

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

MATHEUS HENRIQUE DOS SANTOS DIAS

**Mecanismos da toxidez de FGF2 em células
malignas dependentes de Ras: bloqueio de divisão
celular e estresse proteotóxico**

Versão original da tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
14/02/2012

MATHEUS HENRIQUE DOS SANTOS DIAS

**Mecanismos da toxidez de FGF2 em células
malignas dependentes de Ras: bloqueio de divisão
celular e estresse proteotóxico**

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

Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

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

Dias, Matheus Henrique dos Santos
D541m Mecanismos da toxidez de FGF2 em células malignas dependentes de Ras: bloqueio de divisão celular e estresse proteotóxico / Matheus Henrique dos Santos Dias. -- São Paulo, 2012.
163p.

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. Câncer
I. T. II. Armelin, Hugo Aguirre, orientador.

574.88 CDD

Matheus Henrique dos Santos Dias

Mecanismos da toxidez de FGF2 em células malignas dependentes de Ras:
bloqueio de divisão celular e estresse proteotóxico

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

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À minha tão amada família, que me inspira, me alegra e me orgulha a cada dia.

Aos meus tão extraordinários amigos, cuja presença em minha vida é uma dádiva.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por TUDO.

Ao meu orientador, meu amigo e meu exemplo Hugo Aguirre Armelin, pelos muitos conselhos profissionais e pessoais, e por dividir conosco "causos" que contam a história da ciência contemporânea do ponto de vista de quem ajudou a construí-la. Muitíssimo obrigado por dar asas ao meu pensamento crítico e também por cortá-las quando necessário. E principalmente por, através do seu exemplo, me ensinar a amar a ciência incondicionalmente.

Ao Prof. Dr. Fábio Luís Forti, que acreditou no meu potencial, me "draftou" para vir trabalhar no IQ e guiou com paciência e habilidade meus primeiros passos na ciência.

Às minhas queridas amigas Julianna Dias (Mulher Cajá) e Juliana Galvão (Mulher Pitomba), pela inestimável ajuda em tudo. Vocês tornaram o laboratório um lugar muitíssimo melhor de se trabalhar. E mais bonito também...

Ao meu amigo, meu parceiro Doc Dermargos, pelas ajudas, pelos conselhos, pelas conversas, e por achar que eu sou um bom garoto...

Ao *brother* Du, pelos papos filosóficos e os nem tão filosóficos assim.

À minha querida Cecília, que contribuiu para a realização desta com muito trabalho na bancada, muito incentivo ou algumas vezes apenas enfeitando o ambiente...

Aos meus amigos de pós-graduação do IQ. É uma honra fazer parte desse time.

Ao Dr. e "boleiro" André Zelanis que me ajudou prontamente com as análises de *mass spec*.

A todos os membros antigos do laboratório, que me acolheram tão carinhosamente, e que ajudaram a gerar o conhecimento que levou a realização deste trabalho.

Aos professores do IQ-USP, que tanto contribuíram e ainda contribuem para minha formação.

Aos meus professores do colégio, responsáveis por plantar em minha cabeça a semente do pensamento crítico, base de toda a ciência.

A todos os técnicos, alunos e funcionários do IQ e do CAT que me ajudaram nas diversas etapas do trabalho.

De maneira muito especial

Ao Sr. Mário (*in memoriam*), meu pai, tio, tio de novo, avô, padrinho, amigo e grande patriarca da minha família. Obrigado por tudo o que fez por nós.

À minha mãe Lázara, que é o suporte de amor e dedicação sem o qual nada disso teria sido possível.

Ao meu pai Maurício, grande alquimista que transformou suor, poeira e pó de borracha na educação de base que me permitiu trilhar este caminho. E por sempre me apoiar no caminho que escolhi.

Aos meus irmãos e irmãs mais velhos, que são para mim exemplo e orgulho.

Aos meus irmãos mais novos, que são verdadeiramente um pedaço de mim.

Aos meus demais familiares, por sempre acreditarem em mim e por tornarem minha vida tão especial.

Aos meus amigos-irmãos, simplesmente por existirem.

Enfim, eu certamente serei incapaz de agradecer a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Mas ficam aqui os meus mais sinceros agradecimentos a cada pessoa que, de uma maneira ou de outra, colaborou para que estes 171.472 caracteres e o conhecimento por trás deles estivessem aqui agora. MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Este projeto teve o suporte financeiro da FAPESP e do CNPq.

“Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão.”

Max Planck (1858-1947)

RESUMO

FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) é o membro fundador de uma grande família de fatores de crescimento protéicos. Sua atividade se dá através da ligação e ativação de receptores específicos de membrana (FGFRs) com atividade de tirosina quinase. No organismo adulto, a sinalização de FGF2 está envolvida na indução de processos de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular; além de cicatrização e angiogênese. Por atuar como um clássico fator de crescimento, a atividade de FGF2 está freqüentemente implicada em mecanismos pró-tumorais. Entretanto, alguns grupos, incluindo o nosso, têm reportado que FGF2 também pode apresentar efeitos antiproliferativos a até citotóxicos seletivamente em células malignas. Em 2008, publicamos um compreensivo relato mostrando que FGF2 bloqueia irreversivelmente a proliferação de linhagens murinas malignas dependentes de Ras. Alterações que levem a atividade aumentada de proteínas Ras estão presentes em diversos cânceres humanos e, freqüentemente, resultando em problemas no tratamento e prognóstico ruim. No presente trabalho, utilizamos principalmente a linhagem murina maligna dependente de Ras Y1 D1G, que apresenta um controle estrito de quiescência/proliferação em função da presença de soro; e é por isso mesmo um bom modelo para a análise dos efeitos de FGF2 sobre o ciclo celular. Análises por citometria de fluxo mostraram que, nessas células, apesar de disparar a transição G0→G1→S, FGF2 provoca um atraso na fase S seguido de um bloqueio do ciclo em G2. Embora bloqueie a progressão no ciclo (proliferação), FGF2 induz em Y1 D1G o crescimento celular em termos de massa e volume. Assim, nessas células FGF2 “desconecta” crescimento celular de proliferação. Esse desarranjo do ciclo celular provocado por FGF2 nas células Y1 D1G tem como resultado a instabilidade genotípica e morte celular; evidenciada pela perda da integridade de membrana plasmática e altas taxas de fragmentação de DNA observadas após o estímulo por esse fator. Esse efeito tóxico de FGF2 depende da atividade da proteína Src; porque a inibição química dessa proteína apresentou proteção total frente aos efeitos tóxicos de FGF2. Análises por espectrometria de massas mostraram que FGF2 induz aumento dos níveis de proteínas relacionadas à síntese protéica, e também de proteínas relacionadas ao estresse proteotóxico. Sabe-se que células malignas lidam com níveis basais altos de diferentes tipos de estresse; incluindo o estresse proteotóxico. Esse quadro mostra que o efeito tóxico disparado por FGF2 em Y1 D1G está relacionado a um acúmulo de proteínas/célula, perda da homeostase de

proteínas e estresse proteotóxico. Corrobora essas proposições o fato de que a inibição química de Src, que protege totalmente as células do efeito tóxico de FGF2, impede completamente o acúmulo de proteínas/célula. Além disso, em células Y1 D1G resistentes ao efeito tóxico de FGF2, e que inclusive dependem deste para proliferar em cultura, a atividade de FGF2 tem efeito oposto; ou seja, provoca diminuição dos níveis estacionários de proteínas/célula. Juntos, esses resultados demonstram que FGF2 é capaz de atacar uma vulnerabilidade de células malignas dependentes de Ras; e no caso estudado, essa vulnerabilidade decorre do desequilíbrio na homeostase de proteínas.

Palavras-chave: FGF2, Ciclo celular, Estresse proteotóxico, Ras.

ABSTRACT

FGF2 is the first member of a large family of peptide growth factors. It binds and activates specific membrane receptors (FGFRs) belonging to a family of tyrosine kinase receptors (RTK). In adult organisms, FGF2 signaling is involved in the induction of cell surveillance, proliferation and differentiation; and also wound healing and angiogenesis. FGF2 is a *bona fide* growth factor and, as such, it is often implicated in pro-tumor mechanisms. However, several groups, including ours, have reported that FGF2 can also display antiproliferative and even cytotoxic effects selectively in malignant cells. In 2008, we fully reported that FGF2 irreversibly blocks the proliferation of Ras-driven mouse malignant lineages. Alterations leading to Ras proteins overactivity are present in many human cancers frequently with bad prognosis. In the present work, we used mainly the Ras-driven mouse malignant lineage Y1 D1G that shows a strict control of quiescence/proliferation by serum factors, making it a great model to analyze the FGF2 effects upon cell cycle control. Flow cytometry analyses showed that in these cells, in spite of triggering G0→G1→S transition, FGF2 causes a delay on S phase followed by cell cycle arrest in G2. Despite blocking cell division, FGF2 induces cell growth in terms of mass and volume. Therefore, in these cells FGF2 “disconnects” cell growth from proliferation. This malfunction of cell cycle control caused by FGF2 on Y1 D1G cells leads to genotypic instability and cell death, highlighted by loss of plasma membrane integrity and high rates of DNA fragmentation. This FGF2 toxic effect depends on the activity of Src protein, because Src chemical inhibition completely protects cells from the FGF2 toxic effects. Mass spec analyses showed that FGF2 increases the levels of proteins involved in the protein synthesis machinery, and also of proteins active in proteostasis, indicating proteotoxic stress. It is known that malignant cells deal with high basal levels of different stresses, including the proteotoxic stress. This picture shows that the toxic effects triggered by FGF2 in Y1 D1G involve accumulation of proteins/cell, loss of protein homeostasis and proteotoxic stress. Corroborating these propositions, chemical inhibition of Src, which completely protects the cells from FGF2 toxic effects, totally abrogates the accumulation of proteins/cell. Moreover, in FGF2-resistant Y1 D1G cells, which depend on this factor for proliferation, FGF2 shows the opposite effect, causing decrease in steady state levels of protein/cell. Altogether, these results show that FGF2 causes a severe proteostasis imbalance in these Ras-driven mouse malignant cells.

Key words: FGF2, Cell cycle, Proteotoxic stress, Ras.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
AKT/PKB	Proteína kinase B
AP-1	Proteína ativadora 1
AVP	Arginina-Vasopressina
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albumina de soro bovino
CDK	Quinase dependente de ciclina
CKI	Inibidor de CDK
DDR	Resposta a dano no DNA
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FCS	Soro fetal bovino
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FGFR	Receptores específicos para FGF
GDP	Guanosina difosfato
GTP	Guanosina trifosfato
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
PBS	Solução salina tamponada
PBSA	Solução salina tamponada sem Ca ⁺² sem Mg ⁺²
PI	Iodeto de propídio
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
PMSF	Fenilmetano Sulfonil Fluoreto
pRB	Proteína retinoblastoma
RTK	Receptor com atividade de tirosina-quinase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBS	Solução tamponada de Tris
TBS-T	Solução tamponada de Tris + 01% <i>Tween 20</i>
TCA	Ácido tricloro acético

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 - Expressão de ciclina D1 e K-Ras em Y1 e clones Y1 D1..	65
Figura 4.2 - Análise do controle de quiescência/proliferação em células Y1 D1G e Y1.....	66
Figura 4.3 - Efeitos de FGF2 sobre células Y1 D1G e Y1.....	68
Figura 4.4 - Efeito de FGF2 sobre outros clones Y1 D1.....	70
Figura 4.5 - Cinética de progressão no ciclo celular em células Y1 D1G.....	73
Figura 4.6 - Perfis de ciclo celular em células Y1 D1G.....	79
Figura 4.7 - Discriminação entre bloqueio em G2 e bloqueio em M...	83
Figura 4.8 - Incorporação de ³ H-timidina em células Y1 D1G com FGF2 adicionado em diferentes tempos.....	85
Figura 4.9 - Acumulação de células Y1 D1G em G2/M em função do tempo de adição de FGF2.....	87
Figura 4.10 - Efeito de FGF2 em Y1 D1G antes da fase S.....	89
Figura 4.11 - Efeitos imediatos de FGF2 sobre o ciclo celular em Y1 D1G.....	92
Figura 4.12 - Efeito de FGF2 sobre o tamanho médio das células Y1 D1G.....	94
Figura 4.13 - Medidas de proliferação e tamanho médio de células Y1 D1G.....	96
Figura 4.14 - Medidas de proteínas totais/célula em Y1 D1G.....	98
Figura 4.15 - Determinação da população com conteúdo de DNA maior que G2/M.....	101
Figura 4.16 - Microscopia confocal de células Y1 D1G sob efeito de FGF2.....	103
Figura 4.17 - Ensaio de exclusão de iodeto de propídio.....	105
Figura 4.18 - Determinação da população sub-G1 em Y1 D1G sob efeito de FGF2.....	107
Figura 4.19 - Cinética de expressão de ciclina E em Y1 D1G.....	109

Figura 4.20 - Cinética de expressão de ciclina A em Y1 D1G.....	110
Figura 4.21 - Cinética de expressão de p21 em Y1 D1G e Y1.....	112
Figura 4.22 - Marcadores de DDR em células Y1 D1 sob efeito de FGF2.....	115
Figura 4.23 - Marcadores de DDR em células Y1.....	116
Figura 4.24 - Expressão de ciclina A e p21 em clones resistentes a FGF2 (FRs).....	119
Figura 4.25 - Marcadores de DDR em clones resistentes a FGF2 (FRs).....	120
Figura 4.26 - Ensaio clonogênico em células Y1 com diferentes inibidores.....	122
Figura 4.27 - Medidas de proliferação de células Y1 D1G e Y1 com diferentes inibidores.....	124
Figura 4.28 - Curvas de crescimento com inibidor de Src PP1.....	125
Figura 4.29 - Fotomicrografias de células Y1 D1G com inibidor de Src.....	126
Figura 4.30 - Expressão de ciclina A, p21 e γ -H2AX em Y1 D1G com inibidor de Src.....	127
Figura 4.31 - Medidas de proteínas totais/célula em Y1 D1G com inibidor de Src.....	133
Figura 4.32 - Medidas de proteínas totais/célula em clones Y1 D1G resistentes a FGF2.....	135

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Prólogo.....	17
1.2. Ciclo celular e câncer.....	18
1.3. Ciclinas, CDKs, CKIs e <i>checkpoints</i>	21
1.4. Respostas celulares a sinais externos.....	25
1.5. A via de MAPK.....	26
1.6. A via de PI3K-Akt.....	28
1.7. A proteína Src.....	29
1.8. A proteína Ras.....	31
1.9. FGF2: biologia, família e sinalização.....	34
1.10. A resposta a dano no DNA (DDR).....	37
1.11. Homeostase de proteínas: um “calcanhar de Aquiles” de células malignas.....	39
1.12. Morte e vida celular.....	41
2. OBJETIVOS.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1. Cultura de células.....	48
3.2. Extração e quantificação de proteínas totais.....	49
3.3. <i>SDS-PAGE</i> e <i>Western blot</i>	50
3.4. Ensaio clonogênicos.....	51
3.5. Curvas de crescimento.....	52
3.6. Ensaio de incorporação de timidina tritiada (³ HTdR).....	53
3.7. Citometria de fluxo.....	54
3.8. Determinação de proteínas totais/célula.....	56
3.9. Microscopia.....	57
3.10. Análise proteômica.....	58
3.11. Linhagens celulares.....	60
3.12. Anticorpos.....	60
3.13. Inibidores.....	61
4. RESULTADOS.....	63

4.1. As sub-linhagens Y1 D1 apresentam um controle estrito de quiescência/proliferação em função da concentração do soro no meio de cultura; e permanecem tão sensíveis quanto a linhagem Y1 aos efeitos tóxicos de FGF2.....	63
4.2. FGF2 promove a transição G0/G1→S em células Y1 D1G, mas posteriormente leva a um comprometimento da síntese de DNA, seguido por um bloqueio do ciclo celular proeminentemente na fase G2.....	71
4.3. FGF2 compromete o ciclo celular em células Y1 D1G em diferentes pontos.....	84
4.4. Em células Y1 D1G, FGF2 “desconecta” crescimento de proliferação.....	93
4.5. FGF2 induz instabilidade genotípica e morte celular em células Y1 D1G.....	99
4.6. Mecanismos moleculares da ação de FGF2 sobre o controle da progressão no ciclo celular.....	108
4.7. FGF2 induz resposta a dano no DNA em Y1 e Y1 D1G.....	113
4.8. FGF2 também induz a expressão de p21 e ciclina A, além da fosforilação da histona H2AX, em células Y1 D1G e Y1 resistentes a FGF2.....	116
4.9. O efeito antiploriferativo de FGF2 pode ser revertido pela inibição de Src, mas não das vias de MAPK ou PI3K-Akt.....	120
4.10. O efeito tóxico de FGF2 em Y1 D1G causa um desequilíbrio na homeostase de proteínas.....	128
5. DISCUSSÃO.....	136
5.1. Efeitos de FGF2 sobre o ciclo celular de Y1 D1G.....	137
5.2. Ações de FGF2 sobre a maquinaria de controle do ciclo celular.....	141
5.3. O papel de Src.....	144
5.4. FGF2 e a homeostase de proteínas em células Y1 D1G.....	146
5.5. Epílogo.....	147
6. CONCLUSÕES.....	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150

SÚMULA CURRICULAR..... **161**

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Prólogo

“... Massas protuberantes, rígidas ao toque e difundidas ao longo da mama...”. Esta é uma tradução/adaptação livre da primeira descrição do que parece ser um câncer. Datada de 2500 a.C., trata-se de um papiro contendo ensinamentos atribuídos ao estudioso egípcio Imhotep; onde, entre outras doenças, ele descreve de maneira detalhada o que parece ser o primeiro caso documentado de um câncer de mama. Mas foi apenas por volta do ano 400 d.C. que grego Hippócrates, ao observar um tumor, achou semelhança entre a massa tumoral com os vasos sanguíneos ao seu redor, e um caranguejo com suas patas. Sendo assim, foi ele quem primeiro introduziu na literatura médica a palavra *karkinos*, freqüentemente traduzida para carcino ou câncer como utilizamos atualmente. Apesar de a comparação parecer meio grotesca, outros autores acabaram associando o caranguejo a outras características da doença solidificando essa nomenclatura. Ao longo de muitos séculos após esse período, muito pouco se avançou na compreensão da doença; e os tratamentos freqüentemente se baseavam na excisão cirúrgica da área afetada. Os resultados não eram muito animadores, tanto pelo que sabemos hoje sobre as metástases quanto pela falta de assepsia com que eram praticadas as operações. As coisas só começaram a mudar quando, em meados do século XIX, Rudolph Virchow postulou a partir de proposições de Theodor Schwann e outros, que o corpo humano é

constituído por células; e que cada célula apenas pode surgir de outra preexistente. Esta proposta deu origem aos conceitos de hipertrofia e hiperplasia, e mudou o entendimento sobre o crescimento humano normal e patológico. O próprio Virchow ao observar tumores ao microscópio reconheceu essa doença como sendo uma violenta forma de hiperplasia patológica. A qual chamou *neoplasia*. Com a difusão dessas informações o câncer passou a ser visto como resultado de uma proliferação celular descontrolada; e após um melhor entendimento dos mecanismos que controlam o ciclo celular, pôde-se entender que o câncer é essencialmente uma doença de ciclo celular. Uma subversão dos mecanismos de controle do ciclo. A partir daí, conceitos como oncogenes e supressores de tumor foram introduzidos, e diversas estratégias de tratamentos têm sido empregadas para controlar os mais diversos tipos de cânceres. Infelizmente, apesar dos muitos avanços, ainda estamos muito longe de entender completamente esse conjunto de patologias que chamamos de câncer, e mais ainda de sermos capazes de controlar a maioria delas.

1.2 - Ciclo celular e câncer

Dentre os diversos processos extraordinários que freqüentemente observamos na natureza, o ciclo celular eucariótico sem dúvida ocupa um lugar de destaque. Para uma definição, o ciclo celular é o processo pelo qual a célula duplica todo o conteúdo celular, incluindo o material genético, e o distribui equitativamente para duas células filhas. Em

mamíferos adultos, o ciclo celular se apresenta sempre em um mesmo padrão de fases: A fase G1 é caracterizada por crescimento celular e preparação para a síntese de DNA; a fase S, que é onde ocorre a duplicação do material genético; a fase G2 também envolve um segundo crescimento celular e a preparação para a divisão celular; divisão esta que ocorre na fase M. Em muitos casos a célula pode permanecer também na fase G0, onde ela se encontra quiescente, mas apta a responder a sinais externos e voltar a proliferar passando para a fase G1. Esse estado de quiescência é bem diferente de senescência celular, que se caracteriza por um bloqueio permanente do ciclo celular, e que será abordada posteriormente neste texto. A progressão através do ciclo é um processo finamente orquestrado e seu controle depende de uma série de níveis de organização. Envolvendo mecanismos moleculares, supramoleculares, celulares, teciduais e etc. Submetendo o controle do ciclo à homeostase do organismo como um todo.

Em organismos multicelulares, cada célula individual deve permanecer quiescente, proliferar, diferenciar-se, senescer ou mesmo morrer para garantir a homeostase dos tecidos e do organismo como um todo; e é aí que está a grande diferença entre células normais e malignas. O resultado das alterações genéticas e epigenéticas ocorridas durante a malignização é uma célula que não está mais comprometida com os controles impostos pelo organismo, e que se divide de maneira descontrolada, coloniza novos locais e por fim acaba com a homeostase do organismo. Embora existam diversos tipos de cânceres e diversas

alterações genéticas que podem levar a esses fenótipos malignos, é bem aceito que existem 6 “habilidades” que células tumorais devem adquirir ao longo de sua progressão para o desenvolvimento do tumor. São elas: proliferação independente de sinalização externa; insensibilidade a fatores antiproliferativos; resistência à morte celular; capacidade ilimitada de replicação; indução de angiogênese e potencial metastático (Hanahan & Weinberg, 2000). Sendo assim, a célula tumoral pode ser vista como uma “perversão” da célula normal; uma vez que a maneira com que ela cresce e progride através do ciclo celular é semelhante ao classicamente observado em células normais. Entretanto, o controle molecular e supramolecular desses processos está subvertido na célula tumoral.

Diante desse quadro, entender corretamente os mecanismos que controlam o ciclo celular é fundamental para entender e combater a progressão tumoral. Apesar dos muitos esforços nesse sentido, os principais tratamentos utilizados contra o câncer hoje em dia, ainda são a quimioterapia e radioterapia para eliminar as células em proliferação ativa, acompanhadas ou não de excisão cirúrgica do tumor. Apesar de matarem preferencialmente as células tumorais, esses dois procedimentos possuem muitos efeitos colaterais por atingirem também células normais. Sendo assim, a busca por vulnerabilidades específicas de células tumorais continua sendo o maior desafio dentro da oncologia.

1.3 - Ciclinas, CDKs, CKIs e checkpoints

Os complexos ciclina/CDK compõem, sem dúvida, o cerne do controle do ciclo celular. Inicialmente propostos por volta da década de 70, sua descoberta rendeu a Leland Hartwell, Tim Hunt e Paul Nurse o prêmio Nobel em fisiologia ou medicina de 2001 (Nurse *et al.*, 1976; Hartwell *et al.*, 1970; Evans *et al.*, 1983). Desde então, muito foi feito referente ao estudo do papel desses complexos no controle do ciclo celular.

As CDKs (*Cyclin-Dependent Kinases*) são uma família de serina/treonina quinases, cuja oscilação da atividade controla a progressão no ciclo. Embora a expressão das CDKs seja constante ao longo do ciclo, sua atividade é controlada principalmente pela ligação dessas proteínas a membros de outra família de proteínas conhecidas como ciclinas. Os níveis celulares de ciclinas variam muito ao longo do ciclo; tanto por variação da expressão, como por modulação da degradação (Morgan, 1997; Malumbres & Barbacid, 2009). Uma vez ligadas às ciclinas, que são as subunidades regulatórias do complexo, as CDKs podem agora fosforilar diversos alvos intracelulares para levar a progressão no ciclo.

Em células animais, os principais membros da família das CDKs envolvidos diretamente no controle do ciclo celular são: CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6. Que são controladas por 4 classes principais de ciclinas: Ciclinas A, B, D e E. Mantendo certa especificidade, diferentes ciclinas

podem combinar-se com diferentes CDKs e os complexos formados vão atuar em momentos específicos do ciclo celular (Morgan, 1997).

Classicamente, células quiescentes respondem a sinais mitogênicos externos com o rápido aumento da expressão dos chamados genes de resposta primária. Dentre estes genes, alguns codificam fatores de transcrição que vão induzir a expressão de ciclinas D; estas se associam às CDKs 4 e 6, que vão fosforilar proteínas da família de pRB. Essa fosforilação libera os fatores de transcrição E2F da repressão imposta por pRB. Os fatores de transcrição da família de E2F vão promover a expressão de diversas proteínas; entre elas, ciclina E. Estas ciclinas E recém sintetizadas vão se associar à CDK2 e a atividade desse complexo promove a completa fosforilação das proteínas pRB e conseqüente liberação total de E2F, que garante a síntese de outras proteínas necessárias à transição G1→S. Em seguida, também pela ação de E2F, os níveis de ciclina A aumentam. Esta se liga à CDK2 e promove a progressão até o final da fase S onde também se liga e ativa CDK1 para favorecer a entrada na mitose. Após isso os níveis de ciclina A caem e então ciclina B pode se associar à CDK1 e governar a progressão das células pela mitose (Revisado em; Malumbres & Barbacid, 2009).

As ciclinas D, e em especial ciclina D1 que é a mais explorada, de acordo com o quadro descrito acima, são responsáveis por conectar vias de sinalização ativadas por sinais externos, à maquinaria de controle do ciclo pela ativação das CDKs 4 e 6. Apesar disso, foi visto por nós e por

outros que essa ciclina pode, dependendo do contexto celular, desempenhar funções diferentes do tradicional controle de quiescência/proliferação. Atuando na manutenção da viabilidade celular em células Y1 (Matos *et al.*, em preparação); como oncogene adjuvante de Ras na transformação maligna de células de mama (Yu, 2001); ou ainda ativando CDK2/ciclina E, por seqüestrar o inibidor p27^{kip1} (Cheng *et al.*, 1998).

A atividade dos complexos ciclina/CDK também é modulada por uma classe de proteínas conhecidas como CKIs (*CDK Inhibitors*). De acordo com sua estrutura e também com os alvos, os CKIs são divididos em duas classes: a classe dos INK4 inclui p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d} e estes inibidores são caracterizados por se ligar apenas às CDKs 4 e 6 e não a outras CDKs ou mesmo às ciclinas D. A ligação desses inibidores às CDKs 4 e 6 inibe a ligação destas às ciclinas D e, conseqüentemente, sua atividade. Da outra classe de CKIs, conhecida como Cip/Kip, fazem parte as proteínas p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}. Estas são capazes de interagir tanto com ciclinas quanto com CDKs, e inibir a atividade dos complexos, no caso de complexos com CDK2; ou estimular tal atividade, no caso de CDKs dependente de ciclinas D (Sherr & Roberts, 1999).

Além da atuação dos CKIs, a atividade dos complexos ciclina/CDK também é modulada pela presença ou não de fosfatos ativadores ou inibidores no complexo. Essa regulação é especialmente importante no caso do complexo ciclina B/CDK1 que controla a mitose; onde a retirada

do fosfato inibidor do complexo é feita por uma fosfatase ativada pelo próprio complexo. Garantindo assim, o rápido disparo da atividade da quinase que é fundamental para a correta execução da mitose (Nurse, 1990; Lindqvist *et al.*, 2005).

Como vimos, o ciclo celular de células normais está finamente orquestrado para que os eventos ocorram em uma seqüência apropriada; e para garantir que isso aconteça, a célula dispõe de mecanismos de checagem em certos pontos do ciclo para se certificar de que as condições necessárias para progredir estão preenchidas. Caso contrário, a célula pode ativar mecanismos envolvendo as regulações que mencionamos acima. Existem 3 principais "*checkpoints*" onde isso acontece. O primeiro, antes da transição G1→S, verifica principalmente se o tamanho celular e o microambiente são favoráveis para que a célula se comprometa com um novo ciclo. O segundo, logo antes da mitose, verifica se a duplicação do DNA ocorreu corretamente. E o terceiro, durante a mitose, verifica se o fuso mitótico está devidamente montado para a separação correta dos cromossomos. Qualquer problema em um desses *checkpoints* leva a inibição dos complexos ciclina/CDK atuantes, e a parada no ciclo celular (Hartwell & Weinert, 1989).

Esse conjunto de proteínas apresentado representa a maquinaria de controle do ciclo celular; e por isso mesmo, alterações de expressão e/ou atividade de diversas dessas proteínas, estão relacionadas a diversos fenótipos tumorais.

1.4 - Respostas celulares a sinais externos

Em organismos multicelulares, cada uma das células precisa colaborar para a homeostase do tecido em que está inserida e, conseqüentemente, do organismo. Para isso, diferentes células possuem um diferente conjunto de receptores em sua membrana, para responder a hormônios, fatores de crescimento, morte ou sobrevivência que vão determinar o destino das células. Esses fatores podem chegar até as células-alvo pela circulação ou serem liberados pelas células vizinhas e até pela própria célula. Uma vez ligados à porção extracelular de seus receptores específicos de membrana, esses fatores vão disparar uma cascata de sinalização envolvendo moléculas adaptadoras, que vão transformar a ativação do receptor em ativação de proteínas intracelulares. Essa cascata vai culminar em indução de proliferação ou diferenciação, ou ainda morte celular entre outros processos.

O exemplo clássico dessa resposta celular é o disparo da transição G0/G1/S do ciclo celular, em células quiescentes, pelo mitógeno EGF (*Epidermal Growth factor*). Em células quiescentes, a cascata de sinalização disparada pela ligação de EGF aos seus receptores específicos de membrana, leva rapidamente à transcrição de genes de resposta primária das famílias Fos e Jun, que se dimerizam para formar o complexo AP-1 (Shaulian & Karin, 2002). Este complexo é o principal fator de transcrição responsável pelo aumento dos níveis de ciclinas D que, como vimos, é necessário para o início da progressão no ciclo.

Devido à importância fundamental destas vias de sinalização, muitos de seus componentes (oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor) são agentes causais na tumorigênese. Podemos destacar aqui o receptor de EGF, que se encontra superexpresso em certos carcinomas de pele entre outros tumores (Ozanne *et al.*, 1986). Essa superexpressão é importante para o crescimento da célula tumoral e, o bloqueio desse receptor por anticorpos monoclonais ou outros inibidores, inibe o crescimento dessas células (Mendelsohn, 2002).

Apesar das respostas classicamente observadas para diferentes sinais mitogênicos, um mesmo sinal pode gerar respostas completamente diferentes de acordo com o contexto celular. É o caso de FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) que, como será discutido nessa tese, pode desencadear respostas opostas em células normais e malignas (Costa *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 1998; Grose & Dickson, 2005).

1.5 – A via de MAPK

A via das MAPKs é sem dúvida uma das principais vias responsáveis por decodificar sinais externos em respostas celulares, entre elas a resposta mitogênica de células de mamíferos adultos (Brunet *et al.*, 1999). Na face interna da membrana plasmática, a proteína Ras na forma ativa é capaz de ativar a proteína Raf, que é a primeira quinase da via e vai fosforilar MEK 1/2; essas quinases por sua vez têm como substrato as quinases ERK 1/2. Uma vez fosforiladas, ERK 1/2 vão fosforilar no

citoplasma algumas quinases de proteínas ribossomais (RSKs), entre outras. Após migrarem para o núcleo, vão fosforilar diversos alvos; incluindo fatores de transcrição e o complexo AP-1; levando a ativação da transcrição de genes necessários para o disparo da entrada no ciclo (Revisado por Shaul & Seger, 2007).

A quinase Raf tem poucos substratos conhecidos além de MEK 1/2; e ERK 1/2 são os únicos substratos conhecidos de MEK 1/2. Sendo assim, ERK 1/2 são sem dúvida as quinases responsáveis pela diversidade de mecanismos modulados pela ativação de Ras gerada por sinais externos; uma vez que essas quinases possuem uma enorme gama de substratos nucleares e citoplasmáticos. Embora diferentes sinais externos através de diferentes receptores possam culminar em ativação de MEK 1/2, a intensidade e principalmente o tempo de tal ativação pode levar a resultados bastante diversos. E esses resultados variam é claro, em diferentes contextos e modelos celulares (Revisado por Chambard, 2007).

Obviamente, devido ao potencial estimulador da progressão no ciclo celular da via Raf-MEK-ERK, não é surpreendente que entre linhagens de células tumorais e tumores primários, mais de um terço apresentem ativação constitutiva de MEK (Hoshino *et al.*, 1999); ou que Raf está mutado em mais da metade dos melanomas (Davies *et al.*, 2002). Por causa disso, diversos esforços têm sido feitos para utilizar a inibição farmacológica dessa via no tratamento do câncer (Revisado por Roberts & Der, 2007).

1.6 - A via de PI3K-Akt

A via de PI3K-Akt está envolvida na regulação de diversos mecanismos relacionados aos controles de sobrevivência, crescimento, proliferação e motilidade celular. A sinalização através dessa via pode ser disparada tanto por receptores acoplados à proteína G, quanto por receptores com atividade de tirosina-quinase. As proteínas PI3K são quinases de lipídios que compõem uma grande família com diferentes isoformas e classes. No caso da classe IA, que é ativada por RTKs, essas quinases se apresentam na forma de um heterodímero, composto por uma sub unidade catalítica (p110) e uma sub unidade regulatória (p85). Os resíduos de fosfo-tirosina gerados pela ativação de RTKs recrutam diretamente a subunidade p85 através de seu domínio SH2; ou indiretamente através de proteínas adaptadoras. Uma vez ativada, PI3K vai fosforilar e converter lipídios de membrana PIP_2 em PIP_3 o que vai levar ativação da quinase Akt (também conhecida como PKB) (Revisado por Vivanco & Sawyers, 2002). Essa ativação é controlada principalmente pela ação da fosfatase PTEN, que atua nos lipídios de membrana fosforilados por PI3K. Essa fosfatase é tida como um dos mais importantes supressores de tumor em humanos e está freqüentemente mutada em certos tipos de câncer (Cantley & Neel, 1999).

A proteína Ras também é um importante ativador de PI3K (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994), e células que apresentam altos níveis de

Ras-GTP podem apresentar atividade elevada da via de PI3K-Akt (Forti *et al.*, 2002; Ramjaun & Downward, 2007).

A estimulação da atividade de mTOR por Akt relaciona diretamente a via de PI3K-Akt ao controle do crescimento celular. A proteína mTOR está no centro desse controle e, de acordo com sinais externos e também disponibilidade de nutrientes, sinaliza para o aumento da síntese protéica que caracteriza o crescimento celular (Fingar, 2002). Essa relação entre a via de PI3K-Akt e mTOR é especialmente importante porque altas taxas de síntese protéica estão relacionadas a fenótipos tumorais (Ruggero & Pandolfi, 2003). Dessa forma, tumores onde a via de PI3K-Akt está desregulada podem ser sensíveis a inibição de mTOR (Neshat, 2001; Wu *et al.*, 2005).

Além da estimulação da síntese protéica, a via de PI3K-Akt participa de diversos outros controles que, em caso de atividade não controlada da via, contribuem para fenótipos tumorais (Franke, 2008). Como por exemplo, a fosforilação por Akt de fatores de transcrição e outras proteínas envolvidas com a estimulação de apoptose, inibindo a atividade dessas proteínas e promovendo evasão à apoptose (Datta *et al.*, 1999).

1.7 - A proteína Src

A proteína Src é o membro original e mais conhecido da família Src de tirosina-quinases solúveis que possui outros 8 membros. Essa proteína

possui quatro domínios do tipo SH (*Src Homology*) que estão relacionados com o controle da atividade e também com a localização celular da proteína. A atividade de Src é controlada pela fosforilação de dois resíduos de tirosina presentes na molécula: o resíduo Tyr530 (em humanos) no C-terminal, quando fosforilado mantém a proteína numa conformação fechada e inativa; com a desfosforilação desse resíduo, a proteína assume uma conformação aberta e ativa, que agora pode se autofosforilar no resíduo Tyr419 levando a ativação total da proteína, e também fosforilar outras proteínas-alvo. Esta conformação aberta de Src também pode ser induzida por sinalização extracelular; uma vez que a ligação de Src a RTKs ativados promove tal ativação (Revisado por Yeatman, 2004).

A proteína Src ativada vai fosforilar diversos alvos, incluindo fatores de transcrição, proteínas adaptadoras e proteínas envolvidas com a adesão celular. A fosforilação desses alvos é responsável pelos efeitos da atividade de Src, que está relacionada com o controle do ciclo celular, e que inclui a estimulação de vias como as de MAPK e de PI3K-Akt; diminuição de adesão celular e aumento de motilidade (Courtneidge, 2003; Martin, 2001).

Src foi o primeiro proto oncogene descrito (Stehelin *et al.*, 1976), e também por isso é um dos mais estudados. Níveis elevados de expressão e principalmente atividade de Src têm sido encontrados em muitos tipos de câncer (Irby & Yeatman, 2000). Em especial, os tumores do trato gastrointestinal, em que maiores níveis de atividade de Src estão

relacionados a uma maior agressividade e pior prognóstico (Talamonti *et al.*, 1993). Experimentos utilizando a proteína Src viral v-Src, que apresenta ativação constitutiva, mostraram que a transformação celular por Src é mediada tanto por Ras-MAPK quanto por PI3K-Akt-mTOR (Penuel & Martin, 1999). A atividade aumentada de Src contribui de diversas maneiras para a progressão tumoral: pelas vias anteriormente descritas, estimula a sobrevivência e proliferação celular; diretamente ou através da ativação da proteína FAK, estimula a ruptura de junções aderentes, o *turnover* de adesões focais, a degradação de matriz extracelular e o aumento da motilidade celular, que em conjunto são necessários para o potencial invasivo e metastático das células malignas; através da fosforilação do fator de transcrição STAT3, estimula a expressão de VEGF que promove angiogênese (Revisado por Yeatman, 2004). Por tudo isso, a inibição farmacológica de Src vem sendo testada para inibir o crescimento de tumores, em que a atividade dessa proteína está aumentada (Golas *et al.*, 2003; Golubovskaya, 2003).

1.8 - A proteína Ras

As proteínas Ras fazem parte de uma superfamília de pequenas GTPases, e atuam como “chaves moleculares” em redes de sinalização intracelular. Em mamíferos, 3 genes codificam para 4 proteínas: N-Ras, H-Ras, K-Ras4A e K-Ras4B. As duas últimas por *splicing* alternativo. As proteínas Ras oscilam entre dois estados: quando ligadas a GTP elas estão

ativadas, e esta ativação dura até que o GTP seja hidrolizado à GDP pela ação GTPásica de Ras. Agora ligadas ao GDP, elas assumem uma conformação inativa; que permanece até que esse GDP seja trocado por um novo GTP. Esse ciclo é controlado por duas classes de proteínas: as GAPs (*GTPase-activating proteins*) que estimulam a atividade GTPásica de Ras (que normalmente é baixa), e com isso desativam a proteína; e as GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*), que estimulam a troca do GDP ligado por um GTP livre, e com isso são responsáveis pela ativação de Ras. A atividade de Ras depende também de sua localização celular; e são necessárias algumas modificações pós-traducionais para que Ras seja capaz de se ancorar a face interna da membrana plasmática e desempenhar suas funções (Revisado por Karnoub & Weinberg, 2008).

De maneira genérica, a ativação de Ras em resposta a sinais externos ocorre da seguinte forma: os resíduos de fosfo-tirosina de RTKs ativados pelo ligante vão, através de proteínas adaptadoras, recrutar as proteínas SOS que são GEFs de Ras e vão promover a ativação dessa proteína. Na forma ativa, Ras vai agora conectar a sinalização externa via RTKs, a vias efetoras intracelulares. A ativação de Ras resulta principalmente em uma bifurcação, onde Ras-GTP vai ativar tanto a via de MAPK, pela ativação de Raf; quanto a via de PI3K-Akt, pela ativação de PI3K. Tais ativações vão induzir sobrevivência e proliferação celular como vimos anteriormente. Além destas proteínas, Ras ativo também é capaz de ativar várias outras proteínas; e está envolvido em processos como

reorganização de citoesqueleto entre outros (Revisado por Malumbres & Barbacid, 2003).

