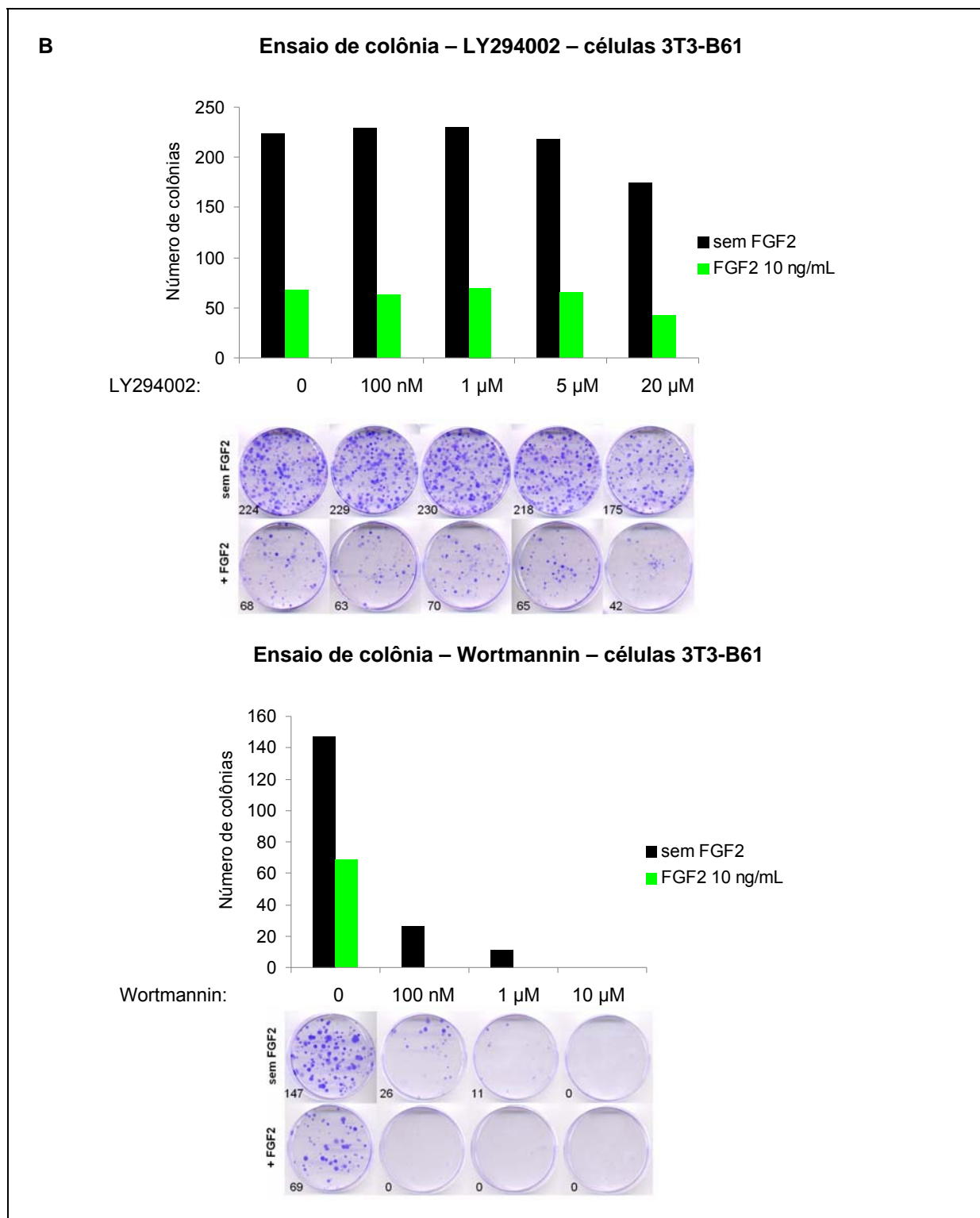


Figura 4.19| Ensaio de colônia na presença dos inibidores de PI3K (LY294002, Wortmannin), adicionado 1 h antes do FGF2. As concentrações de LY294002 variaram de 100 nM a 20 μM e as concentrações de Wortmannin, de 100 nM a 10 μM. **A|** Células Y1. Foram plaqueadas 50-100 células/cm². O meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 14 dias. **B|** Células 3T3-B61. Foram plaqueadas 30 células/cm². O meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 14 dias.

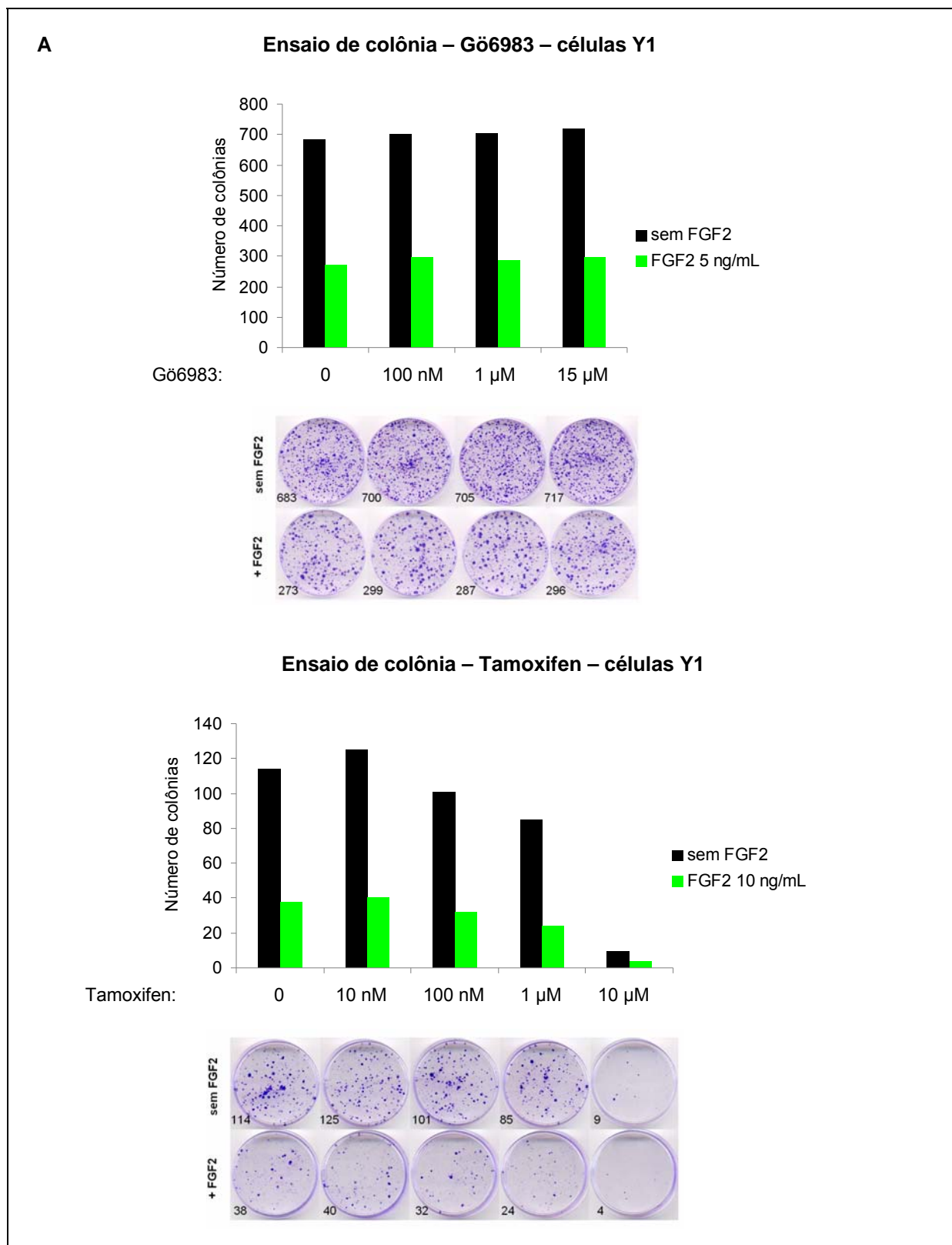


Figura 4.20 continua na próxima página.

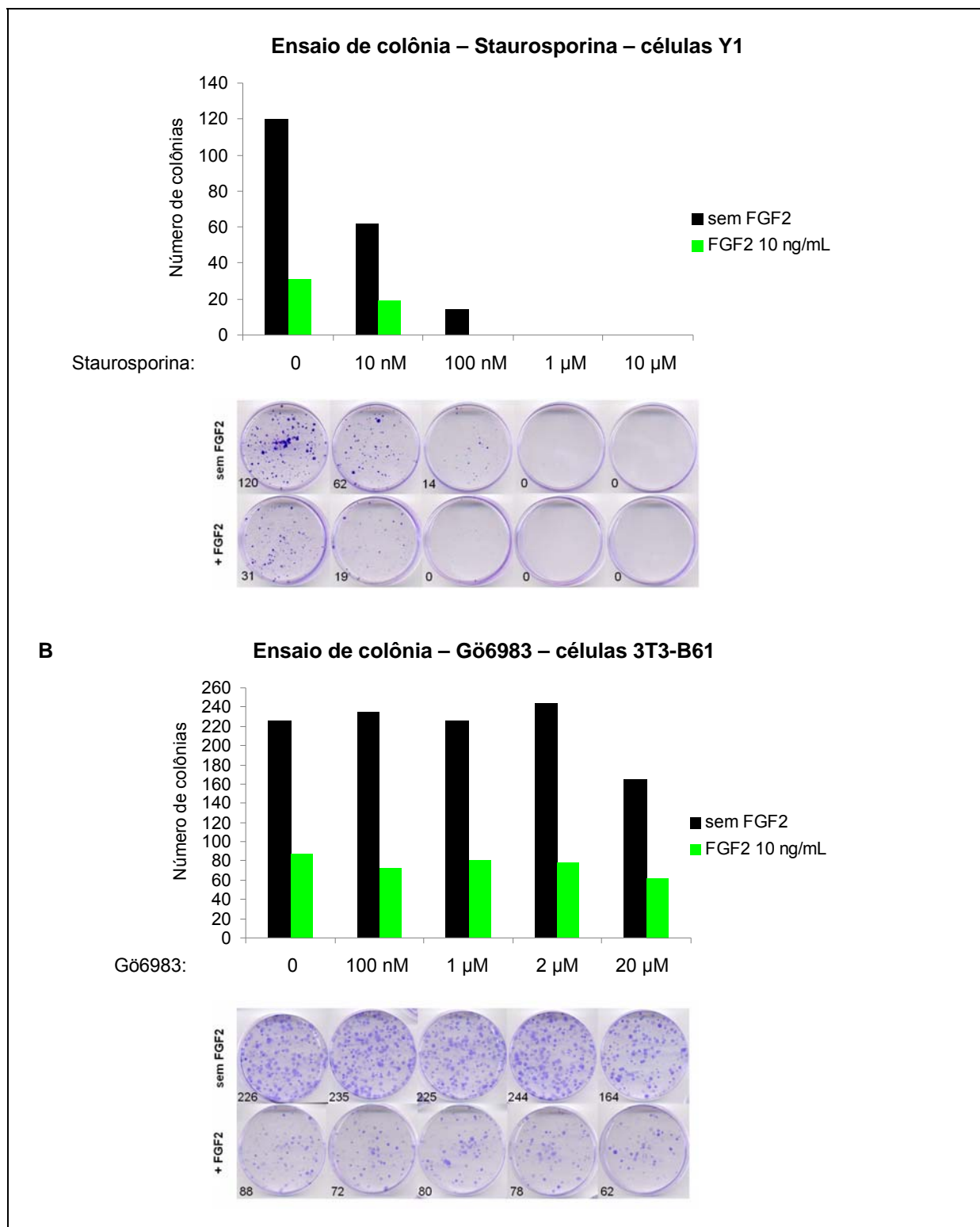


Figura 4.20| Ensaio de colônia a presença de inibidores de PKC, adicionados 1 h antes do FGF2. As concentrações utilizadas de Gö6983 variaram de 100 nM a 20 μ M, de Tamoxifen, de 10 nM a 10 μ M, de Staurosporina, de 10 nM a 10 μ M. **A|** Células Y1. Foram plaqueadas 100 células/cm². O meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 14 dias. **B|** Células 3T3-B61. Foram plaqueadas 30 células/cm². O meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 10 dias.

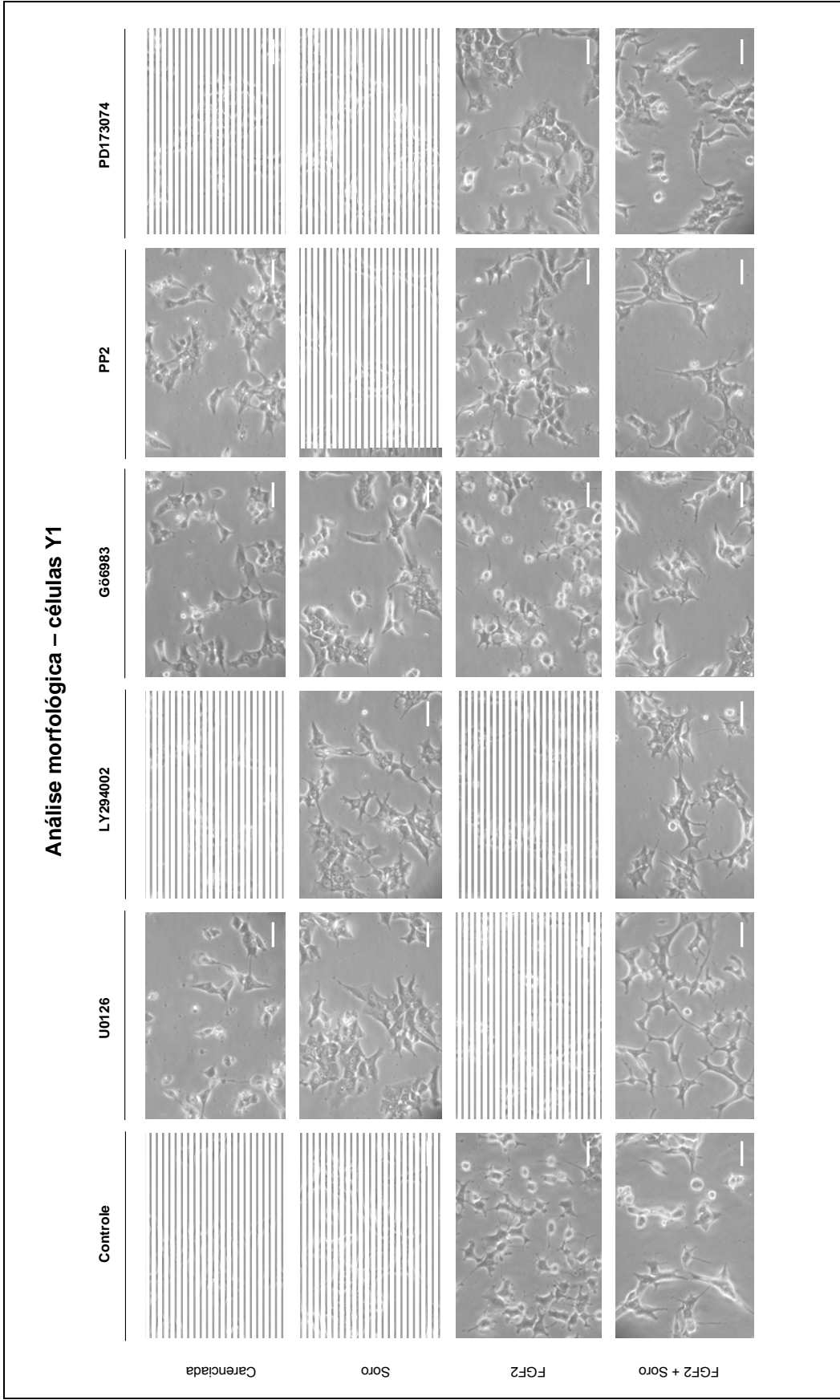


Figura 4.21 | Análise morfológica de células Y1 sob estímulo de soro ou FGF2 por 24 h, na presença de inibidores, quando indicada, U0126 (20 μ M), LY294002 (20 μ M), Gö6983 (5 μ M), PD173074 (150 nM), PP2 (10 μ M), adicionados 1 h antes dos estímulos. Os inibidores de Tyr-quinase de FGFR PD173074 e de Src PP2 foram utilizados para comparação. Barra de escala das fotos = 50 μ m.

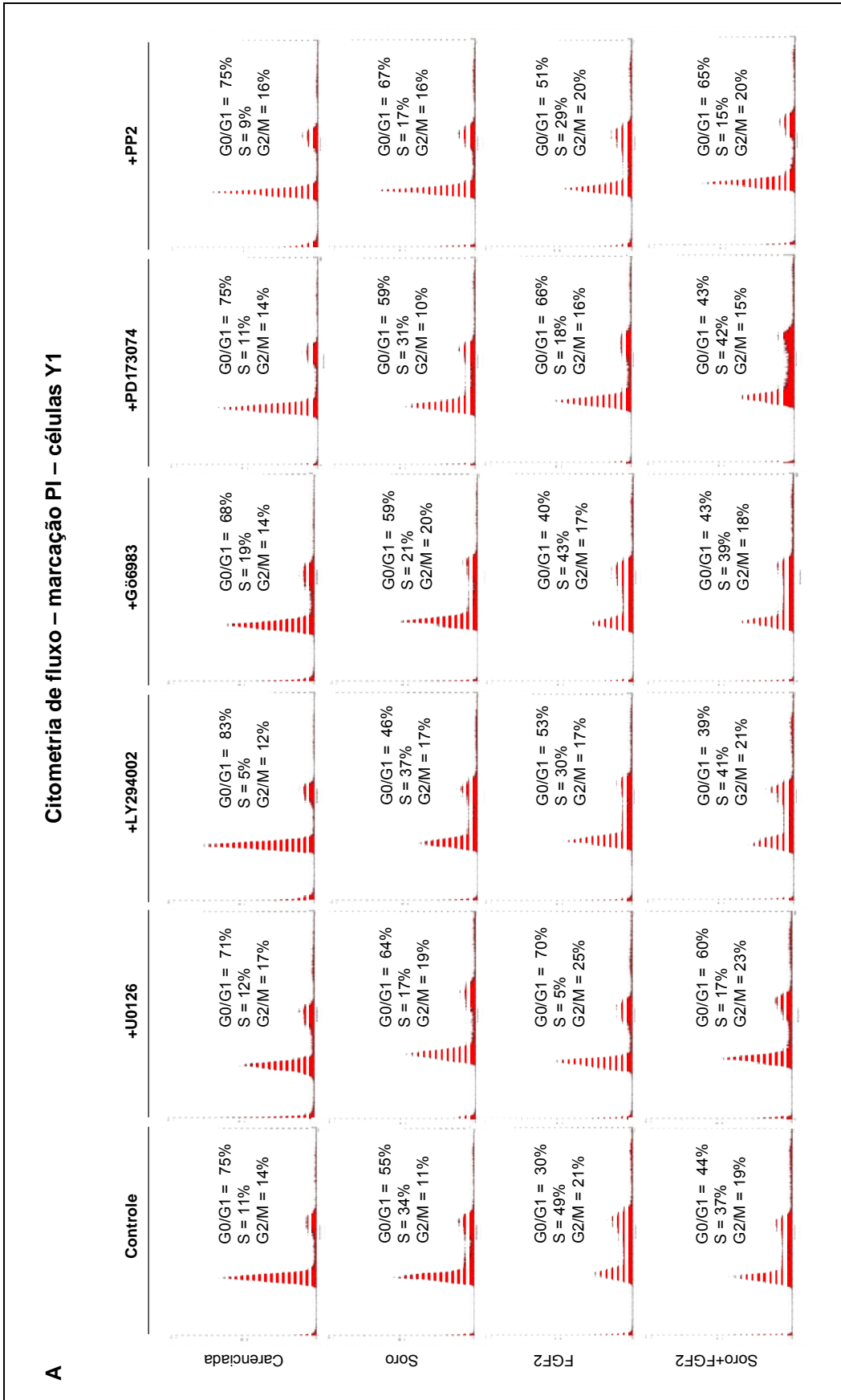


Figura 4.22 continua na próxima página.

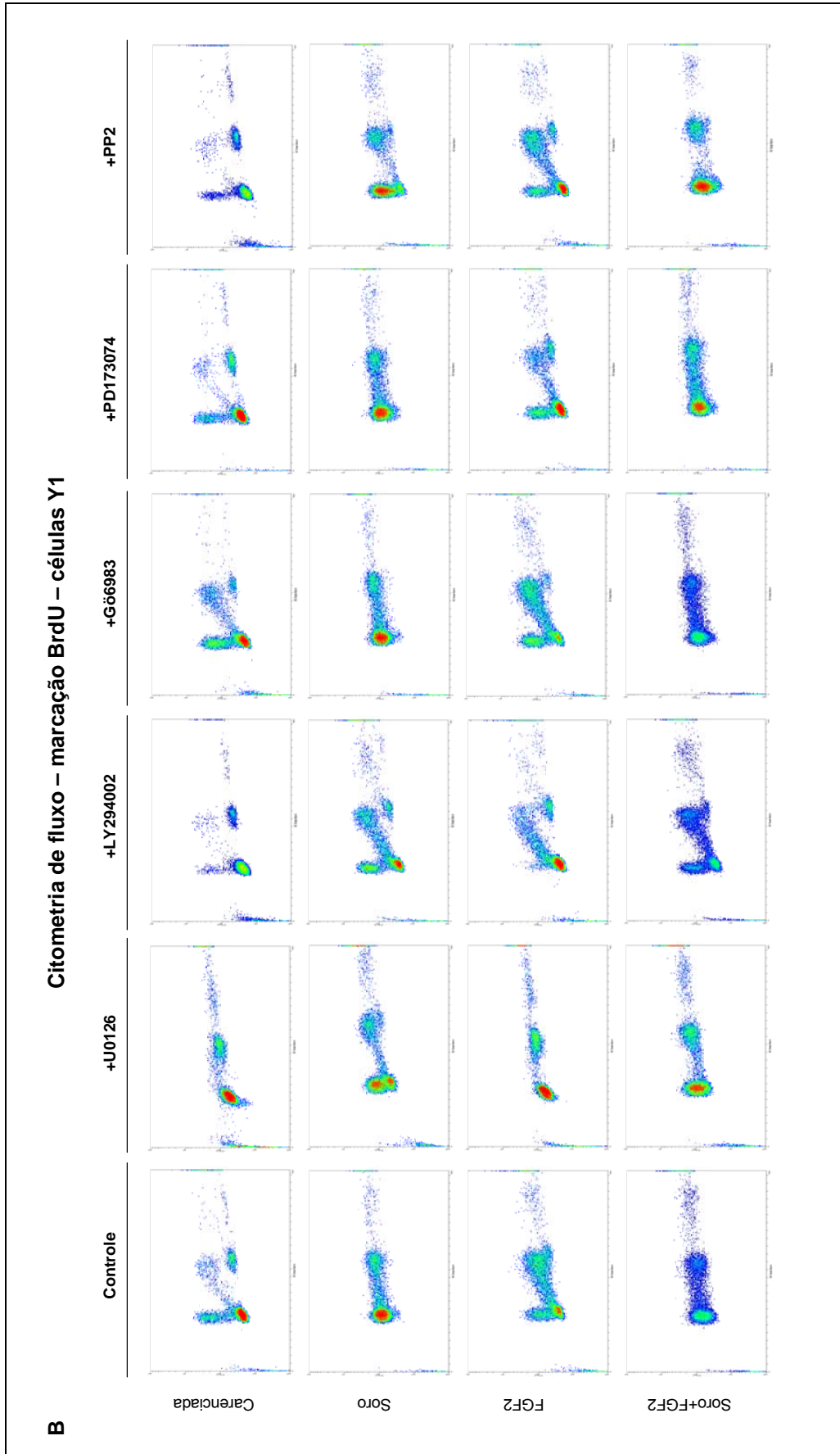


Figura 4.22 continua na próxima página.

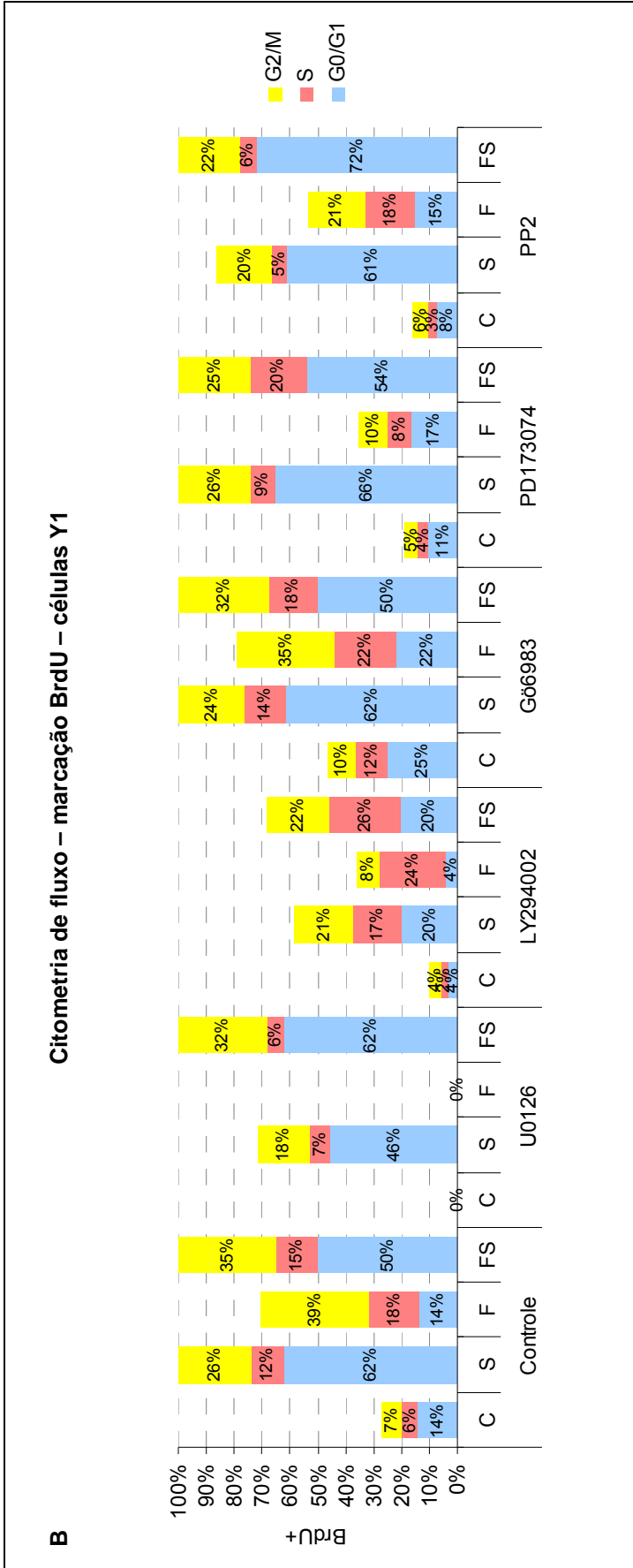


Figura 4.22| A| Análise do ciclo celular (fases G0/G1, S e G2/M) por citometria de fluxo de células Y1, sob estímulo de soro (10%) ou FGF2 (10 ng/mL) por 24 h, na presença, quando indicada, U0126 (20 µM), LY294002 (20 µM), G66983 (5 µM), PD173074 (150 nM), PP2 (10 µM), adicionados 1 h antes dos estímulos. Os gráficos indicam o número de eventos no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio (conteúdo de DNA) no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada foi realizada pelo programa Cylchred. **B|** Incorporação de BrdU pelo mesmo período, nas mesmas condições anteriores. Os gráficos indicam: função logarítmica (base 10) da fluorescência de Alexa 488 (anticorpo anti-BrdU) no eixo das ordenadas e fluorescência de iodeto de propídio no eixo das abscissas. A quantificação das fases do ciclo celular indicada (positivas para BrdU) foi realizada pelo programa FlowJo. Todos os gráficos foram gerados pelo programa WinMDI 2.9. Os inibidores de Tyr-quinase de FGFR PD173074 e de Src PP2 foram utilizados para comparação. Foram analisadas 20000 células.

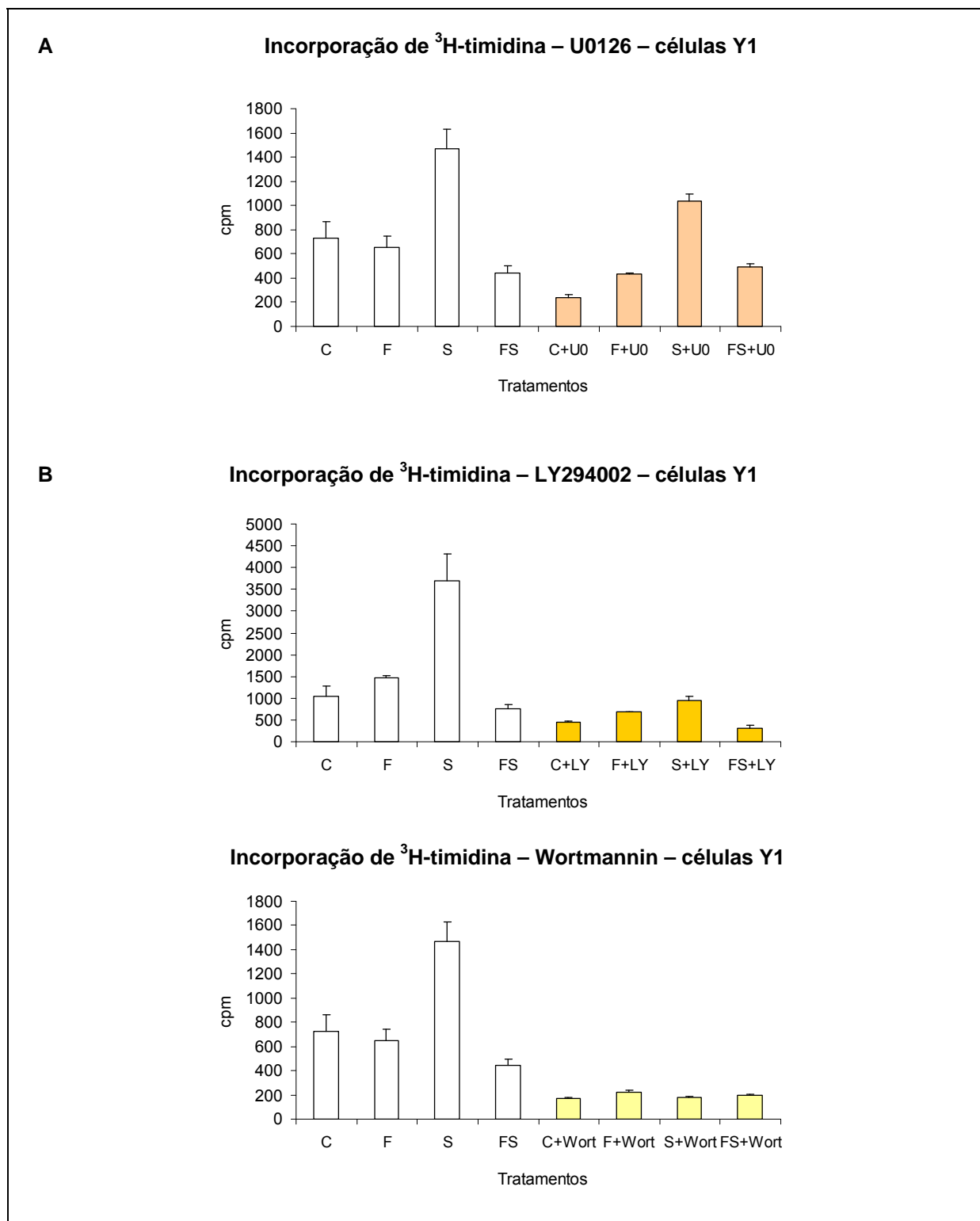


Figura 4.23 Incorporação de timidina tritiada, pulso de 1 h, em células Y1 estimuladas com soro 10% e/ou FGF2 10 ng/mL e/ou PMA 5 ng/mL, por 12 h, após carenciamento. C = carenciadas, F = FGF2, S = soro, P = PMA. Os inibidores foram adicionados 1 h antes dos estímulos. **A**] Inibidor de MEK, U0126 (U0, 15 μM), com soro e/ou FGF2. **B**] Inibidores de PI3K, LY294002 (LY, 5 μM). E Wortmannin (Wort, 5 μM).

4.7 Genes de controle de ciclo celular, migração, adesão e citoesqueleto são expressos diferencialmente na linhagem parental Y1 e na sublinhagem Y1-FRes3, parcialmente resistente a FGF2.

A sublinhagem Y1-FRes3 pertence a uma classe de sublinhagens clonais isoladas como resistentes ao FGF2 (FGF2-Resistente) que, como a linhagem parental Y1, mantém a superexpressão de K-Ras, sustentando a via K-Ras-GTP → PI3K → Akt constitutivamente ativa. Apesar disso, a sublinhagem Y1-FRes3 mostrou tumorigenicidade significativamente menor em camundongos Balb/c Nude, com tumores em apenas 50% dos animais e tempo de latência de 29 dias, enquanto que, no caso da linhagem parental Y1, os tumores aparecem, sistematicamente, em 100% dos animais, em cerca de 13 dias (Costa & Armelin, 2005).

As células Y1-FRes3 apresentam um fenótipo de resistência parcial ao FGF2 (figura 4.24A), que não é estável, pois, se forem mantidas em meio sem FGF2, progressivamente, reverterem-se ao fenótipo da linhagem parental, passando a ser sensíveis ao efeito citotóxico de FGF2.

Os dois traços mais marcantes do fenótipo de resistência a FGF2 das células Y1-FRes3 são: a) controle estrito da transição reversível quiescência/proliferação e b) elevada resposta das células quiescentes, sincronizadas em G0/G1, à ação mitogênica de FGF2, que se combina sinergicamente com o soro (Costa & Armelin, 2005). Estes traços estão plenamente ilustrados nos resultados de tomada de ³H-timidina em

DNA, apresentados na figura 4.24B, onde se notam: a) níveis negligenciáveis de síntese de DNA nas células G0/G1 não estimuladas, b) forte estimulação da síntese de DNA (entrada na fase S) por FGF2, cuja ação se combina sinergicamente com o soro. Portanto, as células Y1-FRes3 mostram apenas a resposta mitogênica a FGF2 e são imunes à ação inibitória disparada por FGF2 no início de G1 que, nas parentais Y1, leva ao bloqueio tardio da síntese de DNA na fase S induzida por soro, descrito e caracterizado nesta tese (item 4.4, figura 4.9). Por conseguinte, dadas estas diferenças fenotípicas, tornou-se de interesse óbvio comparar os genes induzidos por FGF2 e soro durante as primeiras 2 h de estimulação das células Y1 e Y1-FRes3, arrestadas por carenciamento em G0/G1. Este estudo comparativo poderia encontrar genes críticos na resposta de estresse das células Y1 à toxidez de FGF2.

Os dados obtidos por RT-qPCR ($\Delta\Delta C_t$) foram analisados pelo programa R/Heatmap, onde os genes (tabela 4.1) foram divididos em grupos (ou *clusters*), que serão discutidos a seguir (figura 4.25). Os valores obtidos pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para todos os genes e condições analisadas estão Anexo A.

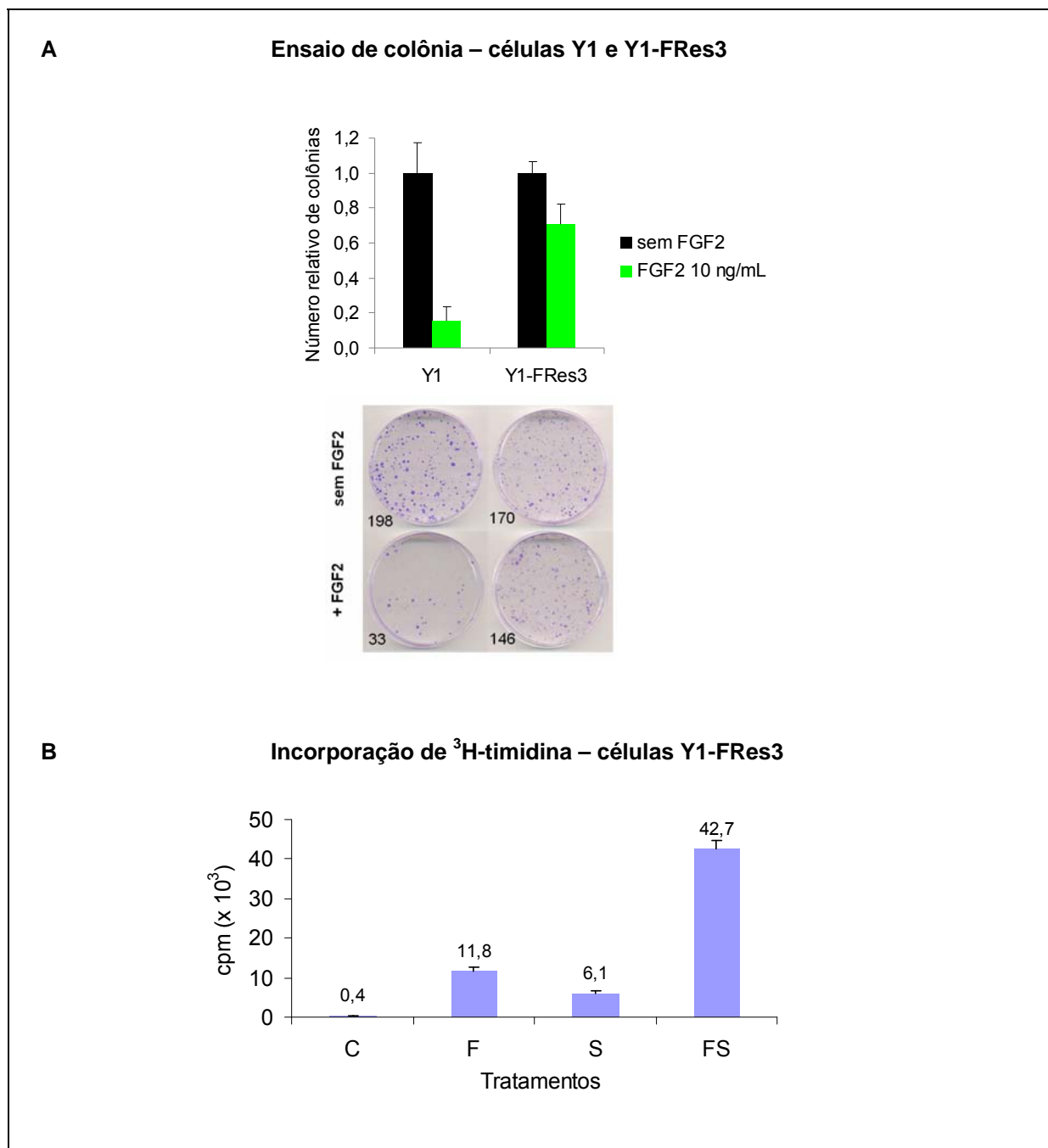


Figura 4.24| A| Ensaio de colônia em células Y1 e Y1-FRes3 na presença de FGF2 10 ng/mL. Foram plaqueadas 50-250 células/cm². O meio de cultura foi renovado após 24 h. A cultura foi mantida por 14 dias. n = 3. **B|** Incorporação de timidina tritiada, entre 11-24 h do estímulo, em células Y1-FRes3 carenciadas (C), que foram estimuladas com soro (S) e/ou FGF2 10 ng/mL (F) por 24 h. Resultado representativo de 2 experimentos.

Tabela 4.1| Genes selecionados para análise por RT-qPCR.

cDNA	Genbank
Arhgef3	NM_027871.1 Mus musculus Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3 (Arhgef3)
Cald1	NM_145575.1 Mus musculus caldesmon 1 (Cald1)
Cdc42	NM_009861.1 Mus musculus cell division cycle 42 homolog (S. cerevisiae) (Cdc42)
Cdkn1a	NM_007669.2 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) (Cdkn1a)
Cdkn1b	NM_009875.2 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (P27) (Cdkn1b)
Cdkn2a	NM_009877.1 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Cdkn2a)
Cdkn2d	NM_009878.2 Mus musculus cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4) (Cdkn2d)
Chn2	NM_023543.1 Mus musculus chimerin (chimaerin) 2 (Chn2)
Dusp8	NM_008748.1 Mus musculus dual specificity phosphatase 8 (Dusp8)
Fgf1	NM_010197.2 Mus musculus fibroblast growth factor 1 (Fgf1)
Fgf2	NM_008006.1 Mus musculus fibroblast growth factor 2 (Fgf2)
Fgfr1	NM_010206.1 Mus musculus fibroblast growth factor receptor 1 (Fgfr1)
Fgfr2	NM_201601.1 Mus musculus fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2), transcript variant 2 NM_010207.1 Mus musculus fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2), transcript variant 1
Fgfr3	NM_008010.2 Mus musculus fibroblast growth factor receptor 3 (Fgfr3)
Fgfr4	NM_008011.1 Mus musculus fibroblast growth factor receptor 4 (Fgfr4)
Fgfr5	NM_054071.1 Mus musculus fibroblast growth factor receptor-like 1 (Fgfrl1)
Glb1	NM_009752.1 Mus musculus galactosidase, beta 1 (Glb1)
Grm1	NM_016976.1 Mus musculus glutamate receptor, metabotropic 1 (Grm1)
Hprt1	NM_013556.1 Mus musculus hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (Hprt1)
Hsp60	NM_010477.2 Mus musculus heat shock protein 1 (chaperonin) (Hspd1)
Mad111	NM_010752.2 Mus musculus mitotic arrest deficient 1-like 1 (Mad111)
Mad211	NM_019499.2 Mus musculus MAD2 (mitotic arrest deficient, homolog)-like 1 (yeast) (Mad211)
Mad4	NM_010753.2 Mus musculus Max dimerization protein 4 (Mxd4)

Mapk9	NM_016961.2 NM_207692.1 Mus musculus mitogen activated protein kinase 9 (Mapk9)
Mek3	NM_008928.1 Mus musculus mitogen activated protein kinase kinase 3 (Map2k3)
Morf4l1	NM_024431.1 Mus musculus mortality factor 4 like 1 (Morf4l1)
Nfkb1	NM_008689.1 Mus musculus nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105 (Nfkb1)
Ngfr	NM_033217.2 Mus musculus nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16) (Ngfr)
Mapk14	NM_011951.1 Mus musculus mitogen activated protein kinase 14 (Mapk14)
Pdgfa	NM_008808.2 Mus musculus platelet derived growth factor, alpha (Pdgfa)
Pdgfb	NM_011057.3 Mus musculus platelet derived growth factor, B polypeptide (Pdgfb)
Pdgfc	NM_019971.2 Mus musculus platelet-derived growth factor, C polypeptide (Pdgfc)
Pdgfd	NM_027924.1 Mus musculus platelet-derived growth factor, D polypeptide (Pdgfd)
Pdgfralpha	NM_011058.1 Mus musculus platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide (Pdgfra)
Pdgfrbeta	NM_008809.1 Mus musculus platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide (Pdgfrb)
Rac1	NM_009007.1 Mus musculus RAS-related C3 botulinum substrate 1 (Rac1)
Ran	NM_009391.2 Mus musculus RAN, member RAS oncogene family (Ran)
Rap2a	NM_029519.2 Mus musculus RAS related protein 2a (Rap2a)
Rgn	NM_009060.1 Mus musculus regucalcin (Rgn), mRNA
Rhoa	NM_016802.3 Mus musculus ras homolog gene family, member A (Rhoa)
Rhob	NM_007483.2 Mus musculus ras homolog gene family, member B (Rhob)
Rps28	NM_016844.1 Mus musculus ribosomal protein S28 (Rps28)
Sod3	NM_011435.3 Mus musculus superoxide dismutase 3, extracellular (Sod3)
Svi1	NM_153153.1 Mus musculus supervillin (Svil), transcript variant 1
Tbx2	NM_009324.1 Mus musculus T-box 2 (Tbx2)
Tnr	NM_022312.1 Mus musculus tenascin R (Tnr)
Trp53	NM_011640.1 Mus musculus transformation related protein 53 (Trp53)
Vim	NM_011701.3 Mus musculus vimentin (Vim)

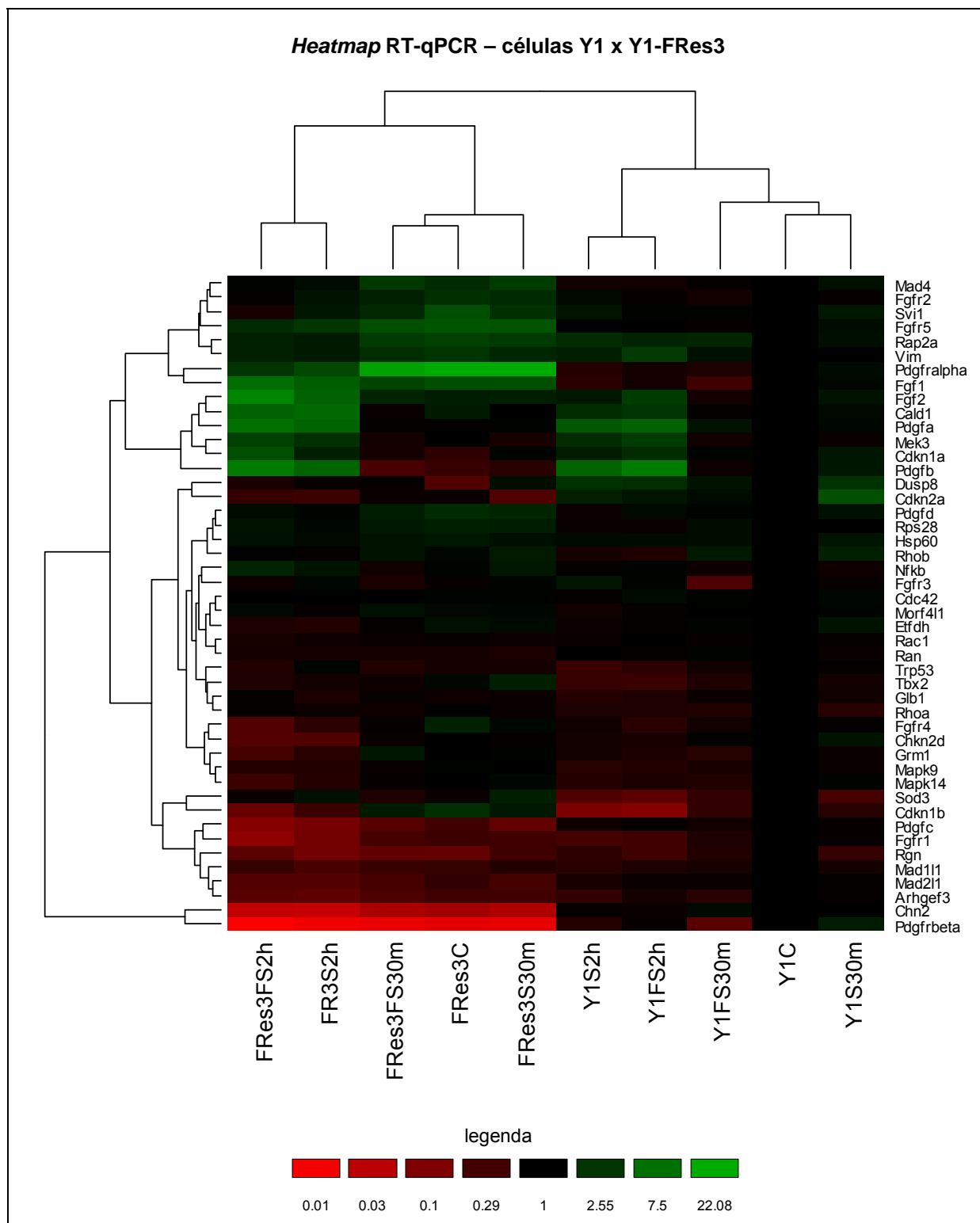


Figura 4.25| Heatmap dos dados obtidos de RT-qPCR, comparando-se as células Y1 e Y1-FRes3. Como gene de referência, empregou-se o HPRT1. Como condição de referência, utilizou-se RNA das células Y1C. C: células sincronizadas em G0/G1 por carenciamento para soro por 48 h; FS30m: 30 min de estímulo com FGF2 e soro; FS2h: 2 h de estímulo com FGF2 e soro; S30m: 30 min de estímulo com soro; S2h: 2 h de estímulo com soro. Estímulo de FGF2 10 ng/mL e soro 10%. Heatmap gerado pelo programa R/Heatmap.

