



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Thaís Hancio Pereira

**Implicações da modulação de Tob2 na proliferação
celular, e sua associação com Myc, em células tumorais e
não-tumorais.**

Orientador: Prof^a. Dr^a. Raquel Ciuvalschi Maia
Co-Orientadora: Dr^a Fernanda Costas Casal de Faria.

**RIO DE JANEIRO
2020**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Thaís Hancio Pereira

**Implicações da modulação de Tob2 na proliferação
celular, e sua associação com Myc, em células tumorais e
não-tumorais.**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional
de Câncer como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Oncologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Raquel Ciuvalschi Maia

Co-orientadora: Dr^a Fernanda Costas Casal de Faria.

**RIO DE JANEIRO
2020**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Thaís Hancio Pereira

**Implicações da modulação de Tob2 na proliferação celular, e sua
associação com Myc, em células tumorais e não-tumorais.**

ORIENTADOR: Prof. Dr^a. Raquel Ciuvalschi Maia

Co-Orientador: Dr^a. Fernanda Costas Casal de Faria

Aprovada em: Seis de Março de 2020

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sá (INCA) - Presidente

Prof^a. Dr^a. Nathalia Meireles de Oliveira (INCA)

Prof^a. Dr^a. Tatiana Almeida Simão (UERJ)

Prof^a. Dr^a. Renata Binato Gomes (INCA) – Suplente I

Prof. Dr. Luiz André Mencialha (UERJ) – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2020**

P436i Pereira, Thaís Hancio.

Implicações da modulação de Tob2 na proliferação celular, e sua associação com Myc, em células tumorais e não-tumorais. / Thaís Hancio Pereira. – Rio de Janeiro, 2020.
68f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Ciuvalschi Maia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Costas Casal de Faria

1. Receptor ErbB-2. 2. Proliferação de Células. 3. Neoplasias. 4. Genes myc I. Maia, Raquel Ciuvalschi (Orient.). II. Faria, Fernanda Costas Casal de (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.994075

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, a mulher mais incrível que já habitou este mundo, à forte mulher que me transformou na mulher forte que sou hoje e que lutou até o fim. Agradeço por todos os momentos vividos, pelo amor incondicional e pelo incentivo em todas as etapas da minha vida, até o final da sua. Serei eternamente grata por ter segurado a sua mão desde o meu primeiro passo, até o último suspiro. Sempre haverá um pedaço faltando no meu coração, mas continuo todos os dias por você. Te levo comigo para todos os lugares marcada na pele (literalmente). Irei te amar para todo sempre, com todo meu coração.

Ao meu Pai Marcelo, meu maior incentivador e meu primeiro grande amor. Não tenho palavras para descrever quanto sou grata por ser sua filha. Obrigada por tudo.

À minha irmã Giovanna, que abrilhanta meu céu. Você é uma pedra preciosa que enche meu coração de orgulho. Te amo.

À minha irmã Maria Isabel, que dividiu comigo uma das piores dores da vida. Meu amor, você está se tornando uma mulher forte, como a nossa mãe era, que orgulho de você. Nunca esqueça que estarei sempre ao seu lado, celebrando cada conquista sua.

À minha orientadora Raquel Maia. Obrigada pela grande oportunidade de encontrar mais que um grupo de laboratório, encontrar uma família. Serei eternamente grata pelos grandes ensinamentos no âmbito profissional e pessoal, pela orientação e por sempre embarcar nas minhas loucuras.

À minha co-orientadora Fernanda Costas, obrigada por sempre incentivar minha independência científica. Desejo que você alce voos cada vez maiores.

Aos meus colaboradores do Programa de Imunologia e Biologia Tumoral do INCA, Dr. Leonardo Karam e Rafaela Fagundes, que com muita paciência me introduziram à biologia molecular e passaram todos seus conhecimentos. Sem vocês, não seria possível desenvolver este trabalho.

À Gabriela Nestal, uma das mulheres mais incríveis que eu encontrei na minha vida, que me apoia e me garante grandes risadas todos os dias. Não sei o que seriam dos meus dias no laboratório e dos meus almoços sem a sua

presença. Sua amizade e seu apoio são fundamentais para o meu crescimento dentro e fora do laboratório. Obrigada por absolutamente tudo. Você é brilhante!

À Flavia Vasconcelos, obrigada por todos os conselhos, ajuda, apoio e toda amizade cheia de amor e carinho que temos. Eu adoro dividir toda a minha doçura com você e é muito bom saber que há pessoas tão doces quanto eu neste mundo. Você é uma mulher maravilhosa!

À Lauana Lemos, que voou e foi ganhar o mundo. Lau, você é o ser humano mais iluminado que eu conheci em toda a minha vida, quanta alegria você emana! Já estou morrendo de saudades de você no meu dia a dia. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo em todos os momentos e todas as risadas que você me proporciona.

À Paula Sabbo, a feia mais bonita deste Brasil e a melhor que nós temos! Sua ajuda foi essencial para que este trabalho fosse desenvolvido e sua amizade foi essencial para os meus dias no laboratório.

Aos membros da família Lab Hemato, muito obrigada por fazer meus dias melhores, cada um de vocês traz uma imensa alegria para a minha vida. Nos momentos difíceis, cada apoio e abraço foram imprescindíveis para me sentir melhor.

Aos meus melhores amigos, que mesmo de longe me incentivam e me apoiam em todos os momentos, Deborah Delbue e Gabriel Mello. Que alegria ter amigos tão grandiosos que não se contentaram em viver no ninho e voaram para ganhar o mundo.

À minha melhor amiga, de todo sempre, Thamiris Schwandt. Você é e sempre será meu porto-seguro. Obrigada por sempre ter um colo amigo, uma vontade imensa de me apoiar e crescer comigo. Nosso caminho é sempre seguirmos juntos, ainda bem.

Ao grande amor da minha vida, a pessoa que eu escolhi para dividir os momentos bons e os momentos ruins, Guilherme Rabelo, vulgo mozinho. Você é o meu ponto de paz em meio a qualquer tormenta. Que sorte a minha contar com o melhor abraço do mundo e o amor mais imenso para passar todos os dias da minha vida. Não existe um dia, desde que começamos essa jornada, que eu não

esteja completamente apaixonada por você. Te amo, todos os dias um pouquinho mais.

À minha sogra e minha segunda mãe Claudia Carneiro, que me acolheu com tanto amor e carinho em todos os momentos. Obrigada por me abraçar nesta família maravilhosa.

Aos meus tios Lailson e Paty, que mesmo da Etiópia compartilham todos os momentos de alegria e dor comigo e que vibram por cada vitória minha.

À banca examinadora que gentilmente aceitou o convite para avaliação deste trabalho.

Aos membros da secretaria de Pós-graduação do INCA, que me auxiliaram em todos os momentos do mestrado.

Às agências de fomento que permitiram que este trabalho caminhasse até aqui, em especial a CAPES e à FAPERJ que em um momento tão difícil para a ciência brasileira, permitiram que este trabalho fosse desenvolvido.

Jamais terei palavras para expressar a gratidão que foi desenvolver esse trabalho e crescer tanto durante o processo.

“Ao fim do dia, podemos
aguentar muito mais do que
pensamos que podemos”.

Frida Kahlo

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Implicações da modulação de Tob2 na proliferação celular, e sua associação com Myc, em células tumorais e não-tumorais.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaís Hancio Pereira

Tob2 (transducer of ERBB2, 2) é um membro da família BTG/Tob, principalmente envolvida na deadenilação de mRNAs, mediado pelo complexo CCR4-NOT. Embora Tob2 seja considerada uma proteína antiproliferativa e supressor tumoral, o seu papel em células tumorais e na transformação tumoral ainda não foram completamente elucidados. Neste estudo, nós investigamos o papel da modulação de Tob2 em células tumorais e não tumorais e sua associação com Myc. Nossos resultados demonstraram que a linhagem celular HL60 apresenta maiores níveis de mRNA de TOB2, comparado às linhagens HL60R, U937 e Kasumi-1. Ao passo que as linhagens HL60 e HL60R apresentam maiores níveis de MYC mRNA, comparadas às demais linhagens de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) avaliadas. Além disso, nós observamos que a linhagem HEK293T apresenta maiores níveis dos transcritos de TOB2 comparada às linhagens MDA-MB-231 e H460, ao passo que a linhagem H460 apresenta maiores níveis do transcrito de MYC. A avaliação por Western blotting demonstrou que a linhagem U937 exibe maiores níveis de Tob2 proteico, comparada às demais linhagens de LMA avaliadas e a linhagem celular H460 apresenta maiores níveis de Myc comparado às demais linhagens aderentes. Além do mais, a superexpressão de Tob2 nas linhagens MDA-MB-231, H460 e HEK293T induz um aumento da proliferação celular e do potencial clonogênico destas linhagens. Confirmando este resultado, a inibição de Tob2 nas mesmas linhagens celulares mostrou o efeito oposto, levando à redução da proliferação celular e do potencial clonogênico das células. Além disso, nossos dados demonstram que o silenciamento gênico de Myc, induziu maiores níveis de Tob2 na linhagem P-4936. Adicionalmente, nós observamos que a superexpressão de Tob2 nas linhagens MDA-MB-231 e HEK293T, leva a redução da expressão de Myc. Em conjunto, nossos dados indicam que Tob2 pode ter um papel na indução de proliferação celular em alguns modelos tumorais e não-tumorais. Além disso, nós sugerimos que haja um feedback negativo de expressão entre Myc e Tob2, mas este feedback não parece estar associado ao novo papel de Tob2, na indução de proliferação celular.



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Implicações da modulação de Tob2 na proliferação celular, e sua associação com Myc, em células tumorais e não-tumorais.

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaís Hancio Pereira

Tob2 (transducer of ERBB2, 2) is a protein from BTG/Tob family mainly involved in mRNA deadenylation mediated by CCR4-Not Complex. Although Tob2 is considered as an antiproliferative protein and a tumor suppressor, its role in tumor cells and tumor transformation is almost unknown. In this study we investigated the role of Tob2 modulation in tumor cells and non-tumor cells and the association between Myc and Tob2. Our results demonstrated that HL60 cell line presents higher expression of TOB2 mRNA in comparison to HL60R, U937 and Kasumi-1 cell lines. Meanwhile, HL60R and HL60 cell lines exhibit higher MYC mRNA levels, compared to the others Acute Myeloid leukemia (AML) cell lines evaluated. Furthermore we observed that HEK293T presents higher levels of TOB2 transcripts compared to MDA-MB-231 and H460 cells, while H460 and HEK293T presents higher levels of MYC mRNA, compared to MDA-MB-231. Western blotting evaluation demonstrated that U937 cell line exhibit higher levels of Tob2 protein expression when compared to the others AML cell lines and H460 presents higher levels of Myc protein compared to the other adherent's cells. Moreover, Tob2 overexpression in MDA-MB-231, H460 and HEK293T cell lines increased both cellular proliferation and clonogenic potential. Confirming these data, Tob2 inhibition in the same cells showed the opposite effect, leading to cell proliferation and clonogenic potential decrease. Besides, our data demonstrated that the genic silencing of Myc treatment induced higher Tob2 levels in P-4936 cells. Additionally we observed that Tob2 overexpression in MDA-MB-231 and HEK293T cells reduced Myc expression. Taken together, our data indicates that Tob2 may play a role in cellular proliferation induction in some tumor and non-tumor models. Furthermore, we hypothesize the presence of a negative feedback between Myc and Tob2 expression, but this feedback may not be associated to the novel Tob2 role in cell proliferation induction.

LISTA DE ABREVIACOES

A β 42	<i>Amyloid beta 42</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BTG	<i>B-cell translocation gene</i>
BSA	Albumina srica bovina
Caf-1	<i>chromatin assembly factor-1</i>
CCR4	<i>Carbon Catabolite Repression 4</i>
CDK	Ciclinas Dependentes De Kinases
C/EBP α	<i>CCAAT enhancer binding protein alpha</i>
CNOT7	<i>CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 7</i>
CNOT8	<i>CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 8</i>
cDNA	DNA complementar
DCP1	<i>mRNA-decapping complex regulatory subunit Dcp1</i>
DCP2	<i>mRNA-decapping complex regulatory subunit Dcp2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
DNA	cido desoxirribonuclico
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
eIF4F	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
ERK1/2	<i>Extracellular Regulated MAP Kinase</i>
G1	Gap1
GMP	7-metilguanosina
GST	Glutathione S-Transferase
HEK293T	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>
HER2	<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
IgM	Imunoglobulina M
INCA	Instituto Nacional de Cncer
IPPN	Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais
kDa	Quilodalton

LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
miR	MicroRNA
mRNA	RNA mensageiro
Osx	<i>Osterix protein</i>
PAM-2	<i>PABP-Interacting Motif 2</i>
PABP	<i>poly(A) binding protein</i>
PAN2	<i>poly(A) specific ribonuclease subunit PAN2</i>
PAN3	<i>poly(A) specific ribonuclease subunit PAN3</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PPAR γ 2	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Γ 2
PRMT1	<i>Arginine Methyltransferase 1</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Fase de síntese
Smad1	<i>SMAD family member 1</i>
Smad6	<i>SMAD family member 6</i>
Smad8	<i>SMAD family member 4</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SFB	Soro fetal bovino
STR	<i>short-tandem repetition</i>
TBE	Tris/Borato/EDTA
TBS	Salina tamponada com Tris
TBST	TBS Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1,2-diaminometano
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta 1</i>
TM	Marca registrada
TOB	<i>transducer of ERBB2</i>

TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
UTR	Região não traduzida
XRN1	<i>5'-3' exoribonuclease 1</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Estruturas dos membros da família BTG/Tob e seus domínios. Representação gráfica dos principais domínios descritos nos membros da família BTG/Tob.....	4
Figura 1.2 Processo de deadenilação de mRNAs em mamíferos simplificado.....	13
Figura 1.3 Representação reduzida do papel de Tob2 no processo de deadenilação de mRNA.....	16
Figura 3.1 Representação esquemática do vetor pcDNA TM 5/FRT/TO. Em destaque o sítio múltiplo de clonagem original Adaptado do manual do fabricante.....	21
Figura 3.2 Gel de agarose representativo do vetor, amplicon e corte das enzimas de restrição.....	23
Figura 3.3 Esquema ilustrativo simplificado do processo de construção do plasmídeo contendo o amplicon de Tob2 e seu vetor vazio.....	25
Figura 3.4 Esquema de superexpressão de Tob2 por lipofecção, e plaqueamento dos experimentos subsequentes.....	26
Figura 3.5 Esquema de inibição de Tob2 por siRNA, e plaqueamento dos experimentos subsequentes.....	27
Figura 4.1 Representação esquemática do desenho experimental utilizado no estudo.....	32
Figura 5.1 Avaliação dos níveis de transcrito e proteicos de Tob2 e Myc em diferentes linhagens neoplásicas e não-neoplásicas.....	34
Figura 5.2 Avaliação dos níveis proteicos de Tob2 após silenciamento de Myc	36
Figura 5.3 Avaliação do <i>feedback</i> de regulação entre Myc e Tob2	37

Figura 5.4 Avaliação do número de células totais e trypan positivas após superexpressão de Tob2.....	39
Figura 5.5. A expressão de Tob2 exógeno aumenta a proliferação celular nas linhagens celulares.....	41
Figura 5.6 Análise da formação de colônias após superexpressão de Tob2.....	43
Figura 5.7 Avaliação do número de células totais após inibição de Tob2.....	44
Figura 5.8 A inibição de Tob2 induz redução na proliferação celular das linhagens.....	46
Figura 5.9 Análise da formação de colônias após inibição de Tob2.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Família BTG/Tob e suas interações proteicas.....	5
Tabela 3.1 Condições de plaqueamento para os experimentos realizados em linhagens celulares.....	21
Tabela 3.2 Sequência de primers de TOB2 utilizados no sequenciamento.....	25
Tabela 3.3 Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de Western blotting.....	32

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. FAMÍLIA BTG/TOB.....	1
1.1.1. Subfamília BTG1/BTG2.....	3
1.1.2. Subfamília BTG3/BTG4.....	6
1.1.3. Subfamília Tob1/Tob2.....	6
1.2. TRANSDUCER OF ERBB2 (TOB2).....	7
1.2.1. Tob2 e a deadenilação de mRNAs eucarióticos.....	10
1.2.2. Impacto de Tob2 no câncer.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. CULTURA DE CÉLULAS.....	20
3.2. CLONAGEM TOB2.....	21
3.3. INDUÇÃO DE EXPRESSÃO ECTÓPICA TRANSIENTE DE TOB2.....	26
3.4. SILENCIAMENTO GÊNICO DE TOB2 POR siRNA.....	27
3.5. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO AZUL DE TRYPAN.....	29
3.6. ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA.....	29
3.7. ENSAIO CLONOGÊNICO.....	29
3.8. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MRNA POR PCR EM TEMPO REAL.....	30
3.9. AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO POR WESTERN BLOTTING.....	30
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4. DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
5. RESULTADOS.....	33
5.2. A INIBIÇÃO GÊNICA DE MYC IMPACTA NA EXPRESSÃO DE TOB2.....	37
5.3. A EXPRESSÃO DE TOB2 EXÓGENO LEVA A DIMINUIÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO DE MYC EM LINHAGENS CELULARES TUMORAIS E NÃO TUMORAIS.....	38
5.4. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA MODULAÇÃO DE TOB2 EM LINHAGENS TUMORAIS E NÃO-TUMORAL.....	39
5.4.1. A superexpressão de Tob2 não altera o número de células das linhagens testadas.....	39
5.4.3. A inibição de Tob2 não altera o número de células das linhagens tumorais.....	45
5.4.4. A inibição de Tob2 induz redução de proliferação nas linhagens H460 e HEK293T e reduz o potencial de formação de colônia das linhagens.....	46
6. DISCUSSÃO.....	50
7. CONCLUSÕES.....	55
8. PERSPECTIVAS.....	55
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
10. TRABALHOS PUBLICADOS NÃO RELACIONADOS AO MESTRADO.....	67

1. Introdução

A célula tumoral apresenta diversos fatores que contribuem para sua malignidade e progressão tumoral. Estes fatores, como a evasão do sistema imune, instabilidade genômica, resistência à morte celular e a sinalização proliferativa sustentada colaboram para o desenvolvimento do tumor e sua progressão, culminando muitas vezes na invasão de outros tecidos. O entendimento destes fatores é imprescindível para a busca de novos alvos marcadores moleculares capazes de prever a resposta ao tratamento e a sobrevida global do paciente (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

A desregulação da proliferação celular é um dos fatores que contribui massivamente para a progressão tumoral e sua agressividade. Além disso, o entendimento da sinalização envolvida na progressão do ciclo celular e proliferação celular é altamente complexa e ainda hoje, não é completamente compreendida. Muitos dos alvos envolvidos no processo de proliferação celular são potenciais alvos terapêuticos. Desta maneira, é tão importante o estudo das vias envolvidas no processo de indução de proliferação celular e a busca de novas proteínas envolvidas com este processo, visando maior compreensão da desregulação deste processo no câncer (EVAN & VALDENS, 2001).

1.1. Família BTG/Tob

A família BTG/Tob (*B-cell translocation gene/transducer of ERBB2*) é uma família de proteínas composta por seis membros descritos em mamíferos, sendo eles: *BTG1*, *BTG2(TIS21/PC3)*, *BTG3*, *BTG4*, *Tob1* e *Tob2* (WINKLER, 2010). Todos os membros desta família são caracterizados pela presença do domínio BTG (também conhecido como domínio APRO), na região N-terminal. (BARTLAM & YAMAMOTO, 2010). Além disso, análises estruturais revelam que as proteínas *Tob1* e *Tob2* apresentam região C-terminal mais longa que os demais membros da família (MAUXION, *et al.*, 2009; WINKLER, 2010).

A função desta família tem sido associada a diversos processos celulares fisiológicos e patológicos, como regulação do crescimento tecidual e regulação negativa do ciclo celular. Além disso, membros desta família podem interagir com fatores de transcrição aumentando sua afinidade pelas sequências consenso destas proteínas no DNA e regulando a transcrição de diversos genes. As proteínas desta família também podem interagir com diversas proteínas da maquinaria do decaimento de mRNA, participando assim, da regulação da tradução de diversos alvos (WINTERS & BERNT, 2017). Dessa forma, os membros da família BTG/Tob apresentam importante papel na proliferação, invasão e metástase em diversos modelos tumorais, tornando o estudo da sua expressão e regulação de grande importância para o entendimento da tumorigênese. Além disso, tais moléculas são potenciais biomarcadores de prognóstico e possíveis alvos terapêuticos em diversos tipos tumorais (WINKLER *et al.*, 2010; MICHELI *et al.*, 2015; BAI *et al.*, 2017). Bai e colaboradores demonstraram que todos os membros da família BTG/Tob estavam diferencialmente expressos, quando comparados a amostras normais, em diversos tipos de tumores. O estudo mostrou que a expressão de Tob1, Tob2 e BTG2 está diminuída na maioria dos tumores, ao passo que a expressão de BTG3 está aumentada na maioria dos tumores estudados (BAI, *et al.*, 2017).

Apesar dos membros da família BTG/Tob terem sido descritos em contextos biológicos diferentes, o produto gênico destes membros, possuem em comum a habilidade de inibição da proliferação celular, principalmente ligado ao domínio BTG presente em todos os membros (WINKLER, 2010). Essa função de inibição de proliferação em diversos modelos tumorais e não-tumorais, inclui a família BTG/Tob2 como uma família de genes supressores tumorais, tornando-se cada vez mais importante entender o papel destes, sua regulação e função em diferentes modelos patológicos e fisiológicos.

