



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

TATIANE DE PINHO PASTOR

**O papel do cofator transcricional IRF2BP2 no controle do ciclo e na
transformação celular *in vitro* e *in vivo*.**

Orientador: Dr. João P. B. Viola

RIO DE JANEIRO

2020



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

TATIANE DE PINHO PASTOR

**O papel do cofator transcricional IRF2BP2 no controle do ciclo e na
transformação celular *in vitro* e *in vivo*.**

Orientador: Dr. João P. B. Viola

RIO DE JANEIRO

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Palavras-chave: 1. IRF2BP2 2. Ciclo celular 3. Supressor tumoral

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Imunologia e Biologia de Tumores da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA), sob orientação do Dr. João P. B. Viola e com o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e do Instituto Nacional de Câncer e Tecnologia para o controle do câncer (INCT-Câncer).

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Dr. João Viola pelos ensinamentos e direcionamentos que conduzem a minha formação profissional e que acrescentaram muito no desenvolvimento deste projeto. Obrigada por ter dividido esse projeto comigo, por ter acreditado em mim e pela paciência em responder as minhas várias perguntas!!! Você é sem dúvida um excelente professor!

Aos amigos queridos do Programa de Imunologia e Biologia de Tumores. Vocês, com certeza, são parte importante da minha sobrevivência nesses longos anos. Obrigada por serem tão disponíveis e pela companhia na bancada e nas mesas de bar.

À Alexandra e a Amanda por tornarem nossos trabalhos mais fáceis.

Ao Lucas, meu psicólogo favorito! Obrigada por me ensinar cálculo.

À Karina, pela paciência em me ensinar citometria.

Às minhas amigas: Bárbara Lúcia, Dani, Marcelle, Luiza e Teresa. Obrigada por todo o carinho e amizade! Sou muito feliz em ter vocês ao meu lado!

A toda minha família, em especial meus pais, minhas irmãs e meus sobrinhos, pelo estímulo constante nessa jornada, sempre me incentivando a continuar os meus estudos. Agradeço também por toda a orientação que me deram durante a vida e por me ajudarem a enfrentar os obstáculos e transformações que a vida impõe.

Ao Thiago, por me incentivar nos momentos difíceis e por ficar horas na portaria do CPQ me esperando terminar as cinéticas.

A todas as agências de fomento que permitiram com que esse trabalho fosse realizado.



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

RESUMO

O papel do cofator transcricional IRF2BP2 no controle do ciclo e na transformação celular *in vitro* e *in vivo*.

A proteína IRF2BP2 (Interferon regulatory factor 2 binding protein 2) é um dos membros da família de proteínas IRF2BP e foi descrita inicialmente como um co-repressor transcricional dependente de IRF-2. O fator de transcrição IRF2 é conhecido por controlar a expressão de muitos genes responsivos ao interferon (IFN), que por sua vez atuam na regulação do ciclo celular e/ou apoptose. Embora o real envolvimento da proteína IRF2BP2 na transcrição desses genes ainda não tenha sido avaliado e seu papel fisiológico ainda seja pouco compreendido, dados recentes sugerem sua participação no controle de ciclo celular, apoptose e angiogênese, indicando que o desbalanço na função de IRF2BP2 poderia estar relacionada a fisiopatologia do câncer. Portanto, o objetivo principal desse estudo é investigar o papel de IRF2BP2 no controle de ciclo e transformação celular e determinar sua relevância no processo de tumorigênese. Para isso, células da linhagem de fibroblastos murinos NIH3T3 foram transduzidas com vetor retroviral contendo o gene IRF2BP2 sob controle de um promotor responsivo a doxiciclina/tetraciclina. Proliferação, ciclo, morte e transformação celular foram avaliados por marcação com cristal violeta, ensaio clonogênico, citometria de fluxo com marcação PI, BrdU e anexina V, PCR em tempo real, western blot, formação de focos, crescimento em meio semissólido e formação de tumores em camundongos nus. Além disso, dados de RNA-Seq de amostras de fibroblastos humanos transformados foram obtidos do banco de dados GTEx (*Genome-Tissue Expression*) e analisados. Como resultados, observamos que a superexpressão de IRF2BP2 levou à redução da proliferação de células NIH3T3, associada a atraso na entrada na fase S do ciclo celular. Adicionalmente, a superexpressão de IRF2BP2 em células transformadas por H-ras-V12 reduziu a formação de focos em cultura, colônias em meio semissólido e tumores em camundongos. A expressão de *IRF2BP2* apresentou correlação inversa com a de diversos genes envolvidos na progressão do ciclo celular em fibroblastos humanos. Estes dados sugerem que IRF2BP2 possa ter um papel supressor tumoral, induzindo um menor potencial proliferativo através da regulação negativa do ciclo celular em células NIH3T3.



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

ABSTRACT

The role of the IRF2BP2 protein in cell cycle control and transformation *in vitro* and *in vivo*.

The IRF2BP2 protein (Interferon regulatory factor 2 binding protein 2) is a member of IRF2BP family of proteins, which were initially identified as transcriptional corepressors that were dependent on IRF2. IRF2 is known for controlling the expression of many interferon (IFN)-responsive genes, which in turn act in the regulation of the cell cycle and/or apoptosis. Although the actual involvement of IRF2BP2 in these genes' transcription has not yet been evaluated and its physiological role is still poorly understood, recent data suggest the participation of IRF2BP2 in cell cycle control, cell death and angiogenesis. These findings indicate that an imbalance in IRF2BP2 function could be related to the pathophysiology of cancer. The main objective of this study is to investigate the role of IRF2BP2 in cell cycle control and transformation, and thus to determine the relevance of this protein in tumorigenesis. In order to do that, NIH3T3 murine fibroblast cells were transduced with retroviral vector containing the *IRF2BP2* gene under the control of a tetracycline-responsive promoter. Cell proliferation, cycle, death and transformation were evaluated by crystal violet labeling, clonogenic assays, PI, BrdU and annexin-V-labeled flow cytometry, real time PCR, western blot, focus formation, growth in semi-solid medium and tumor formation in nude mice. In addition, RNA-Seq data from transformed human fibroblast samples were obtained from a GTEx (Tissue Genome Expression) database and gene expression profiles were analyzed. These experiments showed that IRF2BP2 overexpression decreased cell proliferation due to a delay in S phase entry. Additionally, overexpression of IRF2BP2 in cells transformed with H-ras-V12 diminished the formation of culture foci, semi-solid colonies and mouse tumors. The expression of *IRF2BP2* displayed inverse correlation with the expression of several genes involved in cell cycle progression in human fibroblasts. These data suggest that IRF2BP2 may have a tumor suppressive role, inducing lower proliferative potential through repressing the expression of cell cycle genes in NIH3T3 cells.

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	<i>7-aminoactinomycin D</i>
APC	Complexo promotor da anafase
APL	Leucemia Promielocítica Aguda (<i>Acute Promyelocytic Leucemia</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
ATRA	Ácido all-trans retinóico (<i>All-Trans Retinoic Acid</i>)
BAX	Proteína X associada a BCL-2 (<i>BCL-2 homology domain</i>)
BCL	Proteína associada ao linfoma de células B (<i>B cell lymphoma protein</i>)
BrdU	Bromodeoxiuridina
BRE	<i>B Recognition Element</i>
BSA	Albumina do soro bovino
DBD	Domínio de ligação ao DNA (<i>DNA Binding Domain</i>)
CBP/p300	<i>cAMP Response Element-Binding Protein (CREB) Binding Protein and p300</i>
CCNE2	Ciclina E2
CDK	Cinase dependente de Ciclina (<i>Cyclin dependente kinases</i>)
CDK1	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>
CDK2	<i>Cyclin Dependent Kinase 2</i>
CDK4	<i>Cyclin Dependent Kinase 4</i>
CDK6	<i>Cyclin Dependent Kinase 6</i>
CDKN1A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1A (<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>)
CDKN1B	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1B (<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B</i>)
CDKN1C	Inibidor de cinase dependente de ciclina 1C (<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C</i>)
cDNA	DNA complementar
CDX1	<i>Caudal type homeobox 1</i>

CIP/KIP	Proteína de interação com Cdk/Proteína inibitória de cinase
CKI	Inibidor de cinase dependente de ciclina
CTD	Domínio C-terminal da polimerase II (<i>Carboxy Terminal Domain</i>)
DBD	Domínio de ligação ao DNA (<i>DNA binding Domain</i>)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (<i>Dulbecco modified Eagle médium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPE	<i>Downstream Promoter Element</i>
EAP1	<i>Enhanced and puberty 1</i>
EDTA	Ácido tetra-acético etilenodiamino
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
ETO2	<i>Eight-twenty-one 2</i>
E2F	Fator de ligação ao promotor de E2 (<i>E2 Promoter Binding Factor</i>)
FASKD2	Domínio Quinase-2 de serina e treonina ativado por Fas (<i>Fas-Activated Serine-Threonine Kinase Domain 2</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G	Intervalo
GADD45B	<i>Growth Arrest And DNA Damage Inducible Beta</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HAT	Histona acetiltransferases (Histone acetyltransferase)
HBS	Tampão Salino de Hanks
HDAC	Histona deacetilase (<i>Histone deacetylase</i>)
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
HPRT	Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase
H-rasV12	Proteína H-ras com uma mutação para valina na posição 12
IL	Interleucina
INK4	Inibidores de Cdk4
INK4A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
INK4B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B</i>

INK4C	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C</i>
INK4CD	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2D</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
IRF2BP2	Proteína ligadora-2 do fator regulatório-2 de interferon (<i>Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2</i>)
IRF2BP1	Proteína ligadora-1 do fator regulatório-2 de interferon (<i>Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 1</i>)
KLF2	<i>Krüppel-like factor 2</i>
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
M	Mitose
MCM	<i>Minichromosome Maintenance Protein Complex</i>
miRNA	Micro ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ncRNA	Ácido ribonucleico não codificante
NFAT	Fator Nuclear de células T ativadas (<i>Nuclear factor of activated T cell</i>)
NLS	Sinal de localização nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
NP-40	<i>Nonidet P-40</i>
NRIF3	Fator 3 de Interação Nuclear (<i>Nuclear interacting factor 3</i>)
ORC	<i>Origin Recognition Complex</i>
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffer Sulfate</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI	Iodeto de propídio (<i>Propidium Iodide</i>)
RARA	Receptor alfa de Ácido Retinóico (<i>Retinoic acid receptor alfa</i>),
RB	Retinoblastoma
RING	<i>Real Interesting New Gene</i> ; tipo de domínio dedo de zinco
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal

S	Síntese
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>).
SFB	Soro Fetal Bovino
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	Pequeno RNA de interferência (<i>Small interfering RNA</i>)
snRNA	Pequeno RNA nuclear (<i>Small nuclear RNA</i>)
TBP	Proteína de Ligação ao TATA box (<i>TATA binding protein</i>)
TBS	Salina tamponada com Tris
TBS-T	Salina tamponada com Tris com Tween 20
TEAD4	<i>TEA-Domain protein 4</i>
TetR	Proteína repressora Tet (<i>Tet Repressor proteins</i>)
TF	Fator de transcrição (<i>Transcription Factor</i>)
TPM	Transcritos por milhão
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
VEGFA	Fator de Crescimento Celular Vascular Endotelial (Vascular endothelial growth factor A)
VGLL4	<i>Vestigial-Like 4</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Sequências consenso encontradas nos promotores basais de células eucarióticas	4
Figura 1.2	Controle transcricional em células eucarióticas	5
Figura 1.3	Fatores de transcrição alvos no câncer.....	6
Figura 1.4	Características do câncer	10
Figura 1.5	Representação esquemática do ciclo celular em mamíferos	13
Figura 1.6	Mutações nos reguladores da transição G ₁ /S em tumores humanos	17
Figura 1.7	Representação esquemática das isoformas A e B da proteína IRF2BP2	20
Figura 1.8	Diferentes sistemas biológicos regulados pela proteína IRF2BP2	21
Figura 4.1	Níveis proteicos de IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR não sincronizadas atingem um pico de síntese 24 horas após a adição de 1 µg/ml doxíciclina no meio de cultura	37
Figura 4.2	Níveis proteicos e de mRNA da IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR sincronizadas atingem um pico de síntese a partir de 8 horas e 3 horas, respectivamente, após a adição de 1 µg/ml doxíciclina no meio de cultura.....	39
Figura 4.3	Células NIH3T3-TetR sincronizadas superexpressando IRF2BP2 apresentam redução na taxa de proliferação celular, além da formação de menos clones	41

Figura 4.4	Células NIH3T3-TetR sincronizadas superexpressando IRF2BP2 não apresentam aumento na taxa de morte celular	42
Figura 4.5	A superexpressão de IRF2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular	46
Figura 4.6	A superexpressão de IRF2BP2 atrasa a saída da fase G ₁ do ciclo celular.....	47
Figura 4.7	A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente não induz estresse replicativo em células NIH3T3	48
Figura 4.8	A superexpressão de IRF2BP2 atrasa a progressão das fases G ₀ /G ₁ para a fase S do ciclo celular	49
Figura 4.9	Níveis proteicos de H-rasV12 em células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12	51
Figura 4.10	Células NIH3T3 transformadas superexpressando IRF2BP2 apresentam redução na taxa de proliferação celular além da formação de menos clones	52
Figura 4.11	A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente pode induzir de morte celular em células NIH3T3 transformadas	53
Figura 4.12	A superexpressão de IRF2BP2 não induzir morte celular em tempos mais iniciais em células NIH3T3 transformadas	54
Figura 4.13	A superexpressão de IRF2BP2 não induz morte celular em tempos mais tardios em células NIH3T3 transformadas	55
Figura 4.14	A superexpressão IRF2BP2 reduz os fenótipos de transformação <i>in vitro</i>	58
Figura 4.15	A superexpressão IRF2BP2 reduz os fenótipos de transformação <i>in vivo</i>	59

Figura 4.16	A expressão diferencial de IRF2BP2 modifica o perfil de expressão de diferentes genes em fibroblastos humanos transformados	62
Figura 4.17	A expressão de IRF2BP2 correlaciona-se à expressão de genes envolvidos em diferentes vias celulares em fibroblastos humanos transformados	63
Figura 4.18	A expressão de IRF2BP2 está correlacionada de forma diferencial à expressão de genes envolvidos com a via de ciclo celular em fibroblastos humanos transformados	64
Figura 4.19	A expressão IRF2BP2 correlaciona-se direta ou inversamente com diferentes genes envolvidos na progressão das fases G ₁ /S do ciclo celular	65
Figura 4.20	A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente não regula a expressão de genes importantes para a transição G ₁ /S do ciclo celular em células NIH3T3	68
Figura 4.21	A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente não regula a expressão da proteína Rb em células NIH3T3	69
Tabela 1.1	Parceiros de interação da proteína IRF2BP2	21

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - Regulação da Expressão Gênica em Eucariotos	1
1.1.1 – Regulação Geral da Transcrição	1
1.1.2 – Os fatores de transcrição	4
1.1.3 – Cofatores transcricionais	7
1.2 - Mecanismos de carcinogênese	8
1.3 - Ciclo celular	11
1.3.1 – Regulação da transição entre as fases G₁ e S do ciclo celular	14
1.3.2 – Ciclo celular e câncer	16
1.4 - A proteína IRF2BP2	18
1.4.1 – Função da proteína IRF2BP2	20
2 – OBJETIVOS	26
2.1 - Objetivo principal	26
2.2 – Objetivos específicos.....	26
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 - Cultura de células	27
3.2 - Animais	27
3.3 - Construção dos plasmídeos	27

3.4 - Transdução de células NIH3T3 com retrovírus recombinantes	28
3.5 - Sincronização celular nas fases G ₀ /G ₁ do ciclo celular	29
3.6 - Sincronização celular nas fases G ₂ /M do ciclo celular	29
3.7 - Cinética de proliferação celular	30
3.8 - Western blotting	30
3.9 - Análise de ciclo celular por incorporação de BrdU	31
3.10 - Análise de morte celular por marcação com iodeto de propídio	32
3.11 - Análise de morte celular por marcação com Anexina V	32
3.12 - Ensaio clonogênico	32
3.13 - Ensaio de formação de focos	33
3.14 - Ensaio de crescimento independente de ancoragem em meio semissólido	33
3.15 - Formação de tumores em camundongos atímicos	33
3.16 - Análises de dados de RNA-Seq	34
3.17 - Extração de RNA e síntese de cDNA	34
3.18 - PCR em tempo real	35
3.19 - Análises estatísticas	35
4 – RESULTADOS	36
4.1 - Avaliação dos níveis proteicos de IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR-BP2 não sincronizadas	36
4.2 - Avaliação da expressão de IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas	38

4.3 - Avaliação da proliferação e morte celular de células NIH3T3-TetR-BP2	40
4.4 - Análise da progressão do ciclo celular em células NIH3T3-TetR-BP2	43
4.5 - Avaliação da proliferação e morte celular de células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12.....	50
4.6 - Avaliação de fenótipos de transformação celular em células com altos níveis da proteína IRF2BP2	56
4.7 - Avaliação da correlação entre a expressão de IRF2BP2 e genes de ciclo celular em dados de RNA-Seq de amostras de fibroblastos humanos	60
4.8 - Avaliação da expressão de genes envolvidos com a transição G ₁ /S do ciclo celular em células NIH3T3-TetR-BP2	66
5 – DISCUSSÃO	70
6 – CONCLUSÕES	79
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8 – AXEXOS	92
8.1 – Protocolo CEUA para utilização dos animais nos experimentos <i>in vivo</i>	92
8.2 – Gráficos de correlação entre a expressão de IRF2BP2 e a expressão de genes envolvidos no ciclo celular	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Regulação da Expressão Gênica em Eucariotos

A complexidade dos organismos vivos não é determinada pelo número de genes, e sim como estes estão sendo regulados. Sendo assim, o controle de quais genes serão expressos e em que intensidade essa expressão ocorre provocam grandes variações no tamanho, forma, comportamento e função das células, sendo de fundamental importância para definir a identidade celular (GUO, 2014). A expressão gênica é o principal fator responsável pelos efeitos das interações genótipo x ambiente em todos os organismos, sendo, portanto, um importante componente da base genética para a mudança evolutiva em diversos aspectos, permitindo assim diferenças fenotípicas que caracterizam os diversos tipos celulares presentes nos eucariotos superiores (OGBOURNE & ANTALIS, 1998; WRAY *et al.*, 2003). A expressão de genes eucarióticos é um processo fortemente regulado, ou seja, genes que regulam a identidade celular são ativados sob condições temporais, espaciais e ambientais muito específicas para garantir que uma célula seja capaz de desempenhar sua função designada (PHILLIPS, 2008). Falhas nos programas de controle da expressão gênica estão associadas a diferentes doenças e síndromes, incluindo câncer, autoimunidade, diabetes e doenças cardiovasculares (LEE & YOUNG, 2013; REITER *et al.*, 2017; SOUTOURINA, 2017).

O controle da expressão gênica envolve diferentes vias de sinalização, as quais são reguladas por diversas proteínas que se associam de forma coordenada e combinatória (REMÉNYI *et al.*, 2004). Há várias etapas no processo da expressão gênica em células eucarióticas e todas elas podem ser controladas, incluindo alterações na estrutura da cromatina, ativação da transcrição, processamento do RNA nuclear, transporte e localização do mRNA, síntese proteica e modificações pós-traducionais (OGBOURNE & ANTALIS, 1998).

1.1.1 Regulação Geral da Transcrição

Um dos principais processos que regula a expressão gênica em uma célula é a transcrição, que envolve a síntese de uma molécula RNA a partir de uma sequência gênica contida na molécula de DNA (BUNCH, 2017). Para a maioria dos genes, o

controle transcricional é soberano uma vez que este pode garantir que intermediários desnecessários não sejam sintetizados. A transcrição de genes eucarióticos é um processo bioquímico extremamente complexo e regulado em diversos níveis, permitindo assim, que programas genéticos estejam adaptados de acordo com as necessidades celulares (LEMON & TIJAN, 2000; SOUTOURINA, 2017). A ativação transcricional envolve muitas etapas que requerem (i) abertura da estrutura da cromatina, (ii) montagem do complexo de pré-iniciação e (iii) transição para uma etapa de alongação produtiva (FRIETZE & FRNHAM, 2011).

Em eucariotos, a síntese de RNA é catalisada por três RNA polimerases diferentes dependendo do tipo de RNA produzido: (i) RNA polimerase I é necessária para a transcrição de RNA ribossômico (rRNA); (ii) RNA polimerase II sintetiza RNA heteronuclear; (iii) RNA polimerase III participa da transcrição de pequenos RNAs nucleares, como por exemplo RNA transportador (tRNA). A RNA polimerase II é responsável por aproximadamente 20-40% do total de atividade das RNAs polimerases (OGBOURNE & ANTALIS, 1998) e está associada com a regulação da transcrição de todos os genes que codificam para uma proteína e alguns genes não codificantes (ncRNAs), como por exemplo os micro-RNAs (miRNA) e pequenos RNAs de interferência (snRNA) (BUNCH, 2017). É estimado, que em humanos, apenas dois terços do genoma é transcrito e somente 2% dos RNAs transcritos são traduzidos em proteínas (FATICA & BOZZONI 2014; PALAZZO & GREGORY, 2014).