A expressão dos genes *Ngfr* e *Tnr* não foi detectada por RT-qPCR, em nenhuma das células analisadas.

No grupo dos genes induzidos na Y1-FRes3 (porção superior do *heatmap*, figura 4.41), estão os genes: *Fgf1*, *Pdgfralpha*, *Vim*, *Rap2a*, *Fgfr5*, *Svi1*, *Fgfr2* e *Mad4*. Interessante notar que três membros da família FGF estão neste grupo.

Em Y1, a expressão de *Fgf1* é inibida três vezes em 30 min com FGF2, enquanto que é inibida em 2 h somente com soro. Em Y1-FRes3, sua expressão é cerca de quatro vezes maior que em Y1, e, ao contrário de Y1, a expressão de *Fgf1* é induzida em 2 h na presença de FGF2.

Pdgfralpha apresentou grandes diferenças entre Y1 e Y1-FRes3, onde é mais de vinte vezes mais expresso. Enquanto que, em células Y1, não há praticamente alteração na sua expressão durante os tratamentos, *Pdgfra* é bastante reduzido na presença de soro em Y1-FRes3. Os PDGFs ligam-se aos receptores de Tyr-quinase PDGFR α e PDGFR β , sendo potentes mitógenos para tipos celulares originados do mesênquima (revisado por Fredriksson *et al.*, 2004). Entretanto, Y1, além de produzir abundantemente PDGFs para o meio extracelular, também não responde para PDGFs parácrinos (Rebustini & Armelin, 2003). Além disso, os receptores de PDGF estão presentes em níveis baixíssimos (dados não mostrados).

Vim codifica para vimentina, que é o mais abundante dos filamentos intermediários de citoesqueleto. É marcadora de células mesenquimais e está

relacionada à mobilidade e adesão celular (revisado por Ivaska *et al.*, 2007). FGFR1 pode levar a transição epitélio-mesênquima, num processo que envolve a expressão desta proteína (Ciruna & Rossant, 2001). Em células Y1-FRes3, a expressão de Vim é cerca de 2 vezes maior que em Y1, e não se altera durante os tratamentos, enquanto que em Y1, a expressão de Vim aumenta sob tratamentos de 2 h.

Rap2a (também denominado *Rap2*) teve sua expressão induzida sob estímulo de FGF2 e/ou soro em Y1 e reprimida em Y1-FRes3. Entretanto, vale destacar que o basal de expressão é cerca de três vezes maior em Y1-FRes3. *Rap2a* é membro da subfamília Ras de pequenas GTPases. Diferentemente de *Rap1*, que é chamado de *switch* molecular rápido, foi proposto que *Rap2a* funciona como um *switch* molecular lento, pois possui baixa sensibilidade a GAPs e mais da metade destas proteínas permanecem ligadas a GTP (Ohba *et al.*, 2000).

A expressão de *Fgfr5* mantém-se inalterada durante os tratamentos em Y1, enquanto que, em Y1-FRes3, que expressa mais de quatro vezes, há redução da expressão em 2 h após estímulos. O mesmo perfil de expressão ocorre com *Fgfr2*, onde é cerca de duas vezes mais expresso em Y1-FRes3.

Svi1 codifica para supervilina. A porção N-terminal desta proteína contém sinais de localização nuclear e a porção C-terminal contém inúmeras sequências consecutivas com extensiva similaridade a proteínas da família gelsolina, proteínas de ligação à actina. O produto deste gene está altamente associado tanto a filamentos de actina, quanto a membrana plasmática, sugerindo um papel de conexão entre o

citoesqueleto de actina e a membrana. Sua função inclui o recrutamento de actina e outras proteínas do citoesqueleto a estruturas especializadas localizadas na membrana plasmática e no núcleo de células em crescimento (Takizawa *et al.*, 2006; revisado por Khurana & George, 2008). Em células sincronizadas, a expressão de *Svi1* é quatro vezes maior em Y1-FRes3 e durante o tratamento com soro, esses níveis são reduzidos, enquanto que os níveis se mantêm inalterados em Y1, sob qualquer tratamento.

O gene *Mad4* é membro da família Mad (proteína dímera de Max). Mads são proteínas *zipper* de leucina hélice-volta-hélice que competem com as proteínas Myc para se heterodimerizarem com a proteína Max, formando um complexo de repressão transcricional. Os genes *Mad* são supressores de tumor que contrabalançam o oncogene *Myc* na regulação do crescimento celular (Grinberg *et al.*, 2004). A expressão de *Mad4* é baixa e inalterada em Y1, enquanto que em Y1-FRes3 é duas vezes maior, sendo reduzida durante os tratamentos de estimulação mitogênica.

No grupo dos genes reprimidos na Y1-FRes3 (porção inferior do *heatmap*, figura 4.41), estão os genes: *Pdgfrbeta*, *Chn2*, *Arhgef3*, *Mad111*, *Mad211*, *Rgn*, *Fgfr1*, *Pdgfc*, *Sod3*, *Cdkn1b*.

Pdgfrbeta é sessenta vezes menos expresso em Y1-FRes3, comparando-se com células Y1 sincronizadas. Este gene foi o que mais apresentou diferença entre as duas

células. *Pdgfc* está reprimido em Y1-FRes3 cerca de três vezes, e o estímulo com soro diminui ainda mais sua expressão, enquanto que permanece inalterado em Y1.

A expressão de *Chn2* é cerca de vinte vezes maior em Y1 que em Y1-FRes3. *Chn2* codifica para a β 2-quimerina (também chamada de *Arhgap3*). Esta proteína é uma Rac-GAP e receptor intracelular para DAG e ésteres de forbol (Wang *et al.*, 2006). *Chn2* controla negativamente muitos eventos patofisiológicos dependentes de Rac, incluindo o desenvolvimento de tumores. Além disso, em células tratadas com EGF, através de fosforilação em tirosina, a família de Src inibe esta proteína (Kai *et al.*, 2007).

A expressão de *Arhgef3* é cerca de três vezes maior em Y1 que em Y1-FRes3. *Arhgef3* é uma GEF de RhoA e RhoB (também conhecida como *Xp1n*). Rho GTPases desempenham um papel fundamental em inúmeros processos celulares que são iniciados por estímulos extracelulares como adesão e migração. Proteínas Rho podem regular a progressão do ciclo celular e a proliferação celular, de forma que a ativação aberrante de RhoGTPases está relacionada ao câncer (Arthur *et al.*, 2002).

A expressão de *Mad2l1* é quase três vezes maior em Y1, enquanto que *Mad2l1* é cerca de duas vezes maior em Y1. *Mad1l1* e *Mad2l1* (*mitotic arrest deficient*) são componentes do ponto de checagem para montagem do fuso mitótico, que previne o início da anáfase até que todos os cromossomos estejam adequadamente alinhados no feixe durante a metáfase (revisado por Lopes & Sunkel, 2003). A baixa expressão destas proteínas está relacionada à aneuploidia em tumorigênese. Por outro lado, a

superexpressão também leva a um grande número de quebras, fragmentações e fusões nos cromossomos.

Rgn codifica para a regucalcina, também chamada de proteína marcadora de senescência (SMP30). É uma proteína que se liga ao cálcio e tem um papel importante na sua homeostase. Foi demonstrado que se transporta ao núcleo, e pode inibir proteínas-quinases, fosfatases nucleares e a síntese de DNA e RNA. Sua superexpressão pode inibir o crescimento de células derivadas de hepatoma (Yamaguchi & Daimon, 2005).

O basal de *Fgfr1* é cerca de três vezes menor em Y1-FRes3. Comparando-se com os demais receptores, o receptor FGFR1 é o mais expresso nas células parentais Y1 (vide item 4.8).

Cdkn1b (Kip1/p27) codifica para um inibidor de CDK e compartilha certa similaridade com outro inibidor da mesma família (*Cdkn1a*/Cip1/p21). A proteína codificada se liga e previne a ativação dos complexos ciclina E-CDK2 ou ciclina D-CDK4, controlando a progressão do ciclo G0/G1 → S. A degradação desta proteína é necessária para a transição do estado de quiescência para o estado proliferativo (revisado por Chu *et al.*, 2008). Condizente com este papel, em ambas as células, este gene é bastante inibido na presença de soro, porém é mais de duas vezes mais expresso em Y1-FRes3.

Em Y1-FRes, *Sod3* é induzida somente na presença de soro. Sod3 (ou cobre-superóxido dismutase extracelular) é uma enzima secretada no meio extracelular,

formando homotetrâmeros que ficam ancorados à matriz extracelular e superfície celular através da interação com proteoglicanos sulfato de heparan e colágeno (revisado por Fattman *et al.*, 2003).

Alguns genes, que estão diferencialmente expressos, merecem destaque: a expressão oposta de *Pdgfra* versus *Pdgfr β* e também de *Fgfr1* versus *Fgfr2* e *Fgfr5*. Enquanto que *Fgfr1* e *Pdgfra* estão mais expressos em Y1, *Fgfr2*, *Fgfr5* e *Pdgfr β* estão mais expressos em Y1-FRes3. Outro dado interessante é a expressão de *Fgf1* aumentada na Y1-FRes3 e a expressão de *Pdgfc*, aumentada na Y1.

No conjunto, estes resultados indicam que genes, reconhecidamente importantes no controle do ciclo celular, do citoesqueleto, da adesão e da migração celular, mostram expressão diferencial entre Y1 e Y1-FRes3 e podem estar envolvidos no processo citotóxico disparado por FGF2 nas primeiras 2 h da fase G1.

4.8 FGFR1IIIc é o receptor dominante na ação antitumoral de FGF2 em células Y1.

Ambas as atividades, mitogênica e citotóxica de FGF2 em células Y1, são mediadas via Tyr-quinase dos receptores de FGF. Desta forma, tornou-se importante identificarmos os receptores presentes nesta linhagem celular. Os mRNAs dos receptores FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 e FGFR5 foram analisados por RT-PCR saturante e sequenciamento. Para identificar a isoforma de *splicing* alternativo da região semelhante à Ig (IIIb ou IIIc) dos receptores FGFR1, FGFR2 e FGFR3, os fragmentos de PCR correspondentes aos mesmos foram sequenciadas e as isoformas presentes são: FGFR1IIIc, FGFR2IIIc e FGFR3IIIc (figura 4.26), as quais correspondem à origem embrionária mesenquimal destas células, derivadas do córtex da glândula adrenal de camundongo.

Para a quantificação relativa de cada um dos receptores em células Y1, foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Verificou-se que os receptores FGFR1, FGFR2 e FGFR5 são, essencialmente, os únicos expressos em Y1 (figura 4.27A). No experimento mostrado na figura 4.27B, foram plaqueadas densidades crescentes de células e as amostras de RNA foram extraídas ao mesmo tempo. A expressão dos receptores FGFR1 e FGFR2 aumenta com a densidade de células, enquanto que a expressão do receptor FGFR5 não se altera.

Há muitos anos, FGF2 é, classicamente, conhecido como mitógeno em diversos tipos celulares, incluindo culturas primárias de células adrenocorticais (Esch

et al., 1985; Viard *et al.*, 1993). Foi demonstrado que, em células de rato de cultura primária de células adrenocorticais, FGF2 leva à forte ativação de ERK 1/2, apesar de transiente, nas células derivadas da zona glomerulosa e da zona fasciculada/reticular (Mattos & Lofti, 2005). Entretanto, apesar de fraca indução de c-Fos, as células glomerulosas entram em S, mas não as células fasciculadas/reticulares (Mattos & Lofti, 2005). Entretanto, os resultados de nosso laboratório mostram que FGF2 dispara um processo de senescência, exclusivamente em células tumorigênicas (Costa *et al.*, 2008).

O principal foco deste trabalho é o estudo das células Y1, que são células derivadas de tumor do córtex da glândula adrenal. Desta forma, tornou-se bastante interessante compará-las à cultura primária de células adrenocorticais não transformadas.

O padrão de expressão de mRNA dos receptores FGFRs foi analisado por RT-qPCR nas células de cultura primária do córtex da glândula adrenal de ratos. As amostras de RNA foram cedidas pela doutoranda Gabriele E. Mattos, do laboratório da Profa. Dra. Claudimara F. Lofti, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (item 3.10).

Verificou-se que os receptores de FGF seguem o seguinte padrão de expressão: FGFR2 > FGFR1 > FGFR3 > FGFR5 (figura 4.27C). Apesar do mesmo padrão, numa análise geral, as células glomerulosas apresentam maior expressão de todos os receptores quando comparadas às células fasciculadas/reticulares.

Comparando-se as células tumorais com as da cultura primária, constatamos que expressam inversamente os receptores FGFR1/FGFR2 e FGFR3/FGFR5.

Como os efeitos mitogênicos e citotóxicos de FGF2 dependem totalmente da Tyr-quinase dos receptores FGFRs (itens 4.1, 4.3 e 4.4), o FGFR5, que não possui domínios de Tyr-quinase, pode ser ignorado.

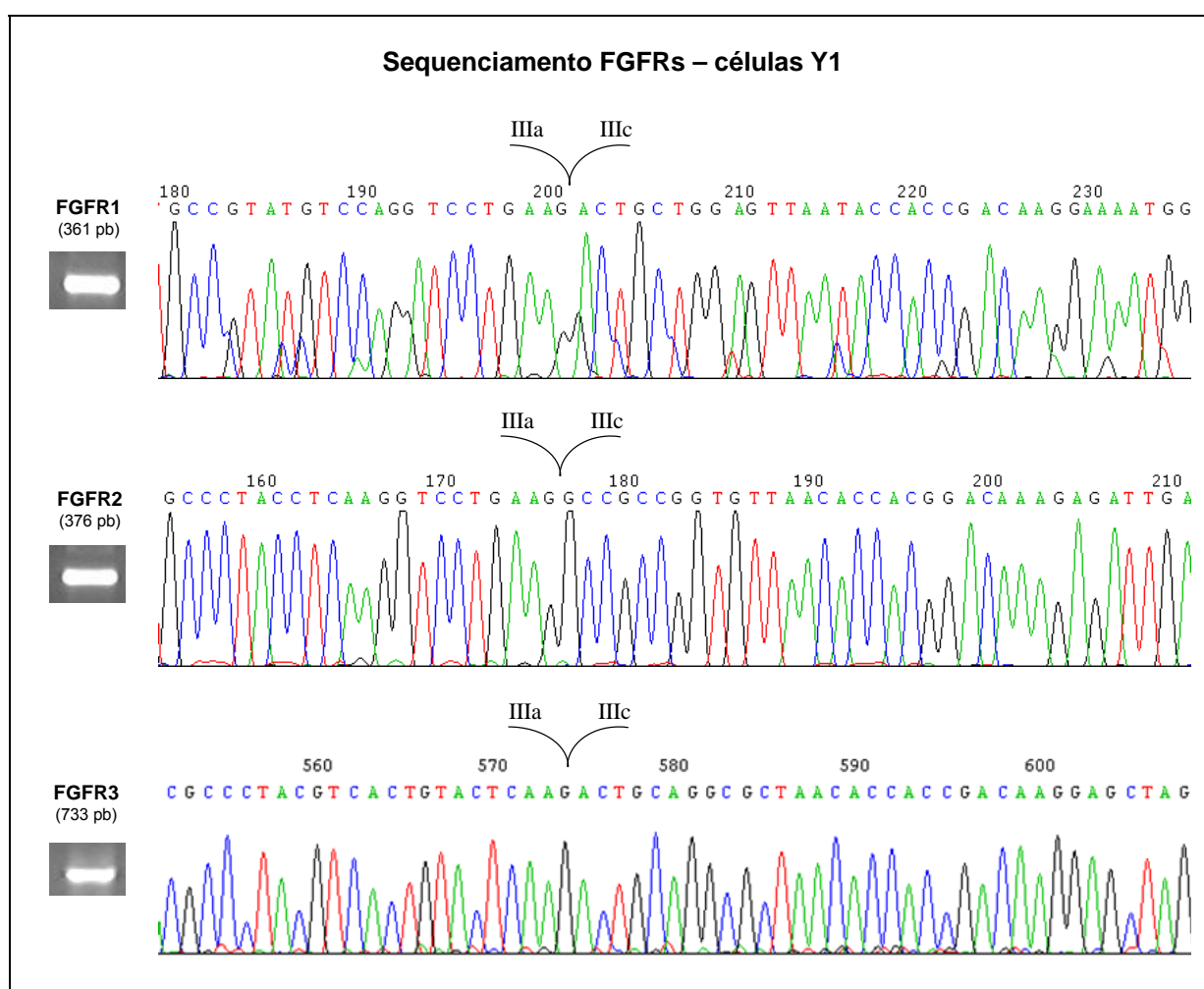


Figura 4.26| Sequenciamento do fragmento de PCR dos receptores FGFR1, FGFR2 e FGFR3 de células Y1. Em destaque, detalhe da junção dos éxons 7 e 9, respectivamente, regiões Ig-like IIIa e IIIc dos receptores de FGF.

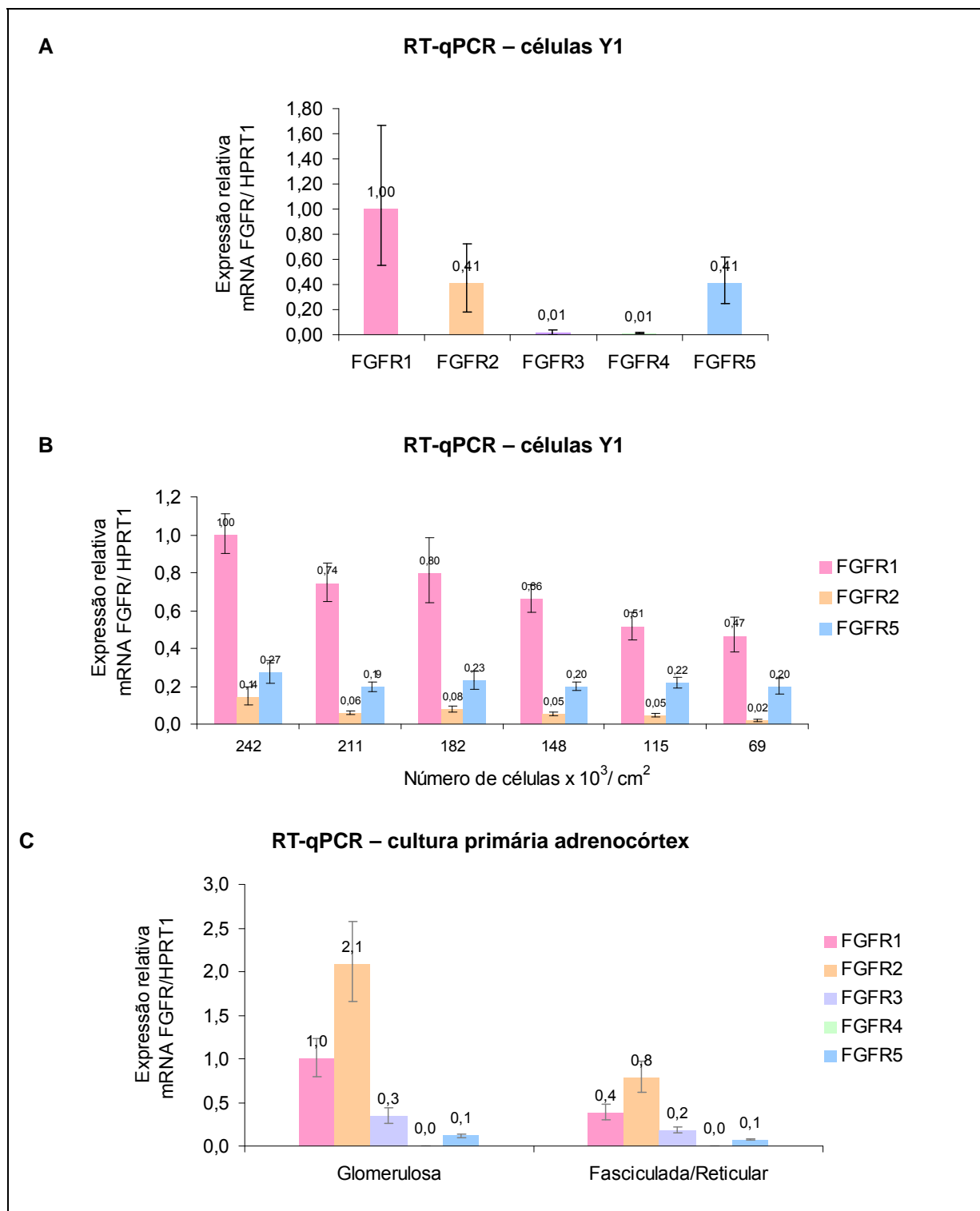


Figura 4.27| A| RT-qPCR dos receptores presentes em células Y1. Os receptores mais expressos são: FGFR1, FGFR2 e FGFR5. qPCR em duplicata, n=3. **B|** A expressão dos mRNA dos receptores FGFR1 e FGFR2 é dependente da confluência celular. Foram plaqueadas no dia 0: 140, 120, 100, 80, 60, 40 x 10³ células/p60, respectivamente. As amostras de RNA foram coletadas 24 h depois. mRNA de qPCR em duplicata, n=1. **C|** Células de cultura primária de adrenocórtex de rato: região glomerulosa e fasciculada/reticular. qPCR em duplicata, n=2.

A técnica de RNAi foi utilizada para investigar se havia especificidade entre os receptores de FGF quanto à toxicidade e mitogenicidade de FGF2. Para tanto, foram feitas transfecções estáveis em Y1, utilizando-se os plasmídeos pSUPER-FGFR1A e pSUPER-FGFR1B para *knockdown* do receptor FGFR1, pSUPER-FGFR2A para o receptor FGFR2, pSUPER-FGFR3A para o receptor FGFR3 (item 3.1, 3.1.1, tabelas 3.1 e 3.2). Como controle positivo, foram feitas transfecções somente com pX343 e, como controle negativo, células Y1 não foram transfectadas. Ao longo de cinco semanas, as células foram submetidas à seleção por resistência à higromicina B e, então, os clones de Y1 foram isolados.

Na tabela 4.2, está o resultado dos clones obtidos nas transfecções independentes, utilizando-se os plasmídeos pSUPER-FGFR1A e pSUPER-FGFR1B. Os clones obtidos a partir da linhagem Y1 foram analisados por RT-PCR. Pode-se observar (figura 4.28), que as sublinhagens obtidas não reduziram os níveis de mRNA do FGFR1.

Na tabela 4.3, está o resultado dos clones obtidos das transfecções independentes com pSUPER-FGFR2A. Foram analisados 19 clones obtidos a partir da linhagem Y1 quanto à expressão do mRNA do receptor FGFR2 (figura 4.29). Dos clones que reduziram os níveis de expressão do receptor FGFR2, foram selecionados R2A0.5, R2A1.4 e R2A2.9 para ensaios posteriores (um clone de cada transfecção independente).

Tabela 4.2| Clones obtidos de células Y1 após transfecção com pSUPER-FGFR1A e pSUPER-FGFR1B para redução do receptor FGFR1.

Plasmídio	Número de clones totais	Número de clones selecionados	Número de clones sobreviventes	Nomes dos clones estudados*
pSUPER-FGFR1A	54	10	2	R1A0.2 R1A0.8
pSUPER-FGFR1A	6	6	3	R1A1.1 R1A1.5 R1A1.6
pSUPER-FGFR1B	118	14	13	R1B2.1 R1B2.2 R1B2.3 R1B2.4 R1B2.6 R1B2.7 R1B2.8 R1B2.9 R1B2.10 R1B2.11 R1B2.12 R1B2.13 R1B2.14

* Após análise por RT-PCR, nenhum clone reduziu satisfatoriamente os níveis de expressão do receptor FGFR1.

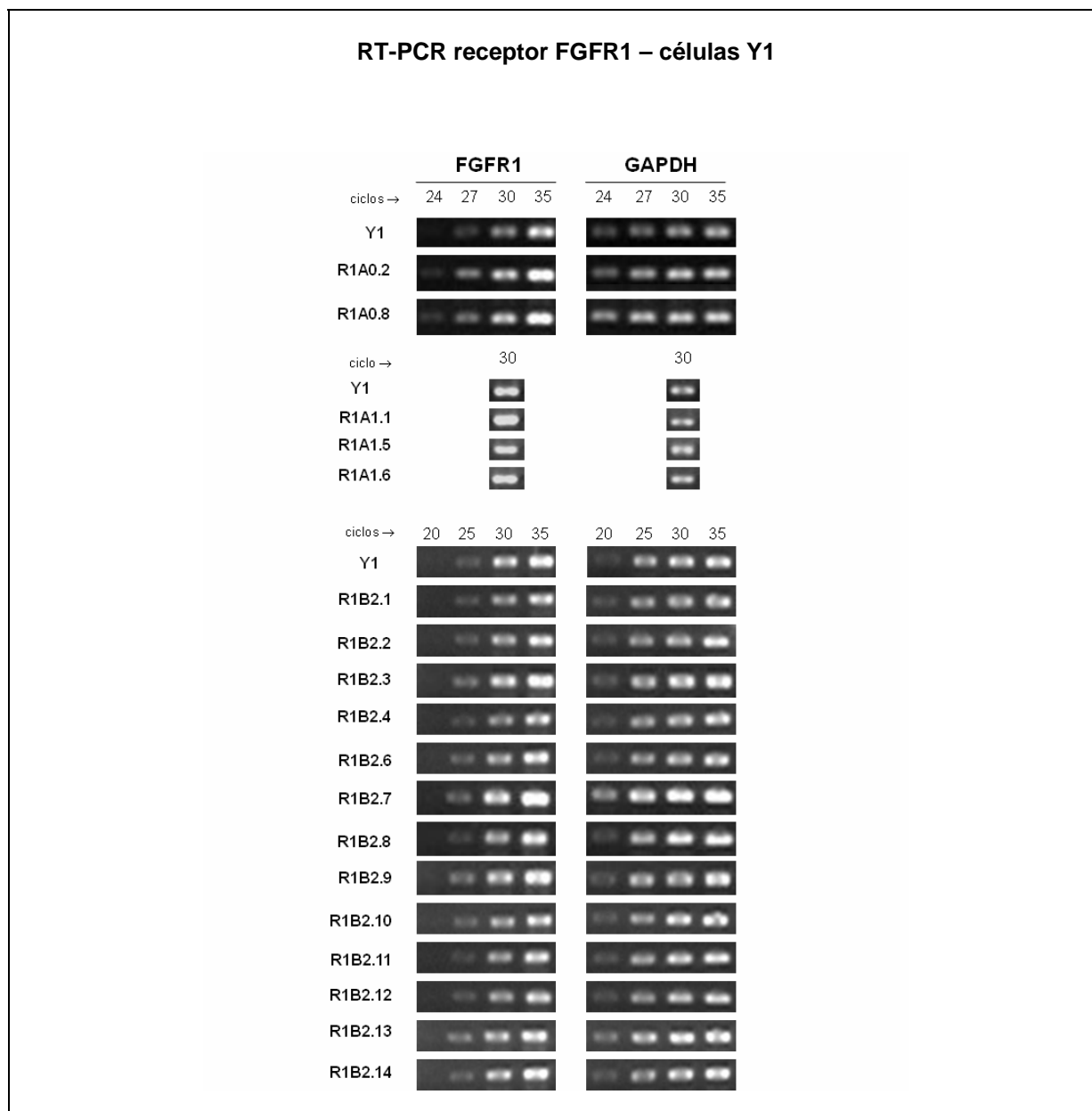


Figura 4.28 RT-PCR semiquantitativo do receptor FGFR1 (361 pb) em clones isolados de Y1 submetidos à RNAi do FGFR1. Como controle foi utilizado o GAPDH (339 pb).

Tabela 4.3| Clones obtidos de células Y1 após transfecção com pSUPER-FGFR2A para redução do receptor FGFR2.

Plasmídio	Número de clones totais	Número de clones selecionados	Número de clones sobreviventes	Nomes dos clones estudados*
pSUPER-FGFR2A	10	8	6	R2A0.1
				R2A0.2 [§]
				R2A0.3 [§]
				R2A0.4
				R2A0.5
				R2A0.7 [§]
pSUPER-FGFR2A	35	19	6	R2A1.1
				R2A1.2
				R2A1.3
				R2A1.4
				R2A1.6
				R2A1.8
pSUPER-FGFR2A	21	15	7	R2A2.2
				R2A2.6
				R2A2.7
				R2A2.8
				R2A2.9
				R2A2.12
				R2A2.14

* Em azul, estão indicados os clones que reduziram a expressão do receptor FGFR2, que foram analisados por RT-PCR. § Estes clones não sobreviveram por mais que 5 passagens.

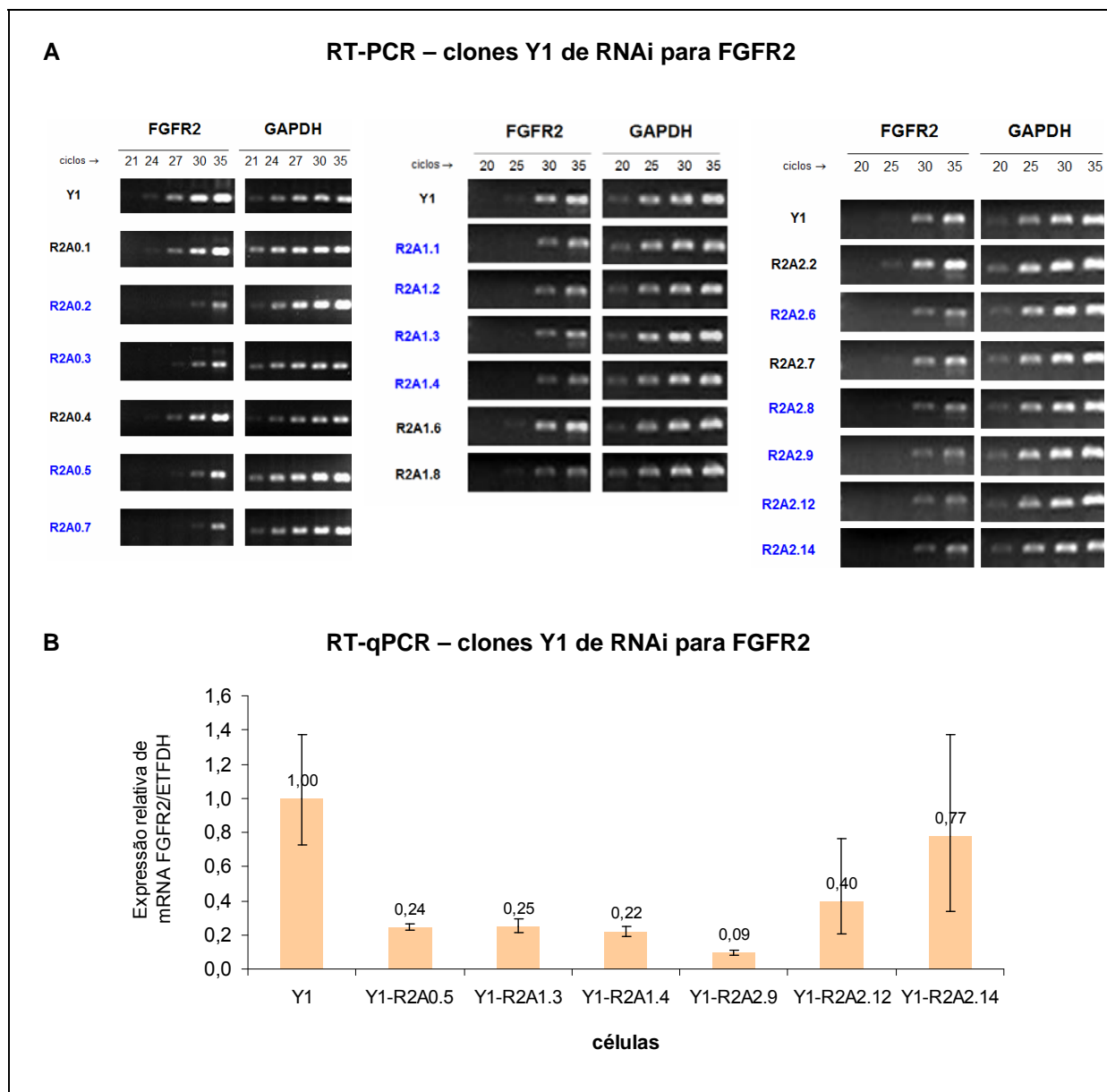


Figura 4.29| A| RT-PCR semiquantitativo do receptor FGFR2 (376 pb) em clones isolados de Y1 submetidos à RNAi do FGFR2. Como controle, foi utilizado o GAPDH (339 pb). Em azul, estão destacados os clones que reduziram os níveis de FGFR2. **B|** Confirmação por RT-qPCR de clones de Y1 selecionados por redução da expressão do mRNA do receptor FGFR2.

Apesar de termos considerado a expressão do receptor FGFR3 negligenciável, também aplicamos RNAi, como forma de controle negativo, já que não esperávamos nenhum efeito deste gene. Na tabela 4.4, está o resultado dos clones obtidos de duas transfecções independentes de pSUPER-FGFR3A. Foram analisados 2 clones obtidos a partir da linhagem Y1. Pode-se observar na figura 4.30A que o clone da primeira transfecção, R3A0.1, reduziu consideravelmente os níveis de expressão do receptor FGFR3. O clone R3A1.10 também foi selecionado para ensaios posteriores (figura 4.30B).

Os clones de RNAi para o receptor FGFR2 (R2A0.5 e R2A1.4) são tão sensíveis quanto à linhagem parental (figura 4.31A), enquanto que o clone R2A2.9 é mais resistente. Como previsto, os clones de RNAi para FGFR3 (R3A0.1 e R3A1.10) são também bastante sensíveis ao efeito de FGF2 (figura 4.31B).

Em células Y1, o receptor mais expresso é o FGFR1, por isso, analisou-se a expressão deste receptor nos clones de RNAi com redução dos receptores FGFR2 e FGFR3. Observou-se que, o clone mais resistente ao FGF2, R2A2.9, intrigantemente, também reduziu a expressão do receptor FGFR1, enquanto que os demais clones a mantiveram semelhante à linhagem parental (figura 4.32A). Observou-se que os clones de RNAi para FGFR3 aumentaram a expressão do receptor FGFR1 (figura 4.32B), enquanto que o FGFR2 se manteve bastante semelhante à linhagem parental. Parece haver um mecanismo de compensação dos receptores de FGF: quando se altera a expressão de algum receptor, muda-se o padrão de expressão do receptor FGFR1.

Desta forma, o FGFR1 parece ser o receptor principal de ação tóxica do FGF2 em células Y1. Assim, estas células foram transfectadas com siRNAs para redução da expressão do receptor FGFR1.

Foram testadas diversas condições, entre as quais, 72 h de transfecção foram suficientes para redução de 91% do mRNA do FGFR1 no siRNA- FGFR1 #2 e 66% do mRNA do FGFR1 no siRNA-FGFR1 #3 (figura 4.33A). Na figura 4.33B, observa-se o efeito morfológico causado por FGF2, que é parcialmente reduzido com a transfecção de siRNA para FGFR1, confirmando sua importância na via de toxicidade de FGF2 em células Y1.

Tabela 4.4| Clones obtidos de células Y1 após transfecção com pSUPER-FGFR3A para redução do receptor FGFR3.

Plasmídeo	Número de clones totais	Número de clones selecionados	Número de clones sobreviventes	Nomes dos clones estudados*
pSUPER-FGFR3A	1	1	1	R3A0.1
				R3A1.1
				R3A1.2
				R3A1.3
				R3A1.7
pSUPER-FGFR3A	40	12	9	R3A1.8
				R3A1.9
				R3A1.10
				R3A1.11
				R3A1.12

* Em azul, estão indicados os clones que reduziram a expressão do receptor FGFR3, que foram analisados por RT-PCR.

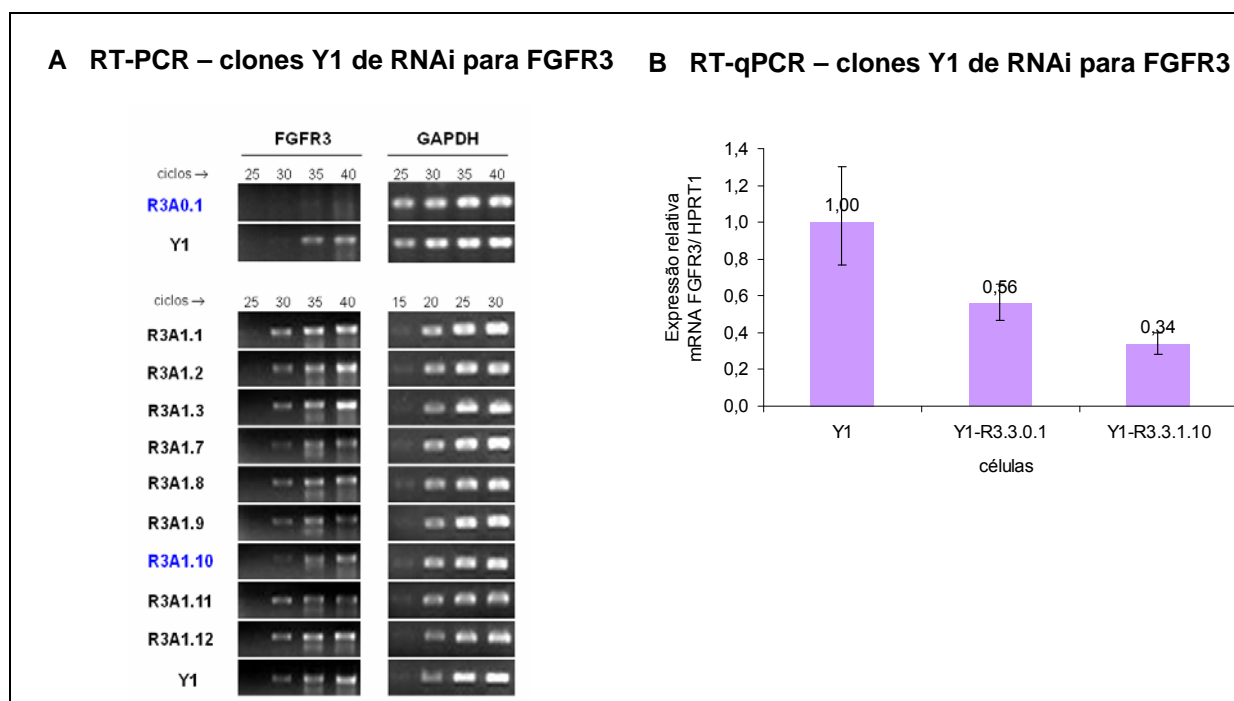


Figura 4.30| A| RT-PCR semiquantitativo do receptor FGFR3 (733 pb) em clones isolados de Y1 submetidos à RNAi do FGFR3. Como controle, foi utilizado o GAPDH (339 pb). Em azul estão destacados os clones que reduziram os níveis de FGFR3. **B|** Confirmação por RT-qPCR dos clones de Y1 selecionados por redução da expressão do mRNA do receptor FGFR3.

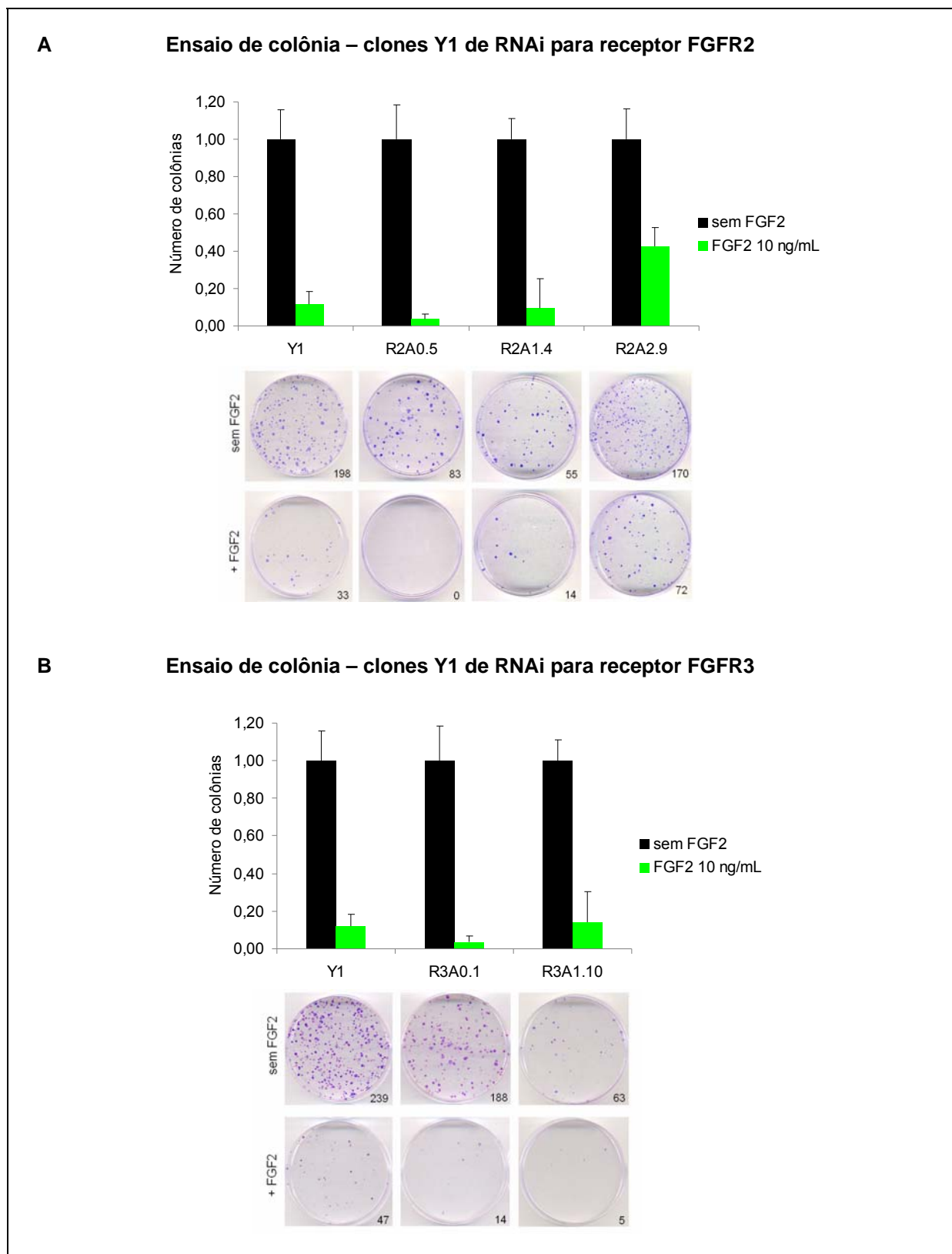


Figura 4.31 | Ensaio de formação de colônia na presença de FGF2 em células Y1. Foram plaqueadas 50-250 células/cm², n=3-5. Foto representativa de cada experimento. **A** | Clones isolados com reduzida expressão do receptor FGFR2 por RNAi. **B** | Clones isolados com reduzida expressão do receptor FGFR3 por RNAi.

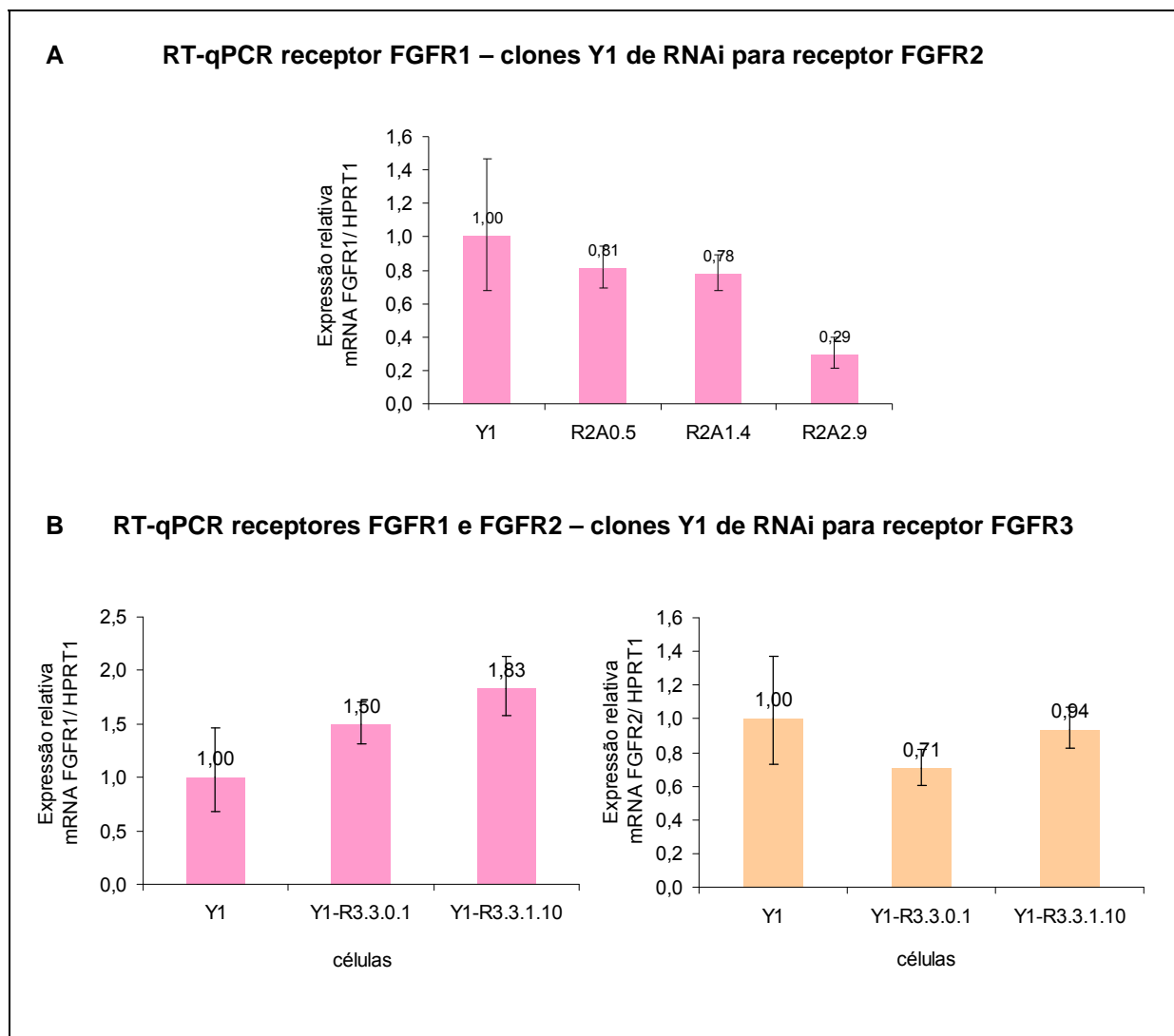


Figura 4.32| A| Análise da expressão do mRNA do receptor FGFR1 por RT-qPCR em células Y1 e clones isolados com reduzida expressão do receptor FGFR2 por RNAi. **B|** Análise da expressão do mRNA do receptor FGFR1 e FGFR2 por RT-qPCR em células Y1 e clones isolados com reduzida expressão do receptor FGFR3 por RNAi.