A região C-terminal não é igualmente conservada entre os membros, permitindo uma classificação da família em três subfamílias: subfamília BTG1/BTG2, subfamília Tob1/Tob2 e subfamília BTG3/BTG4 (ALBRECHT & LENGAUER, 2004). A função do domínio C-terminal destas proteínas ainda é

pouco conhecida, mas alguns estudos sugerem que esta região, confere funções adicionais às proteínas e muitas vezes estão relacionadas à regulação pós-traducional das mesmas (WINKLER, 2010).

1.1.1. Subfamília *BTG1/BTG2*

BTG2 foi o primeiro membro da família BTG/Tob a ser descoberto, em distintos estudos. Em roedores, seus homólogos *TIS21*(rato) e *PC3* (camundongo) foram identificados em resposta imediata primária a fatores de crescimento em células PC12 e Swiss 3T3 durante a diferenciação neural, apresentando então características de uma molécula com habilidade antiproliferativa (BRADBURY, *et al.*, 1991; FLETCHER *et al.*, 1991). Fletcher e colaboradores demonstraram que células NIH3T3 tratadas com acetato de tetradecanoilforbol (TPA), um agente indutor tumoral, leva ao aumento da expressão de *TIS21* e este por sua vez, apresentava a mesma estrutura gênica do gene *PC3*, identificado em camundongos (FLETCHER *et al.*, 1991). Posteriormente, Rouault e colaboradores identificaram e clonaram o gene *BTG2* humano. Os autores demonstraram que a expressão de *BTG2* é regulada por mecanismos dependentes de p53 e sua função está intrinsecamente ligada à regulação do ciclo celular e resposta ao dano do DNA (ROUAULT, *et al.*, 1996; CORTES, *et al.*, 2000).

BTG1 (*B-cell translocation gene 1*) foi primeiramente identificado como um parceiro de translocação cromossômica de c-Myc em amostras de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) (RIMOKH *et al.*, 1991). Posteriormente, Rounalt e colaboradores demonstraram que a expressão de *BTG1* varia entre as diferentes fases do ciclo celular, e que sua superexpressão leva a inibição da progressão do ciclo celular, demonstrando sua atividade antiproliferativa, assim como descrito para *BTG2* (ROUAULT, *et al.*, 1992). Diversos estudos demonstraram que tanto *BTG1*, como *BTG2* estão altamente envolvidos com a leucemogênese linfocítica e linfomas. Além disso, alguns autores já demonstraram que ambas as proteínas podem ser modificadas pós-tradicionalmente e ter sua expressão regulada por microRNAs (miRs) (PRÉVÔT *et al.*, 2000; SCHEIJEN *et*

al., 2017; YUNIATI *et al.*, 2018). *BTG1*, por exemplo, pode ter sua expressão suprimida por Myc, através do miR-17-92. Essa regulação leva ao aumento da proliferação e ao estado neoplásico de células de linfoma (LI, *et al.*, 2014).

O domínio BTG compreende aproximadamente 104 aminoácidos e inclui, na maioria dos membros da família, duas regiões: box A e box B (Fig 1.1) (MATSUDA *et al.*, 2001; TIRONE, 2001; WINKLER, 2010). Os únicos membros que diferem estruturalmente em seu domínio BTG, são *BTG1* e *BTG2*, que além de apresentarem as regiões box A e box B, apresentam adicionalmente a região box C (Fig 1.1) (ROUALT, *et al.*, 1998; EZZEDINE, *et al.*, 2007; MAUXION, *et al.*, 2008). O domínio BTG é responsável, majoritariamente, pelas interações proteína-proteína as quais os membros da família BTG/Tob podem realizar, principalmente com as proteínas do complexo de deadenilação de mRNA: CCR4-NOT (*CCR*, *carbon catabolite repression*) (Tabela 1.1) (MAUXION, *et al.*, 2009; WINKLER, 2010)

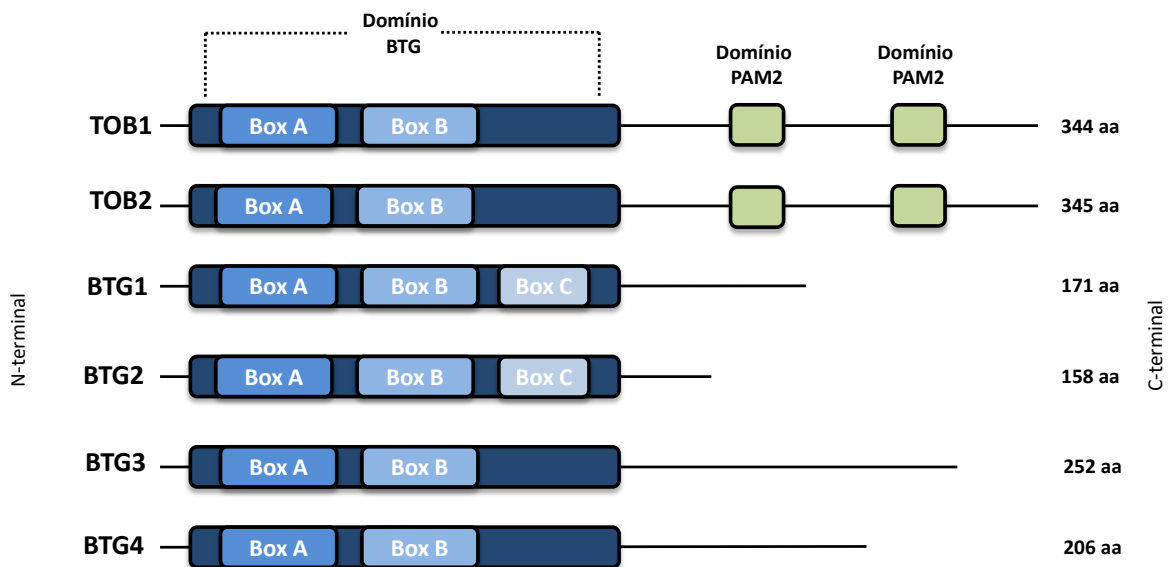


Figura 1.1 Estruturas dos membros da família BTG/Tob e seus domínios. Representação gráfica dos principais domínios descritos nos membros da família BTG/Tob. O domínio BTG está presente em todos os membros da família e as proteínas BTG1 e BTG2 apresentam o box C adicionalmente em seu domínio conservado BTG. As proteínas Tob1 e Tob2 apresentam maior região C-terminal, comparada aos demais membros na família e apresentam nesta região, os domínios PAM2.

Tabela 1.1: Família BTG/Tob e suas interações proteicas. Adaptado de Winkler *et al.*, 2010

Membro BTG/Tob	Interação	Descrição
BTG1	CNOT7	Deadenilase componente do complexo CCR4-NOT
	Hoxb9	Fator de transcrição
	Rar α	Fator de transcrição/receptor nuclear
BTG2	CNOT7/CNOT8	Deadenilase componente com complexo CCR4-NOT
	Hoxb9	Fator de transcrição
	Rar	Fator de transcrição/receptor nuclear
	Smad1/8	Fator de transcrição
	ERK1/2	Serina/treonina quinase
BTG3/ANA	CNOT7	Deadenilase componente com complexo CCR4-NOT
	E2FI	Fator de transcrição
	Smad8	Fator de transcrição
Tob1	ErbB2	Receptor tirosina quinase transmembrana
	CNOT7	Deadenilase componente com complexo CCR4-NOT
	Erk1/2	Serina/treonina quinase
	JNK2	Serina/treonina quinase
	Smad1/5/6/7/8	Fator de transcrição
	Smad2/4	Fator de transcrição
	PABPC1	Proteína de ligação à poli(A)
Tob2	CNOT7	Deadenilase componente com complexo CCR4-NOT
	PABPC1	Proteína de ligação à poli(A)

1.1.2. Subfamília *BTG3/BTG4*

Os demais membros da família BTG/Tob (Tob1, Tob2, BTG3/ANA e BTG4/PC3b) foram identificados a partir da homologia do domínio BTG com os membros já descritos até então (IKEMATSU *et al.*, 1999; CORTES *et al.*, 2000; BUANNE *et al.*, 2000). *BTG3* foi descrito primeiramente em camundongos e sua expressão está associada ao controle negativo do ciclo celular (GUÉHENNEUX, *et al.*, 1997). A expressão de *BTG3* foi descrita como de grande importância durante o processo de desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos (YOSHIDA, *et al.*, 1998). Além disso, recentemente, Hatakawa e colaboradores demonstraram que *BTG3* pode apresentar uma atividade proteolítica relacionada a fragmentos de peptídeos provenientes de uma das regiões internas do domínio BTG. Esses fragmentos de peptídeo por sua vez, podem clivar peptídeos A β 42, importantes para o desenvolvimento da doença de Alzheimer, tornando *BTG3* um alvo interessante para o estudo e desenvolvimento de novas drogas contra a doença (HATAKAWA, *et al.*, 2019).

Dentre todos os membros da família BTG/Tob, *BTG4* é a única proteína que não interage diretamente com as deadenilases do complexo CCR4-NOT, como CNOT7 e seu parálogo CNOT8 (ROUAULT *et al.*, 1998; IKEMATSU *et al.*, 1999; YOSHIDA *et al.*, 2001).

1.1.3. Subfamília *Tob1/Tob2*

Em 1996, Matsuda e colaboradores identificaram um novo membro da família BTG/Tob: o gene *Tob1* (*transducer of ERBB2*). Neste trabalho, os autores identificaram que *Tob1* não apresenta os domínios SH2 (*Src Homology 2*) e SH3 como os demais membros até então descritos, mas apresenta alta homologia ao gene *BTG1*, principalmente quanto a sua região N-terminal. Os autores também identificaram que o novo membro da família BTG/Tob, se liga ao receptor tirosina-quinase ErbB2 (HER2) (MATSUDA, *et al.*, 1996).

Tob2 foi primariamente identificado a partir da hibridização de mRNAs de diversas linhagens celulares. Com intuito de obter a região codificante inteira de *Tob2*, Ykematsu e colaboradores, realizaram uma varredura a partir da biblioteca de cDNA gerada de mRNAs da linhagem de linfoma de Burkitt, Daudi. A comparação de aminoácidos entre o recém-descoberto *TOB2* e os demais membros da família BTG/Tob, apresentavam alta porcentagem de homologia da região N-terminal. Além disso, os autores demonstraram que a superexpressão de *TOB2* na linhagem NIH3T3, levou a uma regulação negativa do ciclo celular (YKEMATSU, *et al.*, 1999). A expressão de Tob2 também já foi associada à indiferenciação osteogênica, através da alça de regulação miR-5100/Tob2/Osx, onde a diferenciação de osteoblastos se deve parcialmente a inibição de Tob2 pelo mir-5100. Por consequência, a menor expressão de Tob2 leva a menor degradação de Osx (*Osterix protein*) e maior diferenciação celular (GÁMEZ, *et al.*, 2013; WANG, *et al.*, 2016). Outro evento no qual a expressão de Tob2 também já foi relacionada é a inibição da adipogênese. Takashi e colaboradores demonstraram que a superexpressão de Tob2 regula negativamente a sinalização de BMP e por consequência, a adipogênese, visto que a sinalização de BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) tem um papel principal neste processo fisiológico. Além disso, o estudo também demonstra que Tob2 inibe PPAR γ 2, (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors γ 2*) uma importante molécula envolvida na adipogênese. Esses achados contribuem de maneira mais evidente para o papel de Tob2 na inibição da adipogênese (GESTA, *et al.*, 2007; TAKAHASHI, *et al.*, 2012).

1.2. Transducer of ERBB2 (Tob2)

Tob2 (*Transducer of ERBB2*) é o membro da família BTG/Tob mais semelhante a Tob1 tanto quanto a sua região C-terminal e quanto a seu tamanho. Por este motivo, até a sua descoberta, muitos trabalhos que buscavam a compreensão sobre os efeitos de Tob não separavam as duas proteínas em relação aos efeitos observados (JIA *et al.*, 2007).

Em 1999, Ikematsu e colaboradores clonaram e caracterizaram Tob2 humano em um estudo que tinha como intuito primário a compreensão dos efeitos biológicos dos demais membros da família BTG/Tob. Apesar de Tob1 e Tob2 apresentarem a região C-terminal mais extensa entre os demais membros, Ikematsu descreveu que essas regiões não apresentavam grande homologia entre elas, sugerindo que estas sejam de grande importância para regulação interna dessas proteínas. Ao contrário do achado relacionado à região C-terminal, a região N-terminal apresenta alta homologia com os demais membros da família, sugerindo que Tob2 apresente as mesmas funções antiproliferativas que as demais proteínas pertencentes à sua família (IKEMATSU, *et al.*, 1999). Em 2002, Ajima e colaboradores clonaram e descreveram o homólogo do gene *Tob2* humano em murinos. Além disso, o estudo de Ajima sugere que Tob2 murino tem participação, durante a embriogênese e durante a vida adulta, em importantes funções fisiológicas, como no desenvolvimento neural e de outros tecidos (AJIMA, *et al.*, 2002).

A função biológica de Tob2 começou a ser elucidada no estudo em que foi identificado e caracterizado, mas assim como Tob1, poucos estudos detalham o seu papel nos processos fisiológicos e patológicos. Tob1 e BTG3 já tiveram seu papel descrito no sequestro de Smad1/5/8 ativados por BMP, levando a supressão da proliferação e diferenciação de osteoblastos (YOSHIDA *et al.* 2000; YOSHIDA *et al.*, 2003). Da mesma maneira, Tob2 já foi descrito levando à inibição de RANK-L e tendo participação no processo de diferenciação de osteoclastos (AJIMA *et al.*, 2008). Tob1 e Tob2 também cooperam com Smad-6 na inibição da transcrição dependente de BMP (*bone morphogenetic protein*), que induz eixos secundários em embriões de *Xenopus* (YOSHIDA *et al.*, 2003). Tob2 também já foi associado à regulação negativa da diferenciação do tecido adiposo em resposta ao *status* de nutrientes. Takahashi e colaboradores demonstram neste estudo que a expressão de Tob2 está diminuída em células do tecido adiposo de camundongos obesos, quando comparados a adipócitos de camundongos saudáveis. Além disso, os autores descreveram que a expressão de Tob2 leva a inibição da transcrição de PPAR γ 2 por meio da inibição da ligação de C/EBP α ao promotor de PPAR γ 2 em

células HEK23T. Esses achados demonstram a importância de Tob2 durante o processo de diferenciação de adipócitos no tecido adiposo branco, visto que a expressão de PPAR γ 2 e C/EBP α são importantes no processo final da diferenciação destas células (ROSEN *et al.*, 2006; TAKASHI *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços de alguns autores, pouco se entendia sobre os processos envolvidos em sua regulação, assim como na relação dos demais membros da família. Alguns trabalhos já demonstravam que a proteína BTG2 apresenta meia-vida curta e é degradada via proteassoma, mas pouco se sabia sobre as demais proteínas (YUNIATI, *et al.*, 2019). Sasajima e colaboradores demonstraram que, assim como BTG2, BTG1, as proteínas Tob1 e Tob2 são degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Os autores demonstraram que a degradação de Tob2, em células HEK293T superexpressas de maneira transiente, é inibido após o tratamento com inibidores de proteassoma específicos. Os autores também demonstraram que a co-expressão de BTG1, BTG2, Tob1 e Tob2 com ubiquitina, em células HEK293T, levam a multiubiquitinação específica de cada membro, sugerindo que a região C-terminal destas proteínas desempenhe um papel importante neste processo (SASAJIMA, *et al.*, 2002).

A região C-terminal de Tob2 já foi sugerido, em alguns estudos, como de grande importância para sua regulação pós-traducional, assim como para sua função no processo de deadenilação de mRNAs. Isto se deve principalmente ao fato da região C-terminal de Tob2 apresentar dois domínios PAM-2, frequentemente associado à ligação de proteínas à PABPC, responsável pelo reconhecimento da cauda poli(A) de mRNAs maduros (ALBRECHT & LENGAUER, 2004; TRITSCHLER *et al.*, 2010). Por este motivo, Huang e colaboradores investigaram o papel dos domínios PAM-2 de Tob2 e seu papel na atividade antiproliferativa ligada a deadenilação de mRNAs desta proteína. Os autores demonstraram que os domínios PAM-2 são importantes para o reconhecimento de PABPC por Tob2, bem como demonstraram que mutantes para estes domínios apresentam menor taxa de deadenilação de mRNA totais. Além disso, os autores encontraram que a fosforilação destes domínios pode levar a sua inativação e conseqüente não ligação a PABPC (HUANG, *et al.*, 2013).

Esses resultados demonstram que a função de deadenilação de Tob2 está relacionada tanto ao domínio BTG encontrado na região N-terminal, que se liga a CNOT7 (deadenilase pertencente ao complexo de deadenilação de mRNA CCR4-NOT), assim como também está relacionado ao domínio PAM-2, responsável pela ligação de Tob2 a proteína PABPC, permitindo o recrutamento correto do complexo CCR4-NOT ao mRNA a ser deadenilado e enviado a degradação.

1.2.1. Tob2 e a deadenilação de mRNAs eucarióticos

A interação entre os membros da família BTG com as proteínas do complexo de deadenilação CCR4-NOT, confere a esta família um importante papel no *turnover* de mRNA (WINKLER, 2010). A deadenilação de mRNAs é um passo importante para a regulação da expressão gênica. Devido à presença do domínio BTG em sua estrutura, a função biológica mais associada a esta proteína é a deadenilação de mRNAs maduros, levando ao seu efeito antiproliferativo. A poliadenilação de mRNAs, assim como a inserção do Cap 5', é um dos processos essenciais para garantir a integridade dos mRNAs. Após a transcrição, ainda no núcleo, o RNA recém transcrito sofre três processos importantes para sua maturação e tradução: 1) A inserção de um radical 7-metilguanossina (GMP), através de uma ligação 5'-5'trifosfato, na extremidade 5' do recém-sintetizado mRNA. Este processo é comumente nomeado de adição do Cap-5'; 2) A retirada dos íntrons pelo complexo proteico denominado spliceossomo, em um processo denominado *splicing* e 3) A inserção de múltiplas adenosinas na extremidade 3' do mRNA, denominado poliadenilação. Estes três processos garantem a integridade do mRNA e da mensagem a ser traduzida (HOCINE, *et al*, 2010; VICENS, *et al.*, 2018).

Em eucariotos, após a poliadenilação na extremidade 3', as proteínas PABP se ligam a cauda poli(A). Essa ligação é importante, uma vez que a interação entre eIF4F *cap-binding complex* e PABP aumenta a eficiência de iniciação de tradução (RICHTER, 2008). A cauda poli(A) apresenta um papel importante na proteção do mRNA contra as RNases presentes no citoplasma celular. Além

disso, o encurtamento da cauda poli(A) é o primeiro passo observado no decaimento de mRNAs, estando intrinsecamente relacionado à meia-vida e controle da expressão dos mRNAs (MEYER, *et al.*, 2004).

A deadenilação de mRNAs apresenta um papel crucial na regulação pós-transcricional da expressão gênica. A partir do momento que a cauda poli(A) é encurtada em alguns resíduos, a degradação deste mRNA é rapidamente iniciada pela digestão do mesmo no sentido 5'-3' pela exonuclease Xrn1 ou alternativamente na direção 3'-5' pelo complexo exossoma (Fig 1.2). Esta regulação permite um silenciamento rápido do mRNA alvo, após a transcrição (GARNEAU, *et al.*, 2007).

Dentre as diversas enzimas já reportadas envolvidas no processo de deadenilação de mRNA, dois complexos heterodiméricos conservados denominados complexo PAN2-PAN3 e complexo CCR4-NOT tem sido descrito como tendo papel central no encurtamento da cauda poli(A) de RNAs de mamíferos. O complexo PAN é composto por duas proteínas, sendo PAN2 a enzima com atividade endonuclease e a proteína PAN3 apresenta papel auxiliar essencial para a atividade do complexo de encurtamento da cauda poli(A) (WOLF & PASMORE, 2014). O complexo CCR4-NOT em mamíferos, por sua vez, apresenta duas enzimas com atividade endonucleases, sendo elas as unidades CNOT7 e seu parálogo CNOT8 (COLLART, 2014).

Diversos trabalhos demonstram que a deadenilação de mRNAs em mamíferos é bifásica. A proteína PABP, ligada a cauda poliadenilada, recruta o complexo PAN2-PAN3, assim como inibe o complexo CCR4-NOT e o complexo de decepamento 5' DCP1-DCP2. O complexo PAN2-PAN3 então leva ao encurtamento da cauda poli(A), pela subunidade PAN2, restando aproximadamente 80 resíduos de adenosina na cauda. Esse processo de encurtamento leva à inibição do complexo PAN2-PAN3, que se desliga do mRNA, e também leva ao recrutamento do complexo CCR4-NOT. Dessa maneira, as suas unidades com atividade catalítica CNOT7 e CNOT8 se ligam a cauda poli(A) e retiram as adenosinas remanescentes. A deadenilação completa do mRNA pode leva-lo à inibição de sua tradução, bem como, levar a sua degradação tanto

dependente do decapeamento 5' pelo complexo DCP-DCP2, assim como independente do decapeamento 5', através de exosoma (Fig 1.2) (YAMASHIDA *et al.*, 2005; MAUXION, *et al.*, 2009). Apesar de ser um processo bem conhecido atualmente, existem algumas etapas que ainda não foram bem elucidados, como por exemplo, os passos envolvendo o recrutamento do complexo CCR4-NOT e passagem da primeira para a segunda fase do processo de deadenilação. Em conjunto com dados encontrados no modelo de levedura, acredita-se que a regulação do tamanho da cauda poli(A) é um processo altamente coordenado e garante a estabilidade do mRNA e, para preencher essas lacunas, é importante entender a associação destes complexos com seus parceiros (MAUXION, *et al.*, 2009).