Todos os genes que codificam proteínas são transcritos pelo complexo da holoenzima RNA polimerase II (DVIR *et al.*, 2001; SPERLING, 2007), que é composto por pelo menos 12 proteínas, chamadas de fatores gerais (ou basais) da transcrição (designados TFIIA, -B, -D, -E, -F e -H), que formam a maquinaria basal de transcrição, necessária para reconhecer a região promotora dos genes e iniciar a transcrição (KORNBERG, 1999; SPERLING, 2007).

Cada gene pode ser categorizado a partir da presença de elementos de sequencias específicas na sua região promotora. Essas sequencias podem estar localizadas *upstream* ou *downstream* dos sítios de início de transcrição gênica (SHANDILYA & ROBERTS, 2012). O promotor basal eucariótico é uma região de aproximadamente 100 pb (pares de bases), onde a maquinaria basal de transcrição é montada (Figura 1.1). Em humanos, este está localizado aproximadamente -45 pb a -20 pb do sítio de início de transcrição. O promotor basal inclui a sequência TATA box, normalmente localizada entre 25-30 pb a 5' do sítio de início da transcrição e outros elementos caracterizados por sequências específicas de nucleotídeos, como o

elemento iniciador (Inr), a sequência de reconhecimento do fator geral de transcrição TFIIB (BRE) e o elemento *downstream* ao promotor (DPE) (RAZIN *et al.*, 2015). Um promotor pode ser formado por combinações destas sequências ou por todas elas (LEE & YOUNG, 2000).

A primeira etapa da iniciação da transcrição envolve a ligação do complexo TFIID-TBP (*TATA binding protein*) ao promotor basal. A subunidade TBP se liga ao sulco menor da sequência TATA box, estabelecendo um sítio de reconhecimento para a RNA polimerase II ao DNA. Na etapa seguinte, o complexo TFIID-TBP recruta o fator TFIIA, que promove uma mudança conformacional no DNA, permitindo a ligação do fator TFIIB. A ligação deste terceiro fator facilita a associação do complexo TFIIF-RNA polimerase II ao promotor. O fator TFIIIE se liga diretamente na polimerase e subsequentemente recruta o fator TFIIH para o domínio c-terminal (CTD) da enzima. Este fator tem atividades helicase e cinase que promove a separação da dupla fita de DNA no sítio de início de transcrição e a liberação dos fatores associados ao domínio CTD, respectivamente, permitindo que o processo se inicie (DVIR *et al.*, 2001; MARTINEZ, 2002). Este, por sua vez, pode ser modulado positiva ou negativamente através da ligação de outros fatores de transcrição a sítios específicos no genoma (LEMON & TIJAN, 2000).

Embora necessária para iniciar a transcrição, a ligação dos fatores gerais ao promotor basal não gera, por si só, níveis significativos de mRNA, uma vez que estes fatores são expressos de forma ubiquitária e conferem pouca especificidade regulatória (OGBOURNE & ANTALIS, 1998; LEE & YOUNG, 2000). A especificidade da regulação da transcrição depende da habilidade de proteínas específicas, chamadas de elementos em *trans*, de se ligarem em sequências regulatórias no DNA (chamadas de elementos em *cis*), que podem estar localizados dentro e fora do promotor basal. Portanto, a transcrição só será produtiva se todos os fatores necessários (elementos em *cis* e *trans*) estiverem presentes e atuarem de forma cooperativa para recrutar a maquinaria transcricional (TODESCHINI *et al.*, 2014).

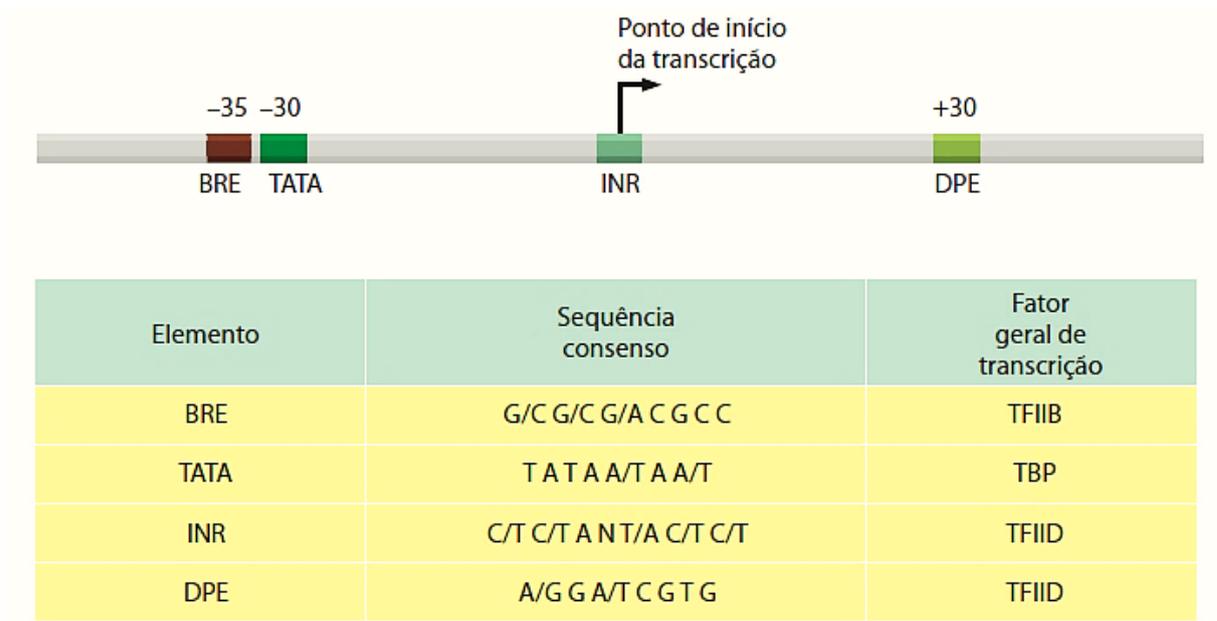


Figura 1.1. Sequências consenso encontradas nos promotores basais de células eucarióticas. Estão indicados o nome dado a cada sequência consenso (primeira coluna) e o fator geral de transcrição que a reconhece (última coluna). Adaptado de *Molecular Biology of The Cell*, 1994.

1.1.2 Os fatores de transcrição

Historicamente, o termo fator de transcrição (TF) tem sido utilizado para descrever qualquer proteína envolvida na transcrição e/ou capaz de alterar os níveis de expressão de um gene. Atualmente, entretanto, o termo é aplicado para proteínas capazes de (i) se ligar ao DNA de forma sequência-específica e (ii) regular a transcrição (FULTON *et al.*, 2009; LAMBERT *et al.*, 2018). Um mesmo fator de transcrição pode regular diferentes genes em diferentes tipos celulares, indicando que a regulação é dinâmica mesmo dentro de um organismo (LAMBERT *et al.*, 2018).

Em mamíferos, os fatores de transcrição compõem a maior classe de proteínas codificadas no genoma, representando aproximadamente 10% de todos os genes codificadores de proteínas (VAQUERIZAS *et al.*, 2009; YOUNG, 2011). São caracterizados por pelo menos dois domínios estruturais distintos: o domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*), que reconhece e se liga a pequenas sequências (de aproximadamente 5-15 pb) localizadas próximas ao promotor basal ou em regiões mais distais do gene e o domínio de ativação ou repressão da transcrição, que interage direta ou indiretamente com diferentes componentes da maquinaria basal da transcrição, ou com outros cofatores e/ou com proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina, influenciando a taxa de transcrição

(WRAY *et al.*, 2003; REMÉNYI *et al.*, 2004). Muitas famílias de moléculas podem atuar como fatores de transcrição. A maioria dos fatores de transcrição são expressos em todas as células do organismo, porém, alguns são específicos de um tipo celular e expressos em um determinado estágio de desenvolvimento.

A regulação da transcrição comumente ocorre através de um dobramento do DNA (Figura 1.2), por meio de interações proteína-proteína, que se encontram posicionadas em sítios a mais de dezenas de pares de bases de distância do promotor (WRAY *et al.*, 2003). Estes sítios podem conter sequências responsáveis por ativar a transcrição, chamadas de *enhancers* ou conter sequências que irão inibir a transcrição, chamadas de *silencers*. Evidências têm mostrado que diversos fatores de transcrição apresentam dupla função, ou seja, podem agir como ativadores ou repressores transcricionais, por meio de mecanismos que envolvem a afinidade de ligação por um sítio específico, as sequências ou elementos de ligação disponíveis e o recrutamento sinérgico de proteínas cofatores (OGBOURNE & ANTALIS, 1998; SIGGERS *et al.*, 2011).

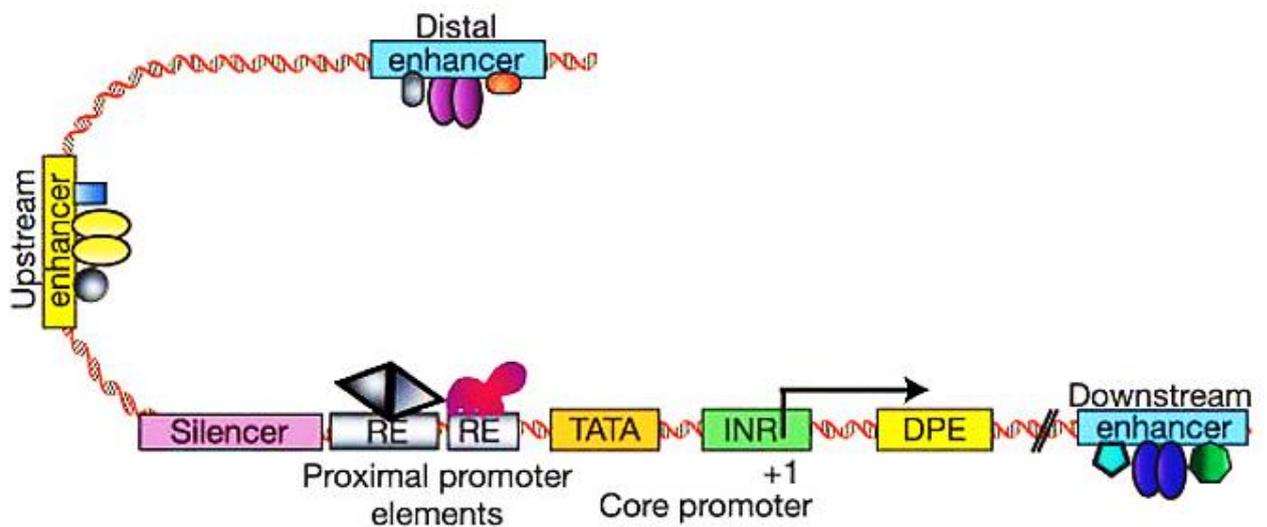


Figura 1.2. Controle transcrricional em células eucarióticas. Um complexo arranjo de sequências ativadoras (*enhancers*) e repressoras (*silencers*), localizadas próximo ou distante do promotor basal é importante para regular a iniciação da transcrição. Estes sítios são ligados por diferentes conjuntos de proteínas, que atuam de forma combinatória para determinar qual, quando e em que intensidade um determinado gene será transcrito. Adaptado de LEVINE & TJIAN, 2003.

A atividade/função dos fatores de transcrição pode estar alterada em diversos tipos de câncer, através de mecanismos diretos, incluindo translocações cromossômicas, amplificação ou deleção gênica e mutações pontuais, assim como por mecanismos indiretos, através de mutações em DNA não codificante, que afetam os sítios de ligação para um fator de transcrição específico. Portanto, fatores de transcrição mutados ou com seus níveis de expressão desregulados representam importantes mediadores de uma regulação da expressão gênica aberrante, podendo levar ao bloqueio da diferenciação celular e a alterações nos programas de expressão de genes associados com a morte celular, que são algumas das características do câncer, criando assim, um microambiente de instabilidade para a aquisição de novas mutações que permitam o aumento da proliferação celular e consequente expansão da heterogeneidade clonal da doença (BUSHWELLER, 2019) (Figura 1.3).

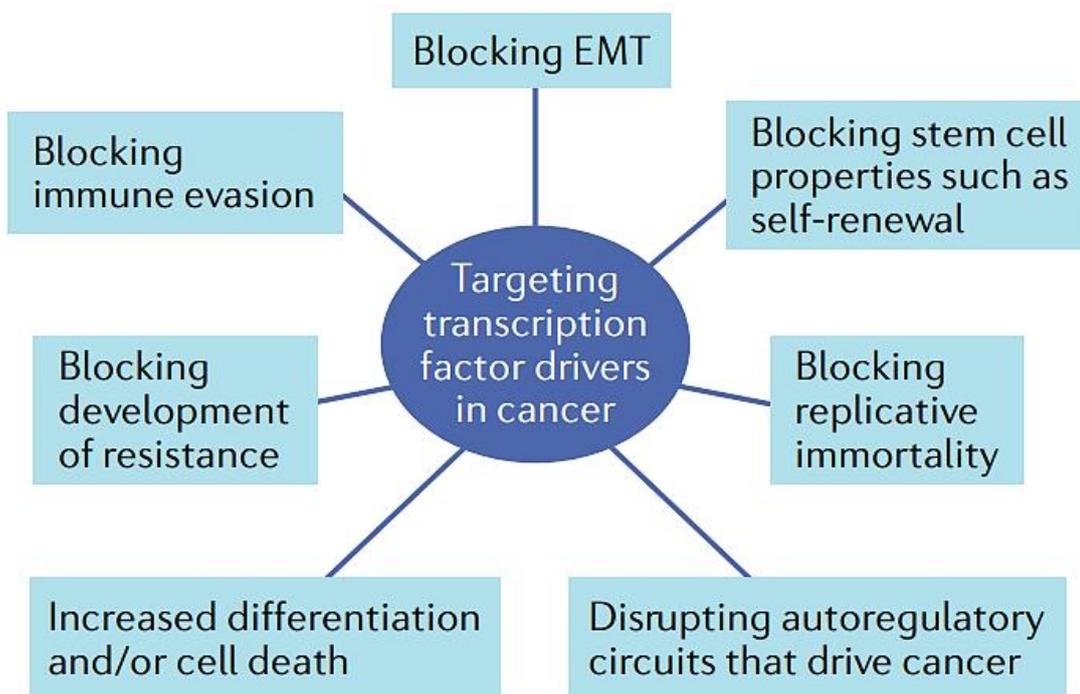


Figura 1.3. Fatores de transcrição alvos no câncer. Esquema mostrando possíveis vantagens para a iniciação e desenvolvimento tumoral através da desregulação da atividade de diversos fatores de transcrição. EMT: transição epitélio-mesenquimal (BUSHWELLER, 2019).

1.1.3 Cofatores transcricionais

Os fatores de transcrição que agem como ativadores ou repressores são incapazes de modular de forma significativa a taxa de transcrição de promotores alvos, portanto, a presença de domínios de interação proteína-proteína encontrados nestes fatores dita em grande parte qual será seu efeito na transcrição, uma vez que o fenótipo induzido por um determinado fator varia de acordo com a proteína parceira com a qual ele está formando o dímero (WRAY *et al.*, 2003).

Os cofatores não têm a capacidade de se ligarem a sequências específicas no DNA, porém são, geralmente, recrutados para regiões promotoras como co-reguladores transcricionais e/ou componentes da maquinaria basal de transcrição (MARTINEZ, 2002). Podem ser divididos em cinco classes, dependendo do seu mecanismo de ação: (i) inclui os cofatores que estão associados intimamente com componentes da maquinaria basal da transcrição; (ii) inclui os cofatores associados com moléculas repressoras e ativadoras; (iii) inclui o complexo Mediador, cuja função está relacionada com a integração e transdução de sinais entre os fatores de transcrição e a maquinaria basal de transcrição; (iv) inclui os cofatores que modificam covalentemente os nucleossomos e (v) inclui os cofatores que modificam a estrutura da cromatina através da hidrólise do ATP (LEMON & TIJAN, 2000).

A estrutura da cromatina tem consequências importantes para a regulação gênica, permitindo que genes relacionados, mesmo localizados em domínios muito distantes no DNA, possam ser regulados de forma simultânea (SPROUL *et al.*, 2005). A compactação do DNA eucariótico representa um obstáculo para a ligação de fatores transcricionais às suas sequências específicas e, portanto, influencia de forma negativa todas as etapas da transcrição (SHANDILYA & ROBERTS, 2012).

Interações entre fatores de transcrição e proteínas modificadoras de histonas e/ou complexos remodeladores de cromatina contribuem de forma significativa para determinar os níveis transcricionais de um determinado gene a partir do seu promotor. Assim, a abertura da cromatina permite que as sequências regulatórias do DNA se tornem mais acessíveis para os fatores de transcrição, e por outro lado, a inativação ou silenciamento da cromatina tornam o DNA mais compactado e inacessível à transcrição.

Diversos reguladores controlam a iniciação da transcrição através do recrutamento para a região promotora de dois diferentes tipos de cofatores modificadores da cromatina: (I) os que alteram a associação das histonas com o DNA

e facilitam o deslocamento dos nucleossomos e (II) os que apresentam atividade acetiltransferase (HATs) ou atividade deacetilase (HDACs), controlando os níveis de acetilação de resíduos de lisina das histonas presentes no nucleossomo e desse modo, influenciando as interações com o DNA e/ou com outras proteínas regulatórias (MARTINEZ, 2002).

As fosfoproteínas nucleares CBP e p300 são exemplos de coativadores transcricionais que apresentam atividade acetiltransferase, ou seja, catalisam a acetilação de lisinas em todas as quatro histonas presentes no cerne do nucleossomo, assim como promovem a acetilação de outras proteínas não-histonas, incluindo diferentes fatores transcricionais como E2F e p53 (CHAN & LA THANGUE, 2001; ACHARYA *et al.*, 2005; FRIETZE & FARNHAM, 2011). Essas modificações aumentam a atividade de ligação ao DNA desses TFs, possivelmente criando uma superfície que facilita o reconhecimento proteína-DNA (IYER *et al.*, 2004).

Os correpressores atuam em analogia com os coativadores, porém seus efeitos são opostos. Um grande número de correpressores foi identificado, e estes se ligam e mediam a função de uma ampla gama de fatores transcricionais, se mostrando essenciais para uma grande variedade de vias biológicas e mecanismos de homeostase, incluindo apoptose, diferenciação, desenvolvimento e proliferação celular. A regulação da interação correpressor-DNA é um parâmetro crítico para as funções biológicas normais da célula, ou seja, interações aberrantes entre o correpressor e sua sequência alvo podem levar a manifestações fisiológicas graves. Diversas doenças humanas, como por exemplo o câncer, são consequências de interações aumentadas ou reduzidas entre o correpressor e sua sequência silenciadora (BURKE & BANIAHMAS, 2000).

1.2. Mecanismos de carcinogênese

O corpo humano é composto de vários sistemas e órgãos, cada um, consistindo de milhões de células, que necessitam de condições relativamente estáveis para funcionar efetivamente e contribuir para a sobrevivência do corpo como um todo.

Em quase todos os tecidos adultos as células morrem continuamente e são substituídas, permitindo que a organização tecidual seja preservada. As células nos tecidos variam grandemente na taxa e no padrão de renovação, ou seja, existem células que permanecem por toda a vida, sem substituição e existem aquelas que são

substituídas completamente em poucos dias. A renovação do tecido requer um controle complexo para coordenar o comportamento da célula individual com as necessidades do organismo. As células devem dividir quando novas células do seu tipo específico são necessárias, e conter a divisão quando desnecessário, assim como, devem sobreviver ou morrer em situações específicas. Portanto, o balanço entre proliferação e morte celular é essencial para a manutenção da homeostase tecidual (ALBERTS *et al.*, 1994).

A perda da capacidade de induzir morte celular ou o aumento descontrolado da proliferação podem levar ao surgimento do câncer. O câncer é um conjunto de doenças genéticas que podem ser herdadas ou causadas por danos endógenos ou exógenos ao DNA. A tumorigênese é um processo de múltiplas etapas, que confere a uma célula normal, através de diversas alterações genéticas e epigenéticas, capacidade e vantagem seletivas, associadas as seguintes características (Figura 1.4): autossuficiência em sinais de crescimento; insensibilidade a sinais inibidores de crescimento; evasão da apoptose; potencial replicativo ilimitado; invasão tecidual e metástase; angiogênese sustentada; capacidade de alteração do metabolismo energético celular; escape do sistema imune, além da instabilidade genômica e inflamação proveniente do microambiente tumoral (HANAHAN & WEINBERG, 2011)

Alterações em três classes de genes são responsáveis pelo surgimento e desenvolvimento tumoral: genes supressores de tumor, proto-oncogenes e genes associados a estabilidade celular, como por exemplo, genes de reparo do DNA (HAHN & WEINBERG, 2002; VOLGELSTEIN & KINZLER, 2004). Os proto-oncogenes codificam proteínas que participam no recebimento e na transmissão de sinais estimuladores da proliferação e sobrevivência celular. A perda da regulação dos proto-oncogenes, através de mutações ou alterações que promovem a superexpressão do gene ou a hiperatividade da proteína, transforma-os em oncogenes, e está associada com o crescimento tumoral. Já os genes supressores de tumor geralmente estão associados com a retenção do crescimento e divisão celular inadequada, mantendo as células em equilíbrio. Mutações que levam à perda de função desses genes também estão associadas com o surgimento de tumores. Os genes de reparo do DNA são responsáveis pelo processamento de diferentes tipos de dano e são essenciais para evitar o acúmulo de mutações e garantir a transmissão acurada da informação genética. Existem diferentes vias de reparo do DNA e a desregulação de qualquer uma destas resulta num aumento da taxa mutacional e na instabilidade genômica (SILVA & IDEKER, 2019).