Mutações com ganho de função de Ras estão presentes em aproximadamente 20% dos cânceres humanos; e a maior parte delas, cerca de 85%, atinge K-Ras. A mais clássica dessas mutações é a troca de uma glicina por uma valina no resíduo 12 de Ras. Essas mutações impedem que as GAPs induzam a hidrólise do GTP no Ras ativo; levando a acumulação de Ras-GTP (Downward, 2003). Além disso, mesmo a amplificação sem mutação de RAS leva a acumulação de Ras-GTP e suas conseqüências (Pulciani, 1985). Os resultados dessa ativação aberrante de Ras são, em células imortalizadas, a transformação maligna e manutenção do fenótipo tumoral. Entretanto, em células primárias, essa ativação tende a levar a bloqueio de crescimento e senescência induzida por oncogene (Revisado por Karnoub & Weinberg, 2008).

Os altos níveis de Ras-GTP são fundamentais para a transformação e manutenção do fenótipo tumoral de células em que esse é o oncogene predominante. Uma prova disso é que, freqüentemente, mesmo depois de todas as alterações genéticas e fenotípicas envolvidas na progressão tumoral, a inibição da atividade de Ras sozinha, é capaz de restringir a proliferação dessas células (Shirasawa *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2009). Esse fenômeno é conhecido como "*oncogene addiction*" e tem diversas implicações na busca de estratégias para o tratamento de tumores (Weinstein, 2002; Weinstein & Joe, 2008).

Embora Ras seja um dos oncogenes mais estudados, ainda estamos muito longe de conseguir formas de anular sua ativação aberrante, que possam ser usadas clinicamente. Algumas tentativas foram feitas inibindo etapas do processamento pós-traducional de Ras, e também bloqueando moléculas a montante e a jusante na sinalização de Ras (Karnoub & Weinberg, 2008). Entretanto, ainda sem grandes resultados; talvez devido ao fato de que essas proteínas estão envolvidas com uma grande diversidade de processos celulares e, muitas vezes, de maneira ainda não completamente esclarecida.

1.9 - FGF2: biologia, família e sinalização

O FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) ou bFGF (*Basic Fibroblast growth factor*) foi inicialmente isolado a partir de extratos de pituitária e descrito como um fator protéico de caráter básico, estimulador do crescimento de fibroblastos 3T3 (Armelin, 1973; Gospodarowicz, 1974). Mais de uma década depois, seu gene foi clonado (Abraham *et al.*, 1986). Hoje sabemos que o FGF2 é membro de uma família de fatores crescimento protéicos presentes entre os metazoários. Em humanos e camundongos, a família dos FGFs possui 22 membros (FGFs 1-14 e 16-23 em humanos; FGFs 1-18 e 20-23 em camundongos); que podem ser filogeneticamente divididos em 7 subfamílias (Itoh & Ornitz, 2004).

Embora alguns FGFs (11-14) sejam proteínas intracelulares que atuam de forma intrácrina, a maioria dos FGFs exerce sua função pela ligação e ativação dos receptores de FGF (FGFRs), que são do tipo RTK, presentes na membrana das células-alvo. Mais que as funções biológicas, que são bem diversificadas entre eles, os FGFs têm em comum a alta afinidade por glicosaminoglicanos, particularmente o heparan sulfato (HS) e a heparina. Na verdade, uma eficiente ligação e ativação dos receptores pelos FGFs, depende da interação e formação de um complexo entre FGF, receptor e HS numa estequiometria de 2:2:2 (Mohamaddi *et al.*, 2005). Quando ativados, os FGFRs vão se autofosforilar e ativar vias de sinalização intracelular classicamente ativadas por RTKs, como mencionado em seções anteriores. São quatro os RTKs de FGF em humanos, FGFR1-FGFR4; sendo que os FGFRs 1, 2 e 3 possuem duas isoformas cada, provenientes de *splicing* alternativo. A afinidade dos diferentes FGFs pelos diferentes receptores e isoformas varia muito; e a expressão dos receptores e isoformas também é diferencial entre os tecidos. Isso leva a uma regulação da atividade dos diferentes FGFs nos tecidos, de acordo com o conjunto de receptores expresso (Eswarakumar *et al.*, 2005). No caso de FGF2, sua maior afinidade é por FGFR1 IIIC, FGFR3 IIIC e FGFR4 (Ornitz *et al.*, 1996).

De maneira geral, as funções biológicas dos membros da família dos FGFs estão relacionadas ao desenvolvimento. Experimentos utilizando camundongos “*knock out*” para diferentes FGFs, têm resultado em diferentes fenótipos, que vão desde a letalidade embrionária até

alterações tecido-específicas no animal adulto. No caso específico de FGF2, camundongos “*knock out*” para essa proteína são viáveis, mas apresentam alterações cardiovasculares, ósseas e neuronais. Indicando a importância de FGF2 no desenvolvimento desses tecidos (Revisado por Itoh, 2007). No organismo adulto, FGF2 está envolvido em diversos processos; mas principalmente em sobrevivência, proliferação e diferenciação celular; além de cicatrização e angiogênese (Bikfalvi *et al.*, 1997).

Por ser um fator de crescimento que leva a ativação das vias classicamente ativadas por RTKs, não é surpreendente que FGF2 seja frequentemente implicado na estimulação de processos tumorais: superexpressão de FGF2 em fibroblastos 3T3 é capaz de malignizar as células (Sasada *et al.*, 1988); em gliomas, a superexpressão de FGF2 está relacionada ao grau de malignidade e vascularização do tumor (Takahashi *et al.*, 1992); FGF2 induz resistência à quimioterapia em células de câncer de pulmão (Pardo *et al.*, 2006); entre outros relatos (Para uma revisão: Groose & Dickson, 2005). Por outro lado, foi mostrado que FGF2 bloqueia a proliferação de células de neuroepitelioma (Smits *et al.*, 2000); e também que FGF2 induz morte celular em células de um sarcoma *in vitro* e *in vivo* (Sturla *et al.*, 2000); além destes e de outros relatos, nosso grupo mostrou em 2008, que FGF2 bloqueia a proliferação de células malignas dependentes de Ras de maneira irreversível (Costa *et al.*, 2008). Por tudo isso, o papel de FGF2 na biologia tumoral ainda não está claro. E esse quadro onde, de acordo com o contexto celular, FGF2 ora colabora

com o fenótipo tumoral, ora ataca esse fenótipo, sugere que esse fator pode estar revelando vulnerabilidades das células que apresentam uma resposta antiproliferativa a ele.

É importante destacar que atualmente existem exceções fundamentais às generalizações sobre estrutura, funções e mecanismos de ação dos FGFs sintetizadas acima. Recentemente, foi descoberto que os FGFs 21 a 23 possuem peculiaridades estruturais que os livram da afinidade por heparan sulfato (e heparina) e modificam a composição dos complexos que formam com os FGFRs. Devido a essas diferenças estruturais estes FGFs circulam na rede sanguínea como hormônios clássicos e exercem funções sistêmicas no controle do metabolismo de açúcares, lípidos e sais (Ogawa *et al.*, 2007; Urakawa *et al.*, 2006). O impacto potencial destas descobertas é enorme, mas estas novidades não serão exploradas neste texto por não terem implicações próximas ao tema focal desta tese.

1.10 - A resposta a dano no DNA (DDR)

O princípio da progressão tumoral é caracterizado pelo aumento da atividade de proteínas com potencial oncogênico. Esse aumento, apesar de conferir vantagem proliferativa a essas células, vai levar a uma situação de estresse; onde só as células que conseguirem adquirir novas modificações, para se adaptarem a essa nova situação vão progredir. Esse estresse que é responsável pela senescência induzida por oncogene, e que

funciona como uma barreira para o início da tumorigênese; pode envolver diferentes mecanismos de acordo com modelo celular (Sarkisian *et al.*, 2007; Courtois-Cox *et al.*, 2006). Entretanto, a resposta a dano no DNA (DDR – DNA Damage Response) tem surgido como um dos principais mecanismos envolvidos na montagem dessa barreira (Di Micco *et al.*, 2006; Bartkova *et al.*, 2006). A proliferação aumentada induzida pela ativação de oncogenes, muitas vezes vem acompanhada de um controle deficiente da maquinaria de replicação, levando ao surgimento de estruturas aberrantes de replicação e/ou quebras na dupla fita de DNA, que vão ativar a DDR (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005).

Resposta a dano no DNA é o nome dado ao conjunto de mecanismos que as células dispõem para, identificar, sinalizar para o reparo ou impedir a propagação de eventuais injúrias no DNA, causadas por diferentes mecanismos. Esta resposta se inicia pela ativação das quinases ATM e ATR, que vão fosforilar e ativar as quinases efetoras Chk1/Chk2 (*Checkpoint kinases 1/2*). O resultado de tais ativações é a diminuição da atividade de complexos ciclina/CDK através de diferentes mecanismos; alguns deles envolvendo a ativação de p53 e indução de expressão de p21. Essa inibição das CDKs vai levar a um atraso no ciclo, dando tempo para que o dano seja reparado; ou a um bloqueio definitivo nos *checkpoints*, acompanhado ou não de morte celular, impedindo que o dano seja passado à diante. Outro ponto importante dessa resposta é a fosforilação da histona H2AX no local do dano, que é um clássico

marcador de DDR, e promove o recrutamento de fatores de reparo para o local (Revisado por Harper & Elledge, 2007).

Cada vez mais, a importância da DDR na biologia tumoral vem sendo discutida. E a ativação dessa resposta no início da tumorigênese, restringe a progressão de certas células, mas também impõe uma pressão seletiva para a evasão a mecanismos que controlam a fidelidade de transmissão do genoma. Contribuindo assim para a instabilidade genômica tão importante para a progressão tumoral. Tumores em estágios mais avançados freqüentemente apresentam atenuação da DDR em relação às fases iniciais do tumor (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005); e a reativação dessa resposta em tumores avançados pode ter efeitos terapêuticos interessantes.

1.11 - Homeostase de proteínas: um "calcanhar de Aquiles" de células malignas

A aquisição e manutenção de um fenótipo tumoral conferem vantagem proliferativa à célula maligna frente às células normais. Entretanto, também impõem ou no mínimo acentuam nessas células, certos estresses que estão ausentes ou presentes de maneira muito moderada em células normais. Entre eles estão o estresse oxidativo, que inclusive contribui para o estresse replicativo comentado na seção anterior; e o estresse proteotóxico. O aumento das taxas de proliferação, e também o variado grau de aneuploidia presente nas células tumorais,

vão levar a um desbalanço da produção e comprometimento do dobramento molecular das cadeias peptídicas das proteínas (Revisado por Luo *et al.*, 2009). Esse desbalanço é obviamente tóxico para a célula e quando isso ocorre, é ativada uma resposta conhecida como UPR (*Unfolded Protein Response*). Esta resposta está freqüentemente ativada em tumores, e parece ter um papel importante na progressão tumoral, garantindo a viabilidade celular frente ao estresse proteotóxico (Dai *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2007; Revisado por Walter & Ron, 2011).

A ativação da UPR, também fisiologicamente leva a uma resposta adaptativa mediada pelas proteínas IRE1, ATF6 e PERK, que vai levar à diminuição da síntese de proteínas, aumento da capacidade de processamento de proteínas no retículo e aumento da degradação de proteínas. Caso o nível de estresse seja insuportável, é desencadeado pela própria UPR um processo de morte celular para eliminar essa célula comprometida (Revisado por Ron & Walter, 2007).

Células normais ativam UPRs apenas para “tamponar” situações pontuais de estresse causado, por exemplo, por alterações do microambiente. Diferentemente, muitas células malignas apresentam uma ativação constitutiva da UPR; e por causa de seu fenótipo tumoral, muitas vezes dependem dessa ativação para manter seu estresse proteotóxico em níveis aceitáveis para a viabilidade celular (Dai *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2007). Diante disso, essa já parcialmente comprometida homeostase de proteínas que essas células tumorais apresentam, pode

funcionar como um verdadeiro “calcanhar de Aquiles” nessas células. Inclusive, foi mostrado que a inibição da degradação de proteínas (Obeng *et al.*, 2006); ou a inibição da atividade de chaperonas do retículo (De Raedt *et al.*, 2011), resultam em morte de células malignas. Sendo assim, é bem provável que outras estratégias que levem ao desequilíbrio desta homeostase apresentem resultados semelhantes. Fornecendo um caminho promissor para a terapia do câncer.

1.12 - Morte e vida celular

Todas as células vivas, normais, imortalizadas ou malignas, são freqüentemente expostas a uma diversidade de estresses endógenos ou exógenos. Os resultados desses estresses variam desde a recuperação rápida e total, até a morte celular. Naturalmente, o desfecho da estória vai depender do contexto celular e da natureza e intensidade do estresse. Como estresse celular é tema recorrente nessa tese, vale a pena discorrer sobre alguns dos desfechos possíveis nesse tipo de situação.

A senescência é um processo de parada irreversível da progressão no ciclo celular. Diferente do estado de quiescência (G0), onde a célula é capaz de responder a estímulos e voltar a proliferar, a senescência é caracterizada por alterações da cromatina e alta expressão de proteínas inibidoras do ciclo, levando a um arrestamento permanente do ciclo. A senescência pode ser induzida por encurtamento dos telômeros, como é geralmente o caso da chamada senescência replicativa; e pode ser

induzida também pelo aumento da atividade oncogênica em determinadas células; no processo chamado de senescência induzida por oncogene. Além disso, muitos outros estresses, especialmente genotóxicos, podem levar as células à senescência. A senescência muitas vezes funciona como um mecanismo protetor contra a tumorigênese, e por isso mesmo é freqüente a busca por mecanismos para induzir senescência em células tumorais (Revisado por Nardella *et al.*, 2011).

Caso as injúrias levem a morte celular, essa morte pode ocorrer por diferentes mecanismos:

- A apoptose pode ser disparada por dano no DNA, estresse proteotóxico, entre outras injúrias. Uma vez disparada, a execução do processo envolve a perda da integridade da mitocôndria, com liberação de proteínas que vão ativar a proteólise celular e fragmentação do DNA, por mecanismos dependentes e independentes de caspases. Diversas terapias contra o câncer visam induzir apoptose nas células tumorais (Revisado por Chipuk & Green, 2005).

- A morte celular autofágica é morfologicamente caracterizada pela intensa vacuolização do citoplasma. A autofagia tem um papel importante como mecanismo de sobrevivência em certas condições de estresse. Mas também parece ser responsável pela eficácia da quimioterapia em certas células tumorais resistentes à apoptose. Sendo assim, o termo morte celular autofágica é recomendado para processos de morte que possam

ser efetivamente inibidos pela inibição da autofagia (Revisado por Kroemer & Levine, 2008).

- A necrose é caracterizada por queda dos níveis de ATP e ruptura da membrana plasmática; e por muito tempo foi vista apenas como uma morte celular que ocorria de maneira desordenada, e sem empregar os mecanismos envolvidos com a execução da apoptose ou da morte celular autofágica. Hoje em dia sabemos que a necrose também ocorre de maneira controlada, com participação de proteínas específicas e pode inclusive substituir outros mecanismos de morte em caso de inibição destes (Revisado por Golstein & Kroemer, 2007).

- A catástrofe mitótica, ora é descrita como uma morte celular que ocorre durante a mitose; ora é vista como uma morte celular que ocorre devido a uma mitose aberrante, e é executada ainda na mitose ou após ela. Entretanto existem evidências que indicam que a catástrofe mitótica, não é na verdade uma modalidade de morte celular, e sim um pré-estágio de uma morte celular que vai ocorrer por necrose e/ou apoptose. Funcionando assim como um mecanismo protetor contra erros na mitose (Revisado por Vakifahmetoglu *et al.*, 2008).

- A *entosis* é um tipo bastante peculiar de morte celular onde uma célula engloba completamente a célula vizinha. Embora o destino da célula englobada nem sempre seja a morte, a *entosis* pode ser considerada uma modalidade distinta de morte celular, porque a célula englobada muitas vezes morre pela ação do lisossomo da célula hospedeira, e sem envolver

mecanismos de outros tipos de morte celular. Esse processo, que não envolve fagócitos profissionais, tem sido observado em algumas linhagens tumorais, e parece depender da perda de interação da célula com a matriz extracelular (Overholtzer *et al.*, 2007).

- A *anoikis* é um tipo de morte celular disparada em células aderentes pela perda da adesão à matriz extracelular. Uma vez disparada, essa morte celular ocorre por apoptose. Células tumorais adquirem durante a progressão maligna a habilidade de crescer na ausência de substrato sólido. Sendo assim, compreender os mecanismos envolvidos no disparo desse tipo de apoptose, e a maneira com que células malignas conseguem desativar tais mecanismos pode ser de grande valor terapêutico (Frisch & Francis, 1994; revisado por Frisch & Screaton, 2001).

Naturalmente, apesar de existirem diferentes tipos de morte celular, que se utilizam de diferentes mecanismos de execução, muitas vezes a morte celular disparada por um determinado estresse envolve a participação, em menor ou maior grau, de mais de um desses mecanismos. Esses e outros mecanismos de morte celular foram competentemente discutidos em um artigo publicado durante a escrita dessa tese, que fornece definições moleculares e recomendações de nomenclatura para diferentes tipos de morte celular (Galuzzi *et al.*, 2012).

2 – OBJETIVOS

Já há muitos anos, os mecanismos de controle do ciclo celular, bem como sua desregulação patológica, têm sido o principal foco do nosso laboratório. Nesse sentido, diversos esforços foram feitos ao longo desses anos, utilizando principalmente os fatores peptídicos ACTH, AVP e FGF2, para “desconstruir” módulos de sinalização intracelular e sua regulação (Lotfi & Armelin, 2001, Lotfi *et al.*, 2000, Lepique *et al.*, 2000 e 2004, Forti *et al.*, 2000, 2002 e 2006, Schwindt *et al.*, 2003, Rocha *et al.*, 2003; Forti & Armelin, 2007 e 2011 entre outros). Durante esse tempo, nos deparamos com um inesperado efeito antiproliferativo disparado por FGF2, um clássico mitógeno, em células malignas dependentes de Ras (Costa *et al.*, 2004 e 2008).

Mutações com ganho de função de Ras estão presentes em aproximadamente 20% dos cânceres humanos. E altos níveis de Ras-GTP são indispensáveis para a progressão, e freqüentemente para a manutenção do fenótipo tumoral. Apesar de esse ser um dos oncogenes mais estudados, o tratamento de tumores que apresentam alta atividade de Ras ainda é muito ineficaz; e direcionado a alvos a montante e a jusante de Ras, dada a dificuldade em inibir clinicamente a própria Ras (Young *et al.*, 2009).

A atividade aumentada de Ras cria fenótipos malignos que têm grandes vantagens proliferativas e de sobrevivência frente às células normais. Mas é também bastante provável que esses fenótipos

apresentem certas vulnerabilidades ausentes nas células equivalentes normais. Dessa forma, cada vez mais a busca por maneiras de impedir a progressão de tumores que apresentam altos níveis de Ras-GTP, está focada na identificação de vulnerabilidades específicas dessas células (De Raedt *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011; Singh & Settleman, 2009).

No trabalho publicado em 2008, mostramos que FGF2 bloqueia irreversivelmente o ciclo celular nas linhagens testadas. Esse bloqueio depende necessariamente da presença altos níveis de Ras GTP; e a redução desses níveis protege as células do efeito tóxico de FGF2 (Costa *et al.*, 2008). Diante desse quadro, é bastante provável que FGF2 esteja atingindo uma dessas vulnerabilidades Ras-específicas. E entender mecanisticamente essa relação entre a atividade aumentada de Ras e o efeito tóxico de FGF2, é potencialmente muito importante, pois pode ter promissoras implicações na terapia do câncer.

Tendo este quadro geral como base, os objetivos do trabalho apresentado nessa tese foram:

- Caracterizar os efeitos de FGF2 na dinâmica de progressão no ciclo celular; incluindo a determinação do ponto, ou possíveis pontos, de bloqueio do ciclo causado por FGF2 em modelos de células malignas dependentes de Ras.

- Determinar o mecanismo por trás desse efeito tóxico de FGF2, que expõe uma vulnerabilidade de células malignas dependentes de Ras, e cujos mecanismos moleculares são ainda obscuros.

Para isso, utilizamos a linhagem murina adrenocortical tumoral Y1, que superexpressa a proteína K-Ras e por isso apresenta altos níveis de Ras-GTP; e principalmente a sub-linhagem Y1 D1G, também maligna e que também apresenta altos níveis de Ras-GTP. Ambas serão descritas a seguir.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Cultura de células

As linhagens celulares utilizadas fazem parte do banco de células que nosso laboratório mantém sob congelamento em tanques contendo nitrogênio líquido. Sempre que necessário, uma alíquota (*vial*) de cada uma das linhagens foi descongelada rapidamente em banho-maria a 37°C e, imediatamente após descongelar, o conteúdo de cada um dos *vials* foi colocado em uma garrafa de poliestireno, própria para cultura celular. No caso da linhagem Y1, foi adicionada a cada uma das garrafas a quantidade necessária de meio de cultura DMEM 10%FCS (Meio DMEM suplementado com 1,2 g/l de NaHCO₃, 25 mg/l de ampicilina, 100mg/L de sulfato de estreptomicina e 10% de FCS) e, no caso das sub-linhagens Y1 D1, foi utilizado um meio de manutenção (DMEM 10%FCS + 100µg/ml de geneticina) a fim de manter a pressão seletiva. As células foram acondicionadas na estufa a 37°C numa atmosfera com 5% de CO₂ e, após a adesão das células à garrafa, o meio de cultura foi substituído por meio fresco previamente aquecido para a retirada do DMSO presente no meio de congelamento. Realizado este procedimento as células voltam para a estufa para o crescimento da população celular. Durante o crescimento celular o meio de cultura foi renovado a cada 2 ou 3 até que as células atingissem a confluência necessária para realização dos experimentos e/ou sub cultivo. Nesse ponto, após a retirada do meio de cultura, as células foram lavadas com PBSA e liberadas da garrafa por tripsinização

permitindo assim o sub cultivo e/ou plaqueamento para realização dos ensaios desejados.

No caso de experimentos que necessitavam de carenciamento, ou seja, privação de soro a fim de sincronizar as células na fase G0 do ciclo celular, as células foram plaqueadas em meio com FCS e deixadas para adesão *overnight*. No dia seguinte, o meio de cultura foi retirado e as placas foram lavadas 2x com PBS e 1x com DMEM sem FCS. Após esse procedimento, as células foram mantidas em DMEM sem FCS por 48 horas antes do início de qualquer experimento.

3.2 - Extração e quantificação de proteínas totais

Para a extração de proteínas totais, as células foram plaqueadas em placas p100 e submetidas às condições de tratamentos e estímulos indicadas em cada caso. Encerrado o tempo de tratamento, as placas foram retiradas da estufa, lavadas com PBS gelado e foi adicionado a cada placa 1ml de RIPA (*Cell signaling*) + inibidores (2,5mM pirofosfato de sódio; 1mM β -glicerofosfato; 1mM ortovanadato de sódio; 2 μ g/ml leupeptina; 2 μ g/ml pepstatina; 2 μ g/ml aprotinina; 1mM PMSF) (*Sigma*). As placas foram deixadas sobre gelo por 5 minutos e então raspadas para coleta dos lisados celulares com o auxílio de um raspador de células. Após completa homogeneização, os lisados foram transferidos para tubos *ependorf*[®] e incubados no gelo por 10 minutos. Decorrido esse tempo, os lisados foram centrifugados por a 4°C em microcentrífuga a 14000 RPM

por 10 minutos. Após isso, cada sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo *ependorf*[®] e congelado a -20°C até sua utilização. Uma alíquota de 10µl de sobrenadante foi utilizada para a quantificação dos lisados que foi realizada por espectrofotometria utilizando o reagente Bradford (BioAgency).

3.3 - SDS-PAGE e Western blot

Para as medidas de expressão relativa de proteínas por *Western blot*, uma alíquota equivalente a 100µg de proteína de cada um dos lisados a serem analisados, foi transferida para um novo tubo previamente resfriado em gelo e misturada ao tampão de amostra para proteínas. Posteriormente, as amostras foram incubadas a 100°C por 10 minutos para completa desnaturação das proteínas, e em seguida retornadas ao gelo. Realizado esse procedimento, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida (10-15% conforme o caso), juntamente com um padrão de peso molecular, e submetidas a uma corrida eletroforética a 40-70V *overnight* para a devida separação das proteínas. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram submetidas a uma transferência em cuba do tipo semi-seca passando assim para uma membrana de nitrocelulose *Hybond C-Extra* (Amersham-Pharmacia). A eficiência e homogeneidade da transferência foram avaliadas pela coloração da membrana com o reagente Ponceau-S. Após a descoloração da membrana por lavagens com TBS-T, a membrana foi bloqueada, ou

seja, incubada em uma solução de leite desnatado a 5% em TBS-T durante uma hora, visando prevenir ligações inespecíficas quando da adição dos anticorpos. Ao final do bloqueio, a membrana foi lavada com TBS-T sob agitação para retirar o excesso de leite e, em seguida, incubada *overnight* com o anticorpo primário específico para a proteína a ser analisada, diluído em uma solução de BSA a 5% em TBS-T em concentrações indicadas em cada caso. Ao final dessa incubação, a membrana foi lavada com TBS-T (3 vezes de 10 minutos sob agitação) e agora incubada por uma hora com um anticorpo secundário, conjugado à enzima peroxidase, e capaz de ligar-se ao anticorpo primário utilizado. Decorrido esse tempo, a membrana foi novamente lavada com TBS-T para a retirada do excesso de anticorpos e, para a detecção das proteínas desejadas, utilizamos o kit *ECL Plus Western Blotting Detection System* (*GE healthcare*[®]) de acordo com o protocolo do fabricante para sensibilizar filmes fotográficos permitindo a análise da expressão das proteínas de interesse.

3.4 - Ensaios clonogênicos

Para a realização dos ensaios clonogênicos, utilizamos placas de 60mm onde foram plaqueadas 1000 células por placa juntamente com os estímulos e/ou inibições indicados em cada caso em meio DMEM 10%FCS. Sempre que necessário, os inibidores foram adicionados 30 min. – 1 hora antes dos estímulos visando melhorar a eficácia da inibição. Após o

plaqueamento, as células foram incubadas na presença dos estímulos e/ou inibidores por 24 horas na estufa. Decorrido este tempo, as placas foram lavadas 2x com PBS e 1x com DMEM 10%FCS para retirar completamente os tratamentos e deixadas para crescimento na estufa em meio DMEM 10%FCS. O meio de cultura foi trocado a cada 2 ou 3 dias até o surgimento de colônias visíveis a olho nu (13- 18 dias). Nesse ponto, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído a 3,7% por 10 minutos, e em seguida coradas com uma solução de cristal violeta novamente por 10 minutos. Após lavagem das placas, as colônias foram contadas para determinar alterações da viabilidade da população celular causadas pelo tratamento ocorrido nas 24 horas iniciais.

3.5 - Curvas de crescimento

Para a realização das curvas de crescimento as quantidades de células indicadas para cada caso foram plaqueadas em placas de 35mm, utilizando meio completo já contendo os estímulos e/ou inibidores utilizados em cada caso. A exemplo do ocorrido nos ensaios acima, caso necessário os inibidores foram adicionados 30 min. – 1 hora antes da adição dos estímulos. Nos experimentos onde a havia a necessidade de sincronizar a população celular antes do início da curva, as células foram plaqueadas apenas em meio completo e incubadas *overnight* para adesão à placa. No dia seguinte então, as células foram carenciadas da forma

anteriormente descrita e só depois disso é que os estímulos e/ou inibições foram adicionados, sendo este considerado o tempo zero. Decorrido o devido tempo de estimulação, as células foram retiradas da estufa, lavadas com PBS-A previamente aquecido a 37°C e liberadas da placa utilizando 300µl de uma solução de tripsina. Em cada placa, foram adicionados à suspensão de células 600µl de PBS e, após completa homogeneização, a suspensão foi transferida para um tubo *ependorf*[®] contendo 100µl de formaldeído a 37% e novamente homogeneizada. As células agora fixadas foram posteriormente contadas e analisadas quanto ao seu tamanho utilizando o contador de partículas *Z2 Coulter Counter*[®] (*Beckman*).

3.6 - Ensaios de incorporação de timidina tritiada (³HTdR)

Para as medidas de velocidade relativa de síntese de DNA por incorporação de timidina tritiada, foram utilizadas placas *Multiwell* de 24 *wells* onde foram plaqueadas 5×10^4 células/*well*. As células foram incubadas *overnight* para adesão e, em seguida, foram adicionados os estímulos necessários a cada caso, sendo esse considerado o tempo 0. Nos experimentos em que havia a necessidade de sincronizar as células em G0, após a adesão *overnight*, as células foram carenciadas por 48 horas como previamente descrito e só então estimuladas. O mix de timidina (1µCi/ml timidina tritiada + 10^{-8} M timidina não radioativa) foi adicionado nos tempos indicados em cada caso. Decorrido o tempo de

estimulação, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas com TCA 10% por 20 minutos e, após a retirada do TCA, lisadas com NaOH 0,5M a 60°C por 30 minutos. Estes lisados foram então transferidos para pedaços de filtro de papel que foram lavados subseqüentemente com TCA 5%, etanol 70% e acetona e posteriormente colocados para secar em estufa por 2 horas. Os filtros já secos foram colocados em frascos apropriados contendo 5ml de líquido de cintilação e em seguida analisados em um contador de cintilação líquida.

3.7 - Citometria de fluxo

Para os experimentos de citometria de fluxo, as células foram plaqueadas em placas p60mm e cultivadas até atingirem aproximadamente 50% de confluência. Neste ponto as células foram, quando necessário, carenciadas por 48 horas e então estimuladas de acordo com o descrito em cada caso. Decorrido o devido tempo de estimulação, as placas foram lavadas 2X com PBSA, as células liberadas da placa por tripsinização e as suspensões lavadas 2X com PBS. Para fixação em etanol 75%, cada *pellet* foi ressuspendido em uma parte de PBS gelado e em seguida foram adicionadas de maneira subseqüente três partes de etanol absoluto gelado e as células foram mantidas a 4°C por pelo menos 12 horas.

Para a marcação de DNA total, as células fixadas foram lavadas 2X com PBS e então ressuspendidas em uma solução 50µg/ml de iodeto de

propídio (PI) (*Invitrogen*[®]) contendo 50µg/ml de RNase A. As amostras foram incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz; e então lidas no citômetro.

Nos casos de dupla marcação, conteúdo de DNA total X incorporação de BrdU, as células fixadas foram lavadas 2X com PBS e em seguida incubadas no escuro por exatos 20 minutos em uma solução de HCl 2M contendo 0,5% de tween 20 para permeabilização da célula e desnaturação do DNA. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas seqüencialmente com 0,1M tetraborato de sódio e PBS. Após isso, as células foram incubadas com 2µg/ml de *Alexa Fluor*[®] 488 anti-BrdU por 90 minutos, protegidas da luz e sob leve agitação. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas e o *pellet* ressuspendido em uma solução de PI como descrito acima. A fluorescência verde do *Alexa Fluor*[®] 488 e a vermelha do PI foram então medidas no citômetro utilizando os filtros apropriados.

Para as medidas de histona H3 fosforilada, as células fixadas foram lavadas 2X com TBS, permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 em TBS por 5 minutos e lavadas novamente com TBS. Em seguida, as amostras foram bloqueadas com 1% BSA em TBS por 15 minutos a temperatura ambiente e, após nova lavagem com TBS, incubadas com 2µg/ml de *Anti-phospho-histone H3 (ser10)* por 90 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas com TBS, incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário *Alexa Fluor*[®] 488 goat anti-Mouse e em

seguida lavadas novamente com TBS. Nesse ponto, o *pellet* foi ressuspenso em uma solução de PI como anteriormente descrito e as amostras lidas no citômetro.

No caso das análises de exclusão de PI, decorrido o tempo de tratamento, as placas foram lavadas e as células tripsinizadas. As suspensões de células foram então lavadas com PBS, ressuspendidas em uma solução de PI 8µg/ml, e analisadas no citômetro. (*FACSCalibur* e *FACSAria BD Biosciences*).

3.8 - Determinação de proteínas totais/célula

Para as análises de proteínas totais/célula, 3×10^5 células foram plaqueadas em placas p35, deixadas para adesão *overnight*, e carenciadas como anteriormente descrito. Após o carenciamento, o meio de cultura foi traçado e os estímulos e/ou inibidores foram adicionados pelos tempos indicados em cada caso. Quando necessário, os inibidores foram adicionados uma hora antes dos estímulos. Decorrido o tempo de estimulação, 6 placas de cada condição foram retiradas da estufa. 3 delas foram tripsinizadas, fixadas e contadas individualmente de acordo com o que foi descrito acima para os experimentos de curva de crescimento; as outras três tiveram suas células lisadas com 200µl de RIPA + inibidores de protease, e esses lisados foram quantificados individualmente utilizando o reagente de Bradford. A determinação da quantidade média de proteínas/célula em cada condição foi obtida através da divisão da

quantidade média de proteínas/placa (triplicata), pela quantidade média de células por placa na mesma condição (triplicata).

3.9 - Microscopia

Para as análises de microscopia, as células foram plaqueadas em lamínulas de 18 X 18mm para uma confluência de aproximadamente 60%, incubadas *overnight* para adesão, e em seguida carenciadas como anteriormente descrito. Após o carenciamento, as células foram estimuladas nas condições e tempos descritos na figura. Decorrido o tempo de estimulação, as lamínulas foram lavadas 2x com PBS e fixadas em formaldeído 3,7% em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. Após isso, as células foram permeabilizadas por 10 minutos com Triton X-100, lavadas 2X com PBS e tratadas com 10mg/ml de RNase por 30 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem, as células foram incubadas por uma hora com faloidina conjugada a *Alexa Fluor*[®] 488 (*Invitrogen*[®]) na concentração de 7,5µM em câmara escura e úmida. Decorrido esse tempo, as lamínulas foram lavadas e as lâminas foram montadas com 4µl de iodeto de propídio para marcação dos núcleos e 9µl do *anti-fading Vectashield*[®] (*Vector*).

As células foram analisadas ao microscópio confocal *Zeiss LCM 510* com fatiamentos óticos no eixo Z e reconstrução de imagens em 3D, utilizando o *software* que acompanha o equipamento.

3.10 - Análise proteômica

A extração e quantificação de proteínas totais foram feitas com anteriormente descrito. Após isso, para cada amostra, 100 µg de proteínas foram separados e precipitados com uma mistura de acetona/metanol 8:1. A digestão por tripsina em solução foi realizada para cada amostra conforme o protocolo descrito por Kleifeld *et al.* (2010). Para a remoção de resíduos de sais e detergentes, as amostras foram submetidas a uma coluna de troca catiônica (*OASIS MCX, Waters*). Seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante. Após dessalinização, os eluatos foram ressuspensos em 50 µL de ácido fórmico 0,1% para a análise de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (*LC-MS/MS*).

Cada mistura de peptídeos foi submetida à cromatografia líquida de fluxo nanométrico, utilizando coluna C-18 capilar de 100µm x 100mm (*Waters*), num fluxo de 600 nl/min. Foi utilizado um espectrômetro do tipo Quadrupolo-Tempo de Vôo com fonte de ionização *nanospray (Q-ToF Ultima, Waters)*. O espectrômetro foi ajustado para operar com um tempo de exclusão dinâmica de 90 segundos (para diminuir a aquisição repetitiva de um mesmo valor de *m/z*). As amostras foram analisadas em quadruplicata.

Para o processamento dos espectros, os dados brutos (*Raw files*) referentes às análises de *MS/MS* foram processados utilizando o programa *ProteinLynx™* versão 2.3 (*Waters*). Os arquivos resultantes foram

utilizados para buscas em bancos de dados e identificação de proteínas utilizando o programa *Mascot* (*Matrix Science*), acessado através de um servidor instalado no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (*Mascot Server* versão 2.2). Utilizamos o banco não-redundante de proteínas do *SwissProt* (*SwissProt database* - www.uniprot.org) e restringimos o universo de busca à taxonomia **Rodentia**, que contava com 148.545 seqüências (depositadas na data 11 de Novembro de 2011). Os resultados das buscas com o algoritmo *Mascot* foram submetidos ainda a uma segunda análise, utilizando o programa *Scaffold*TM 3 versão 3_00_01 (*Proteome Software Inc.*) (Searle, 2010).

Para estimativa da taxa de falsos positivos, um banco de dados foi elaborado por meio da ordenação reversa e randômica das seqüências presentes no nosso banco de dados original (*Rodentia*). De acordo com os parâmetros de busca utilizados, as taxas de falsos positivos calculadas para os experimentos de *LC-MS/MS* foram $\leq 1\%$.

A quantificação relativa dos peptídeos presentes nas amostras foi feita utilizando o programa *Scaffold*TM 3 versão 3_00_01 (*Proteome Software Inc.*) com base no método de contagem de espectros (*spectral count*), conforme descrito por Liu *et al.* (2004). A quantificação relativa é obtida pela observação do número de espectros de *MS/MS* que resultaram na identificação de uma determinada proteína e a comparação deste número em relação àquele obtido em diferentes condições experimentais.

3.11 - Linhagens celulares

As células Y1 são derivadas de tumor funcional do córtex adrenal de camundongo (Yasumura *et al.*, 1966). Foram obtidas da *American Type Culture Collection (Rockville, MD)* expandidas e mantidas em nossos bancos de células. Possuem amplificação do proto-oncogene c-Ki-ras, e por conta disso apresenta altos níveis basais de K-Ras na forma ativada (K-ras-GTP) (Schwab *et al.*, 1983; Kimura & Armelin, 1988).

As sub-linhagens Y1 D1 foram engenheiradas através de transfecção estável de células Y1 para superexpressar ciclina D1. Essas células mantêm a amplificação de c-Ki-ras e a malignidade observada na linhagem Y1 (Schwindt *et al.*, 2003; Matos *et al.*; manuscrito em preparação).

Os clones Y1 e Y1 D1G resistentes a FGF2 (FRs: FGF2-Resistente) foram obtidas através do cultivo das linhagens em meio com FGF2 até o surgimento de clones capazes de proliferar na presença desse fator. Tais clones apresentam baixa tumorigenicidade, freqüentemente deixam de superexpressar K-Ras, e passam a depender de FGF2 para proliferar (Érico T. Costa, 2005 tese de doutorado; Tatiana G. F. Matos, tese de doutorado, 2007).

3.12 - Anticorpos

* Anti-fosfo-histona H3 (Ser10), Millipore™ Cat #05-806

- * Anti- γ H2A-X (Ser139), *Cell signaling*[®] Cat #2577
- * Anti-fosfo-p53 (Ser15), *Cell signaling*[®] Cat #9284
- * Anti ciclina A, *Santa Cruz Biotechnology* Cat SC-596
- * Anti ciclina D1, *Santa Cruz Biotechnology* Cat SC-20044
- * Anti ciclina E, *Santa Cruz Biotechnology* Cat SC-481
- * Anti p21, *Santa Cruz Biotechnology* Cat SC-6246
- * Anti actina, *Santa Cruz Biotechnology* Cat SC-10731
- * Anti HPRT, *Santa Cruz Biotechnology* Cat SC-20975
- * *Goat anti-rabbit* conjugado a peroxidase, KPL Cat 474-1506
- * *Goat anti-mouse* conjugado a peroxidase, KPL Cat 04-18-06
- * Anti BrdU conjugado a *Alexafluor*[®]488, *Invitrogen*[®] Cat B35130
- * *Goat anti-mouse* conjugado a *Alexafluor*[®]488, *Invitrogen*[®] Cat A11001

3.13 - Inibidores

- * Receptor de FGF: PD 173074 (*Sigma*)
- * MEK: PD 98059 (*Sigma*)
- * PI3K: LY 294002 (*Sigma*)

* Src: PP1 (*Calbiochem*)

4 - RESULTADOS

4.1 - As sub-linhagens Y1 D1 apresentam um controle estrito de quiescência/proliferação em função da concentração do soro no meio de cultura; e permanecem tão sensíveis quanto a linhagem Y1 aos efeitos tóxicos de FGF2

Desde que a explicação mecanística para o efeito antiproliferativo de FGF2 sobre células malignas Y1 passou a ser um dos principais focos de nosso laboratório, a análise da transição através das fases de ciclo celular, bem como a determinação do ponto, ou possíveis pontos, de parada no ciclo em função da ação do FGF2 tornaram-se imprescindíveis. Nesse sentido, alguns dados, publicados ou ainda em preparação, foram produzidos em nosso grupo demonstrando que nas linhagens malignas Y1, FGF2 é capaz de disparar a transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$, mas posteriormente leva a um bloqueio do ciclo celular na fase S (Costa *et al.*, 2008; Salotti & Armelin, artigo submetido). Uma grande parte desses dados foi produzida utilizando tanto a linhagem adrenocortical Y1 como a linhagem B61 derivada de fibroblastos Balb3T3 transformados com o H-Ras (V12) (linhagem B61). Em função dos altos níveis basais de Ras-GTP encontrados nas duas linhagens, ambas apresentam um controle apenas parcial do “switch” quiescência/proliferação por fatores séricos, dificultando a sincronização da população celular pelo carenciamento de soro no meio de cultura. Esta característica, intrínseca aos modelos

celulares utilizados, dificulta a análise dos efeitos fase-específicos de FGF2.