A resolução da estrutura da família BTG/Tob revelou que o domínio BTG pode se associar à subunidade catalítica do complexo CCR4-NOT, CNOT7. Diversos estudos forneceram importantes informações para melhor entendimento do processo de passagem da primeira para a segunda fase da deadenilação de mRNA e para o entendimento da associação estrutural das proteínas da família BTG/Tob com o complexo CCR4-NOT (HORIUCHI *et al.*, 2009). Além disso, estudos demonstram que tanto o boxA, quanto o boxB presentes no domínio BTG interagem com CNOT7. Corroborando esta ideia, a mutagênese nestas regiões leva a perda de ligação de BTG2 a CNOT7 (ROUAULT, *et al.*, 1998; MAUXION *et al.*, 2008; HORIUCHI *et al.*, 2009). As análises estruturais do domínio BTG demonstram que sua ligação à proteína CNOT7 tem papel central na sua função de deadenilação de mRNA (HORIUCHI *et al.*, 2009).

Estudos posteriores demonstraram que a Tob1, além de se ligar às deadenilases presentes no complexo CCR4-NOT também pode se ligar a outras proteínas deste complexo, como NOT1, uma proteína acessória de grande importância para função do complexo. Esta interação está relacionada à região C-terminal de Tob1, que não é conservado entre os membros da família, sugerindo que esta ligação não ocorre em todos os membros da família (MIYASAKA *et al.*, 2008).

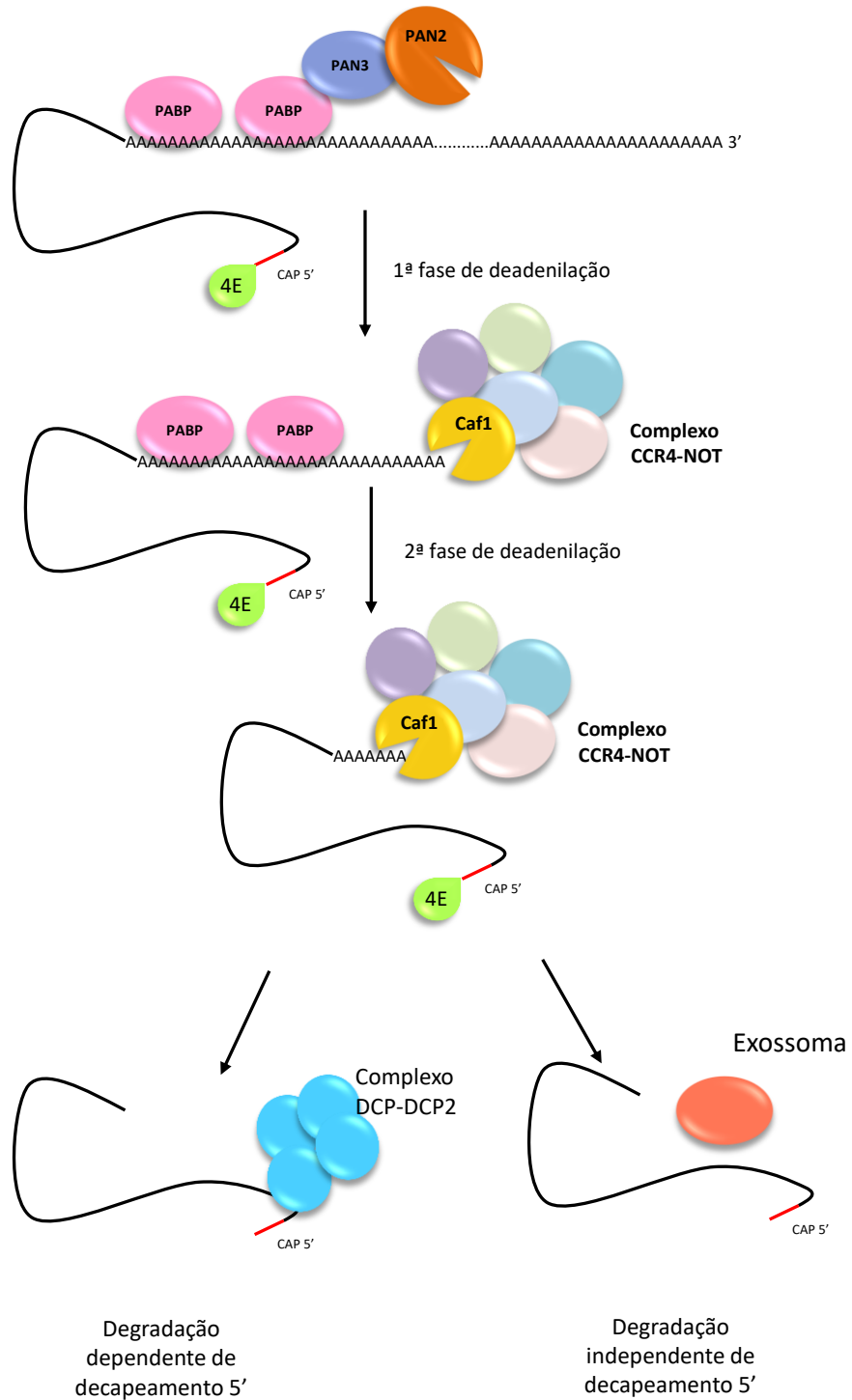


Figura 1.2 Esquema simplificado do processo de deadenilação de mRNAs em mamíferos. A cauda poli(A) do RNA maduro é reconhecido pela proteína PABPC. A primeira fase da deadenilação de mRNAs é caracterizada pelo recrutamento do complexo PAN2/PAN3, que reconhece a proteína PABPC e cliva grande parte dos resíduos de adenosina presente na cauda. A segunda fase deste processo consiste no recrutamento do complexo CCR4-NOT e suas

deadenilases CNOT7 e CNOT8 para clivagem dos resíduos restantes na cauda poli(A). Em sequência o RNA é levado à degradação dependente ou independente do decapeamento 5'.

As evidências que os membros da família BTG/Tob se ligam a proteínas membros do complexo de deadenilação CCR4-NOT, fortalecem a hipótese de que esta família tem um papel essencial neste processo de decaimento de mRNA. Iakmashi e colaboradores, ao descreverem Tob2, demonstraram que o mesmo também leva a inibição do ciclo celular, inibindo a passagem de G1 para fase S. Para estabelecer qual mecanismo levaria a esta inibição, os autores investigaram quais moléculas poderiam interagir com Tob2. As análises de hibridização de cDNA proveniente de HeLa sugerem que Tob2 pode se ligar à CNOT7 humano. Corroborando os dados, o estudo mostrou que a imunoprecipitação de células HEK293T expressando plasmídeos contendo Tob2 e CNOT7 selvagem apresenta ligação entre estas duas proteínas. Tendo em vista que Tob2 pode levar a regulação negativa do ciclo celular, os autores investigaram se Tob2 ou seu parceiro CNOT7 poderia se ligar às quinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês, *cyclin dependente kinase*). As análises de co-imunoprecipitação revelaram que Tob2 não se liga diretamente a Cdk2, Cdk4 e Cdc2, enquanto CNOT7 mostrou uma clara interação com Cdk4 e Cdc2 e uma fraca interação entre CNOT7 e Cdk2 e entre CNOT7 e Cdk6. Em conjunto, estes dados sugerem que a regulação negativa do ciclo celular por Tob2 está relacionada ao seu papel no processo de deadenilação de mRNA, uma vez que Tob2 interage diretamente com CNOT7, e este por sua vez se liga a proteínas regulatórias do ciclo celular (IAKEMATSU *et al.*, 1999). Mais tarde, Feng e colaboradores demonstraram que a expressão ectópica de Tob2 em células tumorais e não-tumorais de mama leva a inibição de mRNA de ciclina D1, sugerindo que a regulação do ciclo celular por Tob2 está intrinsecamente relacionada ao seu papel na deadenilação de mRNAs relacionados à progressão do ciclo celular (FENG *et al.*, 2011).

Posteriormente ao trabalho de Iakematsu, Ezzedine e colaboradores tentaram elucidar de maneira mais precisa como Tob1 e Tob2 participam do processo de encurtamento da cauda poli(A) de mRNAs maduros. Neste trabalho, os autores encontraram que tanto Tob1, quanto Tob2 aceleram o processo de

encurtamento de cauda poliadenilada e que este processo é independente de sua ligação a PABP, mas dependente da sua ligação à CNOT7. Estes dados suportam o modelo em que Tob1 e Tob2 promovem a deadenilação de mRNAs recrutando CNOT7 para a ponta 3' do complexo cauda poli(A)-PABP. Além disso, os autores demonstraram que a atividade de Tob1 e Tob2 no decaimento de mRNAs é independente do status de fosforilação das serinas 152, 154 e 164, sendo estes sítios já descritos como importantes para a regulação pós-traducional de Tob1 (MAEKAWA *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2002; EZZEDINE *et al.*, 2012). Todos esses dados demonstram que Tob2 é uma peça importante no processo de deadenilação de mRNA, visto que as evidências indicam que Tob2 reconhece o complexo cauda poli(A)-PABP e recruta o complexo CCR4-NOT pela ligação à CNOT7, este recrutamento por sua vez, leva a passagem da primeira para a segunda fase da deadenilação de mRNA (Fig 1.2).

1.2.2. Impacto de Tob2 no câncer

O papel de Tob2 em processos patológicos ainda não está bem elucidado, ainda assim já foi reportado que Tob2 pode ser um dos parceiros de translocação do gene MLL, que apresenta mais de 100 rearranjos diferentes e grande relevância em diferentes tipos de leucemias e linfomas (WINTERS & BERNT, 2017). O produto da fusão MLL-Tob2 foi descrito em dois casos de malignidade linfóide: o primeiro, proveniente de uma leucemia aguda de células B. O segundo caso reportado foi uma leucemia/linfoma de célula T precursora (AN, *et al.*, 2009).

No contexto tumoral, a inibição de Tob2 por diversos microRNAs (miRs) já foi associada ao aumento de proliferação, invasão tumoral e transição epitélio-mesênquima em diversos tumores. Li e colaboradores demonstraram que o miR-5100 inibe a expressão de Tob2 pela sua ligação a extremidade 3' UTR. A inibição deste alvo está associada ao aumento de proliferação e invasão celular em células de carcinoma de pulmão A549. Em concordância com estes achados, os autores demonstraram que a superexpressão transiente de Tob2 em células A549 compromete os efeitos do miR-5100 na habilidade de migração, principalmente

em células tratadas com TGF- β , comumente associado à transição epitélio-mesênquima. A superexpressão de Tob2 nesta linhagem de carcinoma de pulmão também foi associada a diminuição de marcadores epitéliais como E-caderina, sugerindo que sua inibição possa ter um papel na transição epitélio-mesênquima destas células (LI, *et al.*, 2017).

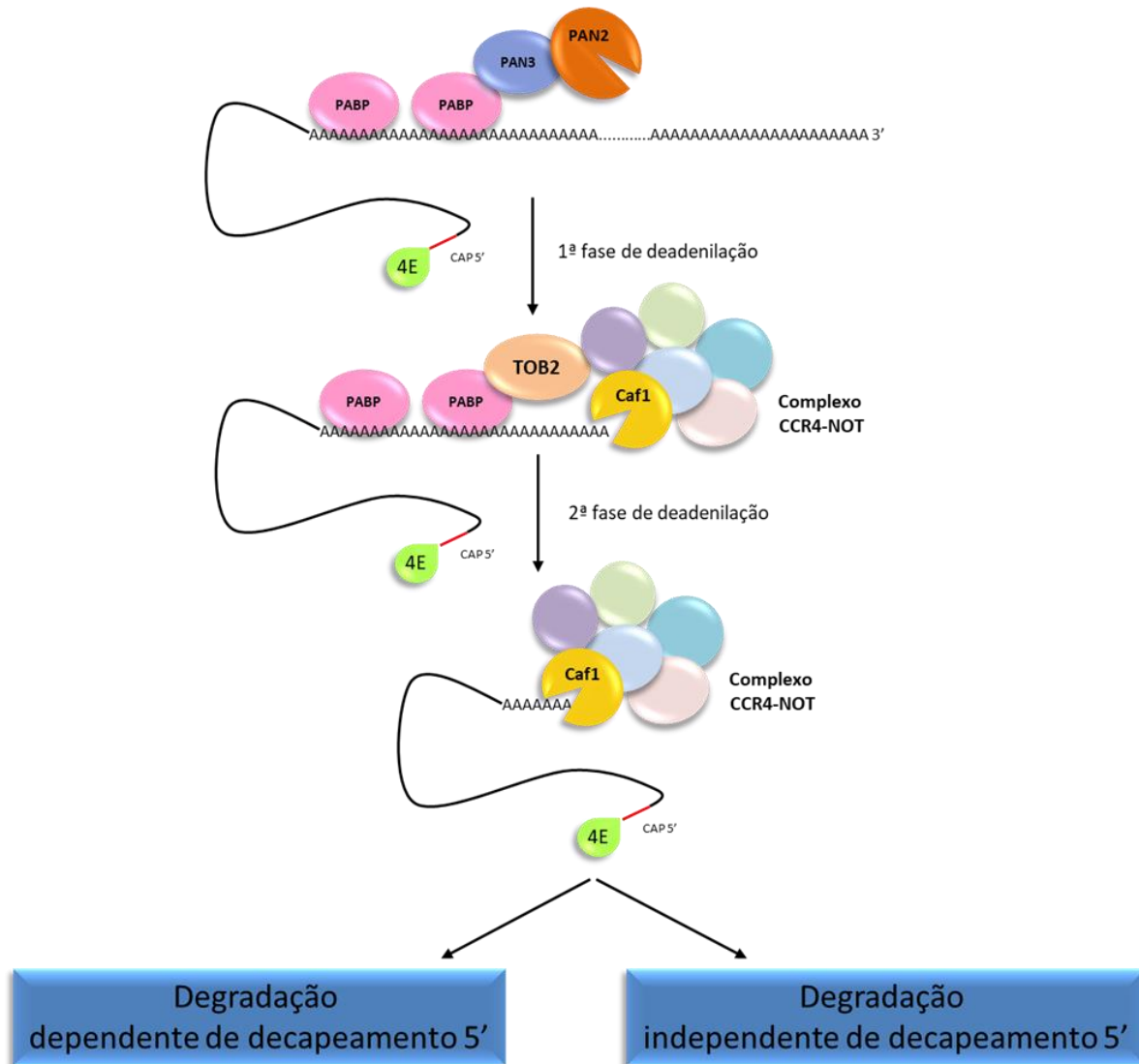


Figura 1.3 Representação reduzida do papel de Tob2 no processo de deadenilação de mRNA. Durante a de deadenilação de mRNAs, Tob2 é uma das proteínas que pode recrutar o complexo CCR4-NOT para dar continuidade ao processo (Caf1 = CNOT7 em humanos e Caf1b = CNOT8 em humanos).

A inibição de Tob2 pelo miR-362-3p também já foi observada em células de carcinoma hepatocelular. Foi demonstrado, mediante experimentos de modulação do miR-362-3p, em células de carcinoma hepatocelular que este evento pode inibir Tob2, levando então a regulação negativa do ciclo celular. Também foi demonstrado que a inibição de Tob2 por shRNA, neste mesmo modelo, está parcialmente associada ao aumento de proliferação, aumento da formação de colônia e aumento de crescimento independente de ancoragem (SHEN, *et al.*, 2015).

O miR-378 foi outra molécula descrita como inibidora de Tob2 através da ligação a sua extremidade 3' UTR, em células de carcinoma de nasofaringe e em células tumorais e não-tumorais de mama (FENG, *et al.*, 2011; YU, *et al.*, 2013). Feng e colaboradores demonstraram que existe uma alça de regulação Myc/miR-378/Tob2/ciclina D1, onde Myc se liga ao promotor do miR-378 levando ao aumento da sua expressão. A expressão de miR-378 leva a inibição de Tob2, que por sua vez deixa de inibir a expressão do mRNA de ciclina D1, levando a progressão no ciclo celular, aumento de proliferação, e transformação oncogênica de células de mama não-tumorais. Feng também demonstrou que essa alça de regulação acontece somente em células HER2⁺, visto que ele não observa os mesmos efeitos em células sem a expressão de HER2 (FENG, *et al.*, 2011). Em células de carcinoma de nasofaringe também foi demonstrado que o miR-378 pode levar ao aumento de proliferação celular, aumento da migração e invasão celular *in vitro*, assim como também promove a tumorigênese *in vivo*. Os efeitos observados com a expressão do miR-378 neste modelo, são sugestivamente associados a inibição de Tob2 pelo mesmo, visto que os autores demonstraram que a inibição do miR leva ao aumento de Tob2 e que Feng e colaboradores já haviam demonstrado que Tob2 é um alvo direto do miR-378 (YU, *et al.*, 2013).

Sabendo-se que Feng e colaboradores já descreveram uma possível regulação de Myc e Tob2, por meio do miR-378, outros possíveis mecanismos de regulação entre Tob2 e Myc podem existir. Myc é um fator de transcrição, que quando dimerizado a Max, se liga ao DNA, levando à transcrição de seus genes alvos, principalmente envolvidos na inibição da apoptose e progressão no ciclo

celular (GRANDORI, *et al.*, 2000; BRETONES, *et al.*, 2015). Feng e colaboradores demonstraram que Myc pode levar a transcrição do miR-378, que por sua vez tem como alvo Tob2. Esse eixo de regulação leva a um decaimento de Tob2, que tem como efeito a não deadenilação do mRNA de ciclina D1, fazendo com que esta ciclina se mantenha expressa e por sua vez atuante na progressão do ciclo celular (Feng, *et al.*, 2011).

Tendo em vista que a função de Tob2 não está completamente elucidada em modelos tumorais e não-tumorais, nosso trabalho visa entender os efeitos da expressão de Tob2 na proliferação celular, a regulação de Tob2 e o papel da associação entre a expressão de Tob2 e Myc.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da modulação de Tob2 na proliferação celular e sua associação com Myc em diferentes modelos tumorais e não-tumoral.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a associação negativa entre Myc e Tob2 na linhagem com promotor de Myc responsivo a tetraciclina, P-4936;
- Avaliar a expressão basal de Tob2 e Myc nas linhagens celulares de carcinoma de pulmão H460, carcinoma mamário MDA-MB-231 e na linhagem não tumoral de rim embrionário HEK293T;
- Avaliar a expressão de Myc após superexpressão de Tob2 nas linhagens H460, MDA-MB-231 e HEK293T;
- Investigar o perfil de proliferação celular dos modelos tumorais (MDA-MB-231 e H460) e não-tumoral (HEK293T) mediante superexpressão transiente de Tob2;

- Avaliar a modulação de proliferação celular das linhagens H460, MDA-MB-231 e HEK293T mediante inibição gênica transiente por siRNA de Tob2;
- Investigar o papel de Tob2 no potencial clonogênico das linhagens H460, MDA-MB-231 e HEK293T mediante sua superexpressão ou inibição por siRNA.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultura de células

As linhagens de carcinoma de pulmão H460 (ATCC® HTB-177™), carcinoma mamário MDA-MB-231 (ATCC®, HTB-26™) e a linhagem de rim humano fetal HEK293T (ATCC® CRL-3216™) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) high glucose (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado. A linhagem P-4936, derivada de célula B humana (Linfoma de Burkitt *like*), foi cultivada em meio RPMI com adição de 10% de SFB Hyclone e 2mM de L-glutamina. As linhagens HL60, U937 e HL60R foram cultivadas em meio RPMI com adição de 10% de SFB e a linhagem Kaumi-1 foi cultivada em meio DMEM-F12 com adição de 20% de SFB. A linhagem resistente à Citarabina HL60R foi cultivada continuamente com 50µM do quimioterápico. Todas as linhagens foram mantidas em estufa úmida (Thermo Scientific) a 37°C com injeção de 5% de CO₂. A linhagem P-4936 foi cultivada sem a presença do antibiótico doxiciclina. Para os experimentos de inibição de Myc, a mesma foi cultivada na presença de 1µg/mL do antibiótico pelos tempos de 30, 60, 90min e 24h. Posteriormente a exposição à doxiciclina, os experimentos com a linhagem P-4936 foram realizados. As linhagens aderentes foram soltas com tripsina 0,125%, (Gibco), centrifugadas (750g, 3min) e resuspensas em meio de cultura para posterior repique e plaqueamento dos experimentos. Todas as linhagens tiveram os perfis genéticos confirmados por STR (*short-tandem repetition*) e foram submetidas ao teste de Mycoplasma por PCR (MycoSensor QPCR Assay kit, Agilent Technologies), estando todas livres de contaminação.

Tabela 3.1 Condições de plaqueamento para os experimentos realizados em linhagens celulares. Quantidade de células e volume de meio de cultura suplementado com soro fetal bovino relativo à área da superfície para adesão celular.

Experimento	Área (cm²)	Número de células	Volume
Placa de 96 poços	0,32	1×10^4	200 μ L
Placa de 6 poços	9,4	3×10^5	500 μ L
Placa de Petri	60,1	$1,8 \times 10^6$	10 mL
Garrafa de 75	75	$2,3 \times 10^6$	12 mL
Garrafa de 150	150	$4,7 \times 10^6$	20 mL

3.2. Clonagem Tob2

Para avaliação do efeito da expressão exógena de Tob2 na proliferação das linhagens celulares H460, MDA-MB-231 e HEK293T, além da investigação da associação da expressão de Tob2 e Myc em diferentes modelos tumorais e não-tumorais, foi necessário a construção de um plasmídeo contendo o inserto Tob2 selvagem em um arcabouço (vetor vazio). Para estas construções, foi utilizado como arcabouço o plasmídeo comercial pcDNATM5/FRT/TO (Invitrogen), que contém entre outros, um sítio de clonagem múltipla e gene de resistência à ampicilina (Fig 3.1). As construções foram validadas, conforme descrito posteriormente, e utilizadas para os ensaios posteriores de modulação de Tob2 nas linhagens.