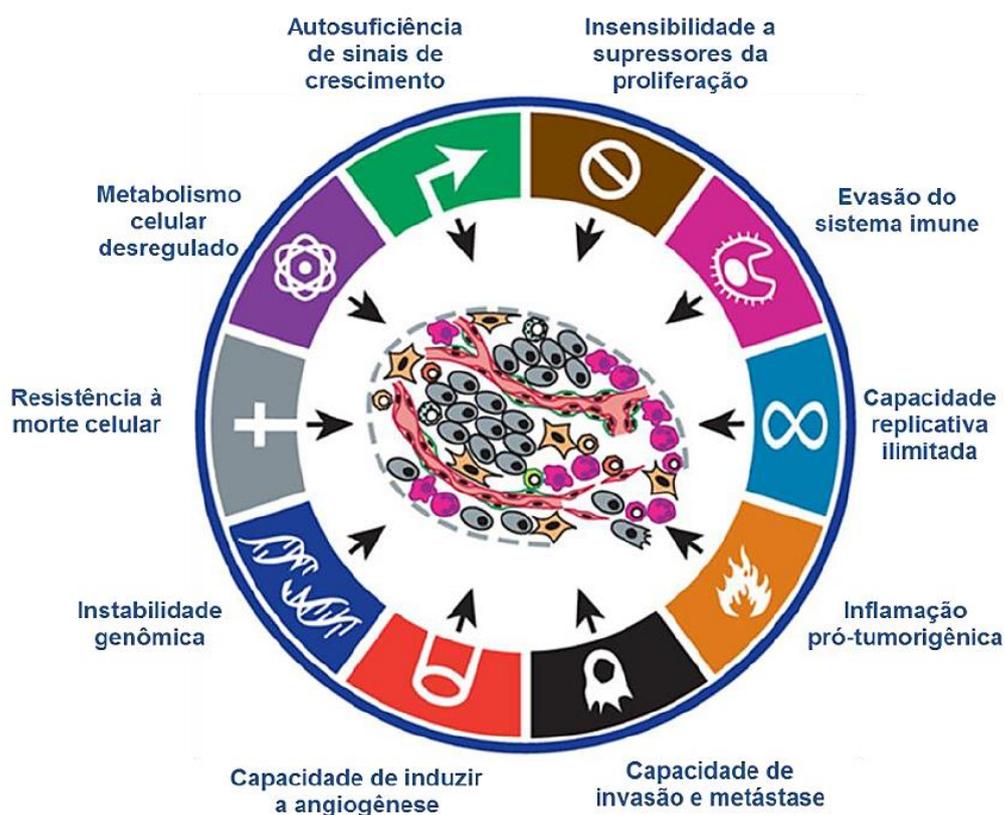


Figura 1.4. Características do câncer. A figura mostra as dez características que uma célula normal precisa adquirir durante o processo de transformação conforme proposto por Hanahan & Weinberg (Adaptado de HANAHAN & WEINBERG, 2011).

As vias de sinalização celular capazes de promover ou suprimir diferentes aspectos associados à transformação celular são formadas por diferentes proteínas oncogênicas e supressoras de tumor (PATTERSON *et al.*, 2018). Muitas vezes a alteração de apenas uma única proteína mediadora é suficiente para desencadear fenótipos associados à progressão tumoral. As alterações genéticas associadas ao câncer podem afetar proteínas que participam em quase todos os níveis do controle transcricional, incluindo os fatores *-trans* (fatores de transcrição, proteínas de sinalização, cofatores, reguladores da cromatina) e elementos em *cis* (promotores, *enhancers* e *silencers*) (BRADNER *et al.*, 2017).

Em um organismo complexo, não há consequências danosas se uma única célula apresentar comportamento anormal. Mas um descontrole pode ocorrer quando uma célula sofre alguma alteração genética que lhe permite sobreviver e dividir quando não deveria, produzindo clones celulares que também se comportam erroneamente. Portanto, o acúmulo de mutações, competição e seleção natural dentro de uma população de células somáticas são a base para o desenvolvimento tumoral.

1.3. Ciclo celular

De maneira resumida, pode-se dizer que a homeostasia tecidual é dada por um delicado balanço entre a proliferação e a morte celular e diversos mecanismos de sinalização irão determinar se uma determinada célula irá permanecer quiescente, proliferar ou morrer. Todos os organismos vivos, desde bactérias unicelulares aos mamíferos multicelulares, são produtos de repetidos eventos de crescimento e divisão celular. Esse processo ocorre por meio de uma sequência ordenada de eventos, que duplicam os componentes celulares e os dividem em duas novas células, sendo, portanto, um processo fundamental para a preservação da integridade genômica (NORBURY & NURSE, 1992). Os detalhes do ciclo celular podem variar de um organismo para outro, ou mesmo em diferentes períodos de crescimento em um mesmo indivíduo (MURRAY & KIRSCHNER, 1989; HARASHIMA *et al.*, 2013).

O ciclo celular pode ser dividido em quatro fases: duas fases de intervalo ou *gaps* (fases G₁ e G₂), a fase de síntese de DNA (fase S) e a mitose (fase M) (NORBURY & NURSE, 1992; POON, 2016) (Figura 1.5). As fases S e M compreendem, respectivamente, dois eventos cruciais para o ciclo celular: a duplicação do conteúdo genético da célula e a repartição de todos os componentes celulares entre duas células filhas idênticas. As outras duas fases do ciclo celular, G₁ e G₂, representam períodos de preparação que asseguram a progressão correta para as fases S e M, respectivamente. Dependendo dos estímulos recebidos, as células podem permanecer em uma etapa de repouso conhecida como G₀ ou quiescência (SHERR, 1996; YAO, 2014; COLLER, 2020).

A entrada no ciclo celular é dependente de estímulos mitogênicos extracelulares (COLLER, 2020), que impulsionam a célula a sair do estágio de quiescência. A partir de um determinado ponto durante a fase G₁, células passam a ser capazes de progredir pelo ciclo celular independente da presença de sinais estimulatórios. Esta transição é denominada ponto de restrição, após a qual células entram de forma irreversível na progressão do ciclo celular (PARDEE, 1974).

Nas células eucarióticas, a progressão do ciclo celular é altamente regulada por uma complexa rede de proteínas regulatórias, conhecida como sistema de controle do ciclo celular ou pontos de checagem (*checkpoints*), que só permitirão que o ciclo progrida quando todos os eventos necessários para aquela etapa estiverem concluídos (HARTWELL & WEINERT, 1989; ELLEDGE, 1996; BERTOLI *et al.*, 2013). O núcleo desse sistema é uma série ordenada de mudanças bioquímicas que iniciam

os principais eventos do ciclo, incluindo a duplicação e a segregação dos cromossomos. Na maioria das células, níveis adicionais de regulação aumentam a fidelidade da divisão celular e permitem que o sistema de controle responda a vários sinais, tanto internos como externos à célula. Na maioria das células eucarióticas, existem três pontos principais de checagem: (i) o primeiro representa o ponto de restrição no final de G₁, onde a célula se compromete à entrada no ciclo celular e à duplicação do material genético, como mencionado anteriormente; (ii) o segundo é o checkpoint G₂/M, onde a célula verifica se a síntese do DNA foi completada de forma satisfatória e sem erros; e (iii) o terceiro é o checkpoint de M, que é ativado na transição entre a metáfase e anáfase, estimulando a separação das cromátides-irmãs, levando à conclusão da mitose e da citocinese (LECCA & PRIAMI, 2007). Estes mecanismos de *checkpoint* podem induzir as células a sair do ciclo celular ou a ficarem em arresto em alguma fase do ciclo quando necessário (COLLER, 2020), e a perda desses pontos de checagem pode resultar em morte celular, infidelidade na distribuição do conteúdo genético durante a divisão, ou maior susceptibilidade a danos ao DNA, podendo levar ao desenvolvimento tumoral (HARTWELL & WEINERT, 1989; KASTAN & BARTEK, 2004).

Um dos principais reguladores da progressão pelas diferentes fases do ciclo celular é uma família de serina-treonina cinases conhecidas como CDKs (*Cyclin-dependent kinases*) (MALUMBRES & BARBACID, 2005). As atividades dessas cinases sobem e descem à medida que a célula avança no ciclo, levando a mudanças na fosforilação de proteínas intracelulares que iniciam ou regulam os principais eventos do ciclo celular. As proteínas CDKs são ativadas pela ligação às ciclinas, que são sintetizadas e degradadas em momentos específicos do ciclo celular (MURRAY, 2004). Em cada etapa do ciclo celular, um grupo diferente de ciclinas será sintetizado, levando à ativação de suas CDKs específicas e permitindo um controle fino da progressão do ciclo celular. Existem quatro classes de ciclinas, cada uma definida pelo estágio do ciclo celular no qual se ligam às CDKs e em que funcionam. Três dessas classes, ciclinas de G₁/S, ciclinas de fase S, e ciclinas de fase M, estão diretamente envolvidas no controle dos eventos do ciclo celular. A quarta classe, ciclinas de G₁, controlam a entrada no ciclo celular em resposta a mitógenos e fatores de crescimento extracelulares (YANG, 2018).

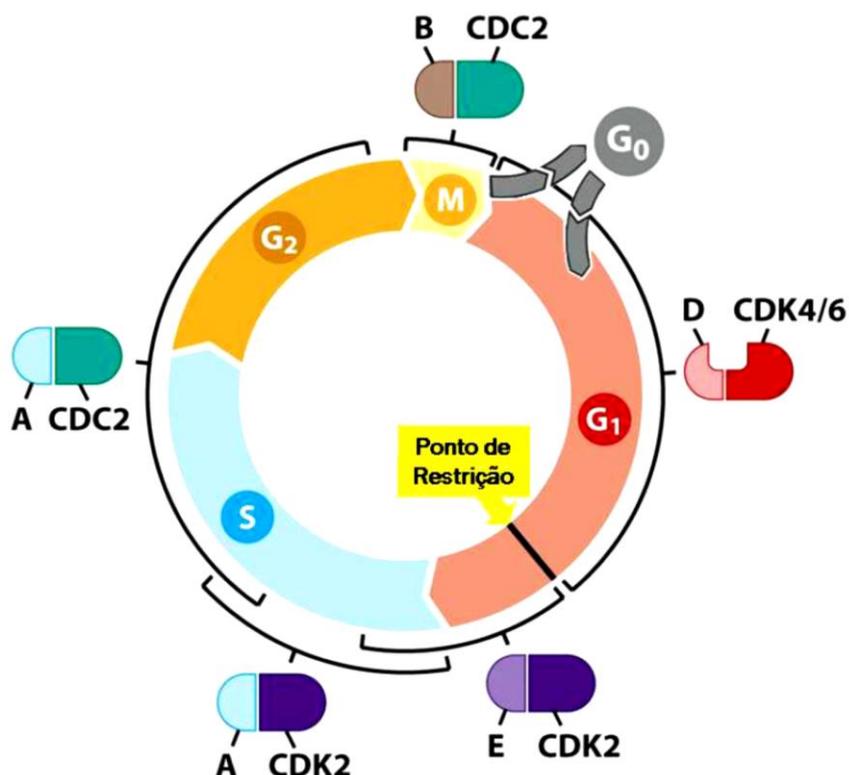


Figura 1.5. Representação esquemática do ciclo celular em mamíferos. O ciclo celular é dividido em quatro fases – G₁, S, G₂ e M. Estão representados os períodos de atividade dos complexos ciclina-Cdks durante a progressão do ciclo, além da entrada ou saída de células no estado de quiescência (G₀) e o ponto de restrição que ocorre durante a progressão da fase G₁. Adaptado de WEINBERG, 2007.

Enquanto as ciclinas atuam como reguladoras positivas da atividade das CDKs, existe um outro conjunto de proteínas, as CKIs (*CDK inhibitors*) que agem como reguladoras negativas da função das CDKs (SHERR & ROBERTS, 1999). Em mamíferos, existem duas famílias de CKIs definidas de acordo com suas origens, estruturas e mecanismos de inibição: Cip/Kip e INK4 (COLLER, 2020). Os membros da família Cip/Kip bloqueiam a atividade dos complexos ciclina/CDK se ligando tanto a ciclina quanto a sua CDKs específica, impedindo assim, a habilidade do complexo de fosforilar suas proteínas alvo. A família Cip/Kip é composta por três membros: *CDKN1A* (p21^{Cip1/Waf1}), *CDKN1B* (p27^{Kip1}) e *CDKN1C* (p57^{Kip2}), que inibem principalmente a função dos complexos Ciclina E/CDK2 e Ciclina A/CDK2 e, portanto, a entrada e progressão da fase S do ciclo celular (SHERR & ROBERTS, 1999). A proteína p21 ainda pode inibir os complexos formados pelas CDK1, CDK4 e CDK6 e suas ciclinas específicas, atuando sobre outras etapas do ciclo celular. Portanto, os membros da família Cip/Kip são importantes para restringir a proliferação celular

durante o desenvolvimento e diferenciação e reduzir o número de ciclos de divisão celular sob condições de estresse (SHERR & ROBBERTS, 1999). Já a família de inibidores INK4 é composta pelos membros *INK4A* (p16), *INK4B* (p15), *INK4C* (p18) e *INK4D* (p19). Essas proteínas são mais restritas que as da família Cip/Kip no reconhecimento dos complexos ciclina/CDK e atuam se ligando e inibindo as cinases CDK4 e CDK6 de se associarem as Ciclinas do tipo D, promovendo assim, um arresto na fase G₁ do ciclo celular em diferentes situações, inclusive durante a senescência (RUAS & PETERS, 1998; PAVLETICH, 1999). Dessa forma, as proteínas CKIs atuam na regulação do ciclo celular em momentos de condições desfavoráveis, contribuindo para a manutenção da homeostase celular e a inativação desses reguladores está associada com uma proliferação inapropriada no contexto do desenvolvimento e formação tumoral.

1.3.1. Regulação da transição entre as fases G₁ e S do ciclo celular

O ciclo celular pode se iniciar após uma divisão celular anterior, com a entrada das células-filhas em um novo processo de ciclo. Alternativamente, estas células podem sair do ciclo celular cessando a proliferação e entrando no estado de quiescência. A manutenção das células no ciclo celular depende da interação entre sinais mitogênicos extracelulares com receptores da superfície celular. Uma vez passado o ponto de restrição, a célula está comprometida a progredir pelo ciclo, independentemente da presença de sinais estimuladores de proliferação no microambiente (POON, 2014). As células que mantêm a proliferação avançam para a fase G₁ do novo ciclo, e são necessários alguns eventos para que ocorra a progressão para a fase S: (i) a formação dos complexos pré-replicativos nas origens de replicação e a iniciação da síntese de uma nova molécula de DNA, (ii) a coordenação entre biossíntese de moléculas e a disponibilidade de nutrientes para garantir que o genoma seja replicado de forma adequada e (iii) o comprometimento e ativação dos complexos ciclina-CDKs. A desregulação de qualquer um desses eventos pode resultar numa transição G₁/S inapropriada (SIDOROVA & BREEDEN, 2003).

As Ciclinas D (D1, D2 e D3) são as primeiras ciclinas sintetizadas durante o ciclo celular e têm seus níveis controlados pela presença de fatores de crescimento, sugerindo que estas proteínas são responsáveis pela comunicação funcional entre os estímulos extracelulares e a maquinaria do ciclo celular (SHERR, 1995, POON, 2014).

Os mecanismos pelos quais mitógenos e fatores de crescimento ativam as Ciclinas D são complexos e ocorrem tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional (YANG, 2018). Ciclinas D se ligam e ativam tanto CDK4 e CDK6 (MORGAN, 1997). Essas duas proteínas cinases são relacionadas entre si e não apresentam diferenças funcionais, apenas padrões distintos de ativação (MEYERSON E HARLOW, 1994; JINNO *et al.*, 1999). Os substratos primários de CDK4/6 na progressão da fase G₁ são os membros da família de proteínas retinoblastoma, respectivamente Rb, p107 e p130 (ADAMS, 2001; HENLEY & DICK, 2012). Na ausência de estímulos mitogênicos, a proteína Rb interage e inibe a atividade dos fatores de transcrição da família E2F, bloqueando sua habilidade de ativar a transcrição gênica (HELIN *et al.*, 1993; SHERR & Mc CORMICK, 2002). Além de interagir fisicamente com E2F, a proteína Rb também recruta enzimas remodeladoras de cromatina, como as HDACs, que frequentemente agem como correpressores transcricionais. Portanto, a ligação da proteína Rb ao E2F não somente inibe a atividade desse fator de transcrição, como também o complexo Rb-E2F se liga a promotores gênicos específicos, reprimindo a transcrição através do bloqueio espacial da atividade dos *enhancers* (YANG, 2018).

A atividade das proteínas Rb é modulada por fosforilação catalisada por CDKs. Rb contém 16 potenciais sítios de fosforilação por CDKs e oscila entre as formas hipofosforilada e hiperfosforilada durante o ciclo celular (LUNDBERG E WEINBERG, 1998; EZHEVSKY *et al.*, 2001). Pelo menos três diferentes complexos de ciclina/CDKs são conhecidos por fosforilar a proteína Rb durante o ciclo celular: Ciclina D-CDK4/6 que age no início de G₁; Ciclina E-CDK2 que atua no final de G₁; e Ciclina A-CDK2 que atua em fase S. Desse modo, Rb se torna sequencialmente fosforilada ao longo do ciclo celular (YANG, 2018).

Em G₀, Rb encontra-se completamente desfosforilada e inativa, e seu estado ativo (inibitório) seria causado por uma hipofosforilação inicial por CDK4/6 durante o início de G₁. A inativação de Rb inibe sua ligação ao fator E2F, levando à transcrição de genes necessários para progressão à fase S, incluindo os genes de Ciclina E e Ciclina A (OHTANI *et al.*, 1995; SCHULZE *et al.*, 1995; GENG *et al.*, 1996; MORGAN, 2007) e genes necessários para a síntese de DNA (DYSON, 1998; NEVINS, 1998). A completa hiperfosforilação de Rb pelos complexos Ciclina D-CDK4/6 e Ciclina E-CDK2 coincide com o ponto de restrição, a partir do qual a célula já está comprometida com o ciclo celular (YANG, 2018).

1.3.2. Ciclo celular e câncer

Células tumorais têm em comum a aquisição de algumas características essenciais, resultantes de alterações na fisiologia celular, que juntas ditam o desenvolvimento e crescimento tumoral. Duas dessas características estão associadas diretamente com o ciclo celular, que são a autossuficiência de sinais proliferativos e a insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento celular (MASSAGUÉ, 2004). A desregulação das vias de sinalização ativadas por fatores extracelulares que estimulam a expressão de ciclinas e a proliferação celular são de grande importância para o desenvolvimento e progressão tumoral (MALUMBRES & BARBACID, 2001). Diferentes fatores de crescimento e seus respectivos receptores, assim como proteínas efetoras citoplasmáticas e nucleares têm sido identificados como oncogenes e genes supressores de tumor. Mutações que causam a ativação ou inibição constitutiva de proteínas oncogênicas ou supressoras de tumor, respectivamente, são comuns no câncer, podendo levar a um aumento da proliferação e diminuição do controle do ciclo celular.

Alterações genéticas e epigenéticas em genes do ciclo celular têm sido identificadas em diferentes tipos de neoplasias humanas. Além disso, estudos *in vivo* têm demonstrado que alterações em proteínas reguladoras do ciclo celular apresentam um papel importante na iniciação e progressão tumoral (CAGLAR & AVCI, 2020). Estas alterações diminuem a dependência das células por fatores de crescimento, permitindo que estas se dividam mesmo em condições desfavoráveis, garantindo às células afetadas uma vantagem proliferativa sobre as demais (SIDOROVA & BREEDEN, 2003). Os genes mais comumente mutados em tumores humanos são aqueles que codificam para proteínas que fazem parte da maquinaria de regulação da transição G₁/S, como proteínas da via Rb-EF2, ciclinas da fase G₁ e CKIs das famílias INK4 e Cip/Kip (DESHPANDE *et al.*, 2005) (Figura 1.6). Mudanças na expressão desses reguladores frequentemente resultam de alterações cromossômicas (amplificações, translocações e/ou deleções) ou inativação epigenética (MALUMBRES & BARBACID, 2001).