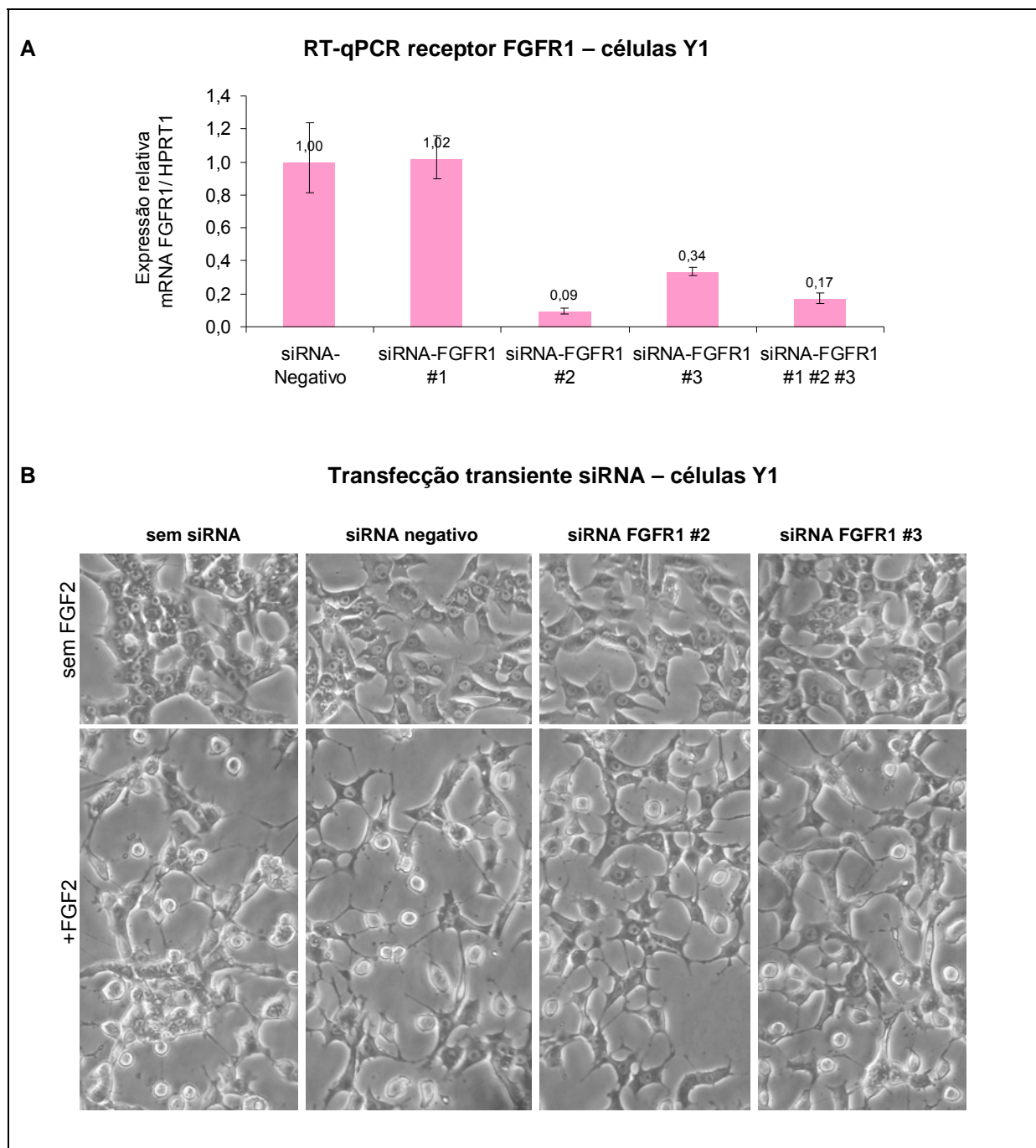


Figura 4.33 | Análise da expressão do mRNA do receptor FGFR1 por RT-qPCR após 72 h de transfecção de siRNA controle negativo e siRNAs para FGFR1 200 nM. **B** | Análise morfológica das células Y1 após 72 h de transfecção de siRNA controle negativo e siRNAs para FGFR1 200 nM. O FGF2 10 ng/mL foi adicionado nas últimas 24 h.

4.9 FGFR1IIIc também é o receptor dominante na ação antitumoral de FGF2 em células 3T3-B61.

Devido à importância destacada para a via Tyr-quinase dos receptores de FGF, estudamos também a presença dos mRNAs dos receptores FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4 e FGFR5, por RT-qPCR, na linhagem celular parental Balb 3T3 e sublinhagem 3T3-B61, transformada por *HRAS^{V12}* (figura 4.34). Para identificação da isoforma de *splicing* alternativo da região semelhante à Ig (IIIb ou IIIc) dos receptores FGFR1, FGFR2 e FGFR3 na linhagem Balb 3T3, os fragmentos de PCR correspondentes aos mesmos foram sequenciados e as isoformas presentes são FGFR1IIIc, FGFR2IIIc e FGFR3IIIc (figura 4.35A), as quais correspondem à origem embrionária mesenquimal destes fibroblastos. O receptor FGFR1 também foi sequenciado em 3T3-B61 e a isoforma presente é FGFR1IIIc (figura 4.35B).

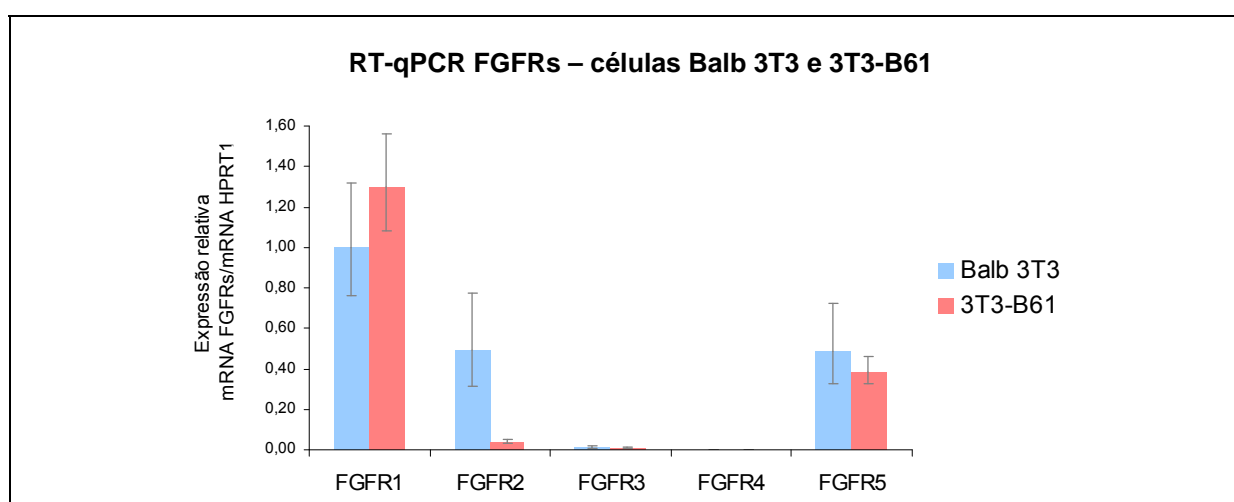


Figura 4.34 | Análise d RT-qPCR dos receptores presentes em células Balb 3T3 e 3T3-B61. mRNA de HPRT1 foi utilizado como controle. qPCR em triplicata, resultado representativo de 3 experimentos independentes.

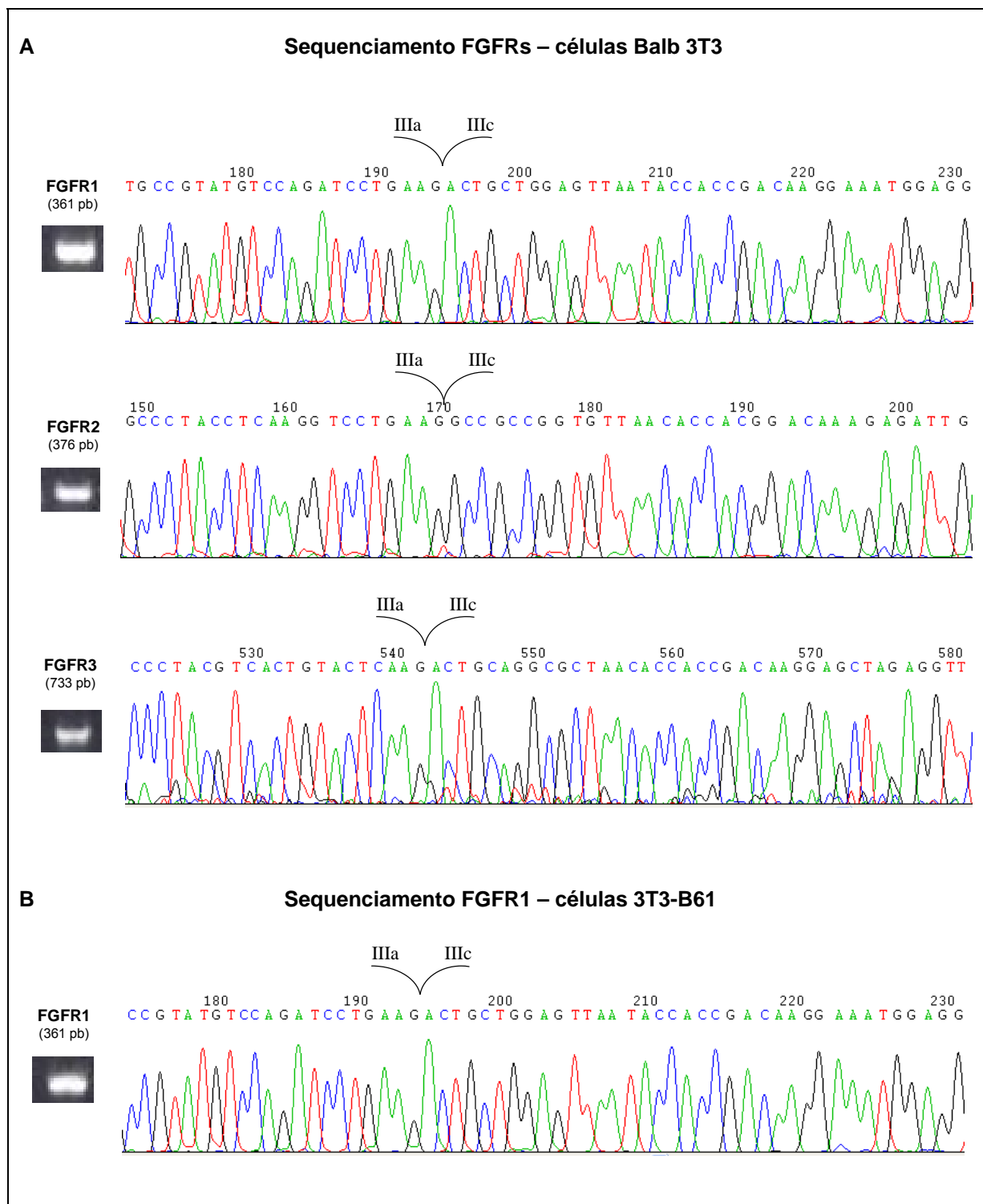
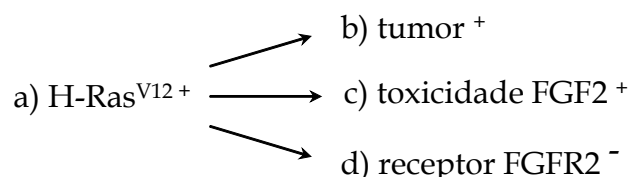


Figura 4.35| A| Sequenciamento do fragmento de PCR dos receptores FGFR1, FGFR2 e FGFR3 da linhagem parental Balb 3T3. **B|** Sequenciamento do fragmento de PCR do receptor FGFR1 da sublinhagem 3T3-B61. Em destaque, detalhe da junção dos éxons 7 e 9, respectivamente, regiões Ig-like IIIa e IIIc dos receptores de FGF.

Essencialmente, os receptores FGFR1, FGFR2 e FGFR5 são os únicos expressos em Balb 3T3, enquanto que, em 3T3-B61 e 3T3-EJA (outra sublinhagem transformada por *HRAS^{V12}*), a expressão se reduz a FGFR1 e FGFR5 (figura 4.36), cujas expressões mantêm o mesmo nível da parental Balb 3T3. O clone não tumorigênico B61-FRes1, derivado de células 3T3-B61, foi selecionado por ser resistente ao FGF2 (Costa & Armelin, 2005). Este clone é um revertente que perdeu totalmente as cópias do transoncogene *HRAS^{V12}* e restaurou a expressão do receptor FGFR2 (figura 4.36A e 4.36B).

Desta forma, os dados mostram correlação entre os seguintes traços fenotípicos: a) expressão de H-Ras^{V12}; b) tumorigênese; c) alta sensibilidade à toxicidade de FGF2 e d) redução drástica na expressão do receptor FGFR2. Esta correlação pode ser admitida devido à relação causal:



Não está claro se b), c) e d) são traços fenotípicos independentes entre si. Particularmente, é de interesse imediato saber se o receptor FGFR2 faz diferença na resposta celular ao FGF2, o que implicaria numa relação de causa/efeito. Esta pergunta foi investigada com a superexpressão de FGFR2 em 3T3-B61.

Para tanto, foram geradas duas linhagens policlonais denominadas B61-FGFR2cA e B61-FGFR2cB, expressando o receptor FGFR2 isoforma IIIc, através da

transfecção do plasmídeo pcDNAI-FGFR2IIIc, e uma linhagem policlonal transfectada com pcDNA3.1, denominada B61-controle (item 3.1, tabela 3.1).

A expressão do receptor FGFR2, nas linhagens policlonais, é semelhante à da linhagem parental Balb 3T3, enquanto que a expressão de H-Ras^{V12} não se alterou em comparação à 3T3-B61 (figura 4.37A e 4.37B). Ambas as linhagens policlonais, expressando o receptor FGFR2IIIc, são igualmente sensíveis à toxicidade do FGF2, enquanto a linhagem parental Balb 3T3 não o é (figura 4.37C).

Estes resultados mostram que a toxicidade do FGF2 é independente do receptor FGFR2. Como o FGFR5 não possui domínio de Tyr-quinase, o receptor FGFR1 é o suficiente para o disparo da toxidez por FGF2 em células 3T3-B61, já que o inibidor de Tyr-quinase dos receptores de FGF (PD17307) as protege completamente do efeito citotóxico de FGF2 (item 4.1).

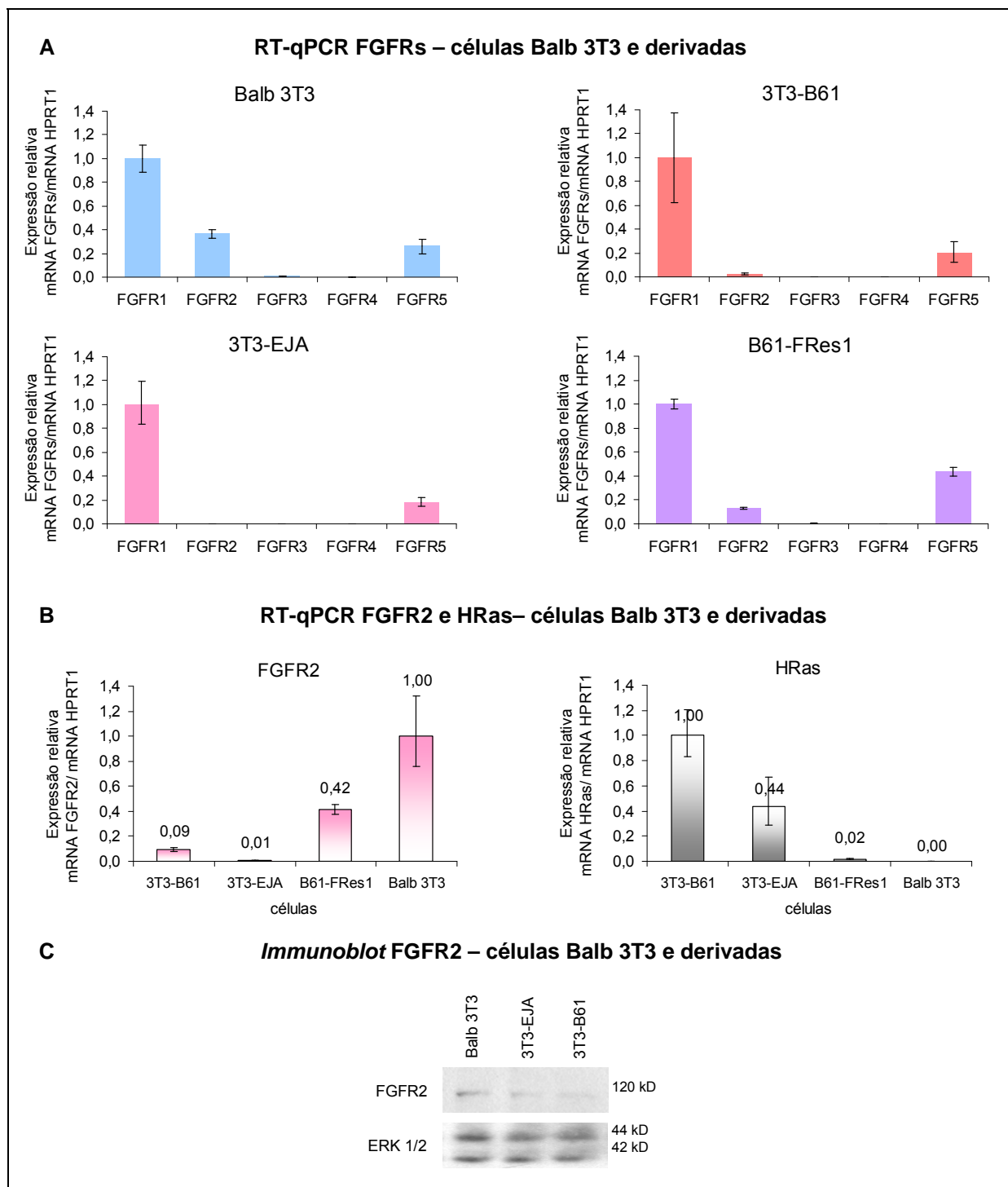


Figura 4.36| A) RT-qPCR dos receptores presentes em células Balb 3T3, 3T3-B61, 3T3-EJA e B61-FRes1. mRNA de HPRT1 foi utilizado como controle. qPCR em duplicata, resultado representativo de 2 experimentos independentes. **B)** RT-qPCR de mRNA de receptor FGFR2 e H-RasV12 em células 3T3-B61, 3T3-EJA, B61-FR1 e Balb 3T3. mRNA de HPRT1 foi utilizado como controle. qPCR em duplicata, resultado representativo de 2 experimentos independentes. **C)** *Immunoblot* de receptor FGFR2 em Balb 3T3, 3T3-B61 e 3T3-EJA. Como controle, foi utilizada expressão de ERK1/2 total. Resultado representativo de 2 experimentos independentes.

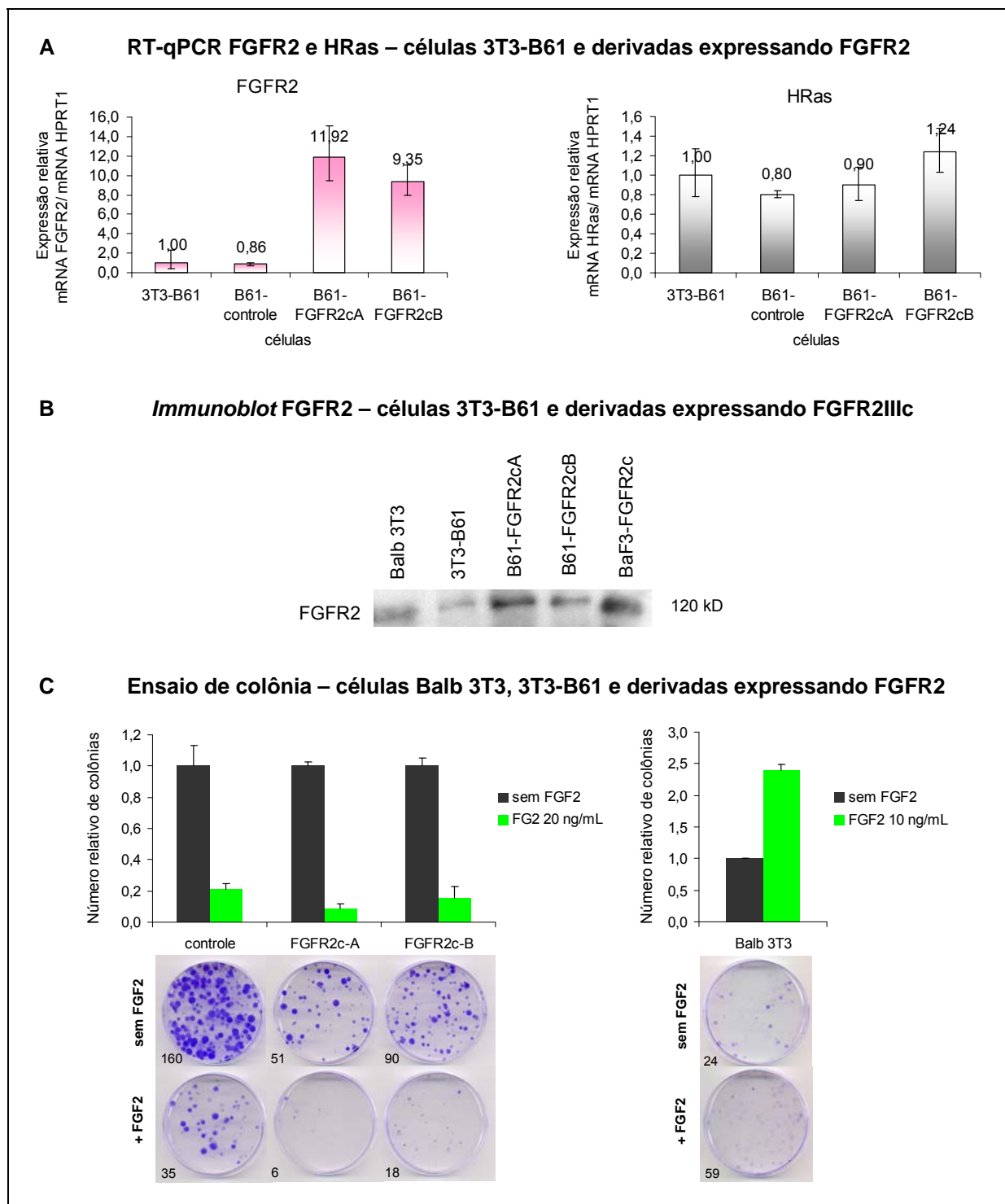


Figura 4.37 | **A**] RT-qPCR de receptor FGFR2 e H-Ras^{V12} em 3T3-B61, B61-controle, B61-FGFR2cA e B61-FGFR2cB. mRNA de HPRT1 foi utilizado como controle. **B**] *Immunoblot* de receptor FGFR2 em Balb 3T3, 3T3-B61, B61-FGFR2cA, B61-FGFR2cB e B61-controle. A célula BaF3-FGFR2c foi utilizada como controle para a expressão do receptor FGFR2. **C**] Ensaio de formação de colônia na presença de FGF2 em 3T3-B61, B61-controle, B61-FGFR2cA, B61-FGFR2cB e Balb 3T3. Foram plaqueadas 25 células/cm². O meio foi renovado após 24 h do tratamento. O número de colônias está indicado no canto inferior esquerdo de cada placa. Experimento realizado em duplicata, n=1.

5 Discussão

5.1 FGF2 dispara um processo de estresse nas células malignas transformadas por Ras.

Recentemente, descrevemos uma nova atividade citotóxica de FGF2 parácrino, que dispara um mecanismo inibitório de proliferação nas células tumorais Y1 e 3T3-B61, transformadas malignamente por Ras (Costa *et al.*, 2008). Nesta tese, estudamos os mecanismos celulares e moleculares desta resposta de estresse irreversível disparada por FGF2.

As células malignas adrenocorticais Y1 e os fibroblastos transformados 3T3-B61 sofrem diferentes tipos de desregulação do ciclo celular. As células Y1, derivadas de tumor adrenocortical funcional de camundongo (Yasumura *et al.*, 1966), possuem uma amplificação do gene *Kras2*, uma elevada expressão da proteína K-Ras (Schwab *et al.*, 1983) e, conseqüentemente, também da sua forma ativada K-Ras-GTP (Forti *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2003). Os altos níveis de K-Ras-GTP mantêm ativa a via antiapoptótica de PI3K/AKT (Forti *et al.*, 2002; Forti *et al.*, 2006; Forti & Armelin, 2007), mas não a via de ERK 1/2 (Rocha *et al.*, 2003; Schwindt *et al.*, 2003; Lofti *et al.*, 1997). Assim, tanto soro quanto FGF2 promovem a progressão do ciclo celular: G0/G1 → S, ativando a via ERK 1/2 → ciclina E/Cdk2 → fosforilação de Rb → expressão dos genes *Fos* e *Jun* (Lofti & Armelin, 2001). Além disso, há uma lesão no controle da fase G1 que leva à expressão simultânea das ciclinas D1 e E, ao invés de serem induzidas sequencialmente (Costa *et al.*, 2008). As células 3T3-B61, derivadas

de fibroblastos Balb 3T3, transformados com *HRAS^{V12}* (Kovary *et al.*, 1989), possuem altos níveis de H-Ras-GTP e são tumorigênicas (Rocha & Armelin, 1994; dados não publicados de Kátia M. Rocha & Hugo A. Armelin). Foi descrito que a transformação maligna por Ras nas células 3T3 leva ao silenciamento dos genes *Fos* e *Fosb* e à expressão constitutiva de ciclina D1, desregulando o ciclo celular (Rocha & Armelin, 1994; Mechta *et al.*, 1997). De fato, quando as células 3T3-B61 são carenciadas e, então, estimuladas com soro ou FGF2, ERK 1/2 são pouco fosforiladas e por um curto período, genes imediatos como *Fos* e *Fosb* não são induzidos e a ciclina D1 é expressa constitutivamente (Kátia M. Rocha & Hugo A. Armelin, dados não publicados).

Entretanto, apesar destas diferenças no descontrole do ciclo celular, ambas as linhagens Y1 e 3T3-B61 estão sujeitas ao estresse induzido por FGF2 de maneira bastante semelhante, apresentando inibição da proliferação (figura 4.1A e 4.4A), inibição da formação de colônias (figura 4.1B e 4.4B) e alterações morfológicas (figura 4.3), que sugerem um efeito estressante, em grande contraste com soro, que promove o crescimento destas células. Este fenômeno não se caracteriza como apoptose ou necrose, pois é independente de ativação de caspases, não há fragmentação no DNA, não há marcação para anexina (Costa *et al.*, 2008) e, além disso, não há ruptura da membrana plasmática e as células mantêm-se ativas metabolicamente (figura 4.6). Entretanto, este fenômeno é semelhante à senescência (Costa *et al.*, 2008).

A senescência pode ocorrer em células normais em cultura, após cultivo serial *in vitro*, e recentemente, foi demonstrado que a senescência pode ser disparada por estímulos de estresse severos em células normais, como a expressão de oncogenes ativos (como *Ras* e *Myc*), perda de proteínas supressoras de tumor,

estresse oxidativo, dano no DNA ou encurtamento de telômeros, que irreversivelmente bloqueiam o ciclo celular na fase G1, impedindo a entrada em S (revisado por Campisi, 2005).

Numa análise de ciclo celular das células Y1, por incorporação de BrdU, nossos resultados anteriormente publicados mostraram que FGF2 exerce sua conhecida ação mitogênica de estimular a transição G0/G1 → S (Armelin *et al.*, 1977; Rocha *et al.*, 2003). Mas, nesta tese, mostramos que FGF2 dispara também um mecanismo antagônico, bloqueando a progressão celular nas fases S e G2/M (figuras 4.7 e 4.8). Observamos por ensaios de incorporação de ³H-timidina, que este efeito antagônico de FGF2 é disparado nas primeiras horas de G1 (figura 4.9), mas o bloqueio do ciclo celular é tardio, ocorrendo após as células iniciarem a progressão da fase S.

O processo de senescência induzida por oncogenes envolve as vias de Trp53/Cdkn1a e Cdkn2a/Rb (revisado por Campisi, 2005). Sabe-se que os inibidores de CDK (Cdkn) funcionam como reguladores negativos da progressão do ciclo celular. Em particular, *Cdkn1a* (Cip1/p21) está associado com a transição G1 → S em resposta à estimulação de fatores de crescimento (revisado por Sherr & Roberts, 1999). *Cdkn2a* codifica para, pelo menos, 3 variantes de *splicing* alternativo, sendo que 2 isoformas funcionam como inibidoras da quinase CDK4 (INKa e INKb). O outro transcrito inclui um éxon à montante e contém uma janela de leitura alternativa (ARF), cujo produto não é relacionado estruturalmente com os produtos das outras variantes. O produto ARF funciona como um estabilizador da proteína supressora de tumor Trp53, que interage e sequestra MDM1, uma proteína responsável pela

degradação de Trp53. Apesar das diferenças, as isoformas inibidoras de CDK e ARF compartilham uma funcionalidade comum no controle de G1, podendo levar à parada do ciclo celular (revisado por Kim & Sharpless, 2006). Entretanto, a parada no ciclo celular causada pela resposta de estresse de FGF2 parece não depender da via de Cdkn2a/Rb e Trp53/Cdkn1a. Nas células Y1, previamente sincronizadas em G0/G1, tanto soro quanto FGF2 fosforilam Rb e a expressão de *Cdkn1a* é induzida, mas a expressão de *Trp53* é reprimida (figura A1 – Anexo I). Estes resultados indicam que mais estudos ao nível proteico serão necessários para determinar a atividade da via Trp53/Cdkn1a e também de Cdkn2a. Como nas células Y1, não parece que a via de Trp53/Cdkn1a participa da parada do ciclo celular por FGF2 nas células 3T3-B61, já que as sublinhagens, classicamente transformadas com SV40, também foram susceptíveis ao efeito nocivo de FGF2 em ensaios de colônia (Tatiana G. F. Matos & Hugo A. Armelin, dados não publicados), apesar da inativação da via Trp53/Cdkn1a pelo antígeno T SV40 nestas células transformadas. Assim, a via funcional Trp53/Cdkn1a parece desnecessária para disparar a resposta de estresse de FGF2 nas células malignas 3T3.

As respostas celulares aos sinais externos requerem um controle coordenado de módulos de redes sinalizadoras e metabólicas, específicas para cada tipo celular. Qualquer processo que desbalanceie esta coordenação fina resulta numa superativação ou desativação das respostas celulares. É o que acontece, por exemplo, no caso da transformação maligna, onde uma série de eventos leva à proliferação celular descontrolada. A evolução do câncer é mais complexa do que o acúmulo linear de mutações oncogênicas. Os sinais proliferativos potencialmente oncogênicos

estão acoplados a uma variedade de barreiras ou processos inibitórios de crescimento, como a indução da apoptose, diferenciação ou senescência, restringindo a expansão clonal e evolução neoplásica (revisado por Evan & Vousden, 2001). A transformação maligna requer a superação destas barreiras, que protegem as células e organismos da proliferação maligna descontrolada. Nós propomos esta senescência induzida por FGF2 como um novo exemplo de defesa antitumoral, por um mecanismo não esperado dependente de RhoA e independente das vias de Trp53 e Cdkn2a/Rb (Costa *et al.*, 2008).

Esta proposta parece contrariar as conjecturas a respeito do FGF2, que é mais descrito na literatura como um fator mitogênico, angiogênico (revisado por Presta *et al.*, 2008) e antiapoptótico e, por isso, potencialmente oncogênico (Neufeld *et al.*, 1988; Maret *et al.*, 1995; Polnaszek *et al.*, 2003; Pardo *et al.*, 2006; Ribatti *et al.*, 2007; Sahni *et al.*, 2008; Giulianelli *et al.*, 2008; Ohshima *et al.*, 2009). Apesar destes relatos, é possível que os altos níveis de FGF2 endógenos em tumores sejam simplesmente uma consequência da superprodução de fatores antitumorais, superados conforme a progressão do câncer. As células tumorais Y1 produzem FGF2 endogenamente. No entanto, FGF2 não é encontrado no meio de cultura, e nem poderia, pois um FGF2 autócrino deveria inviabilizar estas células. Diferentemente de outros fatores, como PDGFs, que são produzidos e encontrados em abundância no meio das células Y1, mas não ativam as vias mitogênicas, já que estas células possuem uma expressão baixíssima dos receptores PDGFR α e PDGFR β (resultados não publicados de Paulo Lee Ho, Eico Kimura e Hugo A. Armelin; Rebustini & Armelin, 2003).

Outros trabalhos relatam que FGF2 pode inibir a proliferação celular, através da indução de mecanismos de apoptose (Sahni *et al.*, 2001; Westwood *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 2004), ou ainda, que FGF2 pode induzir uma parada no ciclo celular em G1 (Aikawa *et al.*, 2001; Krejci *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2006), ou em G2, num mecanismo que pode envolver a regulação da fosforilação de Cdc25C (Smits *et al.*, 2000). Mas, estes aludidos mecanismos moleculares das ações heterodoxas de FGF2 não foram de fato estabelecidos e aguardam soluções mais definitivas.

De qualquer forma, estes relatos da literatura sugerem que o FGF2 pode ser um fator pleiotrópico, cujos efeitos podem variar com o tipo celular e o estado fisiológico das células. A hipótese de que o FGF2 tem um papel antitumoral é de interesse indiscutível e seu estudo faz parte da agenda atual da biologia do câncer. Somente a elucidação dos mecanismos moleculares e celulares das ações sinérgicas e antagônicas de FGF2 no controle do ciclo celular e da proliferação observadas em múltiplas linhagens celulares descritas proporcionará o entendimento do papel da sinalização por FGF2 na origem e progressão dos tumores humanos. O trabalho relatado nesta tese é um avanço significativo nessa direção.

5.2 A atividade das Tyr-quinases dos receptores de FGF é fundamental para a mitogenicidade e toxicidade do FGF2.

Os fenômenos antagônicos de mitogênese e citotoxicidade disparados por FGF2 iniciam-se nos receptores transmembranares de FGF, exclusivamente através da atividade de Tyr-quinase desses FGFRs.

O bloqueio da atividade de Tyr-quinase com inibidor específico (PD173074) impede a ativação de ERK 1/2 por FGF2, mas não interfere na ação do soro (figura 4.16). Além disso, PD173074 protege as células da toxidez do FGF2 em ensaios de proliferação (figuras 4.1A e 4.4A), formação de colônia (figuras 4.1B, 4.2, 4.4B e 4.5), da alteração morfológica de estresse (figuras 4.3), da parada da progressão de S e em G2/M (figuras 4.7 e 4.8) e do bloqueio da síntese de DNA induzida por soro, desde que adicionado até duas horas depois do FGF2 (figura 4.10).

O perfil de expressão dos receptores de FGF na linhagem Y1 varia em função da densidade celular (figura 4.27B) e é dominado pelo FGFR1IIIc, FGFR2IIIc e FGFR5 (figuras 4.26 e 4.27A), enquanto que, em 3T3-B61, os receptores presentes são FGFR1IIIc e FGFR5 (figura 4.34 e 4.35B). Como o domínio de Tyr-quinase está ausente em FGFR5, concluímos que este receptor é irrelevante para os processos mitogênicos e citotóxicos disparados por FGF2 nestas células. FGFR5 poderia funcionar como um “sequestrador” de FGF2 do meio extracelular, modulando a via de sinalização de FGF2, mas esta possibilidade é muito improvável nas condições experimentais exploradas nesta tese. No entanto, na literatura, há muita especulação e pouca comprovação a respeito de receptores de FGF na matriz extracelular desempenhando algum papel inibitório.

Em Y1, a redução do receptor FGFR2, por expressão estável de shRNAs, não interferiu na resposta citotóxica induzida por FGF2 (figura 4.31A), enquanto que, apesar de não obtermos nenhum clone com redução do FGFR1 por expressão estável de shRNAs (tabela 4.2), a transfecção transiente de siRNAs mostrou alguma proteção das células contra o FGF2 (figura 4.33). Como em 3T3-B61, o receptor FGFR1 é

praticamente o único expresso, com domínio de quinase, concluímos, então, que o FGFR1IIIc é o principal responsável pelas ações do FGF2 em ambas as células estudadas. Além disso, o FGF2 tem maior afinidade pelo receptor FGFR1IIIc, em relação ao FGFR2IIIc (Ornitz *et al.*, 1996).

Observamos também que Ras ativo interfere no padrão de expressão dos receptores em ambas as células Y1 e 3T3-B61. Os resultados mostram uma correlação entre os seguintes traços fenotípicos: altos níveis de Ras (K-Ras ou H-Ras^{V12}, para Y1 e 3T3-B61, respectivamente), tumorigênese, alta sensibilidade à toxicidade de FGF2 e redução drástica na expressão de FGFR2 (figuras 4.27 e 4.36). As células Y1 expressam o FGFR2. Entretanto, quando observamos o padrão de expressão de células de cultura primária, o FGFR2 é mais expresso que FGFR1 (figura 4.27C), diferentemente de Y1, onde FGFR1 é mais expresso que FGFR2 (figura 4.27A). Nas células adrenocorticais normais de cultura primária, o FGF2 é benéfico para ambas as culturas da zona glomerulosa e fasciculada, ativando a via de ERK 1/2 (5 min, *Immunoblot*), induzindo os genes *Fos* e *Jun* (30-60 min, RT-PCR) e provendo sobrevivência (ensaio de MTS) e proliferação celular (dados do grupo da Prof^a Claudimara F. P Lofti, ICB-USP).

Em alguns estudos, o receptor FGFR2 já foi relacionado com melhor prognóstico de tumores e até sugerido como um supressor de tumor (Yamaguchi *et al.*, 1994a; Onose *et al.*, 1999). Por outro lado, a maioria dos trabalhos sobre alterações genéticas de ativação de receptor de FGF evidencia o papel oncogênico da sinalização por FGF (revisado por Beenken & Mohammadi, 2009). Ainda no caso do FGFR2, dois estudos recentes correlacionaram SNPs em um íntron do gene do FGFR2

com uma predisposição para o câncer de mama, por um mecanismo ainda não descrito (Hunter *et al.*, 2007; Easton *et al.*, 2007). As mutações pontuais de ganho de função oncogênica em FGFRs não coincidem necessariamente com a sinalização ativada pelo ligante FGF2. Há exemplos descritos dessa natureza onde mutação em uma das tirosinas críticas do receptor gera atividade tumorigênica (tabela 1.2; Lew *et al.*, 2009). Neste último trabalho, foi demonstrado que a autofosforilação dos domínios de Tyr-quinases é mediada por uma reação sequencial de três estágios, precisamente ordenada, controlada cineticamente, dependendo da estrutura primária e terciária dos aminoácidos nestes domínios de quinase e que esta ordem de fosforilação é prejudicada em certos tumores com mutações de ativação no FGFR1, o que levaria a ativação e ligações aberrantes das moléculas parceiras de sinalização à jusante (Lew *et al.*, 2009). Entretanto, acredito que devemos considerar que, às vezes, alguns receptores exercem um efeito antitumorigênico, como no caso descrito nesta tese e outros supracitados.

Outro ponto importante a ser considerado é a origem embrionária das células estudadas, que vai ditar a presença/atividade dos diferentes tipos de receptores e suas isoformas e das moléculas de transdução de sinal e proteínas-alvo à jusante, que podem alterar a resposta aos FGFs, que são um sinal de comunicação epitélio-mesênquima. Além disso, a desregulação deste sistema de sinalização pode promover a transição epitélio-mesênquima em células tumorais (Chaffer *et al.*, 2006; Acevedo *et al.*, 2007). Assim, ter como alvo terapêutico os receptores FGFRs pode trazer algum benefício clínico somente para aqueles tumores onde a incidência de ganho de função foi comprovada. De qualquer forma, melhorar nosso entendimento

da biologia dos FGFs e seus receptores pode provar-se de grande valor no desenvolvimento de terapias para certos tipos de câncer, bem como de outras doenças genéticas.

5.3 Mecanismos intracelulares disparados por FGF2.

Como relatamos acima, a resposta de estresse de FGF2 depende da atividade de Tyr-quinase do receptor de FGF. Não temos indicações que a ativação dos FGFRs por FGF2 em Y1 (ou mesmo 3T3-B61) seja diferente do conhecido, logo, toda a diferença deve estar à jusante dos FGFRs.

O mecanismo citotóxico disparado por FGF2 não envolve as vias mitogênicas de MEK/ERK, PI3K/AKT e PKC, pois os inibidores destas vias (U0126, LY294002 e Gö6983, respectivamente) não protegem as células da toxidez do FGF2 em ensaios clonogênicos (figuras 4.18, 4.19 e 4.20, respectivamente) e nem na morfologia (figura 4.21), mas reduzem o vazamento em ensaios de ciclo celular (figura 4.22) e de síntese de DNA estimada por tomada de ³H-timidina (figura 4.23).

Além do inibidor de quinase dos receptores de FGF, o inibidor de Src foi o único que também bloqueou, mas de forma parcial, o efeito deletério de FGF2 (figura 4.13), tanto em ensaios de colônia (figura 4.12A), como em ensaios de análise de ciclo celular por citometria de fluxo (figuras 4.14) e síntese de DNA por ³H-timidina (figura 4.15). Além disso, Src constitutivo (figura 4.11) causa desregulação parcial da transição G₀/G₁ → S e mantém um basal alto de síntese de DNA em células Y1.

Portanto, Src propriamente (o primeiro oncogene e Tyr-quinase descritos), ou algum oncogene de sua família, pode ser um contribuinte no processo de transformação maligna das células Y1, intrigantemente, Src também contribui para a sensibilidade destas células à toxidez de FGF2. Estes resultados não tinham sido notados anteriormente. Da mesma forma que para os FGFRs, estes resultados reforçam a ideia de que nem sempre bloquear os chamados “oncogenes” em câncer é o melhor tratamento.

Com intuito de expandir o número de genes envolvidos nos processos antagônicos disparados por FGF2, utilizamos a abordagem de comparação da expressão gênica diferencial entre Y1 e uma sublinhagem derivada, resistente ao FGF2, chamada de Y1-FRes3, que apesar de manter a superexpressão de K-Ras e a via PI3K/AKT constitutivamente ativa, é menos tumorigênica que a parental Y1 e apresenta um fenótipo de resistência parcial ao FGF2 (Costa & Armelin, 2005, figura 4.24A). Y1-FRes3 apresenta um controle estrito da transição reversível quiescência/proliferação e elevada resposta das células sincronizadas em G0/G1 à ação mitogênica de FGF2, que se combina sinergicamente com o soro (Costa & Armelin, 2005, figura 4.24B). Portanto, as células Y1-FRes3 mostram apenas a resposta mitogênica a FGF2 e são imunes à ação inibitória disparada por FGF2 no início de G1 que, nas parentais Y1, leva ao bloqueio tardio da síntese de DNA na fase S induzida por soro, descrito e caracterizado nesta tese (figura 4.9). Por estas diferenças fenotípicas, comparamos os genes induzidos por FGF2 e soro durante as primeiras duas horas de estimulação das células Y1 e Y1-FRes3, sincronizadas G0/G1, por carenciamento de soro.

Previamente, estas células Y1-FRes3 foram comparadas às parentais Y1 na tese de Paula Asprino através de análise da expressão gênica por microarranjos de cDNA (cerca de 1000 genes arbitrariamente escolhidos por lâmina), onde foram descobertos diversos genes envolvidos no fenômeno disparado por FGF2 (Asprino & Armelin, 2006), cuja confirmação era necessária por outra técnica, como qPCR. Numa análise geral de redes transcricionais, em células Y1, na presença de FGF2 por duas horas, genes relacionados a ciclo celular, adesão focal e migração estão induzidos, enquanto que os genes de vias metabólicas, como glicólise/gliconeogênese e síntese de purinas/pirimidinas, estão reprimidos (Asprino & Armelin, 2006). Apesar de aparentemente contraditórios, estes dados estão de acordo com os resultados de nosso laboratório: FGF2 dispara entrada em S, mas bloqueia a continuidade da progressão do ciclo e divisão celular. Além disso, estes resultados (Asprino & Armelin, 2006) (confirmados e ampliados nesta tese, figura 4.25), também motivaram ensaios sobre o papel de RhoA nos processos disparados por FGF2. Demonstramos que esta proteína ativa faz parte do processo citotóxico de FGF2, mas não do mitogênico, já que a expressão do seu dominante negativo ou o inibidor específico foi capaz de bloquear completamente o efeito tóxico de FGF2 (Costa *et al.*, 2008). RhoA é uma GTPase conhecida por estar envolvida na reorganização do citoesqueleto e na migração celular, que pode ser ativada pelo estímulo de fatores de crescimento (revisado por Jaffe & Hall, 2005). A inibição de RhoA atinge a transição $G1 \rightarrow S$, inibindo a proliferação de células normais, imortalizadas ou não, mas não interfere na proliferação das células malignas, inclusive as transformadas por Ras.

A análise nesta tese, em até duas horas de FGF2, apontou para genes pertinentes, diferencialmente expressos entre as duas células (tabela 4.1, figura 4.25). Estes genes pertencem a famílias de fatores de crescimento (*Fgf1, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr5, Pdgfralpha, Pdgfrbeta, Pdgfc*), de controle de ciclo celular (*Rap2a, Cdkn1b, Mad4, Mad111, Mad211, Rgn*), de migração, adesão e citoesqueleto (*Chn2, Arhgef3, Vim, Svi1, Sod3*). Com destaque aos receptores de FGF, observamos que FGFR1 está mais expresso em Y1, enquanto que FGFR2 e FGFR5 estão mais expressos em Y1-FRes3. Novamente, FGFR2 aparece como receptor predominante na linhagem não-tumorigênica. Outro destaque à *Chn2*, uma Rac-GAP, e *Arhgef3*, uma GEF de RhoA e RhoB, que estão mais expressas em Y1. *Vim* e *Svi1* são proteínas de citoesqueleto e estão mais expressas em Y1-FRes3. Todos estes resultados são indicativos dos mecanismos envolvidos no processo disparado por FGF2, que já foram (caso de RhoA) ou serão explorados no nível de atividade proteica.

As observações desta tese de estresse morfológico causado por FGF2 (figura 4.3) estão de acordo com os resultados prévios (Asprino & Armelin, 2006). A modificação morfológica estressante que observamos, além de alterações na adesão celular e também na matriz extracelular, pode ser resultado de alterações de citoesqueleto. Durante a mitose, as células estimuladas para a proliferação passam por alterações estruturais, típicas da passagem pela mitose, como arredondamento, que envolvem alterações de citoesqueleto (revisado por Kunda & Baum, 2009). Por que, afinal, aqui nós relatamos as alterações morfológicas como sintomas de estresse? Poderia ser a mesma resposta já conhecida de alteração morfológica, mas aqui associada à toxidez e não à mitogênese? Apesar dos critérios visuais de análise serem

subjetivos, podemos dizer que estes aspectos morfológicos específicos estão ausentes em células ativadas com soro e que este sintoma de efeito deletério distingue-se das mudanças morfológicas observadas na resposta mitogênica das células normais a FGF2. Além disso, as células estudadas, Y1 e 3T3-B61, não se desprendem simplesmente da placa e, por isso, não conseguem mais crescer. Ensaio de crescimento em agarose demonstraram que, na presença de FGF2, não há crescimento de colônias (Matos & Armelin, 2007). Acredito que um estudo aprofundado das alterações de citoesqueleto, adesões focais e matriz extracelular possa clarificar estes efeitos observados, completando o quebra-cabeça deste novo tipo de defesa antitumoral de FGF2.

Em conclusão, os resultados apresentados apoiam a hipótese de o efeito morfológico estar correlacionado com a toxicidade do FGF2 em ensaios proliferativos, mas ser independente da ativação das vias mitogênicas e da progressão do ciclo celular.

6 Conclusão

FGF2 ativa dois mecanismos antagônicos: 1) assim como soro, FGF2 ativa vias mitogênicas e promove a progressão do ciclo $G0/G1 \rightarrow S$; 2) mas, diferentemente de soro, FGF2 ativa vias de estresse e as células ficam arrestadas em $S \rightarrow G2/M$, por um mecanismo que passa pelas Tyr-quinases dos receptores FGFR1IIIc, pela Tyr-quinase Src e alterações de citoesqueleto, envolvendo RhoA.

Há uma correlação entre os fenótipos: altos níveis de Ras oncogênico, tumorigênese, alta sensibilidade à toxicidade de FGF2 e redução drástica na expressão de FGFR2IIIc, sugerindo que este receptor possa ter um papel supressor de tumor.