Sendo assim, para uma análise mais apurada dos efeitos de FGF2 sobre o ciclo células malignas dependentes de Ras, optamos por incluir em nossas análises a observação do efeito de FGF2 sobre as sub-linhagens Y1 D1. Tais linhagens foram engenheiradas em nosso laboratório para, através de transfecção estável, expressar constitutivamente ciclina D1. O resultado esperado era, a exemplo do que foi demonstrado em fibroblastos (Jiang *et al.*, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994), uma desregulação do controle da transição quiescência → proliferação. Entretanto, de maneira oposta ao esperado, o resultado da superexpressão constitutiva de ciclina D1 no modelo de células Y1, resultou em sub-linhagens que mantêm um comportamento fenotípico semelhante ao da linhagem parental; inclusive mantendo os altos níveis de expressão de K-Ras, tumorigenicidade e sensibilidade aos efeitos tóxicos de FGF2 *in vitro*, mas que apresentam um arrestamento estrito em G0/G1 decorrente de privação de soro (Schwindt *et al.*, 2003; Matos *et al.*; manuscrito em preparação). A figura 4.1 mostra resultados de *western blot* que comprovam que a expressão de ciclina D1 nas sub-linhagens Y1 D1, apesar de aumentada nas células em crescimento exponencial, é também facilmente detectada nas amostras de células carenciadas. Diferente do que podemos observar para a linhagem Y1. Além disso, a figura comprova também que as sub-linhagens Y1 D1 apresentam níveis da proteína K-Ras semelhantes aos observados na linhagem Y1.

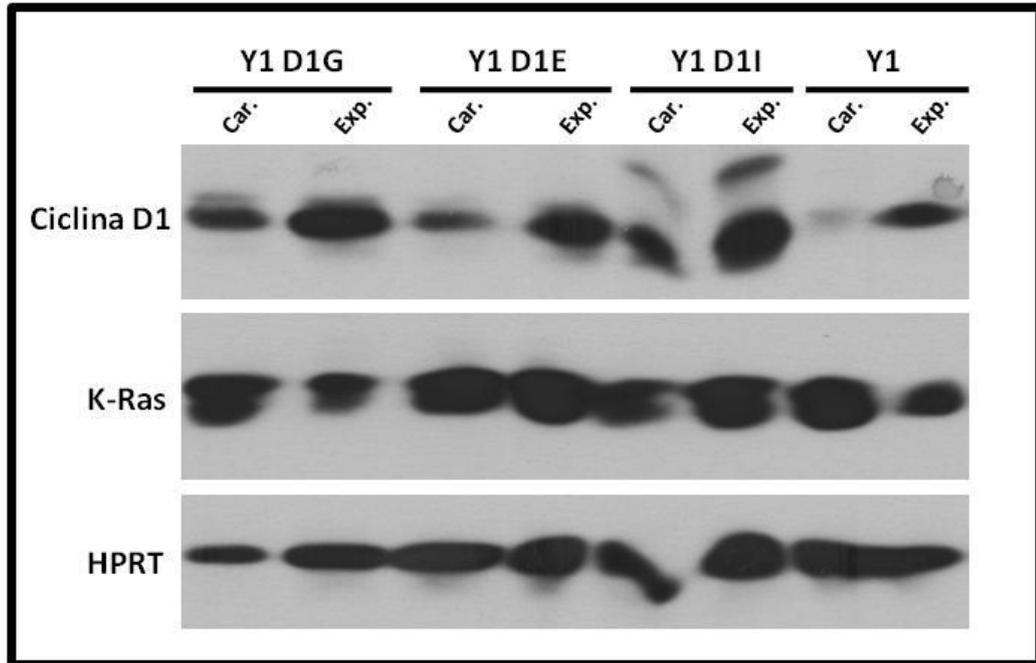


Figura 4.1- Expressão de ciclina D1 e K-Ras em Y1 e clones Y1 D1. *Western blot* comparando a expressão de ciclina D1 e K-Ras entre células Y1 e clones Y1 D1. As células foram coletadas carenciadas (**Car.**) ou em crescimento exponencial (**Exp.**). A expressão de HPRT está sendo usada como controle.

Após isso, primeiramente comparamos a linhagem parental Y1 com a sub-linhagem Y1 D1G no que se refere ao grau de sincronização em G0/G1 após o carenciamento, bem como a capacidade de saída do estado de quiescência dessas células após adição de soro ao meio de cultura. Os resultados de citometria demonstram que na linhagem Y1, apesar da clara estimulação após a adição de soro, uma importante parcela da população celular permaneceu ciclando mesmo na ausência de soro. Diferentemente, as células Y1 D1G apresentam um enorme grau de sincronização em G0/G1 sob carenciamento, e uma massiva reestimulação em função da adição de soro ao meio (Figura 4.2 A). Da mesma forma, ensaios de incorporação de timidina tritiada evidenciaram as baixíssimas taxas de síntese de DNA em células Y1 D1G carenciadas, e um aumento

de aproximadamente 55X nessas taxas após a adição de soro ao meio; ao passo que os resultados em Y1 mostram uma diferença pouco menor que 5X nessas medidas (Figura 4.2 B).

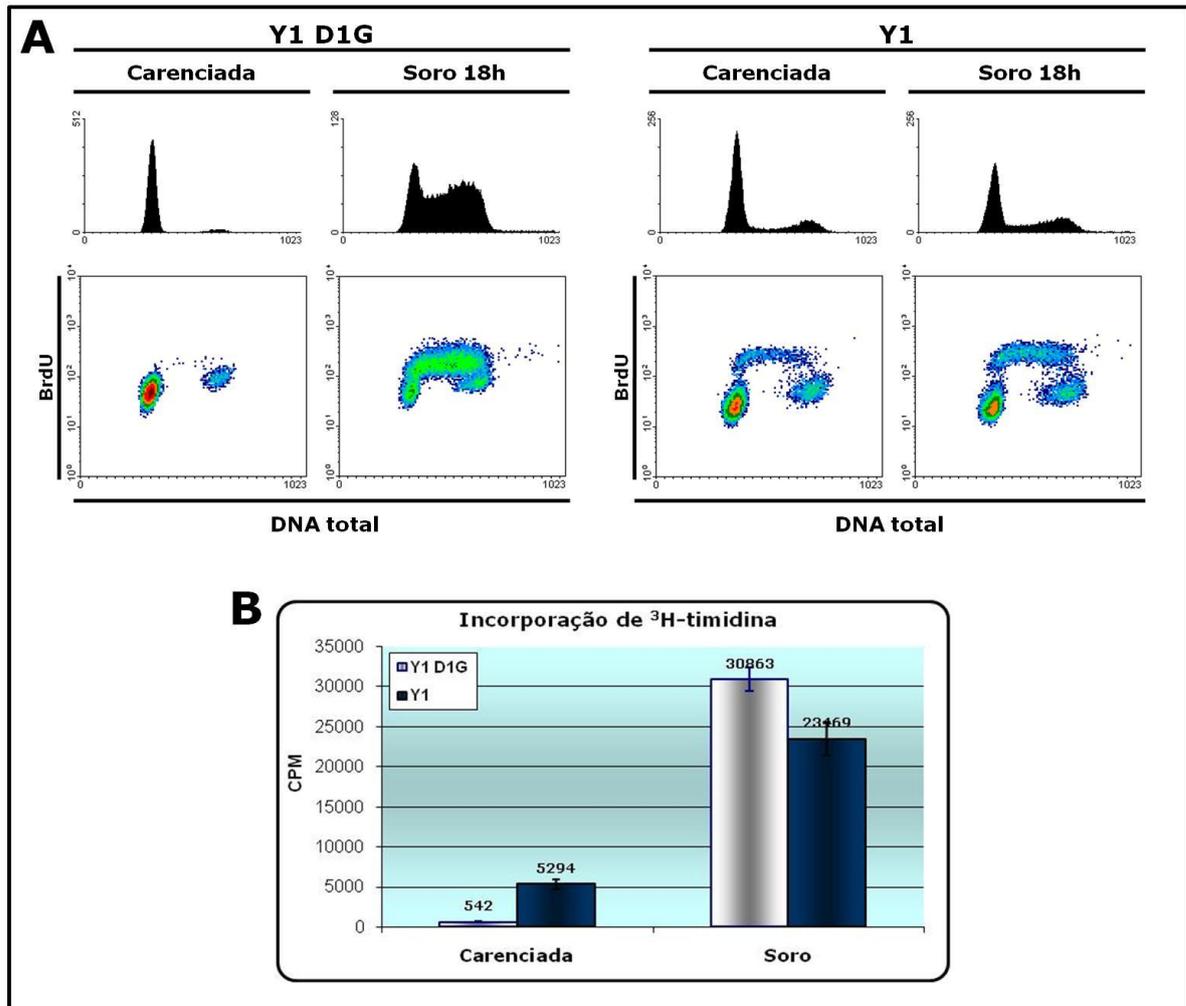


Figura 4.2 - Análise do controle de quiescência/proliferação em células Y1 D1G e Y1. (A) Citometrias de fluxo comparando as células Y1 D1G e Y1 quanto à sincronização em G0/G1 por carenciamento e o reestímulo por soro. As células foram carenciadas como descrito e reestimuladas ou não com soro por 18 horas. BrdU foi adicionado 30 minutos antes da coleta. 20000 células foram analisadas. **(B)** Medidas de incorporação de ^3H -timidina comparando as células Y1 D1G e Y1 quanto ao basal de síntese de DNA sob carenciamento, e intensidade do reestímulo por soro. As células foram carenciadas como descrito e reestimuladas ou não com soro por 16 horas. A timidina foi adicionada 9 horas após o reestímulo.

Em seguida, procuramos confirmar se, a exemplo do observado na linhagem Y1, FGF2 também desempenha um efeito tóxico sobre as células Y1 D1G. Como podemos ver na figura 4.3 A, células Y1 D1G estimuladas por FGF2 apresentam as mesmas alterações morfológicas observadas quando utilizamos a linhagem Y1; caracterizadas por um arredondamento das células e uma diminuição da adesão à placa. Para analisar os efeitos de FGF2 sobre a proliferação e viabilidade Y1 D1G, realizamos curvas de crescimento e ensaios clonogênicos. Os resultados das curvas de crescimento confirmam que FGF2 também bloqueia totalmente a proliferação das células Y1 D1G (Figura 4.3 C). Da mesma forma, os ensaios clonogênicos mostraram que a capacidade de formação de colônias em células Y1 D1G é também bastante diminuída sob efeito de FGF2 como observado nas células Y1 (Figura 4.3 D). Além disso, medimos o efeito de FGF2 sobre a velocidade relativa de síntese de DNA dessas linhagens na primeira fase S após o reestímulo. Os resultados dos ensaios de incorporação de timidina tritiada mostraram que, a exemplo do anteriormente observado em células Y1, FGF2 estimula a entrada em S, porém compromete a síntese de DNA, mesmo que estimulada por soro, em células D1G. (Figura 4.3 B)

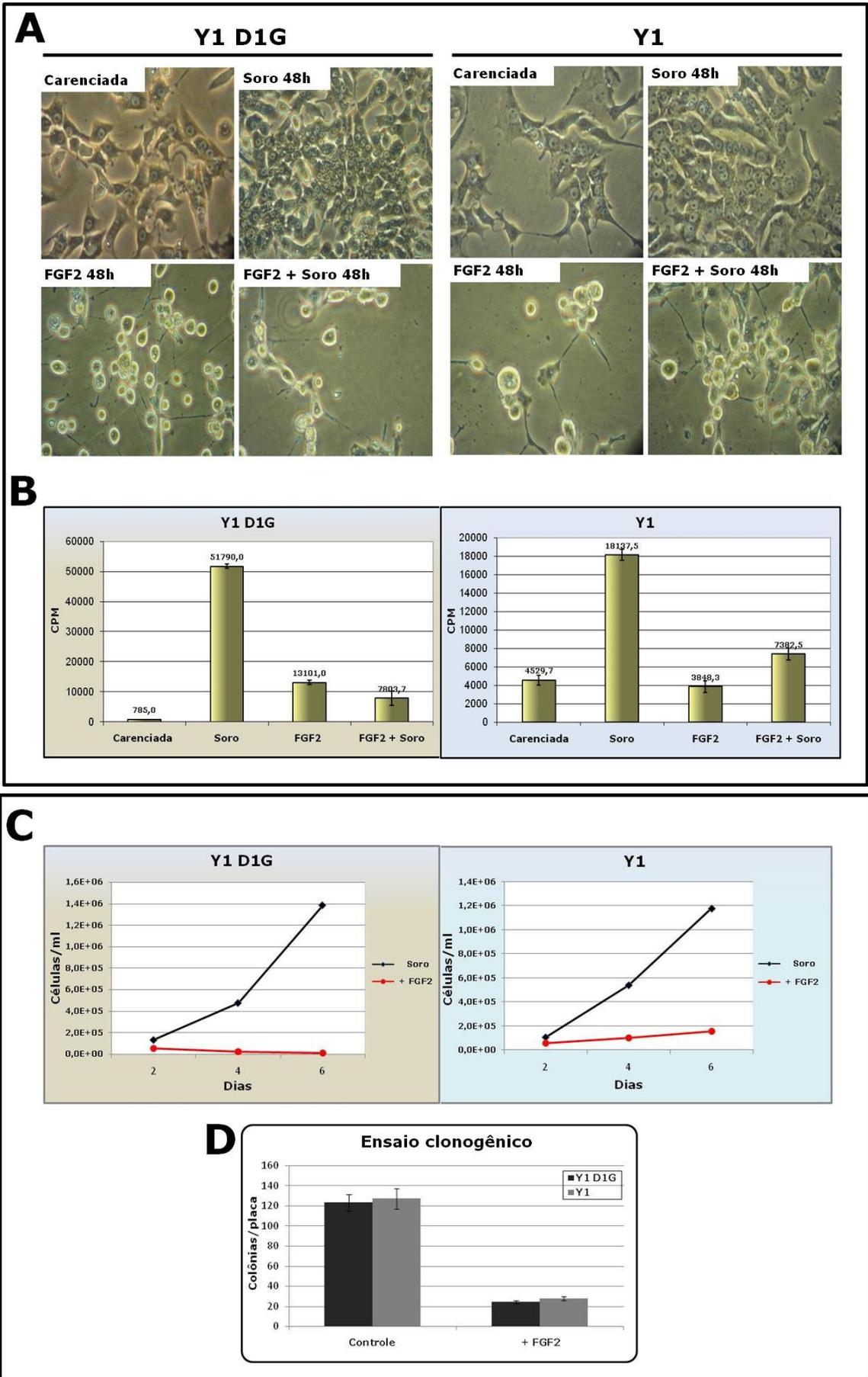


Figura 4.3 - Efeitos de FGF2 sobre células Y1 D1G e Y1. (A) Fotomicrografias mostrando o efeito de FGF2 sobre a morfologia das células Y1 D1G e Y1. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 48 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Foram mantidos controles de células não reestimuladas. **(B)** Medidas de incorporação de ³H-timidina utilizando células Y1 D1G e Y1. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 16 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Foram mantidos controles de células não reestimuladas (Carenciada). A timidina foi adicionada 9 horas após o reestímulo. **(C)** Curvas de crescimento utilizando células Y1 D1G e Y1. **Soro**=FCS 10%; **+FGF2**=FCS 10%+FGF2 10ng/ml. **(D)** Ensaios de formação de colônias utilizando células Y1 D1G e Y1. **Controle**=FCS 10%; **+FGF2**=FCS 10%+FGF2 10ng/ml.

Para excluir a possibilidade de que esse fenótipo de excelente sincronização em G0/G1 por privação de soro, bem como da resposta a FGF2 apresentado pela sub-linhagem Y1 D1G seja uma peculiaridade desse clone, analisamos alguns outros clones Y1 D1 para garantir que obteríamos resultados semelhantes aos observados nas células Y1 D1G. Tanto em análise morfológica quanto em ensaios de incorporação de timidina tritiada (figuras 4.4 A e B respectivamente), os clones Y1 D1 testados apresentaram um comportamento idêntico ao observado em Y1 D1G, permitindo assim a utilização da sub-linhagem Y1 D1G como modelo.

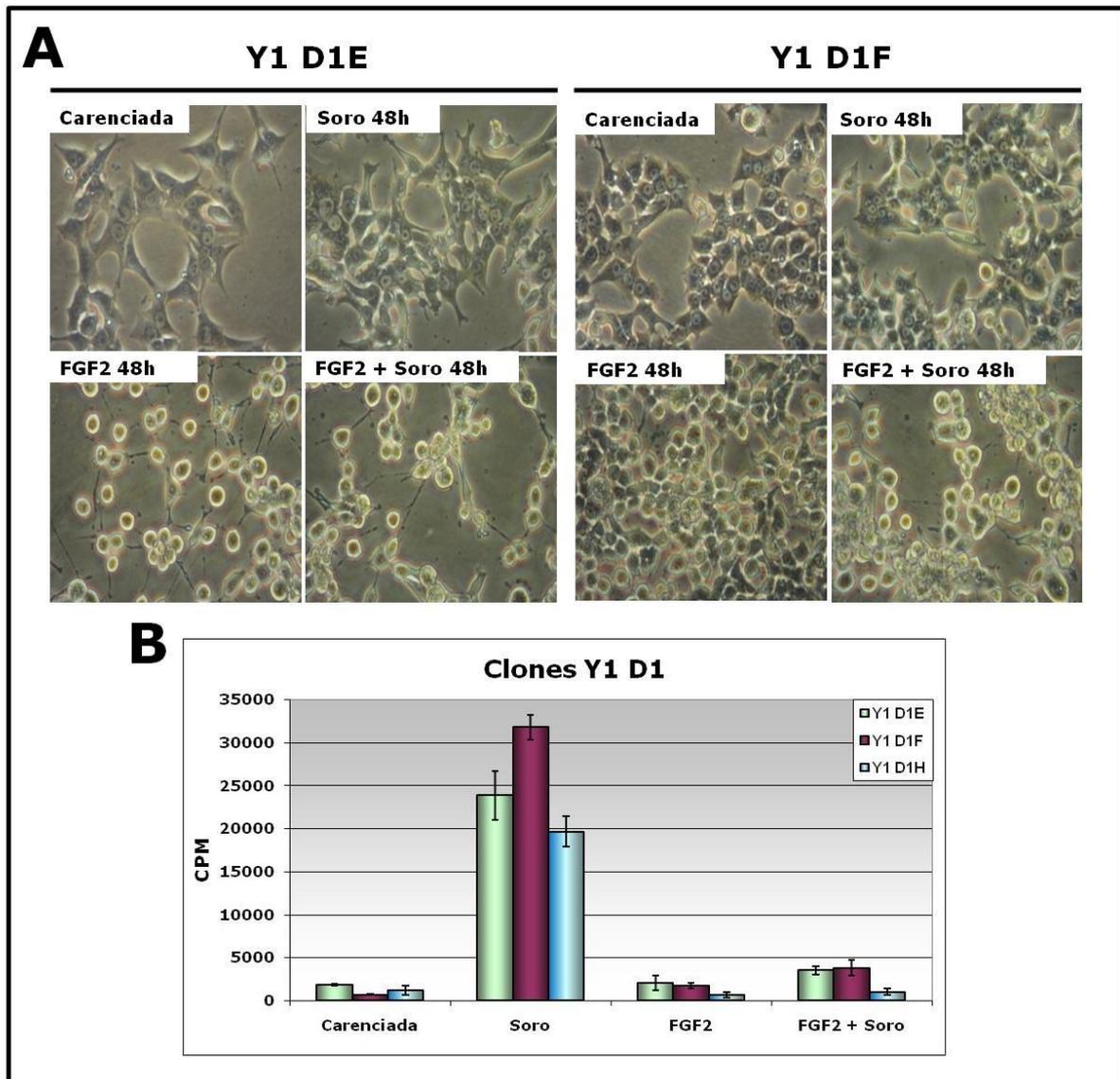


Figura 4.4 - Efeito de FGF2 sobre outros clones Y1 D1. (A) Fotomicrografias mostrando o efeito de FGF2 sobre a morfologia de clones Y1 D1. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 48 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Foram mantidos controles de células não reestimuladas. **(B)** Medidas de incorporação de ^3H -timidina utilizando clones Y1 D1. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 16 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Foram mantidos controles de células não reestimuladas. A timidina foi adicionada 9 horas após o reestímulo.

Em conjunto, esses resultados confirmam e expandem as observações de que as sub-linhagens Y1 D1 evidenciam atividades de ciclina D1 ainda não experimentalmente apreciadas e documentadas em

qualquer outro modelo celular. Isto é, em células Y1, ciclina D1 não participa do controle da progressão em G1, que está dominado pelas ciclinas E. Por outro lado, a expressão constitutiva de ciclina D1 restitui, apesar da manutenção da superexpressão de K-Ras, um controle estrito do "switch" quiescência/proliferação às sub-linhagens Y1 D1. Além disso, as sub-linhagens Y1-D1 mantém a sensibilidade aos efeitos tóxicos de FGF2 observada na linhagem parental Y1, sendo assim um modelo bastante apropriado para a busca dos objetivos propostos neste trabalho.

4.2 - FGF2 promove a transição G0/G1→S em células Y1 D1G, mas posteriormente leva a um comprometimento da síntese de DNA, seguido por um bloqueio do ciclo celular proeminentemente na fase G2

Para analisar a dinâmica do bloqueio causado por FGF2 em células Y1 D1G, e também a transição G0→G1→S em presença desse fator, observamos por citometria de fluxo a progressão dessas células no ciclo, a cada duas horas, durante as primeiras 24 horas após o reestímulo na presença ou não de FGF2. Os resultados demonstram que, como esperado, FGF2 sozinho é capaz de promover a transição G0→G1→S numa importante parcela da população celular. Entretanto, sozinho ou mesmo na presença de soro, FGF2 claramente compromete a fase S em células Y1 D1G, levando a um atraso da progressão dessas células pela fase S em relação ao controle estimulado apenas por soro; atraso este que é

primeiramente evidenciado entre 14 e 16 horas e que se mantém até 24 horas, onde grande parte das células do controle estimulado apenas por soro já iniciaram um novo ciclo, enquanto as populações celulares em presença de FGF2 estão ainda se acumulando na fase S (Figura 4.5 A). Além disso, é possível notar que as amostras estimuladas por FGF2 na presença de soro, apresentam a partir de aproximadamente 20 horas uma população de células que têm um conteúdo de DNA correspondente à fase S, mas não incorporaram o BrdU adicionado imediatamente antes da fixação; indicando que estas células entraram na fase S, não completaram a duplicação do material genético, porém apresentam uma síntese de DNA transitoriamente interrompida devido aos efeitos tóxicos de FGF2 (Figura 4.5 A setas).

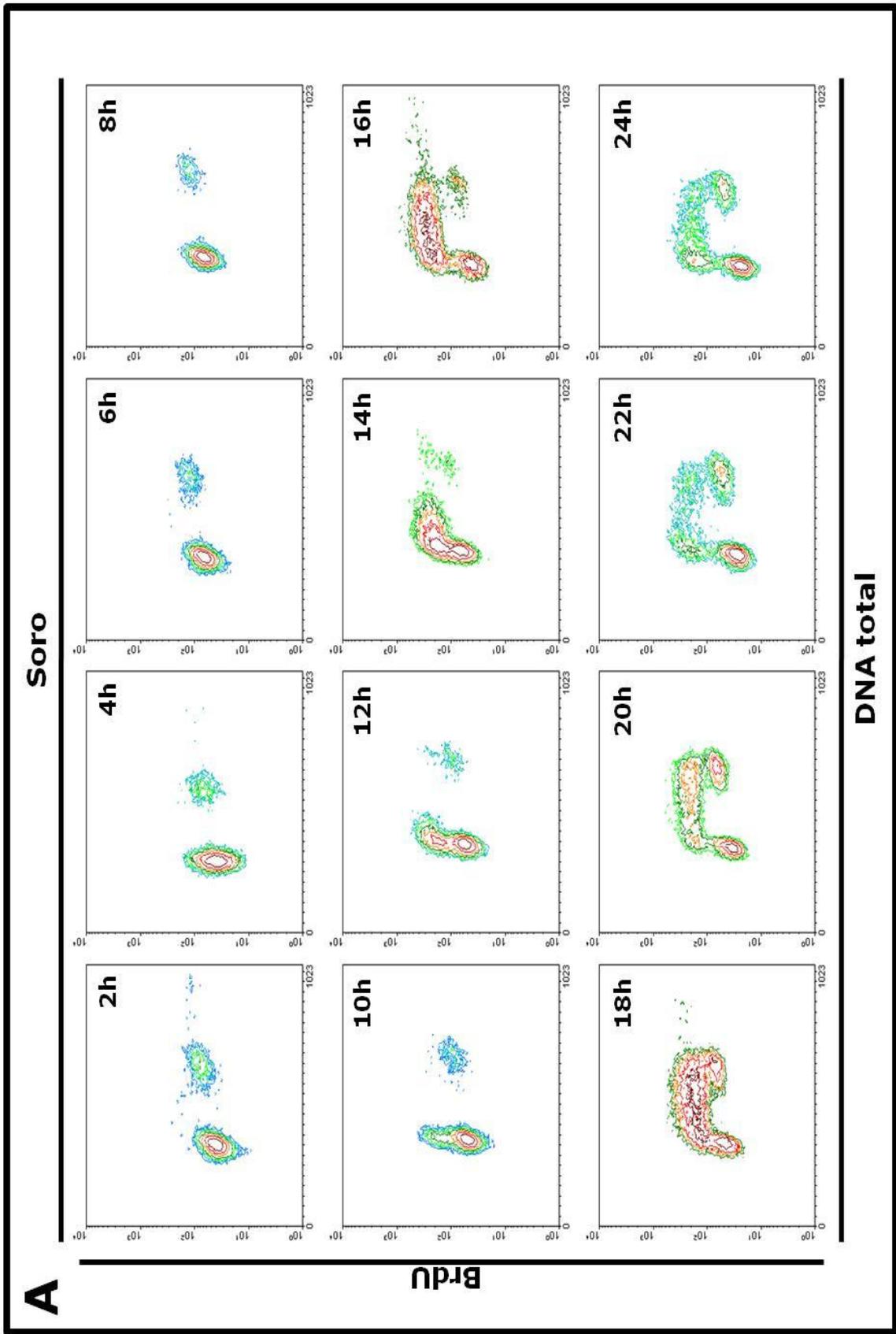


Figura 4.5 - Cinética de progressão no ciclo celular em células Y1 D1G. (Continua na próxima página...

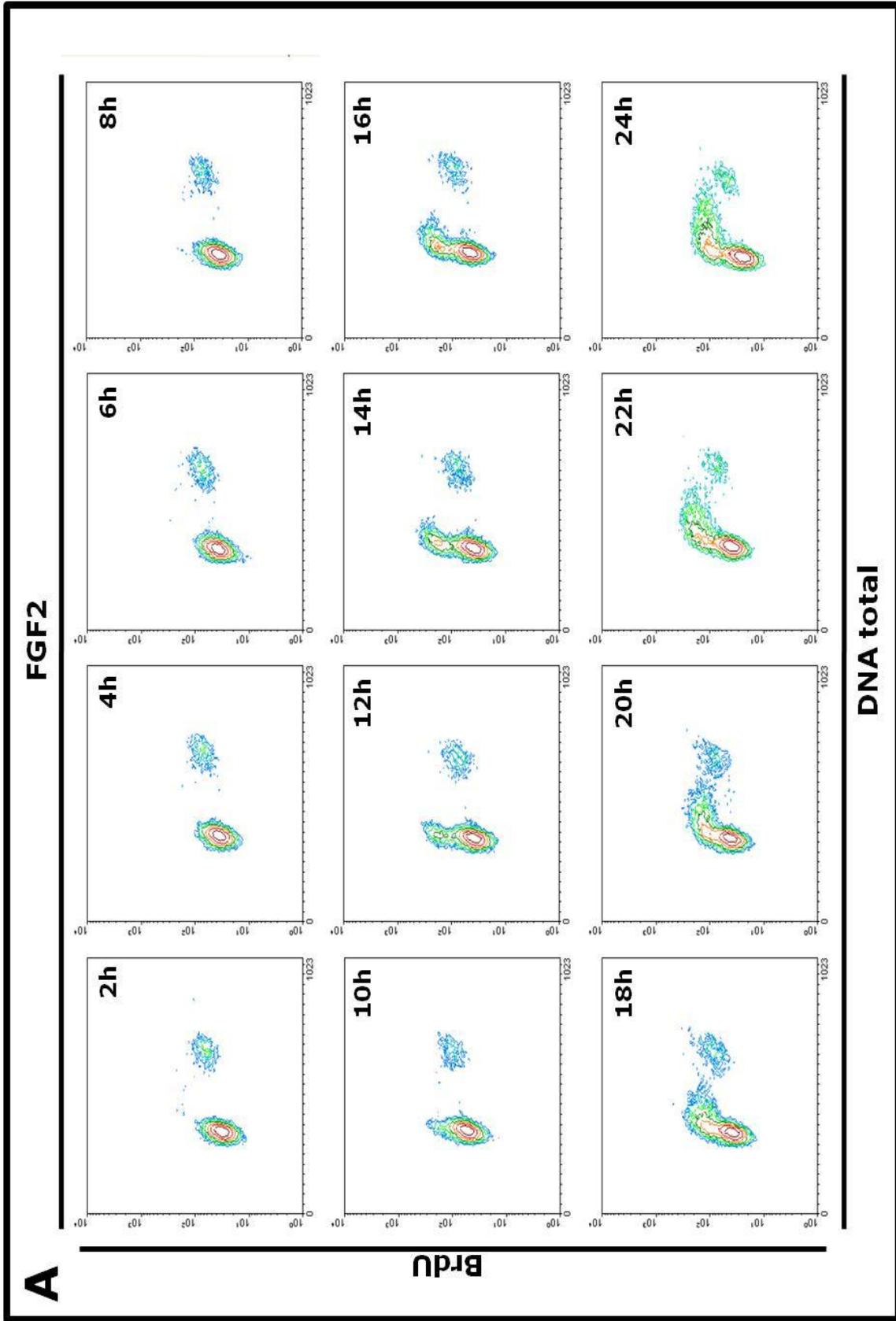


Figura 4.5 - Cinética de progressão no ciclo celular em células Y1 D1G. (Continua na próxima página...

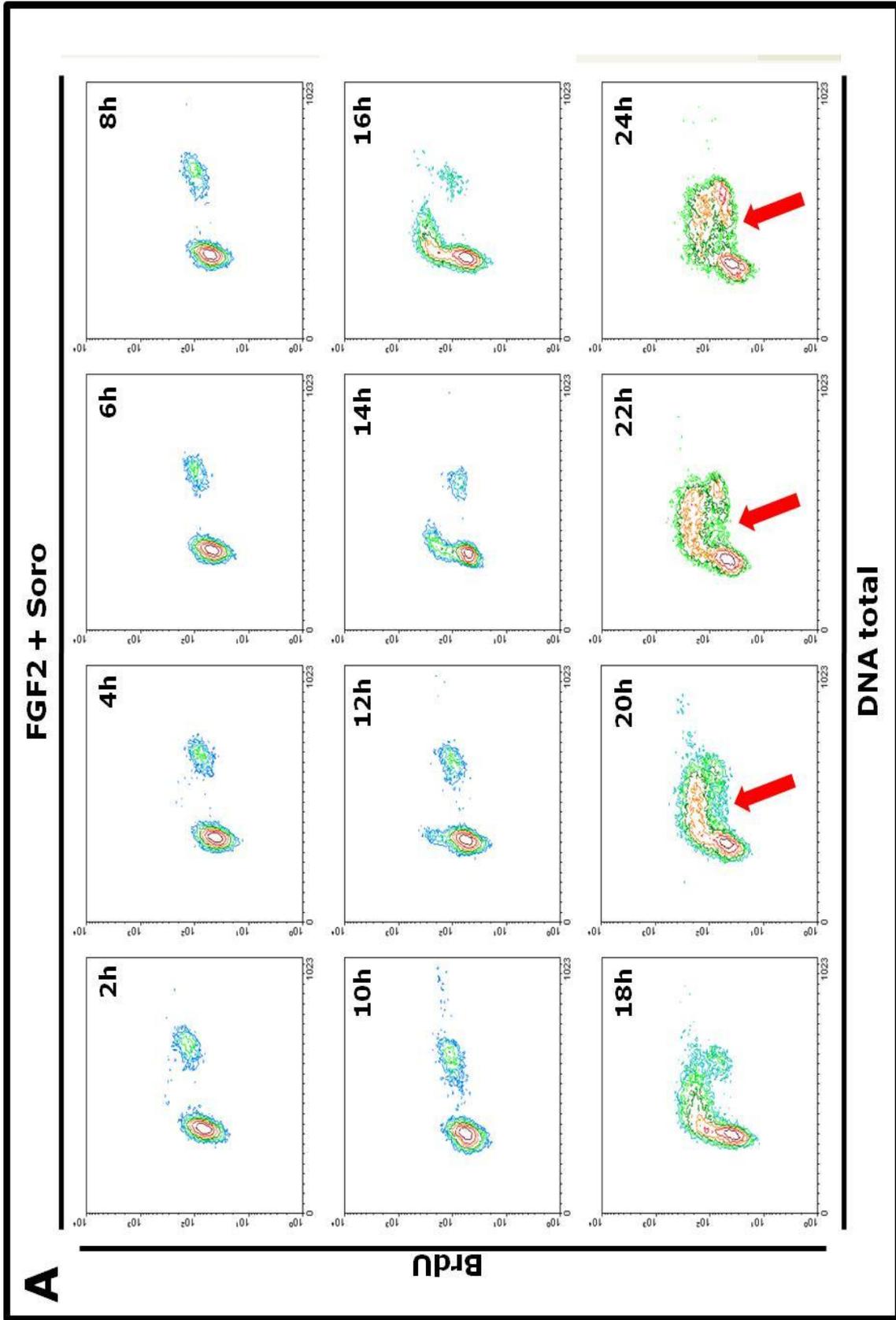


Figura 4.5 - Cinética de progressão no ciclo celular em células Y1 D1G. (Continua na próxima página...

B

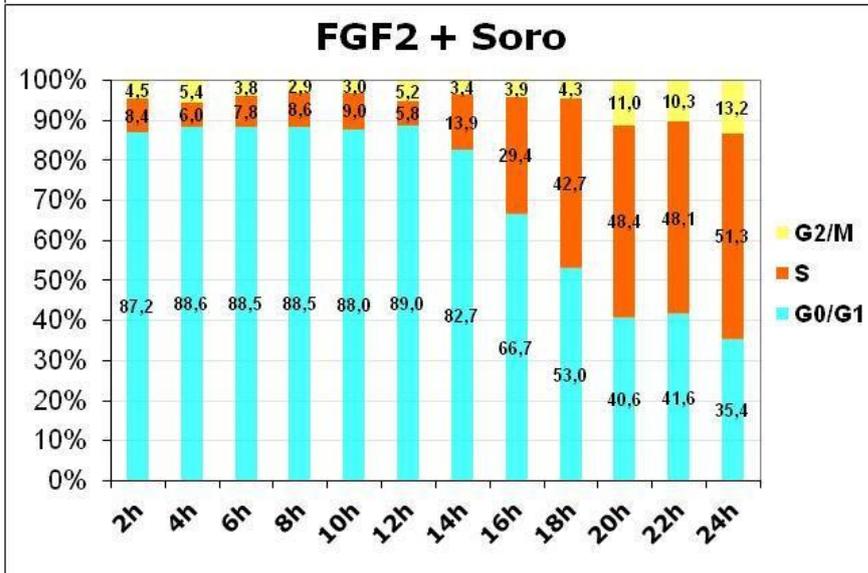
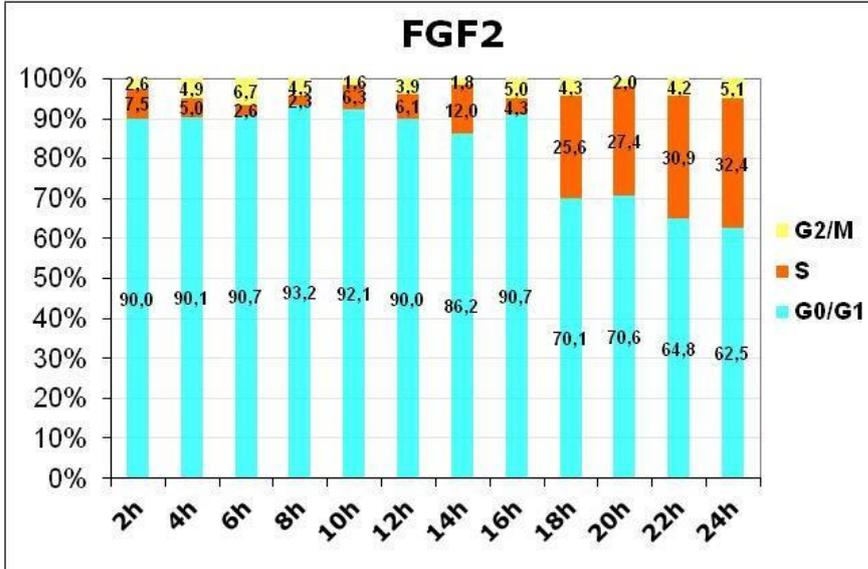
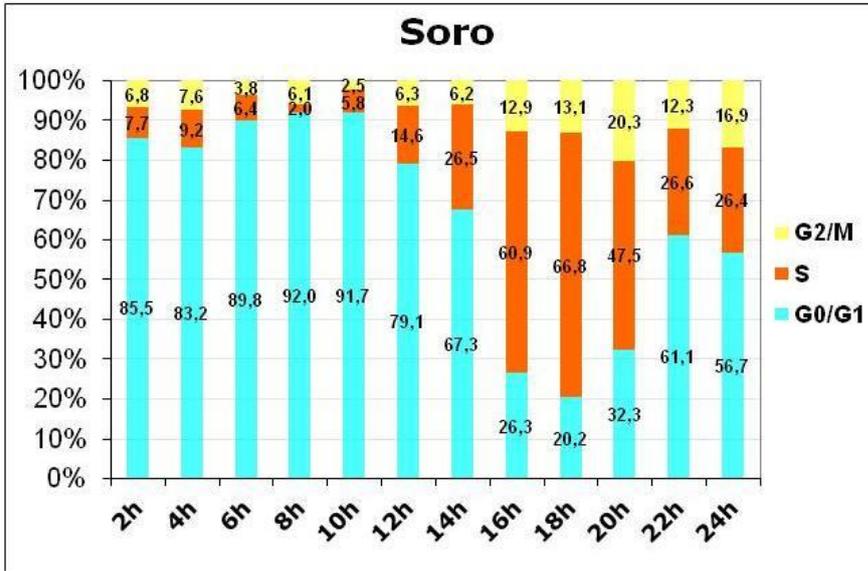


Figura 4.5 - Cinética de progressão no ciclo celular em células Y1 D1G. **(A)** Citometrias de fluxo mostrando a dinâmica de progressão no ciclo celular sob os estímulos descritos. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Amostras foram coletadas a cada 2 horas até 24 horas após o reestímulo. BrdU foi adicionada 30 minutos antes de cada coleta. **(B)** Quantificações dos dados das cinéticas de 24 horas. As quantificações foram feitas utilizando o programa *Cylchred 1.0.2*. 20000 células foram analisadas.