Ciclina D1 está superexpressa em diversos tumores como resultado da amplificação ou translocação de seu *locus* localizado no cromossomo 11q13 (HAMEL & HANLEY-HYDE, 1997). Os genes de CDK4 e CDK6 também apresentam amplificação em diversas malignidades, como sarcoma, glioma, linfoma, melanoma, e cânceres de mama (MALUMBRES & BARBACID, 2009). *CDK4* encontra-se

amplificado em 50% dos gliomas (SCHMIDT *et al.*, 1994) e constitutivamente ativado por mutações pontuais em melanomas (WÖLFEL *et al.*, 1995). De forma similar, *CDK6* é ativado por translocações genômicas em linfomas esplênicos (CORCORAN *et al.*, 1999). A tumorigênese também pode ser influenciada por diferentes CKIs. O gene *CDKN2A*, que codifica para os supressores de tumor $p16^{INK4A}$ e $p14^{ARF}$, representa o *locus* mais frequentemente mutado em tumores humanos e sua expressão é comumente silenciada por metilação da região promotora (KAMB, 1998; BEROUKHIM *et al.*, 2010). A deleção do gene *RB1*, que codifica para a proteína Rb, está associada com progressão irrestrita do ciclo celular, independentemente da atividade dos complexos Ciclina D-CDK4/CDK6 (OTTO & SICINSKI, 2017). Esta proteína encontra-se frequentemente mutada em retinoblastomas e em câncer de pulmão (KNUDSON, 1971; HALL & PETERS, 1996), e perda de sua função foi associada à leucemia linfóide aguda (LLA) (TSAI *et al.*, 1996). Ultimamente, um papel importante dos fatores E2F tem surgido em cânceres, com ampliações descritas em diversas malignidades (CHEN *et al.*, 2009).

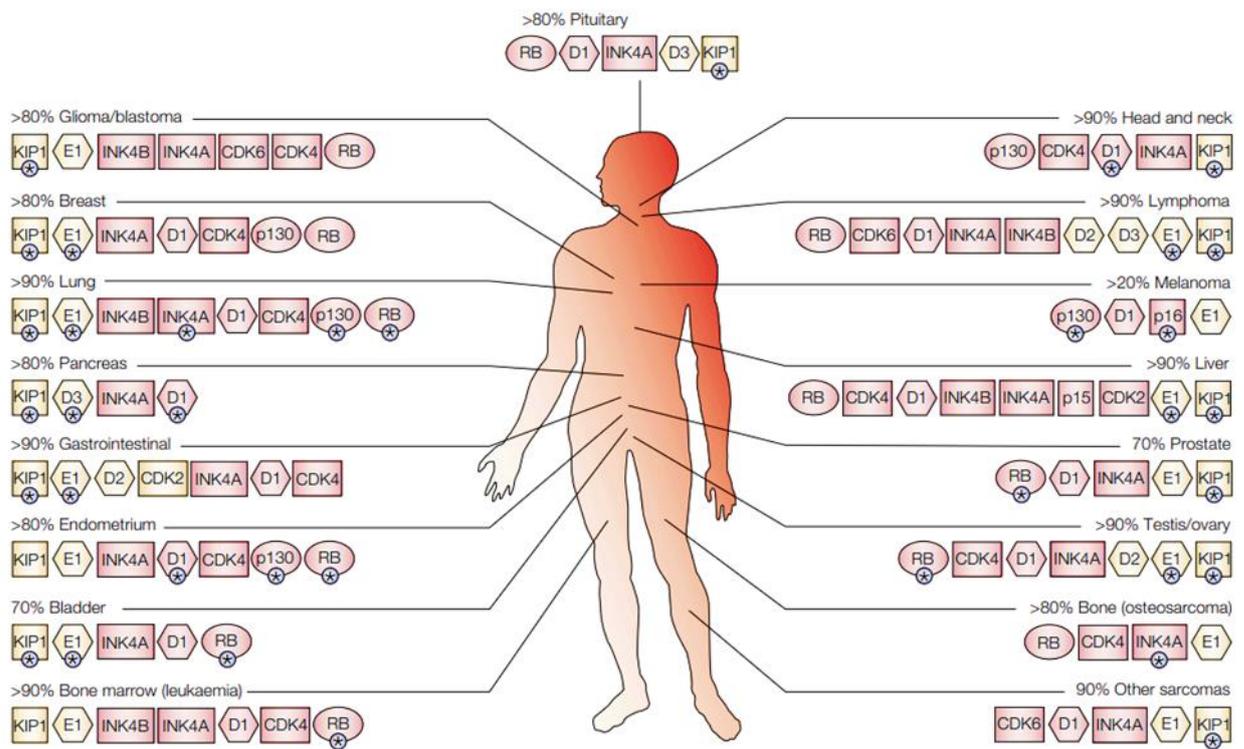


Figura 1.6. Mutações nos reguladores da transição G₁/S em tumores humanos. Foram consideradas apenas as alterações que ocorrem em mais de 10% dos tumores primários. Os números representam a porcentagem de tumores com as alterações em qualquer um dos reguladores do ciclo celular listados. Em rosa, os *loci* no qual a mutação específica ou alteração epigenética ocorreu. Em amarelo estão representadas alterações sem mecanismo de indução conhecido. Os asteriscos representam as alterações relevantes para o prognóstico do tumor (MALUMBRES & BARBACID, 2001).

O genoma de células eucariotas está sob constante ataque de agentes exógenos, como radiação ultravioleta, radiação ionizante, e químicos genotóxicos, e de agentes endógenos como espécies reativas de oxigênio. Esses agentes podem induzir danos ao DNA, e conseqüentemente, mutações pontuais até rearranjos cromossômicos, que se não corrigidos podem causar o acúmulo de alterações em diversos genes, incluindo os responsáveis pelo controle ou progressão do ciclo celular (FRIEDBERG, 2001; NIIDA e NAKANISHI, 2006). O dano ao DNA induzido em células em proliferação resulta na ativação do ponto de checagem para análise de integralidade do DNA, levando à parada do ciclo celular e o recrutamento da maquinaria de reparo. Se o dano não for reparado de forma eficiente, as células entram em senescência ou sofrem apoptose, evitando dessa forma que a informação genética incorreta seja transmitida para as células-filha (NIIDA e NAKANISHI, 2006; HOUTGRAAF *et al.*, 2006). De forma alternativa, o acúmulo de danos ao DNA pode resultar em instabilidade genômica e cromossômica, o que pode levar a um aumento na expressão de genes que promovem proliferação e diminuição na expressão de genes de controle do ciclo celular, permitindo assim, o processo de transformação celular.

1.4. A proteína IRF2BP2

A família IRF2BP (*Interferon regulatory factor 2 binding protein*) é constituída pelas proteínas IRF2BP1, IRF2BP2 e IRF2BPL (também conhecido como EAP1). As duas primeiras foram identificadas em 2003 como correpressoras transcricionais do fator de transcrição IRF-2 (*Interferon regulatory factor-2*) (CHILDS & GOODBOURN, 2003). A proteína IRF-2 é um dos membros, juntamente com IRF-1, da família de fatores de transcrição IRF, que tem um papel importante na defesa antiviral e na regulação da resposta imune e do crescimento celular (NGUYEN *et al.*, 1997). Apesar de IRF-1 e IRF-2 se ligarem as mesmas sequências alvo no DNA, elas atuam de forma antagônica, ou seja, enquanto IRF-1 age como supressora tumoral, a IRF-2 tem função oncogênica (HARADA *et al.*, 1993; KOEPEL *et al.*, 2009). Além de reprimir a transcrição de genes alvos de IRF-1, a proteína IRF-2 também promove a proliferação celular através da ativação da transcrição dos genes da Histona H4 (VAUGHAN *et al.*, 1998), Ciclina D1 (WANG *et al.*, 2007), e Ciclina B1 (XIE *et al.*, 2002) e no recrutamento das histonas acetiltransferases CBP/p300 para os

promotores alvo, resultando num aumento da atividade transcricional (MASUMI *et al.*, 1999).

As proteínas IRF2BP1/2 apresentam duas regiões altamente conservadas, um domínio *zinc finger* C4 na porção amino-terminal e um domínio RING (*Real Interesting New Gene*) C3HC4 na porção carboxi-terminal (Figura 1.7). Os domínios *zinc finger* são comumente encontrados em fatores de transcrição e frequentemente estão relacionados às interações proteína-DNA e proteína-proteína (VAQUERIZAS *et al.*, 2009). Já os domínios RING são mais frequentemente encontrados mediando interações entre proteínas (MACKAY & CROSSEY, 1998) e em E3 ubiquitina ligases. A função destes domínios na proteína IRF2BP2 não é inteiramente conhecida, porém é através do domínio RING que ela interage com o fator IRF-2 (CHILDS & GOODBOURN, 2003). Entre esses domínios, existe uma região, conservada entre os membros da família, formada pelos resíduos de arginina e lisina (RKRK), onde se encontra o sinal de localização nuclear (*do inglês, nuclear localization signal*; NLS) da proteína (Figura 1.5) (CARNEIRO *et al.*, 2011; TENG *et al.*, 2011).

Estruturalmente, o gene que codifica para a proteína IRF2BP2 em humanos está localizado no braço longo do cromossomo 1 na posição 1q42.3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/359948>) e é codificado por dois éxons e produz três isoformas proteicas através de *splicing* alternativo: A (587 aas), B (571 aas) e C (163 aas). As isoformas A e B diferem entre si em apenas 16 resíduos de aminoácidos, codificados pela porção terminal do primeiro éxon. Já a isoforma C não possui o domínio *zinc finger* presente na região N-terminal da proteína (TENG *et al.*, 2011) e sua função ainda não é conhecida. O mRNA da IRF2BP2 apresenta uma longa região 3'UTR (*untranslated region*). Apesar de não ter sido demonstrado que essa região é regulada traducionalmente, um trabalho realizado por ARRUDA e colaboradores (2015), sugere que, possivelmente, a síntese da proteína IRF2BP2 pode ser regulada pela ligação do miR-155 nessa região.

A proteína IRF2BP2 é observada em diferentes organismos, desde animais muito simples, como as larvas do parasita *Fopius* até animais mais complexos, como os seres humanos, indicando um possível papel desse cofator transcricional em diferentes vias de sinalização celular (RAMALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2019). A proteína IRF2BP2 é expressa de forma ubiquitária, sendo encontrada em diferentes tecidos normais e tumorais, através de análises de transcriptoma e proteoma (FAGERBERG *et al.*, 2014; www.proteinatlas.org/ENSG00000168264) Porém, um estudo mostrou que após o desenvolvimento embrionário murino, os níveis dessa proteína decrescem

de forma geral, se mantendo alto apenas em alguns tecidos, como o pulmão, coração e tecido muscular (TENG *et al.*, 2010).

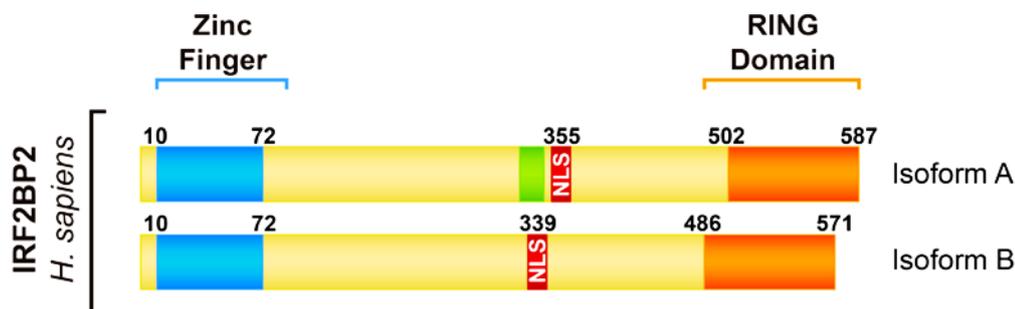


Figura 1.7. Representação esquemática das isoformas A e B da proteína IRF2BP2. Estão representados no esquema o domínio *zinc finger* (em azul), o domínio *RING finger* (em laranja) e o domínio de localização nuclear (NLS) (em vermelho) (RAMALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2019).

1.4.1. Função da proteína IRF2BP2

Recentemente, a proteína IRF2BP2 tem sido sugerida como um importante cofator transcricional em diferentes sistemas biológicos, agindo como um regulador positivo e negativo da expressão de genes relacionados com a diferenciação celular, ciclo celular, apoptose, angiogênese, inflamação e resposta imune, contribuindo para a homeostasia celular fisiológica (Figura 1.8). Apesar ter sido identificada como parceira transcricional do fator IRF-2, a proteína IRF2BP2 também é observada em organismos ausentes para esse fator de transcrição, mostrando que essa proteína apresenta funções independentes de IFR-2, através da interação com outros parceiros envolvidos na regulação transcricional (CHILDS & GOODBOURN, 2003; RAMALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2019) (Tabela 1.1).

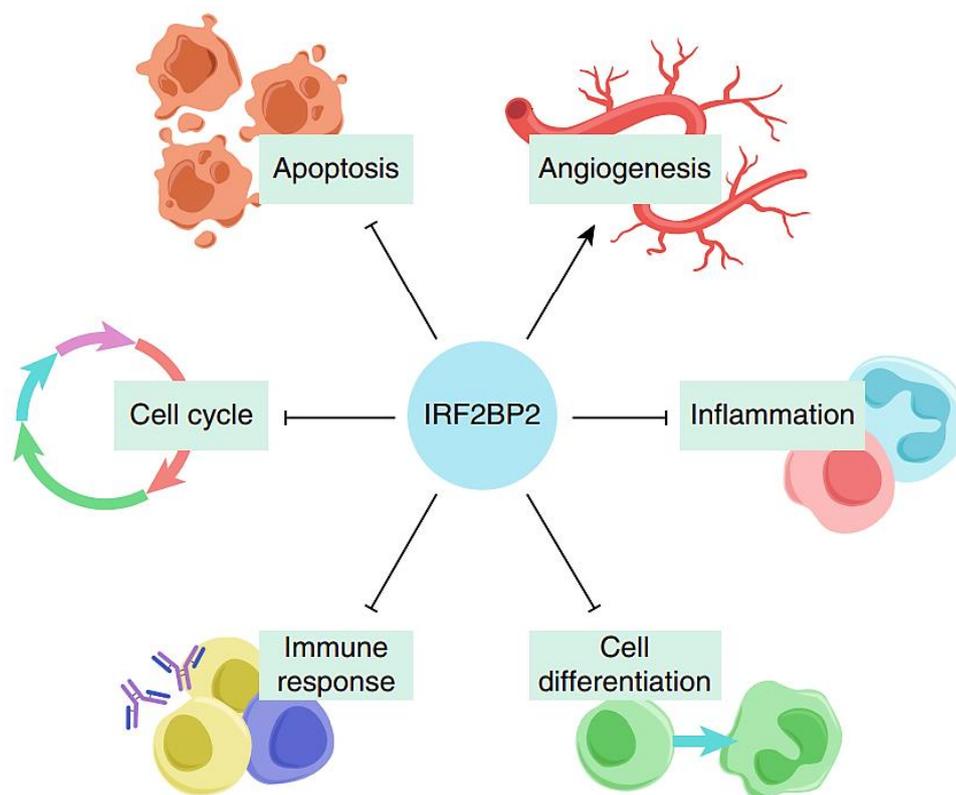


Figura 1.8. Diferentes sistemas biológicos regulados pela proteína IRF2BP2. A proteína IRF2BP2 está envolvida na regulação da expressão de genes envolvidos em diferentes vias celulares, como diferenciação celular, ciclo celular, angiogênese, resposta imune, inflamação e apoptose (RAMALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Tabela 1.1. Parceiros de interação da proteína IRF2BP2. Adaptado de RAMALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2019.

Parceiro de interação	Domínio de interação na proteína IRF2BP2	Referências
IFR-2	Ring	CHILDS & GOODBOURN, 2003
NFAT1	Ring	HARI <i>et al.</i> , 2017
NRIF3	Ring	FAGERBERG <i>et al.</i> , 2014
IFR2BPL	C4 zinc finger	YEUNG <i>et al.</i> , 2012
ETO2	Ring	STADHOUDERS <i>et al.</i> , 2015
NCOR1	-	STADHOUDERS <i>et al.</i> , 2015
VGLL4	Ring	TENG <i>et al.</i> , 2010; WU <i>et al.</i> , 2019

Além de sua habilidade repressora associada a IRF-2 (CHILDS & GOODBOURN, 2003), a IRF2BP2 foi identificada como alvo direto da proteína p53. Neste estudo, foi mostrado que em situações de estresse genotóxico, induzido por Actinomomicina D, p53 se liga a um sítio *upstream* ao promotor de *IRF2BP2* e ativa sua expressão. Consequentemente, a proteína IRF2BP2 reprime a transativação mediada por p53 dos promotores de *CDKN1A* (que codifica para a proteína p21^{Cip1/Waf1}) e do gene pró-apoptótico *BAX*, favorecendo um arresto de ciclo celular em relação à apoptose em células de osteosarcoma U2OS, o que segundo os autores poderia fazer parte de um mecanismo que favoreceria o reparo do DNA evitando assim a morte dessas células (KOEPEL *et al.*, 2009). Ainda em relação à morte, a IRF2BP2A foi pescada num ensaio de duplo-híbrido de levedura, interagindo com NRIF3 (*Nuclear interacting factor 3*), que é um fator pró-apoptótico para células de câncer de mama. Nesse estudo foi mostrado, através do ensaio de TUNEL para observar fragmentação de DNA, que a isoforma A da proteína IRF2BP2 impede a morte celular mediada por NRIF3, aparentemente via ação SirT1, uma HDAC de classe III, em diferentes linhagens de câncer de mama (TINNIKOV *et al.*, 2009). Em 2011, o mesmo grupo mostrou que a IRF2BP2A executa essa função através da repressão do gene pró-apoptótico *FASTKD2* (*Fas-activated serine-threonine kinase domain 2*). Através de ensaios de imunoprecipitação de cromatina e espectrometria de massa, a proteína IRF2BP2A foi identificada como um dos membros de um grande complexo proteico formado também pelas proteínas IRF2BP1 e EAP1 (*Enhanced and puberty 1*). Essas proteínas interagem através de seus domínios *zinc finger* C4 e se ligam ao DNA próximo à região de transcrição do gene *FASTKD2*, reprimindo sua transativação, e dessa forma modulando de forma seletiva a sobrevivência celular (YEUNG *et al.*, 2011). Ainda em 2011, o NLS da IRF2BP2 foi identificado paralelamente pelo nosso grupo (CARNEIRO *et al.*, 2011) e por TENG *et al.* (2011). Esse sinal, RKRK (R= arginina, K= lisina), está localizado na região central da proteína, (resíduos 355-358 em relação à isoforma A e 339-342 em relação à isoforma B). TENG e colaboradores (2011) também mostraram que adjacente ao NLS existe uma serina que precisa ser fosforilada para que a IRF2BP2 possa se localizar no núcleo.

Um trabalho realizado pelo nosso grupo (CARNEIRO *et al.*, 2011) identificou, através de um ensaio de duplo-híbrido de levedura, a proteína IRF2BP2 como parceira do fator de transcrição NFAT1 (*Nuclear factor of activated T cell*). Neste estudo, utilizando células T CD4 da linhagem Jurkat e de linfócitos primários, foi mostrado que a IRF2BP2 interage com o domínio C-terminal do NFAT1 e reprime a transativação

mediada por ele dos promotores dos genes codificadores das citocinas IL-2 e IL-4. Além disso, foi observado que a deleção da região N-terminal da IRF2BP2 abole seu fenótipo repressor, embora a interação com o NFAT1 ainda se mantenha, indicando que o domínio *zinc finger* dessa proteína é necessário para sua função repressora. Um outro trabalho também desenvolvido pelo nosso grupo demonstrou que a superexpressão ectópica de IRF2BP2 em linfócitos primários T CD4 leva a uma diminuição da proliferação celular após sua ativação e uma redução da expressão de moléculas marcadoras de ativação CD25 e CD69 *in vitro*. Além disso, células T CD4 superexpressando IRF2BP2 foram transferidas para camundongos recipientes C57/BL6, irradiados subletalmente, para observar sua expansão *in vivo*. Como resultado, foi observado que os linfócitos transduzidos com IRF2BP2 apresentaram uma reduzida expansão celular, mostrando que essa proteína têm um efeito negativo na sobrevivência dessas células (SECCA *et al.*, 2016).

A atividade repressora de IRF2BP2 também foi descrita durante o desenvolvimento hematopoiético (STADHOUDERS *et al.*, 2015). A partir de dados de proteoma e ensaio repórter de luciferase, foi mostrado que a proteína IRF2BP2 interage com o fator de transcrição ETO2 (*Eight-twenty-one 2*) e favorece sua atividade repressora em células progenitoras eritróides. IRF2BP2 é um dos componentes do complexo proteico responsável pela manutenção da expressão de genes importantes para o processo de eritropoiese. A relevância funcional da atividade repressora de IRF2BP2 foi confirmada *in vivo*. Foi observado que camundongos homozigotos deficientes para a proteína apresentam fenótipo letal, morrendo durante a gestação ou nas primeiras semanas de vida devido a um severo retardo no crescimento. Além disso, foi visto, através da análise de dados de RNA-seq, que os genes alvo de IRF2BP2 participam de diferentes vias biológicas, principalmente aquelas relacionadas com a proliferação, apoptose e ciclo celular.