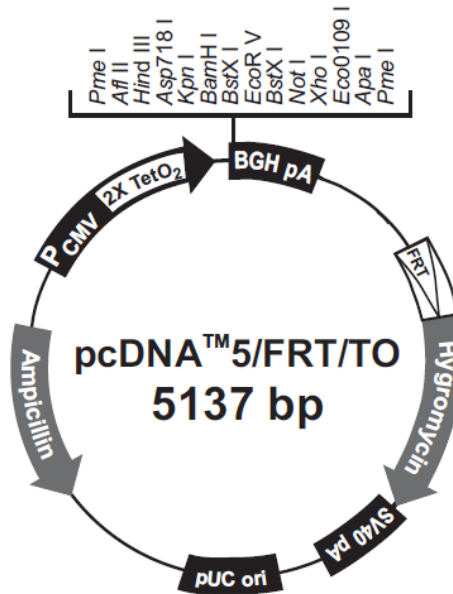


Figura 3.1 Representação esquemática do vetor pcDNA™5/FRT/TO. Adaptado do manual do fabricante.

O passo inicial para o processo de construção do vetor plasmidial foi a análise do vetor de expressão e do gene de interesse. Analisamos o gene de interesse a ser clonado visando obtermos o maior número de informações da sequência gênica e proteica para os próximos passos. Para a análise do gene Tob2 (NCBI Reference Sequence: >NC_000022.11:c41448230-41433488 Homo sapiens chromosome 22, GRCh38.p7 Primary Assembly), utilizamos o banco de dados públicos do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Visando a síntese de primeira fita (cDNA) do gene de interesse, utilizamos o primer específico para Tob2 (5'- AAC ACA CTT GGG TGC TTT G -3') com a finalidade de amplificação do gene alvo por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) utilizando o kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). O produto da reação foi então purificado com o kit HiSpeed plasmid purification (Qiagen).

Ao cDNA, foi adicionado tampão de amostra 5X e o mesmo foi submetido a corrida por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5X, brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As corridas eletroforéticas foram realizadas a 100 V durante aproximadamente 1 hora. O gel de agarose contendo DNA foi visualizado em fotodocumentador, e fotografado

sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm (Bio-Rad). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de DNA de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Posteriormente, o produto de PCR purificado foi mensurado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Para Digestão do vetor, foram utilizadas as enzimas de restrição BamHI-Hi-Fi (G^AGATC_C) e Xho I (C^ATCGA_G) em reação em tampão NEBUffer 4 (New England Biolabs) segundo a recomendação do fabricante. O produto da reação de digestão foi então submetido à corrida de eletroforese em gel de agarose como já descrito, e então purificado com o kit MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen), e posteriormente quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Para a reação de ligação do vetor digerido ao produto de PCR, foi utilizado o kit Quick Ligation (NEB) utilizando as indicações do fabricante. A eficiência de clivagem das enzimas de restrição utilizadas foi testada, bem como o tamanho do fragmento amplificado, como demonstrada na Figura 3.2.

Após a ligação do produto de PCR ao vetor, foram utilizadas bactérias *E. coli* competentes (XL1 Blue) a fim de transformá-las com o novo vetor pcDNA5-TOB2. A eletroporação foi realizada no aparelho GenePulser XCellTM Electroporation System Quick Guide (Bio-Rad). As bactérias competentes receberam uma corrente elétrica de 2,5 kV por aproximadamente 4 milissegundos e em seguida, foram incubadas em meio LB (Luria Bertani) *overnight*. O processo de seleção das bactérias transformadas consistiu na semeadura das mesmas em placa de petri contendo meio LB e ampicilina por pelo menos 18h em estufa a 37°C. Após este período, as placas foram avaliadas quanto à presença de colônias isoladas resistentes a ampicilina. A etapa seguinte consistiu na seleção de no mínimo três colônias isoladas de bactérias transformadas com o vetor vazio, que para fins didáticos será nomeado de pcDNA5 a partir de agora, e no mínimo 3 colônias isoladas de bactérias transformadas com pcDNA5-TOB2, que também para fins didáticos, será nomeado neste trabalho de TOB2. As colônias

selecionadas foram incubadas *overnight*, na estufa, em placa de petri contendo meio LB com adição de ampicilina.

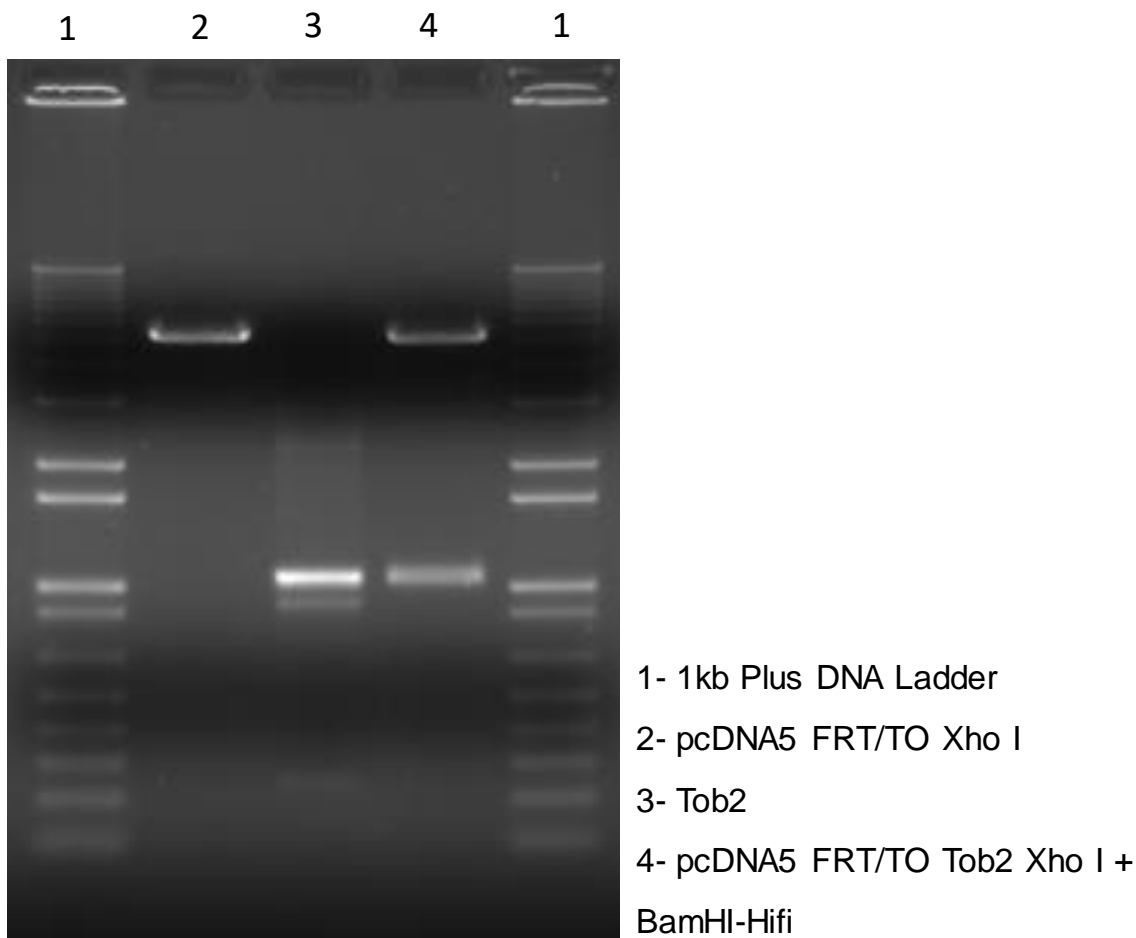


Figura 3.2 Gel de agarose representativo do vetor, amplicon de TOB2 e clivagem do vetor pelas enzimas de restrição. A utilização de apenas uma das enzimas de restrição (linha 2) gerou uma única banda de menor mobilidade no gel. A utilização das duas enzimas de restrição geraram duas bandas no gel, uma de maior mobilidade (TOB2) e uma de menor mobilidade (pcDNAFR/TO) (linha 4). Ambos demonstram a eficiência da clivagem pelas enzimas de restrição ao arcabouço utilizado. A linha 3 mostra apenas o amplicon de Tob2, que apresenta o tamanho esperado (14,743 bp).

Com intuito de obtermos maior quantidade dos plasmídeos gerados, foi realizado uma preparação de plasmídeo em escalas maiores (Mini Prep). As bactérias foram colocadas em meio LB líquido, em tubo falcon, em shaker orbital *overnight*, com temperatura e rotação controladas. Após este período de

incubação, as bactérias tiveram seu DNA extraído com Illustra PlasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. O material nucleico obtido foi submetido à fragmentação por sonicação e amplificados utilizando os primers descritos na tabela 3.2. Após a obtenção dos amplicons, foi realizada a digestão parcial dos mesmos e em seguida foi realizada a adaptação dos barcodes e amplificação do material, para então as amostras serem sequenciadas. Todo o processo foi realizado no aparelho HiSeq 2000 Sequencing System (Illumina), para conferência de ausência de mutação.

Tabela 3.2 Sequência de primers de TOB2 utilizados no sequenciamento. F1 = Foward1, F2 = Foward 2 e R1 = Reverse 1

TOB2 Sequencing F1	5' - CTT TGA GGT GTC CTA CCA GAT T - 3'
TOB2 Sequencing F2	5' - GCC TCT CTC TGT CTA TGC ATT C - 3'
TOB2 Sequencing R1	5' - GCT GCT CTT GAT CTC CTT GT - 3'

Após confirmação da ausência de mutação, o processo de preparação de plasmídeo em escalas maiores (Maxi Prep) foi realizado. As bactérias foram colocadas em meio LB líquido, em Erlenmeyer, em shaker orbital *overnight*, a 37C⁰ e rotação controlada. Após a incubação, o material nucleico foi extraído com PureLink HiPure Plasmid Filter MaxiPrep Kit (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Após a Maxi Prep, os plasmídeos foram então novamente sequenciados e após a confirmação de ausência de mutação, utilizados para a transfecção de células mamíferas. A Figura 3.3 ilustra de maneira simplificada o processo de clonagem.

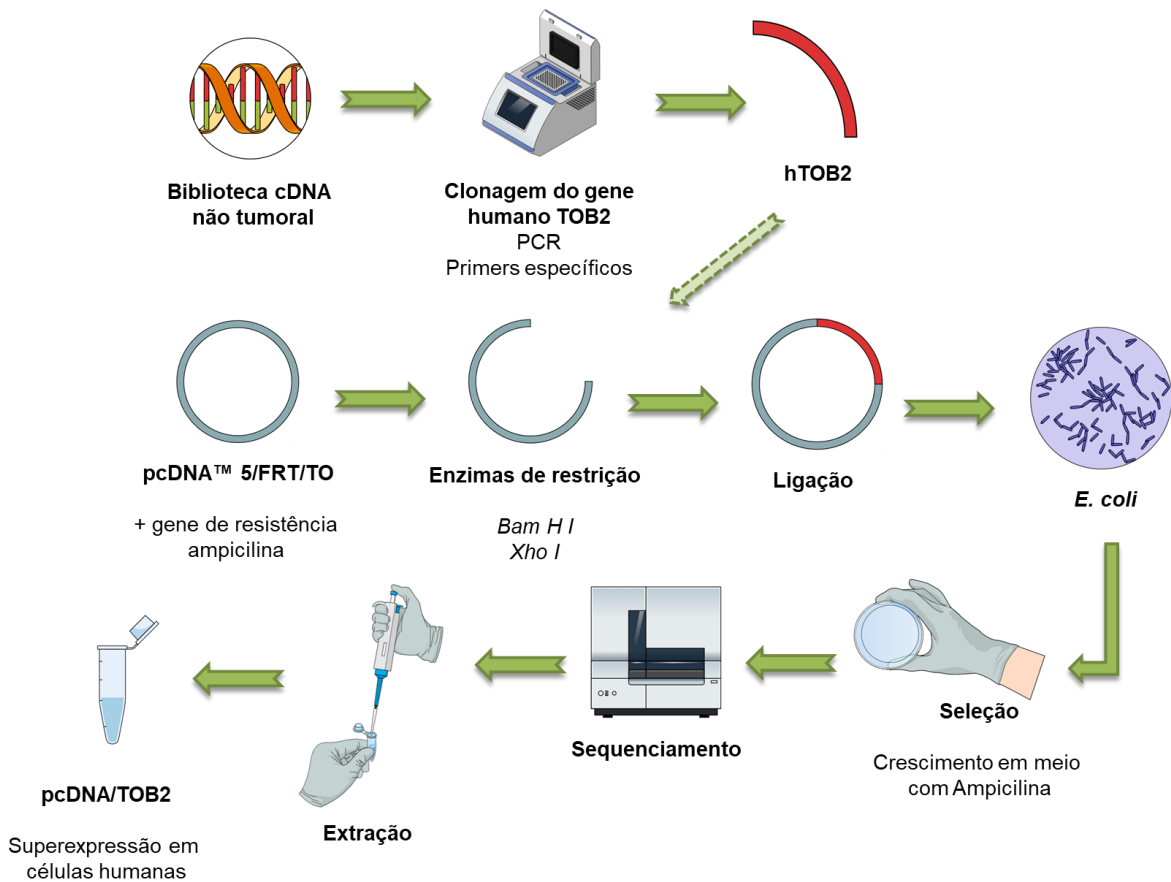


Figura 3.3 Esquema ilustrativo simplificado do processo de construção do plasmídeo contendo o amplicon de Tob2 e seu vetor vazio.

3.3. Indução de expressão ectópica transiente de Tob2

Para superexpressão transiente de Tob2 nas linhagens aderentes, com intuito de avaliar os efeitos biológicos desta superexpressão, o reagente de transfecção lipofectamina 2000 (Invitrogen) foi utilizado. Para este protocolo, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (750g, 3min), resuspensas e contadas. Ao total, 3×10^5 células foram plaqueadas em cada poço, em placa de seis poços para que estas atingissem confluência entre 80-90% no dia posterior. As células então foram colocadas em estufa para aderência por 24h. Após este período de tempo, o meio foi retirado e substituído por um novo meio, tendo sido adicionado a este $4 \mu\text{g}$ dos plasmídeos pcDNA5 (vetor vazio) ou pcDNATob2 (contendo o inserto de Tob2 selvagem), na presença de $5 \mu\text{L}$ de lipofectamina por poço. Os

plasmídeos e a lipofectamina foram diluídos em Opti-MEM (Gibco), conforme o protocolo do fabricante. As células foram então incubadas por 24h em estufa úmida a 37°, com injeção de 5% de CO₂. Após este período de tempo foram novamente tripsinizadas, centrifugadas (750g, 3min), resuspensas, contadas e replaqueadas para os experimentos posteriores.

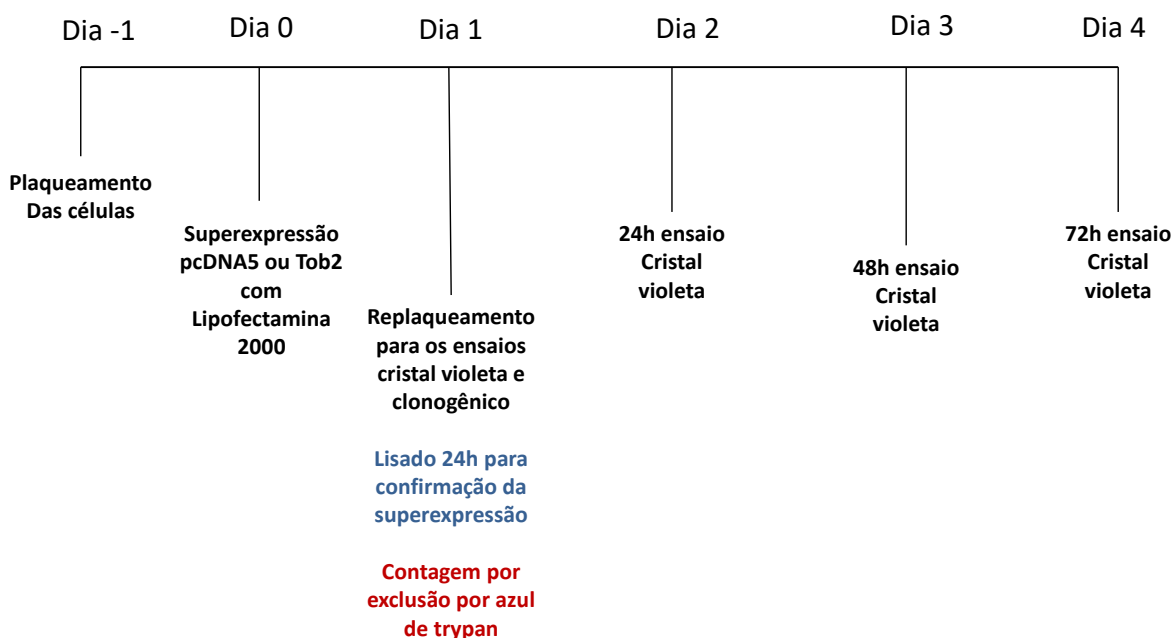


Figura 3.4 Desenho experimental da superexpressão de Tob2 por lipofecção, e plaqueamento dos experimentos subsequentes. Plaqueamento das células no dia -1 para obtenção de 80-90% de confluência no dia 0. No dia 0 as células foram induzidas a expressão de Tob2 exógeno ou de seu vetor vazio com lipofectamina 2000. No dia 1 as células foram contadas por exclusão de azul de trypan e então replaqueadas para os experimentos de proliferação celular (Dias 2, 3 e 4) e ensaio de formação de colônias (10-14 dias após replaqueamento no dia 1). Adicionalmente, foram colhidos pellets para confirmação da superexpressão de Tob2 no dia 1.

3.4. Silenciamento gênico de Tob2 por siRNA

Tendo em vista a avaliação dos efeitos da inibição de Tob2, a técnica do siRNA foi utilizada para silenciar a expressão proteica de Tob2 endógeno. Em placas de seis poços, foram preparados os complexos de transfecção, onde as linhagens H460, MDA-MB-231 e HEK293T foram plaqueadas em total de 2×10^5

células por poço, com intuito de obtenção de 50-60% de confluência no dia seguinte. Os reagentes, 100ng de siScramble ou siTob2 (Santa Cruz Biotechnology) e 5µL de lipofectamina 2000 (Invitrogen) na presença de Opti-MEM (Gibco), foram incubados por 20 minutos e após este tempo incorporados às células. As placas foram então colocadas em estufa úmida (37°C, 5% injeção de CO₂) por 24h para aderência das células e após este tempo, as mesmas foram tripsinizadas, centrifugadas, resuspensas, contadas e replaqueadas para os experimentos posteriores.

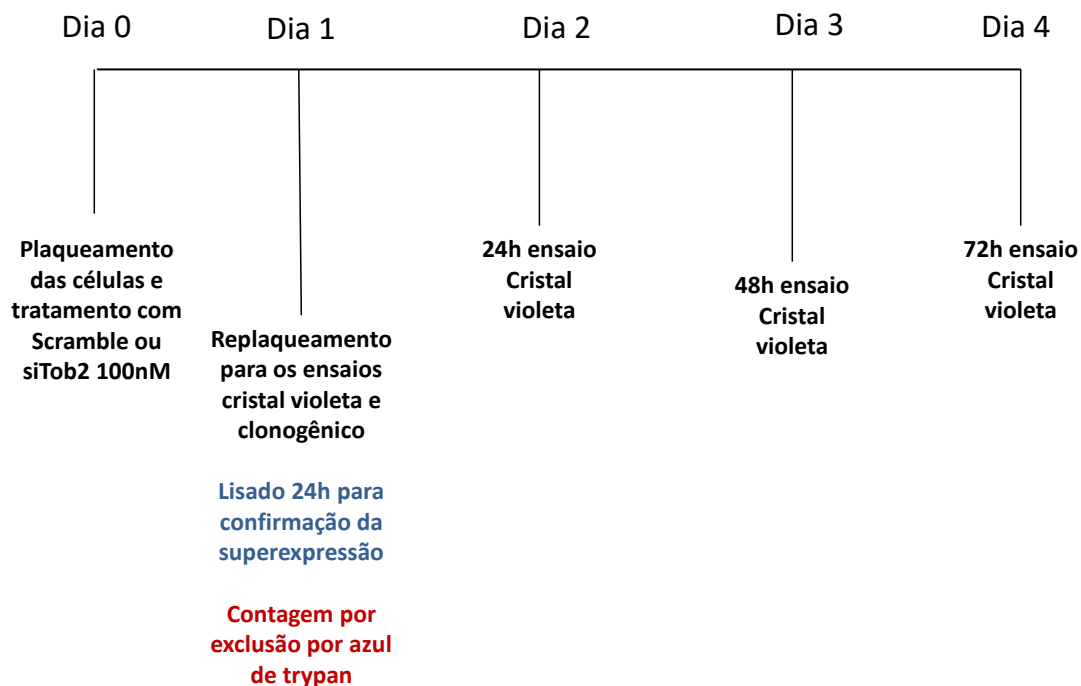


Figura 3.5 Desenho experimental da inibição de Tob2 por siRNA, e plaqueamento dos experimentos subsequentes. Dia 0 - As células foram tratadas com siRNA Tob2 ou Scramble, com lipofectamina 2000 No dia 1 (24h) as células foram contadas por exclusão de azul de trypan e então replaqueadas para os experimentos de proliferação celular (Dias 2, 3 e 4) e ensaio de formação de colônias (10-14 dias após seu replaqueamento no dia 1). Adicionalmente, foram colhidos pellets para confirmação da superexpressão de Tob2 no dia 1.