A quantificação dos dados do experimento acima claramente demonstra que em células Y1 D1G, enquanto no controle estimulado apenas por soro existe uma "onda" de entrada em S seguida de uma volta à fase G1, indicando que as células estão realmente ciclando e de maneira sincronizada, as células estimuladas em presença de FGF2 ainda se acumulam na fase S até o final da cinética, 24 horas após o reestímulo (Figura 4.5 B). Em função disso, nos perguntamos se o efeito causado por FGF2 nessas células é realmente um bloqueio durante a fase S, como inicialmente proposto, ou apenas um forte atraso na progressão através dessa fase. Para resolver essa questão e também para confirmar os resultados dessa cinética de 24 horas, realizamos uma nova cinética, nos mesmos moldes da anterior, porém seguindo a progressão dessas células no ciclo por 48 horas. Os resultados fortemente indicam que, especialmente em presença de soro, o bloqueio causado por FGF2 é proeminentemente em G2/M; uma vez as células que tiveram sua fase S comprometida pela ação do FGF2 parecem gradativamente conseguir completar a fase S e alcançar um conteúdo de DNA total equivalente a G2/M, onde podemos notar um claro acúmulo de células em função da

ação do FGF2 (Figura 4.6 A). Apesar disso, mesmo em tempos mais tardios, ainda podemos observar nas amostras estimuladas por FGF2 com ou sem soro aquela população de células que apresentam conteúdo de DNA equivalente à fase S, porém não incorporaram o BrdU pulsado antes da fixação. Indicando que uma parcela das células ainda permanece com o ciclo comprometido durante a fase S (Figura 4.6 A).

O método de quantificação habitualmente usado para determinar o percentual de células em cada fase do ciclo nesse tipo de experimento, leva em conta apenas o conteúdo de DNA total, desprezando a valiosa informação que a incorporação do BrdU pulsado imediatamente antes da fixação, fornece sobre as células que estão no início ou no final da fase S. Por causa disso, para uma quantificação mais apurada, optamos por realizar as quantificações desse experimento através de uma "clusterização" das populações celulares mostradas em *dot plots*, levando em conta o conteúdo de DNA total e a incorporação de BrdU das células utilizando o programa para análises estatísticas "R". Os resultados das quantificações das cinéticas de 48 horas estão mostrados na figura 4.6 B, onde podemos observar a representação gráfica que ilustra a movimentação das populações celulares pelas fases do ciclo ao longo do tempo, e permite a visualização do que foi descrito acima.

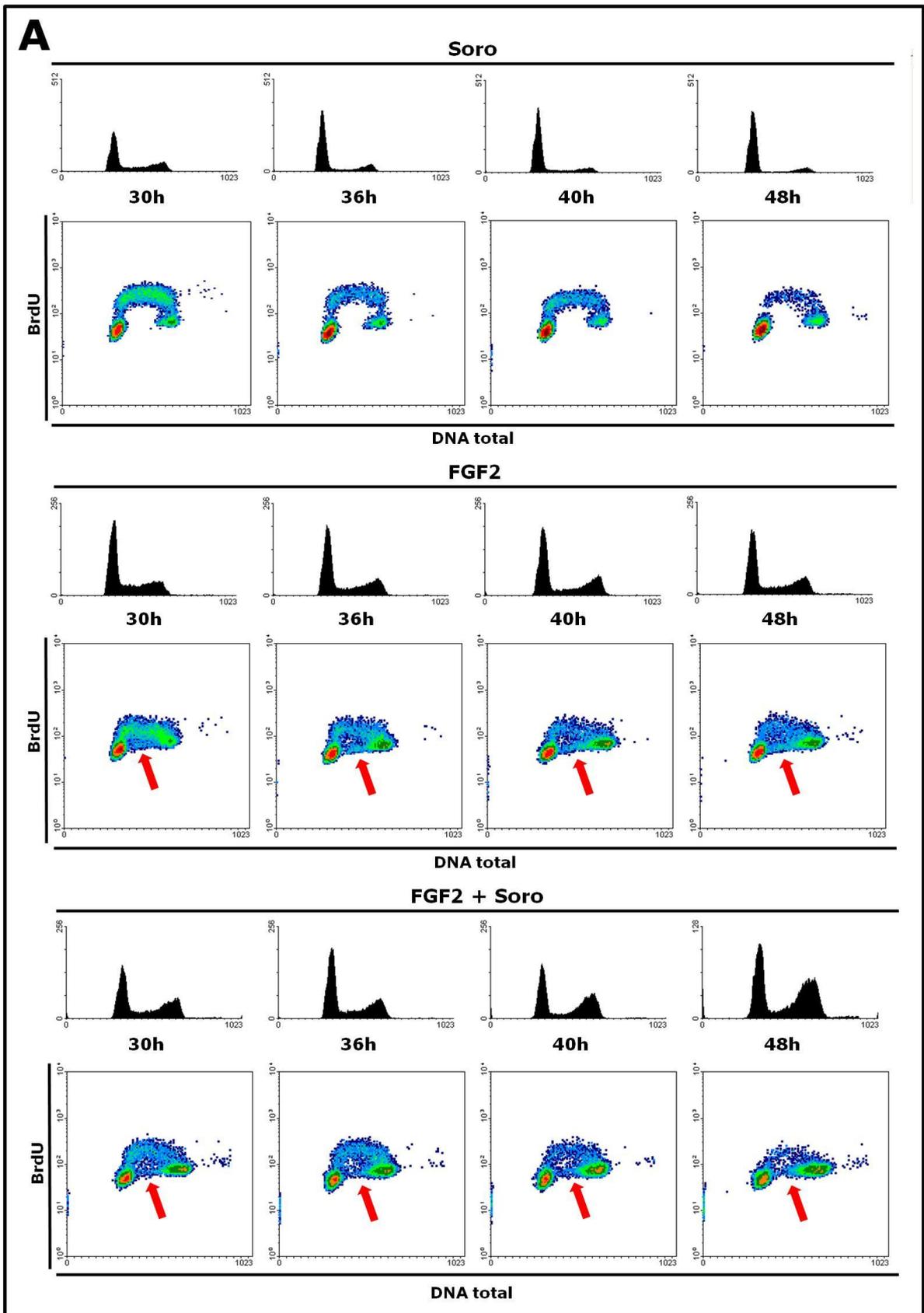


Figura 4.6 - Perfis de ciclo celular em células Y1 D1G. Continua na próxima página...

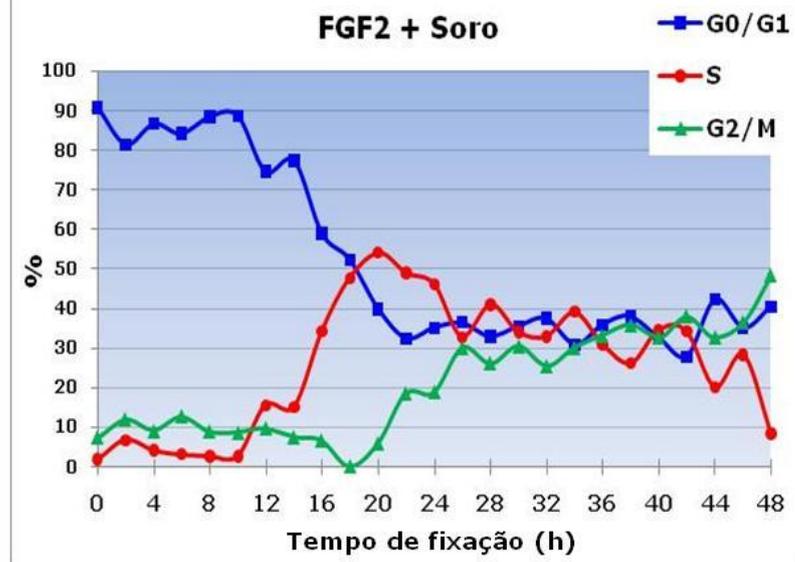
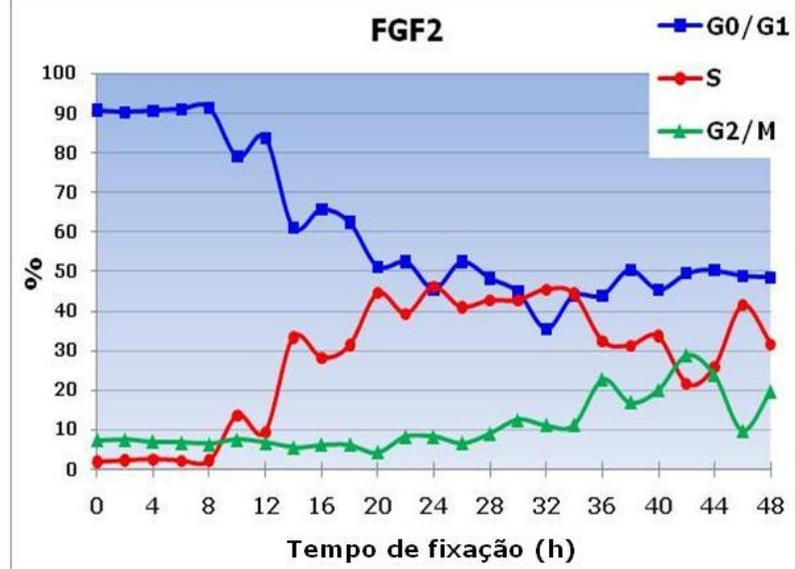
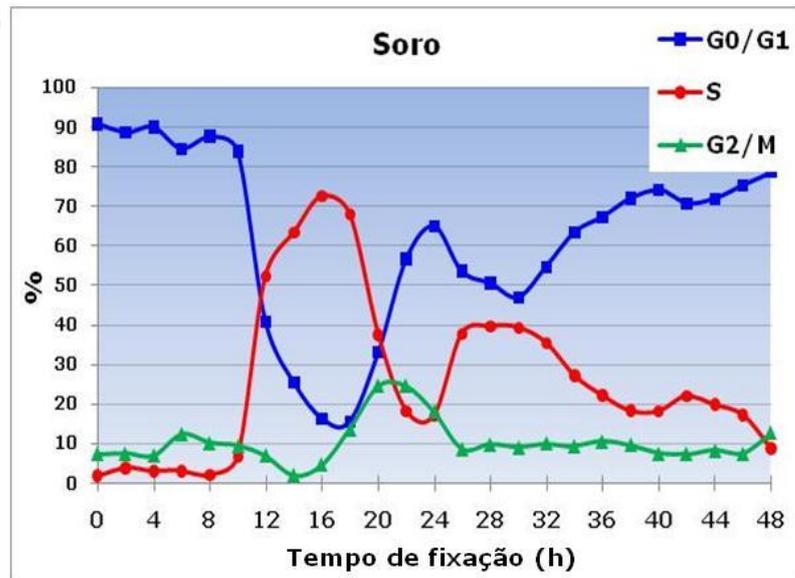
B

Figura 4.6 - Perfis de ciclo celular em células Y1 D1G. (A) Citometrias de fluxo mostrando a progressão no ciclo celular sob os estímulos descritos. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Amostras foram coletadas a cada 2 horas até 48 horas após o reestímulo. Para efeitos práticos, apenas alguns pontos são mostrados. BrdU foi adicionada 30 minutos antes de cada coleta. **(B)** Quantificações dos dados das cinéticas de 48 horas. As quantificações foram feitas por utilizando o programa "R". 20000 células foram analisadas.

Uma questão óbvia que surge nesse momento é: seria esse bloqueio em G2 ou na mitose propriamente dita? Para responder essa questão, reestimulamos células previamente sincronizadas em G0/G1 com FGF2 sozinho ou na presença de soro. Colchicina também foi ou não adicionada às placas no momento do reestímulo visando bloquear em mitose as células que chegassem até essa fase. Realizamos então uma cinética entre 24 e 36 horas após o reestímulo e, fazendo uso de um marcador de mitose (anti fosfo-histona H3 ser10) (Li *et al.*, 2005), determinamos por citometria de fluxo a porcentagem de células mitóticas nessas populações. Os resultados demonstram que na ausência de colchicina, como esperado, populações de células estimuladas por FGF2 com ou sem soro apresentam uma tendência de acumulação em G2/M ao longo do tempo, diferentemente do controle estimulado apenas por soro. Apesar disso, a porcentagem de células em mitose propriamente dita é sistematicamente mais baixa nas amostras submetidas ao FGF2, em comparação ao controle (Figura 4.7 A e B). De modo ainda mais contundente, mesmo quando a mitose é bloqueada por colchicina, nas amostras estimuladas por FGF2 apenas uma pequena parcela da população parece alcançar a mitose ao

longo de todo o tempo do experimento; ao passo que as amostras do controle estimulado apenas por soro já apresentam uma massiva acumulação em mitose no ponto de 24 horas (Figura 4.7 B). Demonstrando que o bloqueio causado por FGF2 em Y1 D1G é principalmente em G2 e não na mitose.

Juntos, esses resultados demonstram que, apesar de terem a síntese de DNA comprometida pela ação do FGF2, uma grande parcela das células Y1 D1G consegue concluir a fase S e alcançar G2, onde permanecem bloqueadas, não se engajando assim na mitose.

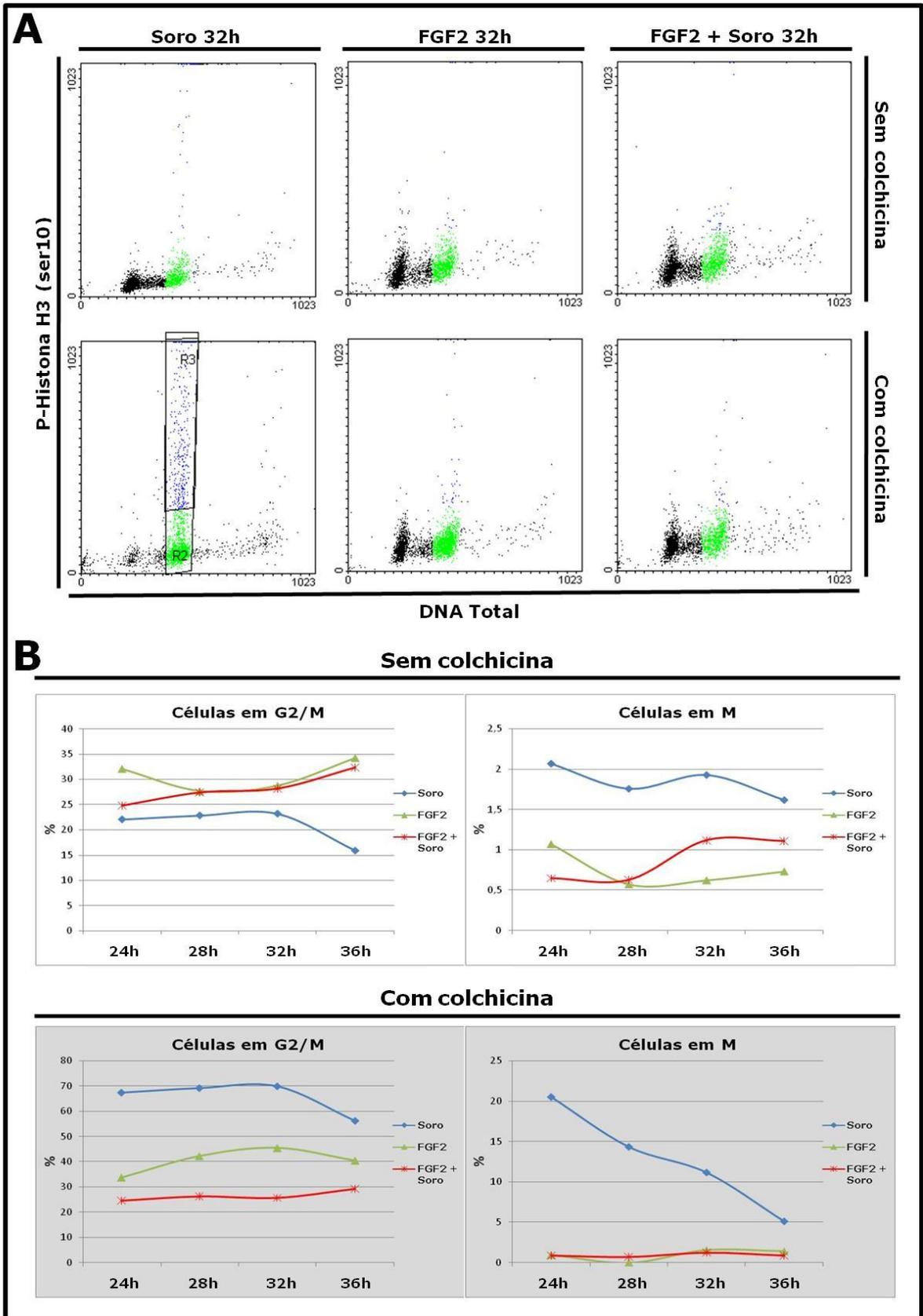


Figura 4.7 - Discriminação entre bloqueio em G2 e bloqueio em M. (A) Citometrias de fluxo comparando a acumulação de células Y1 D1G em mitose (P-histona H3) entre os estímulos descritos. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. 2 μ M de colchicina foi ou não adicionado conforme descrito. Amostras foram coletadas a cada 4 horas entre 24 e 36 horas após o reestímulo. Para efeitos práticos, apenas as amostras coletadas em 32 horas são mostradas. **(B)** Quantificação do experimento acima. A quantificação foi feita utilizando o programa "WinMDI 2.9", onde o *gate* R2 determina células em G2/M; e o *gate* R3 determina células em M. 20000 células foram analisadas.

4.3 - FGF2 compromete o ciclo celular em células Y1 D1G em diferentes pontos

Tendo em vista que, com base nos resultados até aqui apresentados, FGF2 provoca em células Y1 D1G um considerável atraso na progressão através da fase S, seguido de um bloqueio em G2; decidimos investigar se nessas células FGF2 apresenta algum efeito antiproliferativo em outros pontos do ciclo, bem como, a relação entre o tempo de adição de FGF2 e o efeito sobre o ciclo celular.

Primeiramente, analisamos o efeito de FGF2 em função do tempo de adição desse fator, sobre a primeira fase S de células Y1 D1G reestimuladas com soro após sincronização em G0/G1 por carenciamento. Resultados anteriores de nosso laboratório sugeriam que em células Y1, a execução dos efeitos antiproliferativos disparados por FGF2 se inicia durante a fase S. Entretanto, o disparo de tais efeitos, só é eficiente quando o fator é adicionado dentro das primeiras horas após o reestímulo por soro de células previamente carenciadas. (Salotti & Armelin, artigo submetido) Coerentemente, em células Y1 D1G reestimuladas por soro e

com FGF2 adicionado em diferentes tempos após o reestímulo, os resultados mostraram que esse fator é capaz de diminuir significativamente a tomada de timidina, apenas quando adicionado até duas horas após o reestímulo (Figura 4.8). Indicando que nessas células, o disparo dos efeitos tóxicos de FGF2 que vão resultar em comprometimento da síntese de DNA na fase S seguinte, é efetivo apenas quando o fator é adicionado no início da reentrada no ciclo.

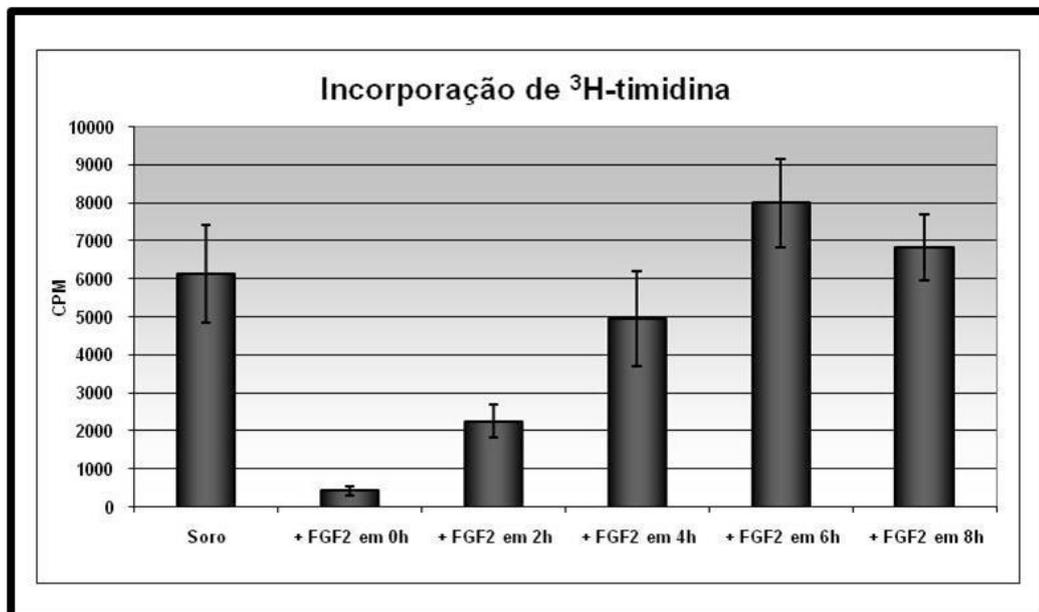


Figura 4.8 - Incorporação de ³H-timidina em células Y1 D1G com FGF2 adicionado em diferentes tempos. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas com FCS 10%; FGF2 foi adicionado nos tempos descritos mantendo-se um controle de células estimuladas apenas por FCS 10% (Soro). ³H-timidina foi adicionada às placas em 9 horas e as amostras foram coletadas 16 horas após o reestímulo.

Para avançar no entendimento sobre como o momento da célula no ciclo celular influencia na resposta antiproliferativa disparada por FGF2, buscamos analisar como varia a acumulação de células em G2 causada pelo FGF2 quando o mesmo é adicionado em diferentes fases do ciclo: ao

final de G1, durante S ou ao final de S/início de G2. Buscando assim saber se as células Y1 D1G poderiam ser refratárias ao bloqueio causado por FGF2 quando adicionado em estágios mais avançados do ciclo celular. Para tal, reestimulamos com soro células Y1 D1G previamente carenciadas, e adicionamos FGF2 em 8, 12 ou 18 horas. Uma vez que as células Y1 D1G mostraram um excelente grau de sincronização durante o primeiro ciclo após o reestímulo, estes tempos foram escolhidos de acordo com nossas observações anteriores da cinética de progressão no ciclo celular após o reestímulo dessas células. As células foram coletadas em 36 e 48 horas, e a análise dos resultados obtidos por citometria de fluxo mostraram que FGF2 é capaz de levar a um bloqueio do ciclo celular em G2 independentemente da fase do ciclo em que é adicionado; sendo a intensidade desse bloqueio relacionada ao tempo decorrido após a adição de FGF2 (Figura 4.9). Esses resultados sugerem que não há um período do ciclo celular em que as células Y1 D1G sejam refratárias aos efeitos antiproliferativos de FGF2; mas que, entre o disparo deste efeito e a execução do mesmo, parece ser necessário um tempo para a organização dos mecanismos efetores.

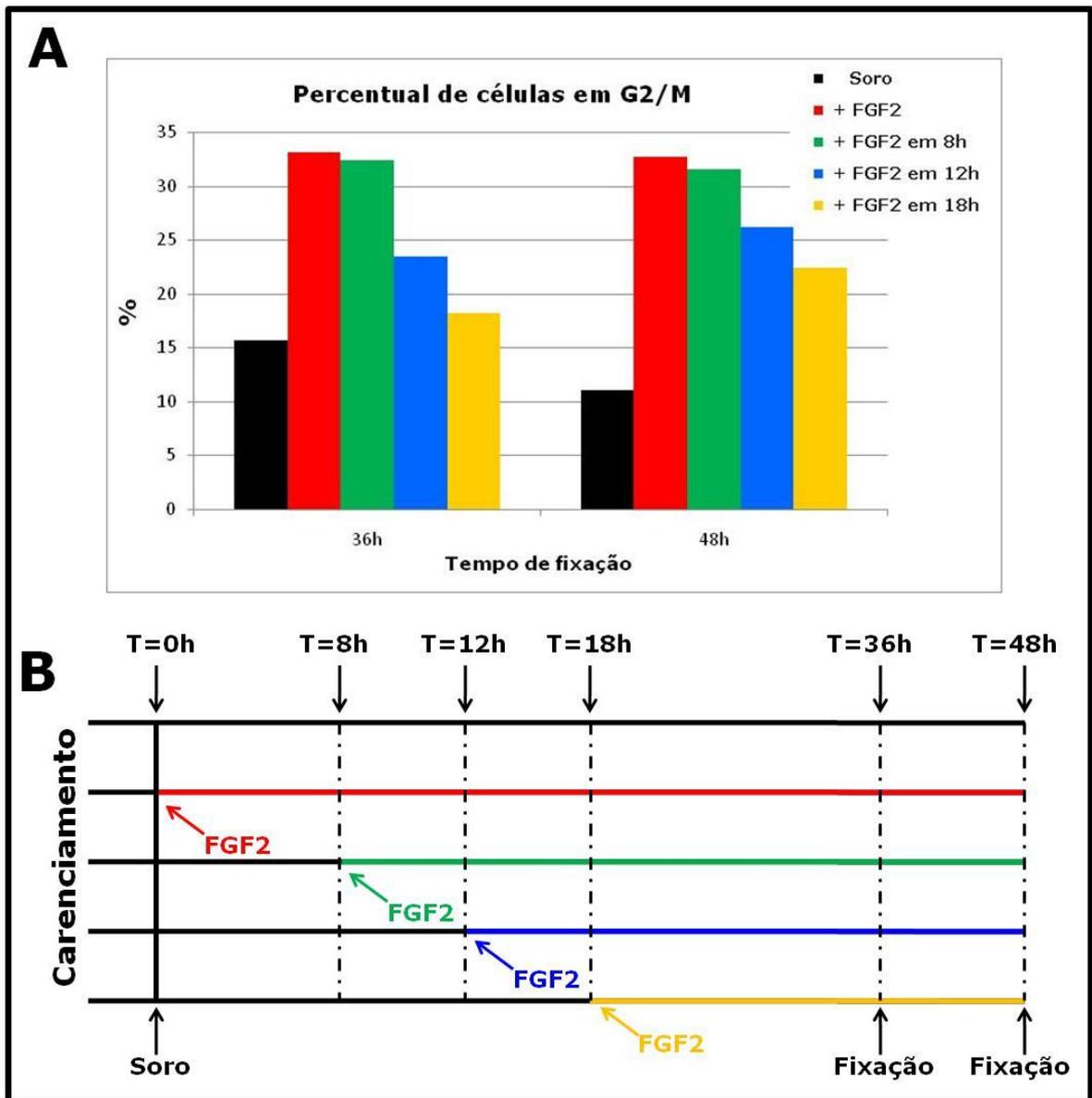


Figura 4.9 - Acumulação de células Y1 D1G em G2/M em função do tempo de adição de FGF2. (A) Quantificação de medidas por citometria de fluxo da acumulação de células em G2/M. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas com FCS 10%; FGF2 foi adicionado em 0, 8, 12 ou 16 horas após o reestímulo conforme descrito, mantendo-se um controle de células estimuladas apenas por FCS 10% (Soro). As amostras foram coletadas em 36 ou 48 horas após o reestímulo. A quantificação foi feita utilizando o programa *Cylchred 1.0.2*. 20000 células foram analisadas. **(B)** representação esquemática do experimento acima.

Mostramos na figura 4.5 que em células Y1 D1G, FGF2, apesar de disparar um mecanismo antiproliferativo que irá comprometer seriamente

o ciclo celular, não bloqueia a transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ disparada por soro após prévio carenciamento dessas células. Mais que isso, FGF2 sozinho é capaz de desempenhar sua função clássica de fator de crescimento e disparar tal transição. Entretanto, além do comprometimento da fase S e do posterior bloqueio em G2 anteriormente citados, chama a atenção o fato de que, ao observarmos as quantificações das cinéticas de progressão no ciclo celular, notamos que apenas em presença de FGF2 com ou sem soro, uma importante parcela da população de células estimuladas parece não ser capaz de deixar G_0/G_1 e entrar na fase S. Tal observação, porém, poderia estar sendo superestimada caso uma considerável parcela da população celular ultrapassasse o bloqueio em G2 e conseguisse se dividir voltando à G1. Para resolver essa questão, reestimulamos com soro em presença ou não de FGF2 células sincronizadas em G_0 por carenciamento, e bloqueamos a mitose com colchicina. Determinamos então por citometria de fluxo a distribuição das células no ciclo celular 36 horas após o reestímulo. Como esperado, nas amostras estimuladas apenas por soro a maior parte da população encontra-se bloqueada no compartimento G2/M após 36 horas devido à ação da colchicina; e apenas uma pequena parcela permanece em G_0/G_1 . No entanto, nas amostras estimuladas por FGF2 juntamente com soro, o perfil de ciclo celular observado nos histogramas é bastante semelhante na presença ou não de colchicina; com acúmulo de células em S e G2/M em relação ao controle estimulado por soro sem colchicina, e sem efeito aparente de bloqueio causado pela colchicina. Apesar disso, mesmo após 36 horas mais de 40% das células

que foram estimuladas com FGF2 junto ao soro parecem não terem sido capazes de ingressar na fase S, permanecendo assim em G1 (Figura 4.10 A e B). Esses resultados indicam que, em Y1 D1G, FGF2 induz com ou sem soro a transição quiescência → proliferação levando uma parcela da população a entrar em S; entretanto, ao mesmo tempo, uma outra parcela da população de células estimuladas a sair do estado de quiescência, tem sua entrada na fase S (induzida por soro) comprometida pela ação de FGF2.

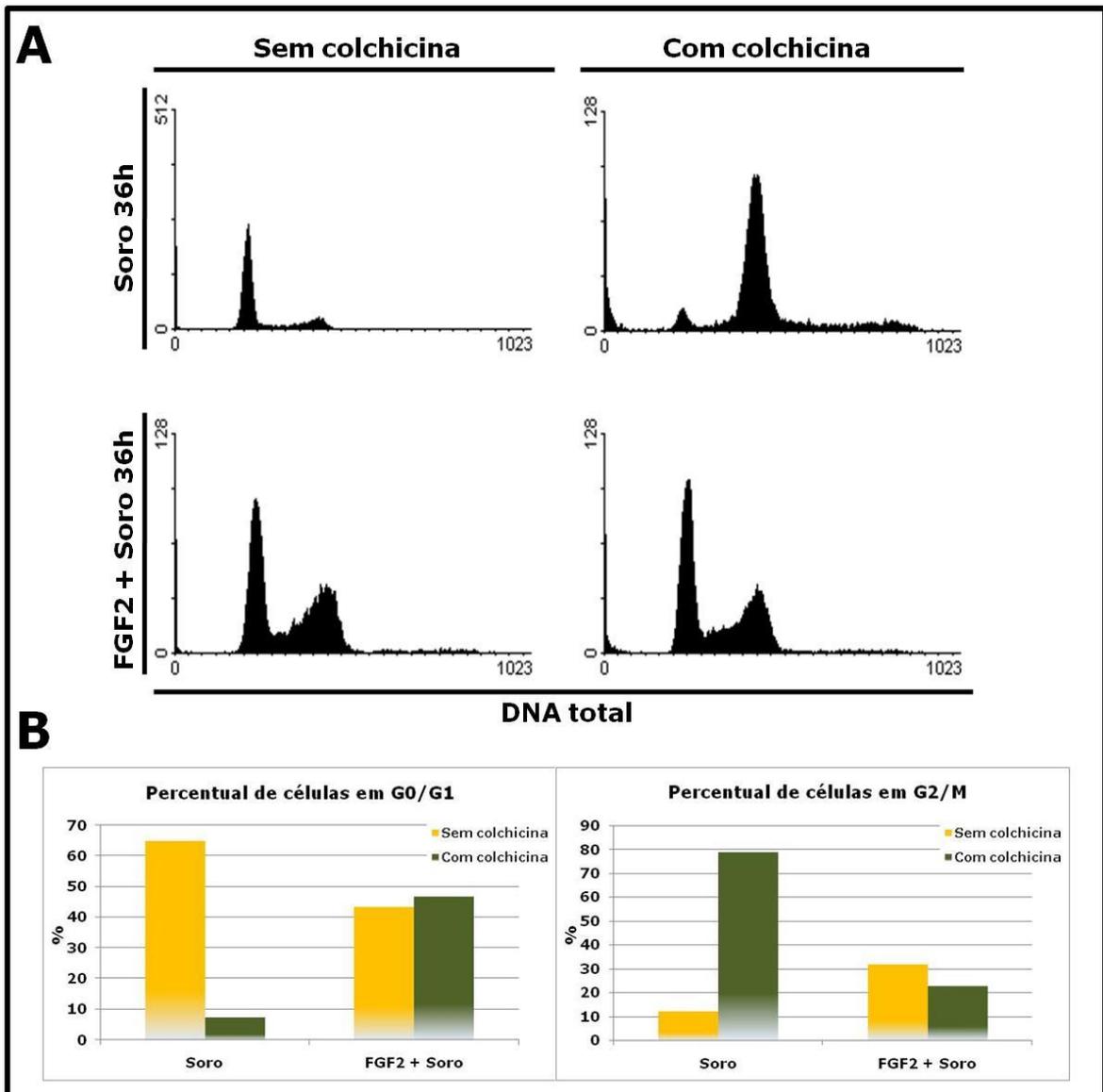


Figura 4.10 - Efeito de FGF2 em Y1 D1G antes da fase S. (A) Citometrias de fluxo comparando perfis de ciclo celular nas condições descritas. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por **Soro**=FCS 10% **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. 2 μ M de colchicina foi ou não adicionado conforme descrito. **(B)** Quantificação do experimento acima. A quantificação foi feita utilizando o programa *Cylchred 1.0.2*. 20000 células foram analisadas.

Finalmente, procuramos verificar se FGF2 também é capaz de disparar mecanismos mais imediatos que resultem em alteração na cinética de progressão no ciclo das células Y1 D1G. Tendo em vista que resultados anteriores do nosso grupo utilizando células Y1 apontam nessa direção (Érico T. Costa, tese de doutorado 2005). Nesse sentido, buscamos medir inicialmente os efeitos imediatos de FGF2 sobre a fase S de células Y1 D1G. Para tal, utilizamos culturas de células não sincronizadas e em condições ótimas de crescimento estacionário onde FGF2 foi ou não adicionado, e medimos a velocidade relativa de síntese de DNA por incorporação de timidina tritiada ao longo do tempo após a adição do FGF2. Os resultados demonstraram que já a partir de 2 horas a tomada de timidina é reduzida nas amostras estimuladas por FGF2 em relação ao controle; redução essa que se acentua e é mantida até 8 horas (Figura 4.11 A). Analisamos também os efeitos imediatos de FGF2 sobre a transição G2→M nas células Y1 D1G. Para isso, utilizamos novamente células não sincronizadas e em condições ótimas de crescimento estacionário, onde FGF2 foi ou não adicionado e, ao mesmo tempo, adicionamos colchicina para que pudéssemos medir a cinética de acúmulo de células em mitose na presença ou ausência de FGF2. As medidas foram realizadas por citometria de fluxo utilizando marcação para DNA total e o

marcador de mitose anti-histona H3 fosforilada. Assim como observado para a fase S, os resultados demonstram que já nas primeiras 2 horas FGF2 diminui a acumulação de células em mitose causada pela colchicina e, apesar de não bloquear completamente tal acúmulo, a presença de FGF2 diminui sistematicamente a porcentagem de células bloqueadas em mitose ao longo dos tempos medidos até 8 horas (Figura 4.11 B). Esses resultados indicam que FGF2 é capaz de disparar efeitos antiproliferativos imediatos também sobre a transição G2→M em células Y1 D1G.

A análise desse conjunto de resultados sugere que parece não haver uma fase ou período do ciclo celular onde as células Y1 D1G sejam refratárias aos efeitos antiproliferativos de FGF2; e que, embora parte desses efeitos envolva mecanismos mais imediatos como observado nas figuras 4.11 A e B, outra parte parece depender da organização de mecanismos efetores disparados no momento da adição do FGF2 e que irão resultar em um ponto de execução mais tardio.

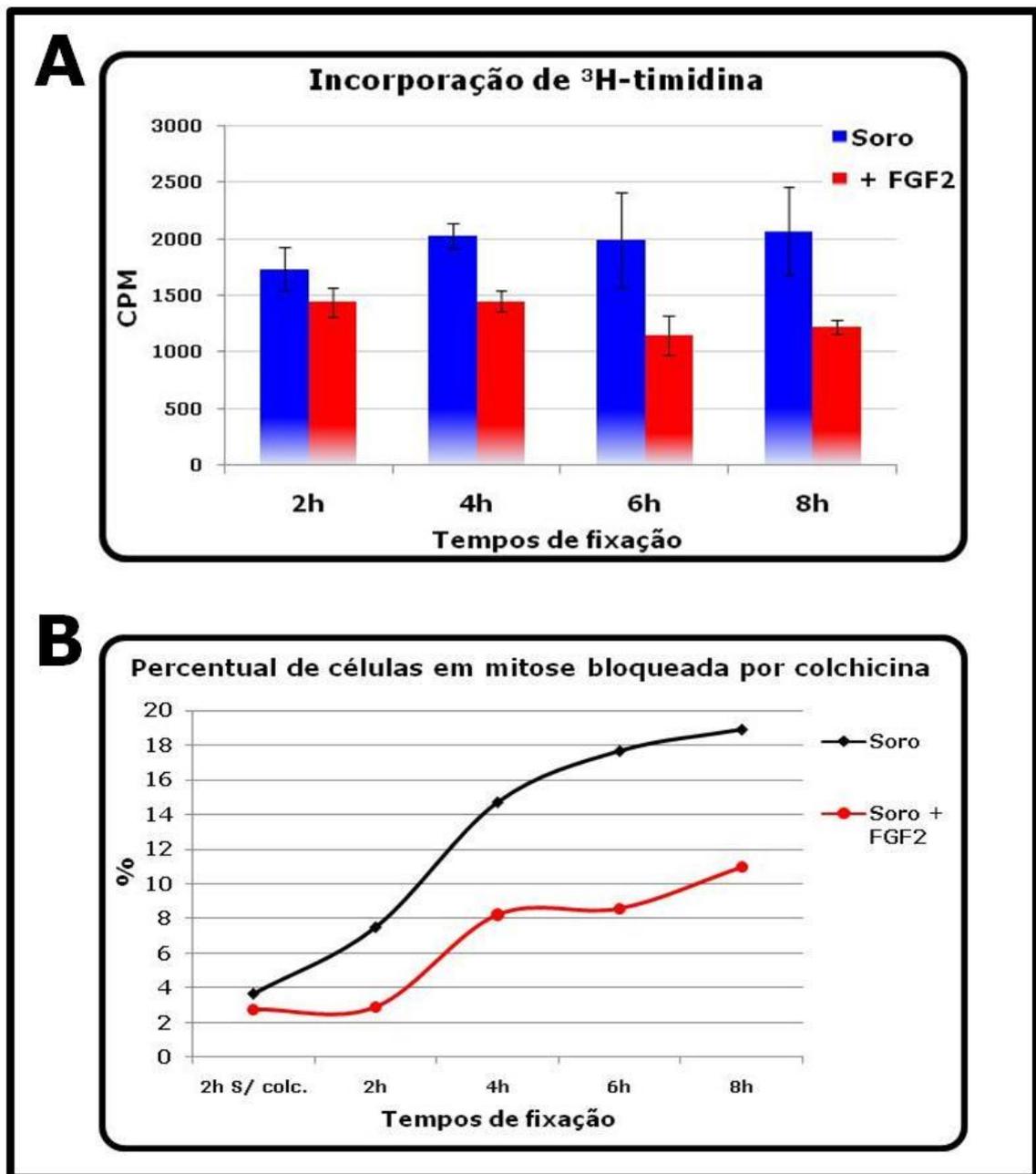


Figura 4.11 - Efeitos imediatos de FGF2 sobre o ciclo celular em Y1 D1G. **(A)** Medida de incorporação de ^3H -timidina. FGF2 10ng/ml foi adicionado às células em crescimento exponencial no tempo 0 (**+FGF2**). Como controle utilizamos amostras crescendo em FCS 10% (**Soro**). As amostras foram coletadas nos tempos descritos. ^3H -timidina foi adicionada 30 min. antes de cada coleta. **(B)** Medida de acumulação de células em mitose bloqueada por colchicina. FGF2 10ng/ml foi adicionado às células em crescimento exponencial no tempo 0 (**+FGF2**). Como controle utilizamos amostras crescendo em FCS 10% (**Soro**). Colchicina $2\mu\text{M}$ foi adicionada também no tempo 0. As amostras foram coletadas nos tempos descritos. Como índice mitótico inicial utilizamos amostras coletadas em 2 horas sem colchicina. A determinação das células em mitose foi feita pela marcação com anti-histona H3 fosforilada, medida por citometria de fluxo. A quantificação foi feita utilizando o programa *WinMDI 2.9*. 20000 células foram analisadas.