Além do seu papel na repressão transcricional, alguns estudos têm mostrado que a IRF2BP2 também apresenta função ativadora. Um estudo realizado CHEN e colaboradores (2015) demonstrou a participação da IRF2BP2 na polarização de macrófagos. Neste trabalho, foi visto que a superexpressão de IRF2BP2 está envolvida com a diferenciação de macrófagos de estágio M2 através da regulação da expressão do fator anti-inflamatório KLF2 (*Krüppel-like factor 2*). Além disso, foi observado que camundongos apresentando macrófagos deficientes para IRF2BP2 desenvolviam uma severa aterosclerose. Em um trabalho mais recente do mesmo grupo, foi observado que a perda de IRF2BP2 na micróglia está associada com um

aumento da expressão de citocinas inflamatórias. Neste estudo foi visto que a IRF2BP2 é necessária para mediar os efeitos anti-inflamatórios e protetivos da citocina IFN-beta na lesão gerada pelo acidente vascular cerebral (CRUZ *et al.*, 2017). A IRF2BP2 também foi descrita como um co-regulador essencial para a ativação de VEGFA (*Vascular endothelial growth factor A*), uma citocina importante para a revascularização muscular. Através de um ensaio de duplo-híbrido de levedura e utilizando uma biblioteca de cDNAs de coração humano, a proteína IRF2BP2 foi identificada como parceira de interação do fator VGLL4 (*Vestigial Like Family Member 4*). Neste trabalho foi observado que a IRF2BP2 participa de um complexo transcricional, também formado pelas proteínas TEAD4/VGLL4, e age em resposta a isquemia muscular esquelética e cardíaca, tendo um papel importante na regulação da angiogênese tecidual (TENG *et al.*, 2010).

O aparente envolvimento da IRF2BP2 com mecanismos de regulação de angiogênese, proliferação e morte celular citados pelos trabalhos acima sugerem que alterações na função dessa proteína podem estar envolvidas com a fisiopatologia do câncer. Alguns trabalhos têm mostrado a associação da expressão de IRF2BP2 em tumores hematopoiéticos e sólidos. Em 2012 (NYQUIST *et al.*, 2012) um estudo identificou uma translocação envolvendo os genes IRF2BP2 e CDX1 (*Caudal type homeobox 1*) em um paciente com condrosarcoma mesenquimal. Essa translocação gera uma proteína híbrida caracterizada pela presença do éxon 1 de *IRF2BP2* e o éxon 2 do gene *CDX1*, que codificam para os domínios *zinc finger* e *homeodomínio* de suas respectivas proteínas. A função biológica dessa proteína ainda não é conhecida. Ainda em 2012, um outro estudo avaliando a citogenética de pacientes com mieloma múltiplo, identificou o ganho de função para o gene da IRF2BP2 em seis pacientes positivos para a translocação BCL1/JH (11;14), encontrada em 20% de todos os casos de mieloma múltiplo sendo importante para os estágios iniciais da patogênese desse tipo tumoral (NI *et al.*, 2012). O perfil mutacional de pacientes com linfoma primário de sistema nervoso central foi avaliado em um estudo feito por BRUNO e colaboradores (2014). Neste trabalho foi realizado um sequenciamento do exoma de 9 casos e foi observado que 14% dos pacientes com esse tipo tumoral apresentavam mutações do tipo *nonsense* e *missense* para o gene da IRF2BP2. A relevância biológica dessas variantes não foi avaliada.

Três estudos descreveram a associação da IRF2BP2 ao desenvolvimento da leucemia promielocítica aguda (APL) (YIN *et al.*, 2015; SHIMOMURA *et al.*, 2016; JOVANOVIC *et al.*, 2016). Em ambos os estudos, foi identificada uma fusão

envolvendo os genes *IRF2BP2* e *RARA* (*Retinoic acid receptor alfa*), através de diferentes pontos de quebra. De acordo com YIN e colaboradores (2015), a proteína híbrida IRF2BP2-RARA poderia ter um efeito dominante negativo sobre a proteína RARA selvagem, o que implicaria com a repressão de genes envolvidos com a diferenciação mieloide. Além disso, essa fusão torna o paciente insensível a monoterapia com ATRA (*all-trans retinoic acid*) (SHIMOMURA *et al.*, 2016) e é capaz de transformar células progenitoras hematopoiéticas, o que foi observado através da indução da formação de colônias *in vitro* (JOVANOVIC *et al.*, 2016).

Apesar de alguns trabalhos mostrarem a associação de IRF2BP2 na regulação do ciclo celular e na patologia tumoral, os mecanismos envolvidos na relação entre a expressão de IRF2BP2 e a malignização celular ainda não são completamente conhecidos, sendo de grande interesse entender como ela influencia a transcrição de genes importantes para a proliferação celular e conseqüentemente, para o desenvolvimento tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Esclarecer o papel da proteína IRF2BP2 no controle do ciclo celular, assim como na transformação celular, avaliando sua capacidade de transformação *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o papel da proteína IRF2BP2 no controle das diferentes fases do ciclo celular;
- Determinar o envolvimento da IRF2BP2 na regulação de fenótipos de transformação celular *in vitro* e *in vivo*;
- Avaliar o envolvimento da IRF2BP2 na regulação da expressão de genes importantes na proliferação celular, em especial, genes envolvidos com a progressão das fases G₁/S do ciclo celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

As células das linhagens NIH3T3, NIH3T3-TetR-BP2, NIH3T3-TetR-BP2.H-rasV12 e EcoPack2 foram cultivadas em meio DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado tanto com 10% ou 0,2% de soro fetal bovino (SFB), NaHCO₃ (40 mM), NaH₂PO₄ (1 mM), piruvato de sódio (1 mM), solução de vitaminas MEM 1x, solução de aminoácidos MEM essenciais e não-essenciais 1x, L-glutamina (2 mM), β-mercaptoetanol (55 μM), HEPES (10 mM), estreptomicina (100 mg/L) e penicilina (100.000 U/L) (todos Gibco). As culturas de NIH3T3-TetR-BP2 e NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram mantidas sob pressão seletiva dos antibióticos puromicina (15 μg/ml) e neomicina (500 μg/ml), respectivamente, com o intuito de preservar a expressão dos genes IRF2BP2 e H-rasV12, exceto quando utilizadas em experimentos. Todas as culturas foram cultivadas em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c nude/nude entre 8 e 12 semanas de idade, obtidos do biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA). Os animais foram mantidos conforme as normas estabelecidas pelo “*Guide for the care and use of laboratory animals*” (NIH, *National Institute of Health*). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do INCA (Processo Nº 004/13).

3.3. Construção dos plasmídeos

O cDNA do repressor responsivo a doxiciclina/tetraciclina (TetR) foi obtido através de amplificação por PCR a partir do vetor pLENTI-CMV-TetR-Blast (Addgene: #17492) (CAMPEAU *et al.*, 2009). O vetor pQCXIH-TetR foi construído pela subclonagem do cDNA do TetR para o vetor pQCXIH (Clontech), utilizando as enzimas de restrição *NotI* e *BglII* (ligando com o sítio da enzima *BamHI* no vetor). O cDNA da IRF2BP2 murina (570 aa) foi subclonado no vetor de entrada pENTR1A no ccDB (Addgene: #17398) a partir do vetor pMSCV-IRIS-Ds-RED-IRF2BP2. Foram

utilizados os sítios de restrição *BamHI-HF* e *XhoI*. O plasmídeo gerado foi posteriormente recombinado com o vetor pQCXP-CMV/TO DEST (Addgene: #17386) utilizando a enzima LR Clonase TM II (Thermo Fisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. O cDNA de H-rasV12 foi obtido do plasmídeo de expressão pBabe-puro, e subclonado no vetor pQCXIN (BD: #53143) utilizando sítios de restrição *BamHI-HF* e *EcoRI*, gerando por fim o vetor pQCXIN-H-rasV12. Todas as construções foram confirmadas por mapeamento com enzimas de restrição e sequenciamento de DNA.

3.4. Transdução de células NIH3T3 com retrovírus recombinantes

A linhagem NIH3T3 foi transduzida, primeiramente, com o vetor pQCXIH-TetR para garantir a expressão da proteína TetR. Logo após a seleção, a linhagem foi transduzida pela segunda vez com o vetor pQCXP-CMV/TO-IFR2BP2 e posteriormente, com o vetor pQCXIN-H-rasV12. As linhagens geradas só expressam o gene IRF2BP2 quando estimuladas com doxiciclina (1 µg/ml) ou outros análogos da tetraciclina.

A linhagem celular EcoPack2 ecotrópica (BD Biosciences) foi utilizada como célula empacotadora dos retrovírus. As células foram transfectadas com o plasmídeo retroviral de forma transiente por fosfato de cálcio segundo o protocolo descrito abaixo.

No primeiro dia, as células empacotadoras foram cultivadas em placas de Petri tratadas de 10 cm de diâmetro no total de 4×10^6 células/placa em 10 mL de meio de cultura. No dia seguinte, estas células foram transfectadas utilizando o DNA dos vetores retrovirais purificados por colunas de Maxi-Prep (QIAGEN). A precipitação do DNA foi feita misturando-se: 20 µg de DNA; 250 µL de tampão salino de Hank 2x (HBS; 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES, pH 7,1); 50 µL de CaCl₂ 2,5 M; em um volume final de 500 µL. Essa mistura foi homogeneizada avidamente por borbulhamento e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, o precipitado (500 µL) foi adicionado às células empacotadoras. No terceiro dia, as células empacotadoras transfectadas foram lavadas duas vezes com PBS (*do inglês, phosphate buffered saline*) e foram adicionados 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone). Neste mesmo dia, as células NIH3T3 foram cultivadas em placas

de 6 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço). No quarto dia, os sobrenadantes das células empacotadoras contendo os retrovírus recombinantes foram recolhidos e filtrados em filtro de poro $0,45 \mu\text{m}$ para retirar eventuais células soltas e fragmentos celulares. O sobrenadante contendo as partículas virais foi suplementado com $8 \mu\text{g/ml}$ de polibreno (*Fluka Chemie*). Em seguida, o sobrenadante foi adicionado junto com meio DMEM novo suplementado com 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone) (1:1; v/v) às células alvo, que foram então centrifugadas duas vezes a 400G por 45 minutos, com intervalo de 90 minutos entre as centrifugações e deixadas na estufa por 24 horas. No dia seguinte, as células foram soltas por tripsinização e plaqueadas em garrafa de 25 cm^2 (3×10^4 células), contendo meio DMEM 10% SFB na presença do antibiótico de seleção. A linhagem NIH3T3 foi selecionada por 10 dias com $800 \mu\text{g/ml}$ de higromicina para o vetor pQCXIH-TetR, ou por 3 dias com $30 \mu\text{g/ml}$ de puomicina para o vetor pQCXP-CMV/TO-IRF2BP2 ou por 11 dias com 1 mg/ml de neomicina para o vetor pQCXIN-H-rasV12.

3.5. Sincronização celular nas fases G_0/G_1 do ciclo celular

Células NIH3T3-TetR-BP2 foram sincronizadas incubando-se $7,5 \times 10^5$ células em garrafas de cultura de 75 cm^2 e cultivando-as por 48 horas até atingirem 90% de confluência. Células ainda em confluência foram lavadas com PBS e então mantidas em privação de soro, cultivando-as em meio DMEM suplementado com 0,2% de SFB por 24 horas.

3.6. Sincronização celular nas fases G_2/M do ciclo celular

Células NIH3T3-TetR-BP2, sincronizadas ou não em G_0/G_1 por confluência e privação de soro, foram plaqueadas na densidade de 4×10^5 células em garrafas de cultura de 75 cm^2 na presença de meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 12 horas. Posteriormente, as células foram incubadas com Nocodazol (100 ng/ml), um inibidor de microtúbulos, por 6, 12 e 18 horas. Após incubação, as células foram lavadas com solução BSA (*do inglês, bovine serum albumin*) 1% e incubadas a 4°C por 16 horas no escuro com solução de marcação com iodeto de propídio (iodeto de propídio, 1 mg/mL ; solução de RNase: NaCl 5M, Tris 1M, RNase 2 mg/mL ; 1X PBS pH 7,2 0,1% Triton X-100). Após marcação, as células foram analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Bioscience).

3.7. Cinética de proliferação celular

Células NIH3T3-TetR-BP2 ou NIH3T-TetR-BP2-H-rasV12 foram cultivadas em placas de 96 poços, 8×10^2 células por poço, em triplicata na ausência ou presença de 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina. Em diferentes tempos após a infecção retroviral a proliferação celular foi avaliada por marcação por cristal violeta. Para isto, as células foram lavadas com PBS, fixadas com etanol absoluto por 10 minutos, coradas com 0,05% de cristal violeta em 20% de etanol por 10 minutos e lavadas 2x com água destilada, posteriormente, o cristal violeta foi ressolubilizado com metanol absoluto por 5 minutos. A absorbância da placa foi acessada no comprimento de onda de 595nm em um espectrofotômetro (SpectraMax 190). O primeiro ponto foi retirado 2 horas após o início da cultura (tempo 0h) e os demais a cada 24 horas.

3.8. Western blotting

As células NIH3T3-TetR-BP2 ou NIH3T-TetR-BP2-H-rasV12 (4×10^5 células) foram centrifugadas, ressuspendidas e lisadas em 40 μL de tampão contendo 40 mM de Tris-Cl pH 7,5, 10 mM de EDTA, 60 mM de pirofosfato de sódio e 5% de SDS. Os extratos proteicos foram incubados a 100°C por 10 minutos e adicionados a 4 μL de 5x loading buffer (350 mM Tris-Cl, Glicerol 10%, Azul de Bromofenol 0,01%, SDS 15%, β -Mercaptoetanol 25%, pH6,8). Posteriormente, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 8% ou 10% (30% bis-acrilamida (1:29) e tampão de separação 4x pH 8,8) a 25 mA por aproximadamente 4 horas. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) utilizando o sistema de transferência *Trans-Blot Semi-Dry electrophoretic transfer cell* (BioRad) seguindo o protocolo do fabricante. Após o processo de transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão Tris salina (TBS; 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,4) com 5% de leite desnatado por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram lavada com TBS-T (TBS mais 0,05% Tween 20) e incubada nesse mesmo tampão *overnight* a 4°C com o anticorpo primário (IFR2BP2, anticorpo monoclonal L-13 (Santa Cruz); H-rasV12, anticorpo monoclonal F132 (Santa Cruz); GAPDH, anticorpo monoclonal 6C5 (Santa Cruz) e anticorpo policlonal anti-Rb (851) (WELCH & WANG, 1993)). Após incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por 10 minutos e

incubadas por mais 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ou camundongo, ambos conjugados à peroxidase de raiz forte (HRP). Em seguida, as membranas foram lavadas seis vezes com TBS-T por 10 minutos e reveladas com o substrato da peroxidase utilizando o sistema “*ECL Western blotting reagent*” (GE Healthcare), como recomendado pelo fabricante. A luminescência emitida foi detectada em filmes de quimioluminescência (Kodak BioMax Light Film, Kodak) em diferentes tempos de exposição.

3.9. Análise de ciclo celular por incorporação de BrdU

Células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de 4×10^5 células em garrafa de 75 cm², sendo mantidas em cultura com meio suplementado com 10% soro até adesão (0h) ou até os tempos indicados. Uma hora (1h) antes da fixação, as células foram pulsadas com 2 µM de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina; Sigma, B5002) em meio DMEM com 10% de soro a 37°C, recuperadas, fixadas em etanol gelado 100% e armazenadas a -20°C por pelo menos 24 horas. Após esse período, $4,5 \times 10^5$ células foram lavadas em solução de albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS e incubadas em solução desnaturante (2N HCl; 0,5% Triton X-100) por 30 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução 0,1 M Borax, para inativar a reação, lavadas novamente com BSA 1%, e incubadas durante 1h a temperatura ambiente no escuro com o anticorpo monoclonal anti-BrdU (*Phoenix Flow Systems*, ABFM18) conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína), com diluição de 1:15 em solução de BSA 1% e Tween-20 0,5% em PBS. Após incubação, as células foram lavadas com solução BSA 1% e incubadas a 4°C por 16 horas no escuro com solução de marcação com iodeto de propídio. Após marcação, as células foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur e o software CellQuest (BD Biosciences).

3.10. Análise de morte celular por marcação com iodeto de propídio

Para análise de morte celular, as células NIH3T3-TetR-BP2 ou NIH3T-TetR-BP2-H-rasV12 foram cultivadas em placas de 12 poços, em confluência, totalizando 1×10^5 células por poço. Nos tempos indicados, as células foram tripsinizadas, lavadas uma vez com PBS e marcadas com iodeto de propídio ($75 \mu\text{M}$) na presença de NP-40. A análise do conteúdo de DNA foi realizada coletando 20.000 eventos por citometria de fluxo. Os dados foram analisados e o percentual de células com marcação sub- G_0 foi determinado utilizando os programas CELLQuest (BD Biosciences) e FlowJo (Tree Star Inc).

3.11. Análise de morte celular por marcação com Anexina V

Células NIH3T-TetR-BP2-H-rasV12 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 (2×10^5 células) na presença ou ausência de doxiciclina ($1 \mu\text{g/ml}$) por 24, 48 e 72 horas. Posteriormente, as células foram coletadas, centrifugadas, lavadas com PBS e incubadas com solução BSA 2% por 30 minutos. Após a incubação, as células foram ressuspensas em tampão de ligação de Anexina V, marcadas com Anexina V-APC (eBiosciences) e 7-AAD (BD Biosciences) e analisadas por citometria de fluxo. Para análise, foram coletados 10000 eventos.

3.12. Ensaio clonogênico

Células NIH3T3-TetR-BP2 ou NIH3T-TetR-BP2-H-rasV12 foram cultivadas em diferentes densidades (50, 100 e 200 células por poço) em placas de 6 poços por 7 e 14 dias com meio DMEM 10% SFB, sendo este trocado por meio novo a cada três dias. Nos tempos indicados, as placas foram lavadas com PBS e fixadas com etanol 100%. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 1 ml de solução de cristal violeta (0,05% de cristal violeta em 20% de etanol), por mais 10 minutos. Posteriormente, as placas foram lavadas 2x com água destilada e, após a secagem dos poços, as placas foram escaneadas.

3.13. Ensaio de formação de focos

Células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram diluídas (1:100, 1:250 e 1:500) com células NIH3T3 selvagens não-transduzidas (WT) para facilitar a visualização dos focos de transformação. Essa mistura foi cultivada em placas de 6 poços a uma densidade final de 5×10^4 células/poço. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após 10 dias, para a visualização dos focos, as placas foram lavadas com PBS, fixadas com etanol 100% por 10 minutos e coradas com cristal violeta por 10 minutos e lavadas com água destilada. Por fim, as placas foram escaneadas.

3.14. Ensaio de crescimento independente de ancoragem em meio semissólido

Placas de seis poços foram forradas com 2 ml de meio suplementado com 0,8% de agarose de baixo ponto de fusão (Invitrogen) para evitar adesão celular ao fundo do poço. Células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram tripsinizadas e 10^3 células foram ressuspensas em 3 mL de meio de cultura contendo 0,4% de agarose e, após a solidificação, foram adicionados 2 mL de meio de cultura, que foram trocados a cada 3 dias. As células foram cultivadas por 14 dias. Colônias representativas foram visualizadas por microscopia de contraste de fase e o número total de colônias foi contado.

3.15. Formação de tumores em camundongos atímicos

Camundongos atímicos BALB/c nude/nude de 8 a 12 semanas foram inoculados com células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12. Essas células foram tripsinizadas, lavadas e ressuspensas em PBS. As inoculações foram feitas através da injeção subcutânea de 3×10^5 células no flanco direito de cada animal. Foram utilizados 2 grupos com 6 animais cada (um grupo controle, que recebia água sem tetraciclina dissolvida e um grupo tratado, que recebia água com tetraciclina dissolvida (500 mg em 250 ml de água). A água com tetraciclina dissolvida começou a ser administrada 2 dias antes do início do experimento e foi trocada a cada três dias. O volume tumoral foi avaliado a cada três dias usando a fórmula: $V = 0,52 \times$

comprimento² x largura. Os camundongos foram sacrificados 13 dias após a inoculação.

3.16. Análises de dados de RNA-Seq

Dados de RNA-Seq de 343 amostras de fibroblastos humanos imortalizados foram obtidos a partir do banco de dados GTEx (Genome-Tissue Expression) (GTEx-CONSORTIUM, 2013). Foram obtidas as matrizes contendo os dados das contagens brutas e os valores de expressão quantificados por TPM (*transcripts per million* - transcritos por milhão). As 86 amostras com valor de expressão de IRF2BP2 menor ou igual ao primeiro quartil foram classificadas como IRF2BP2^{low} e as 86 amostras com valor maior ou igual ao terceiro quartil foram classificadas como IRF2BP2^{high}.

Foi comparada a expressão de cerca de 24 mil genes entre os grupos IRF2BP2^{high} e IRF2BP2^{low} utilizando o pacote DESeq2 (LOVE *et al.*, 2012). Os genes diferencialmente expressos entre os grupos foram utilizados para a análise de enriquecimento de vias de sinalização utilizando o pacote ClusterProfiler (YU *et al.*, 2012). As análises de expressão por heatmap e formação de clusters foram feitas utilizando o pacote Pheatmap, enquanto o esquema da via de ciclo celular foi gerado através do pacote Pathview (LUO *et al.*, 2013). Todas as análises foram realizadas utilizando o software R.