Os traços fenotípicos de morfologia aberrante e toxicidade segregam independentemente da estimulação mitogênica, de forma que estes fenótipos devem estar subordinados a mecanismos moleculares paralelos e independentes (figura 6.1). Podemos dizer que o efeito citotóxico predominou sobre o disparo mitogênico, isto é, a decisão celular resultou na inviabilização das células tumorais dependentes de Ras, configurando um papel antitumoral para FGF2.

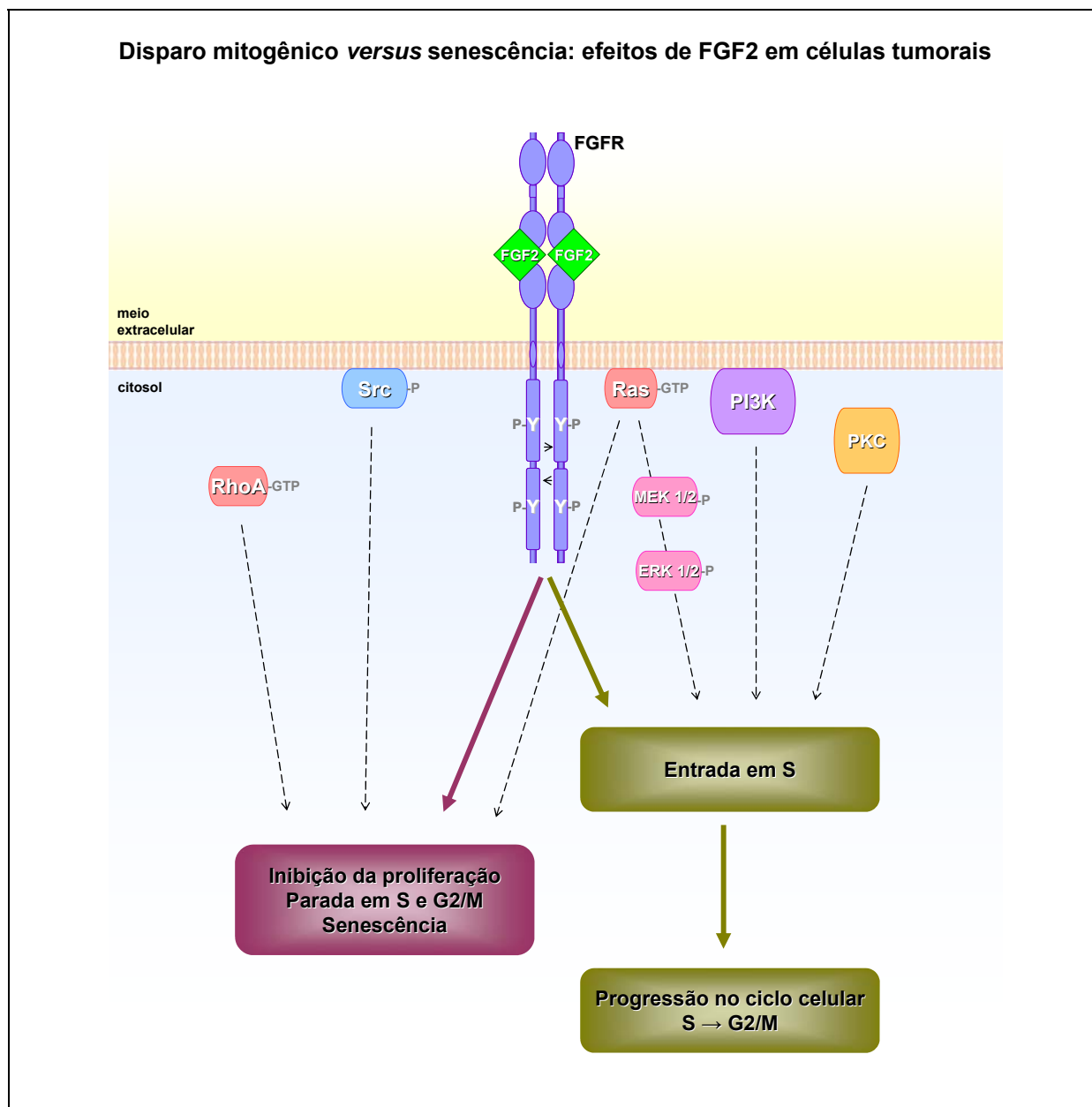


Figura 6.1| Representação esquemática da segregação independente do efeito citotóxico de FGF2 em células tumorais transformadas por Ras. FGF2 atua via Tiroquinases dos receptores de FGF. Este é um processo que depende de Ras e RhoA ativos. No caso das células Y1, Src ativo também está envolvido.

7 Referências bibliográficas

- AARONSON SA & TODARO GJ (1968). Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro. *Science* 162: 1024-1026.
- ABRAMOFF MD, MAGELHAES PJ & RAM, SJ (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11(7): 36-42.
- ACEVEDO VD, GANGULA RD, FREEMAN KW, LI R, ZHANG Y, WANG F, AYALA GE, PETERSON LE, ITTMANN M & SPENCER DM (2007). Inducible FGFR-1 activation leads to irreversible prostate adenocarcinoma and an epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 12: 559-571.
- ADNANE J., GAUDRAY P, DIONNE CA, CRUMLEY G, JAYE M, SCHLESSINGER J, JEANTEUR P, BIRNBAUM D & THIELLET C (1991). *Bek* and *Flg*, 2 receptors to members of the *Fgf* family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* 6: 659-663.
- AIKAWA T, SEGRE GC & LEE K (2001). Fibroblast growth factor inhibits chondrocytic growth through induction of p21 and subsequent inactivation of cyclin E-Cdk2. *The Journal of Biological Chemistry* 276(31): 29347-29352.
- ALLIANCE FOR CELLULAR SIGNALING: GILMAN AG, SIMON MI, BOURNE HR, HARRIS BA, LONG R, ROSS EM, STULL JT, TAUSSIG R *et al.* (2002). Overview of the Alliance for Cellular Signaling. *Nature* 420: 703-706.
- ALON U (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nature Reviews Genetics* 8: 450-461.
- ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W & LIPMAN DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- ARMAN E, HAFFNER-KRAUSZ R, CHEN Y, HEATH JK & LONAI P (1998). Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95: 5082-5087.
- ARMELIN HA (1973). Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 70(9): 2702-2706.
- ARMELIN MC, GAMBARINI AG & ARMELIN HA (1977). On the regulation of DNA synthesis in a line of adrenocortical tumor cells: effect of serum, adrenocorticotropin and pituitary factors. *Journal of Cellular Physiology* 93(1): 1-9.
- ARMELIN HA, LOFTI CF & LEPIQUE AP (1996). Regulation of growth by ACTH in the Y-1 line of mouse adrenocortical cells. *Endocrine Research* 22(4): 373-383.

- ARTHUR WY, ELLERBROEK SM, DER CJ, BURRIDGE K & WENNERBERG K (2002). XPLN, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for RhoA and RhoB, But Not RhoC. *The Journal of Biological Chemistry* 277(45): 42964-42972.
- ASPRINO PF & ARMELIN HA (2006). Análise de expressão gênica por microarrays de cDNA em linhagens de células adrenais tumorigênicas tratadas com FGF2 e ACTH. *Tese de doutoramento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo*.
- BADMAN MK, PISSIOS P, KENNEDY AR, KOUKOS G, FLIER JS & MARATOS-FLIER E (2007). Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPARalpha and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism* 5: 426-437.
- BAERTSCHI S, ZHUANG L & TRUEB B (2007). Mice with a targeted disruption of the Fgfr1 gene die at birth due to alterations in the diaphragm. *Federation of European Biochemical Societies Journal* 274:6241-6253.
- BAGUMA-NIBASHEKA M, LI AW & MURPHY PR (2007) The fibroblast growth factor-2 antisense gene inhibits nuclear accumulation of FGF-2 and delays cell cycle progression in C6 glioma cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 267(1–2): 127-136.
- BAILLY K, SOULET F, LEROY D, AMALRIC F & BOUCHE G (2000) Uncoupling of cell proliferation and differentiation activities of basic fibroblast growth factor. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 14: 333–344.
- BALDIN V, ROMAN AM, BOSC-BIERNE I, AMALRIC F & BOUCHE G (1990) Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *European Molecular Biology Organization Journal* 9: 1511–1517.
- BEENKEN A & MOHAMMADI M (2009). The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 8: 235-253.
- BERNS K, HIJMANS EM, MULLENDERS J, BRUMMELKAMP TR, VELDS A, HEIMERIKX M, Kerkhoven M, MADIREDO M, NIJKAMP W, WEIGELT B, AGAMI R, GE W, CAVET G, LINSLEY PS, BEIJERSBERGEN RL & BERNARDS R (2004) A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 428: 431-437.
- BESSION A, DOWDY SF & ROBERTS JM (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell* 14: 159-169.
- BIKFALVI A, KLEIN S, PINTUCCI G & RIFKIN DB (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine Reviews* 18(1): 26-45.
- BLOCHLINGER K & DIGGELMANN H (1984). Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. *Molecular and Cellular Biology* 4: 2929-2931.
- BONNET H, FILHOL O, TRUCHET I, BRETHENOU P, COCHET C, AMALRIC F & BOUCHE G (1996). Fibroblast growth factor-2 binds to the regulatory beta subunit of CK2 and directly

- stimulates CK2 activity toward nucleolin. *The Journal Biological Chemistry* 271: 24781-24787.
- BOSSARD C, LAURELL H, VAN DEN BERGHE L, MEUNIER S, ZANIBELLATO C & PRATS H (2003). Translokin is an intracellular mediator of FGF-2 trafficking. *Nature Cell Biology* 5: 433-439.
- BÖTTCHER RT & NIEHRS C (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews* 26(1): 63-77.
- BRUMMELKAMP TR, BERNADS R & AGAMI R (2002). A System for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553.
- CALIN GA & CROCE CM (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer* 6: 857-866.
- CAMPISI J (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522.
- CAPPELLEN D, DE OLIVEIRA C, RICOL D, GIL DIEZ DE MEDINA S, BOURDIN J, SASTRE-GARAU X, CHOPIN D, THIERY JP & RADVANYI F (1999). Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nature Genetics* 23: 18-20.
- CARPENTER AE, JONES TR, LAMPRECHT MR, CLARKE C, KANG IH, FRIMAN O, GUERTIN DA, CHANG JH, LINDQUIST RA, MOFFAT J, GOLAND P & SABATINI DM (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biology* 7: R100.
- CHAFFER CL, BRENNAN JP, SLAVIN JL, BLICK T, THOMPSON EW & WILLIAMS ED (2006). Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Research* 66(23): 11271-11278.
- CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD W & PRASHER DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.
- CHAMBARD J-C, LEFLOCH R, POUYSSÉGUR J & LENORMAND P (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 1299-1310.
- CHELLAIAH AT, MCEWEN DG, WERNER S, XU J & ORNITZ DM (1994). Fibroblast growth factor receptor (FGFR) 3. Alternative splicing in immunoglobulin-like domain III creates a receptor highly specific for acidic FGF/FGF-1. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 11620-11627.
- CHESI M, NARDINI E, BRENTS LA, SCHROCK E, RIED T, KUEHL WM & BERGSAGEL PL (1997). Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genetics* 16: 260-264.

- CHU IM, HENGST L & SLINGERLAND JM (2008). The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 8: 253-267.
- CIRUNA BG, SCHWARTZ L, HARPAL K, YAMAGUCHI TP & ROSSANT J (1997). Chimeric analysis of fibroblast growth factor receptor-1 (Fgfr1) function: a role for FGFR1 in morphogenetic movement through the primitive streak. *Development* 124: 2829-2841.
- CIRUNA B & ROSSANT J (2001). FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Developmental Cell* 1: 37-49.
- COHEN S (1965). The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Developmental Biology* 12: 394-407.
- COLVIN JS, BOHNE BA, HARDING GW, MCEWEN DG & ORNITZ DM (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genetics* 12: 390-397.
- CORE LJ, WATERFALL JJ & LIS JT (2008). Nascent RNA Sequencing Reveals Widespread Pausing and Divergent Initiation at Human Promoters. *Science* 322: 1845-1848.
- COSTA ET, FORTI FL, ROCHA KM, MORAES MS & ARMELIN HA (2004). Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. *Endocrine Research* 30(4): 503-509.
- COSTA ET & ARMELIN HA (2005). Ações antagônicas de FGF2 em células tumorais de camundongo: disparo de mitogênese e de morte celular. *Tese de doutoramento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo*.
- COSTA ET, FORTI FL, MATOS TGF, DERMARGOS A, NAKANO F, SALOTTI J, ASPRINO P, YOSHIHARA CK, KOGA MM & ARMELIN HA (2008). Fibroblast Growth Factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering Rho-A-mediated senescence. *Cancer Research* 15: 6215-6223.
- DEMIROGLU A, STEER EJ, HEATH C, TAYLOR K, BENTLEY M, ALLEN SL, KODURU P, BRODY JP, HAWSON G, RODWELL R *et al.* (2001). The t(8;22) in chronic myeloid leukemia fuses BCR to FGFR1: transforming activity and specific inhibition of FGFR1 fusion proteins. *Blood* 98: 3778-3783.
- DE MOERLOOZE L, SPENCER-DENE B, REVEST J, HAJIHOSEINI M, ROSEWELL I & DICKSON C. (2000). An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 127(3): 483-92.
- DENG C-X, WYNSHAW-BORIS A, SHEN MM, DAUGHERTY C., ORNITZ DM & LEDER P (1994). Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes & Development* 8: 3045-3057.
- DENG C, WYNSHAW-BORIS A, ZHOU F, KUO A & LEDER P (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84: 911-921.

- DENG C, BEDFORD M, LI C, XU X, YANG X, DUNMORE J & LEDER P **(1997)**. Fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) is essential for normal neural tube and limb development. *Developmental Biology* 185: 42-54.
- DONO R, TEXIDO G, DUSSEL R, EHMKE H & ZELLER R **(1998)**. Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *European Molecular Biology Organization Journal* 17: 4213-4225.
- DOWNWARD J **(2003)**. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3: 11-22.
- EASTON DF, POOLEY KA, DUNNING AM, PHAROAH PDP, THOMPSON D, BALLINGER DG, STRUEWING JP, MORRISON J, FIELD H, LUBEN R *et al.* **(2007)**. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447: 1087-1093.
- ERIKSSON AE, COUSENS LS, WEAVER LH & MATTHEWS BW **(1991)**. Threedimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 3441-3445.
- ESCH F, BAIRD A, LING N, UENO N, HILL F, DENOROY L, KLEPPER R, GOSPODAROWICZ D, BOHLEN P & GUILLEMIN R **(1985)**. Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 82: 6507-6511.
- ESWARAKUMAR VP, MONSONEGO-ORNAN E, PINES M, ANTONOPOULOU I, MORRIS-KAY GM & LONAI P **(2002)**. The Il1c alternative of Fgfr2 is a positive regulator of bone formation. *Development* 129: 3783-3793.
- ESWARAKUMAR VP, LAX I & SCHLESSINGER J **(2005)**. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 139-149.
- EVAN GI & VOUSDEN KH **(2001)**. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348.
- EZZAT S, HUANG P, DACKIW A & ASA SL **(2005)**. Dual Inhibition of RET and FGFR4 restrains medullary thyroid cancer cell growth. *Clinical Cancer Research* 11: 1336-1341.
- FAHAM S, LINHARDT RJ & REES DC **(1998)**. Diversity does make a difference: fibroblast growth factor-heparin interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 578-586.
- FATTMAN CL, SCHAEFER LM & OURY TD **(2003)**. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine* 35(3): 236-256.
- FEIGE J-J & BAIRD A **(1989)**. Basic fibroblast growth factor is a substrate for protein phosphorylation and is phosphorylated by capillary endothelial cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 86:3174-3178.
- FEIGE J-J, BRADLEY JD, FRYBURG K, FARRIS J, COUSENS LC, BARR PJ & BAIRD A **(1989)**. Differential effects of heparin, fibronectin, and laminin on the phosphorylation of basic

fibroblast growth factor by protein kinase C and the catalytic subunit of protein kinase A. *The Journal of Cell Biology* 109(6): 3105-3114.

FIORITOS T, PANAGOPOULOS I, LASSEN C, SWEDIN A, BILLSTROM R, ISAKSSON M, STRÖMBECK B, OLOFSSON T, MITELMAN F & JOHANSSON B (2001). Fusion of the BCR and the fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) genes as a result of t(8;22)(p11;q11) in a myeloproliferative disorder: the first fusion gene involving BCR but not ABL. *Genes, Chromosomes & Cancer* 32: 302-310.

FLORKIEWICZ RZ & SOMMER A (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 86:3978–3981.

FORTI FL, SCHWINDT TT, MORAES MS, EICHLER CB & ARMELIN HA (2002). ACTH promotion of p27 (Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation. *Biochemistry* 41(31): 10133-10140.

FORTI FL, COSTA ET, ROCHA KM, MORAES MS & ARMELIN HA (2006a). c-Ki-ras oncogene amplification and FGF2 signaling pathways in the mouse Y1 adrenocortical cell line. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78(2): 231-239.

FORTI FL, DIAS MSH & ARMELIN HA (2006b). ACTH receptor: Ectopic expression, activity and signaling. *Molecular and Cellular Biochemistry* 293: 147-160.

FORTI FL & ARMELIN HA (2007). Vasopressin triggers senescence in K-ras transformed cells via RhoA-dependent downregulation of cyclin D1. *Endocrine-Related Cancer* 14: 1117-1125.

FRANKE TF (2008). PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27: 6473-6488.

FREDRIKSSON L, LI H & ERIKSSON U (2004). The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 15: 197-204.

GAMBARINI AG & ARMELIN HA (1982). Purification and Partial Characterization of an Acidic Fibroblast Growth Factor from Bovine Pituitary. *The Journal of Biological Chemistry* 257(16): 9692-9697.

GIULIANELLI S, CERLIANI JP, LAMB CA, FABRIS VT, BOTTINO MC, GOROSTIAGA MA, NOVARO V, GONGORA A, BALDI A, MOLINOLO A & LANARI C (2008). Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: a role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *International Journal of Cancer* 123: 2518-2531.

GIURIATO S, RABIN K, FAN AC, SHACHAF CM & FELSHER DW (2004). Conditional animal models: a strategy to define when oncogenes will be effective targets to treat cancer. *Seminars in Cancer Biology* 14: 3-11.

GOLDFARB M (2005). Fibroblast growth factor homologous factors: evolution, structure, and function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 215-220.

- GREENMAN C, STEPHENS P, SMITH R, DALGLIESH GL, HUNTER C, BIGNELL G, DAVIES H, TEAGUE J, BUTLER A, STEVENS C *et al.* (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446: 153-158.
- GRINBERG AV, HU C-D & KERPPOLA TK (2004). Visualization of Myc/Max/Mad family Dimers and the competition for dimerization in living cells. *Molecular and Cellular Biology* 24(10): 4294-4308.
- GRINER EM & KAZANIETZ MG (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews Cancer* 7: 281-294.
- GRITZ L & DAVIES J (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25: 179-188.
- GROSE R & DICKSON C (2005). Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 179-186.
- GUASCH G, MACK GJ, POPOVICI C, DASTUGUE N, BIRNBAUM D, RATTNER JB & PÉBUSQUE J-M (2000). FGFR1 is fused to the centrosome-associated protein CEP110 in the 8p12 stem cell myeloproliferative disorder with t(8;9)(p12;q33). *Blood* 95: 1788-1796.
- GUASCH G, POPOVICI C, MUGNERET F, CHAFFANET M, PONTAROTTI P, BIRNBAUM D & PÉBUSQUE J-M (2003). Endogenous retroviral sequence is fused to FGFR1 kinase in the 8p12 stem-cell myeloproliferative disorder with t(8;19)(p12;q13.3). *Blood* 101: 286-288.
- HAHN WC, COUNTER CM, LUNDBERG AS, BEIJERSBERGEN RL, BROOKS MW & WEINBERG RA (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400: 464-468.
- HANAHAHAN D & WEINBERG RA (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- HAYFLICK L & MOORHEAD PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25: 585-621.
- HUANG P & STERN MJ (2005). FGF signaling in flies and worms: more and more relevant to vertebrate biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 151-158.
- HUNTER DJ, KRAFT P, JACOBS KB, COX DG, YEAGER M, HANKINSON SE, WACHOLDER S, WANG Z, WELCH R, HUTCHINSON A *et al.* (2007). A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer. *Nature Genetics* 39: 870-874.
- INAGAKI T, CHOI M, MOSCHETTA A, PENG L, CUMMINS CL, MCDONALD JG, LUO G, JONES SA, GOODWIN B, RICHARDSON JA *et al.* (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism* 2:217-225.
- INAGAKI T, DUTCHAK P, ZHAO G, DING X, GAUTRON L, PARAMESWARA V, LI Y, GOETZ R, MOHAMMADI M, ESSER V *et al.* (2007). Endocrine regulation of the fasting response by

- PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metabolism* 5: 415-425.
- INOUE S & TSUJI FI (1994). Aequorea green fluorescent protein: expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* 341: 277-280.
- ITOH N & ORNITZ DM (2004). Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics* 20: 563-569.
- ITOH N (2007). The Fgf Families in Humans, Mice, and Zebrafish: Their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30(10): 1819-1825.
- ITOH N & ORNITZ DM (2008). Functional evolutionary history of the mouse FGF gene family. *Developmental Dynamics* 237: 18-27.
- IVASKA J, PALLARI H-M, NEVO J & ERIKSSON JE (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental Cell Research* 313: 2050-2062.
- JACKSON TA, KOTERWAS DM & BRADFORD AP (2006). Differential regulation of cell growth and gene expression by FGF-2 and FGF-4 in pituitary lactotroph GH4 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 247: 183-191.
- JAFFE AB & HALL A (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 247-69.
- JANG J-H, SHIN KH & PARK JG (2001). Mutations in fibroblast growth factor receptor 2 and fibroblast growth factor receptor 3 genes associated with human gastric and colorectal cancers. *Cancer Research* 61: 3541-3543.
- JANG J-H (2005). Reciprocal relationship in gene expression between FGFR1 and FGFR3: implication for tumorigenesis. *Oncogene* 24: 945-948.
- JANSSEN K-P, ABALA M, MARJOU FE, LOUVARD D & ROBINE S (2005). Mouse models of K-ras-initiated carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1756: 145-154.
- JOHNSON DE, LEE PL, LU J & WILLIAMS LT (1990). Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Molecular and Cellular Biology* 10: 4728-4736.
- JOHNSON FM & GALLICK GE (2007). Src Family nonreceptor tyrosine kinases as molecular targets for cancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 7: 651-659.
- KAI M, YASUDA S, IMAI S, KANO H & SAKANE F (2007). Tyrosine phosphorylation of β 2-chimaerin by Src-family kinase negatively regulates its Rac-specific GAP activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 1407-1415.
- KANEHISA M, GOTO S, HATTORI M, AOKI-KINOSHITA KF, ITOH M, KAWASHIMA S, KATAYAMA T, ARAKI M & HIRAKAWA M (2006). From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research Database* issue 34: D354-D357.

- KASTAN MB & BARTEK J (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323.
- KATZ M, AMIT I & YARDEN Y (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 1161-1176.
- KENT WJ (2002). BLAT: The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Research* 12: 656-664.
- KIM I, MOON SO, YU KH, KIM UH & KOH GY (2001). A novel fibroblast growth factor receptor-5 preferentially expressed in the pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta* 1518: 152-156.
- KIM WY & SHARPLESS NE (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* 127(2): 265-275.
- KIMELMAN D, KIRSCHNER MW (1989). An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell* 59(4): 687-696.
- KHURANA S & GEORGE SP (2008). Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: Villin's perspective. *FEBS Letters* 582:2128–2139.
- KNEE R, LI AW, MURPHY PR (1997). Characterization and tissue-specific expression of the rat basic fibroblast growth factor antisense mRNA and protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 94(10): 4943-4947.
- KNOWLES MA (2007). Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target. *World Journal of Urology* s00345-007-0213-4.
- KOBRIN MS, YAMANAKA Y, FRIESS H, LOPEZ ME & KORC M (1993). Aberrant expression of type I fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Research* 53: 4741-4744.
- KOVARY K, ARMELIN MCS & ARMELIN HA (1989). Ha-Ras-1 oncogene dosage differentially affects Balb/3T3 cells' growth factor requirement and tumorigenicity. *Oncology Research* 4: 55-64.
- KREJCI P, BRYJ V, PACHERNIK J, HAMPL A, POGUE R, MEKIKIAN P & WILCOX WR (2004). FGF2 inhibits proliferation and alters the cartilage-like phenotype of RCS cells. *Experimental Cell Research* 297: 152-164.
- KRUPA S, DOMBROWSKI C, EZZAT S, KATOH M & COOL S (2008). FGF signaling pathway. The Signaling Gateway (Connections Map in the Database of NCI-Nature, as seen 7th April 2008), http://pid.nci.nih.gov/search/pathway_landing.shtml?what=graphic&gif=on&pathway_id=fgf_pathway.
- KUDLA AJ, JONES NC, ROSENTHAL RS, ARTHUR K, CLASE KL & OLWIN BB (1998). The FGF receptor-1 tyrosine kinase domain regulates myogenesis but is not sufficient to stimulate proliferation. *The Journal of Cell Biology* 142:241–250.
- KUNDA P & BAUM B (2009). The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends in Cell Biology* 19(4): 174-179.

- KWABI-ADDO B, OZEN M & ITTMANN M (2004). The role of fibroblast growth factors and their receptors in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer* 11: 709-724.
- LEE PL, JOHNSON DE, COUSENS LS, FRIED VA & WILLIAMS LT (1989). Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science* 245: 57-60.
- LEPIQUE AP, Forti FL, Moraes MS & Armelin HA (2000). Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endocrine Research* 26(4): 825-832.
- LEPIQUE AP, MORAES MS, ROCHA KM, EICHLER CB, HAJJ GN, SCHWINDT TT & ARMELIN HA (2004). c-Myc protein is stabilized by fibroblast growth factor 2 and destabilized by ACTH to control cell cycle in mouse Y1 adrenocortical cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 33(3): 623-638.
- LEVI-MONTALCINI R, MEYER H & HAMBURGER V (1954). In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Research* 14: 49-57.
- LEVI-MONTALCINI R & COHEN S (1960). Effects of the extract of the mouse submaxillary salivary glands on the sympathetic system of mammals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 85: 324-341.
- LEW ED, FURDUI CM, ANDERSON KS & SCHLESSINGER J (2009). The precise sequence of FGF receptor autophosphorylation is kinetically driven and is disrupted by oncogenic mutations. *Science Signaling* 2(58): ra6.
- LIM K-H & COUNTER CM (2005). Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. *Cancer Cell* 8: 381-392.
- LIM K-H, ANCRILE BB, KASHATUS DF & COUNTER CM (2008). Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature* 452: 646-649.
- LIVAK KJ & SCHMITTGEN TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- LOFTI CFP, TODOROVIC Z, ARMELIN HA & SCHIMMER BP (1997). Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry* 272(47): 29886-29891.
- LOFTI CFP, LEPIQUE AP, FORTI FL, SCHWINDT TT, EICHLER CB, SANTOS MO, REBUSTINI IT, HAJJ GNM, JULIANO L & ARMELIN HA (2000). Proliferative signaling initiated in ACTH receptors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 1133-1140.
- LOFTI CFP & ARMELIN HA (2001). cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *Journal of Endocrinology* 168: 381-389.

- LOGIÉ A, DUNOIS-LARDE C, ROSTY C, LEVREL O, BLANCHE M, RIBEIRO A, GASC J-M, JORCANO J, WERNER S, SASTRE-GARAU X, THIERY JP & RADVANYI F (2005). Activating mutations of the tyrosine kinase receptor FGFR3 are associated with benign skin tumors in mice and humans. *Human Molecular Genetics* 14(9): 1153-1160.
- LOPES CS & SUNKEL CE (2003). The spindle checkpoint: from normal cell division to tumorigenesis. *Archives of Medical Research* 34: 155-165.
- MAŁECKI J, WESCHE J, SKJERPEN CS, WIĘDŁOCHA A & OLSNES S (2004). Translocation of FGF-1 and FGF-2 across vesicular membranes occurs during G1-phase by a common mechanism. *Molecular Biology of the Cell* 15: 801-814.
- MALUMBRES M & BARBACID M (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews Cancer* 1: 222-231.
- MALUMBRES M & BARBACID M (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews Cancer* 3: 7-13.
- MALUMBRES M & BARBACID M (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* 9: 153-166.
- MANNING G, WHYTE DB, MARTINEZ R, HUNTER T & SUDARSANAM S (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- MANNING BD (2009). Challenges and Opportunities in Defining the Essential Cancer Kinome. *Science Signaling* 2(63): pe15.
- MANSUKHANI A, DELL'ERA P, MOSCATELLI D, KORNBLUTH S, HANAFUSA H & BASILICO C (1989). Characterization of the murine BEK fibroblast growth factor (FGF) receptor: activation by three members of the FGF family and requirement for heparin. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 89: 3305-3309.
- MARET A, GALY B, ARNAUD E, BAYARD F & PRATS H (1995). Inhibition of fibroblast growth factor 2 expression by antisense RNA induced a loss of the transformed phenotype in a human hepatoma cell line. *Cancer Research* 55: 5075-5079.
- MATOS TGF & ARMELIN HA (2007). Mecanismos anti-proliferativos disparados por FGF2 e éster de forbol em células de camundongos transformadas por Ras. *Tese de doutoramento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo*.
- MATTOS GE & LOTFI CFP (2005). Differences between the growth regulatory pathways in primary rat adrenal cells and mouse tumor cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* 245: 31-42.
- MCKEEHAN WL, WANG F & KAN M (1998). The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 59: 135-176.

- MECHTA F, LALLEMAND D, PFARR CM & YANIV M (1997). Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* 14:837–847.
- MIKI T, BOTTARO DP, FLEMING TP, SMITH CL, BURGESS WH, CHAN AM & AARONSON SA (1992). Determination of ligand-binding specificity by alternative splicing: two distinct growth factor receptors encoded by a single gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 89:246-250.
- MILLER DL, ORTEGA S, BASHAYAN O, BASCH R & BASILICO C (2000). Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice. *Molecular and Cellular Biology* 20: 2260-2268.
- MITIN, N., ROSSMAN, K. L. & DER, C. J (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Current Biology* 15: R563–R574.
- MOFFA AB, TANNHEIMER SL & ETHIER SP (2004). Transforming potential of alternatively spliced variants of fibroblast growth factor receptor 2 in human mammary epithelial cells. *Molecular Cancer Research* 2: 643-652.
- MOFFAT J & SABATINI DM (2006). Building mammalian signaling pathways with RNAi screens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7(3): 177-187.
- MOHAMMADI M, HONEGGER AM, ROTIN D, FISCHER R, BELLOT F, LI W, DIONNE CA, JAYE M, RUBINSTEIN M & SCHLESSINGER J (1991). A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C- γ 1. *Molecular and Cellular Biology* 11: 5068-5078.
- MOHAMMADI M, MCMAHON G, SUN L, TANG C, HIRTH P, YEH BK, HUBBARD SR & SCHLESSINGER J (1997). Structures of the Tyrosine Kinase Domain of Fibroblast Growth Factor Receptor in Complex with Inhibitors. *Science* 276: 955-960.
- MOHAMMADI M, FROUM S, HAMBY JM, SCHROEDER MC, PANEK RL, LU GH, ELISEENKOVA AV, GREEN D, SCHLESSINGER J & HUBBARD SR (1998). Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *The EMBO Journal* 17(20): 5896-5904.
- MOHAMMADI M, OLSEN SK & GOETZ R (2005a). A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs. *Current Opinion in Structural Biology* 15: 506-516.
- MOHAMMADI M, OLSEN SK & IBRAHIMI OA (2005b). Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Reviews* 16(2): 107-137.
- NAGANAWA T, XIAO L, ABOGUNDE E, SOBUE T, KALAJZIC I, SABBieti M, AGAS D & HURLEY MM (2006). In vivo and in vitro comparison of the effects of FGF-2 null and haplo-insufficiency on bone formation in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339: 490-498.

- NEUFELD G, MITCHELL R, PONTE P & GOSPODAROWICZ D (1988). Expression of human basic fibroblast growth factor cDNA in baby hamster kidney derived cells results in autonomous cell growth. *The Journal of Cell Biology* 106: 1385-1394.
- NILSEN-HAMILTON M, HAMILTON RT (1979). Fibroblast growth factor causes an early increase in phosphorylation of a membrane protein in quiescent 3T3 cells. *Nature* 279: 444-446.
- OGAWA Y, KUROSU H, YAMAMOTO M, NANDI A, ROSENBLATT KP, GOETZ R, ELISEENKOVA AV, MOHAMMADI M & KURO-O M (2007). BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 104: 7432-7437.
- OHBA Y, MOCHIZUKI N, MATSUO K, YAMASHITA S, NAKAYA M, HASHIMOTO Y, HAMAGUCHI M, KURATA T, NAGASHIMA K & MATSUDA M (2000). Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade. *Molecular and Cellular Biology* 20: 6074-6083.
- OHSHIMA M, YAMAGUCHI Y, KAPPERT K, MICKE P & OTSUKA K (2009). bFGF rescues imatinib/STI571-induced apoptosis of sis-NIH3T3 fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381(2): 165-170.
- ONOSE H, EMOTO N, SUGIHARA H, SHIMIZU K, WAKABAYASHI I (1999). Overexpression of fibroblast growth factor receptor 3 in a human thyroid carcinoma cell line results in overgrowth of the confluent cultures. *European Journal of Endocrinology* 140: 169-173.
- ORNITZ DM, ITOH N (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2(3): 3005.1-12.
- ORNITZ DM, XU J, COLVIN JS, MCEWEN DG, MACARTHUR CA, COULIERI F, GAO G & GOLDFARB M (1996). Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *The Journal of Biological Chemistry* 271(25): 15292-15297.
- ORTEGA S, ITTMANN M, TSANG SH, EHRLICH M & BASILICO C (1998). Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95: 5672-5677.
- OWENS DM & KEYSE SM (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* 26: 3203-3213.
- PADDISON P, CAUDY AA & HANNON, GJ (2002). Stable suppression of gene expression in mammalian cells by RNAi. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* (99): 1443-1448.
- PARDO OE, WELLBROCK C, KHANZADA UK, AUBERT M, AROZARENA I, DAVIDSON S, BOWEN F, PARKER PJ, FILONENKO VV, GOUT IT, SEBIRE N, MARAIS R, DOWNWARD J & SECKL MJ (2006). FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKC ϵ , B-Raf and S6K2. *The EMBO Journal* 25:3078-3088.
- PARTANEN J, SCHWARTZ L & ROSSANT J (1998). Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes & Development* 12: 2332-2344.

- PASSOS-BUENO MR, WILCOX WR, JABS EW, SERTIÉ AL, ALONSO LG & KITO H **(1999)**. Clinical Spectrum of Fibroblast Growth Factor Receptor Mutations. *Human Mutation* 14: 115-125.
- PATRY V, ARNAUD E, AMALRIC F & PRATS H **(1994)**. Involvement of basic fibroblast growth factor NH2 terminus in nuclear accumulation. *Growth Factors* 11:163-174.
- PETIOT A, CONTI FJ, GROSE R, REVEST JM, HODIVALA-DILKE KM, DICKSON C **(2003)**. A crucial role for Fgfr2-IIIb signalling in epidermal development and hair follicle patterning. *Development* 130(22): 5493-5501.
- POLNASZEK N, KWABI-ADDO B, PETERSON LE, OZEN M, GREENBERG NM, ORTEGA S, BASILICO C & ITTMANN M **(2003)**. Fibroblast growth factor 2 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer. *Cancer Research* 63: 5754-5760.
- POPOVICI C, ADELAIDE J, OLLENDORFF V, CHAFFANET M, GUASCH G, JACROT M, LEROUX D, BIRNBAUM D & PÉBUSQUE M-J **(1998)**. Fibroblast growth factor receptor 1 is fused to FIM in stem cell myeloproliferative disorder with t(8;13). *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 95: 5712-5717.
- POPOVICI C, ZHANG B, GREGOIRE MJ, JONVEAUX P, LAFAGE-POCHITALOFF M, BIRNBAUM D, PÉBUSQUE M-J **(1999)**. The t(6;8)(q27;p11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor 1. *Blood* 93: 1381-1389.
- POWERS CJ, MCLESKEY SW & WELLSTEIN A **(2000)**. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer* 7: 165-197.
- PRASHER DC, ECKENRODE VK, WARD WW, PRENDERGAST FG & CORMIER MJ **(1992)**. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229-233.
- PRATS H, KAGHAD M, PRATS AC, KLAGSBRUN M, LELIAS JM, LIAUZUN P, CHALON P, TAUBER JP, AMALRIC F, SMITH JA & CAPUT D **(1989)**. High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 86(6): 1836-1840.
- PRESTA M, MITOLA S, DELL'ERA P, LEALI D, NICOLI S, MORONI E & RUSNATI M **(2008)**. Fibroblast growth factor-2 in angiogenesis, in: FIGG WD & FOLKMAN J (Eds), *Angiogenesis, an integrative approach from science to medicine*, Springer, chapter 7: 77-88.
- RAND V, HUANG J, STOCKWELL T, FERRIERA S, BUZKO O, LEVY S, BUSAM D, LI K, EDWARDS JB, EBERHART C, MURPHY KM, TSIAMOURI A, BEESON K, SIMPSON AJ, VENTER JC, RIGGINS GJ & STRAUSBERG RL **(2005)**. Sequence survey of receptor tyrosine kinases reveals mutations in glioblastomas. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 102: 14344-14349.
- REBUSTINI IT & ARMELIN HA **(2003)**. Expressão de fatores peptídicos de crescimento e regulação do ciclo celular em células adrenocorticais. *Tese de doutoramento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo*.

- REIS EM, NAKAYA HI, LOURO R, CANAVEZ FC, FLATSCHART AVF, ALMEIDA GT, EGIDIO CM, PAQUOLA AC, MACHADO AA, FESTA F *et al.* (2004). Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* 23:6684–6692.
- REITER A, SOHAL J, KULKARNI S, CHASE A, MACDONALD DHC, AGUIAR RCT, GONÇALVES C, HERNANDEZ JM, JENNINGS BA, GOLDMAN JM & CROSS NCP (1998). Consistent fusion of ZNF198 to the fibroblast growth factor receptor-1 in the t(8;13)(p11;q12) myeloproliferative syndrome. *Blood* 92: 1735-1742.
- REVEST JM, SUNIARA RK, KERR K, OWEN JJ & DICKSON C (2001). Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *Journal of Immunology* 167(4): 1954-1961.
- RIBATTI D, VACCA A, RUSNATI M & PRESTA M (2007). The discovery of basic fibroblast growth factor/fibroblast growth factor-2 and its role in haematological malignancies. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 18: 327-334.
- ROCHA KM & ARMELIN HA (1994). Isolamento de clones revertentes normais a partir de células Balb/3T3 transformadas com o oncogene humano EJ-Ras. *Tese de doutoramento do Instituto de Química da Universidade de São Paulo*.
- ROCHA KM, FORTI FL, LEPIQUE AP & ARMELIN HA (2003). Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: roles of ACTH. *Microscopy Research and Technique* 61: 268-274.
- ROGHANI M & MOSCATELLI D (1992). Basic fibroblast growth factor is internalized through both receptor-mediated and heparan sulfate-mediated mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 267(31): 22156-22162.
- RONCHETTI D, GRECO A, COMPASSO S, COLOMBO G, DELL'ERA P, OTSUKI T, LOMBARDI L & NERI A (2001). Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations. *Oncogene* 20: 3553-3562.
- SAHNI M, RAZ R, COFFIN JD, LEVY D & BASILICO C (2001). STAT1 mediates the increased apoptosis and reduced chondrocyte proliferation in mice overexpressing FGF2. *Development* 128(11): 2119-2129.
- SAHNI A, SIMPSON-HAIDARIS PJ, SAHNI SK, VADAY GG & FRANCIS CW (2008). Fibrinogen synthesized by cancer cells augments the proliferative effect of fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6:176-183.
- SANDILANDS E, AKBARZADEH S, VECCHIONE A, MCEWAN DG, FRAME MC & HEATH JK (2007). Src kinase modulates the activation, transport and signalling dynamics of fibroblast growth factor receptors. *EMBO Reports* 8(12): 1162-1169.

- SCHANER ME, ROSS DT, CIARAVINO G, SØRLIE T, TROYANSKAYA O, DIEHN M, WANG YC, DURAN GE, SIKIC TL, CALDEIRA S *et al.* (2003). Gene Expression Patterns in Ovarian Carcinomas. *Molecular Biology of the Cell* 14: 4376-4386.
- SCHILD C & TRUEB B (2005). Aberrant expression of FGFR1, a novel FGF receptor, in ovarian tumors. *International Journal of Molecular Medicine* 16: 1169-1173.
- SCHLESSINGER J (2008). Fibroblast Growth Factor Receptor Pathway. Sci Signal (Connections Map in the Database of Cell Signaling, as seen 6th November, 2008), http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/stkecm;CMP_15049.
- SCHUBBERT S, SHANNON K & BOLLAG G (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nature Reviews Cancer* 7: 295-308.
- SCHULER GD (1997). Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Research* 7: 541-550.
- SCHWAB M, ALITALO K, VARMUS HE, BISHOP JM & GEORGE D (1983). A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature* 303(5917): 497-501.
- SCHWINDT TT, FORTI FL, JULIANO MA, JULIANO L, ARMELIN HA (2003). Arginine vasopressin inhibition of cyclin D1 gene expression blocks the cell cycle and cell proliferation in the mouse Y1 adrenocortical tumor cell line. *Biochemistry* 42(7): 2116-2121.
- SEILA AC, CALABRESE M, LEVINE SS, YEO GW, RAHL PB, FLYNN RA, YOUNG RA & SHARP PA (2008). Divergent transcription from active promoters. *Science* 322: 1849-1851.
- SEWING A, WISEMAN B, LLOYD AC & LAND H (1997). High intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Molecular and Cellular Biology* 17: 5588-5597.
- SHAH RN, IBBITT JC, ALITALO K & HURST HC (2002). FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene* 21: 8251-8261.
- SHAUL Y & SEGER R (2007). The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 1213-1226.
- SHERR CJ & ROBERTS JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development* 13(12): 1501-1512.
- SHIMADA T, KAKITANI M, YAMAZAKI Y, HASEGAWA H, TAKEUCHI Y, FUJITA T, FUKUMOTO S, TOMIZUKA K & YAMASHITA T (2004). Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 113: 561-568.
- SILVA JM, MIZUNO H, BRADY A, LUCITO R, HANNON GJ (2004). RNA interference microarrays: High-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 101(17): 6548-6552.

- SILVA JM, LI MZ, CHANG K, GE W, GOLDING MC, RICKLES RJ, SIOLAS D, HU G, PADDISON PJ, SCHLABACH MR *et al.* (2005). Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature Genetics* 37(11): 1281-1288.
- SLEEMAN M, FRASER J, MCDONALD M, YUAN S, WHITE D, GRANDISON P, KUMBLE2 K, WATSON JD & MURISON JG (2001). Identification of a new fibroblast growth factor receptor, FGFR5. *Gene* 271: 171-182.
- SMEDLEY D, HAMOUDI R, CLARK J, WARREN W, ABDUL-RAUF M, SOMERS G, VENTER D, FAGAN K, COOPER C & SHIPLEY J (1998). The t(8;13)(p11;q11-12) rearrangement associated with an atypical myeloproliferative disorder fuses the fibroblast growth factor receptor 1 gene to a novel gene RAMP. *Human Molecular Genetics* 7: 637-642.
- SMITS VA, VAN PEER MA, ESSERS MA, KLOMPMAKER R, RIJKSEN G & MEDEMA RH (2000). Negative growth regulation of SK-N-MC cells by bFGF defines a growth factor-sensitive point in G2. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 19375-19381.
- SØRENSEN V, NILSEN T & WIĘDŁOCHA A (2006). Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *BioEssays* 28: 504-514.
- SOULET F, BAILLY K, ROGA S, LAVIGNE A-C, AMALRIC F & BOUCHE G (2005). Exogenously added fibroblast growth factor 2 (FGF-2) to NIH3T3 cells interacts with nuclear ribosomal S6 kinase 2 (RSK2) in a cell cycle-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry* 280(27): 25604-25610.
- ST BERNARD R, ZHENG L, LIU W, WINER D, ASA SK & EZZAT S (2005). Fibroblast Growth Factor Receptors as Molecular Targets in Thyroid Carcinoma. *Endocrinology* 146(3): 1145-1153.
- STREIT S, BANGE J, FICHTNER A, IHRLER S, ISSING W & ULLRICH A (2004). Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* 111: 213-217.
- SUI G, SOOHOO C, AFFAR EB, GAY F, SHI Y, FORRESTER WC & SHI Y (2002). A DNA vector-based technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 99 (8): 5515-5520.
- TAKIZAWA N, SMITH TC, NEBL T, CROWLEY JL, PALMIERI SJ, LIFSHITZ LM, EHRHARDT AG, HOFFMAN LM, BECKERLE MC & LUNA EJ (2006). Supervillin modulation of focal adhesions involving TRIP6/ZRP-1. *The Journal of Cell Biology* 174(3): 447-458.
- TATUSOVA TA & MADDEN TL (1999). Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiology Letters* 174: 247-250.
- TAVERNA S, GHERSI G, GINESTRA A, RIGOGLIUSO S, PECORELLA S, ALAIMO G, SALADINO F, DOLO V, DELL'ERA P, PAVAN A *et al.* (2003). Shedding of membrane vesicles mediates Fibroblast Growth Factor-2 release from cells. *The Journal of Biological Chemistry* 278(51): 51911-51919.

- TAVERNA S, RIGOGLIUSO S, SALAMONE M & VITTORELLI ML **(2008)**. Intracellular trafficking of endogenous fibroblast growth factor-2. *FEBS Journal* 275: 1579-1592.
- THE ENCODE PROJECT CONSORTIUM: LIEFER LA, WETTERSTRAND KA, GOOD PJ, FEINGOLD EA, GUYER MS, COLLINS FS *et al.* **(2007)**. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447: 799-816.
- THOMPSON JD, HIGGINS DG & GIBSON TJ **(1994)**. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- TODARO G & GREEN H **(1963)**. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology* 17: 299-313.
- TSUBOI R & RIFKIN DB **(1990)**. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Journal of Experimental Medicine* 172: 245-251.
- TUSCHL T **(2002)**. Expanding small RNA interference. *Nature Biotechnology* 20:446-448.
- TUSCHL T **(2003)**. Functional genomics: RNA sets the standard. *Nature* (421): 220-221.
- URAKAWA I, YAMAZAKI Y, SHIMADA T, IJIMA K, HASEGAWA H, OKAWA K, FUJITA T, FUKUMOTO S & YAMASHITA T **(2006)**. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444: 770-774.
- VIARD I, JAILLARD C & SAEZ JM **(1993)**. Regulation by growth factors (IGF-I, b-FGF and TGF-P) of protooncogene mRNA, growth and differentiation of bovine adrenocortical fasciculata cells. *FEBS Letters* 328: 94-98.
- VIVANCO I & SAWYERS CL **(2002)**. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 489-501.
- WANG H, YANG C, LESKOW FC, SUN J, CANAGARAJAH B, HURLEY JH & KAZANIETZ MG **(2006)**. Phospholipase C γ /diacylglycerol-dependent activation of β 2-chimaerin restricts EGF-induced Rac signaling. *The EMBO Journal* 25: 2062-2074.
- WATANABE E, SMITH DM, SUN J, SMART FW, DELCARPIO JB, ROBERTS TB, VAN METER CH & CLAYCOMB WC **(1998)**. Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Research in Cardiology* 93: 30-37.
- WEINSTEIN M, XU X, OHYAMA K & DENG CX **(1998)**. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development* 125: 3615-3623.
- WESCHE J, MAŁECKI J, WIĘDŁOCHA A, SKJERPEN CS, CLAUS P & OLSNES S **(2006)**. FGF-1 and FGF-2 require the cytosolic chaperone HSP90 for translocation into the cytosol and the cell nucleus. *The Journal of Biological Chemistry* 281(16): 11405-11412.