4.4 - Em células Y1 D1G, FGF2 “desconecta” crescimento de proliferação

Resultados anteriores de nosso grupo utilizando células Y1 já demonstravam que FGF2 é capaz de bloquear a proliferação de células malignas dependentes de Ras (Costa *et al.*, 2008), e os resultados até aqui apresentados utilizando a sub-linhagem Y1 D1G, comprovam o que foi feito e refinam a caracterização desse fenômeno. Uma característica interessante desta ação de FGF2 sobre as células malignas testadas é o fato de que, apesar de bloquear a proliferação, FGF2 ainda que na ausência de soro, é capaz de desempenhar sua função clássica de fator de crescimento e disparar a transição G0→G1→S nessas células. Para melhor examinar esse efeito antagônico de estimulação de crescimento e bloqueio de proliferação, buscamos analisar a influência de FGF2 no crescimento propriamente dito das células Y1 D1G.

Análises da população celular por citometria de fluxo medindo o espalhamento de luz frontal (FS - *Forward Scatter*) versus o espalhamento de luz lateral (SS - *Side Scatter*), parâmetros que juntos fornecem informações sobre tamanho e complexidade interna da célula (Givan, 2011), mostraram que, em células Y1 D1G reestimuladas após carenciamento, FGF2 com ou sem soro causa um importante aumento nestes dois parâmetros ao longo do tempo após a estimulação, deslocando a população observada no *dot plot* em relação ao controle

estimulado apenas com soro, indicando um aumento do tamanho médio da população celular (Figura 4.12).

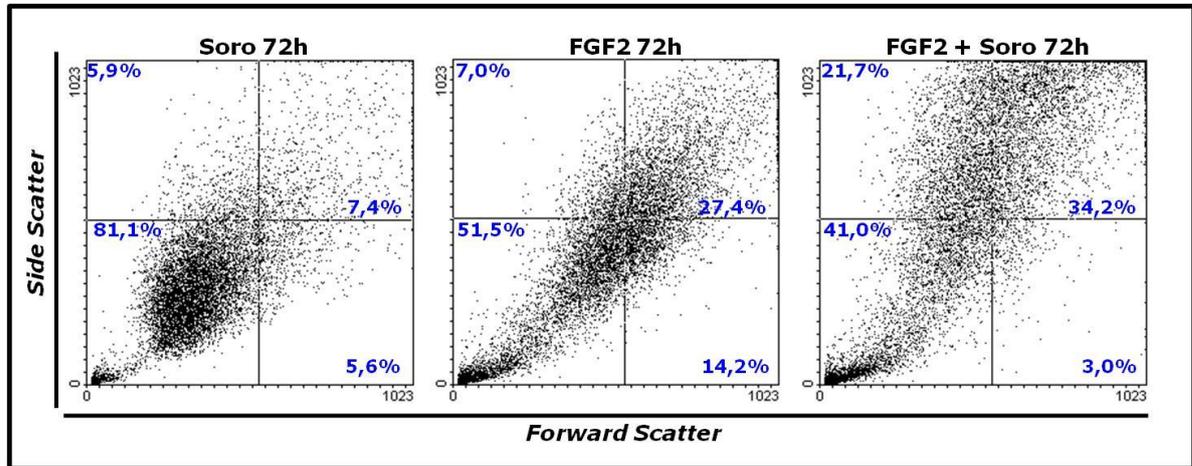


Figura 4.12 - Efeito de FGF2 sobre o tamanho médio das células Y1 D1G. Citometrias de fluxo comparando perfis de tamanho e complexidade interna. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. A quantificação foi feita utilizando o programa *WinMDI 2.9*. 20000 células foram analisadas.

Para uma análise mais fina desse aumento, juntamente com uma medida de proliferação, reestimulamos com FGF2 com ou sem soro, células Y1 D1G previamente sincronizadas em G0, e realizamos uma curva de crescimento medindo a quantidade e o tamanho médio das células em intervalos de 2 horas até 48 horas. As medidas foram feitas em contador de partículas automático e os resultados mostraram claramente que, em relação ao número total de células, só nas amostras controle estimuladas apenas por soro houve proliferação celular. Com o número de células passando de aproximadamente 3×10^5 no momento do reestímulo para aproximadamente 8×10^5 após 48 horas. A estimulação por FGF2 sozinho não levou a proliferação alguma e a própria presença de FGF2 junto ao

soro inibiu a proliferação observada quando apenas o soro foi adicionado, levando a uma quantidade final de células semelhante ao controle não estimulado (Figura 4.13 A). Por outro lado, quando observamos a variação do tamanho médio das células ao longo do tempo, podemos notar que FGF2 sozinho é capaz de aumentar o tamanho médio da população celular em relação ao controle não estimulado. As amostras estimuladas por soro com ou sem FGF2 apresentam um aumento progressivo no tamanho médio das células ao longo do tempo até aproximadamente 18 horas. Nesse ponto, nota-se que o tamanho médio das células estimuladas por FGF2 junto ao soro continua aumentando até 48 horas, indicando que o crescimento celular é mantido, apesar do bloqueio da transição G2/M; por outro lado, como se esperava o tamanho médio das células estimuladas apenas por soro começa a diminuir, devido à divisão mitótica que gera duas células filhas menores que a mãe, levando à diminuição do tamanho celular médio na população (Figura 4.13 B).

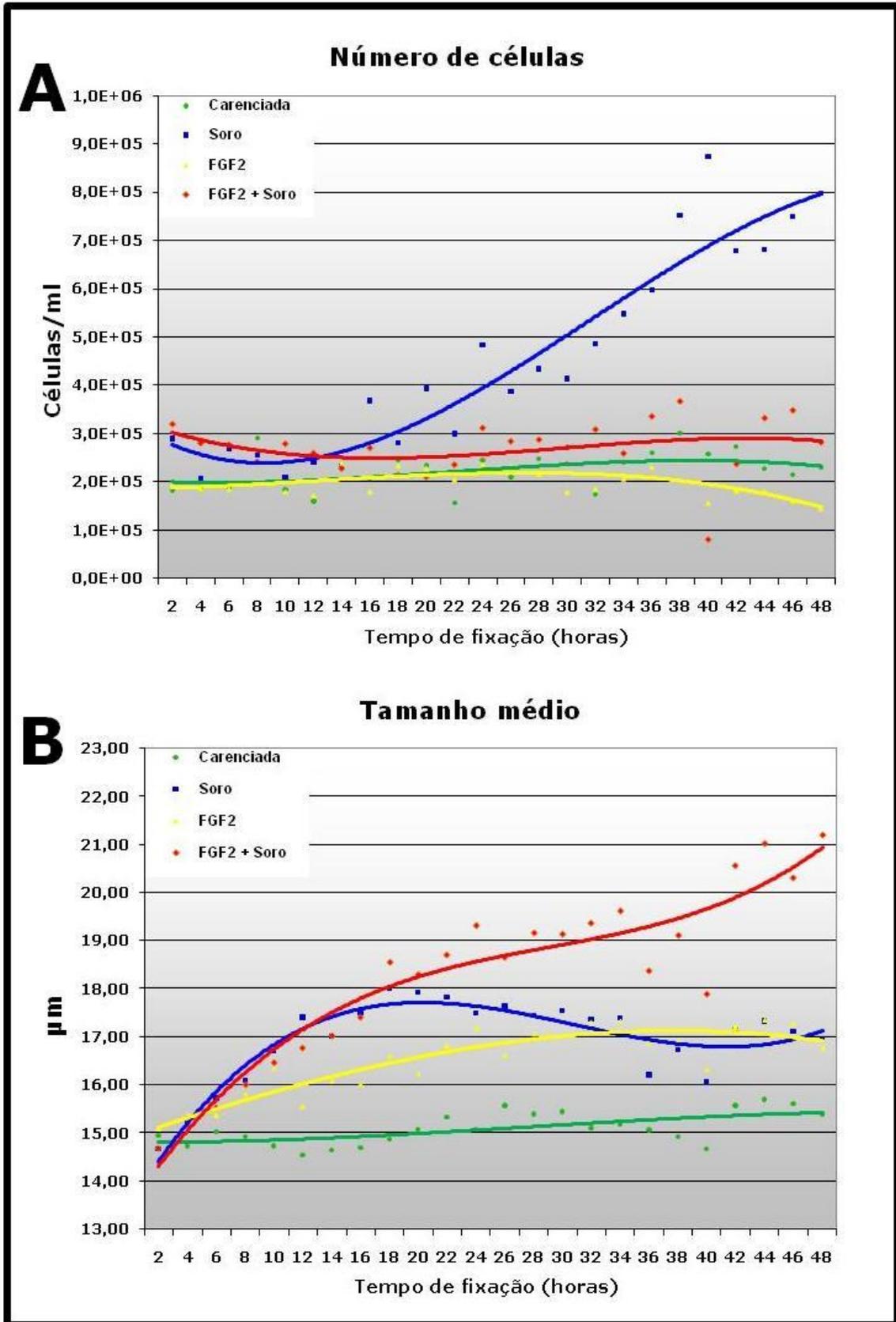


Figura 4.13 - Medidas de proliferação e tamanho médio de células Y1 D1G. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Mantendo-se um controle de células não reestimuladas

(**Carenciada**). As amostras foram coletadas a cada 2 horas até 48 horas após o reestímulo; e o número de células (**A**) e tamanho médio (**B**) foram medidos utilizando o contador de partículas *Z2 Coulter*[®].

Outra abordagem que pode ser utilizada é a medida de crescimento celular em termos de quantidade de proteínas totais/célula. Para analisar se e como FGF2 afeta essa relação, utilizamos células carenciadas que reestimulamos com soro na presença ou não de FGF2. As amostras foram coletadas em 48 e 72 horas após o reestímulo, e medimos o tamanho médio das células em cada condição, bem como a quantidade de proteína total e de células por placa para estabelecer tal relação. Como esperado, o tamanho médio das células estimuladas também por FGF2 é significativamente maior que o observado nas amostras estimuladas apenas por soro. Além disso, a presença de FGF2, como anteriormente visto, inibe drasticamente a proliferação das células D1G em relação ao controle estimulado apenas por soro, tanto em 48 quanto em 72 horas. Apesar disso, a medida de proteína total/placa revela quantidades semelhantes de proteína entre as amostras independente da presença ou não de FGF2 nos dois tempos. Sendo assim, ao observarmos a relação proteínas totais/célula entre as amostras, podemos notar que tanto em 48 quanto em 72 horas, a presença de FGF2 é capaz de dobrar tal relação, comprovando que embora a proliferação esteja bloqueada por esse fator, o crescimento celular continua acontecendo. Esses dados estão reunidos na figura 4.14.

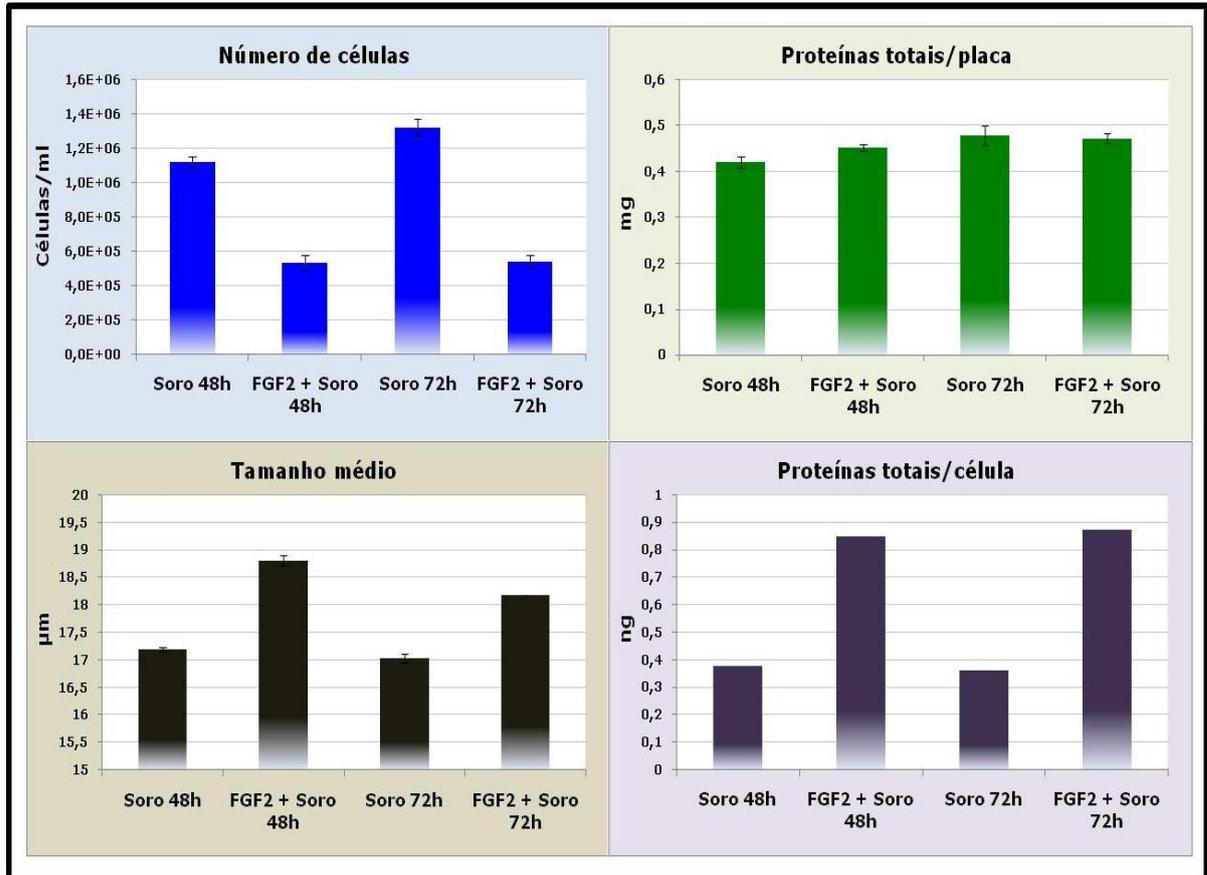


Figura 4.14 - Medidas de proteínas totais/célula em Y1 D1G. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas condições e tempos indicados. **Soro**=FCS 10 ou **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. O número de células e o tamanho médio foram determinados utilizando o contador de partículas Z2 Coulter[®]. A quantidade de proteínas totais/placa foi determinada pelo método de Bradford.

Juntos esses resultados comprovam que, em células Y1 D1G, FGF2 desempenha um efeito dual; bloqueando a proliferação destas células, mas ao mesmo tempo promovendo o crescimento celular em termos de massa e volume. Sendo assim, FGF2 desacopla o crescimento celular da divisão celular propriamente dita.

4.5 - FGF2 induz instabilidade genotípica e morte celular em células Y1 D1G

A instabilidade genotípica é sem dúvida uma das características mais marcantes de células tumorais; freqüentemente contribuindo para a “seleção natural” que leva a evolução dos tumores (Campbell *et al.*, 2010; Khong & Restifo, 2002). No que se refere à linhagem Y1, é sabido há mais de trinta anos que essas células apresentam um cariótipo sub diplóide muito estável, que contem cromossomos marcadores exibindo grandes regiões HSR (*Homogeneously Stained Regions*) (George & Francke, 1980). Essa complexa aneuploidia deve ser resultado da seleção clonal ocorrida no tumor original desenvolvido no camundongo e/ou da seleção clonal intencionalmente feita pelos autores (Yasumura *et al.*, 1966), que originalmente isolaram a linhagem clonal Y1. O cariótipo subdiploide com os cromossomos marcadores m1 e m2, originalmente descrito em George & Francke (1980) foi também observado, largamente documentado e seguidamente confirmado por 30 anos em nosso laboratório (Kimura & Armelin, 1988; Matos *et al.*, manuscrito em preparação). É importante lembrar que os estoques das linhagens Y1 e derivadas são mantidas congeladas em N₂ líquido, sendo periodicamente descongelados para fins de experimentação. No conjunto, esses dados sugerem que a evolução para o fenótipo maligno estável apresentado pela linhagem Y1, envolveu a seleção de uma configuração aneuplóide robusta que mantém a estabilidade fenotípica destas células.

Na observação rotineira de células Y1 D1G estimuladas por FGF2, freqüentemente nos chama a atenção o progressivo aparecimento de uma diversidade de células com morfologia bastante aberrante. Partindo do precoce e característico arredondamento das células nas primeiras horas para o surgimento tardio de agregados celulares, grande variação de tamanho, e presença de células aparentemente binucleadas. Como bloqueios do ciclo celular após a fase S muitas vezes levam ao aumento da quantidade de células com conteúdo de DNA maior que G2/M e/ou poliploidização (Qiao *et al.*, 2008; Strathdee *et al.*, 2001), procuramos verificar se o bloqueio causado por FGF2 poderia estar induzindo tais eventos nas células Y1 D1G. Comprometendo assim aquela estabilidade genotípica citada acima.

Para tal, utilizamos células Y1 D1G carenciadas que reestimulamos com soro na presença ou não de FGF2, e medimos por citometria de fluxo a porcentagem de células com conteúdo de DNA maior que G2/M em 48, 72 e 96 horas após o reestímulo. Os resultados mostraram que já em 48 horas a porcentagem de células com conteúdo de DNA maior que G2/M (5,52%), é aproximadamente duas vezes maior nas amostras estimuladas em presença de FGF2 em relação ao controle reestimulado apenas por soro. Esse percentual ainda aumenta em 72 horas após o reestímulo (7,11%), mas diminuí após 96 horas, indicando que essa alteração genotípica pode estar inviabilizando as células (Figura 4.15 A e B).

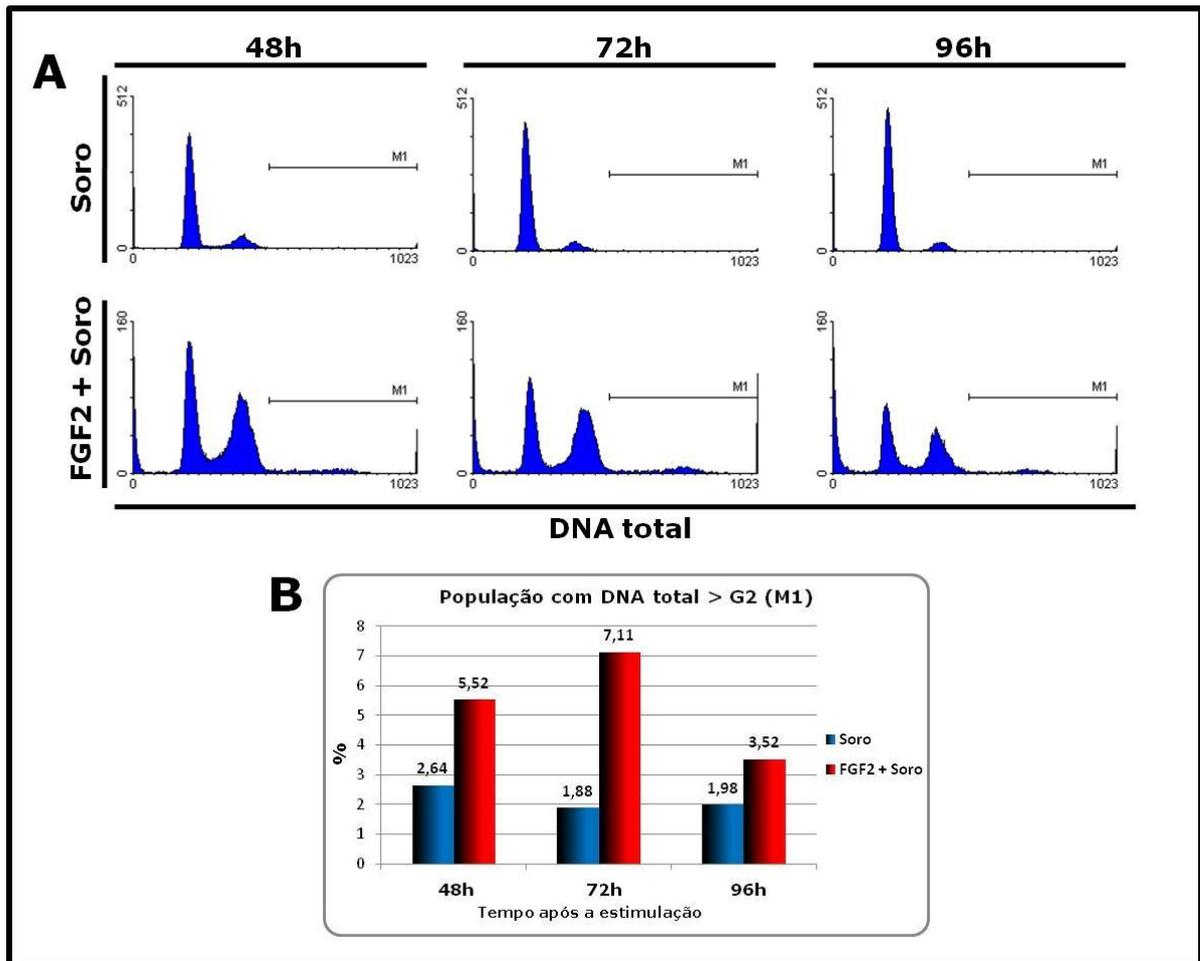


Figura 4.15 - Determinação da população com conteúdo de DNA maior que G2/M. (A) Citometrias de fluxo comparando perfis de ciclo celular nas condições descritas. As células Y1 D1G foram previamente carenciadas e reestimuladas por **Soro**=FCS 10% ou **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10% pelos tempos indicados. (B) Quantificação do experimento acima. A quantificação foi feita utilizando o programa *Cylchred 1.0.2* utilizando o marcador (M1) como mostrado na figura. 20000 células foram analisadas.

Recentemente, a *entosis*, uma espécie de “canibalismo celular” onde uma célula viva é englobada por outra, tem se mostrado bastante comum em linhagens tumorais *in vitro*. Sendo inclusive descrita tanto como um mecanismo de morte celular quanto como uma causa de aneuploidia (Overholtzer *et al.*, 2007; Krajcovic *et al.*, 2011). Devido às observações de que o estímulo por FGF2 provoca em células Y1 D1G a formação de

aglomerados celulares e também induz aumento da quantidade de células com DNA total maior que G2/M, decidimos verificar se esse fator poderia estar induzindo *entosis* nessas células. Os resultados obtidos por microscopia confocal, analisando amostras estimuladas por FGF2 com ou sem soro em 48 ou 72 horas após o reestímulo, evidenciaram a grande variação no tamanho das células e dos núcleos nas amostras estimuladas por FGF2, bem como a presença freqüente de células binucleadas. Entretanto, apesar da formação de agregados celulares, não foram evidenciadas estruturas características de *entosis* nas amostras observadas (Figura 4.16).

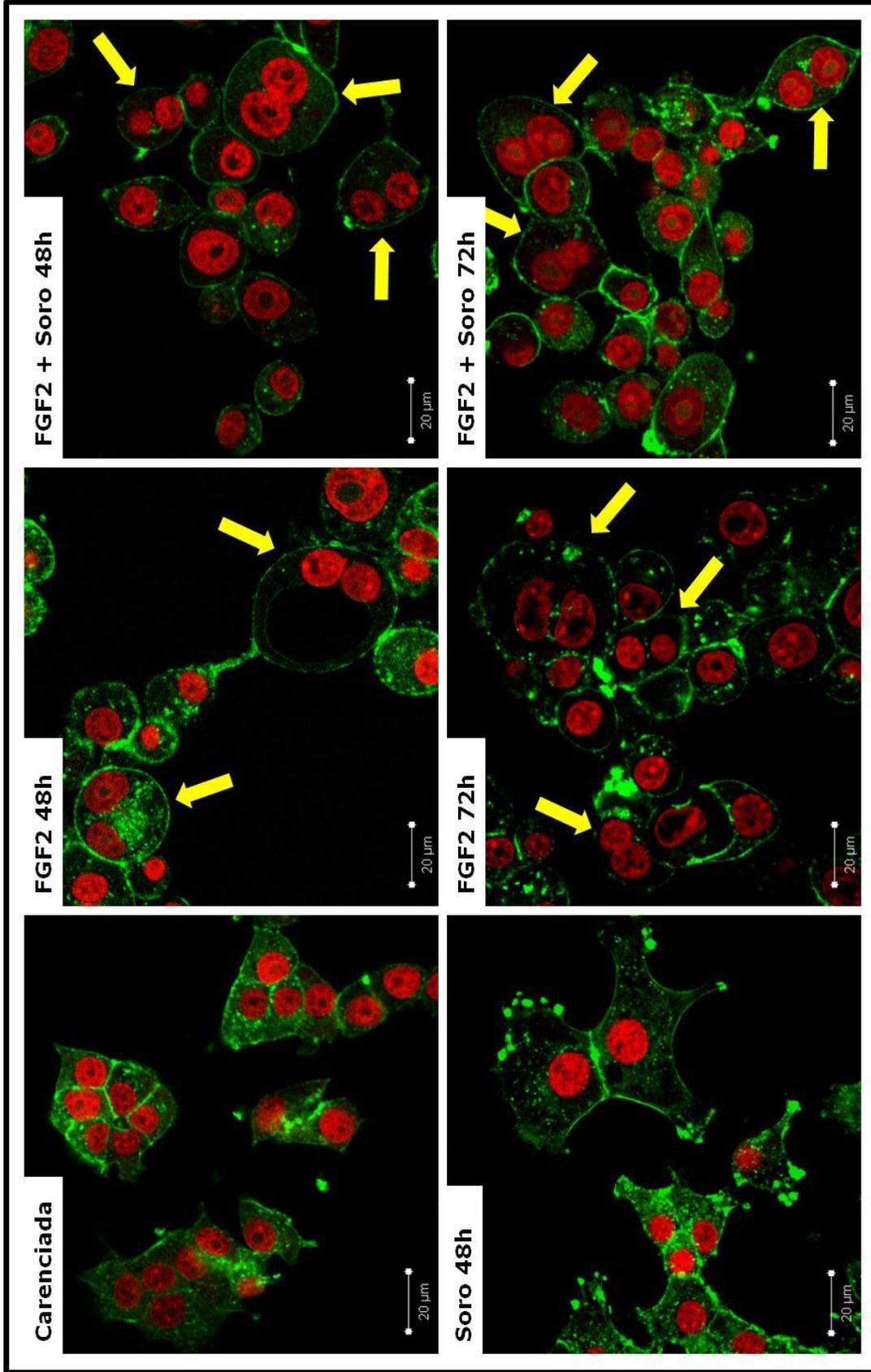


Figura 4.16 - Microscopia confocal de células Y1 D1G sob efeito de FGF2. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: Soro=FCS 10%; FGF2=FCS 10%; FGF2+Soro=FCS 10% + FCS 10% + FGF2 10ng/ml; FGF2+Soro=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Mantendo-se um controle de células não reestimuladas (Carenciada). Os núcleos estão marcados em vermelho; e actina está marcada em verde. As setas indicam células binucleadas.

Durante a descrição realizada até aqui dos efeitos antiproliferativos disparados por FGF2, algumas observações, como por exemplo a diminuição do número de células ao longo da curva de crescimento e do percentual de células com DNA total maior G2/M entre 72 e 96 horas, indicam que em Y1 D1G, FGF2 causa de imediato o bloqueio da divisão celular e tardia e secundariamente morte celular propriamente dita. Para verificar se isso está realmente ocorrendo, submetemos amostras de células Y1 D1G reestimuladas por soro com ou sem FGF2 a um ensaio de exclusão de iodeto de propídio (PI). Onde células não permeabilizadas são colocadas em suspensão na presença desse marcador de DNA, que irá penetrar apenas em células que perderam a integridade da membrana plasmática; ou seja, em processo avançado de morte celular. Os resultados demonstram que, em Y1 D1G, já após 48 horas de estímulo, FGF2 provoca aumento de morte celular em relação ao controle; efeito esse que é gradualmente acentuado em 72 horas e 96 horas após o reestímulo. Medimos também o percentual de morte celular 72 horas após o reestímulo por FGF2 sem soro, e este se mostrou também bastante aumentado em relação à amostra não reestimulada ou mesmo reestimulada por soro (Figura 4.17 A e B).

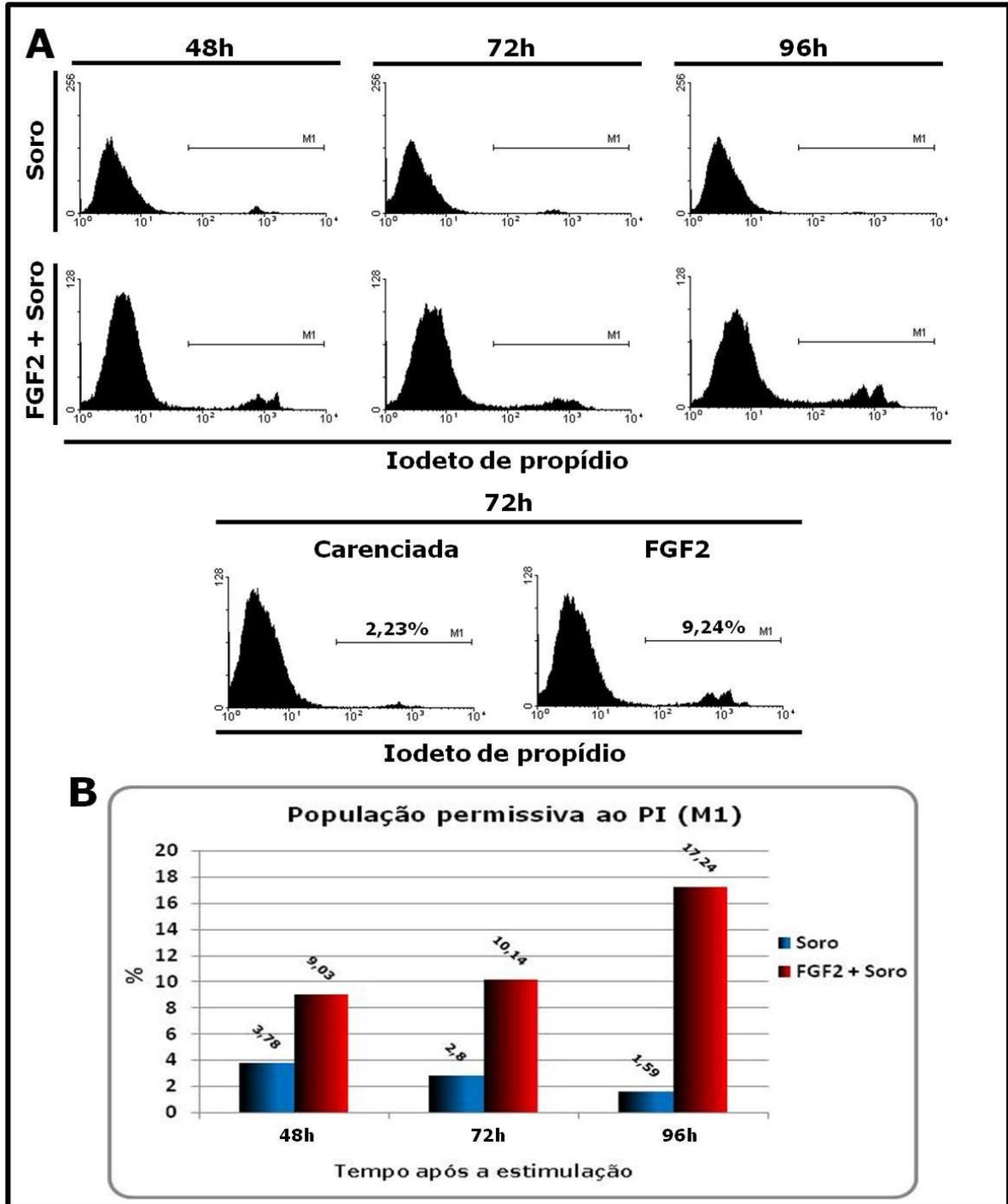


Figura 4.17 - Ensaio de exclusão de iodeto de propídio. (A) As células Y1 D1G foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%, **FGF2**=FGF2 10ng/ml e **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10% pelos tempos indicados e analisadas por citometria de fluxo. Mantendo-se um controle de células não reestimuladas (Carenciada). **(B)** Quantificação do experimento acima. A quantificação foi feita utilizando o programa *Cylchred 1.0.2* utilizando o marcador (M1) como mostrado na figura. 20000 células foram analisadas.

Uma vez que o ensaio de exclusão de PI marca a apenas células em processo avançado de morte celular, especialmente células necróticas; decidimos observar se FGF2 também dispara nessas células a fragmentação de DNA que é característica de processos apoptóticos. E que pode ser facilmente evidenciada pelo surgimento de uma população com conteúdo de DNA total menor que G0/G1, em análises de ciclo celular por citometria de fluxo. Para tal, utilizamos os mesmos tempos e tratamentos descritos acima, porém as células foram permeabilizadas e processadas como descrito anteriormente nos métodos desse trabalho. Além de corroborar a morte celular mostrada nos resultados de exclusão de PI acima descritos, as medidas de fragmentação de DNA, apontam em todos os tempos de tratamento uma taxa de morte celular induzida tardiamente por FGF2 muito maior do que a observada levando em conta apenas a perda de integridade da membrana plasmática. Mostrando novamente um aumento gradual no número de células com conteúdo de DNA menor que G0/G1 (mortas) ao longo dos tempos de tratamento. Novamente comparamos amostras estimuladas por FGF2 sem soro com amostras não reestimuladas e observamos que também FGF2 sem soro aumenta as taxas de fragmentação de DNA em relação ao controle não reestimulado ou reestimulado com soro (Figura 4.18 A e B).

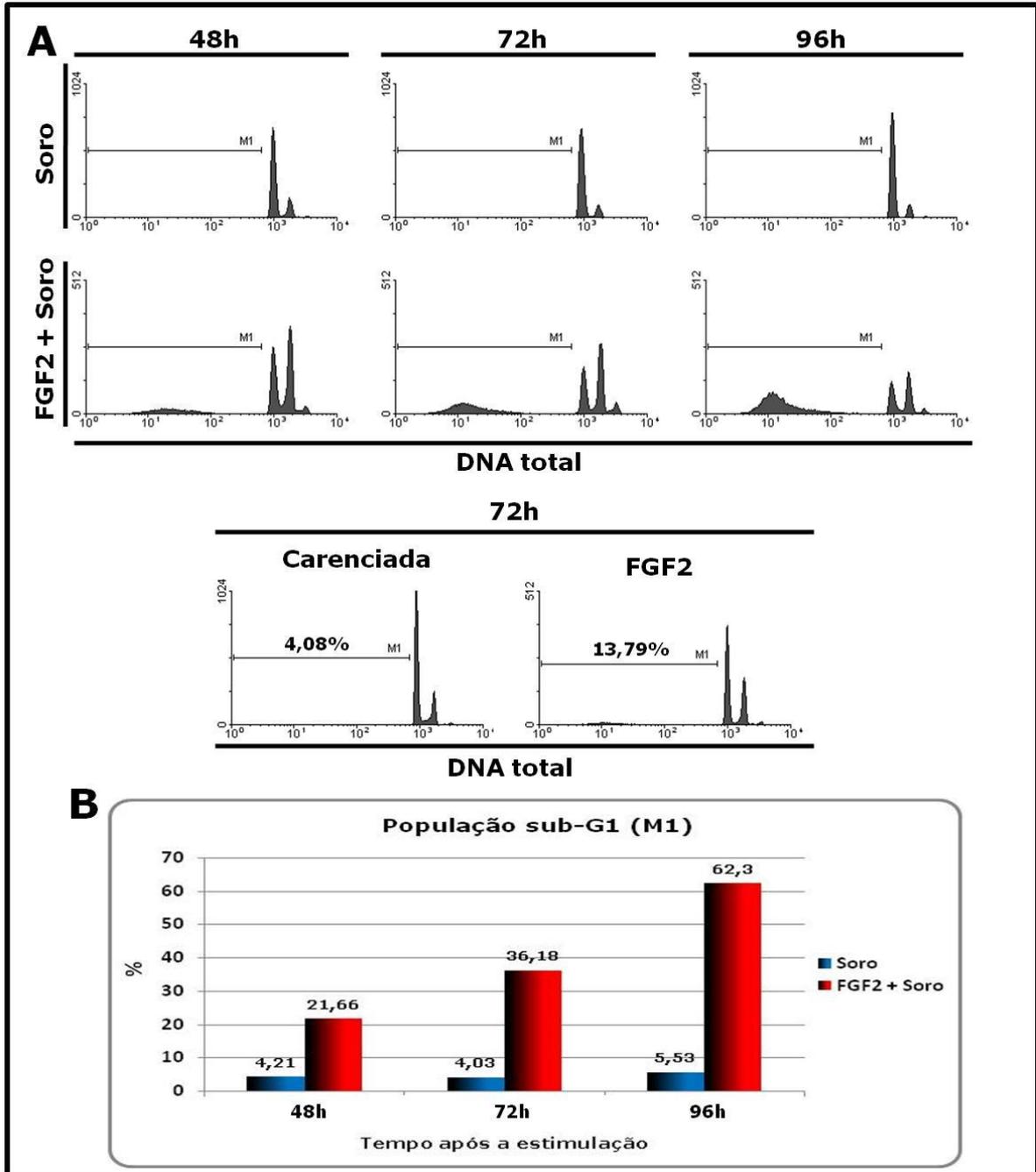


Figura 4.18 - Determinação da população sub-G1 em Y1 D1G sob efeito de FGF2. (A) As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%, **FGF2**=FGF2 10ng/ml e **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10% pelos tempos indicados e analisadas por citometria de fluxo. Mantendo-se um controle de células não reestimuladas (Carenciada). **(B)** Quantificação do experimento acima. A quantificação foi feita utilizando o programa *Cylchred 1.0.2* utilizando o marcador (M1) como mostrado na figura. 20000 células foram analisadas.

Esse conjunto de resultados demonstra que, em células Y1 D1G, o efeito de bloqueio da divisão celular sem bloqueio de crescimento das células disparado por FGF2, resulta gradativamente na morte das células afetadas. Possivelmente com grande envolvimento de processos apoptóticos, a julgar pelas altas taxas de fragmentação de DNA observadas nas amostras estimuladas em presença desse fator.

4.6 - Mecanismos moleculares da ação de FGF2 sobre o controle da progressão no ciclo celular

Descrevemos até aqui o efeito tóxico antiproliferativo disparado por FGF2 nas células malignas Y1 D1G. Entretanto, para caminhar rumo a uma explicação mecanística-molecular para tais efeitos, é necessário entender como FGF2 afeta componentes da maquinaria de controle do ciclo celular. Comentamos no início da descrição dos resultados desta tese, que as sub-linhagens Y1 D1 apresentam um controle estrito de quiescência/proliferação, conferido pela expressão constitutiva de ciclina D1. Nessas células, assim como em Y1, a transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ está provavelmente sendo governada pelos níveis de ciclina E (Schwindt *et al.*, 2003; Forti & Armelin 2007). Sendo assim, inicialmente medimos os níveis dessa ciclina em células Y1 D1G reestimuladas por soro, FGF2 ou ambos após carenciamento. Os resultados observados para o estímulo com soro são bastante coerentes; mostrando um aumento dos níveis de ciclina E em 8 horas, seguido de uma queda em 12 horas e de um novo aumento

em 24 horas, que pode ser entendido como relativo a um segundo ciclo. No entanto, ao observarmos as amostras estimuladas por FGF2 com ou sem soro, podemos notar que o aumento nos níveis de ciclina E ocorre mais tarde, apenas em 12 horas; e tal aumento se mantém até 24 horas, coerente com o atraso da progressão no ciclo celular (entrada e progressão em S) que mostramos anteriormente devido ao efeito de FGF2 (Figura 4.19).