3.17. Extração de RNA e síntese de cDNA

Células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de 7×10^5 células por placa de 10 cm após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Após os tempos indicados, foi feita a extração de RNA de 10^6 células utilizando 1 ml do reagente Trizol[®] (Invitrogen). Células foram homogeneizadas em Trizol[®], e centrifugadas à 12000 g por 15 minutos à 4°C após adição de 200 µl de clorofórmio. A fase superior foi separada e misturada com a mesma medida de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após nova centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado com 500 µl de isopropanol. Após incubação por 15 minutos, foi feita uma centrifugação de 12000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 75%. Após nova centrifugação de 7600 g por 10 minutos, o pellet foi secado e ressuspenso em 15 µl de água RNase free. A quantidade e

qualidade do RNA foram determinadas por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). A síntese da fita de cDNA foi feita a partir de 2 µg de RNA extraído utilizando a Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen), conforme indicado pelo fabricante.

3.18. PCR em tempo real

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizada para avaliar a expressão relativa dos genes das ciclinas D1, D2, E1 e E2. O gene constitutivo hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*HPRT*) foi utilizado como controle endógeno para normalização. Foram utilizadas para estas reações sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram feitas em triplicata para cada gene, utilizando 50 ng de cada um dos diferentes cDNAs, 0,75 µl da respectiva sonda e 7,5 µl de tampão universal PCR Mastermix TaqMan®, em um volume final de 15 µl. O tampão utilizado na reação contém o par de *primers* para a amplificação do cDNA e um oligonucleotídeo que parecia internamente à região amplificada, marcado com o fluorocromo FAM na sua extremidade 5' e com TAMRA na extremidade 3'. As condições para a reação de PCR foram as seguintes: 40 ciclos de 95°C por 10 minutos, seguidos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e leitura da placa. A análise de quantificação relativa foi feita utilizando a função exponencial $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo o tempo de 0h o tempo de referência. Os números de identificação de cada sonda utilizada são os seguintes: Mm00432359_m1 para Ciclina D1, MM00438071 para Ciclina D2, Mn01266311_m1 para Ciclina E1, Mn00438077_m1 para Ciclina E2, e Mm00446968_m1 para HPRT.

3.19. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através da comparação entre os grupos por teste *t* de *Student* não-pareado, com um intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa *GraphPad Prism*. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi menor ou igual a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos níveis proteicos de IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR-BP2 não sincronizadas

Para avaliar os níveis proteicos de IRF2BP2 ao longo do tempo e com diferentes doses de doxiciclina, células NIH3T3-TetR foram transduzidas com vetor retroviral pQCXP-CMV/TO-IFR2BP2, conforme descrito anteriormente, afim de superexpressar, de forma ectópica, a proteína. Estas células foram cultivadas em meio DMEM 10% SFB por diferentes tempos, na ausência ou presença de 1 µg/ml de doxiciclina, que foi adicionada ao meio 2 horas após o início da cultura (tempo 0h) (Figura 4.1A) ou cultivadas com meio DMEM 10% SFB acrescido de diferentes doses de doxiciclina por 24 horas (Figura 4.1B). Nos tempos indicados, os extratos proteicos foram obtidos e avaliados por *Western blot*.

A análise dos resultados indicou que os níveis proteicos de IRF2BP2 atingem um pico de síntese por volta de 24 horas após a adição de doxiciclina (Figura 4.1A), porém é possível observar níveis significativos da proteína 3 horas após o início do experimento. Os níveis de IRF2BP2 se mantêm constantes até 72 horas após a adição de doxiciclina. (Figura 4.1A). Também foi possível observar que a não adição de doxiciclina no meio de cultura não induz níveis da proteína, indicando que o sistema utilizado (Tet-ON) para controlar superexpressão da IRF2BP2 foi eficiente. Além disso, não houve diferença nos níveis proteicos quando adicionadas diferentes concentrações de doxiciclina no meio de cultura (Figura 4.1B). Portanto, para todos os outros experimentos, foi utilizada a dose de 1 µg/ml de doxiciclina.

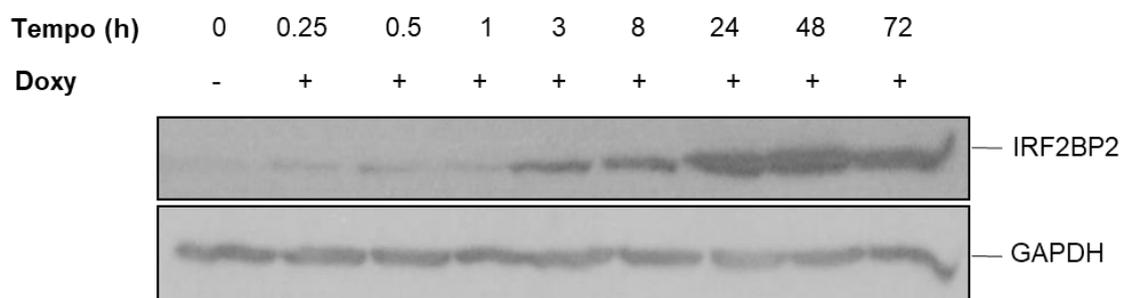
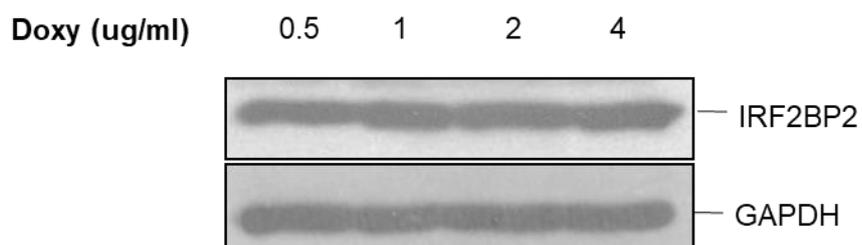
A**B**

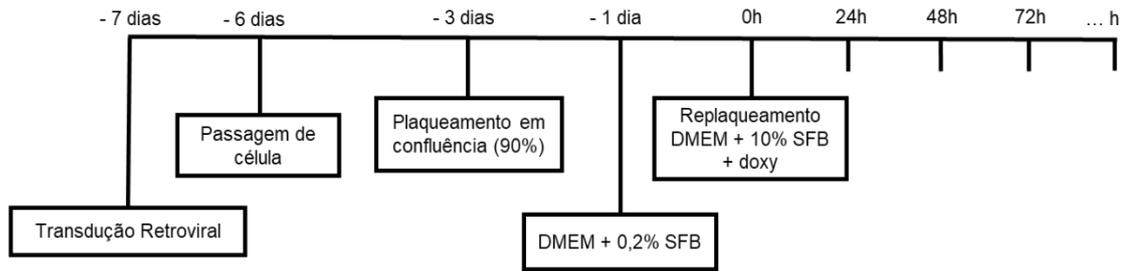
Figura 4.1. Níveis proteicos de IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR não sincronizadas atingem um pico de síntese 24 horas após a adição de 1 $\mu\text{g/ml}$ doxiciclina no meio de cultura. A) Análise por *Western blot* dos níveis de IRF2BP2 entre 0-72 horas após replaqueamento, na ausência ou presença de 1 $\mu\text{g/ml}$ doxiciclina (Doxy) no meio de cultura. B) Análise por *Western blot* dos níveis de IRF2BP2 em 24 horas após o replaqueamento na presença de diferentes concentrações de doxiciclina. Os extratos proteicos foram obtidos com tampão de lise e separados em gel SDS-PAGE a 10%. Os níveis de IRF2BP2 (61 kDa) foram normalizados através dos níveis de GAPDH (37 kDa).

4.2. Avaliação da expressão de IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas

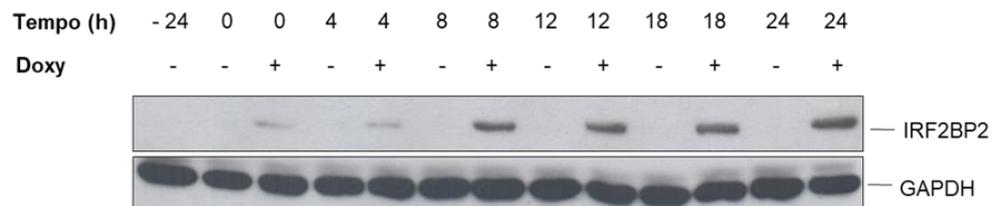
Para avaliar se os níveis de IRF2BP2 variavam ao longo do tempo em resposta a doxíciclina, células NIH3T3-TetR-BP2 foram cultivadas até confluência e mantidas em privação de soro por 24 horas. Posteriormente, as células foram replaqueadas em garrafas de 75 cm² e cultivadas com meio DMEM 10% SFB contendo ou não doxíciclina (Fig. 4.2A). Nos tempos indicados, os extratos proteicos foram obtidos e avaliados por *Western blot*. Os resultados mostram que os níveis proteicos de IRF2BP2 atingem um pico de síntese por volta de 8 até 24 horas após a adição de doxíciclina em células NIH3T3 sincronizadas. Além disso, a ausência de doxíciclina no meio de cultura não induz alteração nos níveis da proteína (Figura 4.2B).

Avaliamos também a expressão do mRNA da IRF2BP2 por PCR em tempo real (Figura 4.2C). As células transduzidas foram replaqueadas após confluência e privação de soro e o mRNA total foi extraído após 0, 3, 6, 8 e 16 horas. Analisando a expressão de IRF2BP2, observamos altos níveis de expressão, com diferenças estatísticas, em 3, 6 e 16h após a ressuplementação com soro nas culturas tratadas com doxíciclina, com um pico de expressão em 3h, quando há aumento de aproximadamente 10x (Figura 4.9)

A



B



C

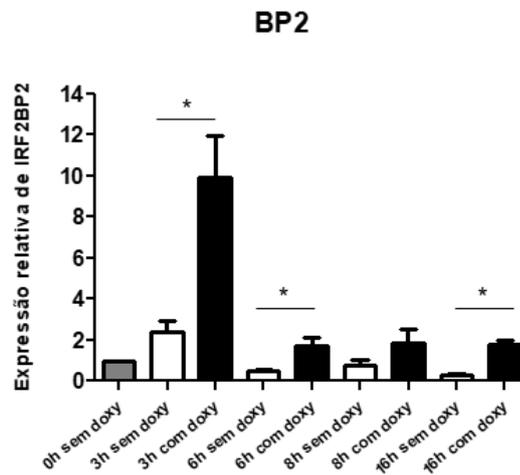


Figura 4.2. Níveis proteicos e de mRNA da IRF2BP2 em células NIH3T3-TetR sincronizadas atingem um pico de síntese a partir de 8 horas e 3 horas, respectivamente, após a adição de 1 µg/ml doxiciclina no meio de cultura. A) Modelo de sincronização de células NIH3T3 por confluência e privação de soro. B) Análise por *Western blot* dos níveis de IRF2BP2 em diferentes tempos após o replaqueamento na presença ou ausência de 1 µg/ml doxiciclina (Doxy). Os extratos proteicos foram obtidos com tampão de lise e separados em gel SDS-PAGE a 10%. Os níveis de IRF2BP2 (61 kDa) foram normalizados através dos níveis de GAPDH (37 kDa). C) Análise dos níveis de mRNA da IRF2BP2 por RT-PCR em tempo real. Extratos de RNA foram preparados utilizando Trizol® nos tempos indicados. cDNAs sintetizados foram usados para avaliar a expressão relativa da proteína IRF2BP2 usando sondas TaqMan®. A quantidade de RNA foi normalizada a partir dos níveis de mRNA de HPRT e a expressão relativa foi considerada 1 para o tempo 0h. Todos os resultados são representativos de quatro experimentos independentes. (*) indica $p < 0,05$.

4.3. Avaliação da proliferação e morte celular de células NIH3T3-TetR-BP2

Para avaliar o papel da proteína IRF2BP2 na proliferação celular, utilizamos como modelo experimental a linhagem não transformada imortalizada de fibroblastos murinos NIH3T3. A linhagem NIH3T3 foi escolhida por ser um modelo clássico para estudos de proliferação e transformação celular.

Células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas tiveram seu perfil proliferativo analisado por marcação por cristal violeta, que fornece informações sobre o número de células na cultura. Neste ensaio observou-se que as células tratadas com doxiciclina, ou seja, células que passaram a expressar IRF2BP2, apresentaram uma redução do nível proliferativo quando comparadas às células não tratadas (Figura 4.3A).

Um ensaio clonogênico realizado com essas mesmas células mostrou que após 7 e 14 dias de cultura, as células não tratadas com doxiciclina formaram muitos clones, enquanto que as tratadas praticamente não formaram clones, ou os clones eram muito pequenos (Figura 4.3B). Como o ensaio clonogênico testa a capacidade de as células sobreviverem e replicarem, a indução de morte celular pela IRF2BP2 poderia justificar o menor número de clones formados. Para avaliar a capacidade da proteína IRF2BP2 de induzir morte celular, foi analisado o conteúdo de DNA subdiploide (sub-G₀), um indicador de células em processo de morte celular por apoptose, das linhagens tratada e não tratada com doxiciclina por 24, 48 e 72 horas, através da marcação com iodeto de propídio (PI). As figuras 4.4A e B mostram que após 24, 48 e 72 horas do replaqueamento, as células com altos níveis de IRF2BP2 não apresentaram uma taxa de morte celular significativa em comparação com as células controle, indicando que a proteína não induz morte nessas células. Esse resultado está de acordo com o observado através da morfologia das células em cultura após o tratamento com doxiciclina (dados não mostrados) e também com os resultados descritos na literatura, que apontam para um papel antiapoptótico da proteína (TINNIKOV *et al.*, 2009; YEUNG *et al.*, 2011). Assim, esses dados sugerem que a superexpressão da IRF2BP2 leva à formação de clones menores e em menor número em relação às células controle e que esse fenótipo aparentemente não está associado com a indução de morte celular.

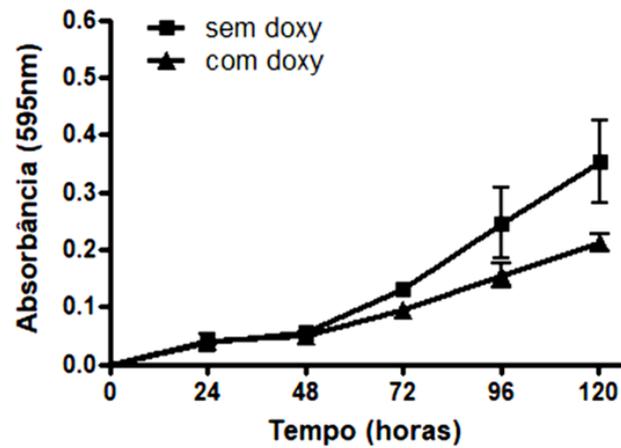
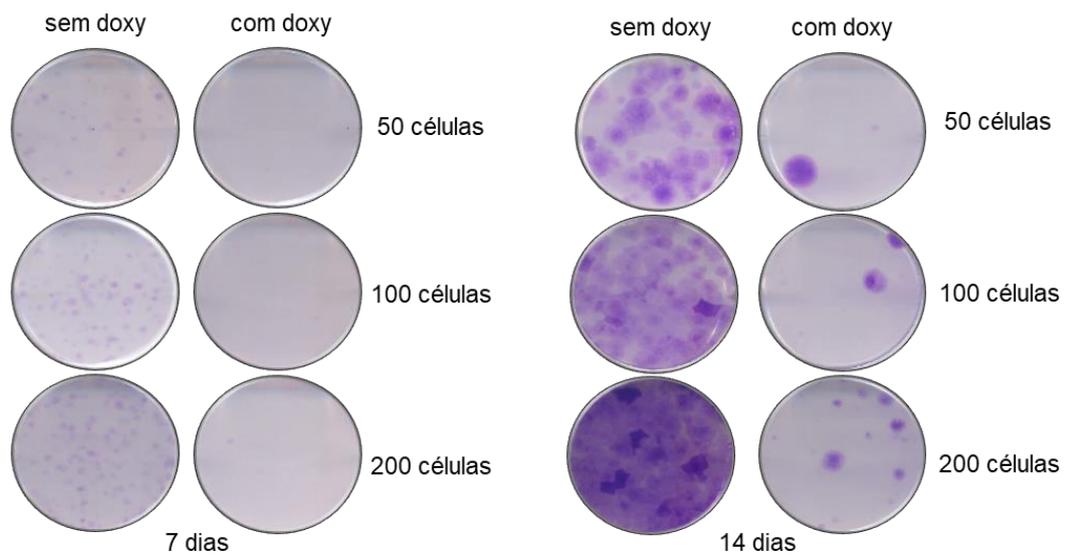
A**B**

Figura 4.3. Células NIH3T3-TetR sincronizadas superexpressando IRF2BP2 apresentam redução na taxa de proliferação celular, além da formação de menos clones. (A) Ensaio de proliferação por marcação com cristal violeta. As células NIH3T3-TetR-BP2 foram cultivadas em placas de 96 poços, 8×10^2 células por poço, em triplicata, na ausência ou presença de doxiciclina. O tempo inicial corresponde ao início da cultura, 24 h após a transdução. O gráfico mostrado é representativo de três experimentos independentes (B) Ensaio clonogênico por marcação com cristal violeta. Células NIH3T3-TetR-BP2 foram cultivadas em diferentes densidades (50, 100 e 200 células por poço) em placas de 96 poços por 7 e 14 dias, na presença ou ausência de doxiciclina no meio de cultura. Após os tempos indicados, o meio de cultura foi removido e as placas foram coradas com cristal violeta. Dados representativos de dois experimentos independentes.

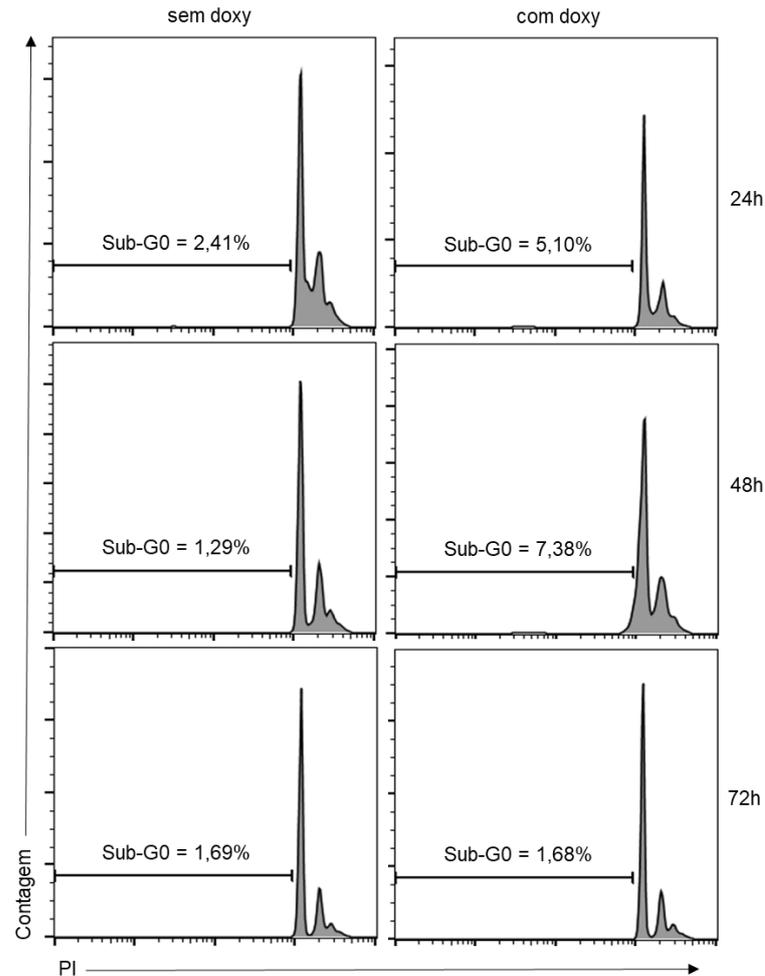
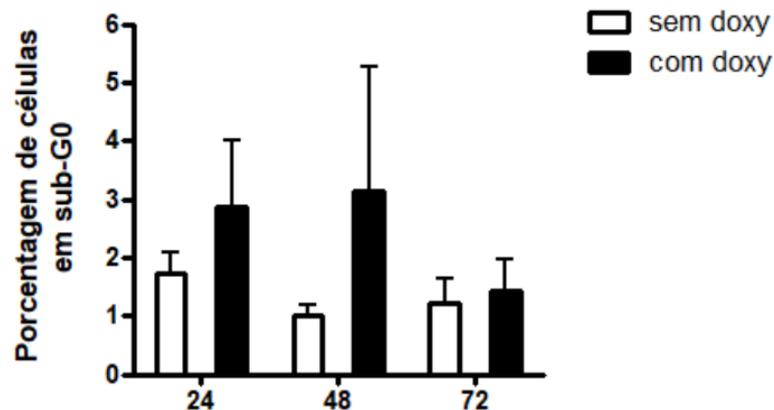
A**B**

Figura 4.4. Células NIH3T3-TetR sincronizadas superexpressando IRF2BP2 não apresentam aumento na taxa de morte celular. (A, B) Análise de morte celular em células NIH3T3-TetR-BP2. As células foram cultivadas em confluência (1×10^5 células em placas de 12 poços) e nos tempos indicados após o início da cultura foram marcadas com iodeto de propídio (PI). A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. O percentual de conteúdo sub-G₀ de DNA está indicado na figura (A) e o gráfico (B) mostra a média dos percentuais de células com conteúdo de DNA sub-G₀ obtidos a partir de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão entre os experimentos. Todos os resultados são representativos de três experimentos independentes.