- WESTWOOD G, DIBLING BC, CUTHBERT-HEAVENS D & BURCHILL SA (2002). Basic fibroblast growth factor (bFGF)-induced cell death is mediated through a caspase-dependent and p53-independent cell death receptor pathway. *Oncogene* 21: 809-824.
- WILKIE AOM (2005). Bad bones, absent smell, selfish testes: the pleiotropic consequences of human FGF receptor mutations. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 187-203.
- WILLIAMSON AJK, DIBLING BC, BOYNE JR, SELBY P & BURCHILL SA (2004). Basic fibroblast growth factor-induced cell death is effected through sustained activation of p38MAPK and up-regulation of the death receptor p75NTR. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 47912-47928.
- WOODS D, PARRY D, CHERWINSKI H, BOSCH E, LEES E & MCMAHON M (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Molecular and Cellular Biology* 17: 5598-5611.
- WU R, CONNOLLY D, NGELANGEL C, BOSCH FX, MUNOZ N & CHO KR (2000). Somatic mutations of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) are uncommon in carcinomas of the uterine cervix. *Oncogene* 19: 5543-5546.
- XIAO S, NALABOLU SR, ASTER JC, MA J, ABRUZZO L, JAFFE ES, STONE R, WEISSMAN SM, HUDSON TJ & FLETCHER JA (1998). FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nature Genetics* 18: 84-87.
- XU X, WEINSTEIN M, LI C, NASKI M, COHEN RI, ORNITZ DM, LEDER P & DENG C (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125: 753-765.
- YAGASAKI F, WAKAO D, YOKOYAMA Y, UCHIDA Y, MUROHASHI I, KAYANO H, TANIWAKI M, MATSUDA A & BESSHO M (2001). Fusion of ETV6 to fibroblast growth factor receptor 3 in peripheral T-cell lymphoma with a t(4;12)(p16;p13) chromosomal translocation. *Cancer Research* 61: 8371-8374.
- YAMAGUCHI F, SAYA H, BRUNER JM, MORRISON RS (1994a). Differential expression of two fibroblast growth factor-receptor genes is associated with malignant progression in human astrocytomas. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 91: 484-488.
- YAMAGUCHI TP, HARPAL K, HENKEMEYER M, ROSSANT J (1994b). Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes & Development* 8: 3030-3044.
- YAMAGUCHI M & DAIMON Y (2005). Overexpression of regucalcin suppresses cell proliferation in cloned rat hepatoma H4-II-E cells: Involvement of intracellular signaling factors and cell cycle-related genes. *The Journal of Cellular Biochemistry* 95: 1169-1177.
- YAMAMOTO T, EBISUYA M, ASHIDA F, OKAMOTO K, YONEHARA S & NISHIDA E (2006). Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Current Biology* 16: 1171-1182.

- YASUMURA Y, BUONASSISI V & SATO G **(1966)**. Clonal analysis of differential function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Research* 26: 529-535.
- YEATMAN TJ **(2004)**. A renaissance for SRC. *Nature Reviews Cancer* 4: 470-480.
- YOSHIMURA N, SANO H, HASHIRAMOTO A, YAMADA R, NAKAJIMA H, KONDO M & OKA T **(1998)**. The expression and localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF receptor-1 (FGFR-1) in human breast cancer. *Clinical Immunology and Immunopathology* 89: 28-34.
- ZEHE C, ENGLING A, WEGEHINGEL S, SCHÄFER T & NICKEL W **(2006)**. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 103: 15479-15484.
- ZHANG J, COUSENS LS, BARR PJ & SPRANG SR **(1991)**. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor, a structural homolog of interleukin 1 β . *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 88: 3446-3450.
- ZHOU M, SUTLIFF RL, PAUL RJ, LORENZ JN, HOYING JB, HAUDENSCHILD CC, YIN M, COFFIN JD, KONG L, KRANIAS EG *et al.* **(1998)**. Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nature Medicine* 4: 201-207.
- ZHU X, KOMIYA H, CHIRINO A, FAHAM S, FOX GM, ARAKAWA T, HSU BT & REES DC **(1991)**. Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors. *Science* 251: 90-93.
- ZHU L, SOMLO G, ZHOU B, SHAO J, BEDELL V, SLOVAK ML, LIU X, LUO J & YEN Y **(2005)**. Fibroblast growth factor receptor 3 inhibition by short hairpin RNAs leads to apoptosis in multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics* 4(5): 787-798.

8 Lista de anexos

Anexo I - Gráficos obtidos pelo método de análise $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de RT-qPCR (item 4.7)

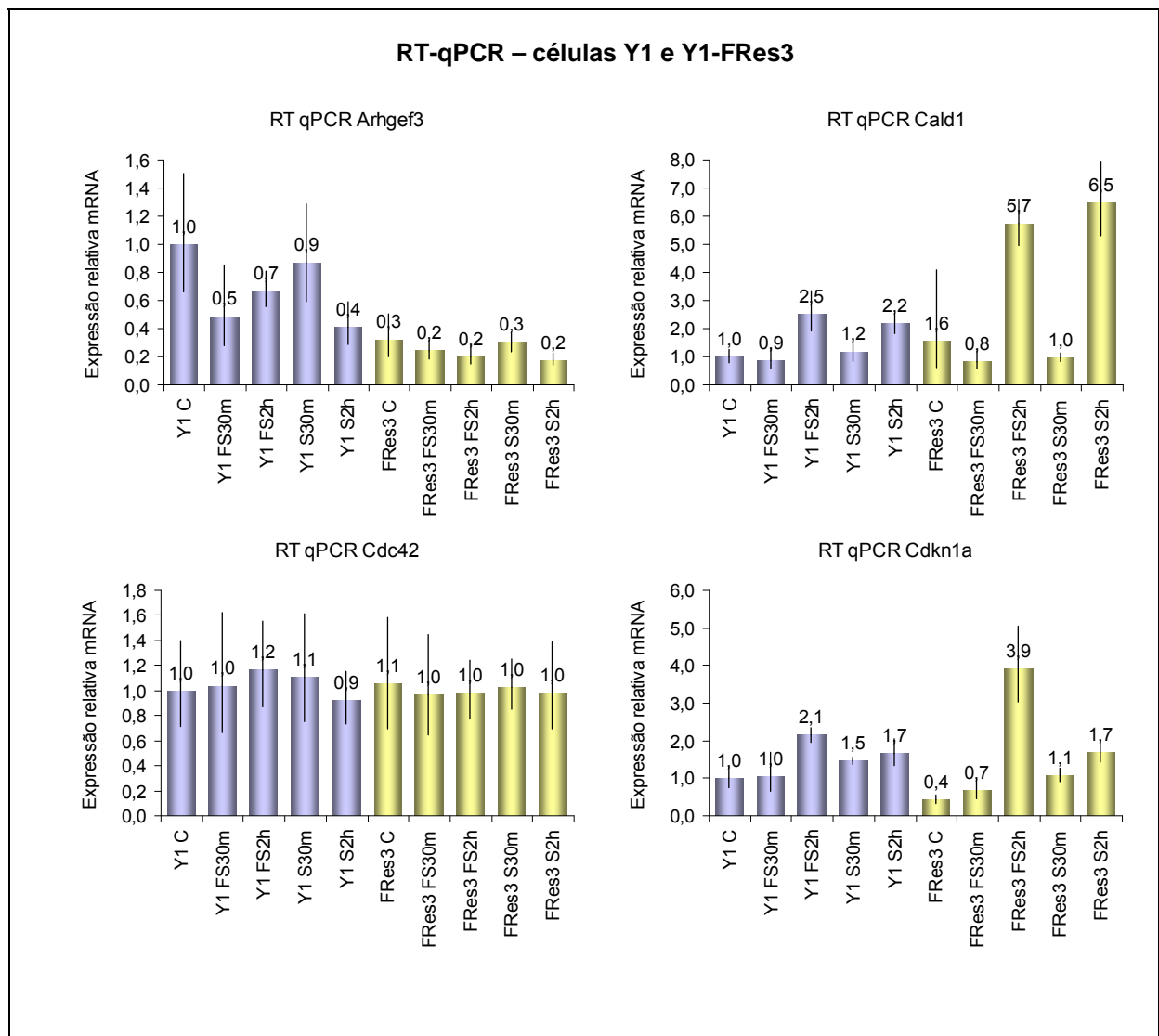
Anexo II - Artigo completo de Costa *et al.*, 2008

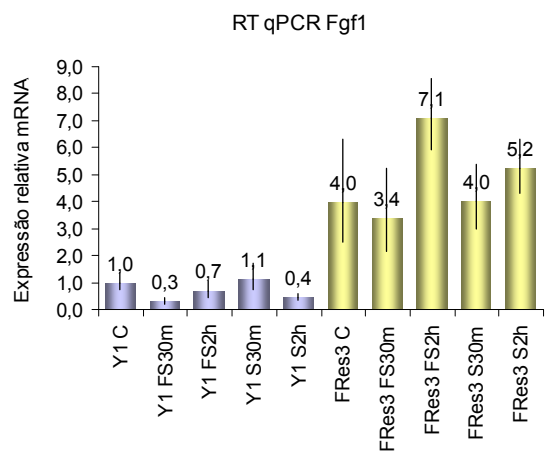
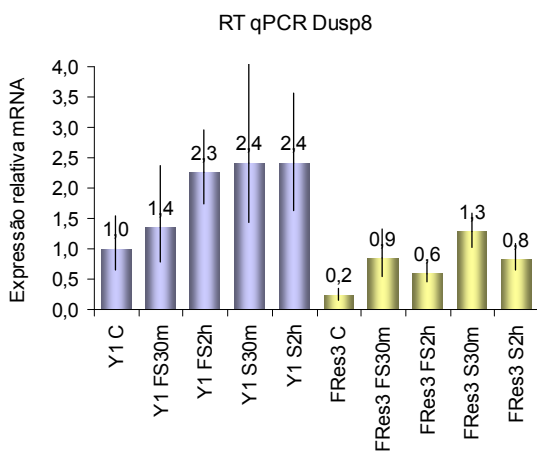
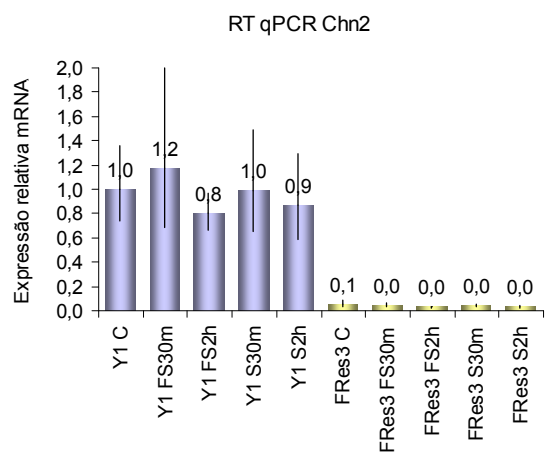
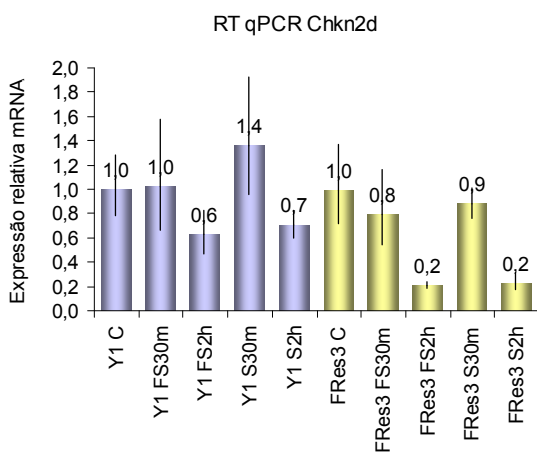
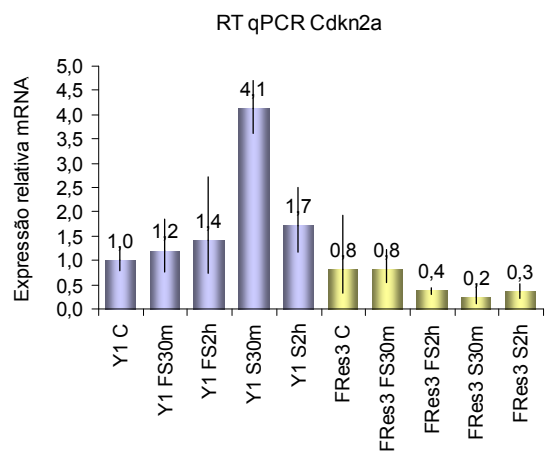
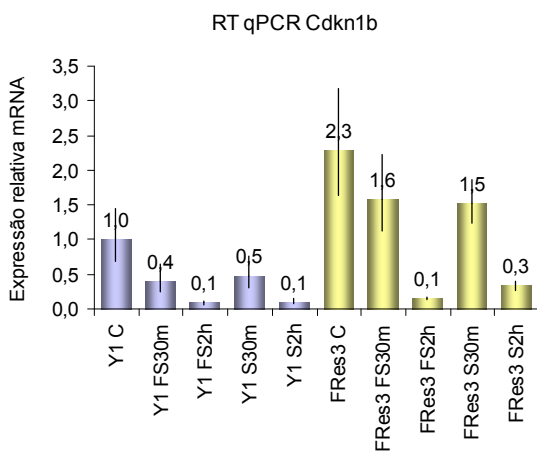
Anexo III - Súmula Curricular

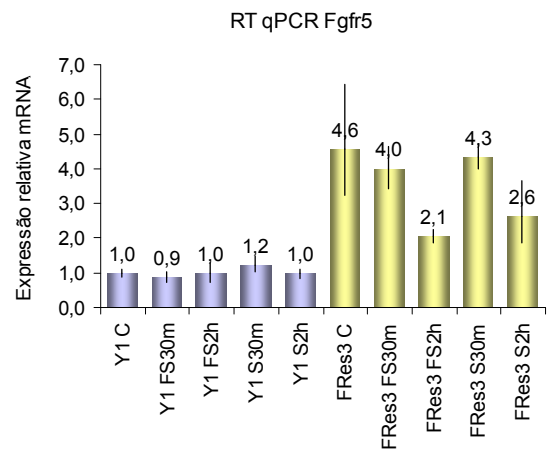
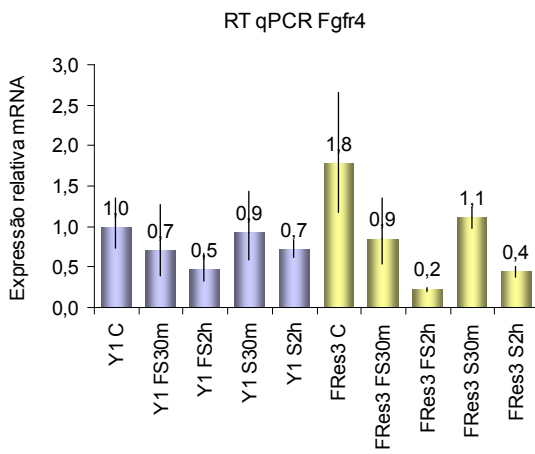
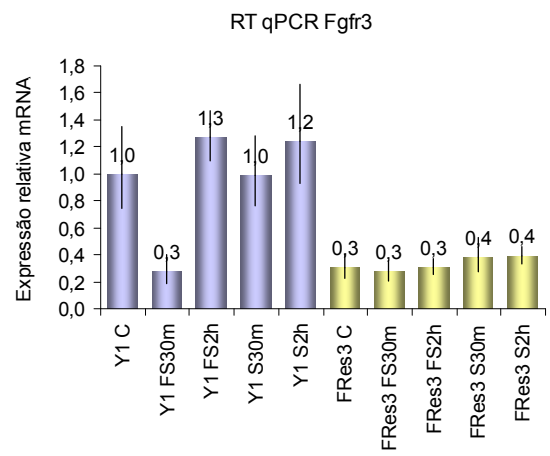
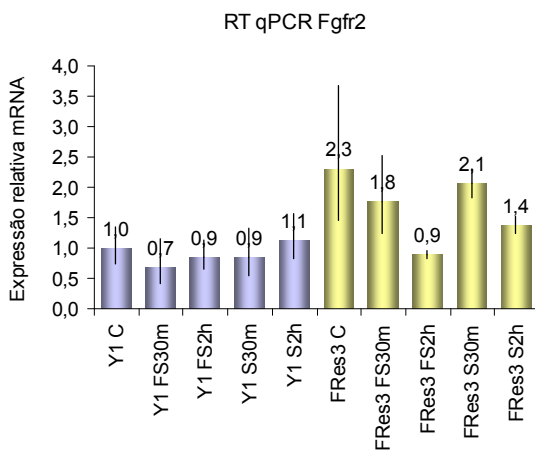
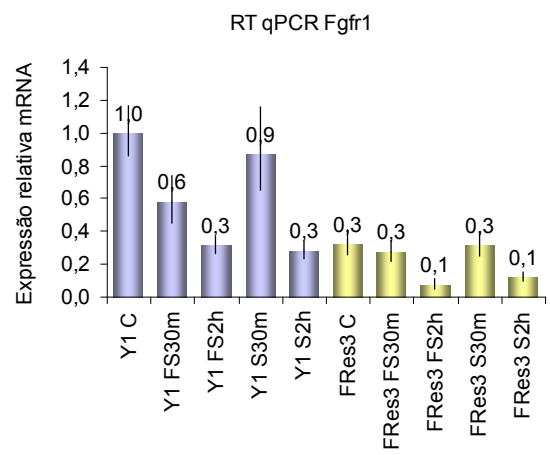
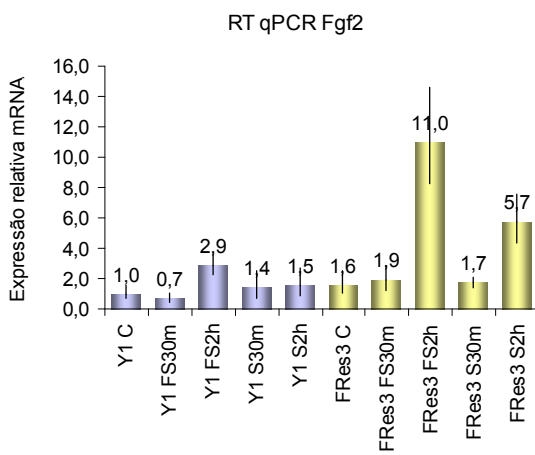
Estes anexos encontram-se na versão eletrônica desta tese.

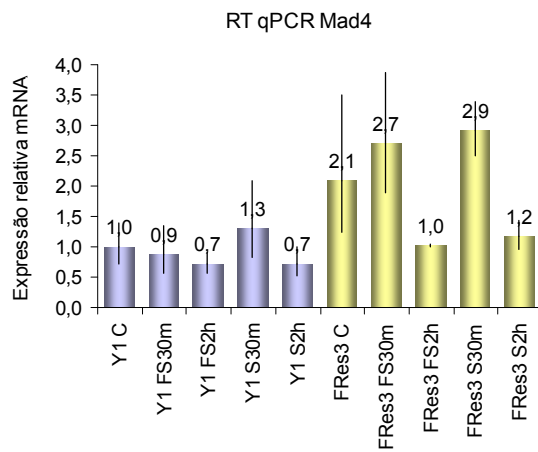
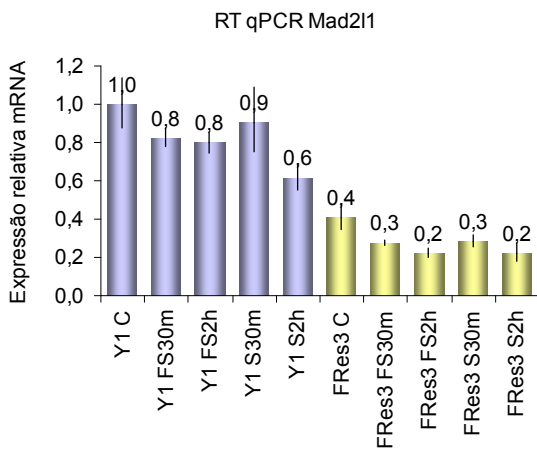
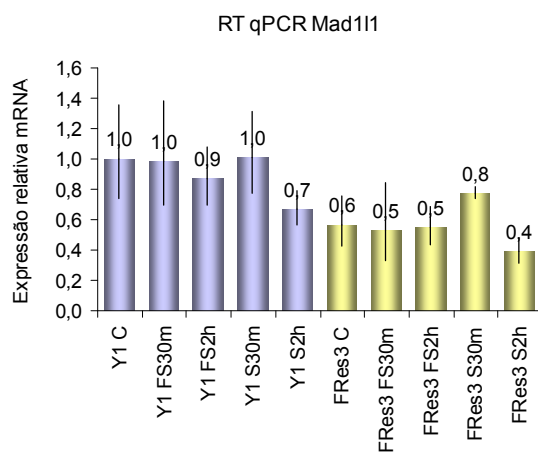
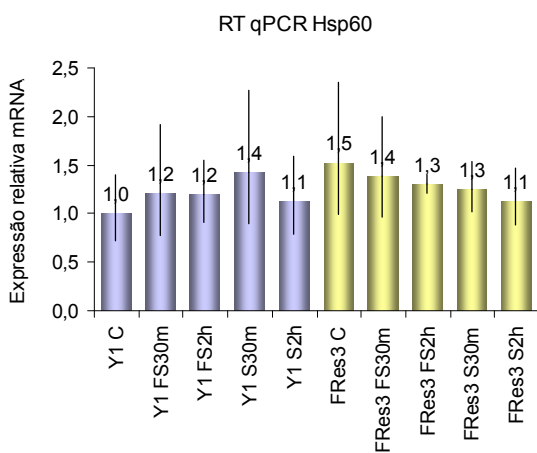
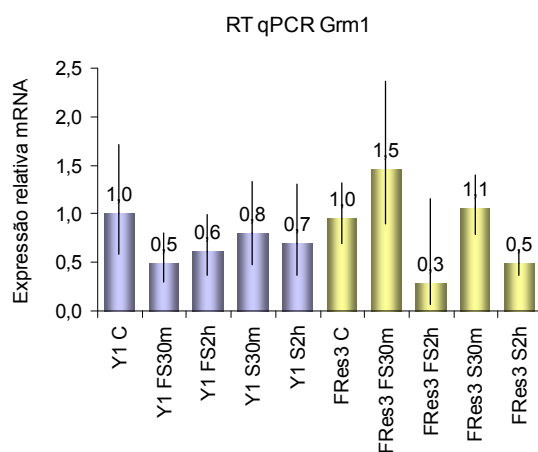
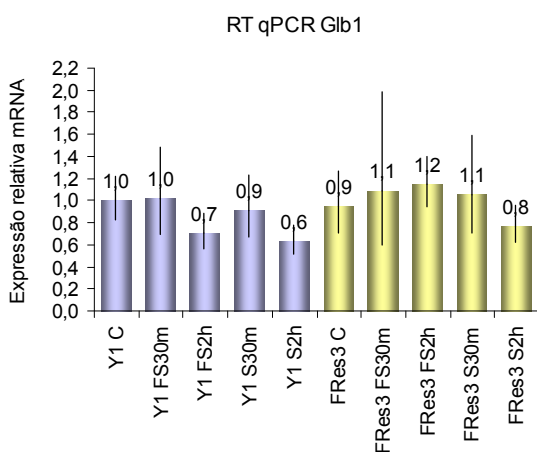
Anexo I

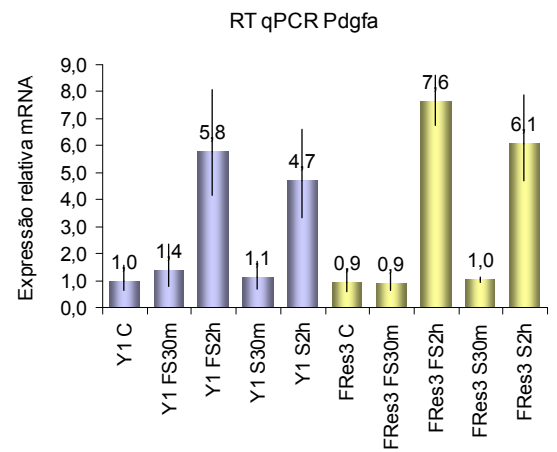
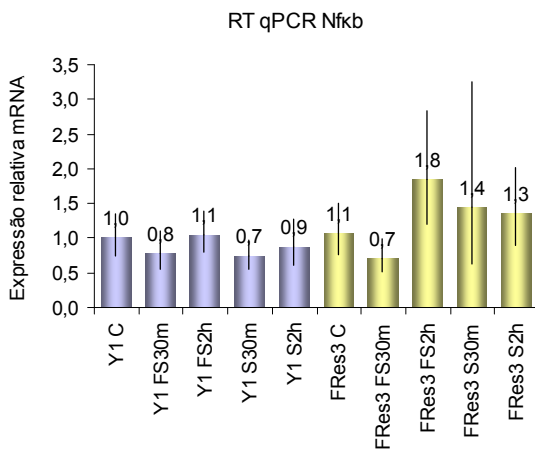
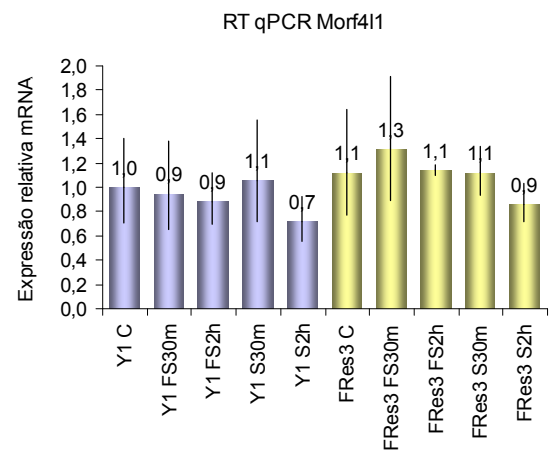
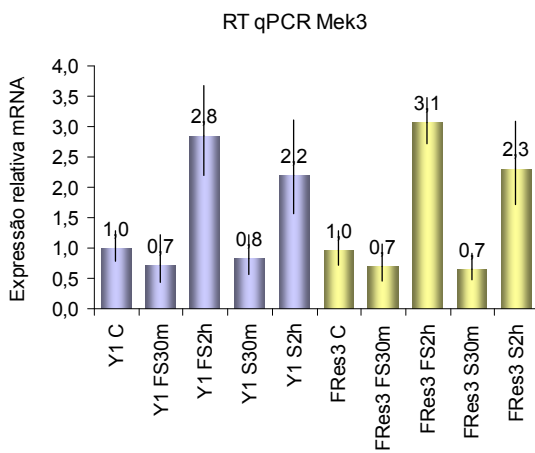
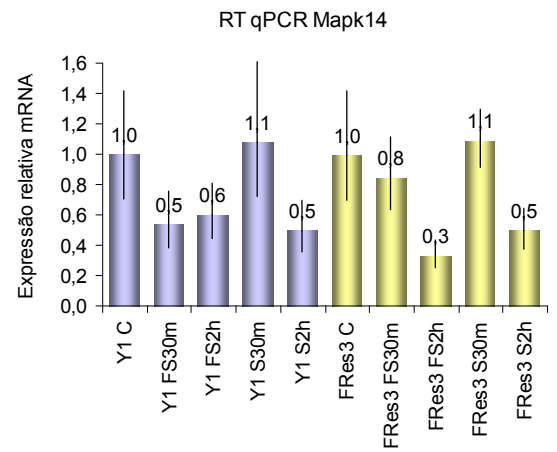
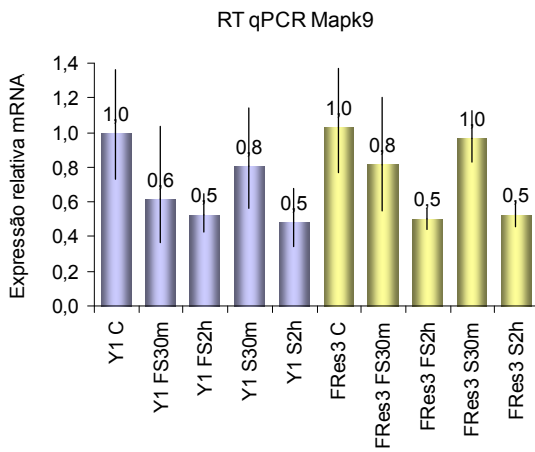
Abaixo estão apresentados os resultados de RT-qPCR das células Y1 e Y1-FRes3 (item 4.7), analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

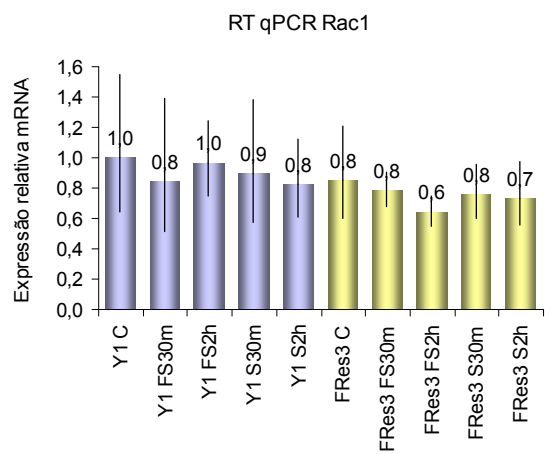
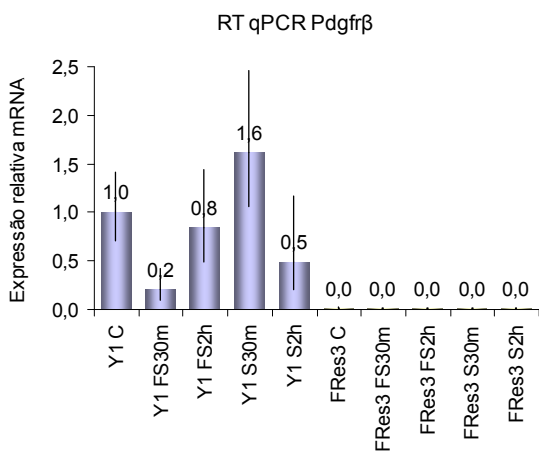
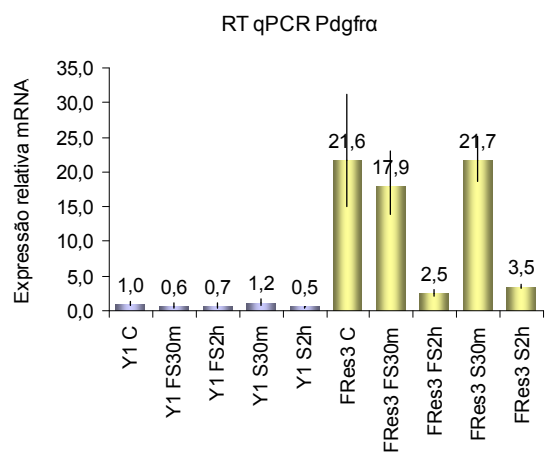
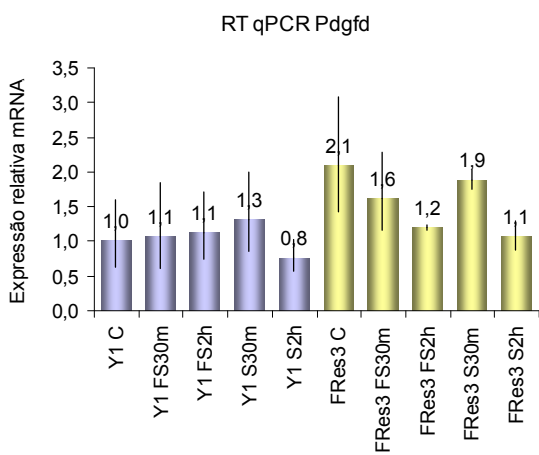
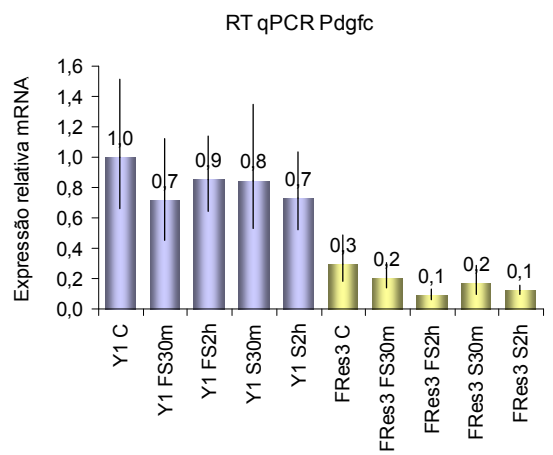
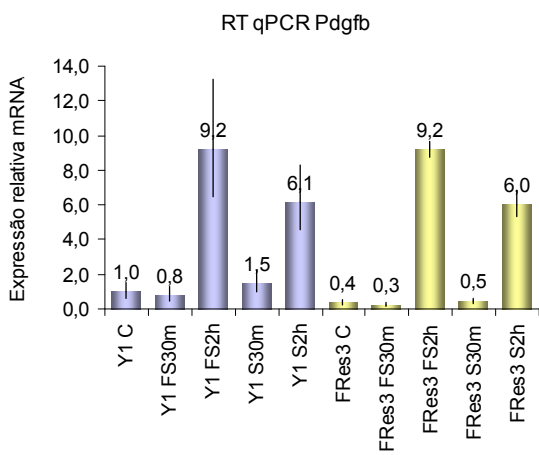


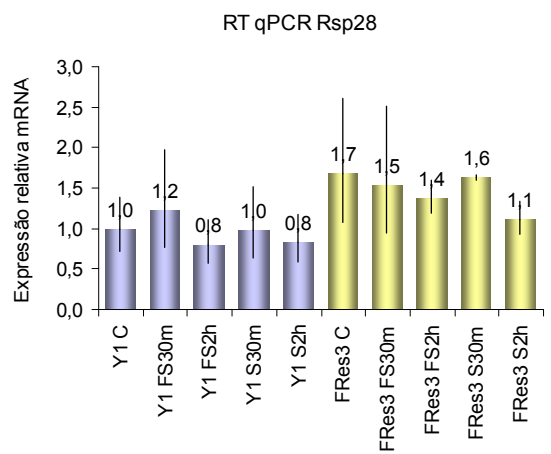
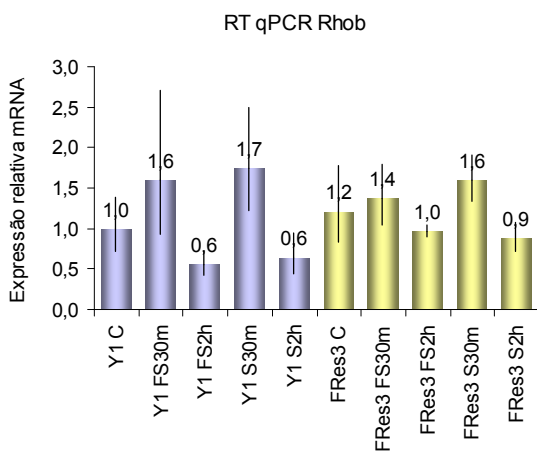
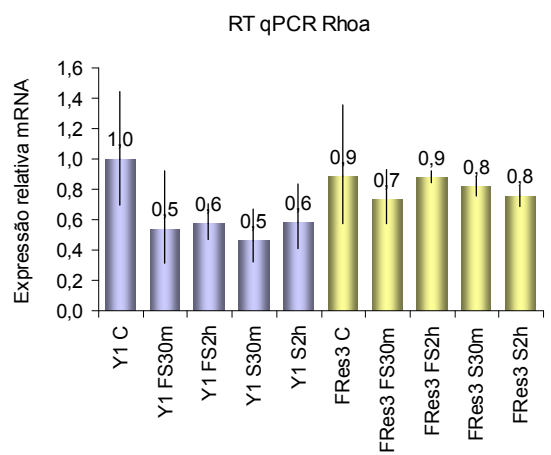
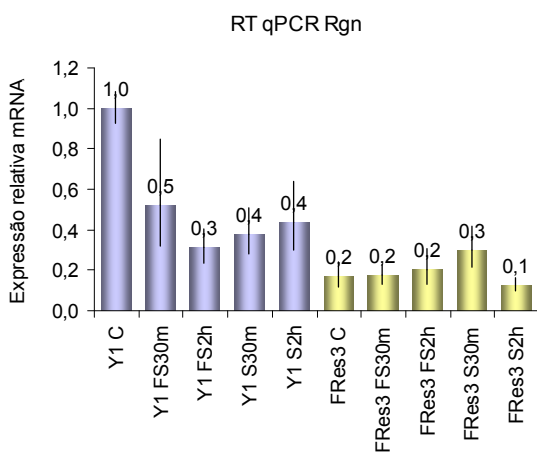
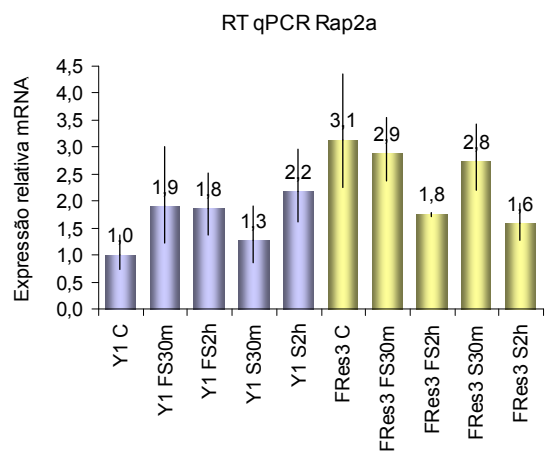
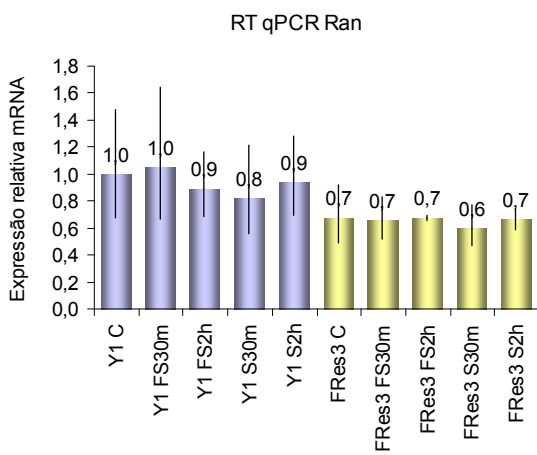












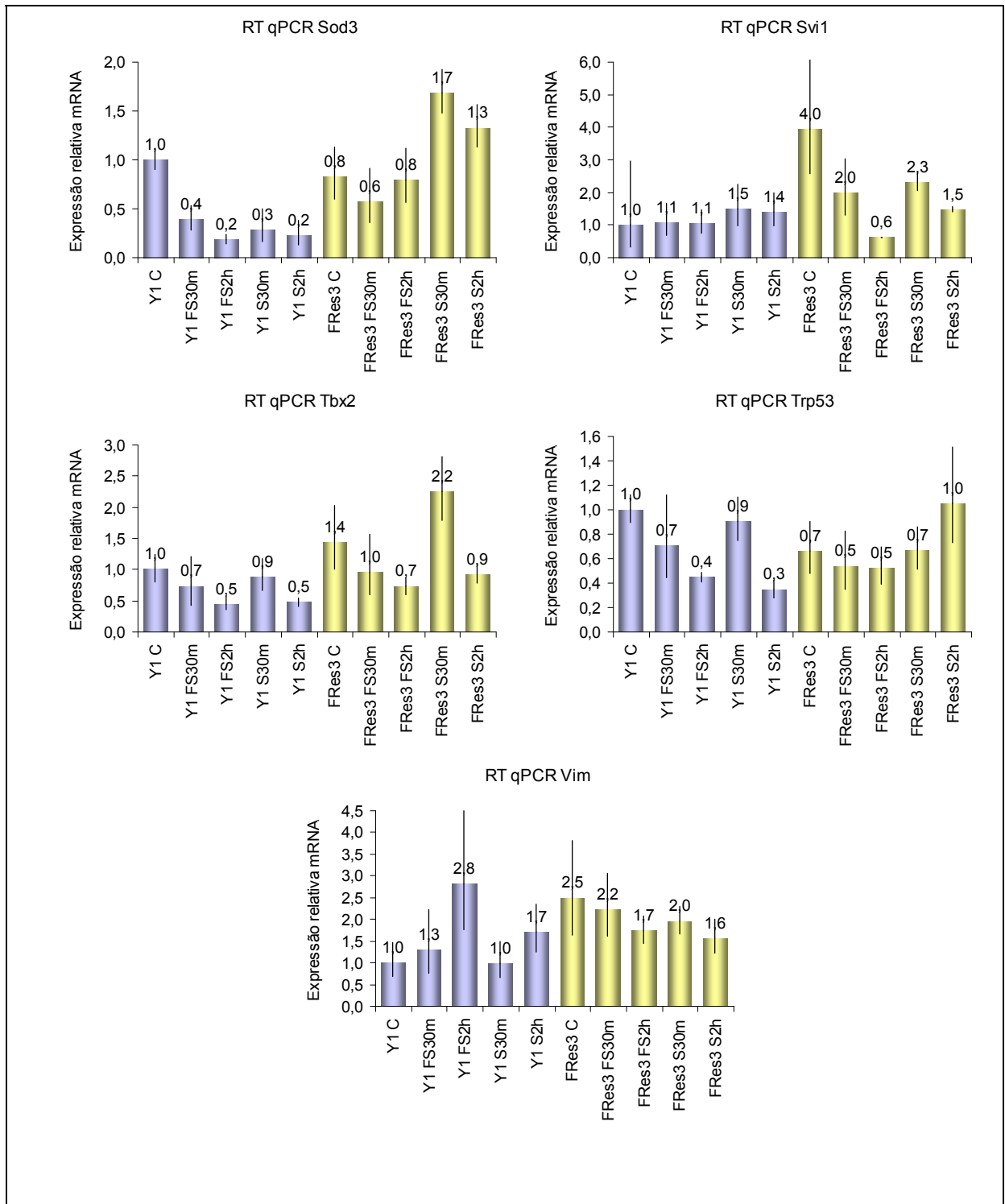


Figura A1 | RT-qPCR para Arhgef3, Cald1, Cdc42, Cdkn1a, Cdkn1b, Chn2, Dusp8, Fgf1, Fgf2, Fgfr1, Fgfr2, Fgfr3, Fgfr4, Fgfr5, Glb1, Grm1, Hsp60, Mad111, Mad211, Mad4, Mapk9, Mapk14, Mek3, Morf411, Nfkb, PdgfA, PdgfB, PdgfC, PdgfD, Pdgfr α , Pdgfr β , Rac1, Ran, Rap2a, Rgn, RhoA, RhoB, Rps28, Sod3, Svi1, Tbx2, Trp53 e Vim.

Anexo II

Fibroblast Growth Factor 2 Restrains Ras-Driven Proliferation of Malignant Cells by Triggering RhoA-Mediated Senescence

Érico T. Costa, Fábio L. Forti, Tatiana G.F. Matos, Alexandre Dermargos, Fábio Nakano, Jacqueline Salotti, Kátia M. Rocha, Paula F. Asprino, Celina K. Yoshihara, Marianna M. Koga, and Hugo A. Armelin

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Fibroblast growth factor 2 (FGF2) is considered to be a bona fide oncogenic factor, although results from our group and others call this into question. Here, we report that exogenous recombinant FGF2 irreversibly inhibits proliferation by inducing senescence in Ras-dependent malignant mouse cells, but not in immortalized nontumorigenic cell lines. We report the following findings in K-Ras-dependent malignant Y1 adrenocortical cells and H-Ras V12-transformed BALB-3T3 fibroblasts: (a) FGF2 inhibits clonal growth and tumor onset in nude and immunocompetent BALB/c mice, (b) FGF2 irreversibly blocks the cell cycle, and (c) FGF2 induces the senescence-associated β -galactosidase with no accompanying signs of apoptosis or necrosis. The tyrosine kinase inhibitor PD173074 completely protected malignant cells from FGF2. In Y1 adrenal cells, reducing the constitutively high levels of K-Ras-GTP using the dominant-negative RasN17 mutant made cells resistant to FGF2 cytotoxicity. In addition, transfection of the dominant-negative RhoA-N19 into either Y1 or 3T3-B61 malignant cell lines yielded stable clonal transfectants that were unable to activate RhoA and were resistant to the FGF2 stress response. We conclude that in Ras-dependent malignant cells, FGF2 interacts with its cognate receptors to trigger a senescence-like process involving RhoA-GTP. Surprisingly, attempts to select FGF2-resistant cells from the Y1 and 3T3-B61 cell lines yielded only rare clones that (a) had lost the overexpressed *ras* oncogene, (b) were dependent on FGF2 for proliferation, and (c) were poorly tumorigenic. Thus, FGF2 exerted a strong negative selection that Ras-dependent malignant cells could rarely overcome. [Cancer Res 2008;68(15):6215-23]

Introduction

Fibroblast growth factor 2 (FGF2) is well known for playing crucial roles in embryogenesis, morphogenesis, tissue turnover, and wound-healing (1-3). However, the role of FGF2 in the development and maintenance of tumors remains an open question, and constitutes the central focus of this article. Early and more recent reports have implicated FGF2 in oncogenesis. For example, ectopic

FGF2 overexpression in transformed mouse 3T3 fibroblasts was found to be oncogenic (4), and more recently, FGF2 expression has been found to be up-regulated in several types of cancer and to protect cancer cells from chemotherapy (5-8). On the other hand, other laboratories have reported that exogenous FGF2 inhibits proliferation, causes death, and chemosensitizes human and rodent tumor cell lines (9-13), implying that FGF2 can restore tumor defense mechanisms in malignant cells.

To analyze whether and how exogenous FGF2 can trigger tumor-defense mechanisms in malignant cells, we chose a pair of Ras-dependent mouse malignant cell lines that are resistant to apoptosis or senescence. The first was the Y1 adrenocortical carcinoma cell line, which was isolated and cloned (14), and later discovered to carry the amplified and overexpressed *K-ras* oncogene (15). The second is a set of highly tumorigenic clonal sublines of BALB-3T3 fibroblasts that were previously transformed with both the *H-ras* V12 oncogene and a neomycin marker gene (16).

Mutated *ras* oncogenes are frequently found in human cancers (17, 18) and are sufficient to induce malignant transformation of almost any kind of immortalized cell line (17, 19, 20). On the other hand, ectopic expression of the activated H-Ras-V12 oncoprotein triggers premature senescence or apoptosis in primary cultures of mouse embryo fibroblasts or human cells, instead of malignant transformation (21, 22). This phenomenon, designated the oncogene stress response, constitutes one of several checkpoints characterizing the complex tumor-defense system of mammalian cells. This system activates well-established apoptotic pathways or still poorly defined senescence pathways (22). When an immortalized cell is transformed with one of the *ras* oncogenes, a malignant cell line is produced that has passed several tumor-defense checkpoints and is now resistant to programmed cell death (19, 20). A timely question in cancer biology and cancer therapy is whether and how one can elicit tumor-defense mechanisms that can lead to the demise of Ras-dependent malignant cells.

As a step in this direction, we report here that FGF2 blocks the cell cycle of Ras-dependent Y1 and 3T3-B61 malignant cells, irreversibly inhibiting proliferation and inducing senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) without signs of apoptosis or necrosis. In addition, whereas inoculating Y1 and 3T3-B61 cells under the skin of BALB/c mice initiates rapid tumor growth, this growth is inhibited by injections of FGF2 at the site of inoculation. RhoA-GTP mediates this FGF2-induced senescence response in both malignant cell types. In fact, prolonged exposure of Y1 and 3T3-B61 malignant cells to FGF2 exerts strong selective pressure against the cells and favors the emergence of poorly tumorigenic variants devoid of overexpressed Ras oncoproteins that are dependent on FGF2 for proliferation and survival. Taken together, these results lead us to propose that, similar to the oncogene stress response of normal cells, some malignant cells resistant to

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

É.T. Costa and F.L. Forti contributed equally to this research.

Requests for reprints: Hugo A. Armelin, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, Cidade Universitária, São Paulo-SP, Cep 05508-900, Brazil. Phone: 55-11-3091-2172; Fax: 55-11-3091-2186; E-mail: haarmeli@iq.usp.br.

©2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0342

apoptosis and senescence exhibit a novel FGF2 stress response. This FGF2 stress response is unlikely to be unique to this growth factor and is unquestionably of great interest for cancer biology and therapy.