3.5. Avaliação da viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Trypan

Para os ensaios de exclusão por azul de Trypan, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e resuspensas em 1mL de meio fresco. Desta solução, foram retirados 20µL e adicionados a 30µL de meio e 30µL do corante azul de Trypan. Após homogeneização, 10µL desta solução foram adicionados à câmara de Neubauer e as células dos quadrantes foram contadas. As células sem marcação pelo corante foram consideradas células viáveis, e as células marcadas pelo corante foram consideradas células não viáveis. Para o número total de células foram consideradas o somatório das células viáveis e não viáveis.

3.6. Ensaio de cristal Violeta

Após os ensaios de superexpressão de Tob2 ou inibição de Tob2, as células foram plaqueadas para o ensaio de cristal violeta. Para este ensaio, foram plaqueadas 1×10^4 células por poço em placa de 96 poços com volume final de 200µL, em quadruplicadas por condição. As placas foram então incubadas pelos tempos de 24, 48 e 72h e após os tempos de incubação, as células foram lavadas com PBS pH 7.4 (Sigma Aldrich), fixadas com 200µL de Etanol P.A (Merck) por 10min e então coradas com cristal violeta 0,05% (Vetec) por 10min. Após a coloração, as células foram lavadas com água destilada e deixadas para secagem. Após secas, as células coradas foram diluídas em 200µL de Metanol P.A (Isofar) e colocadas em agitador orbital. A medida das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Beckman coulter) na faixa de 595nm.

3.7. Ensaio clonogênico

Para avaliar a capacidade de formação de colônias após a superexpressão de Tob2 ou após a inibição de Tob2 nas linhagens, 2×10^3 células foram

plaqueadas em placa de seis poços e deixadas em estufa úmida de 10-14 dias para formação de colônias. Após este tempo, as colônias foram lavadas com PBS pH 7,4 (Sigma Aldrich), fixadas com 1mL de Etanol P.A (Merck) por 10min e coradas com cristal violeta 0,5% (marca) por 1h em shaker orbital. Após a incubação, as colônias foram lavadas com água destilada e colocadas para secagem. As placas foram então fotografadas e, as colônias diluídas em ácido acético 33% (Isofar). Após dissolução das colônias, foram colocados 200µL em placa de 96 poços, em quadruplicada, para posterior medida das absorvâncias em espectrofotômetro (Beckman coulter). A leitura foi realizada na faixa de 595nm.

3.8. Avaliação da expressão de mRNA por PCR em tempo real

Para avaliar os níveis de RNA mensageiro (mRNA) de Tob2 e Myc, a técnica de PCR em tempo real, pelo método Taqman (TaqMan® Gene Expression Assay - Applied Biosystems) foi utilizada. O RNA das células foi extraído por Trizol (Trizol® Reagent; Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. A partir de 2 µg de RNA, quantificado pelo aparelho Nanodrop (Nanodrop® ND-1000), a síntese de cDNA foi feita utilizando o método Superscript (Superscript® II Reverse Transcriptase; Invitrogen). Foram utilizadas sondas específicas para *TOB2* (Hs00967571_s1) e *MYC* (Hs00153408_m1) e β-actina (Hs99999903_m1; utilizada como controle endógeno), adquiridas pela Applied Biosystems. Para avaliar a quantificação relativa do gene alvo, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.9. Avaliação do conteúdo proteico por Western blotting

Para confirmação dos ensaios de modulação de Tob2, e para a investigação da alça regulatória de Myc e Tob2, a técnica de Western blotting foi utilizada. As células foram centrifugadas (430xg por 5min), colocadas em gelo e lavadas com PBS pH 7,4 (Sigma Aldrich). O pellet foi então ressuspenso em 100µL de tampão de extração de proteínas *Cell Extraction Buffer* (Invitrogen), e a extração foi realizada seguindo as instruções do fabricante. A quantificação

proteica foi realizada pelo Kit BioRad, baseado no método de Lowry (LOWRY, et al., 1951). Foram utilizadas 20µg de proteína por condição e foram adicionadas às amostras 10 µL de tampão loading (115 mM Tris-HCl pH 6.8; 15% SDS; 10% de glicerol; 100 mM de 2-β-mercaptoetanol; 0,1% de azul de bromofenol).

As amostras foram submetidas à corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida, composto por Acrilamida/Bis-Acrilamida 30% 29:1 (Bio-Rad); 25% H₂O; 115 mM tampão Tris-HCl pH 8.8 (Bio-Rad); TEMED (Sigma-Aldrich) APS (Sigma-Aldrich). A corrida ocorreu em sistema molhado (Bio-Rad) com tampão de corrida Tris/Glicina/SDS 1x (Bio-Rad) à 200v até completa migração das proteínas no gel. As proteínas foram então transferidas para membrana de nitrocelulose (GE healthcare) em cuba úmida com tampão de transferência Tris/Glicina (Bio-Rad) Metanol 20% à 100v por 2h. O padrão da corrida e a eficiência da transferência foram verificados com Ponceau Red (Ponceau Red 0,2%; ácido tricloroacético 3%). Para bloqueio de marcações inespecíficas, as membranas foram incubadas com solução a 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS/Tween 0,5% (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM de NaCl; 0,2% Tween-20) por 2h. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos de interesse diluídos em TBS-tween 0,1% BSA 5% (Tabela 3.2). As membranas foram então lavadas por três vezes com TBS-tween 0,5% por 10min e então incubadas com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a *HorseRadish-Peroxidase* à temperatura ambiente por 1 h, sob agitação constante. As proteínas β-actina e HSC70 foram utilizadas como controle constitutivo de carregamento dos experimentos. Para a revelação foi utilizado o Kit ECL (*ECL Prime™ Western Blotting Analysis System*; GE Healthcare) e as membranas foram então reveladas em sistema digital (C-digit Licor, Uniscience) em modo de alta exposição por 12min.

Tabela 3.3 Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de Western blotting

Anticorpo	Catálogo	Diluição	Fabricante
Tob2	sc-293326	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
c-Myc	D84C12	1:1000	Cell signaling
Hsc70	sc-7298	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-mouse	A9044	1:40000	Sigma Aldrich
Anti-rabbit	A0545	1:20000	Sigma Aldrich

3.10. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e os resultados foram calculados utilizando-se as médias dos percentuais de cada condição pelo software Graph Pad Prism 4.0. O teste estatístico *two-way ANOVA* seguido pelo pós-teste Bonferroni foi utilizado para a análise do experimento de cristal violeta. Para os demais experimentos foi empregado o teste *t student* seguido do pós-teste Mann Whitney. O valor de p foi calculado em um intervalo de confiança de 95% onde valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos em relação aos controles de cada experimento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4. Desenho experimental

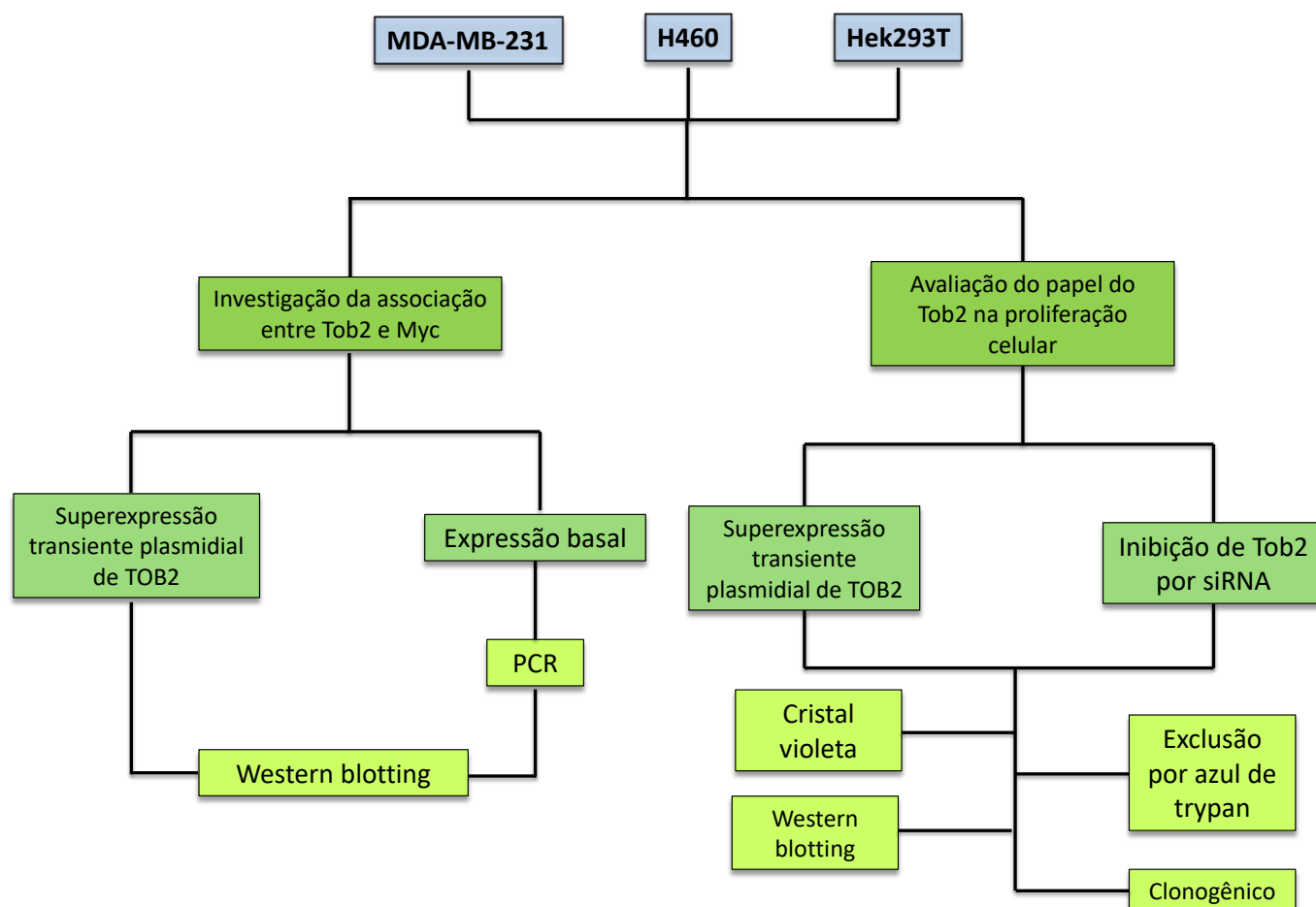


Figura 4.1 Fluxograma ilustrando o desenho experimental utilizado no estudo.

5. Resultados

5.1. A expressão de Myc e Tob2 é diferente entre as linhagens tumorais e não-tumorais

A alça regulatória entre Myc e Tob2 foi descrita por Feng e colaboradores, em um estudo que demonstra que Myc leva ao aumento da expressão do miR-378 e este por sua vez inibe Tob2. Esta regulação se reflete inibindo também a

atividade antiproliferativa de Tob2, visto que esta redução nos níveis de Tob2 está relacionada a maiores níveis de seu alvo de deadenilação, ciclina D1 (FENG *et al.*, 2011).

Tendo em vista este achado, nosso estudo iniciou investigando os níveis de transcritos e os níveis proteicos de Myc e Tob2 em diferentes modelos tumorais e não tumorais. Nossos dados demonstraram que entre as linhagens de leucemia mieloide aguda (LMA) investigadas, a linhagem U937 apresenta menor expressão de Tob2, quando comparada à linhagem HL60 (utilizada como amostra referência) e às linhagens Kasumi-1 e HL60R (resistente à 50 μ M de Citarabina) (Fig 5.1A). Em relação às linhagens provenientes de tumores sólidos e linhagens aderentes não tumorais, nossos dados demonstram que a linhagem de rim embrionário HEK293T apresenta maior expressão de Tob2, quando comparada às demais linhagens tumorais de carcinoma de mama MDA-MB-231, carcinoma de pulmão H460 e à linhagem não tumoral de fibroblasto humano IHF (utilizada como amostra referência) (Fig 5.1B). Em relação aos níveis de expressão gênica de MYC, as linhagens HL60 e HL60R apresentam maiores níveis, quando comparada às linhagens Kasumi-1 e U937 (Fig 5.1C). Ao passo que, as linhagens HEK293T e H460 apresentam Myc aproximadamente 3,5x mais expresso quando comparadas à linhagem de fibroblasto humano (IHF) utilizado como controle. De maneira contrária, a linhagem MDA-MB-231 apresenta expressão 2x menor de Myc, quando comparada ao controle (Fig 5.1D).

Nossos dados de conteúdo proteico demonstram que dentre as linhagens de LMA avaliadas, a linhagem HL60R apresenta maiores níveis de conteúdo proteico de Myc e a linhagem U937 apresenta maiores níveis proteicos de Tob2 (Fig 5.1E). Quanto às linhagens aderentes avaliadas, a linhagem H460 apresenta maiores níveis de Myc, enquanto a linhagem MDA-MB-231 apresenta níveis muito semelhantes de Tob2 à linhagem MCF-7, utilizada como controle positivo (Fig 5.1F).

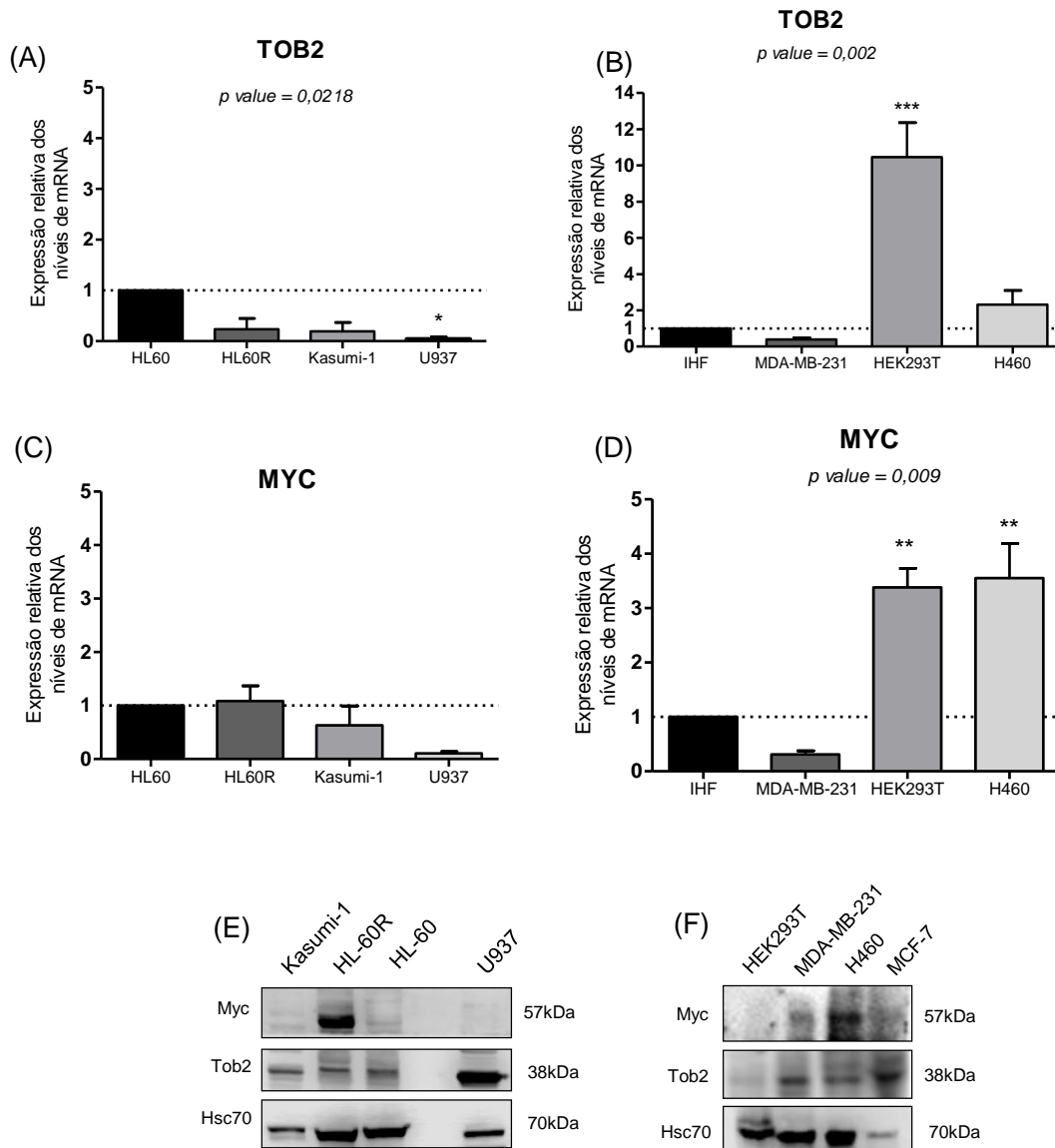


Figura 5.1 Avaliação da expressão gênica e proteica de Tob2 e Myc em diferentes linhagens neoplásicas e não-neoplásicas. Quantificação relativa dos níveis de mRNA de Tob2 em linhagens de LMA (A) e em linhagens aderentes provenientes de tumores sólidos ou tecidos saudáveis (B). Quantificação relativa dos níveis de mRNA de Myc em linhagens de LMA (C) e em linhagens aderentes provenientes de tumores sólidos ou tecidos saudáveis (D). Os níveis de RNAm foram avaliados por PCR em tempo real e todas as análises foram normalizadas com β -actina. Média de três experimentos independentes. Os níveis proteicos de Tob2 e Myc também foram avaliados nas linhagens de LMA (E) e nas linhagens aderentes, este último utilizando a linhagem de mama MCF-7 como controle positivo (F). Figuras representativas de três experimentos independentes. Teste estatísticos One-way ANOVA, pós-teste Bonferroni: $*p < 0.05$.

Comparando as expressões dos transcritos e proteica de Tob2 e Myc nas linhagens, é possível observar que nem sempre, estes níveis se relacionam em expressão. Nossos dados demonstram que apesar dos níveis mRNA de Myc serem semelhantes entre as linhagens HL60R e Kasumi-1 comparada à linhagem HL60, estas não apresentam os mesmos níveis proteicos, visto que a linhagem HL60R apresenta maiores níveis de Myc proteico, comparada às demais linhagens. De maneira semelhante, a expressão de mRNA de Tob2 na linhagem U937 é a menor dentre todas as linhagens de LMA avaliadas, ao passo que os níveis proteicos de Tob2 são superiores às linhagens HL60, HL60R e Kasumi-1. Um efeito semelhante é observado nas linhagens aderentes avaliadas. A linhagem HEK293T apresenta níveis de Tob2 mRNA aproximadamente 8x maiores que a linhagem H460 e mais de 10x maiores, em relação à linhagem MDA-MB-231. Ainda assim, os níveis proteicos de Tob2 na linhagem MDA-MB-231 é maior que as linhagens H460 e HEK293T. O mesmo é observado para a expressão de Myc na linhagem H460, que apresenta níveis semelhantes do transcrito comparados à linhagem HEK293T, ao passo que apresenta a expressão proteica maior que as linhagens MDA-MB-231 e HEK293T.

Em conjunto, os dados sugerem que Myc e Tob2 podem sofrer modificações pós-transcricionais e pós-traducionais que influenciem na sua expressão em diferentes modelos, de acordo com o descrito por Feng em seu trabalho (FENG *et al.*, 2011). Além disso, o nosso conjunto de dados sugere que Myc pode ter sua degradação diminuída, levando o seu acúmulo na linhagem HL60R, do mesmo modo que Tob2 parece se acumular na linhagem U937.

5.2. A inibição gênica de Myc impacta na expressão de Tob2

Feng e colaboradores associou a regulação entre Myc e Tob2 em células de câncer de mama com expressão positiva de HER2 (FENG *et al.*, 2011). Por esta razão passamos a investigar se esta regulação também ocorreria em outros modelos, os quais não expressam HER2. Para este propósito, utilizamos um modelo com características de linfoma de células B cujo promotor de MYC é inibido na presença do antibiótico doxociclina.

O tratamento com 1µg/mL do antibiótico na linhagem P-4936 por 60 minutos, 90 minutos e 24h demonstrou inibição da expressão proteica de Myc, como esperado. Entretanto, nossos resultados demonstram que há um aumento dos níveis de Tob2 após 90min e 24h de tratamento com o antibiótico. Dessa forma, nossos dados indicam que possivelmente há uma associação entre a menor expressão de Myc e maior expressão de Tob2, e que essa associação parece ser independente da expressão de HER2.

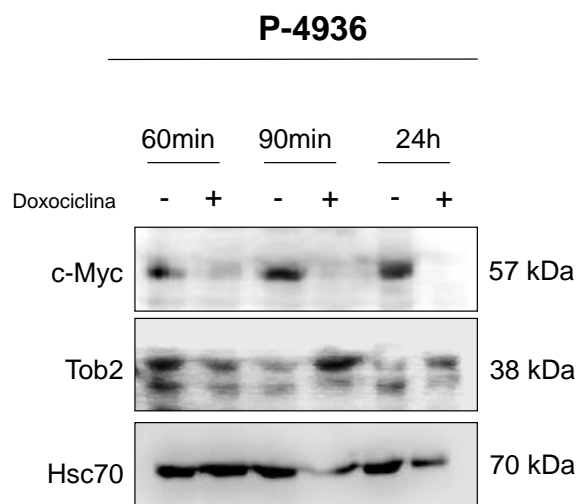


Figura 5.2 Avaliação dos níveis proteicos de Tob2 após silenciamento de Myc. Avaliação dos níveis proteicos de Tob2 após silenciamento de Myc. Expressão proteica de Myc e Tob2 na linhagem P-4936 após tratamento com 1µg/mL de doxociclina por 60 min, 90 min e 24h. Imagem representativa de três experimentos independentes

5.3. A expressão de Tob2 exógeno leva a diminuição do conteúdo proteico de Myc em linhagens celulares tumorais e não tumorais

Uma vez que nossos dados corroboram os dados já existentes na literatura de que existe uma possível alça regulatória entre Myc e Tob2, o próximo passo do nosso trabalho visou investigar se esta alça regulatória aconteceria de maneira unilateral ou se a maior expressão de Tob2 se correlaciona à menor expressão de Myc.