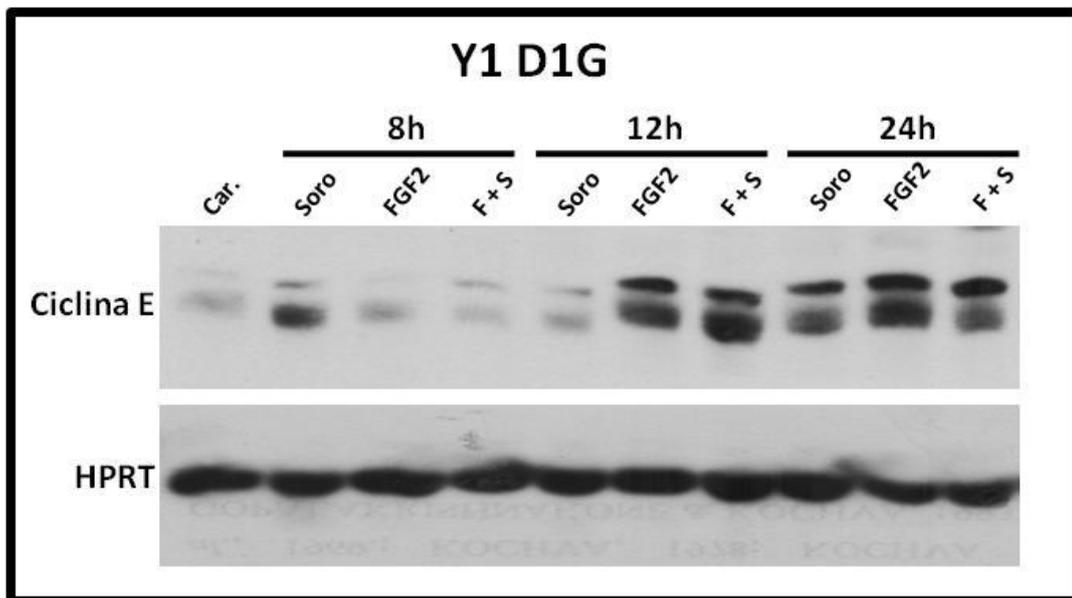


Figura 4.19 - Cinética de expressão de ciclina E em Y1 D1G. *Western blot* comparando a expressão de ciclina E entre os estímulos ao longo do tempo. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas pelos tempos indicados nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Foi mantido um controle de células não reestimuladas (**Car.**). A expressão de HPRT está sendo usada como controle.

Uma vez que ciclina A é também descrita como parte fundamental do controle de progressão durante a fase S (Revisado em; Malumbres & Barbacid, 2009), procuramos determinar se sua expressão é modulada por FGF2 em células Y1D1G. Os resultados mostraram que os níveis de

ciclina A aumentam consideravelmente entre 8 e 12 horas nas três condições de estímulo; o que é coerente com o esperado para esse momento do ciclo. Por outro lado, ao observarmos as amostras coletadas em 24, 48 e 72 horas, podemos notar níveis bastante aumentados de ciclina A nas amostras estimuladas por FGF2 com ou sem soro em relação ao controle (Figura 4.20). Embora o crescimento celular não esteja bloqueado, ciclina A faz parte da maquinaria que controla a progressão no ciclo celular; sendo assim, tal acumulação de ciclina A, pode estar relacionada ao atraso da progressão em S e bloqueio em G2 impostos por FGF2 ao ciclo dessas células malignas.

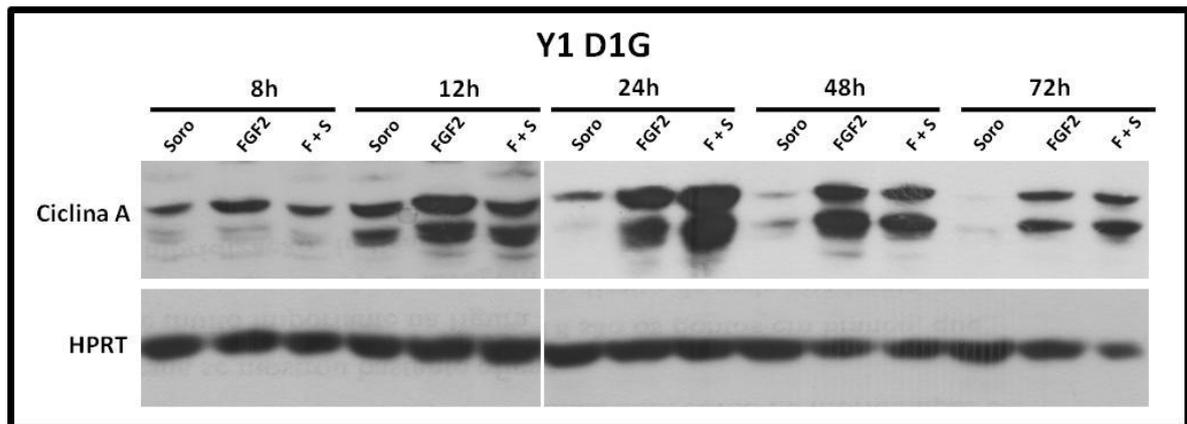


Figura 4.20 - Cinética de expressão de ciclina A em Y1 D1G. *Western blot* comparando a expressão de ciclina A entre os estímulos ao longo do tempo. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas pelos tempos indicados nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. A expressão de HPRT está sendo usada como controle. Entre 8-12 horas e 24-72 horas são experimentos independentes.

Tendo em vista que os inibidores de complexos ciclina/CDK (CKIs) podem atuar como "freios" do ciclo celular, participando da execução de *checkpoints* e inibindo a progressão do ciclo quando existe sinalização

para tal (Sherr & Roberts, 1999), nos pareceu bastante provável que o efeito antiproliferativo disparado FGF2 envolvesse aumento dos níveis protéicos desses inibidores. Sendo p21 um dos principais CKIs, capaz de inibir complexos ciclina/CDK importantes para a transição G1→S e para a progressão em S, e freqüentemente implicado na execução de mecanismos antiproliferativos (Fang *et al.*, 1999), decidimos analisar os níveis dessa proteína nas células Y1 D1G sob efeito de FGF2. Os resultados mostram que FGF2 com ou sem soro induz fortemente o aumento dos níveis de p21 em 24 e 48 horas em relação às amostras estimuladas apenas com soro; e esse aumento é mantido também em 72 horas após a estimulação (Figura 4.21 A). Dada a importância dessa associação entre o estímulo por FGF2, e a aumento dos níveis de uma proteína classicamente envolvida em mecanismos antiproliferativos, resolvemos analisar se o mesmo também ocorreria na linhagem parental Y1. Como podemos ver na figura 4.21 B, a mesma indução do aumento dos níveis de p21 também é vista nas amostras de Y1 nos tempos testados.

Esses resultados demonstram que o efeito tóxico de FGF2 envolve modulação dos níveis de algumas proteínas-chave do controle de progressão no ciclo; com acumulação de ciclina E e ciclina A, e aumento nos níveis do inibidor de complexos ciclina/CDK p21. Entretanto, apesar disso e do bloqueio de proliferação, não há bloqueio do crescimento celular.

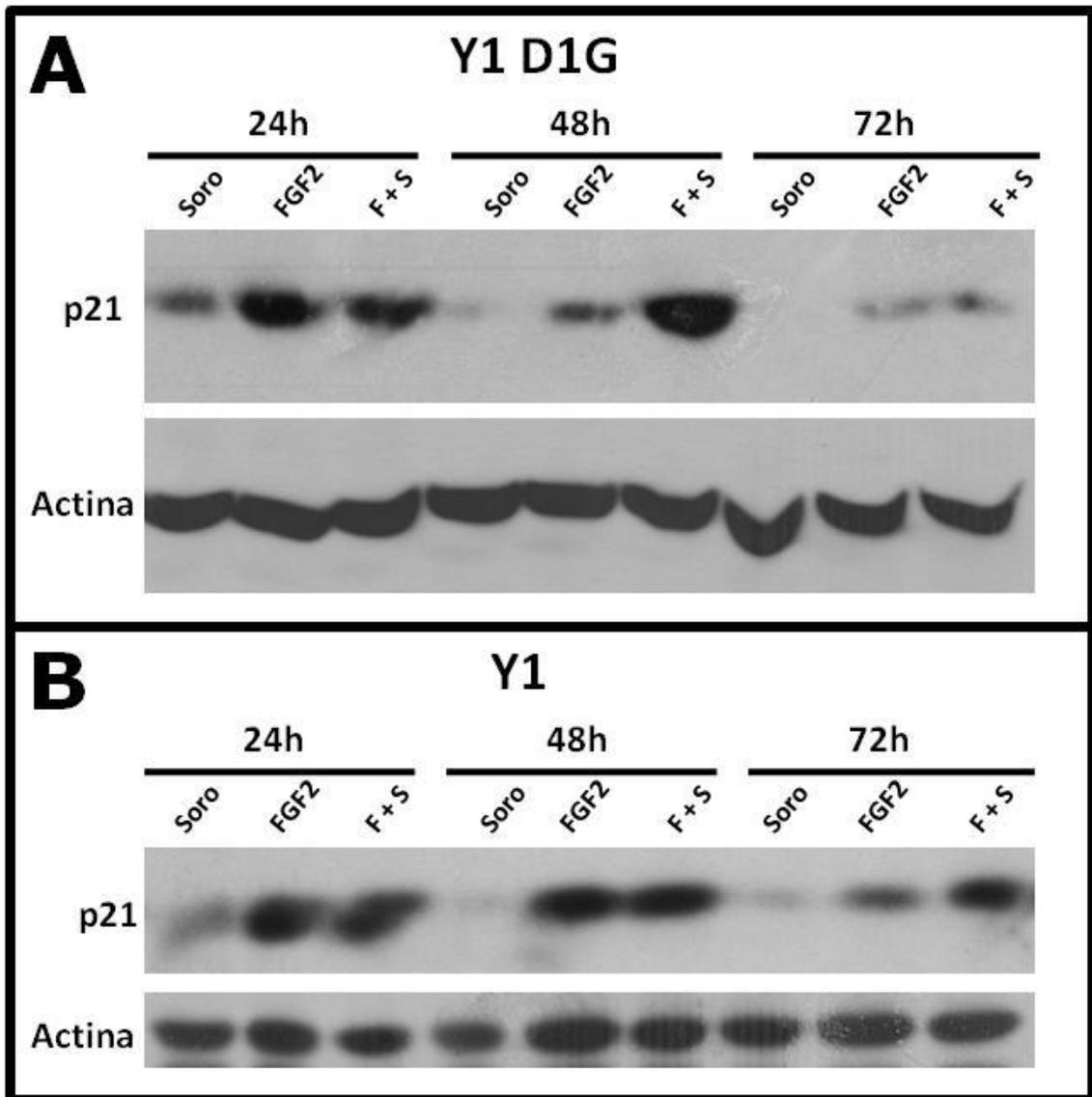


Figura 4.21 - Cinética de expressão de p21 em Y1 D1G e Y1. *Western blot* comparando a expressão de p21 entre os estímulos ao longo do tempo. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas pelos tempos indicados nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. A expressão de actina está sendo usada como controle. **(A)** Foram utilizados lisados de células Y1 D1G; **(B)** Foram utilizados lisados de células Y1.

4.7 - FGF2 induz resposta a dano no DNA em Y1 e Y1 D1G

Mostramos até aqui, utilizando células Y1 D1G, que o efeito antiproliferativo disparado por FGF2 inclui, entre outras coisas, aumento da expressão de p21, atraso na progressão durante a fase S; bloqueio do ciclo celular em G2 e morte celular. Tais características são freqüentemente vistas como consequência da ativação de uma resposta a dano no DNA (DDR). Uma vez que essa resposta pode ser disparada pelo surgimento de estruturas atípicas durante a replicação (Bartkova *et al.*, 2005), e FGF2 é capaz de perturbar a fase S das células malignas dependentes de Ras testadas, decidimos verificar se FGF2 estaria disparando uma DDR nessas células. Para tal, medimos inicialmente em nossas amostras os níveis de γ -H2AX, um dos principais marcadores dessa resposta. (Bartkova *et al.*, 2005). Os resultados das análises por *Western blot* mostraram que as amostras estimuladas por FGF2, com ou sem soro, possuem maiores níveis de γ -H2AX em comparação ao controle estimulado apenas por soro, especialmente em 48 e 72 horas após o reestímulo (Figura 4.22 A). Para corroborar tais resultados, analisamos também os níveis de γ -H2AX após estímulo por FGF2 no clone Y1 D1F e na linhagem Y1. A exemplo do clone Y1 D1G, o clone Y1 D1F apresenta altos níveis de γ -H2AX tanto 24 como em 48 horas quando estimulado por FGF2 em relação ao controle estimulado apenas por soro (Figura 4.22 B). Além disso, os níveis de p21, que também é tido como um participante da DDR, estão também aumentados em Y1 D1F em 24 e 48 horas após o estímulo por FGF2 (Figura 4.22 B), como observado na linhagem Y1 e no

clone Y1 D1G. No caso da linhagem Y1, embora menos evidente, também é possível notar um aumento nos níveis de γ -H2AX em 48 e 72 horas nas amostras estimuladas por FGF2 em relação ao controle; mas apenas quando estimulação é feita por FGF2 sem soro (Figura 4.23).

Sendo p53 o clássico ativador da expressão de p21 e também um marcador de DDR, verificamos se a ativação dessa proteína, caracterizada por fosforilação do resíduo Serina 15, estaria ocorrendo em nossas amostras em razão do estímulo por FGF2. Os resultados para a sub-linhagem Y1 D1G mostraram uma forte fosforilação de p53 apenas no ponto de 24 horas após o reestímulo por FGF2 sozinho, mas não na presença de soro; não houve sinal de p53 fosforilado em 48 e 72 horas (Figura 4.22 A). Quando analisamos a linhagem Y1 quanto à fosforilação de p53, observamos novamente que apenas a estimulação por FGF2 sem soro promove tal fosforilação, que não é vista após estímulo por FGF2 com soro. Entretanto, diferentemente do observado em Y1 D1G, essa fosforilação pode ser vista apenas em 48 e 72 horas após o reestímulo; e não em 24 horas (Figura 4.23).

Esses resultados demonstram que a estimulação por FGF2 é capaz de ativar uma DDR nas linhagens testadas, caracterizada pelo aumento dos níveis de γ -H2AX e também de p21. A contribuição de p53 para o andamento de tal resposta, no entanto, está afastada pelos resultados apresentados; uma vez que, enquanto os níveis de γ -H2AX e p21 estão aumentados em relação ao controle na estimulação por FGF2 com ou sem

soro, os níveis de p53 fosforilado na Serina 15 se mostraram aumentados apenas em amostras estimuladas por FGF2 sem soro. Impossibilitando a implicação de p53 como responsável pelo aumento dos níveis de p21 nesse caso.

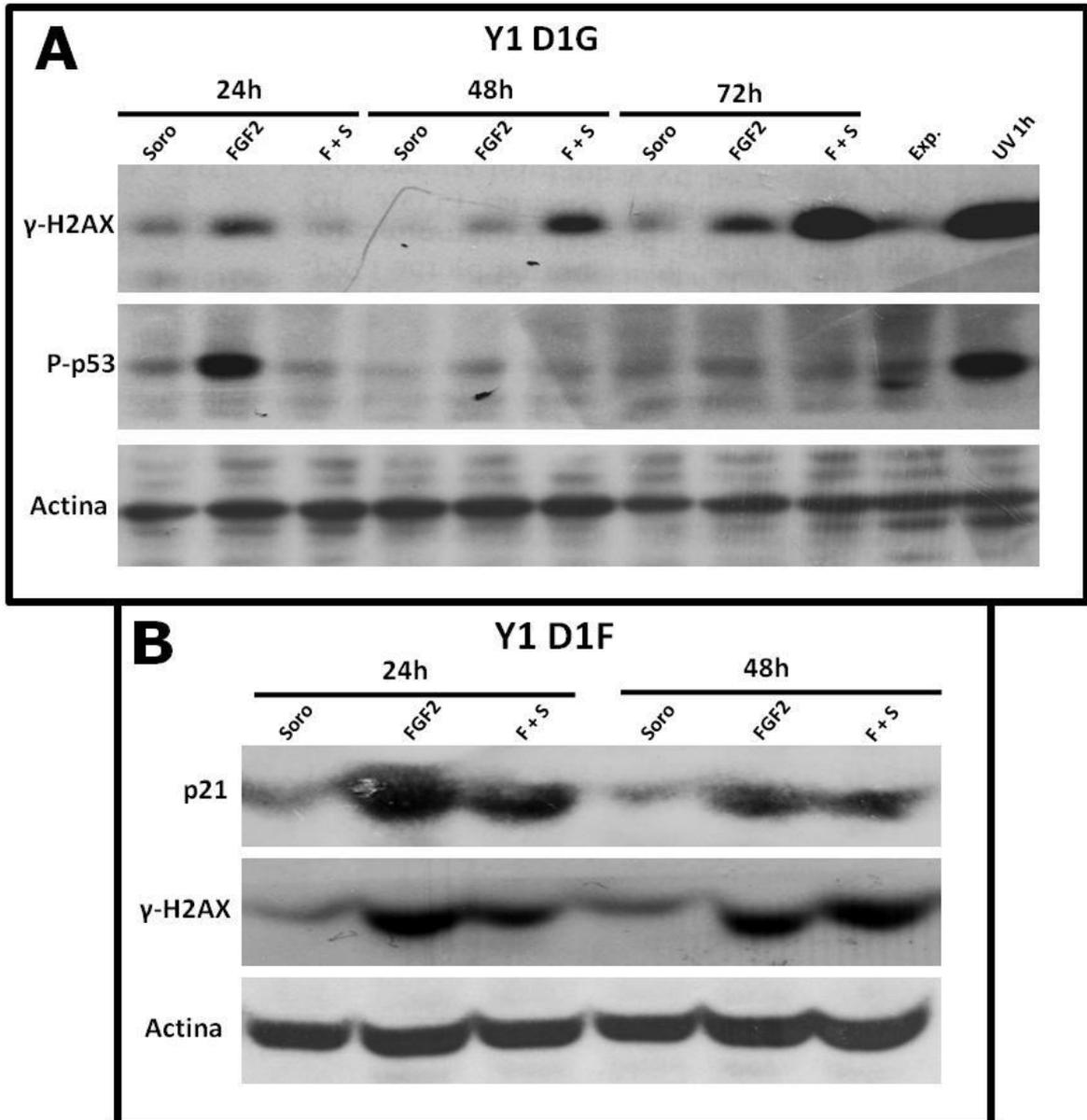


Figura 4.22 - Marcadores de DDR em células Y1 D1 sob efeito de FGF2. **(A)** *Western blot* comparando os níveis de fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ -H2AX), e de p53 na serina 15 (p-p53) entre os estímulos ao longo do tempo em células Y1 D1G. Utilizamos como controle positivo células irradiadas por 10 minutos e coletadas após uma hora (UV 1h); e células em crescimento exponencial como controle negativo (Exp.). **(B)** *Western blot*

comparando os níveis de expressão de p21 e de fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ -H2AX), entre os estímulos ao longo do tempo em células Y1 D1F. Tanto em (A) como em (B) as células foram previamente carenciadas e reestimuladas pelos tempos indicados nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. A expressão de actina está sendo usada como controle.

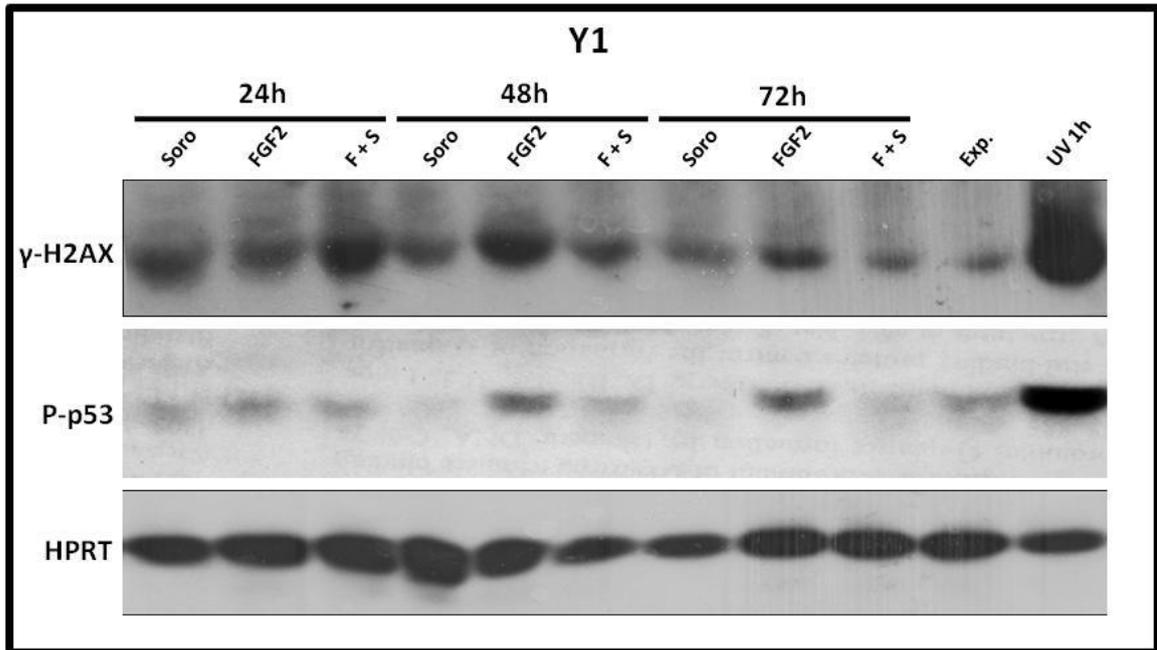


Figura 4.23 - Marcadores de DDR em células Y1. *Western blot* comparando os níveis de fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ -H2AX), e de p53 na serina 15 (p-p53) entre os estímulos ao longo do tempo em células Y1. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas pelos tempos indicados nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. Utilizamos como controle positivo células irradiadas por 10 minutos e coletadas após uma hora (UV 1h); e células em crescimento exponencial como controle negativo (Exp.) A expressão de HPRT está sendo usada como controle.

4.8 - FGF2 também induz a expressão de p21 e ciclina A, além da fosforilação da histona H2AX, em células Y1 D1G e Y1 resistentes a FGF2

Os efeitos tóxicos disparados por FGF2 sobre células malignas dependentes de Ras que temos estudado se mostraram bastante

abrangentes dentro das populações celulares, restringindo por completo a proliferação e resultando gradativamente na morte das células estimuladas. Entretanto, foi possível selecionar em nosso laboratório a partir das células Y1 e Y1 D1G, clones resistentes aos efeitos antiproliferativos de FGF2 (Y1 FRs e Y1 D1G FRs). Tais clones, além de não sofrerem os efeitos tóxicos de FGF2 passaram, durante a seleção, a depender da adição de FGF2 ao meio de cultura para proliferar. Além disso, tal seleção freqüentemente culmina em perda da superexpressão de Ras, inclusive com perda de sua amplificação gênica. (Tatiana G. F. Matos, tese de doutorado, 2007). Sendo assim, na busca por uma explicação mecânica para os efeitos tóxicos de FGF2 que temos observado, a utilização desses clones onde FGF2 age de maneira unicamente mitogênica, nos pareceu bastante promissora para efeitos de comparação com células que sofrem os efeitos antiproliferativos desse fator.

Mostramos anteriormente nesta tese, que FGF2 é capaz de induzir fortemente nas linhagens testadas o acúmulo de ciclina A e p21, proteínas que fazem parte do "core" da maquinaria de controle do ciclo celular. A fim de verificar se tais acumulações estariam atenuadas ou mesmo ausentes nas células Y1 FRs e Y1 D1G FRs, apontando para uma correlação entre a acumulação dessas proteínas e o bloqueio de ciclo causado por FGF2, analisamos por *western blot* os níveis de ciclina A e p21 em clones de Y1 e Y1 D1G resistentes a FGF2 reestimulados após carenciamento. Os resultados surpreendentemente mostraram que, a exemplo do que ocorre em células que sofrem o efeito tóxico de FGF2,

este fator também provoca o aumento nos níveis tanto de ciclina A, como de p21 nesses clones em que a resposta ao FGF2 é puramente mitogênica (Figura 4.24).

Mostramos também acima, que FGF2 induz nas linhagens testadas a ativação de uma DDR, que freqüentemente é implicada em bloqueios de proliferação e/ou morte celular (Revisado por Harper & Elledge, 2007), e poderia estar contribuindo para o fenótipo que estamos observando em função do estímulo por FGF2. Para verificar se a ativação de uma DDR causada pela estimulação por FGF2 está ausente nas células Y1 FR e Y1 D1G FR, medimos também por *western blot* os níveis de γ -H2AX e P-p53 (Ser15) nesses clones reestimulados após carenciamento. Os resultados mostraram que, também nessas células resistentes, FGF2 com ou sem soro promove a ativação de uma DDR, caracterizada pelo aumento dos níveis de γ -H2AX em relação ao controle não estimulado. Curiosamente, mesmo a estimulação apenas por soro promoveu um aumento nos níveis de γ -H2AX nos clones de Y1 e Y1 D1G testados 48 horas após o reestímulo. Um aumento nos níveis de P-p53 (Ser15) foi observado apenas nas células Y1 FR quando estimuladas por FGF2 sozinho ou com soro. Esses resultados estão mostrados na figura 4.25.

A análise desses resultados demonstra que não há relação entre o acúmulo de ciclina A e p21 causado por FGF2, e o efeito antiproliferativo desencadeado por esse fator. Indicando que tais eventos são independentes. Além disso, o fato de FGF2 também desencadear a

ativação de uma DDR em clones resistentes aos seus efeitos tóxicos, descarta a implicação da DDR como principal mecanismo envolvido nos efeitos antiproliferativos disparados por FGF2.

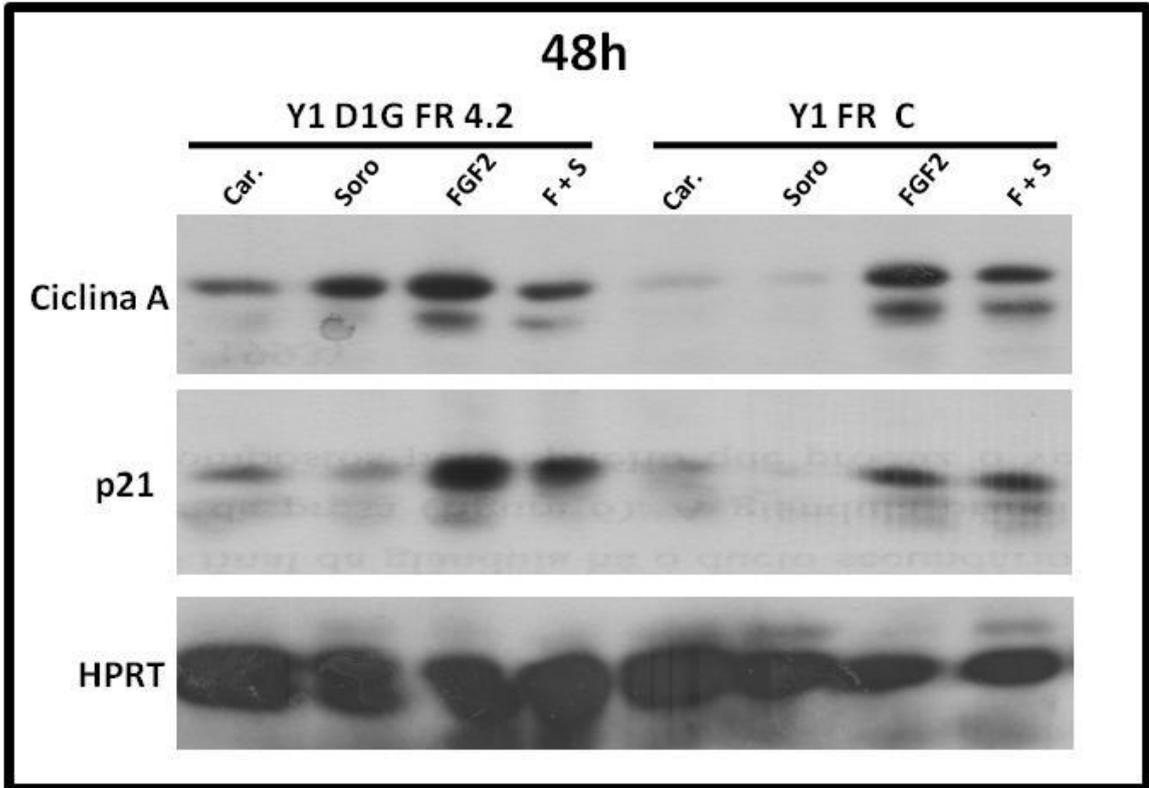


Figura 4.24 - Expressão de ciclina A e p21 em clones resistentes a FGF2 (FRs). *Western blot* comparando os níveis de expressão de ciclina A e p21 entre os estímulos em clones de Y1 D1G e Y1 resistentes a FGF2. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 48 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. A expressão de HPRT está sendo usada como controle.

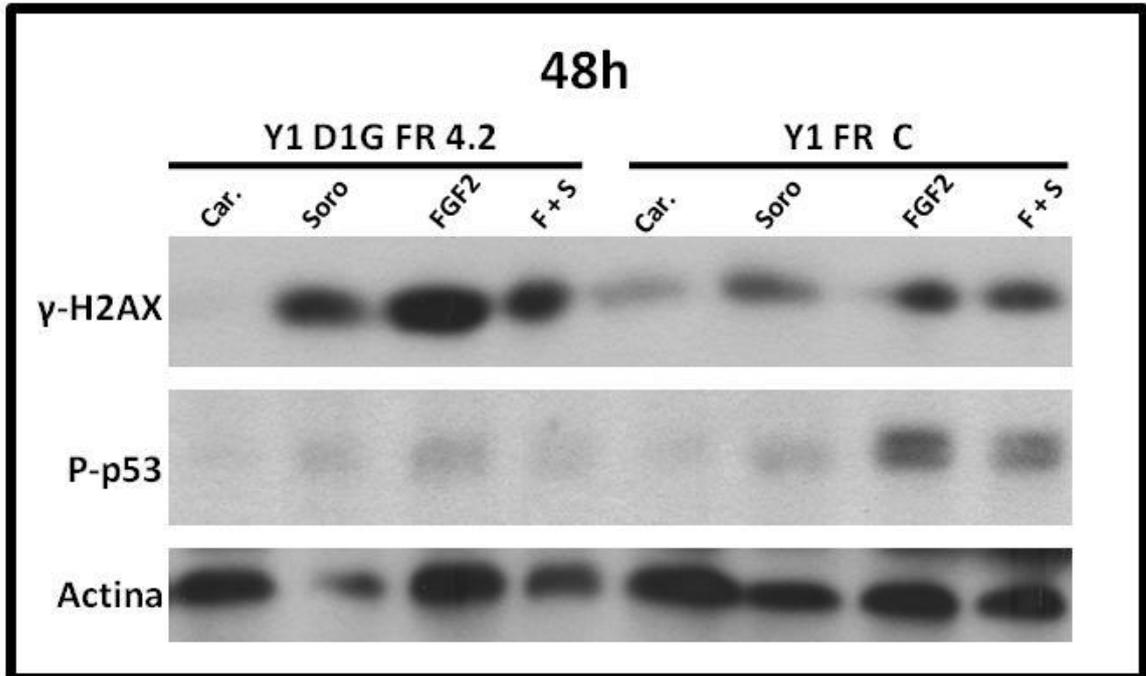


Figura 4.25 - Marcadores de DDR em clones resistentes a FGF2 (FRs). *Western blot* comparando os níveis de fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ -H2AX), e de p53 na serina 15 (p-p53) entre os estímulos em clones de Y1 D1G e Y1 resistentes a FGF2. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 48 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. A expressão de actina está sendo usada como controle.

4.9 - O efeito antiploriferativo de FGF2 pode ser revertido pela inibição de Src, mas não das vias de MAPK ou PI3K-Akt

Ainda em busca de avanços rumo a uma explicação mecanística-molecular para os efeitos antiproliferativos disparados por FGF2 em células malignas dependentes de Ras, voltamos nossa atenção para as vias de sinalização intracelular disparadas pela ligação de FGF2 ao seu receptor de membrana nas células Y1 D1G. Dados anteriores de nosso laboratório obtidos utilizando a linhagem Y1 apontavam para o fato de que a proteína Src, que faz parte do conjunto das principais vias de sinalização

ativadas pelo FGFR, parece desempenhar um papel relevante para o efeito tóxico disparado por FGF2. Uma vez que, em Y1, a inibição química dessa via proporcionou um efeito protetor parcial frente aos efeitos tóxicos de FGF2; o que não aconteceu nos casos de inibição química de outras vias classicamente ativadas por FGF2 (Salotti e Armelin, artigo submetido). Sendo assim, para confirmar e expandir esses dados, utilizamos células Y1 (devido a sua eficiência de plaqueamento em baixa densidade) para realizar medidas de viabilidade celular na presença de FGF2 por ensaio clonogênico, utilizando inicialmente inibidores de MEK, PI3K e do receptor de FGF. Como esperado, nem a inibição de MEK nem de PI3K foi capaz de proteger as células do efeito tóxico de FGF2, e o inibidor da quinase do FGFR aboliu tal efeito (Figura 4.26 A). Entretanto, ao realizarmos ensaios clonogênicos utilizando o inibidor de Src PP1, os resultados demonstram que esse inibidor protege totalmente as células Y1 do efeito tóxico de FGF2 medido por esse tipo de ensaio (Figura 4.26 B).

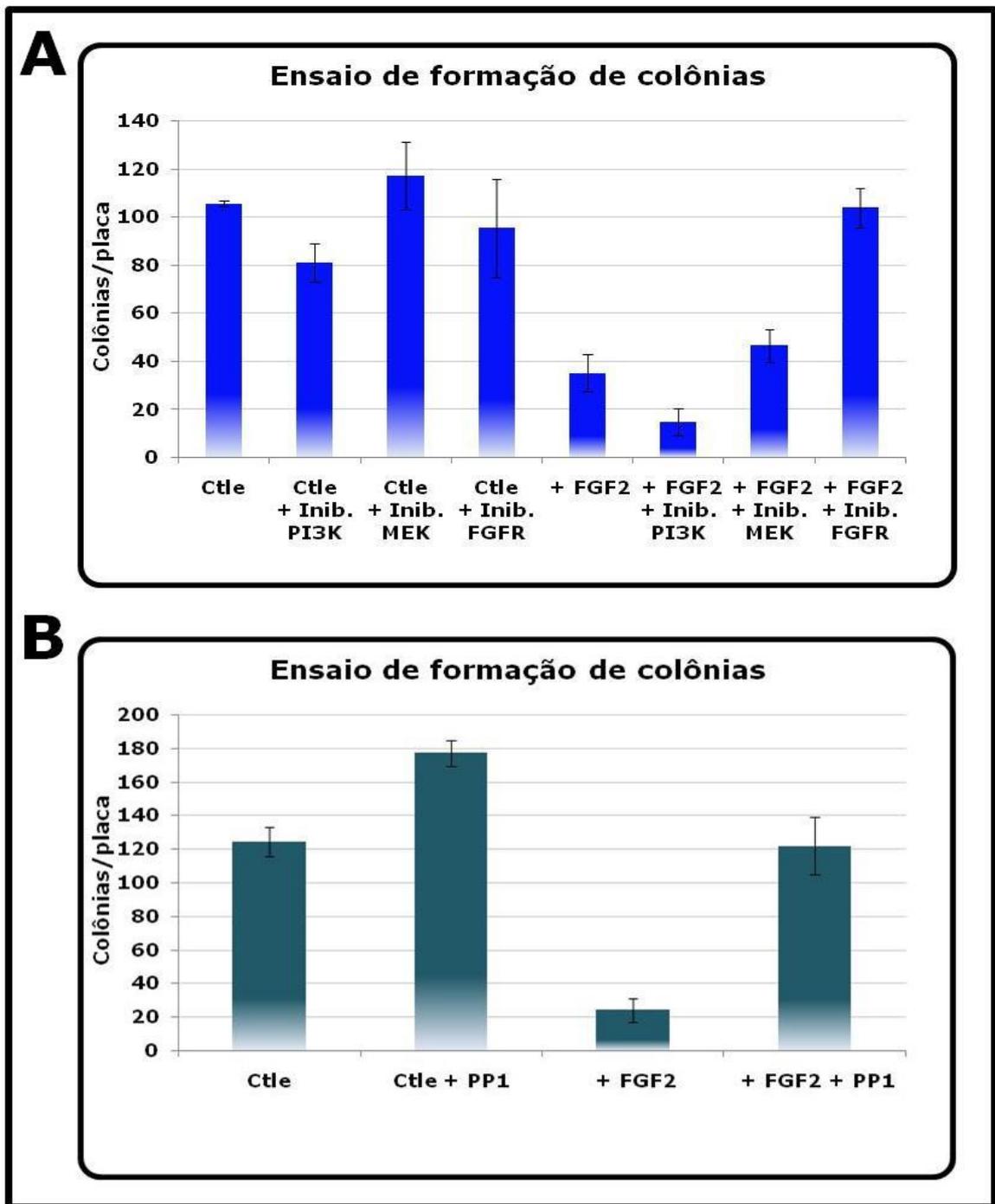


Figura 4.26 - Ensaio clonogênico em células Y1 com diferentes inibidores. (A). Ctle=FCS 10%; +FGF2=FCS 10%+FGF2 10ng/ml. Inibidores: inib. PI3K=LY 294002 20 μ M; inib. MEK=PD 98059 20 μ M; inib. FGFR=PD 173074 150nM. 1000 células foram plaqueadas para cada condição em triplicata. **(B)** Ctle=FCS 10%; +FGF2=FCS 10%+FGF2 10ng/ml. Inibidor de Src PP1 10 μ M. 1000 células foram plaqueadas para cada condição em triplicata.

Após isso, devido a essa proteção total contra os efeitos antiproliferativos de FGF2 apresentada apenas pelo inibidor de Src PP1, e não pelos inibidores de MEK e PI3K, em ensaios clonogênicos, buscamos verificar se o mesmo ocorre em medidas de proliferação. Utilizamos inicialmente amostras de células Y1 D1G não sincronizadas, e plaqueadas em meio ótimo na presença ou não de FGF2, com inibidores de MEK, PI3K ou do receptor de FGF. As medidas foram realizadas em 3 e 6 dias após o plaqueamento e, novamente como esperado, os resultados mostraram que a inibição de MEK ou de PI3K não protegem as células do efeito antiproliferativo de FGF2; e que a inibição da atividade da quinase do FGFR anula tal efeito (Figura 4.27 A). Para efeitos de comparação, realizamos o mesmo procedimento utilizando células Y1, onde os resultados obtidos foram bastante semelhantes (Figura 4.27 B). Em seguida, realizamos curvas de crescimento utilizando células Y1 D1G, com ou sem FGF2 e na presença ou não do inibidor de Src PP1. Os resultados mostraram que, embora o inibidor por si só diminua a proliferação dessas células, as amostras onde o FGF2 foi adicionado sem PP1 não apresentam proliferação alguma ao longo do experimento, ao passo que as amostras onde o FGF2 foi adicionado em presença do inibidor, apresentam uma taxa de proliferação igual à observada no controle com PP1 sem FGF2 (Figura 4.28 A). Novamente, realizamos o mesmo procedimento utilizando a linhagem Y1, onde os resultados foram outra vez semelhantes ao observado em Y1 D1G. Mais que isso, a presença de FGF2 inclusive

aumenta a proliferação das células em presença de PP1, quando comparado ao controle com PP1 e sem FGF2 (Figura 4.28 B).