Materials and Methods

Cell lines. The homogeneously stained chromosome region (HSR) subline (23) of the mouse Y1 adrenocortical carcinoma cell line (14) was obtained from the American Type Culture Collection in 1973. The early passage BALB/c mouse embryo fibroblast cell line, BALB-3T3 clone A31, was obtained in 1984 from the laboratory of Dr. Charles D. Stiles (Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA). Parental Y1 and BALB-3T3 cells and multiple sublines derived from them in this laboratory were cultured in DMEM containing 10% FCS (10% FCS-DME).

Clonogenic assays and growth curves. For clonogenic assays on a solid substrate, cells were plated at 80 to 120 cells/cm² in 10% FCS-DME. For suspension cultures, suspensions of single cells in 0.3% agarose in 10% FCS-DME were overlaid on the solid phase of 0.6% agarose-10% FCS-DME at 1×10^3 to 5×10^3 cells/well. After incubation, colonies were fixed, stained, and counted. To analyze cell proliferation in mass cultures, 2×10^3 to 5×10^3 cells/cm² were plated in 35 mm dishes and counted daily for 5 to 8 days with changes in the medium every second or third day.

Tumorigenesis assays. To monitor the effects of FGF2 on tumor growth, Y1 cells were inoculated in immunodeficient BALB/c-nude mice (4–10 weeks old), whereas BALB-3T3 fibroblasts were inoculated in either immunodeficient nudes or immunocompetent BALB/c mice. Samples of 0.5×10^6 cells in 0.1 mL of serum-free DME with or without 2 ng of FGF2 were injected s.c. in the left hind region of each animal. FGF2 in DME (200 ng/animal) was injected at the site of inoculation every other day, and control animals, which had received inoculum suspensions without FGF2, were injected with equal volumes of DME. Periodic FGF2 injections were essential to inhibit tumor growth independently of FGF2 inclusion in the inoculum (results not shown). Tumor onset was monitored by animal palpation, and tumor size was estimated with the aid of a pachymeter.

Analysis of ERK1/2 and Akt phosphorylation. Cells were lysed by sonication (2 min) in cold 62.5 mmol/L of Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 10% glycerol, 50 mmol/L of DTT, and 1% (w/v) bromophenol blue. The sonicate was boiled for 5 min, clarified by centrifugation at $10,000 \times g$ for 5 min at 4°C, and supernatant aliquots of 150 µg were loaded on 10% SDS-PAGE gels and processed for Western blotting. Total Erk1/2 or Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-phosphorylated ERK1/2 and total Akt or Ser⁴⁷³-phosphorylated Akt isoforms were detected with specific polyclonal rabbit antibodies (Cell Signaling) and a secondary antirabbit polyclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase for chemiluminescent detection (ECL, Amersham-Pharmacia).

RhoAN19 and RhoAV14 clonal sublines derived from Y1 and 3T3-B61 cells. The retroviral pCM vector is based on the pCLNCX backbone, and it contains the Neo gene marker and a polylinker under the control of the cytomegalovirus promoter. Wild-type *RhoA*, constitutively active *RhoAV14*, and dominant-negative *RhoAN19* mutants were cloned separately into the *EcoRI* restriction site of pCM and transiently transfected using Lipofectin into ΦNX-Ampho cells (Phoenix) to produce stocks of recombinant retrovirus, which were maintained at -80°C. Y1 or 3T3-B61 cells were cultured to 50% confluence in 100 mm dishes in 10% FCS-DME containing 5 µg/mL of polybrene. The cells were infected at high viral multiplicity, neutrally selected with 500 µg/mL of G418, and cloned. Stocks of Y1 and 3T3-B61 transfectant clonal sublines were isolated and named to reflect the transducing retrovirus: Y1-RhoAW, Y1-RhoAV14, and Y1-RhoAN19; and B61-RhoAW, B61-RhoAV14, and B61-RhoAN19. These cell sublines were preserved in liquid nitrogen.

Determining RhoA-GTP levels based on reaction with the RBD-GST fusion protein. Protein aliquots (1 mg) from frozen cell lysates [50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5% Nonidet P-40, 150 mmol/L NaCl, 1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mmol/L DTT and 10 µg/mL each of leupeptin, pepstatin, aprotinin, phenylmethylsulfonyl fluoride, and sodium orthova-

nadate] were incubated with Sepharose beads to which the RhoA binding domain of rhotekin-glutathione *S*-transferase (24) had been conjugated (RBD-GST-Sepharose beads). RhoA-GTP in the cell lysates was allowed to bind to the beads for 60 min at 4°C on a rotating platform. The beads were recovered by centrifugation, washed to remove unbound proteins, boiled in SDS-PAGE loading buffer, loaded onto 13% SDS-PAGE gels, and processed for Western blotting. Protein aliquots (100 µg) of untreated cell lysates were processed in parallel to estimate the total amount of RhoA-GTP. RhoA was detected using polyclonal mouse antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Flow cytometry. Cells fixed with 75% ethanol were suspended in 150 µL of PBS plus 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100, 50 µL of 1 mg/mL RNase A (Sigma-Aldrich), and 100 µL of 100 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich), and incubated overnight at 4°C. The suspensions were then analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Inc.) with an argon-ion laser (250 mW, 488 nm; Coherent, Inc.). Red fluorescence due to the propidium iodide was detected at 560/580 nm. Data from samples of 10,000 cells were collected and analyzed using Cylchred (CytometUK, University of Wales College of Medicine, United Kingdom). Light scattering was used to monitor cell size and granularity or internal complexity.

SA-β-Gal assay. Monolayers of cells were fixed for 5 min at room temperature in 2% formaldehyde/0.2% glutaraldehyde. The fixed cells were rinsed and incubated for 8 h at 37°C with a staining solution of 1 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside which also contained 5 mmol/L of potassium ferrocyanide, 5 mmol/L of potassium ferricyanide, 150 mmol/L of NaCl, 2 mmol/L of MgCl₂, 40 mmol/L of citric acid, and sodium phosphate (pH 6.0). The staining solution was diluted from a 20 mg/mL stock solution in dimethylformamide shortly before use. The percentage of SA-β-Gal-stained cells was estimated in photomicrographs by counting a total of 500 cells per duplicate plates. Results from independent experiments were pooled and statistically analyzed using the χ² test of homogeneity.

Results

FGF2 triggers irreversible senescence and inhibits the proliferation of two Ras-dependent malignant cell lines. FGF2 severely inhibited colony development in clonogenic assays with Y1 cells in both solid substrate cultures (Fig. 1A) and agarose suspension cultures (Fig. 1B). FGF2 was a much stronger inhibitor than FGF1, FGF4, or FGF5 (Fig. 1A), even though all of them activated the ERK1/2 mitogenic pathway to similar extents (Supplementary Data, Fig. S1A). Growth curve analysis shows that FGF2 blocked Y1 cell proliferation (Fig. 1C) with an ED₅₀ of 65 pmol/L (data not shown), whereas FGF1 caused only minor inhibition (Fig. 1C). In addition, injections of FGF2 strongly inhibited the rapid tumor growth of Y1 cells previously inserted under the skin of immunodeficient nude mice (Fig. 1D). The FGF receptor (FGFR) tyrosine kinase inhibitor PD173074 completely protected Y1 cells from FGF2 inhibition (Supplementary Data, Fig. S1B), implying that the inhibitory effect of FGF2 is mediated by FGFRs. These inhibitory effects of FGF2 were not unique to our Y1 strain and were also observed in another ras-dependent malignant cell line, which carried amplified *K-ras* genes in the DM instead of HSR chromosomes (Supplementary Data, Fig. S1C; ref. 23).

The FGF2-induced inhibition of malignant cell proliferation seems to be due to irreversible cell cycle arrest (senescence). Bromodeoxyuridine (BrdUrd) labeling of Y1 cells arrested in G₀-G₁ shows that FCS, FGF2, or FCS + FGF2 stimulate the completion of G₁ and entry into S phase (Table 1), in agreement with our previous results (25). However, Y1 cells treated with FGF2 or FCS + FGF2 showed significantly less uptake of ³H-thymidine into DNA compared with serum-treated cells (Table 1; Supplementary Data, Fig. S2). In addition, Y1 cells treated with FGF2 or FCS + FGF2 had extremely low mitotic indices by 18 hours (Table 1), indicating that

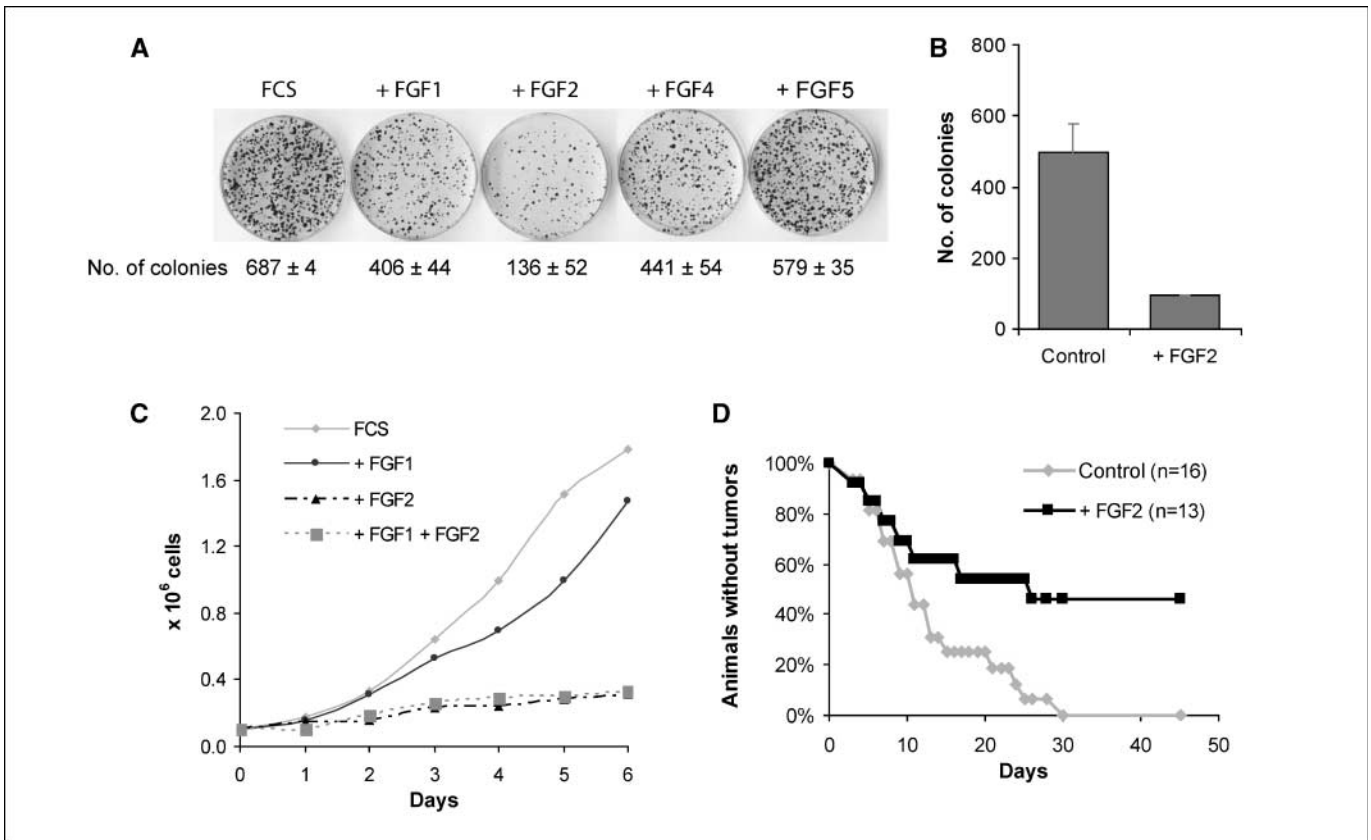


Figure 1. FGF2 inhibits the proliferation of mouse Y1 adrenocortical malignant cells *in vitro* and *in vivo*. *A*, clonogenic assays in solid substrate cultures; the number of colonies in FCS + FGF2 (24 h) is significantly lower than FCS or FCS + any other FGF ($P < 0.0001$; χ^2 test). *B*, clonogenic assays in agarose suspension cultures ($P < 0.0001$; χ^2 test). *C*, growth curves. (FCS + FGF2) and (FCS + FGF2 + FGF1), but not (FCS + FGF1), are significantly different from FCS ($P < 0.05$, Mann-Whitney test). *D*, onset of Y1 tumors in nude mice injected with FGF2; controls were injected with vehicle ($P < 0.01$, Mann-Whitney test).

they fail to reach mitosis because they are trapped in S phase. Furthermore, DNA fragmentation characteristic of the later stages of apoptosis remained at negligible levels even after 48 hours of FGF2 treatment, as shown by flow cytometry analysis (Fig. 2A) and terminal nucleotidyl transferase-mediated nick end labeling assays (data not shown). To detect early signs of apoptosis and necrosis, we used standard assays of FITC-Annexin V labeling and propidium iodide exclusion, respectively. Our results showed that the vast majority of FGF2-treated Y1 cells were negative for both green (FITC-Annexin V) and red (propidium iodide) fluorescent

labeling (Fig. 2B). In addition, Y1 cells treated with FGF2 for 24-48 hours did not show any activation of caspases 3 or 7, and their ATP levels were normal and stable, confirming that the mitochondrial respiratory chain remained functional (data not shown).

Consistent with these results, the strong and specific caspase inhibitor Ac-DEVD-CMK did not protect Y1 cells from FGF2 toxicity in clonogenic assays (data not shown). In fact, FGF2 increased Y1 cell granularity or internal complexity (see side-scattered light in Fig. 2C) and induced SA- β -Gal expression in 50% of the cells within

Table 1. BrdUrd labeling, ³H-thymidine incorporation, and mitotic index in Y1 adrenocortical cells arrested in G₀-G₁ and subsequently stimulated with FCS and/or FGF2

Treatment	BrdUrd labeling (%)	³ H-thymidine incorporation (cpm x10 ³)	³ H-TdR / BrdUrd	Mitotic index (%)
Serum-free	18	17.1 ± 4.4	0.95	1.2
FCS	94	80.6 ± 3.7	0.85	6.2
FCS + FGF2	82	32.2 ± 5.2	0.39	0.7
FGF2	60	17.5 ± 5.2	0.29	0

NOTE: G₀-G₁-arrested Y1 cells were stimulated with 10% FCS and/or 1 nmol/L of FGF2 for 18 h; cells were allowed to incorporate BrdUrd (50 μmol/L) or ³H-thymidine (³H-TdR, 1 μCi/mL, 10⁻⁷ mol/L) for 8 h (between 10 and 18 h). ³H-TdR incorporation results are presented as the means of two independent experiments ± SD. BrdUrd-labeled nuclei (n = 1,500 cells) and mitotic indices (n = 6,000 cells) were obtained from two independent experiments.

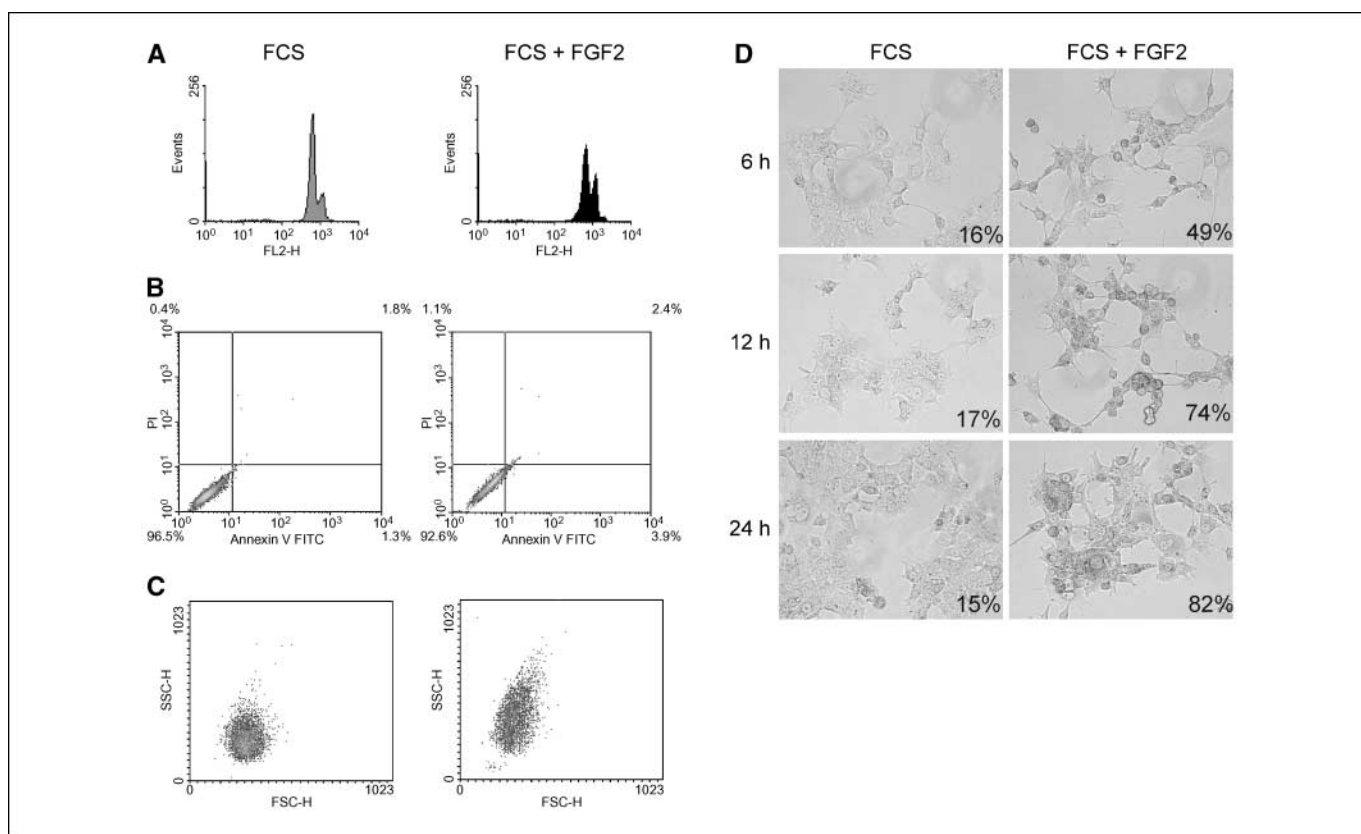


Figure 2. FGF2 induces the expression of SA- β -Gal in Y1 adrenocortical malignant cells but not apoptosis or necrosis. *A*, flow cytometric profiles do not detect DNA fragmentation. *B*, FITC-Annexin V labeling and propidium iodide dye exclusion assays were negative for both apoptosis and necrosis. *C*, side-scattered light indicates that FGF2 increased cell granularity or internal complexity. *D*, assays of SA- β -Gal show induction by FGF2; differences between FCS and FCS + FGF2 are statistically significant at all three time points ($P < 0.05$; χ^2 test).

6 hours and in >80% of the cells by 24 hours (Fig. 2*D*). All of these observations indicate that FGF2, although acting as a canonical mitogen in promoting the G_0 - $G_1 \rightarrow S$ transition, also triggers a senescence-like process and irreversibly blocks the cell cycle at the S phase in Y1 cells.

H-RasV12-transformed BALB-3T3 fibroblasts express constitutively high levels of H-RasV12-GTP (Supplementary Data, Fig. S3). Similar to its effect on Y1 cells, FGF2 induces a senescence-like process in these fibroblasts. Thus, both FGF2 and FGF1 strongly inhibited colony growth of the transformed 3T3-B61 subline in clonogenic assays (Fig. 3*A*), and this inhibition depended on the activation of FGFRs (Fig. 3*B*). In addition, FGF2 inhibited the proliferation of 3T3-B61, regardless of whether the cells existed as monolayers (Fig. 3*C*), as suspension cultures (data not shown), or as tumors in immunocompetent BALB/c mice (Fig. 3*D*). FGF2 also induced SA- β -Gal expression in 3T3-B61 monolayers (data not shown). Furthermore, the inhibitory effect of FGF2 on the proliferation of BALB-3T3 cells correlates with both H-RasV12 expression and tumorigenicity in mice (Supplementary Data, Table S1). These results with Ras-transformed BALB-3T3 cells closely resemble those described above for the Y1 adrenocortical lines, indicating that FGF2 distinguishes immortalized lines from *ras* oncogene-transformed sublines.

Constitutively high levels of Ras-GTP in malignant cells make their proliferation vulnerable to inhibition by FGF2. As seen most clearly in the Y1 adrenocortical cell line, the inhibitory effect of FGF2 on cell proliferation depends on constitutively high

levels of K-Ras-GTP. In stable clonal transfectant Y1 sublines (26) carrying the human dominant-negative mutant *H-rasN17* (27) under the control of the mouse mammary tumor virus promoter, dexamethasone induced the expression of the *H-rasN17* transgene and caused a severe reduction in endogenous levels of KRas-GTP levels (Supplementary Data, Fig. S4; ref. 26). This reduction, in turn, led to changes in cell phenotype. FGF2 inhibited the proliferation of the Y1-RasN17-3.1 subline in the absence of dexamethasone (Fig. 4*A*), but not in its presence (Fig. 4*B*). Furthermore, Y1-RasN17-3.1 cells behaved identically to parental Y1 cells in clonogenic assays, showing reduced colony growth after 24 hours of FGF2 treatment (Fig. 4*C*). However, prior treatment with dexamethasone rendered Y1-RasN17-3.1 cells resistant to FGF2, whereas colony development of parental Y1 cells was still strongly inhibited by FGF2 (Fig. 4*C*). On the other hand, the expression of cyclins D1 and E, the activation of CDK2, and the phosphorylation of Rb protein in G_0 - G_1 -arrested parental Y1 cells and Y1-RasN17-3.1 cells stimulated with either FCS or FGF2 were essentially the same, irrespective of dexamethasone treatment (Supplementary Data, Fig. S5). These results imply that serum or FGF2 promotes progression through G_1 in Y1 cells, and that this promoting effect is independent of the levels of K-Ras-GTP. Therefore, high levels of K-Ras-GTP in Y1 cells cause FGF2 to induce a senescence-like response consisting of a block in S phase.

Cells rescued from tumors growing in FGF2-injected animals are not resistant to FGF2. Y1 cells taken from tumors growing in FGF2-injected nude mice were sensitive to FGF2 growth

inhibition and did not yield clonal sublines resistant to FGF2 (data not shown). These observations show that the tumor growth observed in FGF2-injected animals was not due to the emergence of FGF2-resistant cells; rather, it was more likely because the FGF2 injection procedure did not provide sufficient access to all tumor cells. Thus, cell culture conditions are more appropriate for analyzing the frequency of spontaneous emergence of FGF2 resistance among Y1 cells.

Y1 colonies grown from single cells that had been treated with FGF2 for 24 hours produced Y1 clonal sublines that maintained the amplified K-ras gene and exhibited high basal levels of K-Ras-GTP (Fig. 4D; Supplementary Data, Fig. S6). These sublines were not FGF2-resistant and gave rise to rapidly growing tumors when inoculated into nude mice; this tumor growth was inhibited by FGF2 injections, as in the parental Y1 line (Supplementary Data, Fig. S6).

With sustained FGF2 treatment, it was possible to select rare, stable Y1 sublines lacking K-Ras overexpression (Fig. 4D). These lines require FGF2 for growth in both monolayer and suspension cultures and are poorly tumorigenic in nude mice. A complete characterization of these FGF2-resistant Y1 sublines will be described in a separate publication. These results show that FGF2 strongly selects against K-Ras overexpression in Y1 cells, instead favoring the emergence of sublines whose growth requires FGF2.

Likewise, the 3T3-B61 malignant line yielded FGF2-resistant sublines, which require FGF2 for growth, are nontumorigenic in BALB/c mice but have lost both the neomycin marker gene and the *H-ras V12* trans-oncogene (Supplementary Data, Fig. S7). The results therefore show that, surprisingly, it is very difficult for malignant cells from both Y1 and 3T3-B61 lines to overcome the negative selection exerted by FGF2 in culture.

Tumor cells deficient in RhoA activity are resistant to FGF2-induced senescence. FGF2 causes migration and morphologic changes in Y1 adrenal cells and BALB-3T3 fibroblasts, indicating that the cell adhesion-cytoskeleton system has been activated. This activation is coordinated by the Rho family of GTPases (reviewed in ref. 28). In serum-deprived Y1 or 3T3-B61 cells, the level of RhoA-GTP was below the detection limit (Fig. 5A), but exogenous FGF2 was sufficient to elevate the level of RhoA-GTP and maintain it at a high level (Fig. 5B). Thus, cell cycle arrest by serum deprivation correlated with RhoA deactivation, whereas cell cycle restimulation by FCS or FGF2 led to elevated levels of RhoA-GTP. However, blocking RhoA activation by constitutively expressing the dominant-negative mutant RhoAN19 (Fig. 5C and D) severely inhibited cell migration (data not shown) without reducing proliferation, demonstrating that RhoA activity is not essential for cell cycle completion or cell division in either the Y1 or 3T3-B61 cell lines.

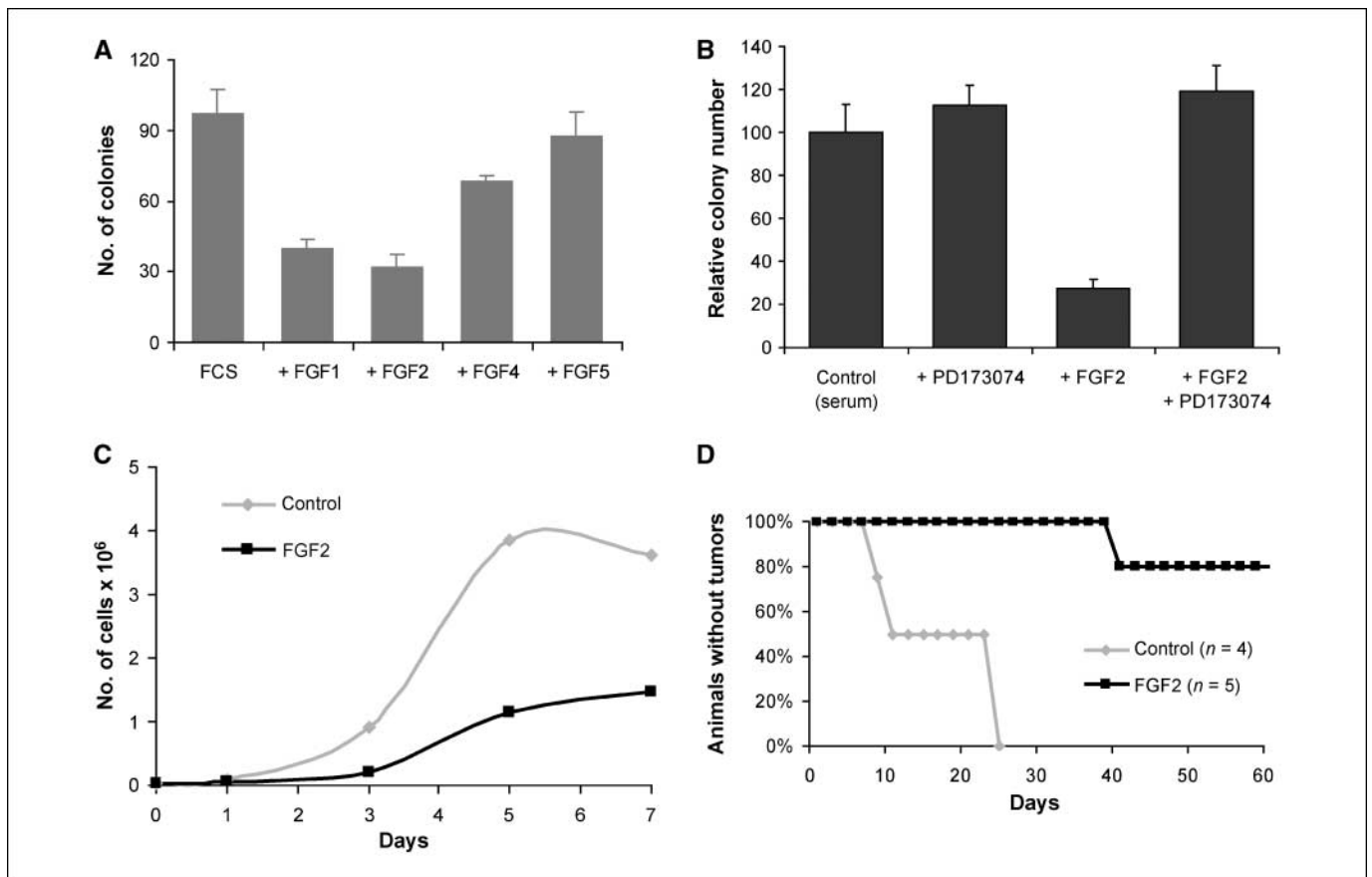


Figure 3. FGF2 inhibits both *in vitro* and *in vivo* proliferation of mouse 3T3-B61 fibroblasts transformed with H-RasV12. **A**, clonogenic assays in solid substrate cultures; the number of colonies in FCS + (FGF2—24 h) is significantly lower than in FCS, FCS + (FGF4—24 h), and FCS + (FGF5—24 h; $P < 0.0001$; χ^2 test) but not FCS + (FGF1—24 h). **B**, clonogenic assays. The FGFR kinase inhibitor PD173074 protects cells from FGF2 cytotoxicity ($P < 0.0001$, χ^2 test). **C**, growth curves ($P < 0.01$; Mann-Whitney test). **D**, onset of 3T3-B61 tumors in immunocompetent BALB/c mice injected with FGF2; controls did not receive FGF2 ($P < 0.01$, Mann-Whitney test).

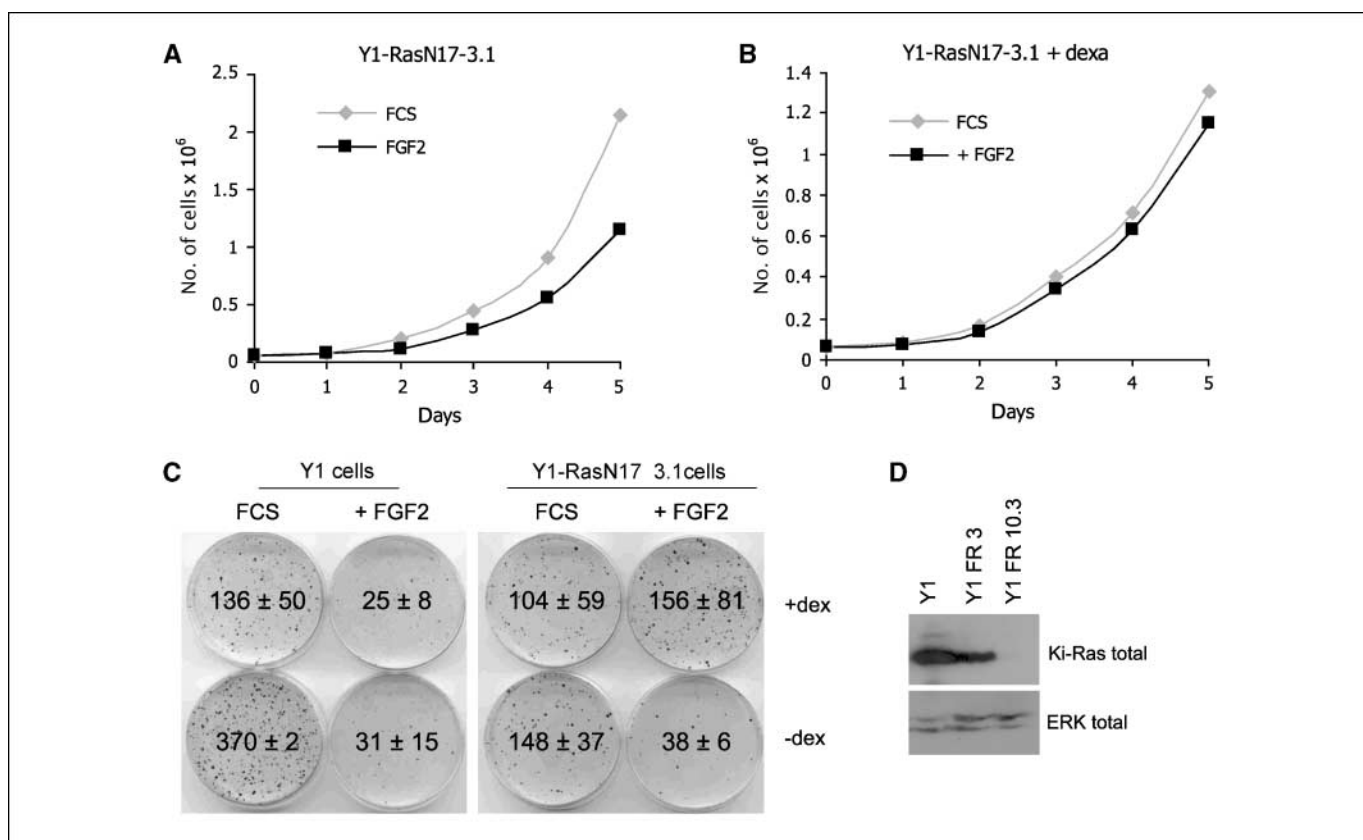


Figure 4. FGF2 inhibition of Y1 cell proliferation depends on constitutively high levels of K-Ras-GTP. *A*, growth curves show that FGF2 inhibited proliferation in the clonal subline Y1-RasN17-3.1 ($P < 0.05$, Mann-Whitney test). *B*, dexamethasone treatment protected Y1-RasN17-3.1 cells from FGF2 cytotoxicity. *C*, in clonogenic assays, FGF2 dramatically inhibited colony development of Y1 parental cells irrespective of dexamethasone treatment; on the other hand, dexamethasone protected cells from FGF2 cytotoxicity in the Y1-RasN17-3.1 subline ($P < 0.001$, χ^2 test). *D*, Western blot showing levels of K-Ras protein expression in the Y1 parental cells and sublines Y1-FR3 and Y1-FR10.3, which show transient and stable resistance, respectively, to FGF2 inhibition of proliferation; total ERK1/2 levels were used as an internal control for protein loading.

In addition, clonal sublines stably transfected with the gene for RhoAN19, typified by Y1-RhoAN19-2.1 (Fig. 5C) and B61-RhoAN19-C.1 (Fig. 5D), were resistant to FGF2-induced senescence, as shown by clonogenic assays, growth curves (Fig. 5C and D), and SA- β -Gal activity (data not shown). On the other hand, the clonal sublines Y1-RhoAV14-1.1 (Fig. 5C) and B61-RhoAV14-A.1 (Fig. 5D) maintained the phenotype of their respective parental cell lines: FGF2 inhibited their proliferation (Fig. 5C and D) and induced the expression of SA- β -Gal (data not shown). Furthermore, inhibition of RhoA activity with C3 exoenzyme protected Y1 and 3T3B61 cells from the noxious effect of FGF2 in clonogenic assays and abolished FGF2 induction of SA- β -Gal activity (Supplementary Data, Fig. S8). Thus, the results from the ectopic expression of the negative-mutant RhoAN19 and the inhibitory effects of the C3 exoenzyme suggest that RhoA mediates the senescence-like process triggered by FGF2 in Y1 and 3T3-B61 cells.

Discussion

In this study, we show that FGF2 stimulates the growth and proliferation of immortalized mouse cell lines, but it triggers senescence in Ras-dependent malignant cells that are resistant to programmed cell death. This FGF2 stress response is observed at physiologic FGF2 concentrations ($ED_{50} \sim 60$ pmol/L), it depends on FGFR kinase activity (Fig. 3B; Supplementary Data, Fig. S1B),

and it occurs through the activity of RhoA-GTP (Fig. 5). This stress response does not involve the MEK/ERK or phosphoinositide-3-kinase/Akt mitogenic pathways because inhibitors of these pathways (PD98059 and LY294002, respectively) failed to protect cells from FGF2 toxicity in clonogenic assays (data not shown).

Intriguingly, FGF2 causes severe toxicity, specifically in malignant cells, in sharp contrast with serum, which promotes the robust growth of malignant cells. Selection with FGF2 caused the appearance of rare revertants that could be amplified into sublines characterized by (a) a lack of Ras overexpression, (b) low tumorigenicity, and (c) a requirement of FGF2 for growth. Surprisingly, in spite of the known genetic instability of malignant cells, FGF2-resistant sublines exhibiting high tumorigenicity and Ras overexpression rarely arose spontaneously in Y1 and 3T3-B61 stock cultures.¹ These results highlight the robustness with which extracellular FGF2 blocks the proliferation of Ras-driven malignant cells.

Y1 adrenocortical cells and 3T3-B61 fibroblasts suffer different types of cell cycle deregulation. In Y1 cells, the cell cycle is partially deregulated by two independent oncogenic lesions. First, constitutively high levels of K-Ras-GTP lead to the elevated activity of the

¹ T.G.F. Matos and H. Armelin, manuscript in preparation.

phosphoinositide-3-kinase/Akt pathway (26, 29, 30); second, cyclins D1 and E are simultaneously induced instead of being induced sequentially (Supplementary Data, Fig. S5), meaning that progression through G_1 lies under the exclusive control of the signaling pathway: ERK1/2 \rightarrow cyclin E/CDK2 \rightarrow pRB-phosphorylation \rightarrow

initiation of DNA synthesis. Thus, both serum and FGF2 stimulated the ERK \rightarrow E/CDK2 \rightarrow pRB pathway, leading to the induction of *fos* and *jun* expression (25) and promoting progression through G_1 , irrespective of the levels of K-Ras-GTP (Supplementary Data, Figs. S1A, S1B, and S5). At the same time, FGF2 activated a novel

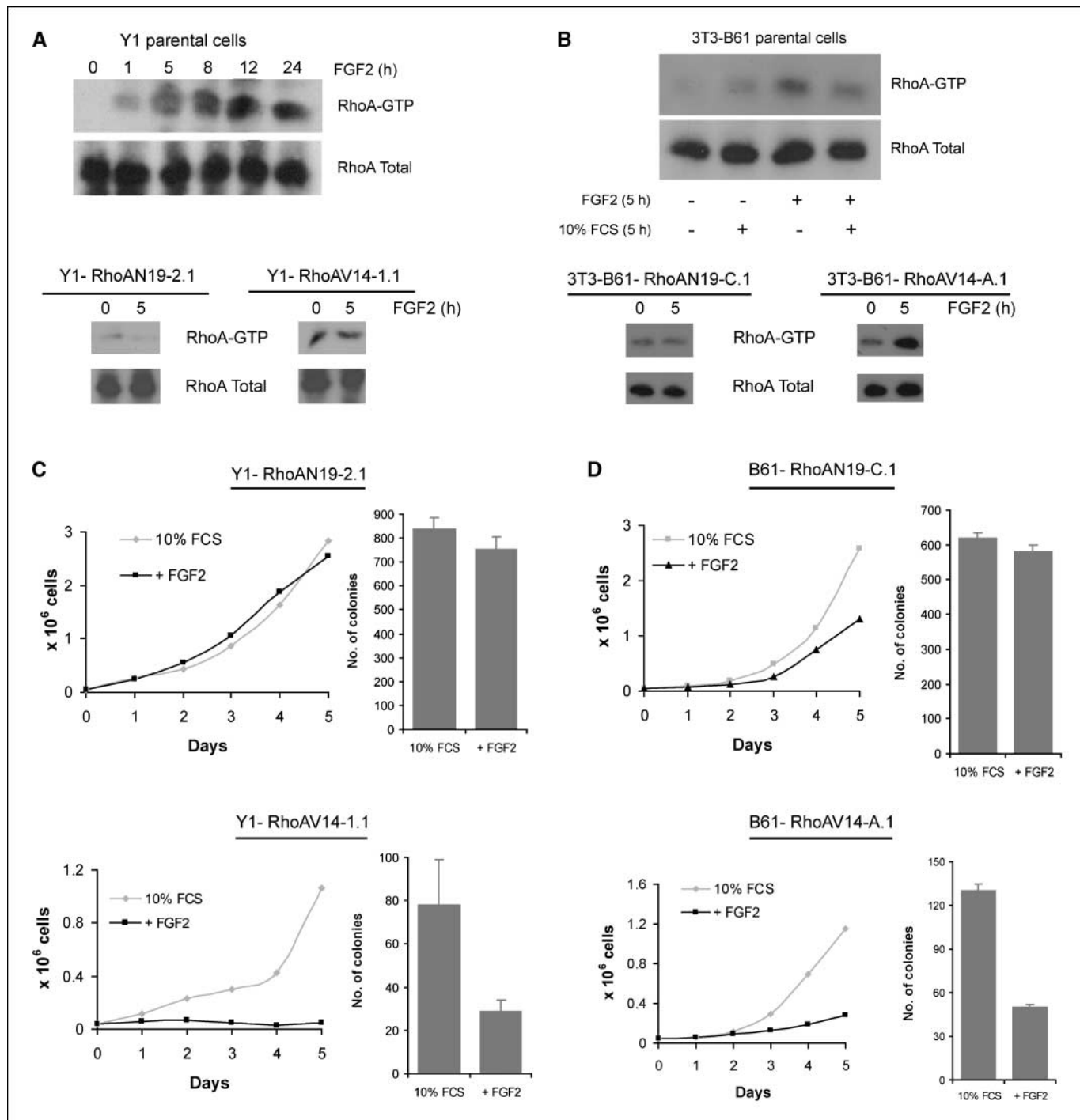


Figure 5. Inhibition of RhoA activation with the dominant-negative RhoA-N19 mutant renders both Y1 and 3T3-B61 cells resistant to FGF2 cytotoxicity. *A*, FGF2 activated RhoA in G_0 - G_1 -arrested Y1 parental cells but not in the Y1-RhoAN19-2.1 subline; Y1-RhoAV14-1.1 cells had constitutively activated RhoA. *B*, likewise, FGF2 activated RhoA in 3T3-B61 parental cells but not in the B61-RhoAN19-C.1 subline; B61-RhoAV14-A.1 cells exhibited constitutively activated RhoA. *C*, Y1-RhoAN19-2.1 cells were resistant to FGF2 cytotoxicity, as shown by growth curves and clonogenic assays; on the other hand, Y1-RhoAV14-1.1 cells were sensitive to FGF2 cytotoxicity, as shown by growth curves ($P < 0.05$, Mann-Whitney test) and clonogenic assays ($P < 0.01$; χ^2 test). *D*, B61-RhoAN19-C.1 cells were resistant, whereas B61-RhoAV14-A.1 cells were sensitive to FGF2 cytotoxicity.

signaling route (FGFR → RhoA-GTP) to trigger a stress response dependent on constitutively high levels of K-Ras-GTP (Fig. 4C) but independent of the ERK pathway. Therefore, the cell cycle arrest caused by the FGF stress response in Y1 cells is unlikely to involve p16/pRb. However, FGF2 induced the expression of p21 in Y1 cells (data not shown), but further study is needed to determine whether the p53/p21 pathway plays a relevant role in the cell cycle arrest.

It has been known for years that ectopic expression of the *H-RasV12* oncogene in mouse 3T3 fibroblasts leads to silencing of *c-fos* and *fosB* genes and constitutive expression of cyclin D1, leading to cell cycle deregulation (31). In fact, when serum-starved 3T3-B61 fibroblasts transformed with RasV12 were stimulated to grow with FGF2 in the presence or absence of serum, none of the canonical mitogenic pathways were activated. Indeed, ERK1/2 were poorly phosphorylated, essential immediate-early genes such as *c-fos* and *fosB* were not induced, and cyclin D1 remained constitutively expressed (data not shown). Despite this severe deregulation of G₁ phase progression, the cell cycle in 3T3-B61 cells could be arrested irreversibly by FGF2 in a RhoA-dependent manner (Fig. 5B and D). Thus, as mentioned above for Y1 cells, it is unlikely that the p16/pRb pathway plays a role in FGF2-induced cell cycle arrest in 3T3-B61 cells. In contrast, FGF2 induced p21 expression in 3T3-B61 cells (data not shown), implying that the p53/p21 pathway may be involved in the FGF2 stress response. However, BALB-3T3 sublines classically transformed with SV40 were also susceptible to the noxious effect of FGF2 in clonogenic assays (data not shown), despite the inactivation of the p53/p21 pathway by SV40 T-antigen in these transformed cells. Thus, a functional p53/p21 pathway may be unnecessary for triggering the FGF2 stress response in malignantly transformed 3T3 cells.

A recent study in human ovarian carcinoma cell lines clearly showed that p53 and caspase 2 are required for apoptosis induced by the DNA-damaging drug cisplatin (32). In the absence of functional p53, cisplatin leads ovarian carcinoma cells into mitotic catastrophe followed by necrosis-like lysis (32). In fact, several stressful stimuli—including DNA damage, certain active oncogenes such as *ras* and *myc*, and telomere shortening—trigger senescence in normal cells by a process involving the p16/pRb and p53 pathways, which irreversibly block the cell cycle at the G₁ phase (reviewed in ref. 33). Malignant transformation requires overcoming these barriers that protect cells and organisms from unchecked malignant proliferation. We propose that the RhoA-dependent, FGF2-induced senescence reported in this article is an example of exogenously induced defenses that restrain tumor growth by a mechanism independent of the p16/pRb and p53 pathways. To our knowledge, this is the first report of a senescence-like state in malignant cells induced by mechanisms involving RhoA pathways. Our findings indicate that FGF2, both a paracrine and autocrine

tissue homeostatic factor, can initiate senescence in cells that have already passed through most or all of the intracellular barriers to malignant transformation. This novel proposal contradicts the long-standing suspicion that FGF2 is an oncogenic factor.

Numerous publications over the last 15 to 20 years have dealt with the role of FGF signaling in cancer development. The importance of understanding FGF signaling for advancing cancer biology and cancer therapy seems indisputable. However, the literature contains numerous and apparently contradictory results describing a diversity of epiphenomena, which makes it difficult to develop a coherent picture of FGF signaling in cancer. Indeed, the paracrine and autocrine roles of FGF2 in cancer development and maintenance remain ambiguous. Reports of high levels of FGF2 in several types of cancer (9–11) do not prove that FGF2 promotes tumor growth. It is also possible that during oncogenesis, FGF2 paracrine and autocrine circuits function as antitumor defenses that are eventually surpassed as the cancer progresses. In this way, the high levels of FGF2 in aggressive advanced tumors may simply be vestiges of the overproduction of antitumor factors. It is understandable that the data from FGF signaling is so complex, given that tumor growth involves somatic evolution within a genetically unstable and highly diverse cell population made up of both malignant and stromal cells. The hypothesis that FGF2 has an antitumor function may help to simplify this complex situation. Further elucidation of the mechanisms underlying the FGF2 stress response described here may provide insight into how malignant cells resist programmed cell death and suggest practical methods to reduce this resistance.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Received 1/28/2008; revised 4/30/2008; accepted 5/16/2008.

Grant support: Grants and fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil (FAPESP) and Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil (CNPq), F.L. Forti, F. Nakano, and K.M. Rocha were postdoctoral fellows of FAPESP; E.T. Costa, P.F. Asprino, and T.F.G. Matos were predoctoral fellows of FAPESP; J. Salotti was a predoctoral fellow of CNPq; and C.K. Yoshihara and M.M. Koga were undergraduate fellows of FAPESP.