A fim de responder a este questionamento, utilizamos o modelo de superexpressão plasmidial transiente de Tob2 nas linhagens MDA-MB-231, H460 e HEK293T, e avaliamos a expressão proteica de Tob2 e Myc. Nossos resultados demonstram que nas linhagens MDA-MB-231 e HEK293T a superexpressão de Tob2 em 24h culmina na menor expressão de Myc (Fig 5.3A e 5.3C). O mesmo não é observado na linhagem de carcinoma de pulmão H460, visto que nossos resultados demonstraram que a maior expressão de Tob2 na linhagem, não altera os níveis proteicos de Myc em 24h (Fig 5.3B). Em conjunto, os dados sugerem que possa haver um *feedback* de regulação entre Tob2 e Myc. No entanto, são necessárias maiores avaliações para confirmação desta alça regulatória.

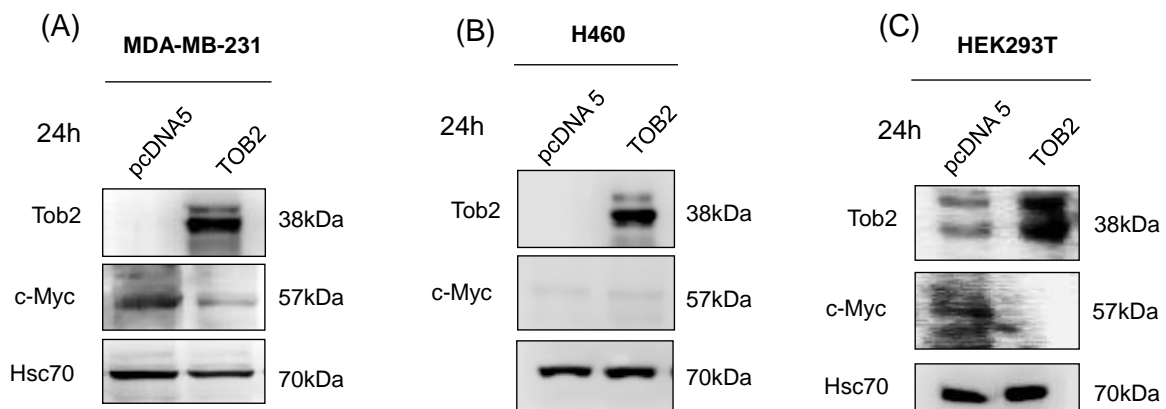


Figura 5.3 Avaliação do feedback de regulação entre Myc e Tob2. Expressão proteica de Tob2 e Myc, por western blot, após a superexpressão de Tob2 exógeno (24h) nas linhagens MDA-MB-231 (A), H460 (B) e HEK293T (C). Imagem representativa de três experimentos independentes.

5.4. Avaliação dos efeitos biológicos da modulação de Tob2 em linhagens tumorais e não-tumoral

A maioria dos trabalhos que explora Tob2 demonstra sua atividade antiproliferativa em diversos tipos de tumores, bem como todos os demais membros de sua família. Por esta razão, a literatura sugere que *Tob2* seja um gene antitumoral, principalmente por sua regulação negativa no ciclo celular. Ainda que haja alguns trabalhos caracterizando os efeitos biológicos de *Tob2* em diversos modelos, é necessário o melhor entendimento da expressão do mesmo em diferentes modelos tumorais e não-tumoral para de fato classificá-lo como um gene antiproliferativo. Por esta razão, nosso trabalho buscou, em seguida, compreender como a modulação de *Tob2* influencia na proliferação celular.

5.4.1. A superexpressão de Tob2 não altera o número de células das linhagens testadas

Para investigar o efeito da expressão de Tob2 nas linhagens celulares MDA-MB-231, H460 e HEK293T, novamente utilizamos o modelo de expressão transiente de Tob2 para avaliar os efeitos biológicos nestes modelos celulares. O primeiro aspecto a ser avaliado foi verificar se a superexpressão de Tob2 (Fig 5.4G, 5.4H e 5.4I) induziria modificação no número total de células, e no número de células marcadas por azul de trypan, o que indicaria células induzidas à morte celular.

Nossos resultados demonstraram que a superexpressão de Tob2 na linhagem MDA-MB-231 não altera o número total de células avaliadas por coloração por azul de trypan, mas demonstram que há uma tendência ao aumento no número de células coradas em azul (Fig 5.4A e 5.4B) O mesmo efeito não foi observado nas demais linhagens. A superexpressão de Tob2 por 24h nas linhagens H460 e HEK293T não alteraram o número de células totais ou o número de células marcadas por azul de trypan (Fig5.4C até 5.4F) sugerindo que a superexpressão de Tob2 neste tempo, não exerce efeito na proliferação celular,

bem como na morte celular. Por este motivo, são necessárias maiores avaliações em tempos maiores para entender os efeitos de Tob2 na proliferação celular.

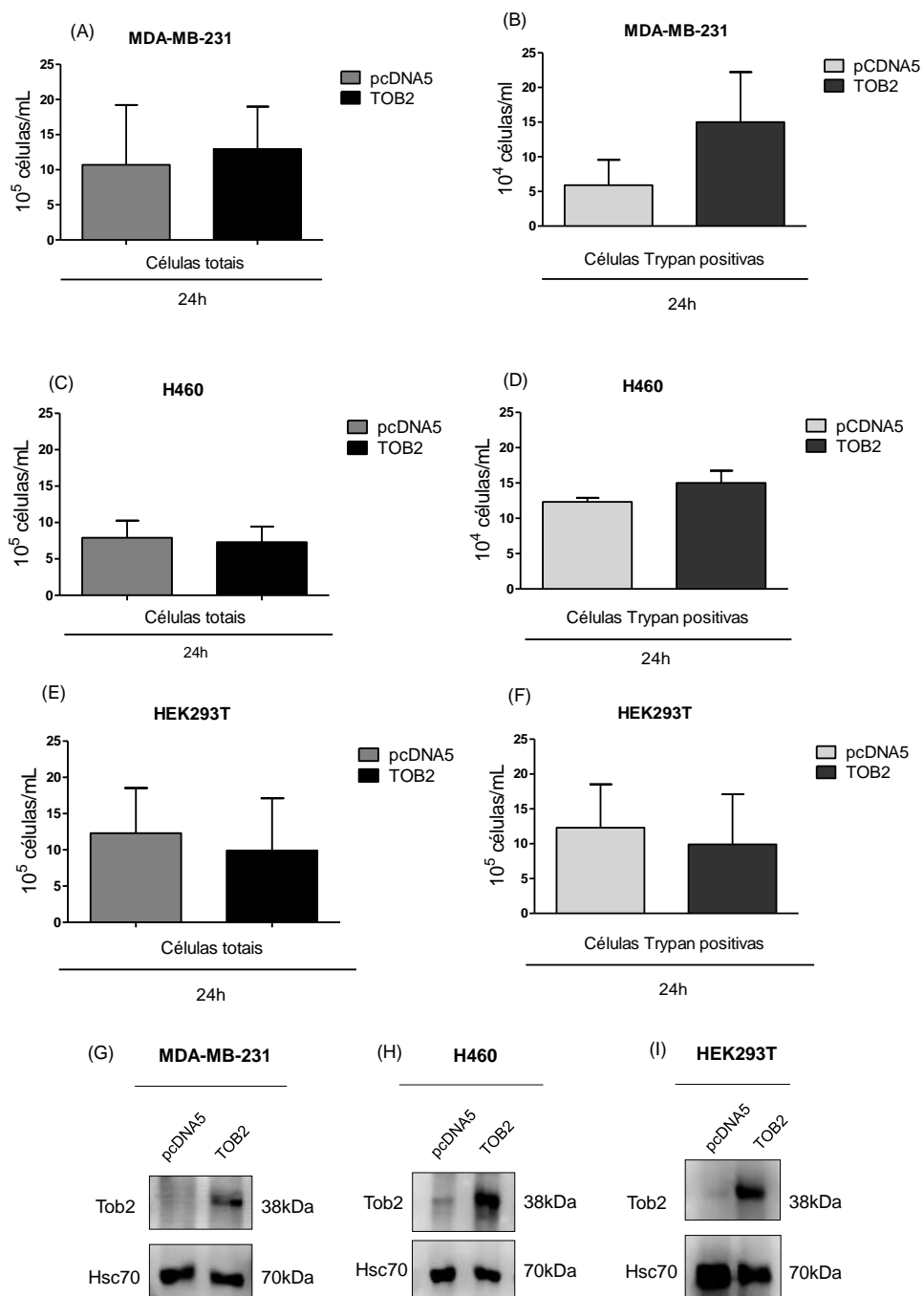


Figura 5.4 Avaliação do número de células totais e trypan positivas após superexpressão de Tob2. Contagem por azul de trypan das linhagens MDA-MB-231 (A e B), H460 (C e D) e HEK293T (E e F) após a expressão exógena de Tob2. Média de três experimentos independentes. Western

blotting para a expressão proteica de Tob2 exógeno nas linhagens MDA-MB-231, H460 e HEK293T por lipofecção por 24h. Imagem ilustrativa de três experimentos independentes.

5.4.2. A superexpressão de Tob2 nas linhagens tumorais e não tumoral induz aumento da proliferação celular e da capacidade de formação de colônias

Tendo em vista que nossos resultados demonstraram que a superexpressão de Tob2 não altera o número de células em 24h, o próximo passo foi investigar se a expressão ectópica de Tob2 nas linhagens celulares altera a proliferação celular. Para este fim, realizamos os experimentos de acordo com o desenho experimental explicitado na Figura 3.3 na seção de Materiais e Métodos

Utilizando a metodologia de cristal violeta para avaliar a proliferação celular após a superexpressão de tob2 no tempo 24h, verificamos que em todas as linhagens a maior expressão de Tob2 induziu aumento na densidade ótica avaliada, sugerindo maior proliferação celular. Este efeito é mais evidente nas linhagens MDA-MB-231, onde esse aumento de proliferação celular é mais evidente e estatisticamente significativo ($p\ value = 0,0047$) após 72h (Fig 5.5A), bem como na linhagem HEK293T, onde o aumento na proliferação celular induzida pela maior expressão de Tob2 também foi estatisticamente significativo ($p\ value = 0,0024$) em todos os tempos avaliados (Fig 5.5C). Na linhagem H460, há uma tendência de aumento na proliferação celular nas células transfectadas com Tob2 (Fig 5.5D), mas este resultado não foi estatisticamente significativo, sendo necessário maior número de experimentos para confirmação deste dado.

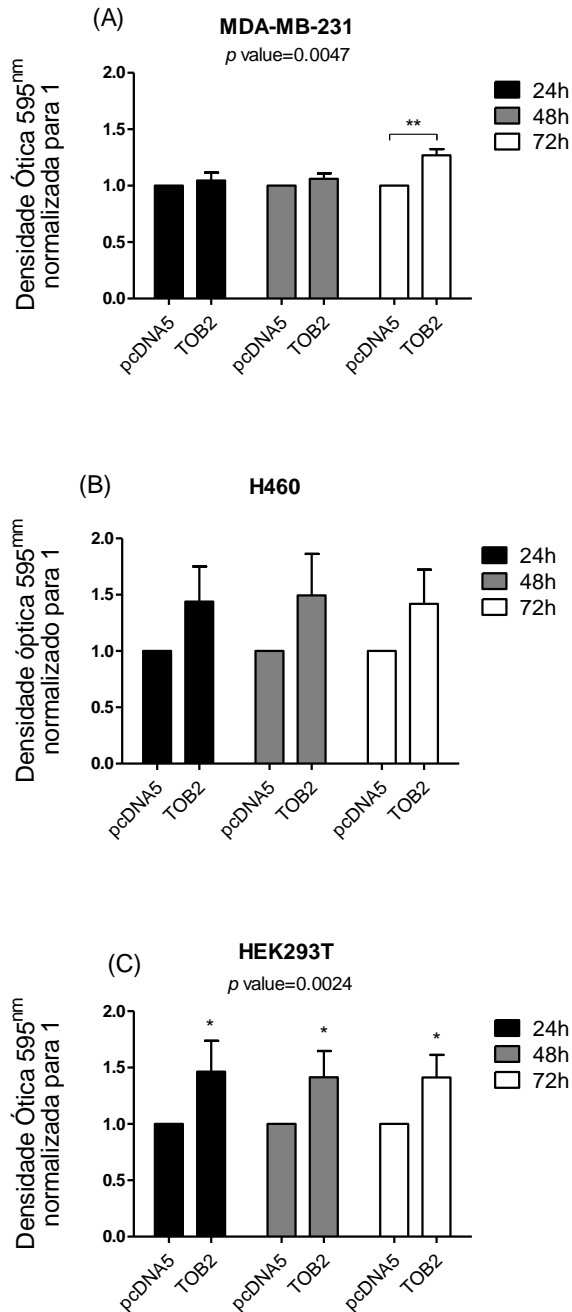


Figura 5.5 A expressão de Tob2 exógeno aumenta a proliferação celular nas linhagens celulares. Ensaio de cristal violeta após superexpressão de Tob2 por 24h avaliando a densidade óptica relativa das linhagens (A) MDA-MB-231, (B) H460, e (C) HEK293T, nos tempos de 24, 48 e 72h. Média de três experimentos independentes. Teste estatístico two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni, * $p < 0,05$

Considerando que nossos resultados demonstraram que a maior expressão de Tob2 induz aumento na proliferação, quando comparado ao seu controle, nosso próximo passo foi avaliar se a superexpressão de Tob2 também influenciaria no processo de formação de colônias das linhagens celulares testadas. A Figura 5.3 demonstra que a superexpressão de Tob2 nas linhagens MDA-MB-231, H460 e HEK293T induz aumento na formação de colônias, mesmo que estes resultados não demonstrem diferença estatisticamente significativa (Fig 5.4.2.2.A-C). Em conjunto, os achados sugerem que Tob2 pode levar ao aumento da proliferação celular nestes modelos, bem como induzir a formação de colônias, contrariando à sua então conhecida função antiproliferativa.

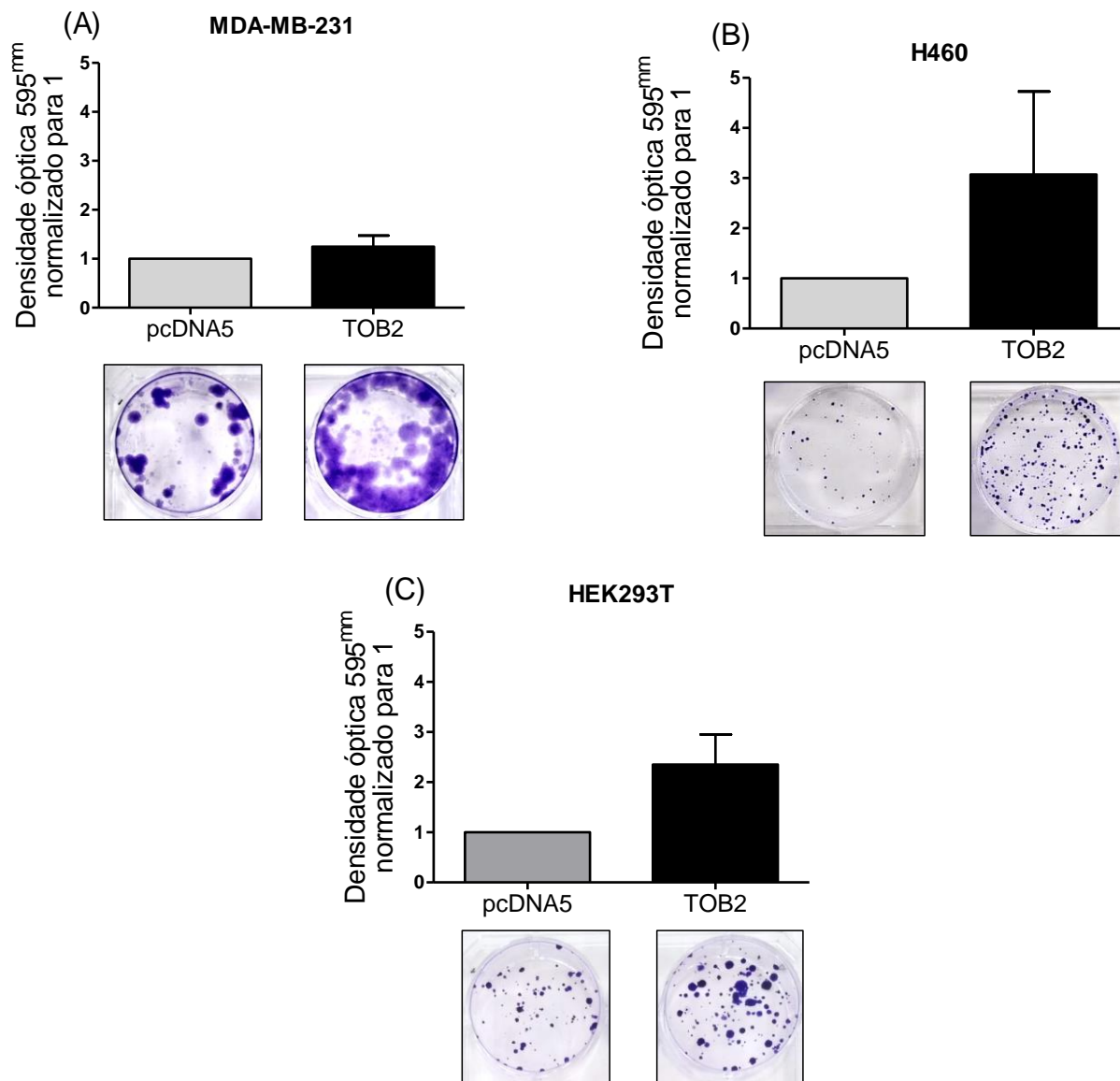


Figura 5.6 Análise da formação de colônias após superexpressão de Tob2. Ensaio de formação de colônias após 10-14 dias de incubação após superexpressão de Tob2 por 24h nas linhagens celulares MDA-MB-231 (A), H460 (B), e na linhagem HEK293T (C) Médias de três experimentos independentes para as medidas de densidade ótica. Imagens representativas de três experimentos independentes.

5.4.3. A inibição de Tob2 não altera o número de células das linhagens tumorais

Com a finalidade de confirmar o papel de Tob2 na indução de proliferação celular nas linhagens MDA-MB-231, H460 e HEK293T, investigamos se a inibição de Tob2 teria o efeito biológico contrário ao encontrado nos nossos resultados de superexpressão de Tob2. Para tal, utilizamos o desenho experimental descrito na Figura 3.4.

Os dados demonstram que a inibição de Tob2 por siRNA após 24h não altera o número total de células nas linhagens tumorais MDA-MB-231 e H460 (Fig 5.7A e 5.7B), sugerindo que a modulação negativa de Tob2, assim como a modulação positiva, não interfere no número de células vivas das linhagens tumorais testadas.

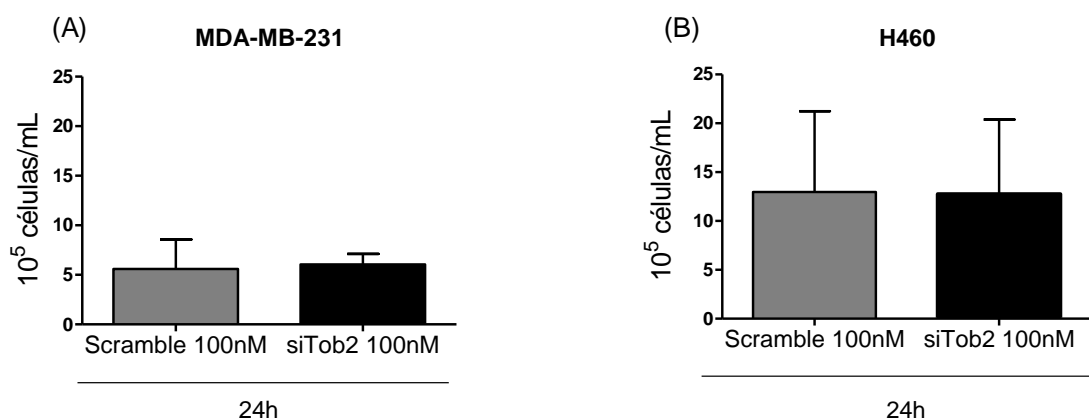


Figura 5.7 Avaliação do número de células totais após inibição de Tob2. Avaliação do número de células por exclusão por azul de trypan após inibição de Tob2 por siRNA por 24h nas linhagens (A) MDA-MB-231 e (B) H460. Média de três experimentos independentes.

5.4.4. A inibição de Tob2 induz redução de proliferação nas linhagens H460 e HEK293T e reduz o potencial de formação de colônia das linhagens

O próximo passo do estudo visou dar continuidade a investigação do efeito de Tob2 na indução de proliferação celular, buscando avaliar se a inibição de Tob2 estaria envolvida com a redução de proliferação celular. Para este fim utilizamos o ensaio de cristal de violeta e avaliamos a proliferação celular das linhagens por 24, 48 e 72h. Os resultados demonstram que a inibição de Tob2 (Fig 5.8D) não altera a taxa proliferativa da linhagem MDA-MB-231 em nenhum dos tempos testados (Fig 5.8A), ao passo que a inibição de Tob2 não altera a taxa proliferativa da linhagem HEK293T nos tempos de 24 e 48h, mas leva a redução de aproximadamente 40% das células no tempo de 72h, quando comparado a seu controle (Fig 5.8C e 5.8F). Além disso, foi possível observar que o silenciamento de Tob2 reduz a proliferação celular em todos os tempos testados, sendo mais evidente no tempo mais tardio (Fig 5.8B e 5.8E).