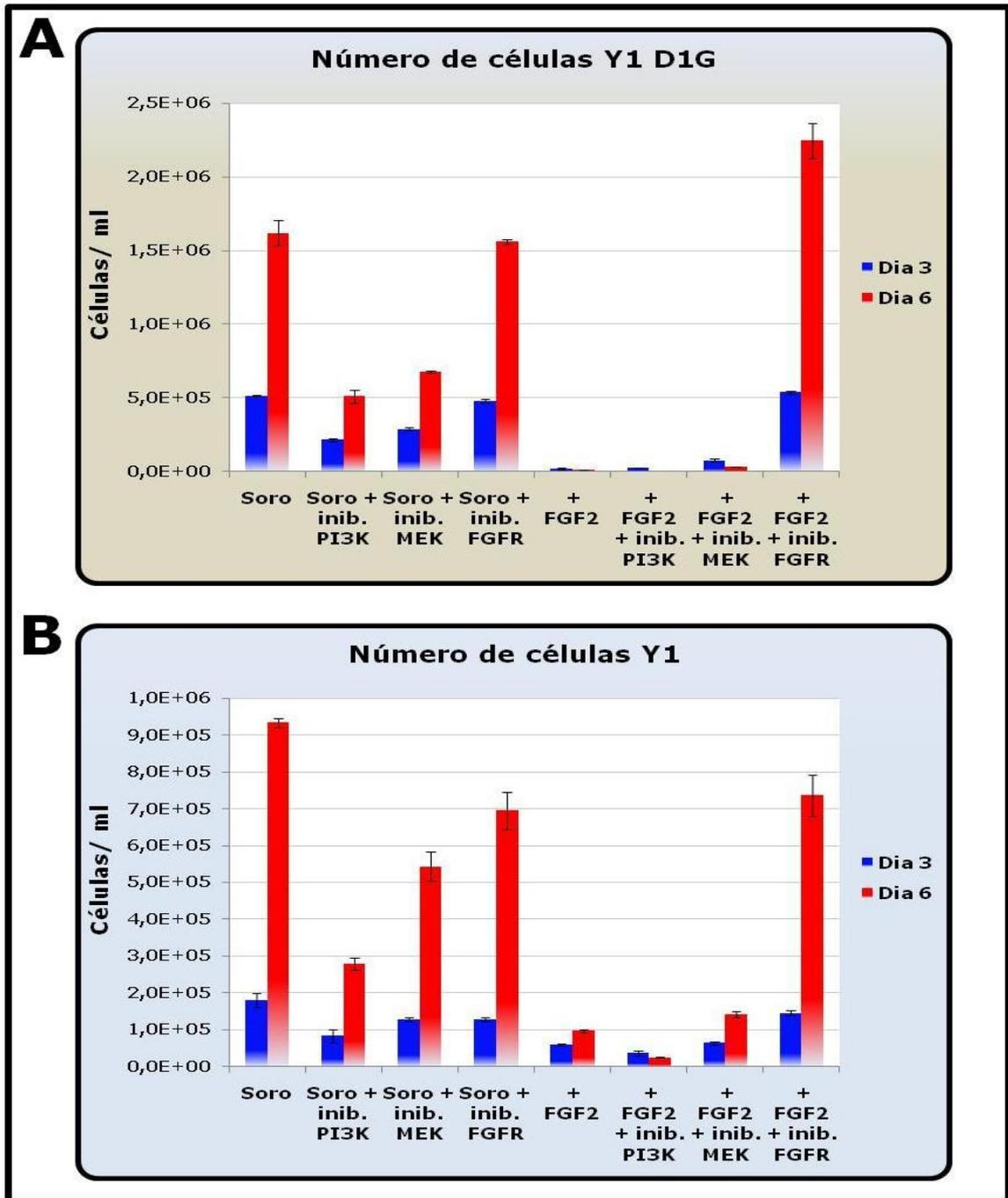


Figura 4.27 - Medidas de proliferação de células Y1 D1G e Y1 com diferentes inibidores. Soro=FCS 10%; +FGF2=FCS 10%+FGF2 10ng/ml. Inibidores: inib. PI3K=LY 294002 20 μ M; inib. MEK=PD 98059 20 μ M; inib. FGFR=PD 173074 150nM. No dia 0, as células foram plaqueadas para cada condição em triplicata. As amostras foram coletadas e contadas no dias

indicados. **(A)** Células Y1 D1G (100000 células plaqueadas). **(B)** Células Y1 (50000 células plaqueadas).

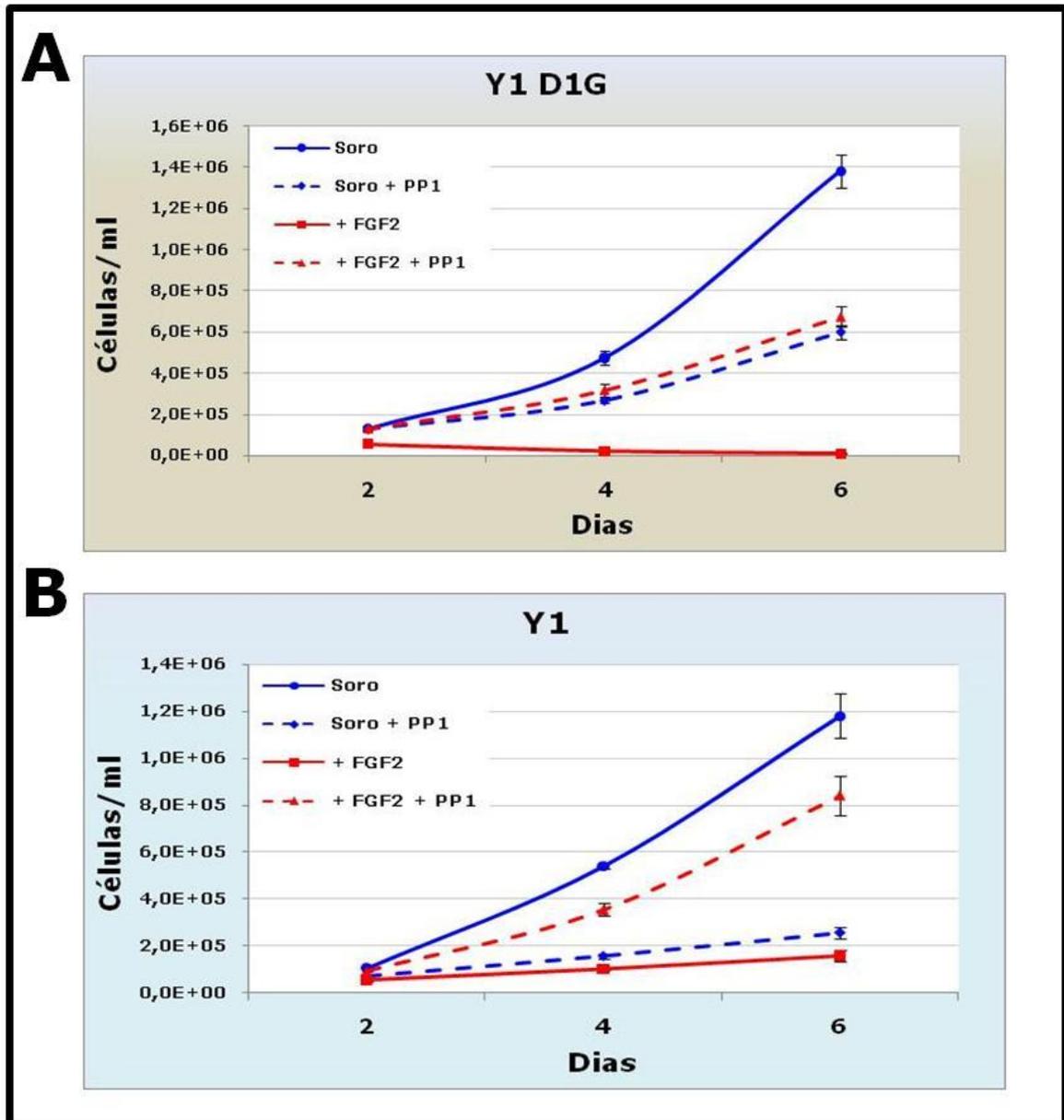


Figura 4.28 - Curvas de crescimento com inibidor de Src PP1. Soro=FCS 10%; +FGF2=FCS 10%+FGF2 10ng/ml. Inibidor de Src PP1 10 μ M. No dia 0, 50000 células foram plaqueadas para cada condição em triplicata. As amostras foram coletadas e contadas no dias indicados. **(A)** Células Y1 D1G. **(B)** Células Y1.

Observamos ainda que o inibidor de Src PP1 impede parcialmente as alterações morfológicas observadas em Y1 D1G, 48 horas após o reestímulo na presença de FGF2 (Figura 4.29).

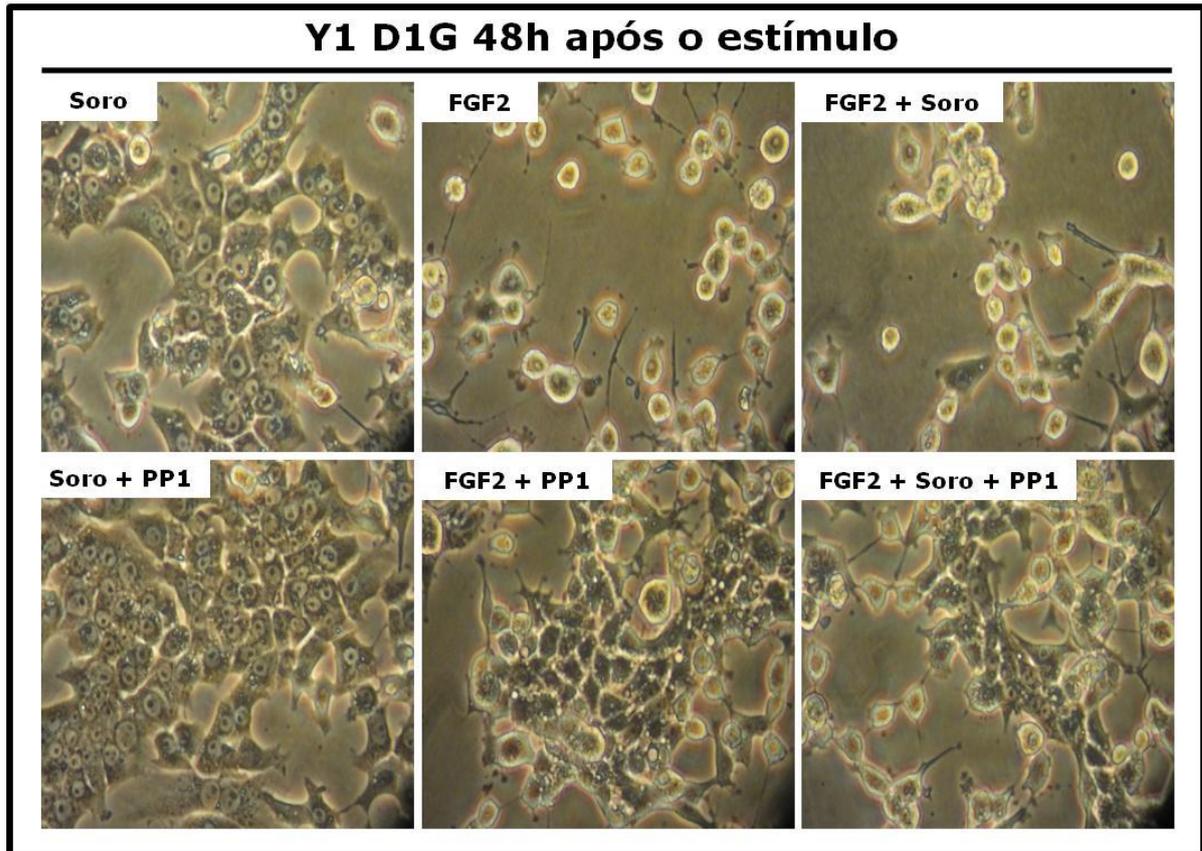


Figura 4.29 - Fotomicrografias de células Y1 D1G com inibidor de Src. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 48 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. 10 μ M do inibidor de Src PP1 foi adicionado uma hora antes do reestímulo quando indicado.

Frente à proteção total observada com o inibidor de Src PP1 contra os efeitos antiproliferativos disparados por FGF2 em Y1 D1G, questionamos se o aumento nos níveis de ciclina A e p21, além da ativação de DDR, anteriormente vistos poderiam estar atenuados ou abolidos nas células estimuladas por FGF2 em presença desse inibidor. Para responder a essa questão realizamos experimentos de *western blot*, cujos resultados mostrados na figura 4.30, demonstram que o inibidor PP1 não impede a acumulação nem de ciclina A nem tampouco de p21 nas amostras

estimuladas por FGF2 com ou sem soro; os níveis de γ -H2AX, entretanto, foram consideravelmente diminuídos pela presença do inibidor de Src.

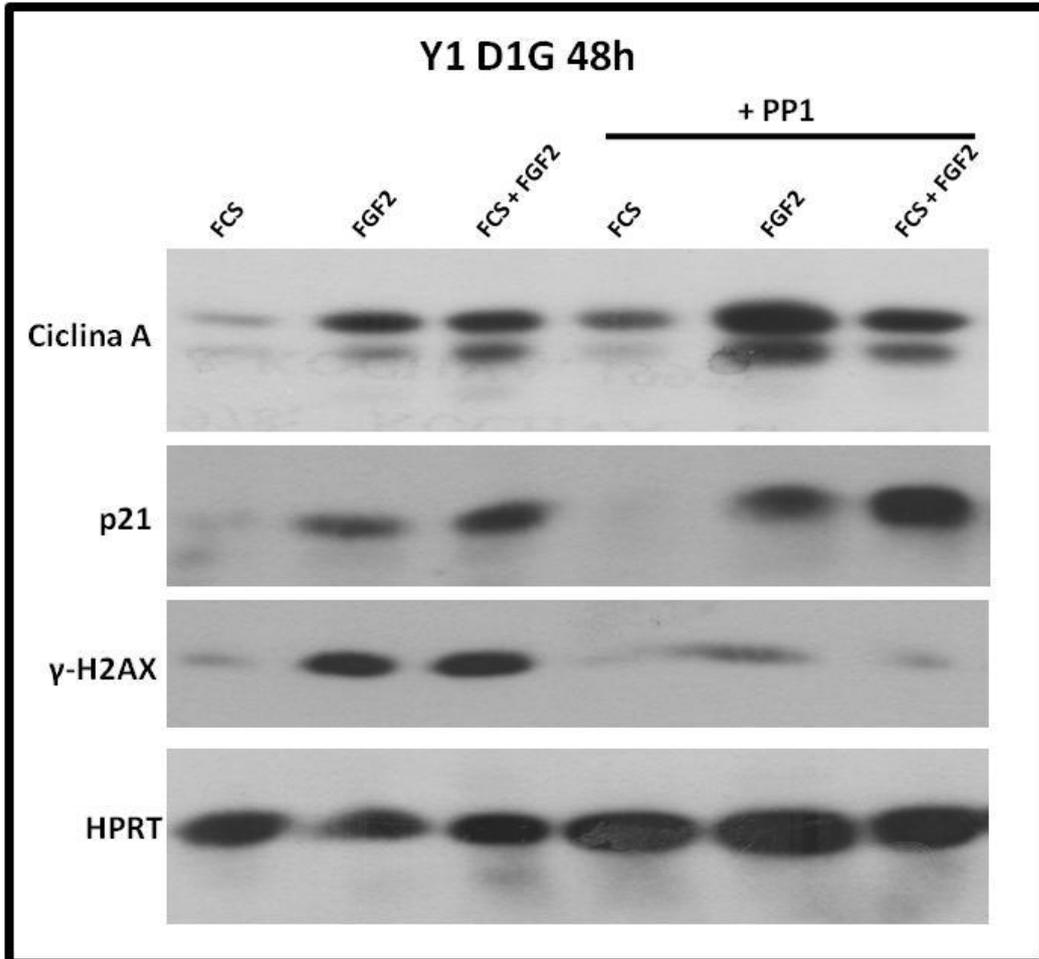


Figura 4.30 - Expressão de ciclina A, p21 e γ -H2AX em Y1 D1G com inibidor de Src. *Western blot* comparando os níveis de expressão de ciclina A e p21 e os níveis de fosforilação da histona H2AX na serina 139 (γ -H2AX), entre os estímulos em células Y1 D1G na presença ou não do inibidor de Src PP1. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 48 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10%; **FGF2**=FGF2 10ng/ml; **F+S**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. O Inibidor PP1 foi adicionado 1 hora antes do reestímulo (10 μ M). A expressão de HPRT está sendo usada como controle.

As observações acima demonstram que a atividade de Src, mas não de outras vias canonicamente ativadas pelo par FGF2/FGFR, é parte fundamental no processo antiproliferativo induzido por FGF2 em Y1 e Y1

D1G. Além disso, fica novamente claro que o aumento dos níveis de ciclina A e p21 não está relacionado ao efeito antiproliferativo de FGF2. Por outro lado, a queda nos níveis de γ -H2AX em função do inibidor PP1 sugere que a ativação de uma DDR pode ter alguma participação causal no efeito tóxico de FGF2.

4.10 - O efeito tóxico de FGF2 em Y1 D1G causa um desequilíbrio na homeostase de proteínas

Como vimos, FGF2 bloqueia a divisão das células Y1 D1G, mas estimula seu crescimento; tanto em termos de tamanho médio, quanto em termos de quantidade de proteínas/célula. Observações experimentais não previamente programadas durante a quantificação de proteínas em lisados celulares para *western blot*, mostraram que valores de proteína/amostra eram sistematicamente muito semelhantes tanto em FGF2 + soro como em soro apenas, em tratamentos de 24 e 48h; apesar da grande diferença observada na quantidade de células entre estes tratamentos. Essas observações sugeriram que FGF2 estava desequilibrando o balanço "produção X degradação" de proteínas nessas células.

Para avaliar de uma maneira ampla o efeito de FGF2 na proteômica das células Y1 D1G, realizamos por espectrometria de massas, uma análise comparativa entre os estímulos soro e FGF2 + soro; e entre soro e FGF2 apenas. Utilizando lisados protéicos de Y1 D1G estimulada por 24

horas. As corridas no espectrômetro identificaram um conjunto geral de 222 proteínas. Partindo desse conjunto, selecionamos apenas aquelas identificadas por no mínimo dois peptídeos únicos, resultando em um conjunto de 68 proteínas com 0,1% de taxa de falsos positivos. Os resultados da contagem de espectros totais das amostras mostraram que na comparação entre soro e FGF2 + soro, quatro proteínas estão mais abundantes na condição soro (Tabela 4.1 A). Por outro lado, nove proteínas estão mais abundantes na condição FGF2 + soro (Tabela 4.1 B). Dentre elas, algumas merecem destaque: a enzima Glicil-tRNA sintetase que catalisa a esterificação da glicina ao seu tRNA, etapa fundamental para a síntese de proteínas (Revisado por Freist *et al.*, 1996); a proteína EF-2 que é responsável por etapas cruciais na elongação de cadeias polipeptídicas nascentes durante a síntese de proteínas. Esta proteína é ativada pela disponibilidade de nutrientes e/ou em resposta a sinais mitogênicos. Sua inibição reduz a síntese protéica (Revisado por White-Gilbertson *et al.*, 2009); a proteína HSP 90 é uma chaperona constitutivamente expressa em células eucarióticas. Sua função envolve a manutenção da homeostase de proteínas nas células. Em situações de estresse, sua expressão é aumentada; e células tumorais dependem de uma maior atividade dessa proteína devido ao constante estresse imposto pelo fenótipo tumoral. Por isso mesmo, a inibição dessa proteína tem se mostrado promissora para terapia do câncer (Whitesell & Lindquist, 2005).

Proteínas diferencialmente reguladas por soro + FGF2 em relação a soro		
A		
Proteínas negativamente reguladas		
Proteína	Número de acesso (SwissProt)	Fold change
ATP synthase subunit alpha	sp Q03265 ATPA_MOUSE	0,4
10 kDa heat shock protein, mitochondrial	sp Q64433 CH10_MOUSE	0,4
Poly(rC)-binding protein 1	sp P60335 PCBP1_MOUSE	0,3
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	sp O08749 DLDH_MOUSE	0,2
B		
Proteínas positivamente reguladas		
Proteína	Número de acesso (SwissProt)	Fold change
14-3-3 protein zeta/delta	sp P63101 1433Z_MOUSE	5,0
Ras-related protein Rap-1b	sp Q99JI6 RAP1B_MOUSE	3,3
Annexin A1	sp P10107 ANXA1_MOUSE	2,5
Glycyl-tRNA synthetase	sp Q5I0G4 SYG_RAT	2,5
Phosphoglycerate kinase 1	sp P09411 PGK1_MOUSE	2,5
Cell division control protein 42 homolog	sp P60766 CDC42_MOUSE	2,5
Elongation factor 2; Short=EF-2	sp P58252 EF2_MOUSE	2,0
Pyruvate kinase isozymes M1/M2	sp P52480 KPYM_MOUSE	2,0
Heat shock protein HSP 90-beta	sp P11499 HS90B_MOUSE	1,7

Tabela 4.1 - Proteínas diferencialmente reguladas: FGF2+Soro X Soro. Resultados das análises por espectrometria de massas. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 24 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10% ou **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. As análises foram realizadas como anteriormente descrito; e as diferenças de abundância das proteínas entre as amostras estão expressas em termos de "fold change". **(A)** Proteínas mais abundantes na condição **Soro**. **(B)** Proteínas mais abundantes na condição **FGF2+Soro**.

No caso da comparação entre soro e FGF2, dez proteínas mostraram maiores níveis na condição soro (Tabela 4.2 A). Nove outras proteínas se mostraram mais abundantes nos lisados de células estimuladas por FGF2 (Tabela 4.1 B). Dentre elas, destacamos novamente o aumento de HSP 90 e o grande aumento dos níveis de Glicil-tRNA sintetase. Além disso, chama a atenção também um aumento maior que 4X dos níveis da proteína dissulfido isomerase; que é uma proteína residente do retículo

endoplasmático, e cujo aumento dos níveis está relacionado ao aumento do próprio retículo em condições de estresse (Denoyelle *et al.*, 2006).

Proteínas diferencialmente reguladas por FGF2 em relação a soro		
A		
Proteínas negativamente reguladas		
Proteína	Número de acesso (SwissProt)	Fold change
Uncharacterized protein OS	tr E9Q616 E9Q616_MOUSE	0,09
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	sp P61979 HNRPK_MOUSE	0,2
Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	sp O08749 DLDH_MOUSE	0,2
40S ribosomal protein S3	sp P62908 RS3_MOUSE	0,3
Transaldolase	sp Q93092 TALDO_MOUSE	0,3
Uncharacterized protein OS	tr D3Z2H9 D3Z2H9_MOUSE	0,3
Transitional endoplasmic reticulum ATPase	sp P46462 TERA_RAT	0,3
Stress-70 protein, mitochondrial	sp O35501 GRP75_CRIGR	0,4
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	sp O08651 SERA_RAT	0,4
Polyubiquitin-B	sp P0CG49 UBB_MOUSE	0,4
B		
Proteínas positivamente reguladas		
Proteína	Número de acesso (SwissProt)	Fold change
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	sp P56480 ATPB_MOUSE	2,0
Heat shock protein HSP 90-beta	sp P11499 HS90B_MOUSE	2,1
Phosphoglycerate kinase 1	sp P09411 PGK1_MOUSE	2,4
Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	sp P11240 COX5A_RAT	2,4
T-complex protein 1 subunit theta	sp P42932 TCPQ_MOUSE	2,4
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	sp P28042 SSBP_RAT	3,0
Fructose-bisphosphate aldolase A	sp P05064 ALDOA_MOUSE	4,3
Protein disulfide-isomerase A6	sp Q922R8 PDIA6_MOUSE	4,7
Glycyl-tRNA synthetase	sp Q5I0G4 SYG_RAT	5,9

Tabela 4.2 - Proteínas diferencialmente reguladas: FGF2 X Soro. Resultados das análises por espectrometria de massas. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas por 24 horas nas seguintes condições: **Soro**=FCS 10% ou **FGF2**=FGF2 10ng/ml. As análises foram realizadas como anteriormente descrito; e as diferenças de abundância das proteínas entre as amostras estão expressas em termos de "fold change". **(A)** Proteínas mais abundantes na condição **Soro**. **(B)** Proteínas mais abundantes na condição **FGF2**.

Numa análise menos estridente dos resultados da espectrometria de massas, utilizando todas as 222 proteínas identificadas por no mínimo 1 peptídeo único; outras proteínas relacionadas à síntese de proteínas foram

encontradas exclusivamente em lisados de células estimuladas por FGF2. Por exemplo: EF-1 gama, alanil-tRNA sintetase e histidil-tRNA sintetase exclusivamente para a condição FGF2 + soro; e seril-tRNA sintetase exclusivamente para a condição FGF2 (dados não mostrados).

Essas observações indicam que FGF2 está induzindo o aumento dos níveis de proteínas relacionadas à síntese de proteínas, e também ao estresse de retículo endoplasmático. Isso sugere que o aumento da quantidade de proteínas/célula que vimos ser induzido por FGF2 (Figura 4.14), pode estar comprometendo a homeostase de proteínas dessas células e, com isso, contribuindo para o efeito tóxico disparado por FGF2.

Se isso for verdade, o inibidor de Src PP1, que mostramos ser capaz de proteger as células Y1 e Y1 D1G do efeito antiproliferativo de FGF2, também deve prevenir esse acúmulo de proteínas/célula. Para testar essa hipótese, realizamos medidas de proteínas totais/célula em células reestimuladas por soro ou FGF2 + soro por 48 e 72 horas na presença de PP1. Os resultados demonstram que o inibidor PP1 efetivamente previne o aumento da quantidade de proteínas/célula. Além disso, o inibidor PP1 também levou a uma diminuição do tamanho médio das células mesmo na presença de FGF2 (Figura 4.31).

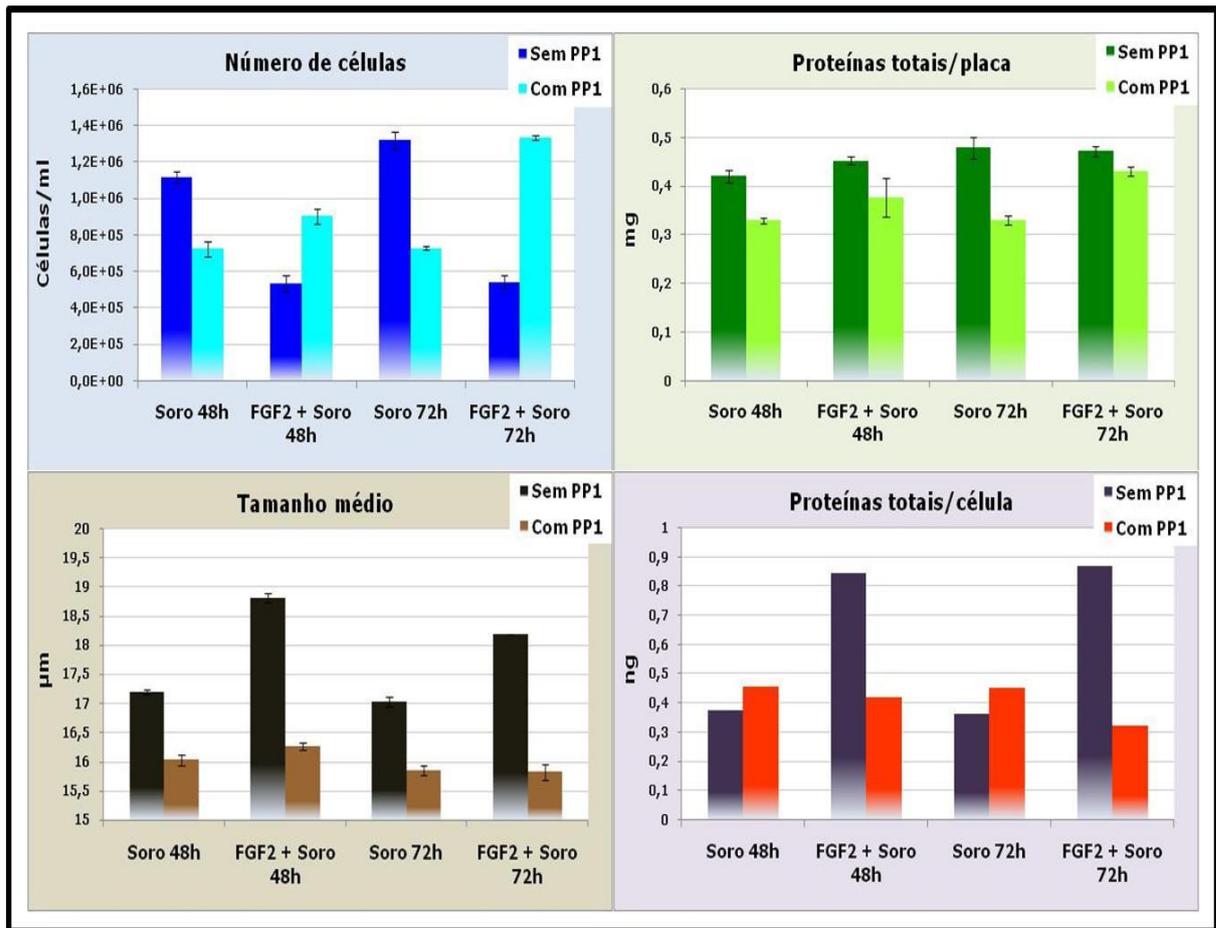


Figura 4.31 - Medidas de proteínas totais/célula em Y1 D1G com inibidor de Src. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas condições e tempos indicados. **Soro**=FCS 10 ou **FGF2+Soro**=FGF2 10ng/ml + FCS 10%. 10µM do inibidor de Src PP1 foi adicionado uma hora antes do reestímulo quando indicado. O número de células e o tamanho médio foram determinados utilizando o contador de partículas Z2 Coulter®. A quantidade de proteínas totais/placa foi determinada pelo método de Bradford.

Para corroborar a importância desse acúmulo de proteínas para o efeito tóxico de FGF2 em Y1 D1G, utilizamos o mesmo tipo de abordagem para verificar como FGF2 influencia a quantidade de proteínas totais/célula, em clones resistentes ao efeito antiproliferativo de FGF2. Os resultados demonstram que nos dois clones testados, ao contrário do observado para Y1 D1G, FGF2 diminuí o tamanho médio das células; e nenhum aumento da quantidade de proteínas/célula é observado por ação

de FGF2. Ao contrário, especialmente para o clone 3.2, mas também para o 4.2, parece haver uma diminuição dessa relação nas células estimuladas com FGF2 em relação ao estímulo apenas por soro (Figura 4.32).

Juntos, esses resultados indicam que a forte indução do aumento da relação proteínas/células disparada por FGF2 em Y1 D1G compromete a homeostase de proteínas nessas células. Esse estresse proteotóxico parece desempenhar um papel importante no efeito tóxico disparado por FGF2 em Y1 D1G; uma vez que o inibidor de Src PP1, que protege as células desse efeito, também previne o aumento da relação proteínas/célula. Mais que isso, em células Y1 D1G resistentes a FGF2, e que inclusive dependem desse fator para proliferar, FGF2 desempenha um papel oposto; diminuindo a relação estacionária de proteínas/célula.

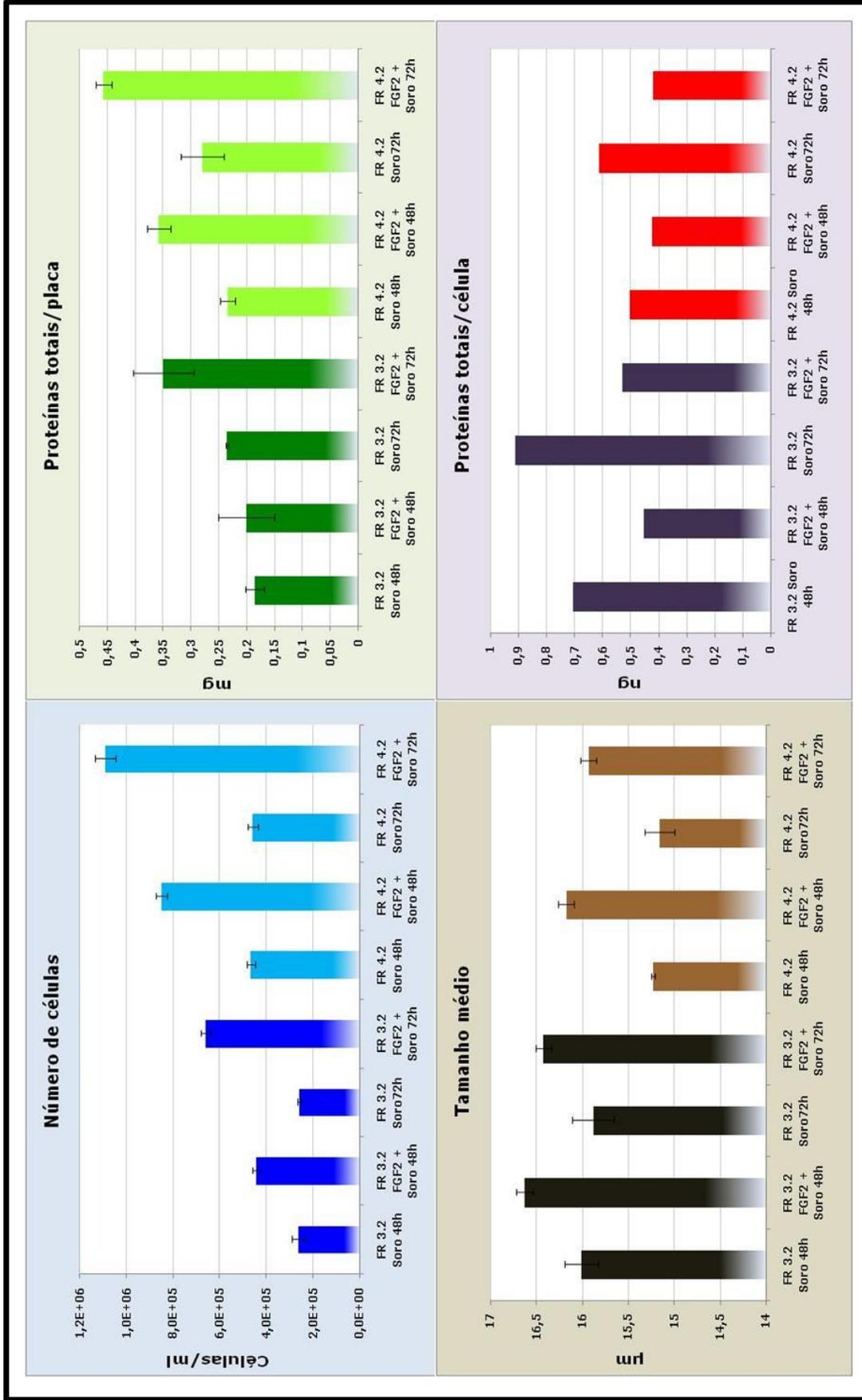


Figura 4.32 - Medidas de proteínas totais/célula em clones Y1 D1G resistentes a FGF2. As células foram previamente carenciadas e reestimuladas nas condições e tempos indicados. Soro= FCS 10 ou FGF2+Soro= FGF2 10ng/ml + FCS 10%. O número de células e o tamanho médio foram determinados utilizando o contador de partículas Z2 Coulter®. A quantidade de proteínas totais/placa foi determinada pelo método de Bradford. Foram utilizados os clones Y1 D1G FR 3.2 e 4.2.

5 – DISCUSSÃO

Toda e qualquer célula viável, não importa se normal, imortalizada ou altamente maligna, é um sistema onde inúmeras “peças” trabalham orquestradamente para manter proliferação e viabilidade, exibindo uma robustez capaz de garantir a sobrevivência frente às mais diversas formas de injúria. Estas injúrias incluem estresses mecânicos, ambientais e moleculares. Certamente, essa robustez é finita; e se alguma peça chave, ou um subconjunto delas, tiver sua função suficientemente alterada o sistema entra num processo de desequilíbrio irreversível e se inviabiliza, levando à morte celular. Os “pontos-sem-volta” que determinam a falência do sistema dependem dos tipos de injúria e da condição e tipos celulares.

A progressão maligna é um processo que envolve sucessivas etapas que gradualmente alteram a estabilidade e a robustez do sistema celular. Isso significa que a célula tumoral deve apresentar condições de robustez diferentes da célula normal. Por conseguinte, a célula maligna deve ter vulnerabilidades ausentes na célula normal. A identificação de vulnerabilidades diferenciais entre células malignas e normais é fundamental para desenhar tratamentos específicos das doenças neoplásicas.

Nesse sentido, a observação de que FGF2, classicamente descrito como um mitógeno, é capaz de bloquear a proliferação de células malignas dependentes de Ras de maneira condicionada à presença de

altos níveis de Ras-GTP (Costa *et al.*, 2008) é, certamente, de óbvio interesse terapêutico. A ativação aberrante de Ras está presente em diversos tipos de tumores humanos, freqüentemente resultando em tumores agressivos e de prognóstico ruim (Downward, 2003). Muitas estratégias têm sido testadas para inibir a sinalização aberrante de Ras em tumores. Entretanto, apesar dos progressos, resultados clinicamente satisfatórios ainda são incomuns (Vigil *et al.*, 2010). Por causa disso, cada vez mais a busca e identificação de mecanismos subjacentes às vulnerabilidades do fenótipo maligno dependente de Ras vem se intensificando (De Raedt *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011; Singh & Settleman, 2009).

Mostramos aqui que FGF2 induz o crescimento de células Y1 D1G, mas bloqueia sua divisão, e esse desacoplamento acaba disparando morte celular. Isso indica que nessas células, FGF2 está atacando uma vulnerabilidade conferida pelo fenótipo maligno decorrente da superexpressão de Ras e, as bases moleculares desse "ataque" foram desconstruídas neste trabalho.

5.1 - Efeitos de FGF2 sobre o ciclo celular de Y1 D1G

Os resultados apresentados na seção 4.1 demonstram que as sub-linhagens Y1 D1, diferentemente da linhagem parental Y1, apresentam um controle estrito da transição quiescência → proliferação em função da concentração de soro no meio de cultura e, apesar disso, se mantém

vulneráveis aos efeitos tóxicos de FGF2. Essas características nos permitiram fazer uma análise fina do efeito de FGF2 sobre o ciclo dessas células. Mostramos aqui que FGF2 mesmo sozinho estimula a transição $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S$ em células Y1 D1G (Figura 4.5). Não é possível notar grandes diferenças entre os estímulos por FGF2 + soro ou mesmo FGF2 sozinho, em relação ao tempo em que as primeiras células alcançam a fase S. Entretanto, é importante destacar que, enquanto as células estimuladas apenas por soro entram e progridem sincronizada e continuamente pela fase S, as estimuladas por FGF2 não mostram essa sincronia, exibindo uma entrada e progressão em S irregular, inclusive com uma parcela da população celular sequer alcançando a fase S, o que sugere efeitos inibitórios estocásticos devidos à ação do FGF2 (Figuras 4.5 A e B; 4.6 B e 4.10).

Entre as células que efetivamente entraram em S em presença de FGF2, a inibição da progressão no ciclo causada por esse fator parece seguir o mesmo padrão. Observando os dados da cinética de 48 horas, podemos notar que, diferentemente do controle, a presença de FGF2 faz com que as células progridam lentamente, ficando sujeitas a eventuais interrupções estocásticas através da fase S. Muitas células que entraram na fase S têm sua síntese de DNA temporariamente interrompida antes de completar a replicação, devido à ação de FGF2 (Figuras 4.5 A e 4.6 A); sugerindo um disparo abortivo de origens de replicação. Um atraso na progressão em S pode significar tanto uma menor velocidade de alongação das cadeias nascentes, quanto um menor número de forquilhas

de replicação ativas. Resultados preliminares anteriormente obtidos por Érico T. Costa (Tese de doutorado, 2005) sugeriram que FGF2 não interfere com a velocidade de alongação da cadeia nascente de DNA, implicando que a interferência deveria ser no número de forquilhas de replicação ativas. O controle da replicação de células eucarióticas começa muito antes da fase S propriamente dita. No final da mitose do ciclo anterior, ou no princípio de G1 no caso de células quiescentes, ocorre o licenciamento das diversas origens de replicação presentes no genoma. Esse processo consiste na ligação das proteínas ORC1-6, CDC6 e Cdt1 às origens de replicação, seguido do recrutamento do hexâmero de proteínas Mcm2-7. Uma vez licenciadas, as origens de replicação vão ou não ser ativadas por diversas fosforilações para gerar forquilhas de replicação ativas na fase S (Nishitani & Lygerou, 2002). Sabe-se que o número de origens licenciadas é bem superior ao necessário para a replicação, e que esse excesso é importante para manter a replicação na eventualidade de estresses. O resultado da diminuição desse excesso é um acúmulo de células em G2 e instabilidade genômica (Ibarra *et al.*, 2008). Mostramos que os efeitos tóxicos de FGF2 sobre a fase S de células reestimuladas só são efetivos quando esse fator é adicionado no início de G1 (Figura 4.8); e que tais efeitos resultam em bloqueio em G2 e instabilidade genotípica (Figuras 4.6 e 4.15 respectivamente). Embora testes mais específicos sejam necessários, nos parece bem plausível a hipótese de que o efeito de FGF2 observado em Y1 D1G envolva uma inibição do licenciamento no

início de G1 em células quiescentes reestimuladas para proliferar, que levaria ao atraso em S e ao bloqueio em G2.