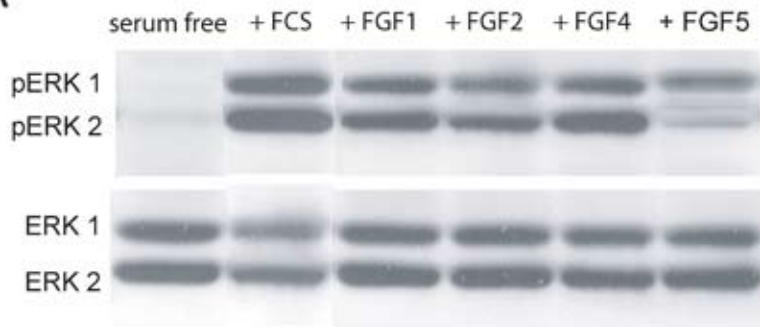
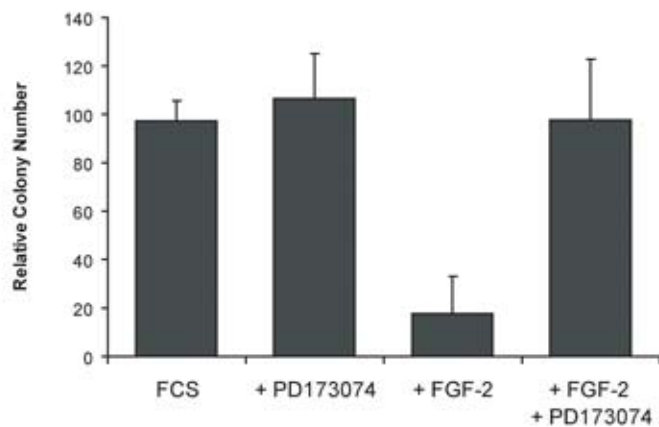
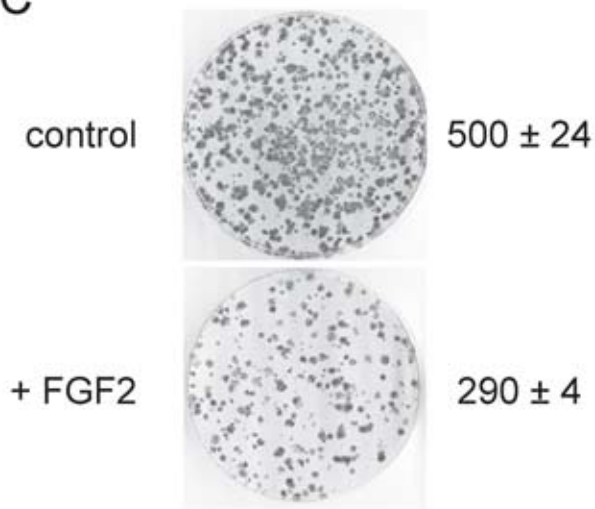
The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

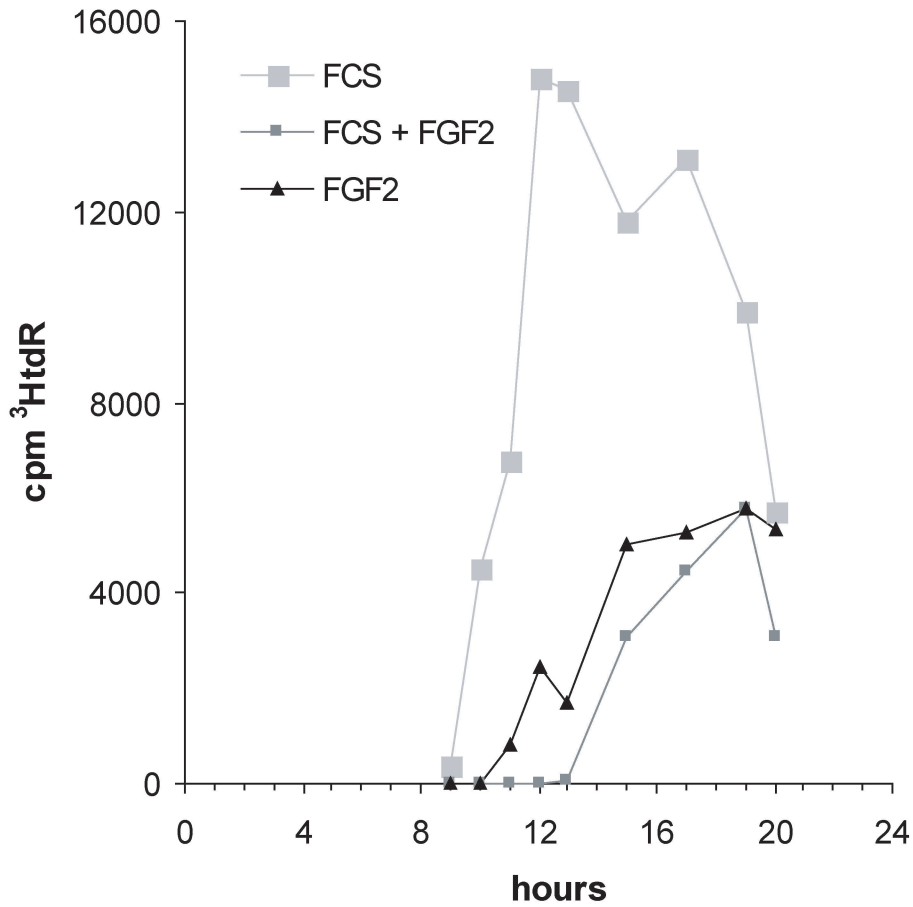
We thank Dr. Claudimara F.P. Lotfi (Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, Brasil) for many discussions and generous sharing of unpublished results; Dr. Alicia J. Kowaltowski (Instituto de Química, USP, São Paulo, Brasil) for discussions and assistance in determining whole-cell ATP content; and Dr. Nigel Carter (The Salk Institute, La Jolla, CA), Dr. Martin A. Schwartz (The Scripps Institute, La Jolla, CA), and Dr. Garry Nolan (Stanford University, Palo Alto, CA) for RhoA mutant clones, the RBD (Rhotekin)-GST fusion clone, and Φ NX-Ampho (Phoenix) cells, respectively.

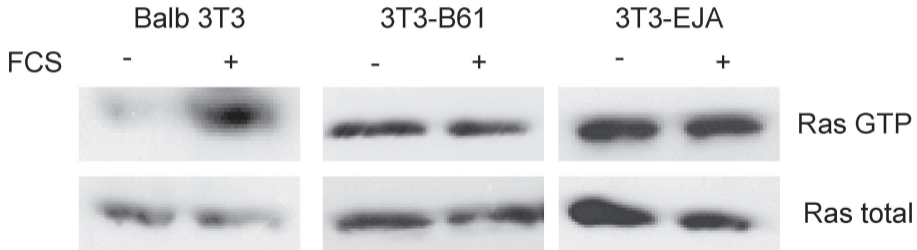
References

- Böttcher RT, Niehrs C. FGF signalling during early vertebrate development. *Endocr Rev* 2005;26:63–77.
- Sørensen V, Nilsen T, Wiedüocha A. Functional diversity of FGF-2 isoforms by intracellular sorting. *Bioessays* 2006;28:504–14.
- Itoh N, Ornitz DM. Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev Dyn* 2008;237:18–27.
- Sasada R, Kurokawa T, Iwane M, Igarashi K. Transformation of mouse BALB/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA. *Mol Cell Biol* 1988;8:588–94.
- Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:179–86.
- Bremnes RM, Camps C, Sirera R. Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung Cancer* 2006;51:143–58.
- Gan Y, Wientjes MG, Au JL. Expression of basic fibroblast growth factor correlates with resistance to paclitaxel in human patient tumors. *Pharm Res* 2006;23:1324–31.
- Pardo OE, Wellbrock C, Khanzada UK, et al. FGF-2 protects small cell lung cancer cells from apoptosis through a complex involving PKC ϵ , B-Raf and S6K2. *EMBO J* 2006;25:3078–88.
- Wang JK, Goldfarb M. Amino acid residues which distinguish the mitogenic potentials of two FGF receptors. *Oncogene* 1997;14:1767–78.
- Wang Q, Maloof P, Wang H, et al. Basic fibroblast growth factor downregulates Bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 1998;238:177–87.
- Burchill SA, Westwood G. Mechanism of basic fibroblast growth factor-induced cell death. *Apoptosis* 2002;7:5–12.
- Coleman AB, Metz MZ, Donohue CA, Schwarz RE,

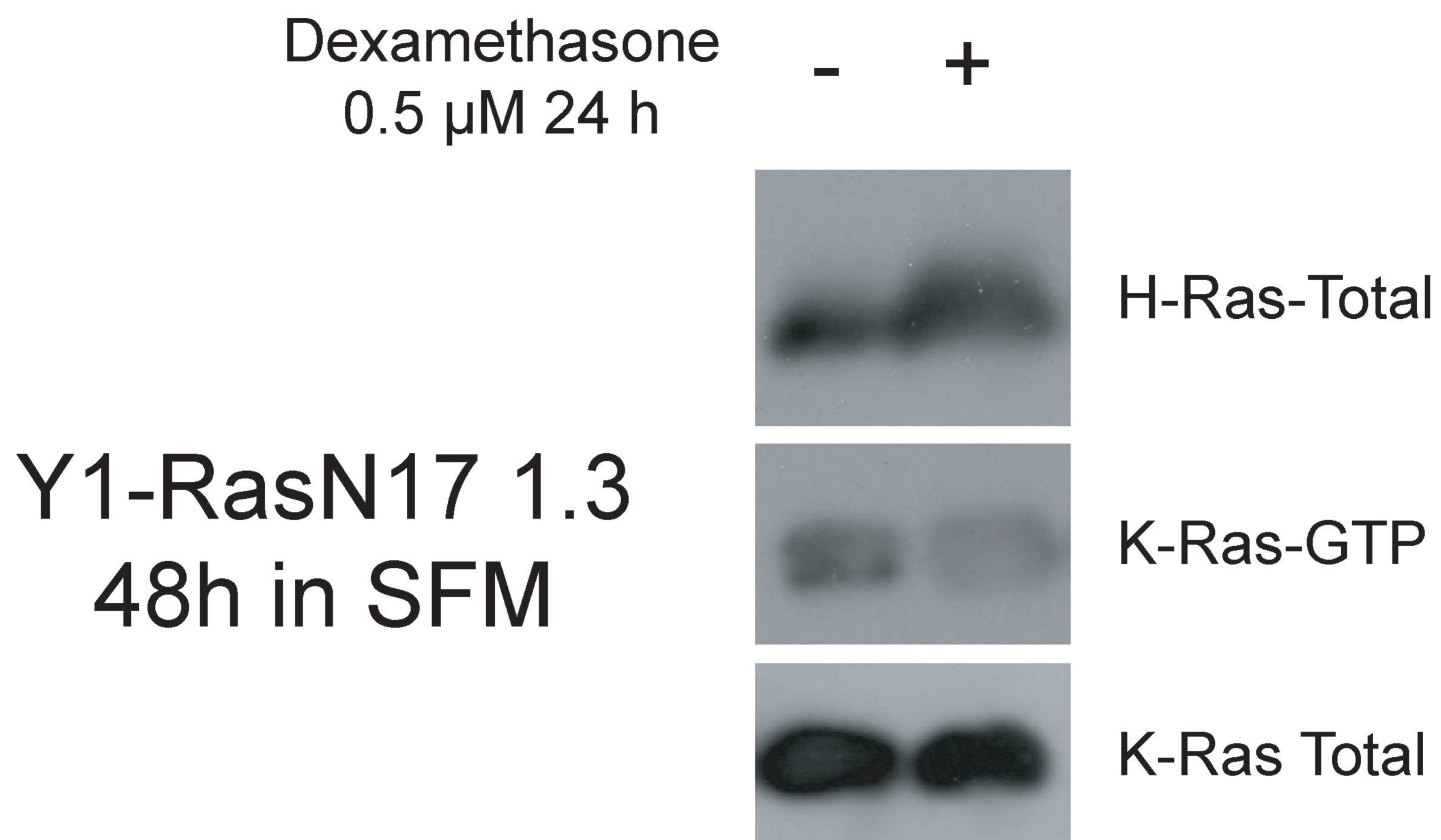
- Kane SE. Chemosensitization by fibroblast growth factor-2 is not dependent upon proliferation, S-phase accumulation, or p53 status. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1111-23.
13. Costa ET, Forti FL, Rocha KM, Moraes MS, Armelin HA. Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. *Endocr Res* 2004;30:503-9.
14. Yasumura Y, Buonassisi V, Sato G. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res* 1966;26: 529-35.
15. 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: 497-501.
16. Kovary K, Armelin MC, Armelin HA. Ha-Ras-1 oncogene dosage differentially affects Balb/3T3 cells growth factor requirement and tumorigenicity. *Oncogene Res* 1989;4:55-64.
17. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987;56: 779-827.
18. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-9. Erratum in: *Cancer Res* 1990;50:1352.
19. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999;400:464-8.
20. 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: 381-92.
21. 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;12:3008-19.
22. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432:307-15.
23. George DL, Francke U. Homogeneously staining chromosome regions and double minutes in a mouse adrenocortical tumor cell line. *Cytogenet Cell Genet* 1980;28: 217-26.
24. Reid T, Furuyashiki T, Ishizaki T, et al. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* 1996;271:13556-60.
25. Lotfi CF, Armelin HA. cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Endocrinol* 2001;168:381-9.
26. Forti FL, Schwindt TT, Moraes MS, Eichler CB, Armelin HA. ACTH promotion of p27(Kip1) induction in mouse Y1 adrenocortical tumor cells is dependent on both PKA activation and Akt/PKB inactivation. *Biochemistry* 2002;41:10133-40.
27. Feig LA, Cooper GM. Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* 1988;8:3235-43.
28. Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005;21:247-69.
29. Forti FL, Costa ET, Rocha KM, Moraes MS, Armelin HA. c-K-ras oncogene and FGF2 signaling pathways in the mouse Y1 adrenocortical cell line. *An Acad Bras Cienc* 2006;78:231-9.
30. Forti FL, Armelin HA. Vasopressin triggers senescence in K-ras transformed cells via RhoA-dependent downregulation of cyclin D1. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:1117-25.
31. Mechta F, Lallemand D, Pfarr CM, Yaniv M. Transformation by ras modifies AP1 composition and activity. *Oncogene* 1997;14:837-47.
32. Vakifahmetoglu H, Olson M, Tamm C, Heldari N, Orrenius S, Zhivotovisky B. DNA damage induces distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ* 2008;15:555-66.
33. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:729-40.

A**B****C**

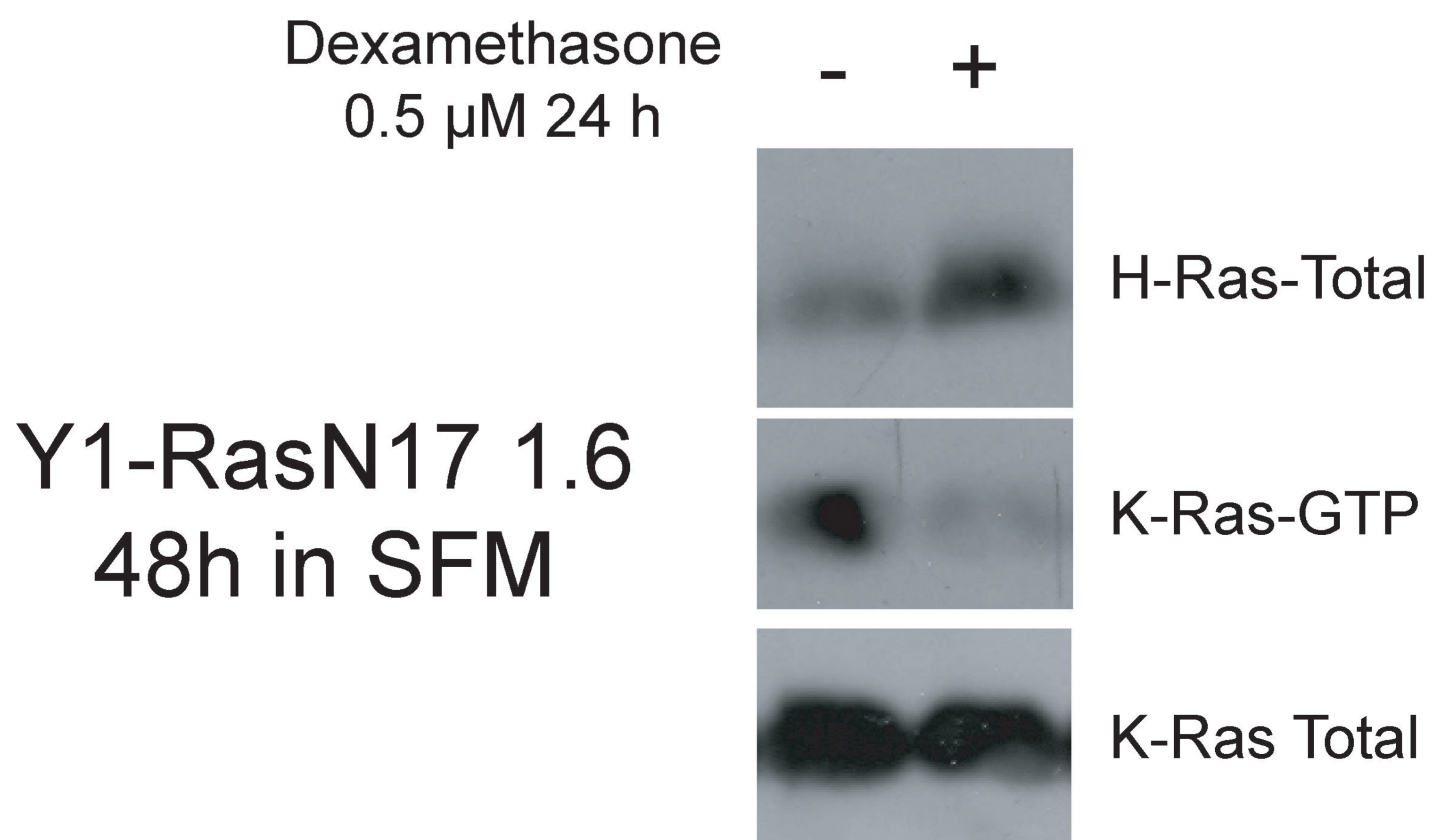


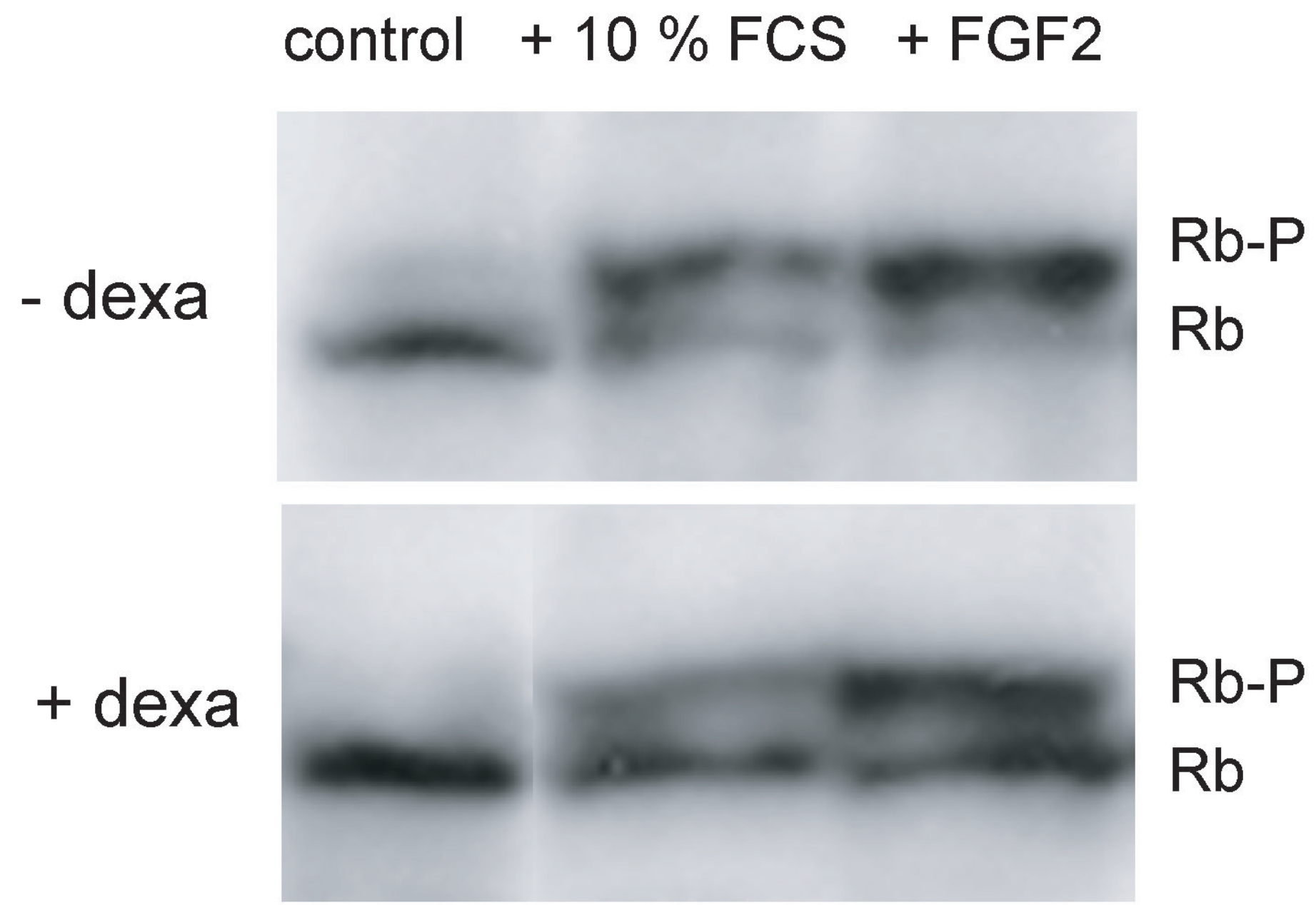
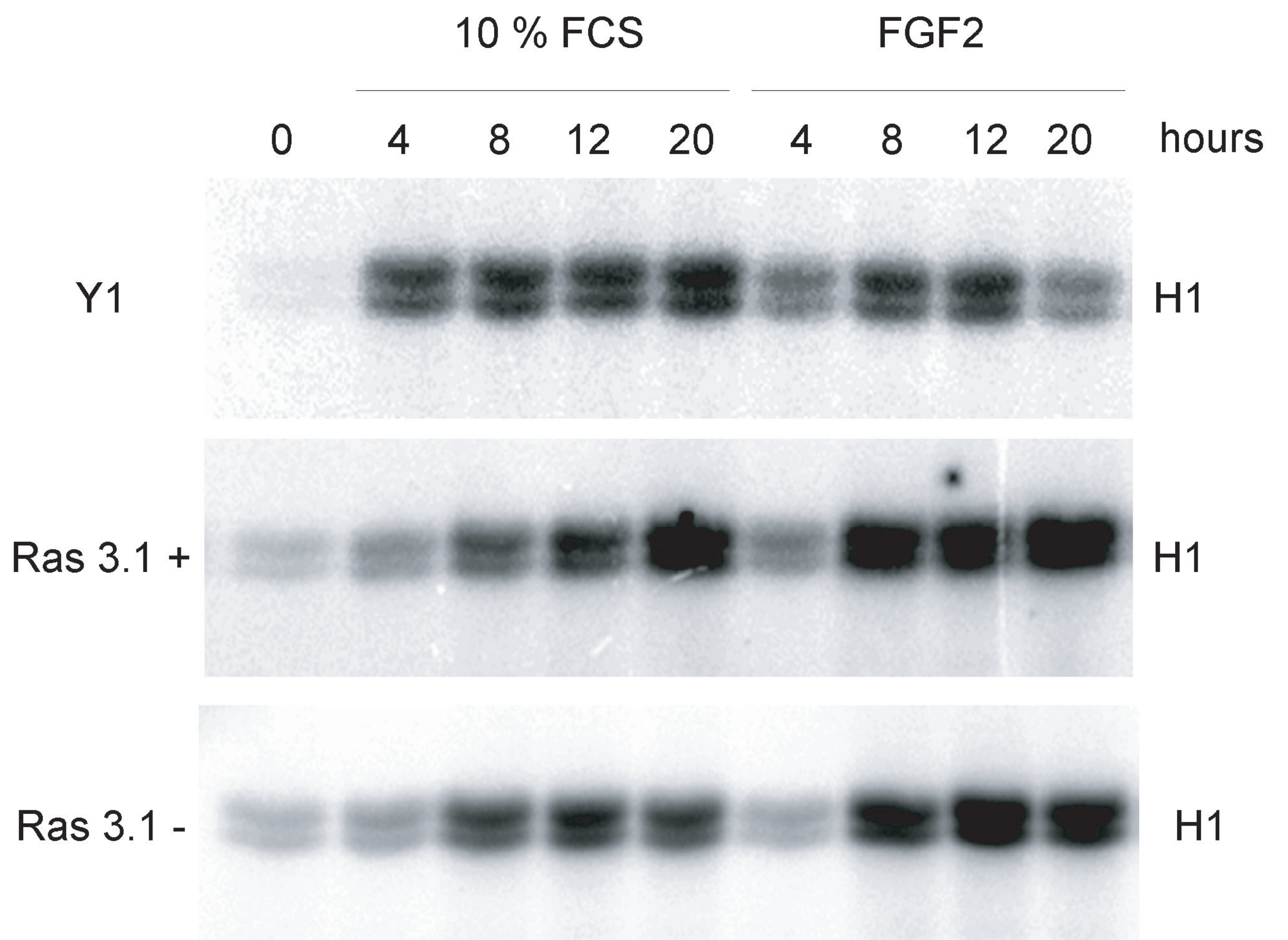
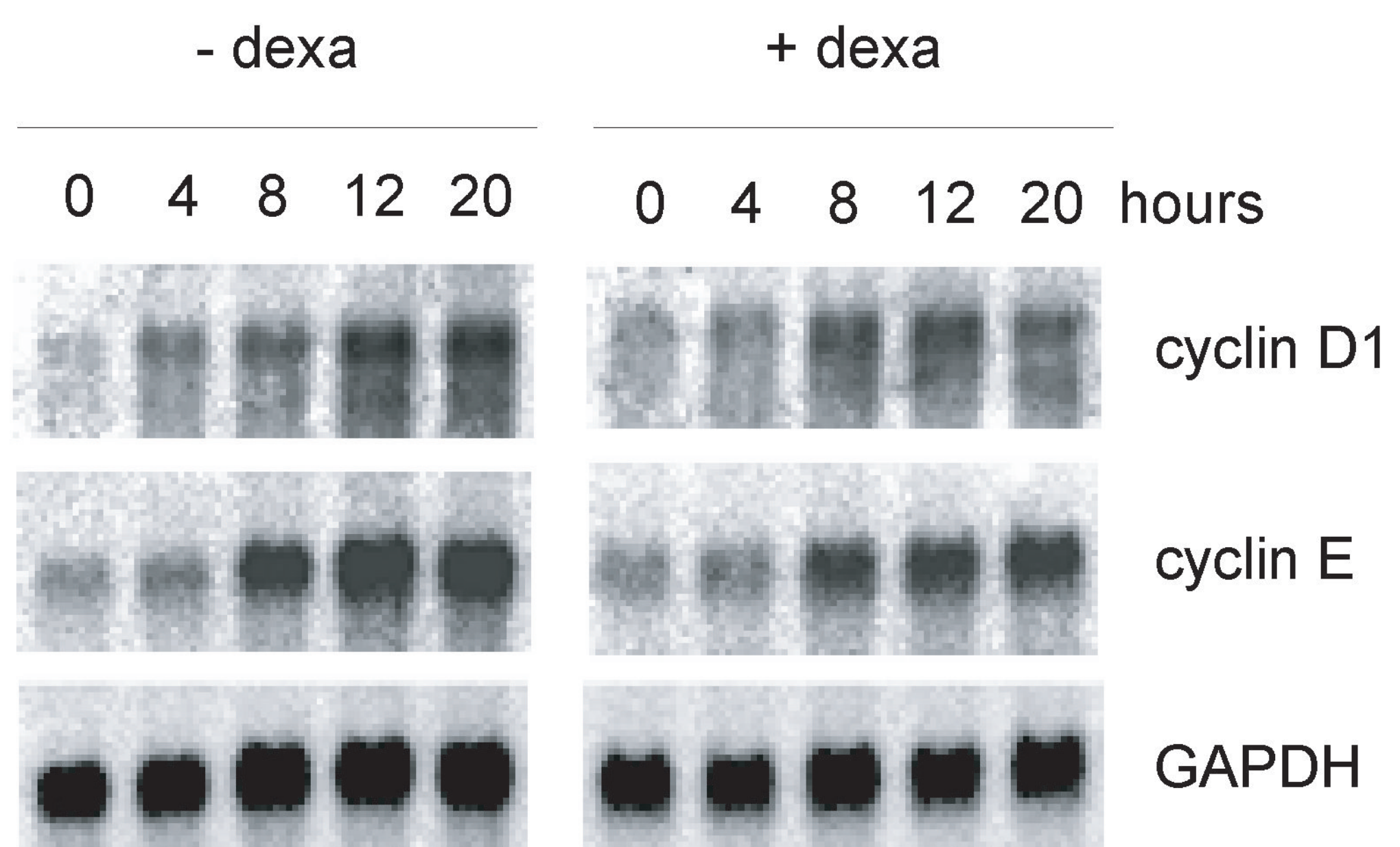


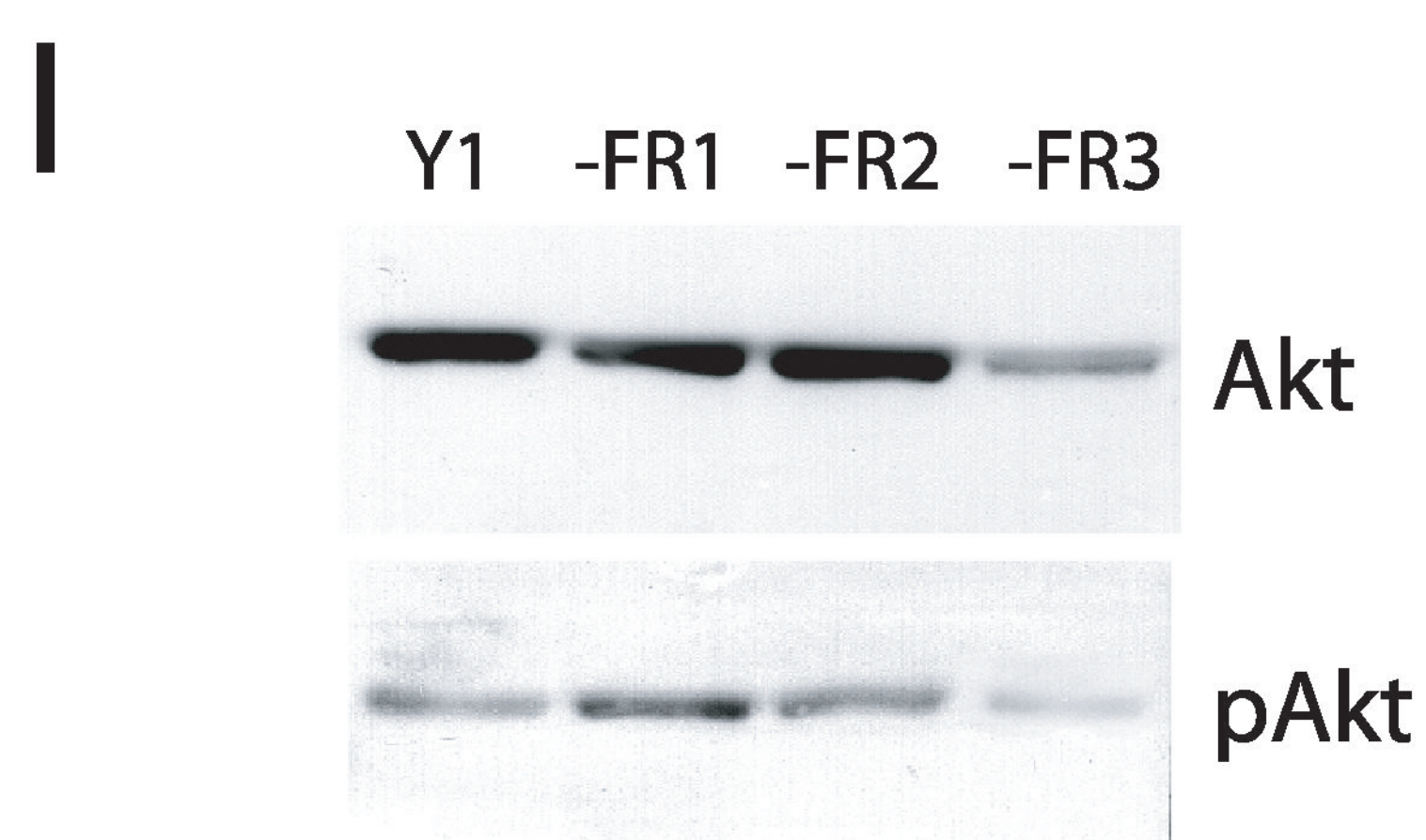
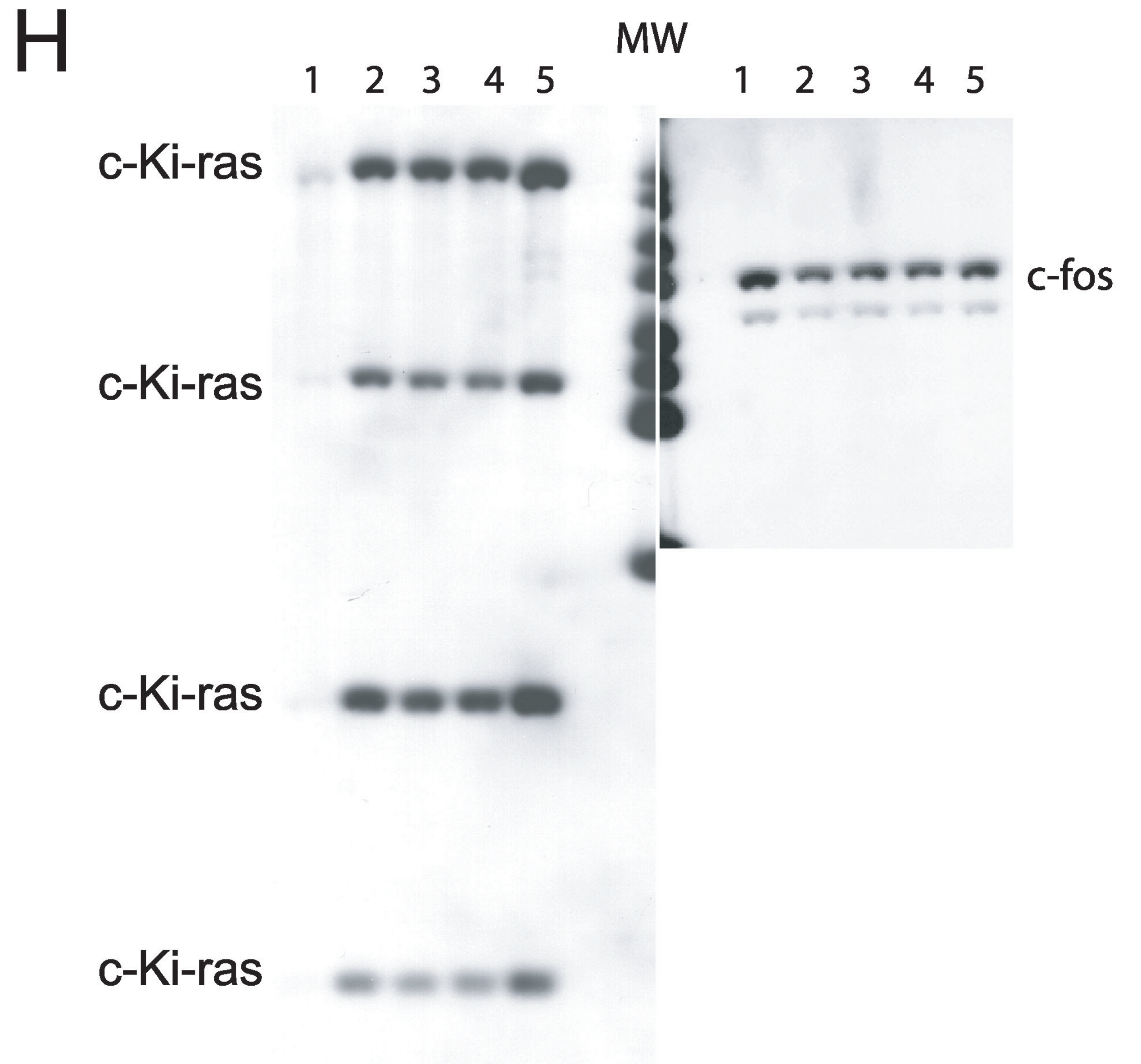
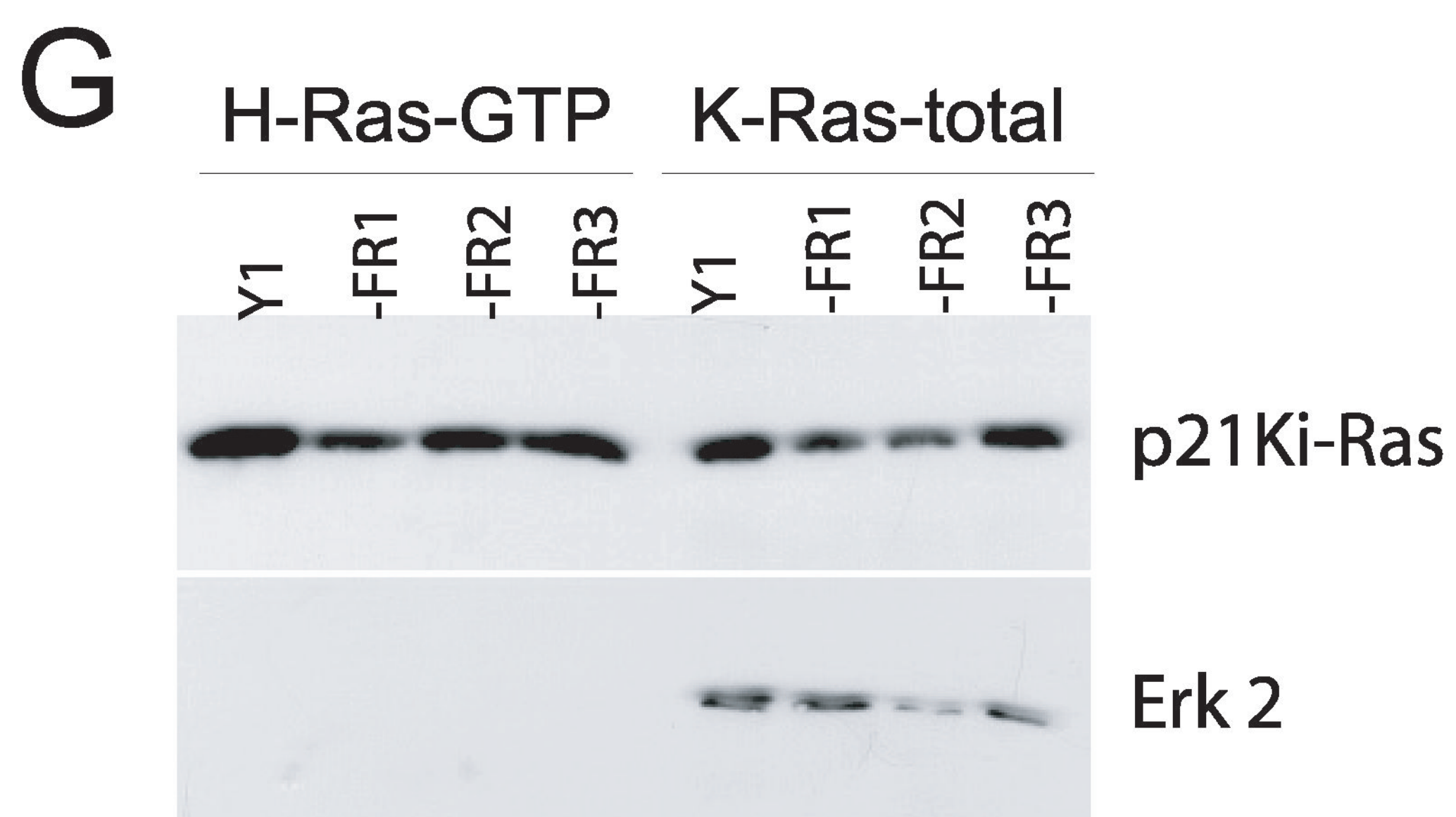
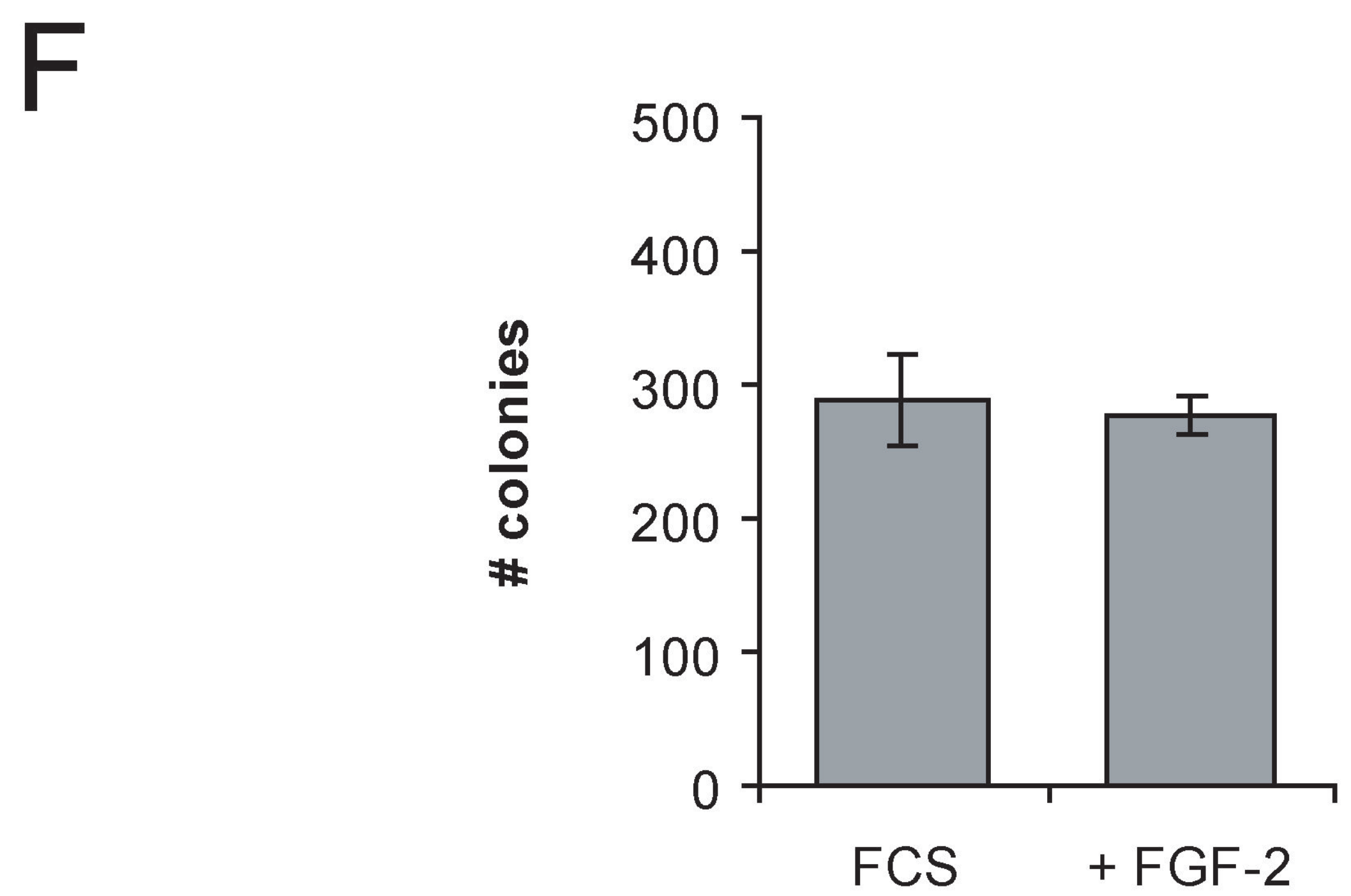
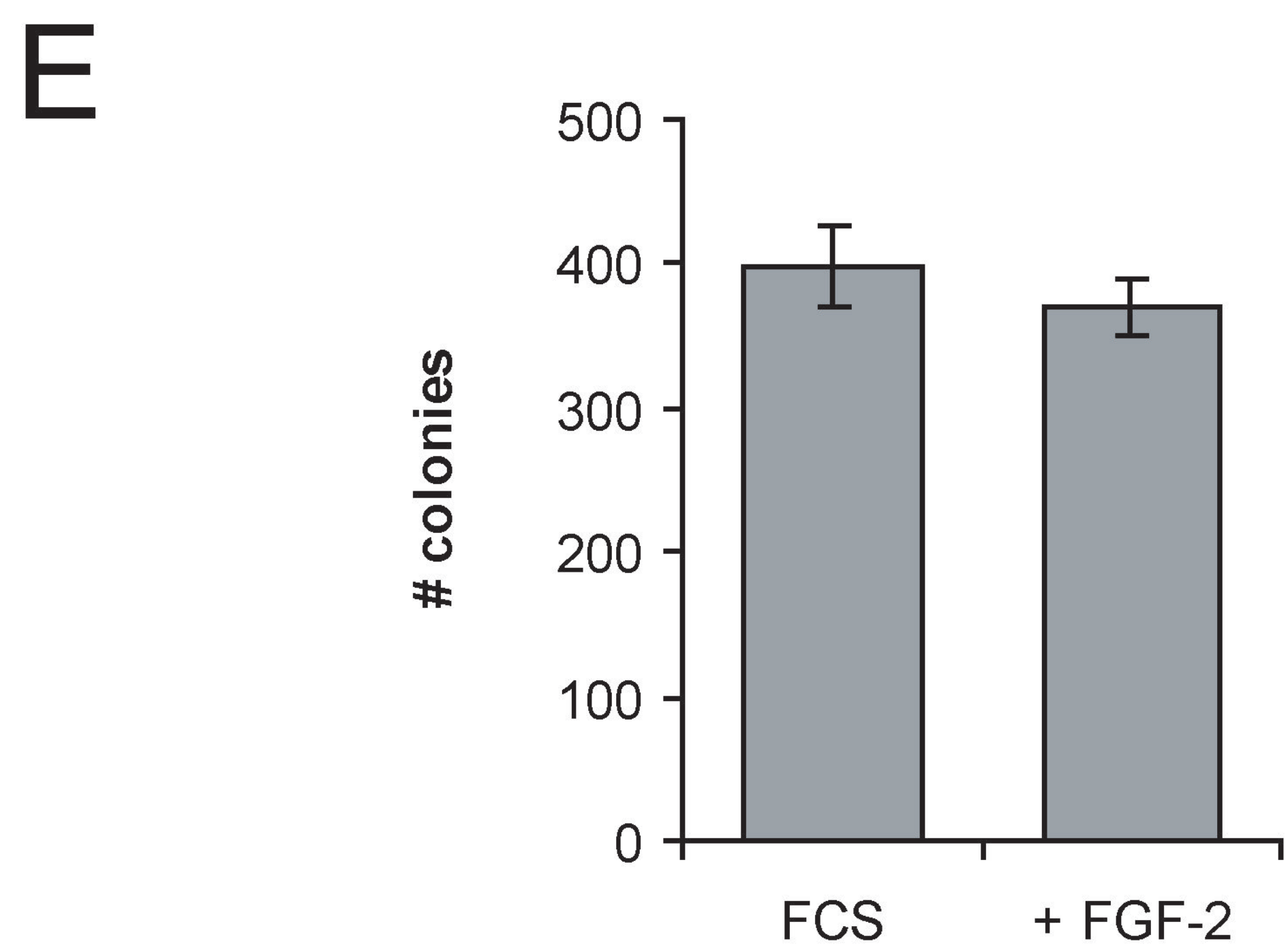
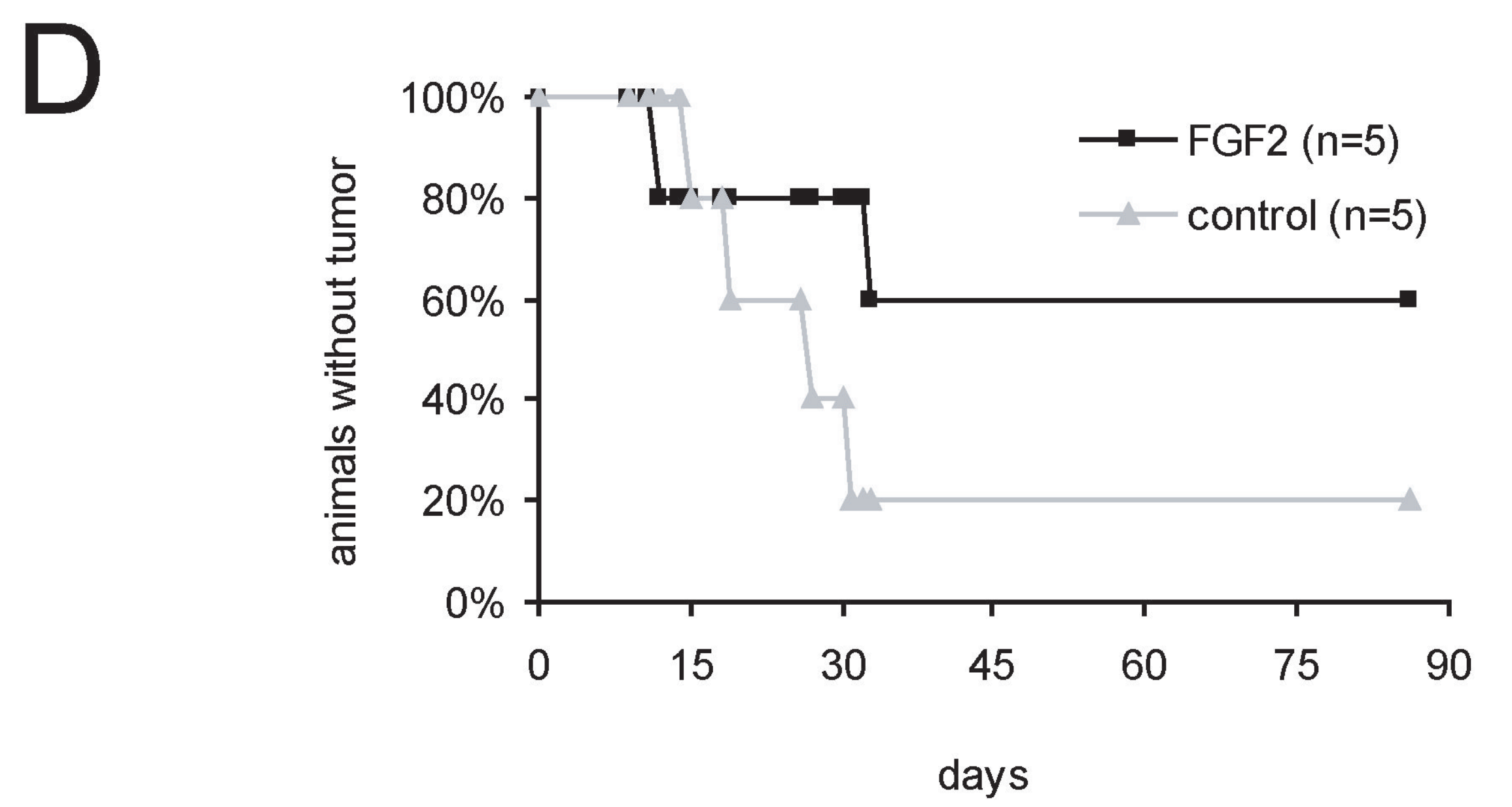
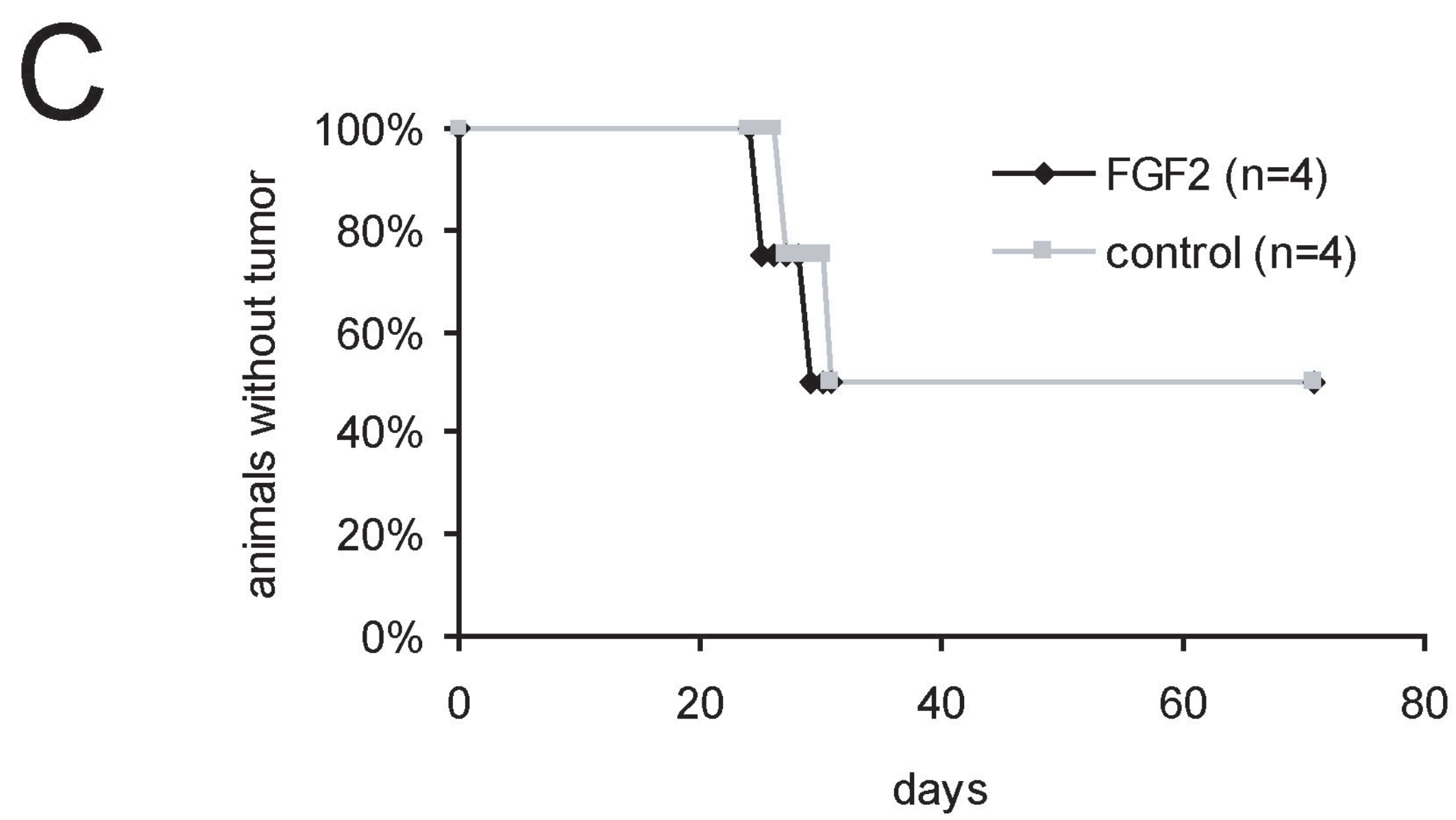
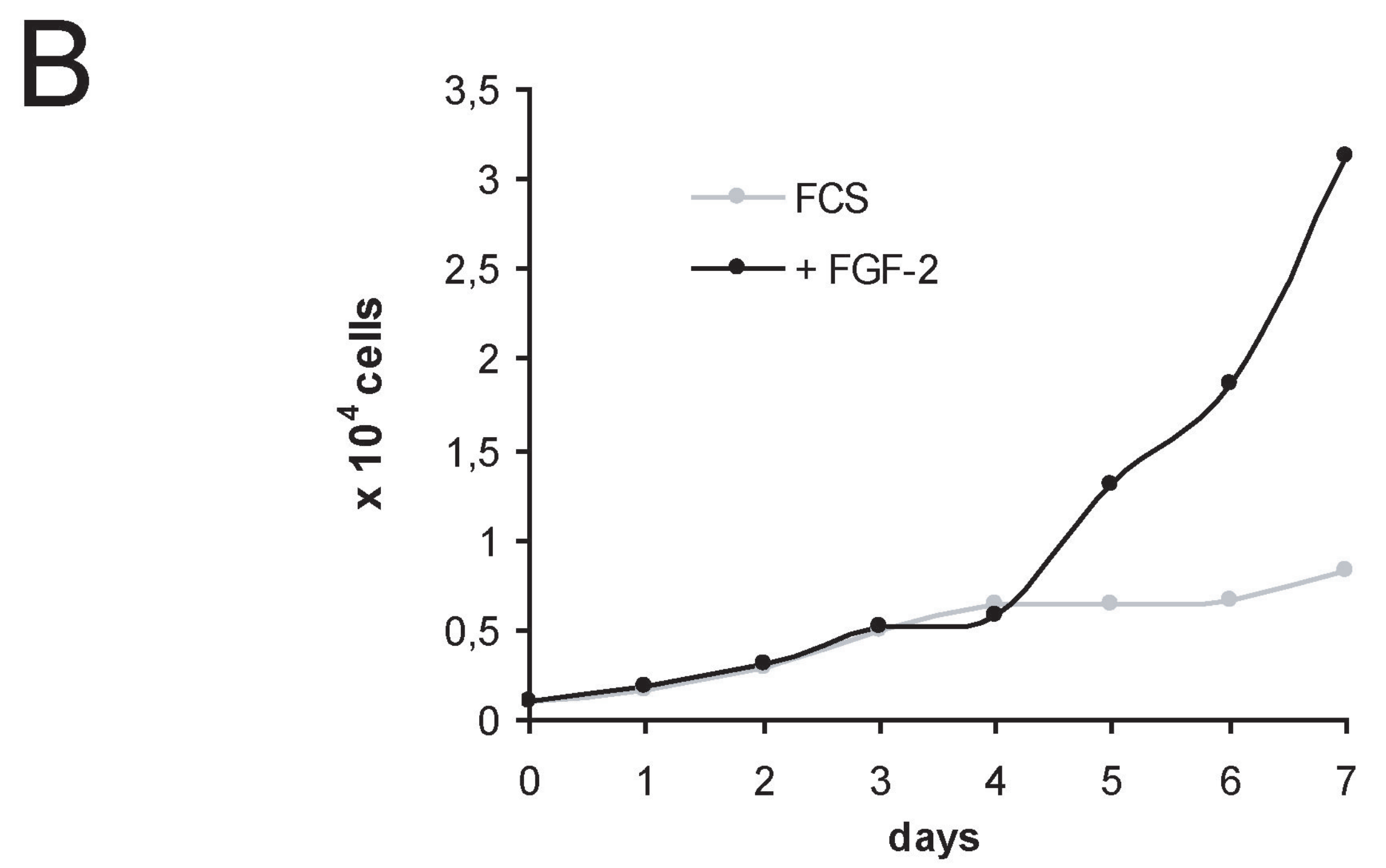
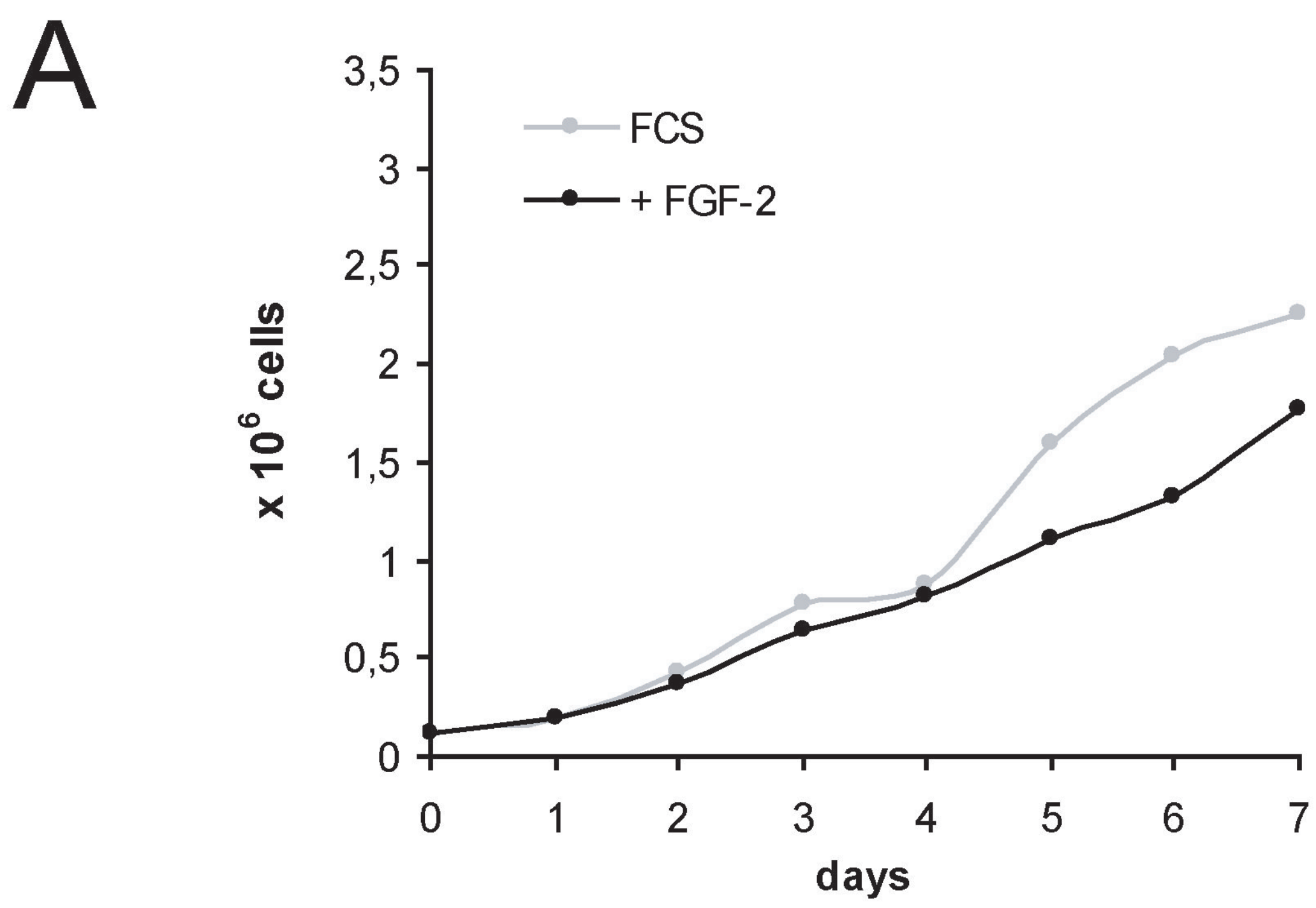
A