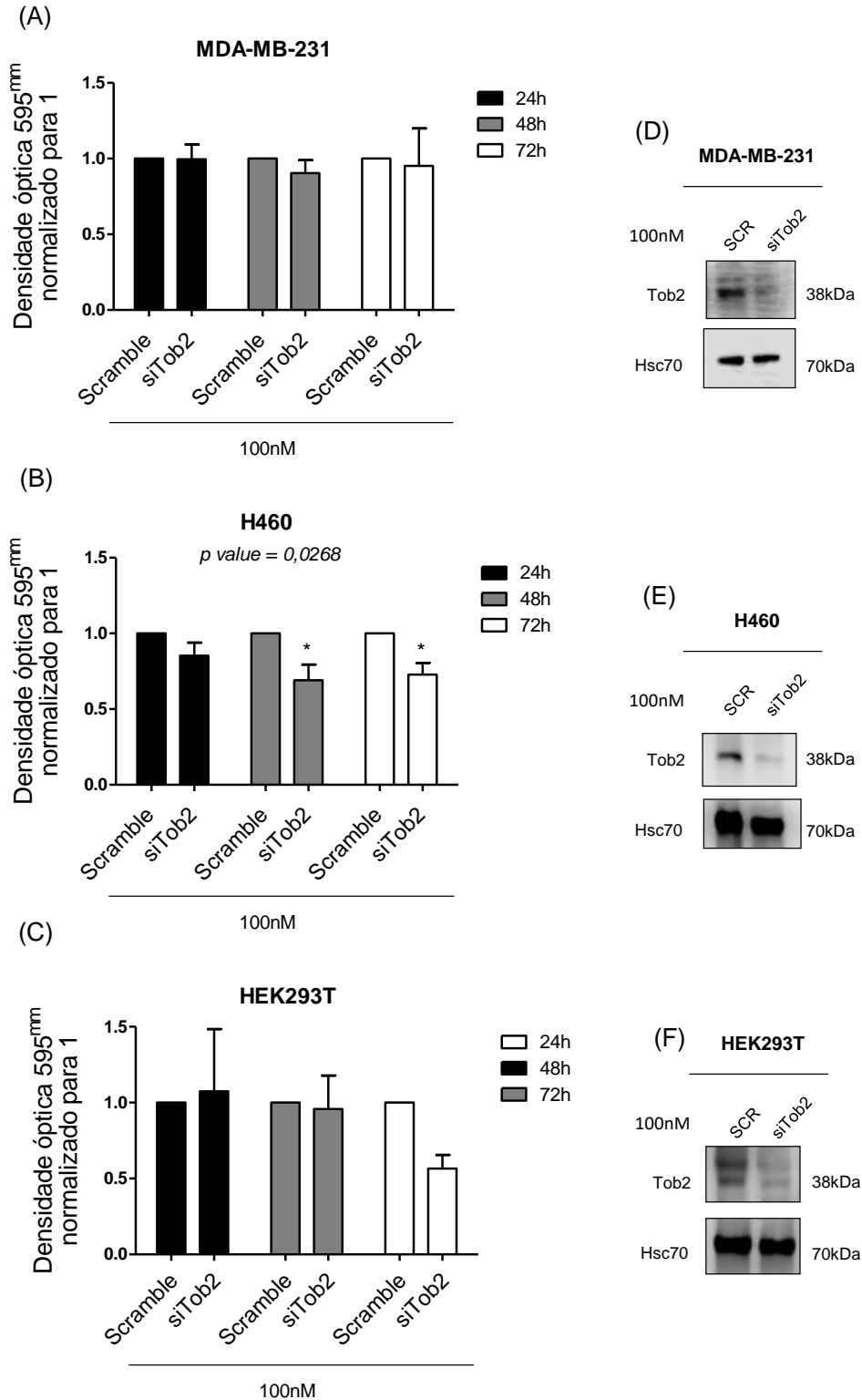


Figura 5.8 A inibição de Tob2 diminui a proliferação celular. Ensaio de cristal violeta após o silenciamento de Tob2 por 24h avaliando a densidade óptica relativa das linhagens (A) MDA-MB-231, (B) H460 e (C) HEK293T nos tempos de 24, 48 e 72h após replaqueamento. Média de três

experimentos independentes. Western Blot demonstrativo da expressão de Tob2 após 24h de inibição por siRNA nas linhagens (D) MDA-MB-231, (E) H460 e (F) HEK293T. Imagens representativas de três experimentos independentes. Teste estatístico two-way ANOVA, pós-teste Bonferroni, * $p < 0,05$.

Além disso, para confirmar o papel de Tob2 na indução de formação de colônia nas linhagens celulares, utilizamos novamente a abordagem do ensaio clonogênico após inibição de Tob2 para obtermos esta resposta. Foi possível observar que a inibição de Tob2 nas linhagens MDA-MB-231, H460 e HEK293T diminuiu a capacidade de formação de colônias destas linhagens quando comparado ao seu controle no experimento (scramble) (Fig 5.9A-C).

Ainda que este conjunto de resultados não apresente diferença estatisticamente significativa, os dados obtidos, em conjunto com os demais dados apresentados nesta dissertação, sugerem que Tob2 apresenta um papel na indução de proliferação celular, dependendo do modelo celular. Para confirmação desta hipótese, ainda não necessários mais experimentos, demonstrando que Tob2, de fato, exerce um papel na indução da proliferação celular.

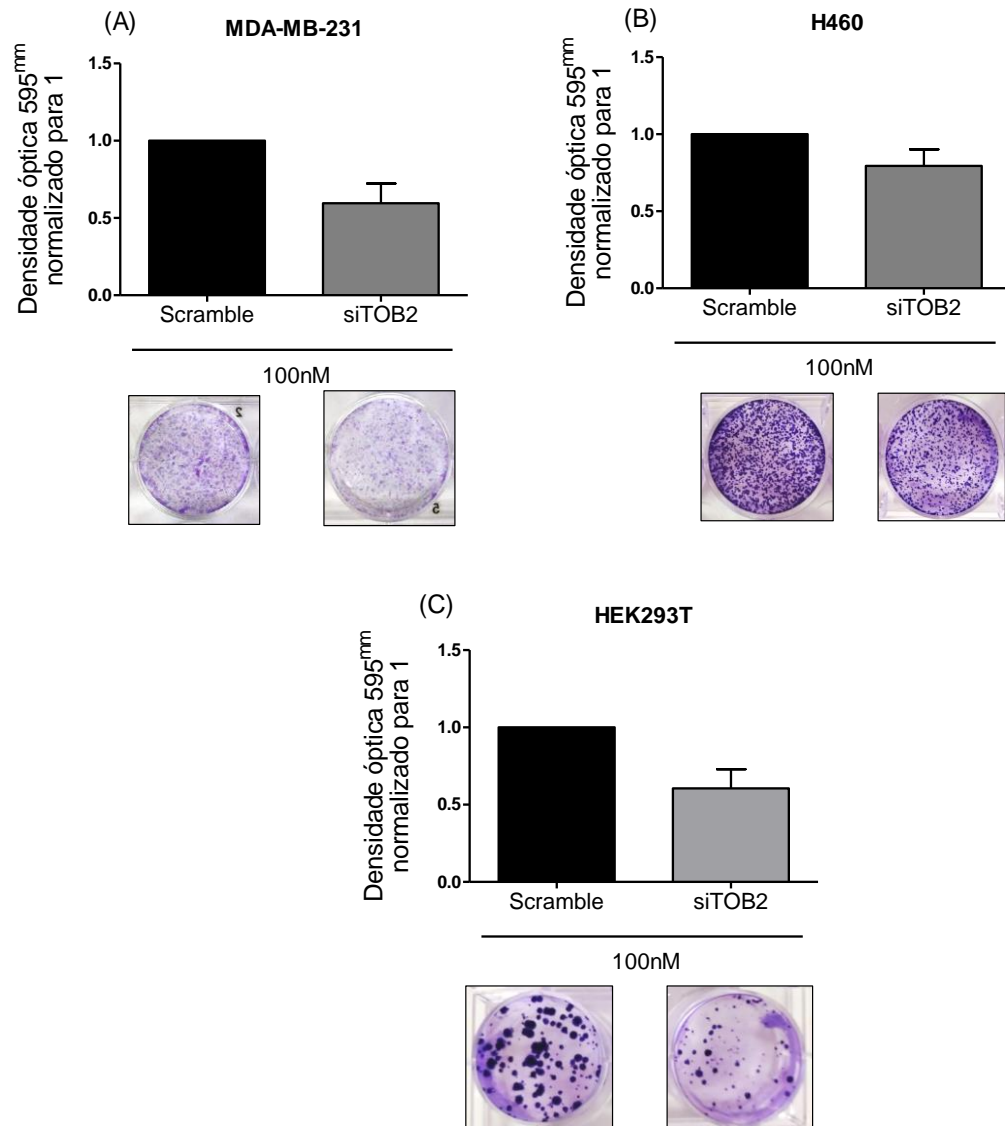


Figura 5.9 Análise da formação de colônias após inibição de Tob2. Ensaio de formação de colônias após 10-14 dias de incubação após inibição de Tob2 por 24h nas linhagens celulares (A) MDA-MB-231, (B) H460, e (C) na linhagem HEK293T. Médias de três experimentos independentes para as medidas de densidade óptica. Imagens representativas de três experimentos independentes

6. Discussão

O gene *TOB2* foi descrito em 1999 por Yakematsu e colaboradores, que associaram sua expressão em células NIH3T ao controle negativo do ciclo celular, classificando-o, assim como os demais membros da sua família, como uma proteína antiproliferativa (IAKEMATSU *et al.*, 1999). Diversos trabalhos já demonstraram o papel antiproliferativo de Tob2 em células tumorais, sendo a maioria destes, associando a sua inibição por miRs à perda de atividade antiproliferativa. Yu e colaboradores demonstraram em 2014 que a superexpressão do onco-miR-378 em células de carcinoma de nasofaringe está associada à maior proliferação e maior invasão das células. No trabalho, os autores observaram que este efeito está parcialmente ligado à inibição de Tob2 pelo miR-378, uma vez que a superexpressão deste miR, neste modelo, leva a menor expressão dos transcritos de Tob2 e de seu conteúdo proteico. Além disso, os autores demonstram que amostras de pacientes com carcinoma de nasofaringe, apresentam menor expressão de Tob2 quando comparadas às amostras de tecidos de nasofaringe normais (YU *et al.*, 2014).

Anteriormente, Feng e colaboradores haviam demonstrado que o miR-378 também desempenha papel importante na indução de proliferação e transformação maligna em células de mama HER2⁺, cujo fato ocorre pela alça de regulação Myc/miR-378/Tob2/ciclina D1. Os autores mostram que a superexpressão de Myc leva à transativação do miR-378, bem como de seu *host gene* PPARGC1B. Este aumento da expressão do miR-378 está associado a menor expressão de Tob2 e por consequência maior expressão de ciclina D1, levando à progressão no ciclo celular, proliferação celular e transformação maligna das células (FENG *et al.*, 2011). Outros trabalhos também já associaram a maior expressão de onco-miRs à menor expressão de Tob2 e maior taxa proliferativa das células tumorais. Em células de carcinoma hepático, Shen e colaboradores, demonstraram que o miR-362-3p se liga diretamente à Tob2, inibindo-o. Além disso, os autores mostram neste trabalho que a inibição de Tob2 por shRNA induz

do crescimento independente de ancoragem, bem como induz formação de colônias em células de carcinoma hepatocelular. Corroborando os dados encontrados *in vitro*, o trabalho ainda demonstra que amostras de pacientes com hepatocarcinoma apresentam menor expressão de Tob2 e maior expressão do miR-326-3p, quando comparados ao tecido normal adjacente ao tumor (SHEN *et al.*, 2015).

Ainda não existem estudos que explorem o potencial de Tob2 na indução de proliferação celular. Além disso, alguns trabalhos vêm relatando sua maior expressão com a menor sobrevida global de pacientes. O mesmo tem ocorrido com Tob1, que apresenta grande homologia com Tob2, visto que sua maior expressão tem sido associada a menor sobrevida global de pacientes com câncer colorretal (LI *et al.*, 2018). No trabalho, os autores levantam a hipótese de que a maior expressão de Tob1 nestes tumores esteja favorecendo um *feedback* positivo com β -catenina. Esta hipótese é baseada no fato dos autores terem observado em linhagens de carcinoma colorretal que a superexpressão de Tob1 está associada à maior expressão de c-Myc, β -catenina, ciclina D1 e claudina 1, bem como o silenciamento de Tob1 por shRNA leva à redução da expressão destes alvos. Além disso, os autores observaram que camundongos com deficiência de Tob1 apresentaram menor surgimento de tumor colorretal e menor marcação de Ki-67 e PHH3 (marcadores de proliferação celular), quando comparados a camundongos Tob1^{+/+}. Adicionalmente, os autores também observaram que a expressão de ciclina D1, alvo de β -catenina, nos camundongos Tob1^{+/+} está aumentada (LI *et al.*, 2018).

Zhang e colaboradores demonstraram que a inibição de Tob1 em células de câncer de mama com crescimento independente de HER2, leva à diminuição da proliferação celular e sensibiliza estas células seletivamente para inibidores de PI3K/AKT e mTOR, sugerindo que a expressão de Tob1 nestas células tenha uma relação com a resistência à tratamentos baseados em estrógeno. O estudo ainda demonstra que Tob1 é ativado por ERK1/2 através de sua fosforilação, e que este processo leva a transição de G1/S, promovendo progressão no ciclo celular e

proliferação celular independente dos receptores hormonais (ZHANG, *et al.*, 2016).

A maioria dos trabalhos tem demonstrado que Tob2 apresenta papel antiproliferativo em células tumorais. Entretanto, os nossos dados mostram que este fato não ocorre em todos os modelos. De maneira contrária ao observado na literatura, nossos resultados demonstraram que a superexpressão transiente de Tob2 nas linhagens de carcinoma de mama MDA-MB-231, carcinoma de pulmão H460 e na linhagem não-tumoral de rim embrionário HEK293T no tempo de 24h não altera o número de células totais, quando comparado ao vetor vazio. Contudo, em tempos mais tardios, a maior expressão de Tob2 induz a proliferação celular, bem como leva ao aumento do potencial clonogênico destas células. Corroborando estes dados, nossos resultados também demonstram que a inibição de Tob2 nestas mesmas linhagens e condições induz o efeito contrário na proliferação celular, de maneira que a inibição de Tob2 por siRNA reduz tanto a proliferação quanto a formação de colônias nestes modelos. Estes resultados, apesar de preliminares, iniciam os estudos do papel proliferativo de Tob2.

De maneira semelhante, Bai e colaboradores demonstraram em estudo de meta-análise, investigando a expressão de todos os membros da família BTG/Tob em diversos tumores, que pacientes com câncer de mama com subtipo *basal-like* que exibem menor expressão de Tob1 também apresentam menor sobrevida global. No mesmo estudo, os autores observaram que amostras de tumores cerebrais que apresentam menor expressão de Tob1 ou Tob2 apresentam maior taxa de sobrevida global, mostrando que dependendo do tumor estudado e de seu subtipo, Tob1 e Tob2 podem apresentar funções proliferativas como as observadas no nosso estudo (BAI *et al.*, 2017).

Tob2 apresenta a maior região C-terminal entre os membros de sua família e essa região tem sido altamente associada à sua regulação e inativação, bem como a inativação da sua atividade no processo de deadenilação de mRNA. Além disso, Tob2 apresenta diversos sítios de fosforilação em sua sequência, principalmente próximo aos domínios PAM2 (MAEKAWA *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2015). Huang e colaboradores, demonstraram que

modificações pós-traducionais como fosforilação nos domínios PAM2 de Tob2 podem interferir na sua ligação à PABPC e inibir a deadenilação de mRNAs na célula. (HUANG et al., 2013). Alguns mecanismos de inibição de Tob1 também já foram explorados. Sukuzi e colaboradores observaram em um trabalho em 2002 que Tob1 pode ser fosforilado por ERK1/2, levando a sua inativação e que esta inativação é necessária para transformação e aumento da proliferação celular mediada por Ras (SUZUKI *et al.*, 2002). Além disso, trabalhos distintos demonstraram que o aumento da fosforilação de Tob1 pode contribuir para o desenvolvimento de câncer gástrico e para o carcinoma papilar da tireóide (ITO *et al.*, 2005; GUAN et al., 2017; WANG *et al.*, 2019).

Tendo em vista que Huang e colaboradores demonstraram que Tob2 pode ser fosforilado em seu domínio PAM2 e, além disso, Suzuki e colaboradores verificaram que Tob1 pode ser fosforilado por ERK1/2 levando a sua inativação, uma das hipóteses levantadas para os resultados obtidos, é a de que Tob2 expresso de maneira exógena nas linhagens celulares utilizadas no trabalho, pode estar sendo inativado mediante a fosforilação por alguma proteína quinase, e esta inativação está relacionada a sua não atividade antiproliferativa (SUZUKI et al., 2002; HUANG et al., 2013). Em contradição, se esta regulação de fato estiver ocorrendo, é esperado que a inibição de Tob2 nas linhagens MDA-MB-231, H460 e HEK293T não teria efeito contrário ao observado na superexpressão de Tob2 nos mesmos modelos. Para obtermos uma resposta mais significativa em relação a esta hipótese, é necessário a utilização de técnicas de silenciamento e superexpressão de maneira sustentada, visto que estas técnicas apresentam uma modulação mais homogênea dos alvos e permite melhores análises. Ainda, há a possibilidade de Tob2 de fato ser fosforilado por uma quinase, mas, esta modificação pós-traducional exercer efeito sobre ele de maneira que o mesmo leve à ativação de alvos envolvidos na progressão do ciclo celular e proliferação celular.

Tob2, assim como Tob1, também apresenta papel na regulação da transcrição gênica. Li e colaboradores demonstraram que a inibição de Tob1 está associada ao aumento da expressão de c-Myc, ciclina D1 e β -catenina, indicando que Tob1

pode estar envolvido na regulação transcricional destes alvos através de um feedback positivo com β -catenina (LI et al., 2018). Uma vez que nossos resultados demonstraram que Tob2 apresenta possivelmente um papel na indução de proliferação, nossa segunda hipótese para este fato é que Tob2 esteja regulando transcionalmente a expressão de proteínas envolvidas na indução de proliferação, como c-Myc e ciclina D1. Para responder a esta hipótese é necessário verificar os níveis destes alvos com a modulação positiva ou negativa de Tob2. No mais, não podemos descartar a hipótese que Tob2 continue tendo sua função de deadenilação de mRNAs, mas na indução de proliferação. Isto levaria à deadenilação e não-tradução de alvos envolvidos na parada do ciclo celular, contribuindo para a indução de proliferação celular.

Outro aspecto importante para compreensão dos efeitos de Tob2 em linhagens tumorais e não-tumorais, é conhecer as proteínas associadas à expressão de Tob2 ou àquelas que interagem diretamente com ela. Feng e colaboradores demonstraram a existência de uma alça regulatória entre Myc e Tob2 em células de carcinoma mamário. Os autores ainda verificaram que a inibição de Tob2 por esta alça regulatória leva ao aumento de expressão de ciclina D1 e contribui para a proliferação celular e transformação mediada por Ras e HER2. Nossos dados demonstram que a inibição gênica de Myc leva ao aumento da expressão de Tob2, independente da expressão de HER2, e que possivelmente esta regulação não é unilateral. A superexpressão exógena de Tob2 nas linhagens MDA-MB-231 e HEK293T está associada a menor expressão de Myc. Feng mostrou que a inibição de Myc por siRNA na linhagem MDA-MB-231 leva ao aumento da expressão de Tob2 (FENG, *et al.*, 2011). Em conjunto, esses dados sugerem que exista uma associação entre Myc e Tob2 em diferentes modelos e esta regulação ocorre independente da expressão de HER2.

O efeito da modulação de Tob2 e sua regulação em diferentes modelos ainda não foi elucidado, motivo pelo qual é importante a exploração destes aspectos no contexto tumoral. A função mais estudada de Tob2 e de sua família é a função antiproliferativa ligada a deadenilação de mRNAs. De fato, muitos trabalhos demonstram o potencial de Tob2 como uma proteína antitumoral. No entanto,

corroborando a literatura sobre as atividades de Tob1, nosso trabalho mostra uma nova função de Tob2, visto que os resultados mostram que Tob2 pode exercer papel na indução da proliferação celular.

7. Conclusões

Em suma, nossos dados demonstram que o papel antiproliferativo de Tob2 parece estar diretamente relacionado ao modelo estudado. Observamos que em diferentes modelos tumorais, e em um modelo não-tumoral, Tob2 parece atuar como uma proteína pró-proliferativa e pode ter papel no processo da tumorigênese e na progressão tumoral. Nosso estudo abre caminho para o melhor entendimento deste papel pró-proliferativo de Tob2 em tumores.

Observamos também, que a associação entre Myc e Tob2 ocorre independente da expressão de HER2 e de maneira não unilateral, demonstrando que possivelmente há um *feedback* negativo entre estas duas proteínas. No entanto, o efeito na indução de proliferação de Tob2 nestes modelos é independente deste *feedback*.