Dentro da população de células bloqueadas com conteúdo de DNA equivalente a G2/M, pouquíssimas células marcam para mitose após estímulos por FGF2 (Figura 4.7). Isso indica que o efeito tóxico de FGF2 leva a um bloqueio executado em G2, impedindo que as células iniciem mitose. Esse bloqueio em G2 poderia ser explicado pela execução de uma DDR. Já foi mostrado que problemas durante a replicação do DNA podem ativar uma DDR resultando em bloqueio em G2/M (Bartkova *et al.*, 2005); e vimos que FGF2 de fato induz DDR em Y1 D1G (Figura 4.22). Mas o fato de os clones resistentes a FGF2, derivados das parentais Y1 e Y1 D1G, também exibirem DDR frente a FGF2, afasta a DDR como o mecanismo molecular disparador do bloqueio em G2 causado por FGF2.

Uma outra face desse bloqueio imposto por FGF2 se refere ao crescimento celular. O equilíbrio entre crescimento e divisão celular é fundamental para a homeostase dos tecidos e do organismo como um todo (Conlon & Raff, 1999). Não por acaso, esses processos são muitas vezes disparados por sinalizações comuns, como a ativação de RTKs por exemplo (Vivanco & Sawyers, 2002). No entanto, o efeito tóxico disparado por FGF2 em células Y1 D1G, que é mediado pelos RTKs de FGF2 (Costa *et al.*, 2008), é caracterizado por um bloqueio da transição G2→M, sem interferir no crescimento celular em volume e massa (Figuras 4.13 e 4.14). Esse “desacoplamento” causado por FGF2 não é novidade, e outros

trabalhos já mostraram que bloqueios da progressão no ciclo podem resultar em aumento no tamanho médio das células (Fingar, 2002 *et al.*; Conlon *et al.*, 2001). Entretanto, o que chama a atenção neste crescimento celular estimulado por FGF2 é que, 72 horas após o estímulo, o volume celular médio está aumentado em 20% nas amostras estimuladas por FGF2 + soro em relação ao controle estimulado apenas por soro; ao passo que a relação de proteínas/célula está aumentada em 140% nas amostras estimuladas por FGF2. Essas quantificações evidenciam que a presença de FGF2 levou a um aumento importante da concentração proteína/célula, suficiente para causar um severo estresse proteotóxico. O efeito terminal desse estresse é a morte celular progressivamente evidenciada pelos experimentos das figuras 4.17 e 4.18. A observação rotineira de células estimuladas por FGF2 por muitas horas revelou sistematicamente características típicas de diferentes modalidades de morte celular, como por exemplo: perda de adesão à placa, vacuolização, fragmentação de DNA e perda de integridade da membrana plasmática. O que nos leva a crer que diferentes tipos de morte celular estão ocorrendo paralelamente, mas, provavelmente, com dominância de processos apoptóticos a julgar pelos altos níveis de fragmentação de DNA observados na figura 4.18.

5.2 - Ações de FGF2 sobre a maquinaria de controle do ciclo celular

Ciclinas, CDKs e CKIs compõem o “core” da maquinaria de controle do ciclo celular (Revisado por Malumbres & Barbacid, 2009). Por causa disso, buscamos alterações dessa maquinaria disparadas por FGF2, que explicassem ou contribuíssem para os efeitos antiproliferativos observados em nossos modelos de estudo. No que se refere às ciclinas, um dado que nos chamou bastante atenção é relativo aos níveis de ciclina A; que sobem em 12 horas com os três estímulos, coerente com o papel desta ciclina na fase S. Entretanto, diferentemente do controle, nas amostras estimuladas com FGF2 essa expressão se mostrou bastante alta até 72 horas (Figura 4.20). Não estava claro nesse momento se esse acúmulo de ciclina A era causa direta e primária da ação tóxica de FGF2, ou um efeito secundário ao bloqueio da progressão no ciclo causado por este fator. A resposta veio quando observamos que FGF2 também promove o acúmulo de ciclina A na presença do inibidor de Src PP1, que protege as células do bloqueio da progressão no ciclo por FGF2; e também nas células Y1 D1G FR, cuja resposta a FGF2 é puramente mitogênica (Figuras 4.30 e 4.24 respectivamente). Isso indica que o acúmulo de ciclina A não é parte do mecanismo molecular disparado por FGF2 para bloquear a progressão no ciclo celular. No entanto, há relatos na literatura mostrando que ciclina A controla o disparo das origens de replicação durante a fase S (Katsuno *et al.*, 2009) e sua superexpressão causa replicação aberrante e disparo de DDR (Tane & Chibazakura, 2009). Sendo assim, parece razoável concluir que esse acúmulo de ciclina A deve contribuir para a persistente ativação da DDR observada, tanto nas parentais Y1 D1G, vulneráveis a FGF2, como

nas sub-linhagens clonais Y1 e Y1 D1G FRs resistentes à toxidez de FGF2. Por conseguinte, pode-se concluir com segurança que a via molecular de estresse: acúmulo de ciclina A → DDR, não é parte dos mecanismos pelos quais FGF2 bloqueia irreversivelmente o ciclo celular, levando à morte celular terminal.

Nossos resultados também mostraram que FGF2 com ou sem soro induz a expressão de p21 em Y1 D1G, na presença ou não do inibidor de Src PP1; e também nos clones resistentes a FGF2 (Figuras 4.30 e 4.24 respectivamente). Portanto, o CKI p21, não está implicado no mecanismo efetor do bloqueio de ciclo celular imposto por FGF2. Essa expressão de p21 poderia ser resultado da ativação de DDR, citada acima. No entanto, o aumento de expressão de p21 causado por DDR é mediado por fosforilação e ativação de p53 (Bartkova *et al.*, 2005; Di Micco *et al.*, 2006). Entretanto, nossos resultados mostram fosforilação de p53 apenas em estímulos por FGF2 sem soro (Figuras 4.22 e 4.23), e indução de p21 por FGF2 mesmo na presença de soro. Logo, essa indução de p21 por FGF2 deve seguir outros mecanismos moleculares, por exemplo, através da ativação de PKC, ou ainda pela translocação para o núcleo de fatores de transcrição da família STAT. Ambos são eventos reconhecidamente induzidos pela ativação de FGFRs (Gartel & Tyner, 1999; Park *et al.*, 2001). Conseqüentemente, esse aumento de p21 não tem papel na toxidez de FGF2 em Y1 D1G. Plausivelmente, nas células Y1 D1G FR, e também nas parentais Y1 D1G com ou sem o inibidor de Src PP1, o excesso de p21 é seqüestrado e neutralizado pelo acúmulo de ciclina A;

permitindo a progressão no ciclo celular mesmo com níveis aumentados de p21. Além disso, foi mostrado que ciclina A é capaz de substituir as ciclinas D e E promovendo a transição G0/G1→S. (Resnitzky *et al.*, 1995).

5.3 - O papel de Src

Dados anteriormente publicados pelo nosso grupo demonstraram que o efeito tóxico de FGF2 sobre células Y1 depende inteiramente da atividade de proteína quinase dos FGFRs. Mas, a inibição das vias de MAPK e PI3K-Akt, ambas à jusante dos FGFRs, não protegeu as células Y1 do efeito tóxico de FGF2. Por outro lado, a inibição de Src protegeu parcialmente as células Y1 do efeito tóxico de FGF2 (J. Salotti, Tese de doutorado (2009); Salotti & Armelin, artigo submetido) e os resultados desta tese (Figuras 4.26 B, 4.28, 4.29 e 4.31) confirmaram e expandiram essas observações iniciais nas células Y1 D1G, mostrando definitivamente que o inibidor de Src PP1 protege completamente estas células do efeito tóxico de FGF2.

A inibição de Src diminui muito o basal de entrada em S das células Y1 sob carenciamento de soro (Salotti & Armelin, artigo submetido). Mas no conjunto, os resultados da inibição de Src nas células Y1 e Y1 D1G parecem, à primeira vista, contraditórios: (i) em curvas de crescimento, o inibidor PP1 diminui a proliferação de células Y1 e Y1 D1G em relação ao controle (Figura 4.28); (ii) em ensaios clonogênicos, a inibição de Src por 24 horas aumenta o número de células viáveis (colônias) em relação ao

controle (Figura 4.26 B) (Salotti & Armelin, artigo submetido); (iii) A inibição de Src resulta em células mais espreiadas na placa e com aspecto mais "saudável" (Não mostrado). Estes resultados indicam que nessas células a atividade de Src é benéfica à proliferação e à sobrevivência, mas também pode induzir estresse. Esse quadro é semelhante ao descrito em outros modelos celulares, nos quais oncogenes ativos induzem um fenótipo maligno proliferativo, porém à custa de um estresse ao qual a célula precisa se adaptar para sobreviver (Luo *et al.*, 2009). Corroborando essas proposições, foi mostrado em linhagens de carcinoma, inclusive malignizadas por Ras, que a deleção de FAK (*Focal Adhesion Kinase*) ou a falta de adesão a substrato sólido levam a uma atividade aumentada de Src, causando morte celular. A resposta adaptativa a esse estresse é a degradação autofágica de Src que promove a viabilidade celular (Sandilands *et al.*, 2011). Nessa interpretação, o FGF2 causa toxidez por elevar a atividade de Src de níveis moderados para muito altos, gerando um estresse oncogênico. No sentido oposto, o inibidor PP1 confere proteção à célula por inibir a atividade de Src, desarmando o estresse oncogênico. As vias de sinalização acionadas pela alta atividade de Src ainda não estão completamente esclarecidas. Mas é importante lembrar que a inibição da GTPase RhoA também protege as células Y1 do efeito tóxico de FGF2, conforme mostramos anteriormente (Costa *et al.*, 2008). Neste ponto é relevante destacar que Src e RhoA tomam parte no complexo de adesão focal que inclui integrinas e FAK, uma tirosina-

quinase que transduz sinais para o interior da célula. Tanto Src como RhoA são ativados pela ação de FGF2 através dos FGFRs.

5.4 - FGF2 e a homeostase de proteínas em células Y1 D1G

As células garantem a sobrevivência frente a um estresse proteotóxico através de três mecanismos: (i) aumentando os níveis de chaperonas; (ii) reduzindo as taxas de síntese de proteínas; (iii) aumentando as taxas de degradação de proteínas seja através do sistema ubiquitina/proteassomo ou por autofagia. Estes mesmos mecanismos de manutenção da homeostase de proteínas são atuantes e importantes na sobrevivência de células malignas que convivem com níveis crônicos de estresse proteotóxico. Por esse motivo células malignas são relativamente mais vulneráveis a agentes promotores de estresse proteotóxico que células normais (Buchberger *et al.*, 2010). Devido a essa diferença fenotípica entre células normais e malignas a inibição da degradação de proteínas vem, há algum tempo, sendo clinicamente usada no tratamento do câncer (Adams & Kauffman, 2004).

Nossas análises comparativas de lisados celulares de Y1 D1G por espectrometria de massas mostraram que FGF2 induz um aumento relativo nos níveis de proteínas envolvidas em controle do estresse proteotóxico (Tabelas 4.1 e 4.2), sugerindo que a célula está sob estresse e procura reagir para manter a homeostase de proteínas e garantir sobrevivência. Mas, contraditoriamente, as células Y1-D1G tratadas com

FGF2 exibem níveis relativamente maiores de proteínas da maquinaria de síntese protéica; o que é compatível com taxas mais elevadas de síntese de proteínas evidenciadas pelo acúmulo progressivo de proteínas/célula verificado em células submetidas a FGF2 (Figura 4.14). Portanto, FGF2 ao bloquear irreversivelmente a transição G2→M, deixando livre o crescimento celular, causou um acúmulo progressivo de proteínas/célula que alcançou níveis incontroláveis de estresse proteotóxico, disparando morte celular.

5.5 - Epílogo

Mostramos em 2008, em sistemas celulares malignos dependentes de altos níveis de Ras-GTP, que FGF2 é capaz de disparar uma forte resposta antiproliferativa (Costa *et al.*, 2008). Nesta tese, expandimos esses estudos, incluindo outro modelo celular maligno, e demonstramos que essa resposta antiproliferativa de FGF2 consiste primariamente de um atraso na fase S e um imediato e irreversível bloqueio em G2, seguidos de morte celular tardia. Mostramos ainda que o efeito tóxico terminal de FGF2 é consequência do desacoplamento entre crescimento e divisão celular que leva a um estresse proteotóxico incontrolável.

Ficou claro, também, que o inibidor de Src, PP1, impede o bloqueio da transição G2→M, permitindo que predomine a ação mitogênica clássica do FGF2. Estes resultados evidenciam que Src é um mediador crítico nesta

ação tóxica de FGF2. Dessa forma conseguimos explicar mecanisticamente a atividade dual de FGF2 em células murinas malignas dependentes do oncogene k-ras.

Nossa visão geral sobre este quadro é que a amplificação do oncogene Ras leva a um fenótipo maligno robusto, mas que possui uma vulnerabilidade evidenciada por FGF2, o qual atua como uma “flecha” atingindo um “calcanhar de Aquiles” desse fenótipo maligno dependente de Ras, isto é, a homeostase de proteínas, provocando a falência do sistema celular.

6 - CONCLUSÕES

- A sub-linhagem Y1 D1G apresenta um controle estrito da transição quiescência→proliferação por fatores séricos, demonstrado por um disparo altamente sincronizado do ciclo celular após o reestímulo por soro de células carenciadas, sendo assim um excelente modelo para análises fase-específicas de ciclo celular.
- O efeito tóxico antiproliferativo de FGF2 sobre as células Y1 D1G é caracterizado por um atraso da progressão em S e bloqueio irreversível do ciclo celular em G2, seguidos de morte celular tardia.
- Embora bloqueie a progressão no ciclo (proliferação), FGF2 estimula o crescimento de células Y1 D1G em massa e volume. Sendo assim, nesse modelo celular FGF2 “desconecta” crescimento de divisão celular.
- O efeito tóxico de FGF2 em Y1 D1G depende da atividade da proteína Src; uma vez que a inibição dessa proteína protege totalmente as células de tal efeito.
- FGF2 leva ao desequilíbrio na homeostase de proteínas e estresse proteotóxico em células Y1 D1G; e esse estresse é majoritariamente responsável pelo efeito tóxico disparado por FGF2 nessas células.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM JA, MERGIA A, WHANG JL, TUMOLO A, FRIEDMAN J, HJERRILD KA, GOSPODAROWICZ D & FIDDES JC **(1986)**. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233(4763): 545-8.

ADAMS J & KAUFFMAN M **(2004)**. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 22(2):304-11. Review.

ARMELIN HA **(1973)**. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(9):2702-6.

BARTKOVA J, HOREJSÍ Z, KOED K, KRÄMER A, TORT F, ZIEGER K, GULDBERG P, SEHESTED M, NESLAND JM, LUKAS C, ØRNTOFT T, LUKAS J & BARTEK J **(2005)**. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434(7035):864-70.

BARTKOVA J, REZAEI N, LIONTOS M, KARAKAIDOS P, KLETSAS D, ISSAEVA N, VASSILIOU LV, KOLETTAS E, NIFOROU K, ZOUMPOURLIS VC, TAKAOKA M, NAKAGAWA H, TORT F, FUGGER K, JOHANSSON F, SEHESTED M, ANDERSEN CL, DYRSKJOT L, ØRNTOFT T, LUKAS J, KITTAS C, HELLEDAY T, HALAZONETIS TD, BARTEK J & GORGOULIS VG **(2006)**. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444(7119):633-7.

BIKFALVI A, KLEIN S, PINTUCCI G & RIFKIN DB **(1997)**. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18(1):26-45. Review.

BRUNET A, ROUX D, LENORMAND P, DOWD S, KEYSE S & POUYSSÉGUR J **(1999)**. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J* 18, 664-674.

BUCHBERGER A, BUKAU B & SOMMER T **(2010)**. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell* 40:238–252.

CAMPBELL PJ, YACHIDA S, MUDIE LJ, STEPHENS PJ, PLEASANCE ED, STEBBINGS LA, MORSBERGER LA, LATIMER C, MCLAREN S, LIN ML, MCBRIDE DJ, VARELA I, NIK-ZAINAL SA, LEROY C, JIA M, MENZIES A, BUTLER AP, TEAGUE JW, GRIFFIN CA, BURTON J, SWERDLOW H, QUAIL MA, STRATTON MR, IACOBUZIO-DONAHUE C & FUTREAL PA **(2010)**. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*:467(7319):1109-13.

CANTLEY LC & NEEL BG **(1999)**. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4240–4245.

CARRASCO DR, SUKHDEO K, PROTOPOPOVA M, SINHA R, ENOS M, CARRASCO DE, ZHENG M, MANI M, HENDERSON J, PINKUS GS, MUNSHI N, HORNER J, IVANOVA EV, PROTOPOPOV A, ANDERSON KC, TONON G & DEPINHO RA **(2007)**. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell* 11(4):349-60.

CHAMBARD JC, LEFLOCH R, POUYSSÉGUR J & LENORMAND P **(2007)**. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1299-310. Review.

CHENG M, SEXL V, SHERR CJ & ROUSSEL MF **(1998)**. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(3):1091-6.

CHIPUK JE & GREEN DR **(2005)**. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(3):268-75.

CONLON I & RAFF M **(1999)**. Size control in animal development. *Cell* 96:235-244.

CONLON IJ, DUNN GA, MUDGE AW & RAFF MC **(2001)**. Extracellular control of cell size. *Nat. Cell Biol.* 3:918-921.

COSTA ET, FORTI FL, ROCHA KM, MORAES MS & ARMELIN HA **(2004)**. Molecular mechanisms of cell cycle control in the mouse Y1 adrenal cell line. *Endocr Res* 30(4):503-9.

COSTA ET, FORTI FL, MATOS TG, DERMARGOS A, NAKANO F, SALOTTI J, ROCHA KM, ASPRINO PF, YOSHIHARA CK, KOGA MM & ARMELIN HA **(2008)**. Fibroblast growth factor 2 restrains Ras-driven proliferation of malignant cells by triggering RhoA-mediated senescence. *Cancer Res* 68(15):6215-23.

COURTNEIDGE SA **(2003)**. Isolation of novel Src substrates. *Biochem Soc Trans* 31:25-8. Review.

COURTOIS-COX S, GENTHER WILLIAMS SM, RECZEK EE, JOHNSON BW, MCGILLICUDDY LT, JOHANNESSEN CM, HOLLSTEIN PE, MACCOLLIN M & CICHOWSKI K **(2006)**. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* 10(6):459-72.

DAI C, WHITESELL L, ROGERS AB & LINDQUIST S **(2007)**. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 130(6):1005-18.

DATTA SR, BRUNET A & GREENBERG ME **(1999)**. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13: 2905-2927.

DAVIES H, BIGNELL GR, COX C, STEPHENS P, EDKINS S, CLEGG S, TEAGUE J, WOFFENDIN H, GARNETT MJ, BOTTOMLEY W, DAVIS N, DICKS E, EWING R, FLOYD Y, GRAY K, HALL S, HAWES R, HUGHES J, KOSMIDOU V, MENZIES A, MOULD C, PARKER A, STEVENS C, WATT S, HOOPER S, WILSON R, JAYATILAKE H, GUSTERSON BA, COOPER C, SHIPLEY J, HARGRAVE D, PRITCHARD-JONES K,

MAITLAND N, CHENEVIX-TRENCH G, RIGGINS GJ, BIGNER DD, PALMIERI G, COSSU A, FLANAGAN A, NICHOLSON A, HO JW, LEUNG SY, YUEN ST, WEBER BL, SEIGLER HF, DARROW TL, PATERSON H, MARAIS R, MARSHALL CJ, WOOSTER R, STRATTON MR & FUTREAL PA **(2002)**. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417(6892):949-54.

DE RAEDT T, WALTON Z, YECIES JL, LI D, CHEN Y, MALONE CF, MAERTENS O, JEONG SM, BRONSON RT, LEBLEU V, KALLURI R, NORMANT E, HAIGIS MC, MANNING BD, WONG KK, MACLEOD KF & CICHOWSKI K **(2011)**. Exploiting cancer cell vulnerabilities to develop a combination therapy for ras-driven tumors. *Cancer Cell* 20(3):400-13.

DENOYELLE C, ABOU-RJAILY G, BEZROOKOVE V, VERHAEGEN M, JOHNSON TM, FULLEN DR, POINTER JN, GRUBER SB, SU LD, NIKIFOROV MA, KAUFMAN RJ, BASTIAN BC & SOENGAS MS **(2006)**. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 8(10):1053-63.

DI MICCO R, FUMAGALLI M, CICALESE A, PICCININ S, GASPARINI P, LUISE C, SCHURRA C, GARRE' M, NUCIFORO PG, BENSIMON A, MAESTRO R, PELICCI PG & D'ADDA DI FAGAGNA F **(2006)**. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444(7119):638-42.

DOWNWARD J **(2003)**. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3(1):11-22. Review.

ESWARAKUMAR VP, LAX I & SCHLESSINGER J **(2005)**. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):139-49. Review.

EVANS T, ROSENTHAL ET, YOUNGBLOM J, DISTEL D & HUNT T **(1983)**. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33(2):389-96.

FANG L, IGARASHI M, LEUNG J, SUGRUE MM, LEE SW & AARONSON SA **(1999)**. p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumour cells lacking functional p53. *Oncogene* 18:2789-2797.

FINGAR DC, SALAMA S, TSOU C, HARLOW E & BLENIS J **(2002)**. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 16:1472-1487.

FORTI FL & ARMELIN HA **(2000)**. ACTH inhibits A Ras-dependent anti-apoptotic and mitogenic pathway in mouse Y1 adrenocortical cells. *Endocr Res* 26:911-914.

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* 6, 10133-10140.

FORTI FL, DIAS MH & ARMELIN HA **(2006)**. ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. *Mol Cell Biochem* 293(1-2):147-60.

FORTI FL & ARMELIN HA **(2007)**. Vasopressin triggers senescence in K-ras transformed cells via RhoA-dependent downregulation of cyclin D1. *Endocr Relat Cancer*14(4):1117-25.

FORTI FL & ARMELIN HA **(2011)**. Arginine vasopressin controls p27(Kip1) protein expression by PKC activation and irreversibly inhibits the proliferation of K-Ras-dependent mouse Y1 adrenocortical malignant cells. *Biochim Biophys Acta* 1813(8):1438-45.

FRANKE TF **(2008)**. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27(50):6473-88. Review.

FREIST W, LOGAN DT & GAUSS DH **(1996)**. Glycyl-tRNA synthetase. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377(6):343-56. Review.

FRISCH SM & FRANCIS H **(1994)**. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124:619-626.

FRISCH SM & SCREATON RA **(2001)**. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13:555-562.

GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS JM, ALNEMRI ES, BAEHRECKE EH, BLAGOSKLONNY MV, DAWSON TM, DAWSON VL, EL-DEIRY WS, FULDA S, GOTTLIEB E, GREEN DR, HENGARTNER MO, KEPP O, KNIGHT RA, KUMAR S, LIPTON SA, LU X, MADEO F, MALORNI W, MEHLEN P, NUÑEZ G, PETER ME, PIACENTINI M, RUBINSZTEIN DC, SHI Y, SIMON HU, VANDENABEELE P, WHITE E, YUAN J, ZHIVOTOVSKY B, MELINO G & KROEMER G **(2012)**. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19(1):107-20.

GARTEL AL & TYNER AL **(1999)**. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res* 246:280-289.

GEORGE DL & FRANCKE U **(1980)**. Homogeneously staining chromosome regions and double minutes in a mouse adrenocortical tumor cell line. *Cytogenet Cell Genet* 28(4):217-26.

GIVAN AL **(2011)**. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol* 699:1-29. Review.

GOLAS JM, ARNDT K, ETIENNE C, LUCAS J, NARDIN D, GIBBONS J, FROST P, YE F, BOSCHELLI DH & BOSCHELLI F **(2003)**. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res* 63(2):375-81.

GOLSTEIN P & KROEMER G **(2007)**. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32(1):37-43. Review.

GOLUBOVSKAYA VM, GROSS S, KAUR AS, WILSON RI, XU LH, YANG XH & CANCE WG **(2003)**. Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and SRC enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol Cancer Res* 1(10):755-64.

GORGOULIS VG, VASSILIOU LV, KARAKAIDOS P, ZACHARATOS P, KOTSINAS A, LILOGLOU T, VENERE M, DITULLIO RA JR, KASTRINAKIS NG, LEVY B, KLETSAS D, YONETA A, HERLYN M, KITTAS C & HALAZONETIS TD **(2005)**. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434(7035):907-13.

GOSPODAROWICZ D **(1974)**. Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249:123-127.

GROSE R & DICKSON C **(2005)**. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:179-86.

GUO JY, CHEN HY, MATHEW R, FAN J, STROHECKER AM, KARSLI-UZUNBAS G, KAMPHORST JJ, CHEN G, LEMONS JM, KARANTZA V, COLLER HA, DIPAOLO RS, GELINAS C, RABINOWITZ JD & WHITE E **(2011)**. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 25(5):460-70.

HANAHAN D, WEINBERG RA **(2000)**. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

HARPER JW & ELLEDGE SJ **(2007)**. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28(5):739-45. Review.

HARTWELL LH, CULOTTI J & REID B **(1970)**. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66(2):352-9.

HARTWELL LH & WEINERT TA **(1989)**. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246(4930):629-34. Review.

HOSHINO R, CHATANI Y, YAMORI T, TSURUO T, OKA H, YOSHIDA O, SHIMADA Y, ARI-I S, WADA H, FUJIMOTO J & KOHNO M **(1999)**. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18(3):813-22.

IBARRA A, SCHWOB E & MÉNDEZ J **(2008)**. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(26):8956-61.

IRBY RB & YEATMAN TJ **(2000)**. Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19:5636-5642.

ITOH N & ORNITZ DM **(2004)**. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20(11):563-9. Review.

JIANG W, KAHN SM, ZHOU P, ZHANG YJ, CACACE AM, INFANTE AS, DOI S, SANTELLA RM & WEINSTEIN IB **(1993)**. Overexpression of cyclin D1 in rat

fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 8(12):3447-57.

KARNOUB AE & WEINBERG RA **(2008)**. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(7):517-31. Review.

KATSUNO Y, SUZUKI A, SUGIMURA K, OKUMURA K, ZINELDEEN DH, SHIMADA M, NIIDA H, MIZUNO T, HANAOKA F & NAKANISHI M **(2009)**. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(9):3184-9.

KHONG HT & RESTIFO NP **(2002)**. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3(11):999-1005. Review.

KIMURA E & ARMELIN HA **(1988)**. Role of proto-oncogene c-Ki-ras amplification and overexpression in the malignancy of Y-1 adrenocortical tumor cells. *Braz J Med Biol Res* 21(2):189-201.

KLEIFELD O, DOUCET A, AUF DEM KELLER U, PRUDOVA A, SCHILLING O, KAINTHAN RKK, STARR AE, FOSTER LJ, KIZHAKKEDATHU JN & OVERALL, CM **(2010)**. Isotopic labeling of terminal amines in complex samples identifies protein N-termini and protease cleavage products *Nat.Biotechnol* 28(3):281-288.

KRAJCOVIC M, JOHNSON NB, SUN Q, NORMAND G, HOOVER N, YAO E, RICHARDSON AL, KING RW, CIBAS ES, SCHNITT SJ, BRUGGE JS & OVERHOLTZER M **(2011)**. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nat Cell Biol* 13(3):324-30.

KROEMER G & LEVINE B **(2008)**. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:1004–1010.

LEPIQUE AP, FORTI FL, MORAES MS & ARMELIN HA, **(2000)**. Signal transduction in G0/G1-arrested mouse Y1 adrenocortical cells stimulated by ACTH and FGF2. *Endoc Res* 26:825-832.

LEPIQUE AP, MORAES MS, ROCHA KM, EICHLER CB, HAJJ GNM, 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. *J Mol Endoc* 33:623-638.

LI DW, YANG Q, CHEN JT, ZHOU H, LIU RM & HUANG XT **(2005)**. Dynamic distribution of Ser-10 phosphorylated histone H3 in cytoplasm of MCF-7 and CHO cells during mitosis. *Cell Res* 15(2):120-6.

LINDQVIST A, KÄLLSTRÖM H, LUNDGREN A, BARSOUM E & ROSENTHAL CK **(2005)**. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol* 171(1):35-45.

LIU H, SADYGOV RG, YATES III, JR **(2004)**. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem* 76:4193-4201.

LOTFI CF, TODOROVIC Z, ARMELIN HA & SCHIMMER BP **(1997)**. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem* 272(47):29886-91.

LOTFI CF, COSTA ET, SCHWINDT TT & ARMELIN HA **(2000)**. Role of ERK/MAP kinase in mitogenic interaction between ACTH and FGF2 in mouse Y1 adrenocortical tumor cells. *End Res* 4:873-877.

LOTFI CFP & ARMELIN HA **(2001)**. cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Endocrinol* 168:381-389.

LUO J, SOLIMINI NL & ELLEDGE SJ **(2009)**. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136(5):823-37.

MALUMBRES M & BARBACID M **(2003)**. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3(6):459-65.

MALUMBRES M & BARBACID M **(2009)**. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3):153-66.

MARTIN GS **(2001)**. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(6):467-75. Review.

MENDELSON J **(2002)**. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 15;20(18 Suppl):1S-13S.

MOHAMMADI M, OLSEN SK & IBRAHIMI OA **(2005)**. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):107-37. Review.

MORGAN DO **(1997)**. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:261-291.

NARDELLA C, CLOHESSY JG, ALIMONTI A & PANDOLFI PP **(2011)**. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 24;11(7):503-11. Review.

NESHAT MS, MELLINGHOFF IK, TRAN C, STILES B, THOMAS G, PETERSEN R, FROST P, GIBBONS JJ, WU H & SAWYERS CL **(2001)**. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10314-9.

NISHITANI H & LYGEROU Z **(2002)**. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells* 7(6):523-34.

NURSE P **(1975)**. Genetic control of cell size at cell division in yeast. *Nature* 256:547-551.

NURSE P **(1990)**. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344(6266):503-8. Review.

OBENG EA, CARLSON LM, GUTMAN DM, HARRINGTON WJ, JR, LEE KP & BOISE LH **(2006)**. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107(12):4907-16.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18):7432-7.

ORNITZ DM, XU J, COLVIN JS, MCEWEN DG, MACARTHUR CA, COULIER F, GAO G & GOLDFARB M **(1996)**. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271(25):15292-7.

OVERHOLTZER M, MAILLEUX AA, MOUNEIMNE G, NORMAND G, SCHNITT SJ, KING RW, CIBAS ES & BRUGGE JS **(2007)**. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131:966-979.

OZANNE B, RICHARDS CS & HENDLER F **(1986)**. Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *J Pathol* 149:9-14.

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 α , B-Raf and S6K2. *EMBO J* 25:3078-88.

PARK JW, JANG MA, LEE YH, PASSANITI A & KWON TK **(2001)**. p53-independent elevation of p21 expression by PMA results from PKC-mediated mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun* 280:244-248.

PENUEL E & MARTIN GS **(1999)**. Transformation by v-Src: Ras-MAPK and PI3K-mTOR mediate parallel pathways. *Mol Biol Cell* 10:1693-1703.

PULCIANI S, SANTOS E, LONG LK, SORRENTINO V & BARBACID M **(1985)**. ras gene Amplification and malignant transformation. *Mol Cell Biol* 5(10):2836-41.

QIAO D, YANG X, MEYER K & FRIEDL A **(2008)**. Glypican-1 regulates anaphase promoting complex/cyclosome substrates and cell cycle progression in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 19(7):2789-801.

RAMJAUN AR & DOWNWARD J **(2007)**. Ras and phosphoinositide 3-kinase: partners in development and tumorigenesis. *Cell Cycle* 6(23):2902-5.

RESNITZKY D, GOSSEN M, BUJARD H & REED SI **(1994)**. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 14(3):1669-79.

RESNITZKY D, HENGST L & REED SI **(1995)**. Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* 15(8):4347-52.

ROBERTS PJ & DER CJ **(2007)**. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26(22):3291-310. Review.

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. *Microsc Res Technique* 61:268-274.

RODRIGUEZ-VICIANA P, WARNE PH, DHAND R, VANHAESEBROECK B, GOUT I, FRY MJ, WATERFIELD MD & DOWNWARD J **(1994)**. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370(6490):527-32.

RON D & WALTER P **(2007)**. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(7):519-29. Review.

RUGGERO D & PANDOLFI PP **(2003)**. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3:179-192.

SANDILANDS E, SERRELS B, MCEWAN DG, MORTON JP, MACAGNO JP, MCLEOD K, STEVENS C, BRUNTON VG, LANGDON WY, VIDAL M, SANSOM OJ, DIKIC I, WILKINSON S & FRAME MC **(2011)**. Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK signalling. *Nat Cell Biol*:14(1):51-60.

SARKISIAN CJ, KEISTER BA, STAIRS DB, BOXER RB, MOODY SE & CHODOSH LA **(2007)**. Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9(5):493-505.

SASADA R, KUROKAWA T, IWANE M & IGARASHI K **(1988)**. Transformation of mouse BALB/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA. *Mol Cell Biol* 8:588-94.

SCHWINDT TT, FORTI FL, JULIANO MA, JULIANO M & 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* 6:10133-40.

SEARLE BC **(2010)**. Scaffold: A bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomics studies. *Proteomics* 10(6):1265-1269.

SHAUL YD & SEGER R **(2007)**. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1213-26. Review.

SHAULIAN E & KARIN M **(2002)**. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4(5):E131-6. Review.

SHERR CJ, ROBERTS JM **(1999)**. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13(12):1501-12.

SHIRASAWA S, FURUSE M, YOKOYAMA N, & SASAZUKI T **(1993)**. Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science* 260:85–88.

SCHWAB M, ALITALO K, VARMUS H, BISHOP J. & GEORGE D **(1983)**. A cellular oncogene (c-Ki-ras) is amplified, overexpressed, and located within karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumour cells. *Nature* 303:497-501. SINGH A, GRENINGER P, RHODES D, KOOPMAN L, VIOLETTE S, BARDEESY N & SETTLEMAN J **(2009)**. A gene expression signature associated with "K-Ras addiction" reveals regulators of EMT and tumor cell survival. *Cancer Cell* 15(6):489-500.

SINGH A & SETTLEMAN J **(2009)**. Oncogenic K-ras "addiction" and synthetic lethality. *Cell Cycle* 8(17):2676-7.

SMITS VAJ, VAN PEER MA, ESSERS MAG, 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. *J Biol Chem* 275:19375-19381.

STEHELIN D, VARMUS HE, BISHOP JM & VOGT PK **(1976)**. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260:170–173.

STRATHDEE G, SANSOM OJ, SIM A, CLARKE AR & BROWN R **(2001)**. A role for mismatch repair in control of DNA ploidy following DNA damage. *Oncogene* 20(15):1923-7.

TAKAHASHI JA, FUKUMOTO M, IGARASHI K, ODA Y, KIKUCHI H & HATANAKA M **(1992)**. Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas. *J Neurosurg* 76(5):792-8.

TALAMONTI MS, ROH MS, CURLEY SA & GALLICK GE **(1993)**. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest* 91:53–60.

TANE S & CHIBAZAKURA T **(2009)**. Cyclin A overexpression induces chromosomal double-strand breaks in mammalian cells. *Cell Cycle* 8(23):3900-3.

URAKAWA I, YAMAZAKI Y, SHIMADA T, IIJIMA 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(7120):770-4.

VAKIFAHMETOGLU H, OLSSON M & ZHIVOTOVSKY B **(2008)**. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15(7):1153-62. Review.

VIGIL D, CHERFELS J, ROSSMAN KL & DER CJ **(2010)**. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer* 10(12):842-57. Review.

- VIVANCO I & SAWYERS CL **(2002)**. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489–501.
- WALTER P & RON D (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334(6059):1081-6. Review.
- WANG Q, MALOOF P, WANG H, FENIG E, STEIN D, NICHOLS G, DENNY TN, YAHALOM J & WIEDER R **(1998)**. Basic fibroblast growth factor downregulates Bcl-2 and promotes apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp Cell Res* 238:177–87.
- WEINSTEIN IB **(2002)**. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* 297:63–64.
- WEINSTEIN IB & JOE A **(2008)**. Oncogene addiction. *Cancer Res* 68:3077–3080.
- WHITE-GILBERTSON S, KURTZ DT & VOELKEL-JOHNSON C **(2009)**. The role of protein synthesis in cell cycling and cancer. *Mol Oncol* 3(5-6):402-8. Review.
- WHITESELL L & LINDQUIST SL **(2005)**. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5(10):761-72. Review.
- WU L, BIRLE DC & TANNOCK IF **(2005)**. Effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 used alone or with chemotherapy on human prostate cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 65(7):2825-31.
- WULLSCHLEGER S, LOEWITH R, & HALL MN **(2006)**. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471–484.
- YASUMURA Y, BUONASSISI V & SATO G **(1966)**. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res* 26(3):529-35.
- YEATMAN TJ **(2004)**. A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* 4(6):470-80. Review.
- YOUNG A, LYONS J, MILLER AL, PHAN VT, ALARCÓN IR & MCCORMICK F **(2009)**. Ras signaling and therapies. *Adv Cancer Res* 102:1-17. Review.
- YU Q, GENG Y AND SICINSKI P **(2001)**. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature* 411:1017–1021.

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Matheus Henrique dos Santos Dias

Nascido a 16/01/1981 em São José do Rio Preto-SP, Brasil

mat.intron.heus@gmail.com

Formação acadêmica

Doutoramento direto junto ao Laboratório Especial de Ciclo Celular (LECC). Instituto Butantan. Pelo programa de pós graduação do instituto de química (IQ) USP.

Título do trabalho: Mecanismos da toxidez de FGF2 em células malignas dependentes de Ras: bloqueio de divisão celular e estresse proteotóxico.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin.

Ingresso em 2006 e conclusão em 2012.

Graduação em Biomedicina com habilitação em Bioquímica biologia molecular.

Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN).

Ingresso em 2002 e conclusão em 2005.

Ensino médio: E E Zacarias Antônio da Silva

Conclusão em 1998.

Ocupação atual

Aluno de doutorado. Instituto de química (IQ) USP

Bolsista CNPq. Vigência 04/2006 até 03/2012.

Trabalhos completos publicados em periódicos

FORTI FL, DIAS MH & ARMELIN HA **(2006)**. ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. Mol Cell Biochem 293(1-2):147-60.

Em preparação

DIAS MH, NAKANO F & ARMELIN HA. FGF2 targets an "Achilles' heel" of Ras-driven mouse malignant cells.

Participações selecionadas em congressos

Dias MHS; Nakano F; Fonseca CS & Armelin HA. FGF2 Targets An "Achilles' Heel "of Ras-Driven Mouse Malignant Cells. Signaling in Cell Death, Cancer and the Immune System, 2010, Angra dos Reis, RJ, Brazil. Oral presentation.

Dias MHS; Nakano F; Fonseca CS & Armelin HA. Cell Cycle Analysis of a Malignant Adrenocortical Cell Line: Novel Functions of Cyclin D1. XXXVIII Reunião anual da SBBq, 2009, Águas de Lindóia, SP, Brazil. Poster session.

Dias MHS; Forti FL & Armelin HA. Investigation of MRAP (Melanocortin-2 Receptor Accessory Protein) Gene Expression by RT-PCR in Mouse Adrenocortical Cells, Lineage Y1, and 3T3 Mouse Fibroblasts. XXI reunião da FeSBE, 2006, Águas de Lindóia, SP, Brazil. Poster session. Menção honrosa.