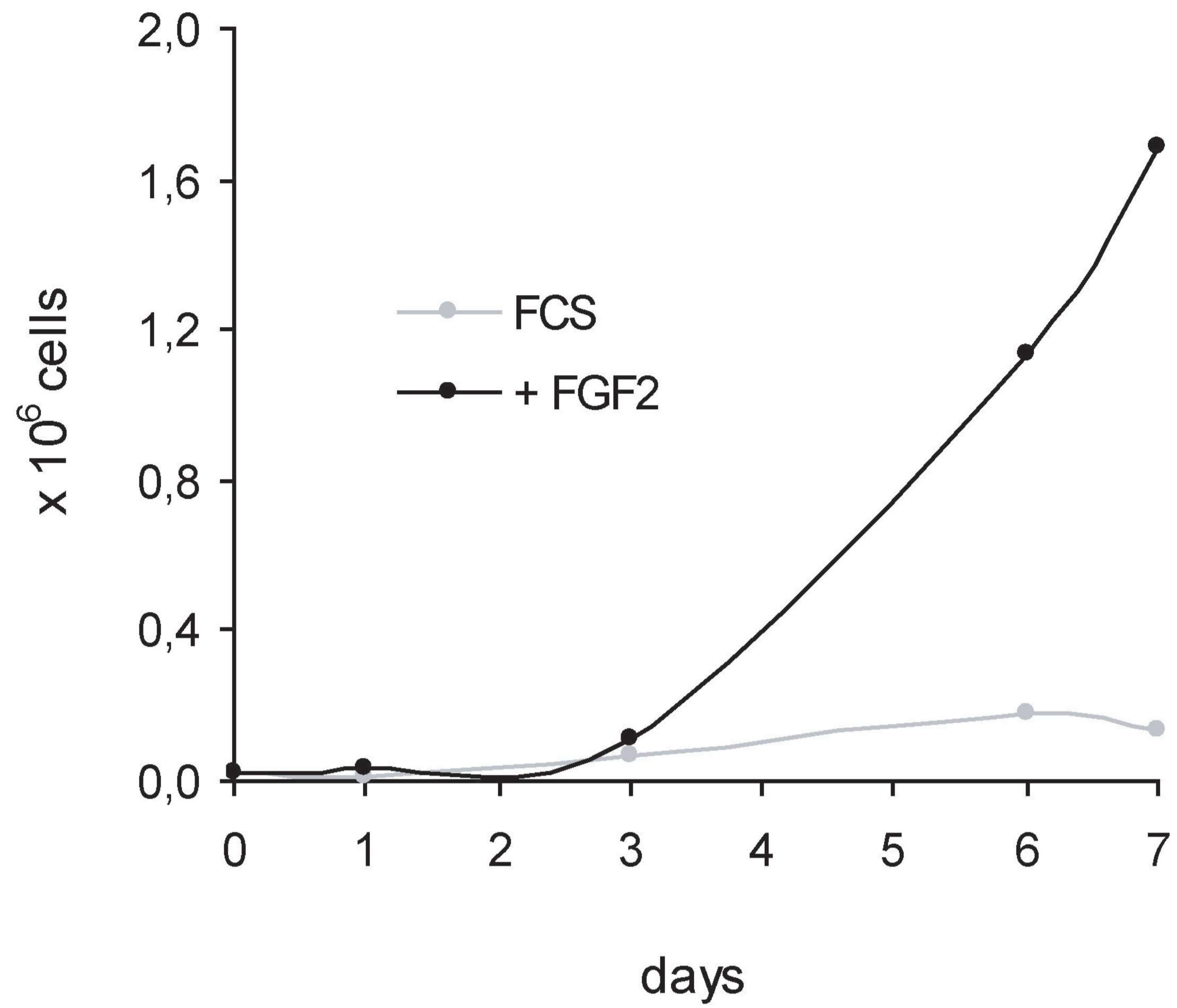
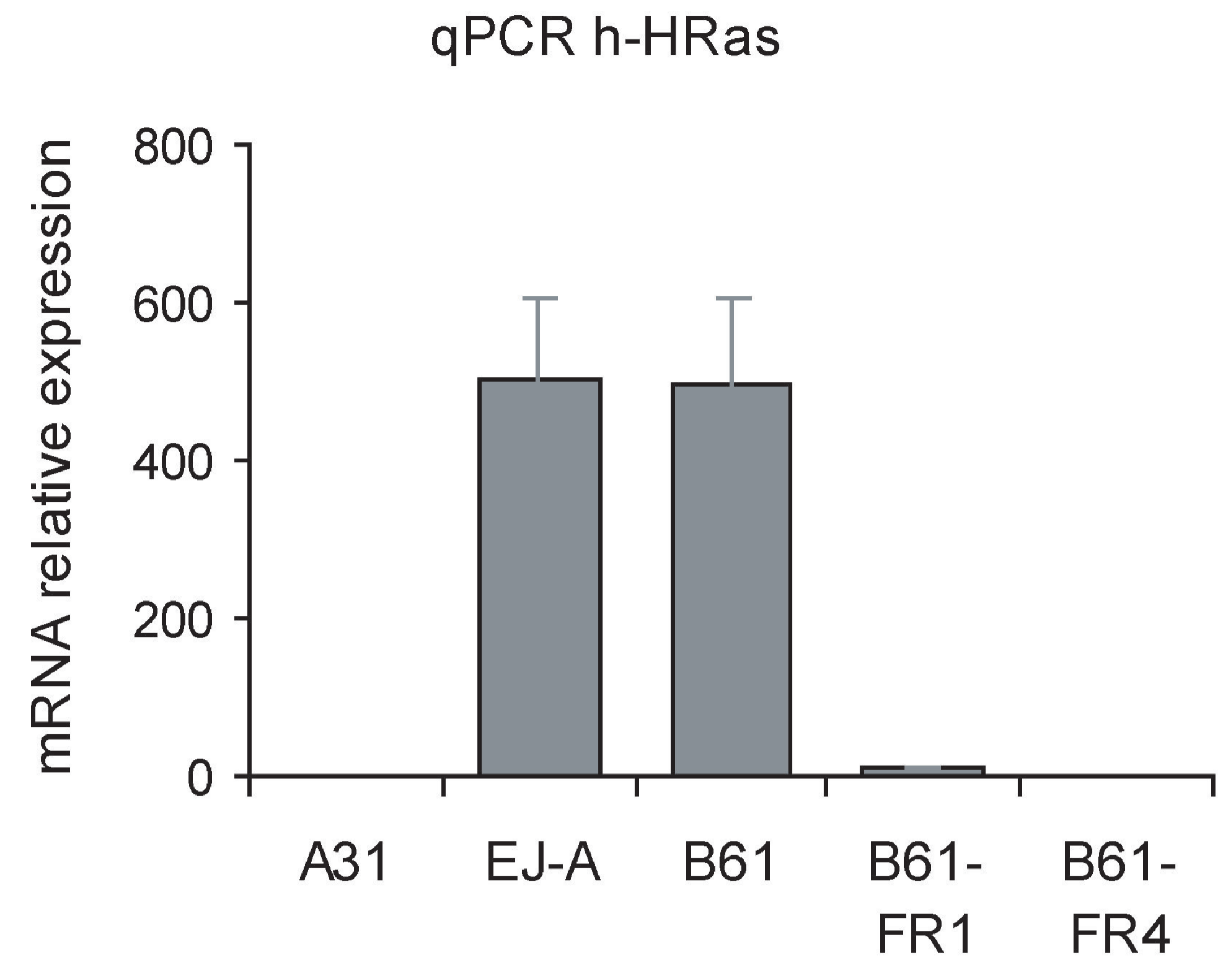
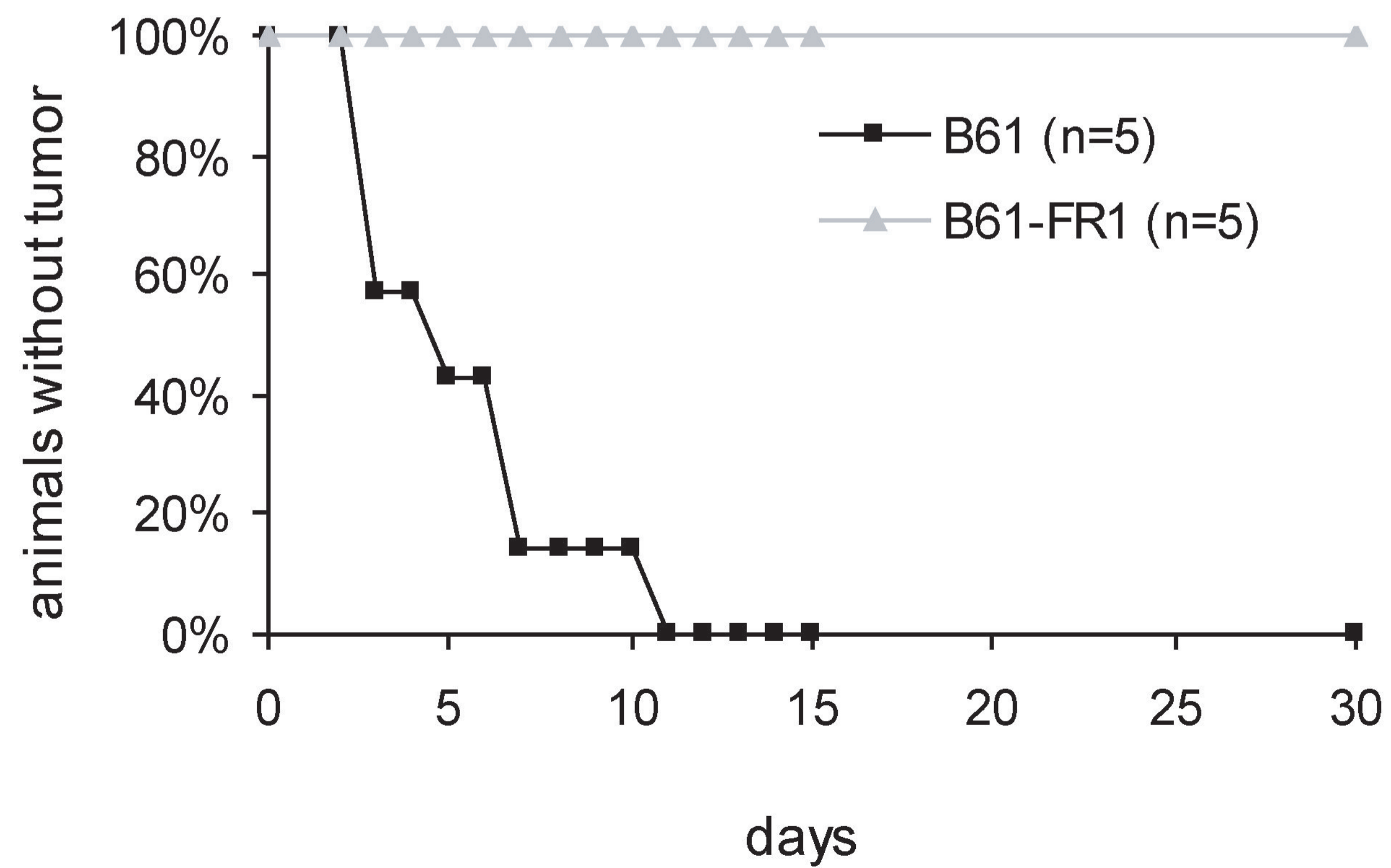


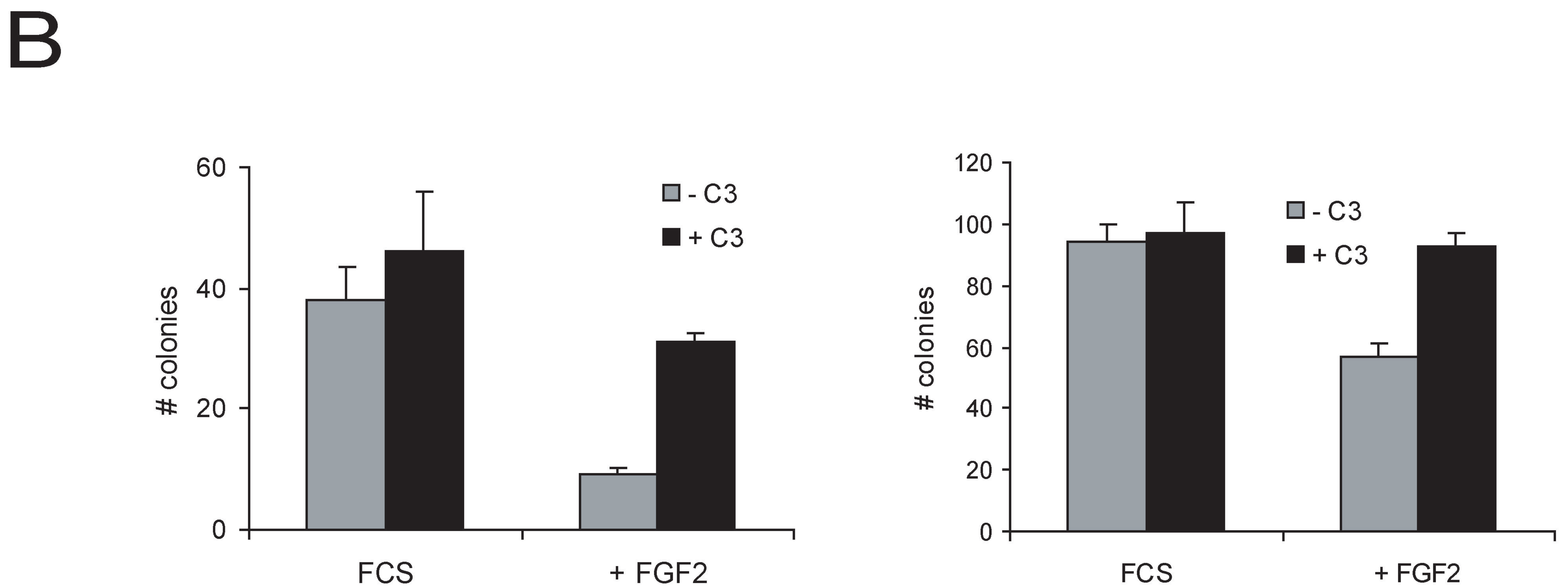
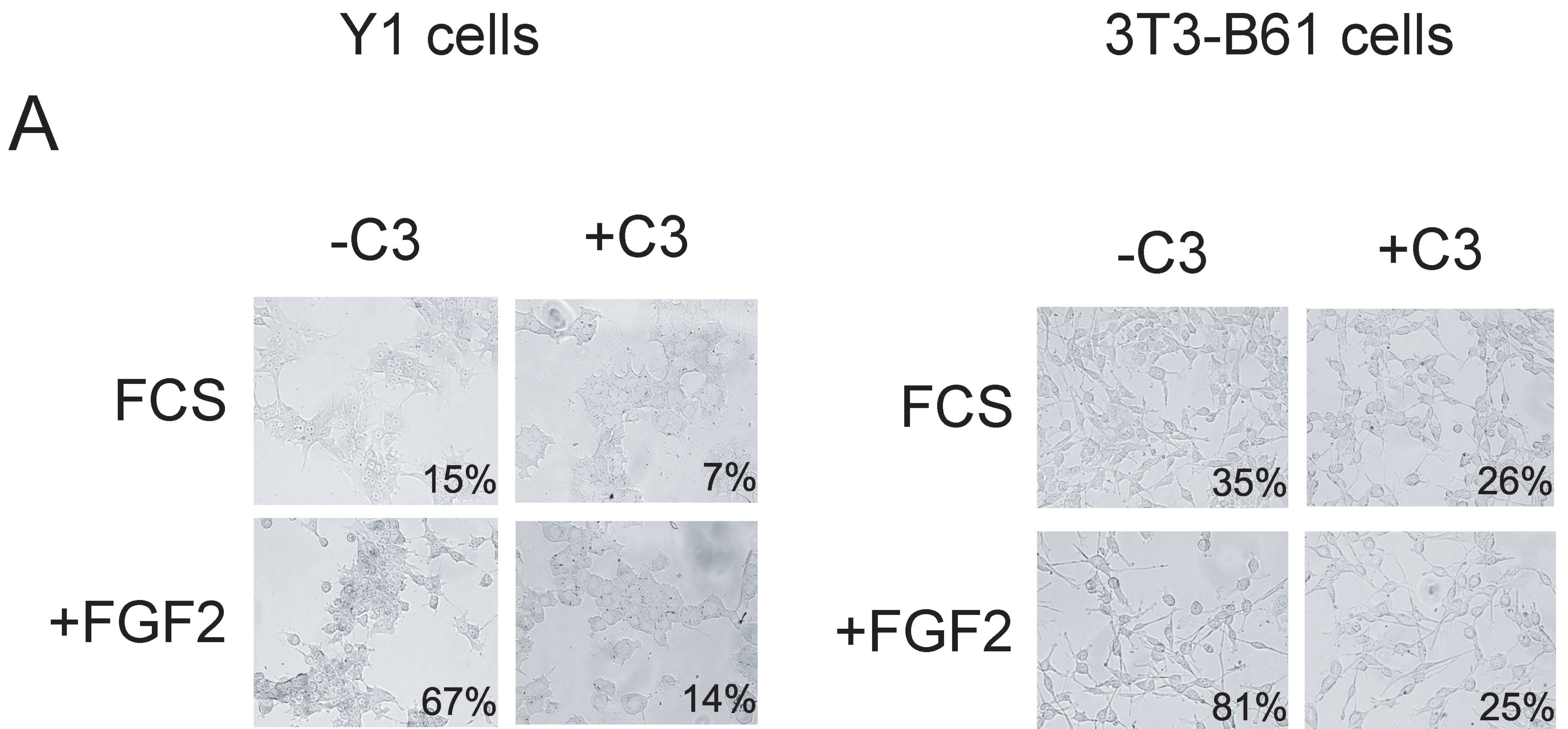
B



A**B****C**



A**B****C**



Supplementary Figure 1

A: G0/G1-arrested Y1 cells were treated for 5 min with FCS or any one of the FGFs (FGF1, -2, -4, and -5) and processed to determine phosphorylation of ERK1/2 by Western blotting. B: In clonogenic assays in solid substrate cultures, the FGFR-kinase inhibitor PD173074 protected Y1 malignant cells from FGF2-cytotoxicity. Single-cell suspensions of Y1 cells were plated at 100 cells/cm² in 10% FCS-DME and treated with 0.1 nM FGF2 for 24 h. The medium was then changed to fresh 10% FCS-DME to allow cell proliferation until colonies were visible. PD173074 was added to medium 5 min before FGF2 (*p < 0.0001, chi-square test). C: Treatment with 0.1 nM FGF2 for 24 h also inhibited colony development in clonogenic assays of the DM-strain of the malignant Y1 cell line (5 dishes per condition; p < 0.01, chi-square test). The DM-strain of the mouse Y1 adrenocortical carcinoma cell line was obtained in 1978 from Dr. Hideo Masui (Biology Department, UCSD, La Jolla, CA, USA).

Supplementary Figure 2

Kinetics of DNA synthesis measured using 1-h pulses of ³H-thymidine uptake by G0/G1-arrested Y1 cells stimulated with 10% FCS, 1nM FGF2, or FCS+FGF2. Y1 cells were plated on glass coverslips at 2 x 10⁴ cells/cover DME containing 3% plasma lacking PDGF slip and starved for 48 h in serum-free DME to arrest cells at the G0/G1 interface. At time 0, G0/G1-arrested Y1 cells were stimulated to progress through the cell cycle, and they were periodically analyzed over the next 20 h. Pairs of coverslips were periodically taken, incubated for 1 h with ³H-thymidine (1 μCi/mL, 10⁻⁷ M), and processed to measure cpm incorporated into DNA per coverslip. The curves in the graph display cpm for each experimental condition minus cpm for each respective non-stimulated control.

Supplementary Figure 3

Levels of H-Ras-GTP in cell lysates of the Balb 3T3 parental line and the H-rasV12-transformed sub-lines 3T3B61 and 3T3EJA: the transformed sub-lines, but not the parental Balb 3T3 line, showed constitutively high levels of H-Ras-GTP. G0/G1-arrested cells were stimulated with 20% FCS for 30 min, lysed, and processed to measure levels of H-Ras-GTP. In the panel, a Western blot shows levels of H-Ras-GTP and total H-Ras found in lysate aliquots containing 1 mg and 100 μg of protein from the indicated cell lines.

Supplementary Figure 4

Transient reduction in the level of K-Ras-GTP in Y1 cell sub-lines of the series Y1-RasN17, which carries the dominant-negative RasN17 mutant under control of the dexamethasone-inducible MMTV promoter. G0/G1-arrested Y1-RasN17 cells were lysed and processed to measure levels of K-Ras-GTP by reaction with a fusion of the Raf1 binding domain and glutathione S-transferase (RBD-GST), which has been described in Forti et al (2002). Representative Western blots for the sub-lines Y1-RasN17-1.3 and Y1-RasN17-1.6 are shown in panels A and B, respectively. "H-Ras-Total" and "K-Ras-Total" refer to lysate aliquots containing 100 μg of protein, whereas "K-Ras-GTP" refers to aliquots containing 1 mg of protein.

Supplementary Figure 5

In G0/G1-arrested Y1 cells whose growth was stimulated by FCS or FGF2, G1 phase progression occurred in the same way irrespective of the level of K-Ras-GTP, as indicated by pRb phosphorylation, CDK2 activation, and induction of both cyclins D1 and E. A: In cells of

sub-line Y1-RasN17-3.1 treated or not treated with 0.5 μ M dexamethasone, Western blotting shows the same pattern of pRb phosphorylation. G0/G1-arrested cells were treated or not treated with 0.5 μ M dexamethasone for 24 h, stimulated with 10% FCS or 0.1 nM-FGF2 for 18 h, lysed, and processed for Western blotting with a monoclonal antibody from Pharmingen. B: Kinetics of CDK2 activation in the parental Y1 cell line and in the sub-line Y1-RasN17-3.1. Cultures of G0/G1-arrested cells were treated or not treated with 0.5 μ M dexamethasone, stimulated with 10% FCS or 0.1 nM FGF2, harvested at various times, and lysed in buffer containing 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 0.1 mM PMSF, 10 μ g/mL leupeptin, 20 U/mL aprotinin, 10 mM glycerolphosphate, 1 mM NaF, and 0.1 mM sodium orthovanadate. The lysates were frozen at -80 $^{\circ}$ C. Lysate aliquots containing 100 μ g of protein were incubated first with antibodies against CDK2 or Cyclin E (Santa Cruz) for 4 h at 4 $^{\circ}$ C and second, with protein A-Sepharose beads for an additional 30 min. Finally the mixtures were centrifuged, washed, and resuspended in 30 μ L of kinase buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 2.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM glycerolphosphate, 1 mM NaF, 0.1 mM sodium orthovanadate] containing 2.5 μ g of histone H1 and 0.25 nmol of γ ³²P-ATP (2 μ Ci). Finally, the kinase buffer suspensions were incubated for 30 min at 30 $^{\circ}$ C and the kinase reaction was terminated by addition of 30 μ L of sample buffer, heating to 100 $^{\circ}$ C for 5 min, and loading onto 10% SDS-PAGE. After electrophoresis, the gel was dried and autoradiographed with X-ray film (Kodak). A representative autoradiogram is shown in panel B. C: Northern blot showing the kinetics of induction of the mRNAs for cyclins D1 and E in G0/G1-arrested Y1-RasN17-3.1 cells treated or not treated with 0.5 μ M dexamethasone for 24 h, then stimulated with 0.2 nM FGF2. Samples of 10 μ g of total RNA were loaded per lane, and the same nylon membrane was successively hybridized to ³²P-labeled probes for cyclin D1, cyclin E and GAPDH mRNA. A representative autoradiogram is shown in panel C.

Supplementary Figure 6

Clonal Y1 sub-lines were grown from colonies that had been derived from single cells that survived 24 h in 10% FCS-DME + FGF2. The sub-lines showed transient resistance to FGF2 cytotoxicity in culture, but were tumorigenic in Balb/c nude mice and, retained the extra copies of the c-K-Ras proto-oncogene, the constitutively high levels of K-Ras-GTP, and a constitutively activated PI3K/Akt pathway. (A) Growth curves and (E) clonogenic assays demonstrate that FGF2 did not inhibit proliferation of Y1-FR2 cells. In addition, data presented in C indicate that Y1-FR2 cells were less tumorigenic than parental Y1 cells and FGF2 injections had no effect on tumor onset. Y1-FR2 cells (0.5×10^6) were inoculated into each animal. In B, growth curves show that Y1-FR3 cells required FGF2 for optimal proliferation and grew well in clonogenic assays (F) irrespective of FGF2. On the other hand, in nude mice (D), Y1-FR3 cells resembled the highly tumorigenic parental Y1 cells, and FGF2 injections significantly inhibited tumor onset in these animals. G: Determination of levels of K-Ras-GTP. Western blotting was used to measure levels of K-Ras-GTP in a lysates aliquot containing 1 mg of total cellular protein and the level of total K-Ras in lysate aliquots containing 100 μ g of protein. ERK2 served as protein loading control. H: Southern blot for Eco-R1 digested genomic DNA (15 μ g/lane) successively hybridized to ³²P-probes of c-K-ras and c-fos genes. 1: Balb 3T3 control without K-ras amplification; 2: parental Y1; 3: Y1-FR1; 4: Y1-FR2; and 5: Y1-FR3 cells. I: Western blot to estimate levels of Akt phosphorylation (pAkt) in G0/G1-arrested cells.

Supplementary Figure 7

The B61-FR1 is a non-tumorigenic revertant sub-line derived from the H-rasV12-transformed 3T3B61 line. As a result of FGF2 selection, B61-FR1 has lost the human-H-rasV12 trans-oncogene and it shows the following stable phenotypic traits: A, it is dependent on FGF2 for proliferation in 10% FCS-DME (growth curves); B, it does not express detectable levels of H-rasV12 mRNA (quantitative RT-PCR); and C, it does not produce tumors in immunocompetent Balb/c mice.

Supplementary Figure 8

The RhoA-specific inhibitor C3 exoenzyme protects both Y1 and 3T3-B61 malignant sub-lines from FGF2 cytotoxicity. A: C3-exoenzyme was added to Y1 and 3T3-B61 cells cultured in 10% FCS-DME, and five minutes later, 1 nM FGF2 was added. After 24 h, cells were fixed and stained in order to estimate the percentage of cells positive for SA- β -Gal. Significant differences were seen among the Y1 cell populations treated in different ways ($p < 0.05$; chi-square test), except for FCS (15%) and FCS+FGF2+C3 (14%). Similarly, all differences between treatment groups of 3T3-B61 cells were statistically significant, except for FCS+C3 (26%) and FCS+FGF2+C3 (25%). B: Clonogenic assays: single-cell suspensions of Y1 and 3T3-B61 were plated, respectively, in 10% FCS-DME and 10% FCS-DME containing 1nM-FGF2 for 24 h, in the absence or presence of C3 exoenzyme. Then the medium was changed to fresh 10% FCS-DME in all conditions in both cell lines in order to allow visible colonies to develop. Figures are averages of triplicates. For both Y1 and 3T3-B61 sub-lines, significant differences were observed between FCS and FCS+FGF2 and between FCS+FGF2 and FCS+FGF2+C3 ($p < 0.05$; chi-square test).

Table S1

Tumorigenic and clonogenic assays in Balb 3T3 cell sub-lines: FGF2 inhibition of colony growth correlates with growth inhibition of tumors in animals.

Cell Type	Colonies / plate ^a		% Inhibition of clonogenic growth	Percent of Animals with Tumors ^b	
	Control	+FGF2		Balb/c	Balb/c Nude
Balb 3T3	234 ± 12	219 ± 17	7%	0 (0 / 4)	25% (1 / 4)
3T3-B-61	123 ± 9	56 ± 5	54%	100% (3 / 3)	100% (7 / 7)
B61-4AB ^c	26 ± 2	34 ± 4	---*	8% (1 / 13)	0 (0 / 6)
3T3-EJA	106 ± 7	45 ± 18	58%	100% (4 / 4)	100% (4 / 4)
EJA-3D ^c	897 ± 53	931 ± 66	---*	0 (0 / 9)	100% (6 / 6)
EJA-5A ^c	61 ± 6	47 ± 2	24%	12% (6 / 49)	0 (0 / 5)
EJA-2A ^c	91 ± 10	70 ± 4	23%	0 (0 / 18)	50% (3 / 6)

^a Cells plated at 100-160 cells/cm² in P60 dishes were incubated in 10% FCS-DME containing 1 nM FGF2 for 24h. After this period, the medium was replaced with fresh 10% FCS-DME to allow colony growth. Colonies were fixed with 3.7% formaldehyde for 15 min and stained with crystal violet. Results are means ± SD (n = 4-8).

^b Balb/c and Balb/c nude mice were inoculated (5×10^5 cells/animal) subcutaneously with parental the non-transformed Balb 3T3 cell line or with both the H-rasV12-transformed sub-lines 3T3-B61 and 3T3-EJA, and non-tumorigenic clonal revertants that were isolated from both. Tumor onset and growth rate were checked every 2-4 days for 30 days.

^c B61-4AB, EJA-3D, EJA-5A, and EJA-2A are non-tumorigenic revertant clonal sub-lines derived from, respectively, 3T3-B61 and 3T3-EJA tumorigenic sub-lines by negative selection with FUDR (Fluor-deoxyuridine) in DME containing 3% plasma lacking PDGF. In PDGF-deficient medium, a very small number of 3T3-B61 or 3T3-EJA variants that had entered the G0/G1 quiescent state survived FUDR cytotoxicity. These rare cells were grown in 10% FCS-DME, isolated, and cloned. A B61-4AB revertant was identified that had lost the H-rasV12 trans-oncogene and that closely resembled the parental Balb 3T3 line phenotype. On the other hand, EJA-3D, EJA-5A, and EJA-2A revertants maintained their copies of the H-rasV12 trans-oncogene and continued to overexpress the protein. At the same time, however, these three revertant clones recovered the induction of c-fos and fosB immediate early genes. In tumorigenic 3T3-B61 and 3T3-EJA sub-lines, ectopic expression of the H-rasV12 oncogene led to

silencing of both c-fos and fosB genes, constitutive expression of cyclin D1, and full growth in DME containing 3% plasma lacking PDGF.

* No inhibition. FGF2 led to an increase in the number of colonies.

Anexo III

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Jacqueline Salotti

Local e data de nascimento: São Bernardo do Campo, SP, Brasil, 16 de junho de 1979

E-mail: jsalotti@yahoo.com

EDUCAÇÃO

Técnica em química (bolsa de estudos integral), Colégio Singular, Brasil, 1996

Farmacêutica-bioquímica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002

Candidata ao título de doutorado em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil, conclusão prevista: 2009

ARTIGO COMPLETO

Costa ET, Forti FL, Matos TGF, Dermargos A, Nakano F, Salotti J, Asprino P, Yoshihara CK, Koga MM & Armelin HA. "Fibroblast Growth Factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering Rho-A-mediated senescence". *Cancer Research*, 2008, 15: 6215-6223.

ÚLTIMAS PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS (RESUMO E APRESENTAÇÃO DE PÔSTER)

Salotti J, Matos TGF & Armelin HA. "FGFR-Tyr-kinase mediates FGF2 anti-proliferative effects independently of PKC, PI3K and ERK1/2 pathways". *Gordon Research Conference: Fibroblast Growth Factors in Development and Disease*, 2008, Barga, Lucca, Itália

Salotti J & Armelin HA. "K-Ras activation up-regulates expression of FGF-Receptors in mouse Y1 adrenal tumor cell lines". *5th São Paulo Research Conference Cancer Today: From Molecular Biology to Treatment*, 2007, São Paulo, SP, Brasil.

Salotti J, Koga MM & Armelin HA. "Reduction of FGF-Receptor 2 and Caveolin-1 expression correlates with H-Ras^{V12}-transformation". *22nd Meeting of the Brazilian Federation Societies in Experimental Biology*, 2007, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Salotti J, Costa ET, Koga MM & Armelin HA. "FGF2/FGFR expression and death of mouse cancer cells". *35th Meeting of the Brazilian Biochem. and Mol. Biology Society*, 2006, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Salotti J, Costa ET, Koga MM & Armelin HA. "Cancer cell death induced by FGF2 and FGFR". *71st CSHL Symposium in Regulatory RNAs*, 2006, Cold Spring Harbor, NY, EUA.

PRÊMIO EM CONGRESSO

Nature Publishing Group Travel Award em *Gordon Research Conference: Fibroblast Growth Factors in Development and Disease*, 2008.

OCUPAÇÕES

Bolsista de iniciação científica PIBIC, projeto: “Caracterização dos alcalóides presentes na suspensão celular de *Rauwolfia sellowii*”, Prof. Dr. Paulo R. H. Moreno, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil, agosto/1998 a fevereiro/2000

Bolsista de iniciação científica FAPESP, projeto: “Atividade da superóxido dismutase em culturas de microalgas marinhas”, Prof. Dr. Pio Colepicolo, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil, fevereiro/2000 a janeiro/2001

Estagiária de Processos Produtivos, Boehringer Ingelheim Ind. Farm. Quím. Ltda, Brasil, setembro/2001 a maio/2002

Analista de Processos Produtivos, Boehringer Ingelheim Ind. Farm. Quím. Ltda, Brasil, junho/2002 a agosto/2003

Bolsista PAE-USP nas disciplinas de Bioquímica para o curso de Ciências Biológicas (2º sem. 2005 e 2006) e Biologia Molecular para o curso de Medicina (1º sem. 2007)

Bolsista de doutorado direto CNPq, tese: “Mecanismos moleculares e celulares de citotoxicidade de FGF2 parácrino em células tumorais dependentes de Ras”, Prof. Dr. Hugo A. Armelin, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil, setembro/2003 a agosto/2008

IDIOMAS

Inglês (fluente), alemão (avançado), espanhol (intermediário), francês (básico)

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](#)