8. Perspectivas

- Avaliar os efeitos da superexpressão de Tob2 em outros modelos tumorais, para verificar se o mesmo também apresenta papel na indução de proliferação celular ou apresenta sua função canônica de regulação negativa do ciclo celular e atividade antiproliferativa;
- Investigar se a atividade de deadenilação de mRNAs, intrínseca a Tob2 está relacionada ao efeito de indução de proliferação celular observada em diversos modelos;

- Avaliar o padrão de fosforilação de Tob2 após superexpressão da proteína Tob2, visando entender se a proliferação celular induzida por sua expressão tem relação com sua inativação por fosforilação mediada por proteínas quinase;
- Investigar a participação de Tob2 na regulação da transcrição de alvos envolvidos na progressão do ciclo celular, como Myc e ciclina D1, visando entender se este fenômeno está envolvido com a indução de proliferação induzida por Tob2 nos modelos estudados.

9. Referências bibliográficas

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J Biol Chem. 1951;193(1):265–275.

BRADBURY A, et al. **Molecular cloning of PC3, a putatively secreted protein whose mRNA is induced by nerve growth factor and depolarization.** Proc Natl Acad Sci U S A 1991;88:3353–3357.

FLETCHER BS, et al. **Structure and expression of TIS21, a primary response gene induced by growth factors and tumor promoters.** J Biol Chem 1991;266:14511–14518.

RIMOKH R, Rouault JP, Wahbi K, Gadoux M, Lafage M, Archimbaud E, Charrin C, Gentilhomme O, Germain D, Samarut J. **A chromosome 12 coding region is juxtaposed to the MYC protooncogene locus in a t(8;12)(q24;q22) translocation in a case of B-cell chronic lymphocytic leukemia.** Genes Chromosomes Cancer. 1991 Jan;3(1):24-36.

ROUAULT JP, Rimokh R, Tessa C, Paranhos G, Ffrench M, Duret L, Garoccio M, Germain D, Samarut J, Magaud JP. **BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes.** EMBO J. 1992 Apr;11(4):1663-70.

MATSUDA S, Kawamura-Tsuzuku , Ohsugi M, Yoshida M, Emi M, Nakamura Y, Onda M, Yoshida Y, Nishiyama A, Yamamoto T. **Tob, a novel protein that interacts with p185erbB2, is associated with anti-proliferative activity.** Oncogene. 1996 Feb 15;12(4):705-13.

ROUAULT JP, Falette N, Guéhenneux F, Guillot C, Rimokh R, Wang Q, Berthet C, Moyret-Lalle C, Savatier P, Pain B, Shaw P, Berger R, Samarut J, Magaud JP, Ozturk M, Samarut C, Puisieux A. **Identification of BTG2, an antiproliferative p53-dependent component of the DNA damage cellular response pathway.** Nat Genet. 1996 Dec;14(4):482-6.

GUÉHENNEUX F, Duret L, Callanan MB, Bouhas R, Hayette S, Berthet C, Samarut C, Rimokh R, Birot AM, Wang Q, Magaud JP, Rouault JP. **Cloning of the mouse BTG3 gene and definition of a new gene family (the BTG family) involved in the negative control of the cell cycle.** Leukemia. 1997 Mar;11(3):370-5.

ROUAULT JP, Prévôt D, Berthet C, et al. **Interaction of BTG1 and p53-regulated BTG2 gene products with mCaf1, the murine homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional regulatory complex.** J Biol Chem. 1998;273(35):22563–22569. doi:10.1074/jbc.273.35.22563

YOSHIDA Y, Matsuda S, Ikematsu N, Kawamura-Tsuzuku J, Inazawa J, Umemori H, Yamamoto T. **ANA, a novel member of Tob/BTG1 family, is expressed in the ventricular zone of the developing central nervous system.** Oncogene. 1998 May;16(20):2687-93.

IKEMATSU N, Yoshida Y, J. Kawamura-Tsuzuku, M. Ohsugi, M. Onda, M. Hirai, J. Fujimoto, T. Yamamoto, **Tob2, a novel anti-proliferative Tob/BTG1 family member, associates with a component of the CCR4 transcriptional regulatory complex capable of binding cyclin-dependent kinases,** Oncogene 18 (1999) 7432e7441.

BUANNE P, Corrente G, Micheli L, et al. **Cloning of PC3B, a novel member of the PC3/BTG/TOB family of growth inhibitory genes, highly expressed in the**

olfactory epithelium. Genomics. 2000;68(3):253–263.
doi:10.1006/geno.2000.6288

CORTES U, Moyret-Lalle C, Falette N, et al. **BTG gene expression in the p53-dependent and -independent cellular response to DNA damage.** Mol Carcinog. 2000;27(2):57–64.

GRANDORI C, COWLEY SM, JAMES LP, EISENMAN RN (2000). **The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior.** Annu Rev Cell Dev Biol. 2000;16:653-99

PRÉVÔT D, Voeltzel T, Birot AM, et al. **The leukemia-associated protein Btg1 and the p53-regulated protein Btg2 interact with the homeoprotein Hoxb9 and enhance its transcriptional activation.** J Biol Chem. 2000;275(1):147–153.
doi:10.1074/jbc.275.1.147

YOSHIDA Y, Tanaka S, Umemori H, et al. **Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts.** Cell. 2000;103(7):1085–1097.
doi:10.1016/s0092-8674(00)00211-7

EVAN GI, Vousden KH. **Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer.** Nature. 2001;411(6835):342–348. doi:10.1038/35077213

PREVOT D, Morel AP, Voeltzel T, Rostan MC, Rimokh R, Magaud JP, Corbo L. 2001. **Relationships of the antiproliferative proteins BTG1 and BTG2 with CAF1, the human homolog of a component of the yeast CCR4 transcriptional complex: Involvement in estrogen receptor alpha signaling pathway.** J Biol Chem 276:9640–9648.

TZACHANIS D, Freeman GJ, Hirano N, van Puijenbroek AA, Delfs MW, Berezovskaya A, Nadler LM, Boussiotis VA. 2001. **Tob is a negative**

regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. Nat Immunol 2:1174–1182

MAEKAWA M, Nishida E, Tanoue T. **Identification of the Anti-proliferative protein Tob as a MAPK substrate.** J Biol Chem. 2002;277(40):37783–37787. doi:10.1074/jbc.M204506200

SUZUKI T, K-Tsuzuku J, Ajima R, Nakamura T, Yoshida Y, Yamamoto T. **Phosphorylation of three regulatory serines of Tob by Erk1 and Erk2 is required for Ras-mediated cell proliferation and transformation.** Genes Dev. 2002;16(11):1356–1370. doi:10.1101/gad.962802

YOSHIDA Y, von Bubnoff A, Ikematsu N, et al. **Tob proteins enhance inhibitory Smad-receptor interactions to repress BMP signaling.** Mech Dev. 2003;120(5):629–637. doi:10.1016/s0925-4773(03)00020-0

ALBRECHT M, LENGAUER T. **Survey on the PABC recognition motif PAM2.** Biochem Biophys Res Commun. 2004;316(1):129–138. doi:10.1016/j.bbrc.2004.02.024

MEYER S, Temme C, Wahle E. **Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes.** Crit Rev Biochem Mol Biol. 2004;39(4):197–216. doi:10.1080/10409230490513991

ITO Y, Suzuki T, Yoshida H, et al. **Phosphorylation and inactivation of Tob contributes to the progression of papillary carcinoma of the thyroid.** Cancer Lett. 2005;220(2):237–242. doi: 10.1016/j.canlet.2004.08.017

OKOCHI K, Suzuki T, Inoue J, Matsuda S, Yamamoto T. **Interaction of anti-proliferative protein Tob with poly(A)-binding protein and inducible poly(A)-**

binding protein: implication of Tob in translational control. Genes Cells. 2005;10(2):151–163. doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00826.x

YAMASHITA A, Chang TC, Yamashita Y, et al. **Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover.** Nat Struct Mol Biol. 2005;12(12):1054–1063. doi:10.1038/nsmb1016

LIM NS, Kozlov G, Chang TC, et al. **Comparative peptide binding studies of the PABC domains from the ubiquitin-protein isopeptide ligase HYD and poly(A)-binding protein. Implications for HYD function.** J Biol Chem. 2006;281(20):14376–14382. doi:10.1074/jbc.M600307200

ROSEN ED, MacDougald OA. **Adipocyte differentiation from the inside out.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2006;7(12):885–896. doi:10.1038/nrm2066

EZZEDDINE N, Chang TC, Zhu W, et al. **Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation.** Mol Cell Biol. 2007;27(22):7791–7801. doi:10.1128/MCB.01254-07

GARNEAU NL, Wilusz J, Wilusz CJ. **The highways and byways of mRNA decay.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(2):113–126. doi:10.1038/nrm2104

GESTA S, Tseng YH, Kahn CR. **Developmental origin of fat: tracking obesity to its source** [published correction appears in Cell. 2008 Oct 17;135(2):366]. Cell. 2007;131(2):242–256. doi:10.1016/j.cell.2007.10.004

HATA K, Nishijima K, Mizuguchi J. **Role for Btg1 and Btg2 in growth arrest of WEHI-231 cells through arginine methylation following membrane immunoglobulin engagement.** Exp Cell Res. 2007 Jul 1;313(11):2356-66. Epub 2007 Mar 30.

JIA S, Meng A. **Tob genes in development and homeostasis.** Dev Dyn. 2007;236(4):913–921. doi:10.1002/dvdy.21092

OU YH, Chung PH, Hsu FF, Sun TP, Chang WY, Shieh SY. **The candidate tumor suppressor BTG3 is a transcriptional target of p53 that inhibits E2F1.** EMBO J. 2007;26(17):3968–3980. doi:10.1038/sj.emboj.7601825

AJIMA R, Akiyama T, Usui M, et al. **Osteoporotic bone formation in mice lacking tob2; involvement of Tob2 in RANK ligand expression and osteoclasts differentiation.** FEBS Lett. 2008;582(9):1313–1318. doi:10.1016/j.febslet.2008.03.012

MAUXION F, Faux C, Séraphin B. **The BTG2 protein is a general activator of mRNA deadenylation.** EMBO J. 2008;27(7):1039–1048. doi:10.1038/emboj.2008.43

MIYASAKA T, Morita M, Ito K, et al. **Interaction of antiproliferative protein Tob with the CCR4-NOT deadenylase complex.** Cancer Sci. 2008;99(4):755–761. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00746.x

RICHTER JD. **Breaking the code of polyadenylation-induced translation.** Cell. 2008;132(3):335–337. doi:10.1016/j.cell.2008.01.024

YANG X, Morita M, Wang H, Suzuki T, Yang W, Luo Y, Zhao C, Yu Y, Bartlam M, Yamamoto T, Rao Z. **Crystal structures of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity.** Nucleic Acids Res. 2008 Dec;36(21):6872-81. doi: 10.1093/nar/gkn825. Epub 2008 Oct 30.

HORIUCHI M, Takeuchi K, Noda N, Muroya N, Suzuki T, Nakamura T, Kawamura-Tsuzuku J, Takahasi K, Yamamoto T, Inagaki F. **Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex.** J Biol Chem. 2009 May 8;284(19):13244-55. doi: 10.1074/jbc.M809250200. Epub 2009 Mar 10.

MAUXION F, Chen CY, Séraphin B, Shyu AB. **BTG/TOB factors impact deadenylases.** Trends Biochem Sci. 2009 Dec;34(12):640-7. doi: 10.1016/j.tibs.2009.07.008. Epub 2009 Oct 12.

BARTLAM M, YAMAMOTO T. **The structural basis for deadenylation by the CCR4-NOT complex.** Protein Cell. 2010;1(5):443–452. doi:10.1007/s13238-010-0060-8

HOCINE S, Singer RH, Grünwald D. **RNA processing and export.** Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(12):a000752. doi:10.1101/cshperspect.a000752

TRITSCHLER F, Huntzinger E, Izaurralde E. **Role of GW182 proteins and PABPC1 in the miRNA pathway: a sense of déjà vu.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2010;11(5):379–384. doi:10.1038/nrm2885

WINKLER, GS. **The mammalian anti-proliferative BTG/Tob protein family.** J Cell Physiol. 2010 Jan;222(1):66-72. doi: 10.1002/jcp.21919.

HANAHAN D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** Cell. 2011;144(5):646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

TAKAHASHI A, Morita M, Yokoyama K, Suzuki T, Yamamoto T. **Tob2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 expression by sequestering Smads and C/EBP α during adipocyte differentiation.** Mol Cell Biol. 2012;32(24):5067–5077. doi:10.1128/MCB.00610-12.

GÁMEZ B, Rodríguez-Carballo E, Bartrons R, Rosa JL, Ventura F. **MicroRNA-322 (miR-322) and its target protein Tob2 modulate Osterix (Osx) mRNA stability.** J Biol Chem. 2013 May 17;288(20):14264-75. doi: 10.1074/jbc.M112.432104. Epub 2013 Apr 5.

LI Y, Choi PS, Casey SC, Dill DL, Felsher DW. **MYC through miR-17-92 suppresses specific target genes to maintain survival, autonomous proliferation, and a neoplastic state.** Cancer Cell. 2014 Aug 11;26(2):262-72. doi: 10.1016/j.ccr.2014.06.014.

WOLF J, PASSMORE LA. **mRNA deadenylation by Pan2-Pan3.** Biochem Soc Trans. 2014;42(1):184–187. doi:10.1042/BST20130211

BRETONES G, DELGADO MD, LEÓN J (2015). **Myc and cell cycle control.** Biochim Biophys Acta. 2015 May;1849(5):506-16. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.013. Epub 2014 Apr 1.

YU BL, Peng XH, Zhao FP, et al. **MicroRNA-378 functions as an onco-miR in nasopharyngeal carcinoma by repressing TOB2 expression.** Int J Oncol. 2014;44(4):1215–1222. doi:10.3892/ijo.2014.2283

MICHELI L, Ceccarelli M, Farioli-Vecchioli S, Tirone F. **Control of the Normal and Pathological Development of Neural Stem and Progenitor Cells by the PC3/Tis21/Btg2 and Btg1 Genes.** J Cell Physiol. 2015;230(12):2881–2890. doi:10.1002/jcp.25038

WU D, Zhou W, Wang S, Zhou Z, Wang S, Chen L. **Tob1 enhances radiosensitivity of breast cancer cells involving the JNK and p38 pathways.** Cell Biol Int. 2015;39(12):1425–1430. doi:10.1002/cbin.10545

COLLART MA. **The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression.** Wiley Interdiscip Rev RNA. 2016;7(4):438–454. doi:10.1002/wrna.1332

WANG H, Cui Y, Luan J, Zhou X, Li C, Li H, Shi L, Han J. **MiR-5100 promotes osteogenic differentiation by targeting Tob2.** J Bone Miner Metab. 2017 Nov;35(6):608-615. doi: 10.1007/s00774-016-0799-y. Epub 2016 Nov 21.

ZHANG YW, Nasto RE, Varghese R, et al. **Acquisition of estrogen independence induces TOB1-related mechanisms supporting breast cancer cell proliferation.** Oncogene. 2016;35(13):1643–1656. doi:10.1038/onc.2015.226

GUAN R, Peng L, Wang D, et al. **Decreased TOB1 expression and increased phosphorylation of nuclear TOB1 promotes gastric cancer.** Oncotarget. 2017;8(43):75243–75253. Published 2017 Sep 8. doi:10.18632/oncotarget.20749

SCHEIJEN B, Boer JM, Marke R, et al. **Tumor suppressors BTG1 and IKZF1 cooperate during mouse leukemia development and increase relapse risk in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients.** Haematologica. 2017;102(3):541–551. doi:10.3324/haematol.2016.153023

WINTERS AC, BERNT KM. **MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches.** Front Pediatr. 2017;5:4. Published 2017 Feb 9. doi:10.3389/fped.2017.00004

LI D, Xiao L, Ge Y, et al. **High expression of Tob1 indicates poor survival outcome and promotes tumour progression via a Wnt positive feedback loop in colon cancer.** Mol Cancer. 2018;17(1):159. Published 2018 Nov 17. doi:10.1186/s12943-018-0907-9

VICENS Q, Kieft JS, Rissland OS. **Revisiting the Closed-Loop Model and the Nature of mRNA 5'-3' Communication.** Mol Cell. 2018;72(5):805–812. doi: 10.1016/j.molcel.2018.10.047

YI H, Park J, Ha M, Lim J, Chang H, Kim VN. **PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay.** Mol Cell. 2018 Jun 21;70(6):1081-1088.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.009.

WANG D, Song H, Zhao T, et al. **Phosphorylation of TOB1 at T172 and S320 is critical for gastric cancer proliferation and progression.** Am J Transl Res. 2019;11(8):5227–5239. Published 2019 Aug 15.

YUNIATI L, Scheijen B, van der Meer LT, van Leeuwen FN. **Tumor suppressors BTG1 and BTG2: Beyond growth control.** J Cell Physiol. 2019;234(5):5379–5389. doi:10.1002/jcp.27407

10. Trabalhos publicados não relacionados ao mestrado

RESEARCH ARTICLE

Antitumor Effect of Pomolic Acid in Acute Myeloid Leukemia Cells Involves Cell Death, Decreased Cell Growth and Topoisomerases Inhibition

Michelle X. G. Pereira^{1,2}, Amanda S. O Hammes³, Flávia C. Vasconcelos¹, Aline R. Pozzo^{1,2}, Thais Hancio Pereira¹, Ernesto R. Caffarena³, Cerli R. Gattass⁴ and Raquel C. Maia^{1,*}

¹Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Pesquisa em Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, (RJ), Brazil; ²Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Oncologia, INCA, RJ, Brazil; ³Grupo de Biofísica Computacional e Modelagem Molecular, Programa de Computação Científica, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ⁴Laboratório de Imunologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract: Background: Acute myeloid leukemia (AML) represents the largest number of annual deaths from hematologic malignancy. In the United States, it was estimated that 21,380 individuals will be diagnosed with AML and 49.5% of patients will die in 2017. Therefore, the search for novel compounds capable of increasing the overall survival rate to the treatment of AML cells was urgent.

Objectives: To investigate the cytotoxicity effect of the natural compound PA and to explore the mechanism of action of PA in AML cell lines with different phenotypes.

Methods: Three different AML cell lines, HL60, U937 and Kasumi-1 cells with different mechanisms of resistance to analyze the effect of PA on the cell cycle progression, on DNA intercalation and on human DNA topoisomerases (hTopo I and II α) *in vitro* studies. Theoretical experiments of the inhibition of hTopo I and II α were done to explore the binding modes of PA.

Results: PA reduced cell viability, induced cell death, increased sub-G0/G1 accumulation and activated caspases pathway in all cell lines, altered the cell cycle distribution and inhibited the catalytic activity of both human DNA topoisomerases.

Conclusion: Finally, this study showed that PA has powerful antitumor activity against AML cells, suggesting that this natural compound might be a potent antineoplastic agent to improve the treatment scheme of this neoplasm.

ARTICLE HISTORY

Received: September 12, 2017

Revised: February 13, 2018

Accepted: April 05, 2018


DOI:

10.2174/1871520618066180412120128

Keywords: Acute myeloid leukemia, natural compound, pomolic acid, human DNA topoisomerases, Topo I, Topo II α , anticancer agent, drug discovery.

Article

TNF- α Modulates P-Glycoprotein Expression and Contributes to Cellular Proliferation via Extracellular Vesicles

Tandressa S. Berguetti ^{1,2}, Lucas S. P. Quintaes ¹, Thais Hancio Pereira ^{1,2}, Marcela C. Robaina ¹ , André L. S. Cruz ³, Raquel C. Maia ^{1,*} and Paloma Silva de Souza ^{1,*}

¹ Laboratório de Hemato-Oncologia Celular e Molecular, Programa de Hemato-Oncologia Molecular, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro 20231-050, Brazil; tata.berguetti@hotmail.com (T.S.B.); lucas.s.p.quintaes@gmail.com (L.S.P.Q.); thais.hancio@gmail.com (T.H.P.); mrobaina@ymail.com (M.C.R.)

² Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Oncologia, INCA, Rio de Janeiro 20231-050, Brazil

³ Laboratório de Fisiopatologia, Polo Novo Cavaleiros, Campus UFRJ-Macae, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, Brazil; andrecruz@macae.ufrj.br

* Correspondence: rcmaia@inca.gov.br (R.C.M.); paloma.inca@gmail.com (P.S.d.S.); Tel.: +55-21-3207-1808 (R.C.M.); +55-21-3207-1808 (P.S.d.S.)

Received: 26 March 2019; Accepted: 23 May 2019; Published: 24 May 2019



Abstract: P-glycoprotein (Pgp/ABCB1) overexpression is associated with multidrug resistance (MDR) phenotype and, consequently, failure in cancer chemotherapy. However, molecules involved in cell death deregulation may also support MDR. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is an important cytokine that may trigger either death or tumor growth. Here, we examined the role of cancer cells in self-maintenance and promotion of cellular malignancy through the transport of Pgp and TNF- α molecules by extracellular vesicles (membrane microparticles (MP)). By using a classical MDR model in vitro, we identified a positive correlation between endogenous TNF- α and Pgp, which possibly favored a non-cytotoxic effect of recombinant TNF- α (rTNF- α). We also found a positive feedback involving rTNF- α incubation and TNF- α regulation. On the other hand, rTNF- α induced a reduction in Pgp expression levels and contributed to a reduced Pgp efflux function. Our results also showed that parental and MDR cells spontaneously released MP containing endogenous TNF- α and Pgp. However, these MP were unable to transfer their content to non-cancer recipient cells. Nevertheless, MP released from parental and MDR cells elevated the proliferation index of non-tumor cells. Collectively, our results suggest that Pgp and endogenous TNF- α positively regulate cancer cell malignancy and contribute to changes in normal cell behavior through MP.

Keywords: P-glycoprotein; ABCB1; TNF- α ; extracellular vesicles; microparticles; drug resistance; MDR