4.4. Análise da progressão do ciclo celular em células NIH3T3-TetR-BP2

A sincronização da proliferação de células em cultura é um procedimento amplamente utilizado para estudar os mecanismos que regulam a entrada e progressão de células pelo ciclo celular (SCHORL & SEDIVY, 2007).

Apesar da proteína IRF2BP2 regular a função de genes críticos para a homeostasia celular, como a de TP53 (KOEPEL *et al.*, 2009) e NFAT1 (CARNEIRO *et al.*, 2011), pouco se sabe sobre sua contribuição fisiológica e qual a gama de genes que ela regula. Para estabelecer a função da IRF2BP2 na progressão do ciclo celular, células NIH3T3-TetR-BP2 foram sincronizadas por confluência e privação de soro e replaqueadas em meio DMEM 10% por diferentes tempos. Após os tempos indicados, as células foram fixadas e a progressão pelas fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo através de marcação com iodeto de propídio (PI), utilizado como marcador do conteúdo de DNA, e anticorpo anti-BrdU, para verificação de células com síntese ativa da molécula de DNA. Foi possível observar que a confluência e privação de soro causaram arresto de ciclo celular, com o acúmulo dessas células na fase G_0/G_1 (Figuras 4.5 e 4.6 – tempo 0h).

As Figuras 4.5 e 4.6 (tempo 0h) mostram que o percentual de células nas fases G_0/G_1 logo após a sincronização foi similar para duas culturas (tratada e não tratada com doxiciclina). Entretanto, após 16 horas do replaqueamento, a diferença do percentual de células em G_0/G_1 chegava a 10%. Enquanto ~ 76% das células não tratadas estavam em G_0/G_1 e 24% em S ou G_2/M , ~87% das tratadas com doxiciclina ainda estavam em G_0/G_1 e apenas 13% em S ou G_2/M , indicando um atraso na progressão do ciclo celular mediado pela IRF2BP2 (Figura 4.6). Essas diferenças de percentuais de células em G_0/G_1 se mantiveram até 20 horas após o replaqueamento. Em 24 horas os valores de G_0/G_1 eram de ~44% e 39% (Figura 4.5) e de ~34% e 40%, para as células não tratadas e tratadas com doxiciclina, respectivamente (Figura 4.6), e muito provavelmente a maioria das células não tratadas já havia completado seu primeiro ciclo de divisão nesse ponto. Esses dados mostram que a proteína IRF2BP2 atrasa a saída das células de G_0/G_1 , mas que esse atraso não configura um arresto de ciclo, uma vez que as células conseguem progredir pelas outras fases do ciclo celular, apesar da progressão ser mais lenta. Os resultados obtidos corroboram os resultados descritos na literatura, uma vez que observamos que a superexpressão de IRF2BP2 aumenta a frequência de células em fase G_1 e reduz a frequência de células em fase S (KOEPEL *et al.*, 2009; SECCA *et al.*, 2016).

Da mesma forma, também foi avaliada a frequência de células que se encontravam em fase S, porém não incorporaram BrdU (Figura 4.7). Os dados indicam que não há diferença nos percentuais de células que não incorporaram BrdU entre os grupos controle (sem doxiciclina) e o grupo com altos níveis de IRF2BP2 (com doxiciclina). Após 24 horas do replaqueamento, 3,51% das células tratadas com doxiciclina não incorporaram BrdU, enquanto 2,19% das células não tratadas apresentaram esse fenótipo. Os resultados foram similares para os tempos mais tardios (48 e 72 horas). Além disso, como é possível observar, em ambos os grupos as células que não incorporaram o BrdU, encontram-se com um perfil mais espalhado e não formam uma população coesa e bem definida. Esses resultados sugerem que a superexpressão de IRF2BP2 não é capaz de induzir eventos de estresse replicativo, que é caracterizado por uma progressão lenta da forquilha de replicação (BESTER *et al.*, 2011), porém outros experimentos são necessários para definir os mecanismos envolvidos na regulação da proteína IRF2BP2 na dinâmica da progressão do ciclo celular.

Para melhor análise do fenótipo de atraso da progressão pelas fases G_0/G_1 - S do ciclo celular, células NIH3T3-TetR-BP2, previamente sincronizada ou não em G_0/G_1 (Figura 4.8A e C, respectivamente), foram incubadas com Nocodazol (100 ng/ml), um potente inibidor da polimerização dos microtúbulos, por 6, 12 e 18 horas. O tratamento das células com Nocodazol induz a sincronização celular na transição das fases G_2/M , impedindo que as células reiniciem um novo ciclo de divisão. Após os tempos indicados, as células foram fixadas e a progressão pelas fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo através de marcação com iodeto de propídio. Como pode ser observado, aproximadamente 33% das células previamente sincronizadas ainda se encontram em fase G_0/G_1 após 12 horas de incubação com Nocodazol, enquanto aproximadamente 26% das células se encontram nesta fase no grupo controle. Os resultados obtidos são similares para o tempo de 18 horas (Figuras 4.8A e B).

Para avaliar a possibilidade de que a proteína IRF2BP2 estivesse agindo na progressão do ciclo celular através da regulação da saída de quiescência, uma vez que estas células foram sincronizadas por confluência e privação de soro, avaliamos o perfil fenotípico da progressão do ciclo celular em células não sincronizadas (Figuras 4.8C e D). Corroborando os resultados anteriores, obtidos em células sincronizadas, pode-se observar que a superexpressão da IRF2BP2 atrasa a saída das células de G_0/G_1 para a fase S do ciclo celular em células NIH3T3 não sincronizadas. Em ambos

os tempos de incubação com Nocodazol (6 e 12 horas), há um maior percentual de células acumuladas nas fases G₀/G₁ no grupo tratado com doxiciclina (30% e 16,6%, respectivamente) quando comparado ao grupo controle (22,2% e 10,8%, respectivamente). Em conjunto, estes resultados indicam que a superexpressão de IRF2BP2 induz uma progressão mais lenta pelo ciclo celular, uma vez que observamos uma redução da frequência de células em fase S e um aumento da frequência de células em fase G₁ em fibroblastos NIH3T3, porém, aparentemente, essa regulação não é dependente da saída de quiescência e não está associada com uma indução de estresse replicativo.

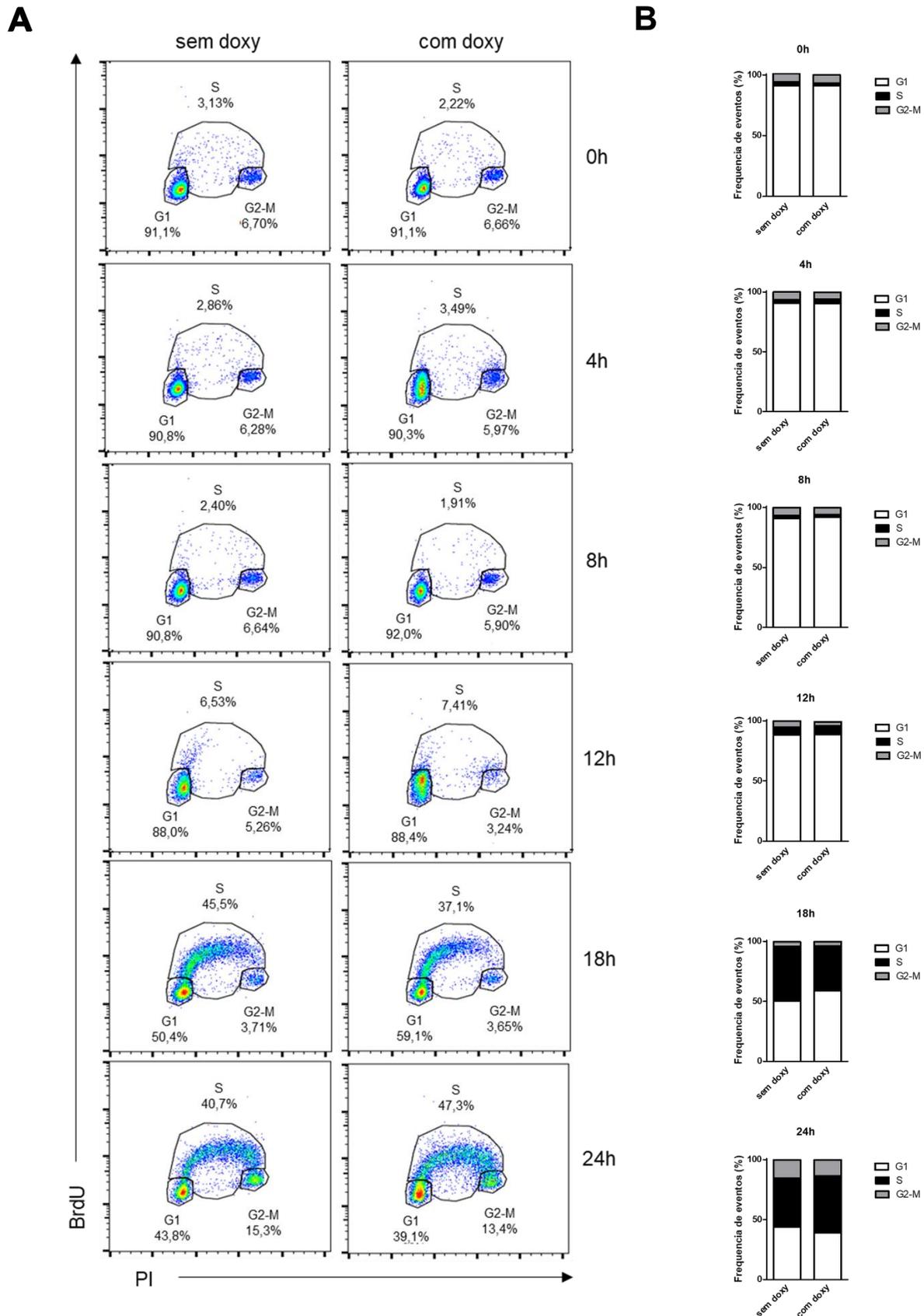


Figura 4.5. A superexpressão de IRF2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular. Células NIH3T3-TetR-BP2 foram sincronizadas por confluência e privação de soro e posteriormente replaqueadas na presença ou ausência de doxiciclina pelos tempos indicados. Após os tempos indicados, as células foram pulsadas com BrdU por 1 hora, fixadas em 70% de etanol e marcadas com iodeto de propídio e anti-BrdU e analisadas por citometria de fluxo. (A) Gráfico da análise do percentual de células em cada uma das fases do ciclo celular (G₀/G₁, S, G₂/M, respectivamente). (B) Gráfico em barras mostra os percentuais de células em cada uma das fases do ciclo celular de acordo com o tempo de análise.

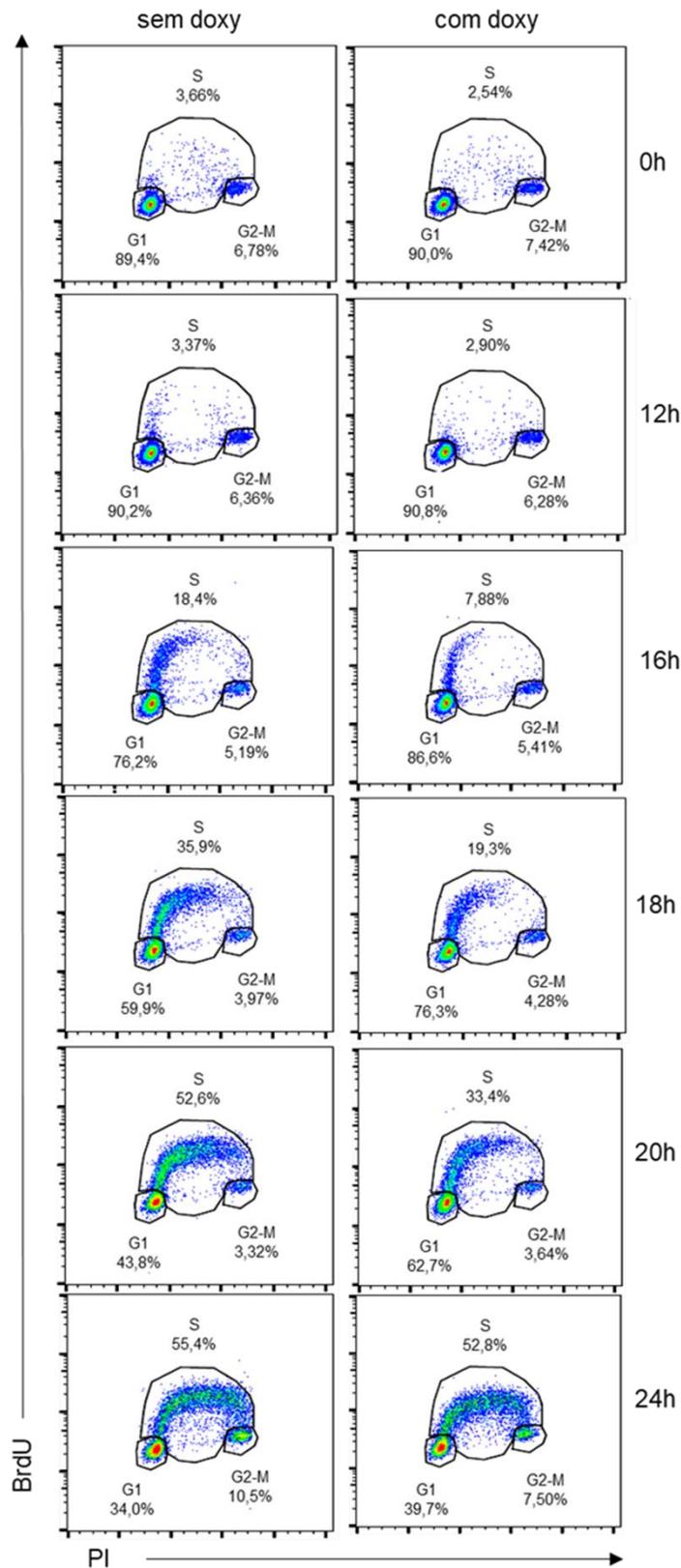
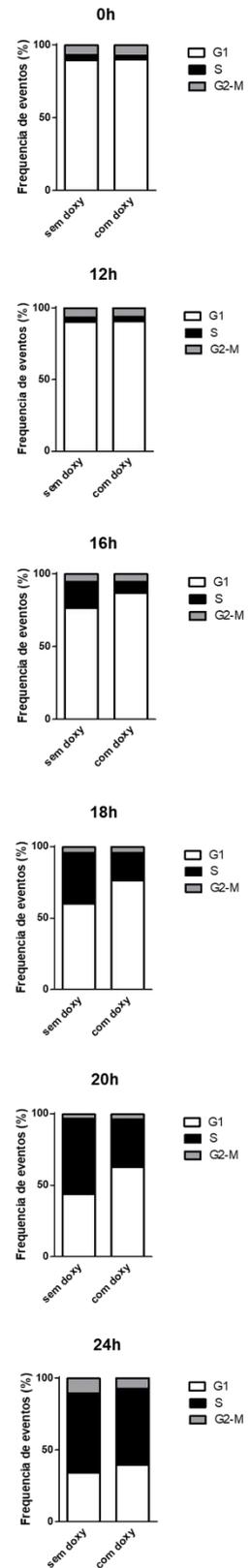
A**B**

Figura 4.6. A superexpressão de IRF2BP2 atrasa a saída da fase G₁ do ciclo celular. Células NIH3T3-TetR-BP2 foram sincronizadas por confluência e privação de soro e posteriormente replaqueadas na presença ou ausência de doxiciclina pelos tempos indicados. Após os tempos indicados, as células foram pulsadas com BrdU por 1 hora, fixadas em 70% de etanol e marcadas com iodeto de propídio e anti-BrdU e analisadas por citometria de fluxo. (A) Gráfico da análise do percentual de células em cada uma das fases do ciclo celular (G₀/G₁, S, G₂/M, respectivamente). (B) Gráfico em barras mostra os percentuais de células em cada uma das fases do ciclo celular de acordo com o tempo de análise.

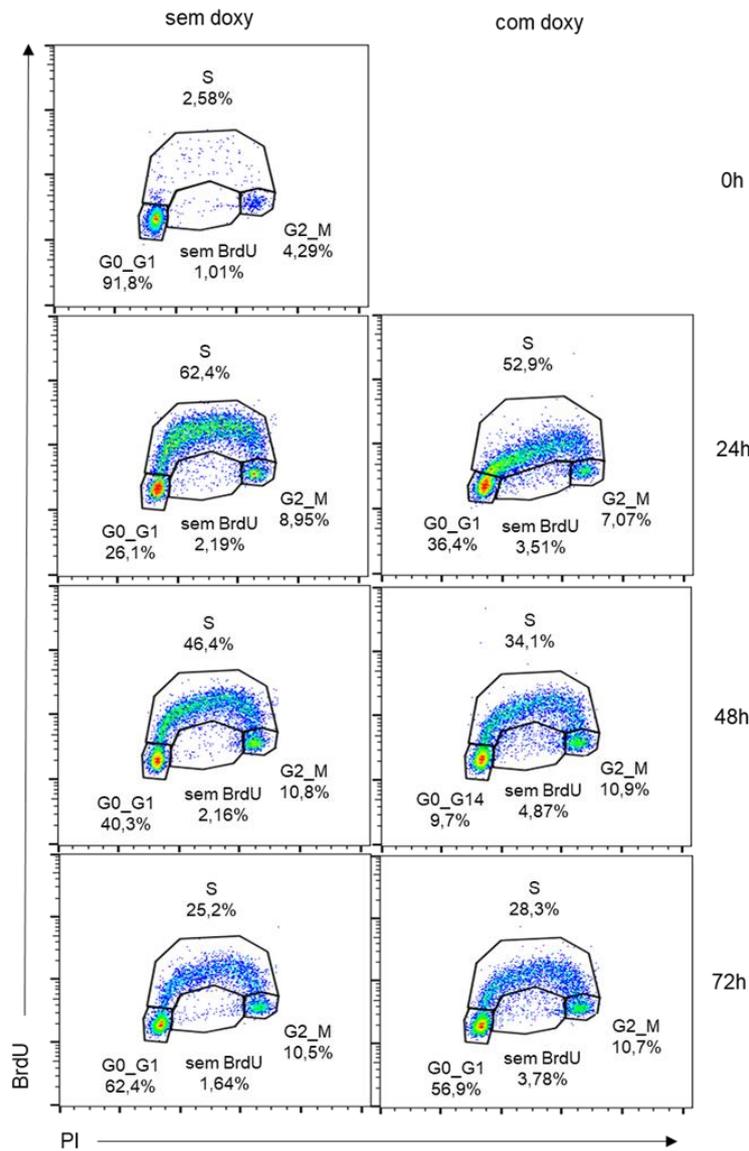
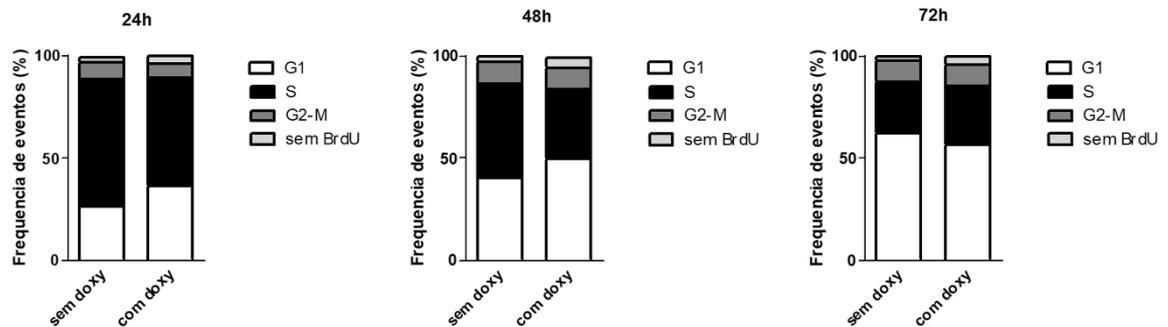
A**B**

Figura 4.7. A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente não induz estresse replicativo em células NIH3T3. Células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas foram replaqueadas na presença ou ausência de doxiciclina. Nos tempos indicados, as células foram pulsadas com BrdU por 1 hora, fixadas em 70% de etanol e marcadas com iodeto de propídio e anti-BrdU e analisadas por citometria de fluxo. (A) Gráfico da análise do percentual de células em cada uma das fases do ciclo celular (G_0/G_1 , S, G_2/M , respectivamente) e das células em S que não incorporaram BrdU (sem BrdU) estão indicadas na figura. (B) Gráfico em barras mostra o percentual de células em cada uma das fases do ciclo de acordo com o tempo de análise. Os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes

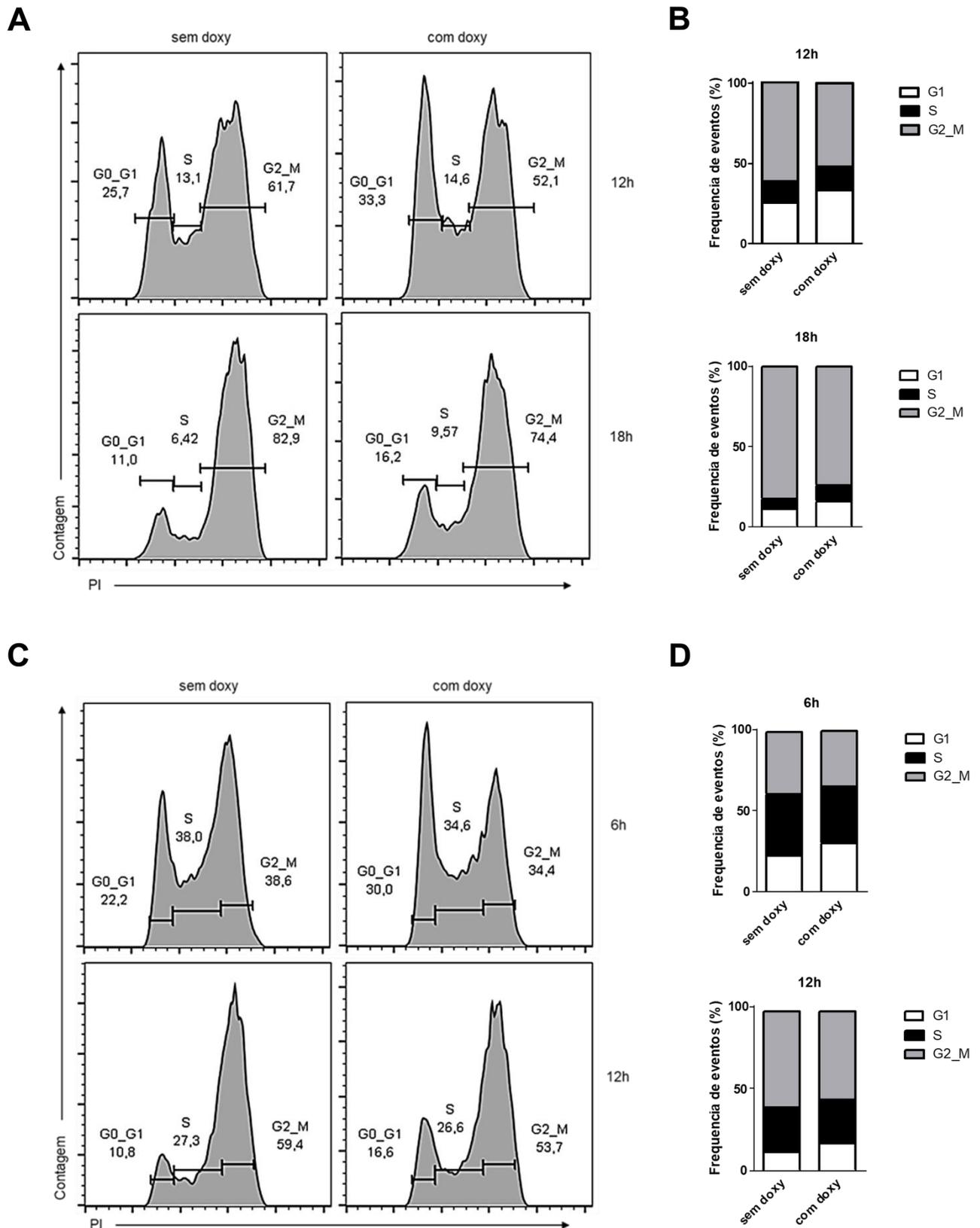


Figura 4.8. A superexpressão de IRF2BP2 atrasa a progressão das fases G₀/G₁ para a fase S do ciclo celular. Células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas (A) ou não (C) por confluência e privação de soro foram replaqueadas na presença de meio DMEM 10% de SFB por 12 horas. Posteriormente, as células foram incubadas com Nocodazol (100 ng/ml) pelos tempos indicados, fixadas em 70% de etanol e marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. (A) e (C) As porcentagens de células em cada uma das fases do ciclo celular (G₀/G₁, S, G₂/M, respectivamente) estão indicadas na figura. (B) e (D) Gráfico em barras mostra o percentual de células em cada fase do ciclo celular de acordo com o tempo de análise. Todos os resultados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

4.5. Avaliação da proliferação e morte celular de células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12

Alguns estudos têm demonstrado que o cofator transcricional IRF2BP2 pode atuar como um gene supressor de tumor (KOEPEL *et al.*, 2009; CARNEIRO *et al.*, 2011; SECCA *et al.*, 2016), regulando diversos genes importantes para a homeostase celular. Aqui, nós demonstramos que a superexpressão de IRF2BP2 induz um atraso da progressão do ciclo celular e diminui a taxa de proliferação, levando a formação de menos clones celulares. A partir desses dados, nós fomos avaliar se a superexpressão de IRF2BP2 é capaz de reverter os fenótipos de transformação celular. Para isso, células NIH3T3-TetR-BP2 foram transformadas a partir da expressão da oncoproteína constitutivamente ativa H-rasV12 através de transdução retroviral. Estas células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² e cultivadas em meio DMEM 10% SFB por diferentes tempos na ausência ou presença de 1 µg/ml de doxiciclina, que foi adicionada ao meio 2 horas após o início da cultura (tempo 0h). Nos tempos indicados, os extratos proteicos foram obtidos e avaliados por *Western blot* (Figura 4.9). Os dados mostram a superexpressão constitutiva de H-rasV12 em células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12. Além disso, a adição de doxiciclina no meio de cultura não afeta os níveis da proteína H-rasV12, regulando somente a expressão de IRF2BP2.

Para avaliar o papel da proteína IRF2BP2 na proliferação celular de células NIH3T3 transformadas, células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 tiveram seu perfil proliferativo analisado por marcação por cristal violeta. Neste ensaio observou-se que as células superexpressando IRF2BP2 apresentaram uma redução do nível proliferativo quando comparadas às células controle (Figura 4.10A).

Um ensaio clonogênico realizado com essas mesmas células mostrou que após 7 e 14 dias de cultura, as células não tratadas com doxiciclina formaram muitos clones, enquanto que as tratadas praticamente não formaram clones, ou os clones eram muito pequenos (Figura 4.10B). Para avaliar a capacidade da proteína IRF2BP2 de induzir morte celular, inicialmente, analisamos a presença de fragmentação de DNA nuclear pela marcação com PI, por diferentes tempos (24, 48 e 72 horas). As figuras 4.11A e B mostram que, após 48 e 72 horas do replaqueamento, as células com altos níveis de IRF2BP2 apresentaram um maior percentual de conteúdo sub-G₀ de DNA quando comparadas às células controle, indicando que possivelmente a proteína IRF2BP2 pode estar induzindo morte nessas células. Apesar da análise de morte celular por

quantificação de DNA sub-G0 mostrar diferenças significativas entre as células controle e superexpressando IRF2BP2, a composição dessa população é uma mistura de fragmentos celulares, não sendo um marcador específico para determinar a porcentagem de células apoptóticas, sendo portanto, necessário o uso de uma metodologia mais robusta, como a marcação com anexina V.

Com o objetivo de melhor caracterizar o fenótipo de morte celular induzido pela superexpressão de IRF2BP2, nós avaliamos a exposição de fosfatidilserina, característica clássica de células apoptóticas, através da marcação com anexina V. As figuras 4.12 e 4.13 mostram que, tanto em tempos mais iniciais (0h/4h/8h) quanto em tempos mais tardios (24h/48h/72h), não há diferenças de percentual de células positivas para anexina V e negativas para 7-AAD entre os grupos controle (sem doxiciclina) e com superexpressão de IRF2BP2 (com doxiciclina), com ambas as culturas apresentando baixa proporção de células apoptóticas.

Em conjunto, esses dados sugerem que a superexpressão da proteína IRF2BP2 leva à formação de clones celulares menores e em menor número em relação às células controle e que esse fenótipo aparentemente não está associado com a indução de morte celular por apoptose em células NIH3T3 transformadas com Ras constitutivamente ativo.

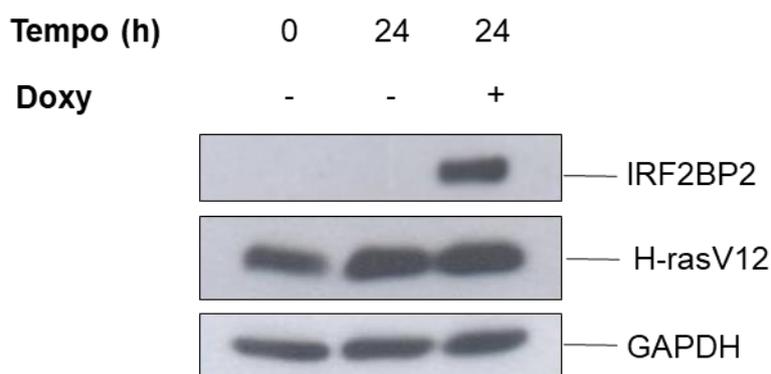


Figura 4.9. Níveis proteicos de H-rasV12 em células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12. (A) Análise por *Western blot* dos níveis de H-rasV12 em diferentes tempos após o replaqueamento na presença ou ausência de 1 µg/ml doxiciclina (Doxy). Os extratos proteicos foram obtidos com tampão de lise e separados em gel SDS-PAGE a 10%. Os níveis de H-rasV12 (21 kDa) foram normalizados através dos níveis de GAPDH (37 kDa).

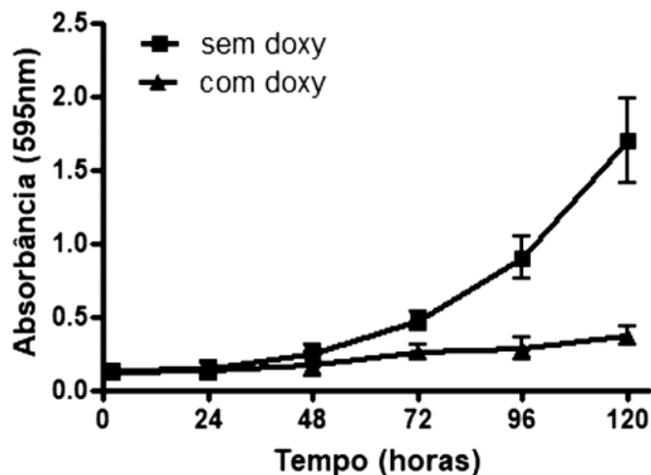
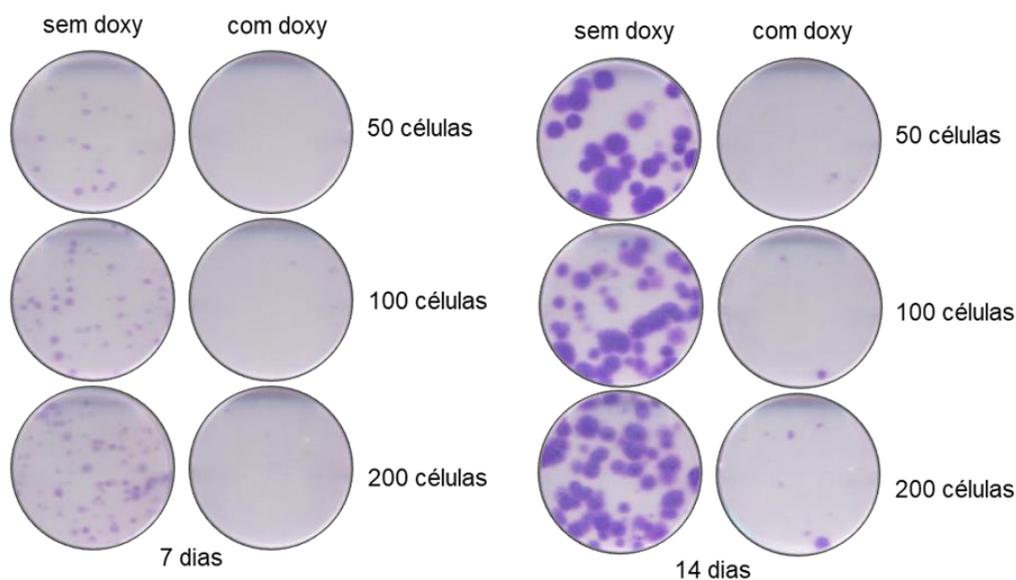
A**B**

Figura 4.10. Células NIH3T3 transformadas superexpressando IRF2BP2 apresentam redução na taxa de proliferação celular, além da formação de menos clones. (A) Ensaio de proliferação por marcação com cristal violeta. As células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram cultivadas em placas de 96 poços, 8×10^2 células por poço, em triplicata, na ausência ou presença de doxiciclina. O tempo inicial corresponde ao início da cultura, 24 h após a transdução. O gráfico mostrado é representativo de três experimentos independentes. (B) Ensaio clonogênico por marcação com cristal violeta. Células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram cultivadas em diferentes densidades (50, 100 e 200 células por poço) em placas de 96 poços por 7 e 14 dias, na presença ou ausência de doxiciclina no meio de cultura. Após os tempos indicados, o meio de cultura foi removido e as placas foram coradas com cristal violeta. Dados representativos de dois experimentos independentes.

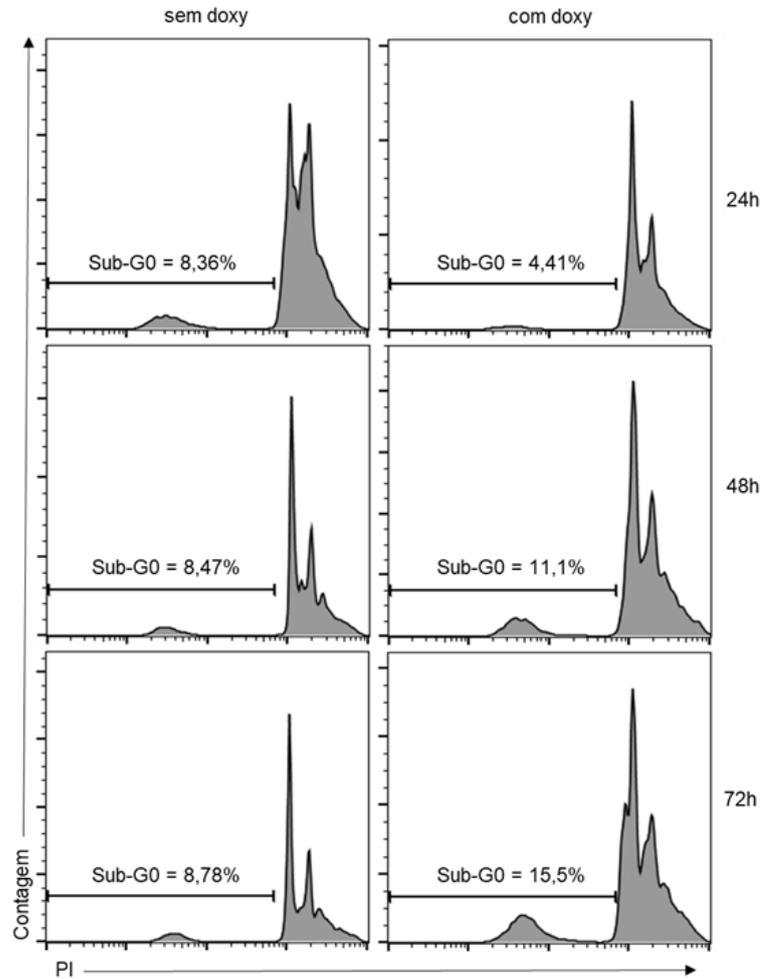
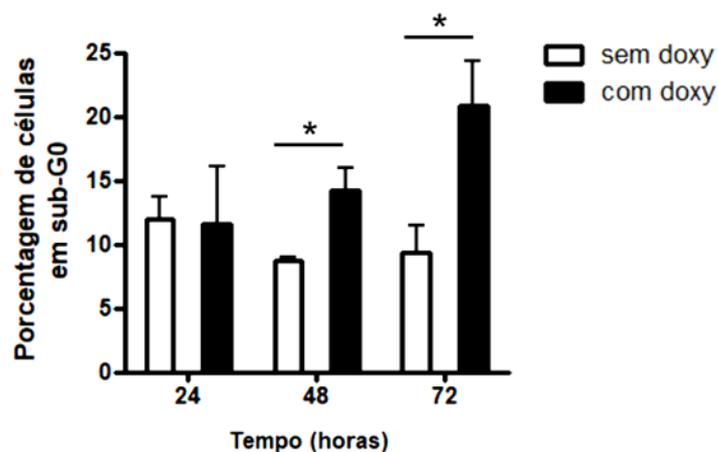
A**B**

Figura 4.11. A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente pode induzir de morte celular em células NIH3T3 transformadas. (A, B) Análise de morte celular em células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 por conteúdo sub-G0 de DNA. As células foram cultivadas em confluência (1×10^5 células em placas de 12 poços) e nos tempos indicados após o início da cultura foram marcadas com iodeto de propídio (PI). A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. O percentual de conteúdo sub-G0 de DNA está indicado na figura (A) e o gráfico (B) mostra a média dos percentuais de células com conteúdo de DNA sub-G0 obtidos a partir de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão entre os experimentos. (*) indica $p < 0,05$

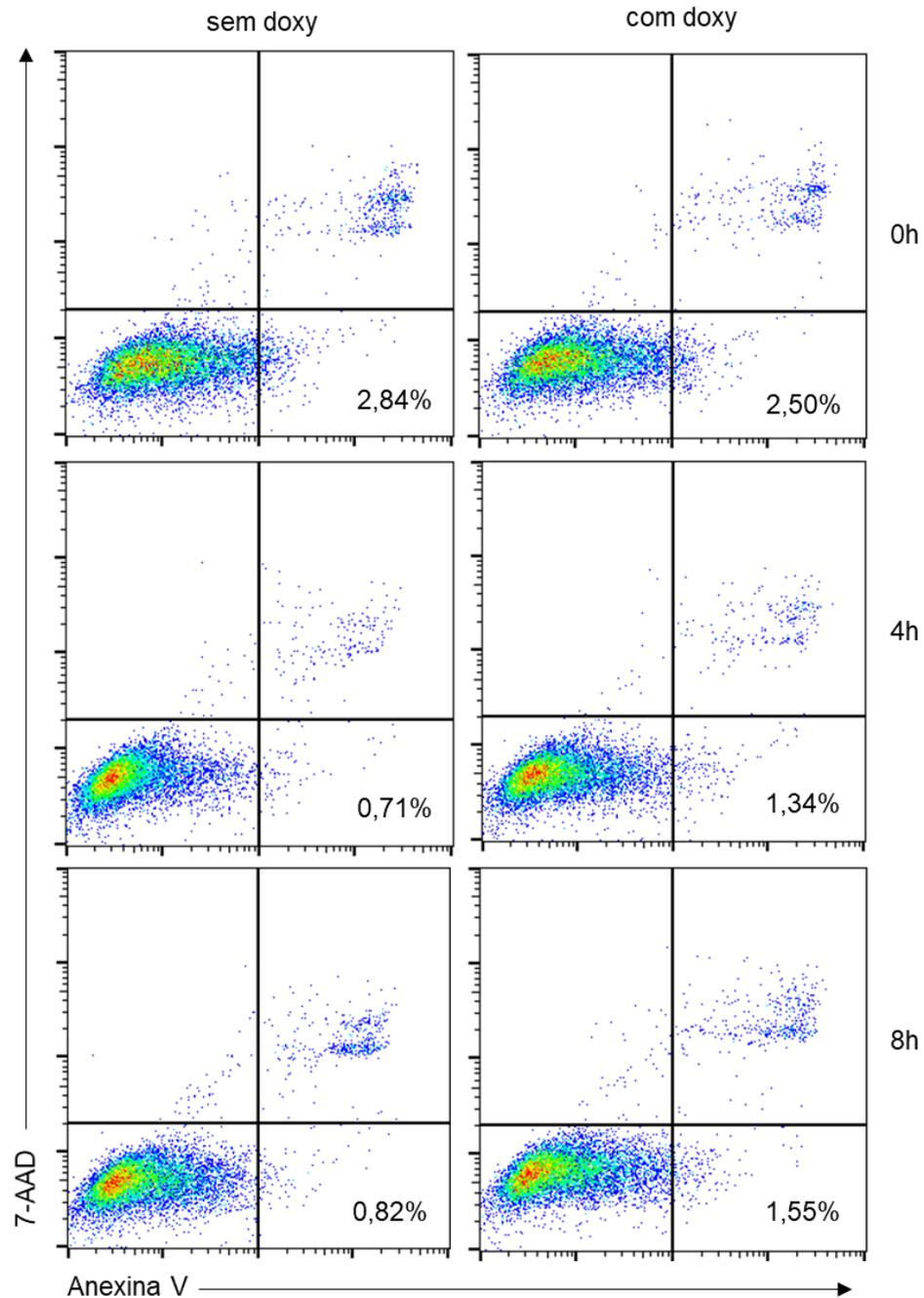


Figura 4.12. A superexpressão de IRF2BP2 não induz morte celular em tempos mais iniciais em células NIH3T3 transformadas. Análise de morte celular em células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 por marcação com anexina V e 7-AAD. As células foram cultivadas em garrafas de cultura 75 cm² na ausência ou presença de 1µg/ml de doxiciclina. Depois de 0 (2h de adesão), 4 ou 8 horas, a exposição de fosfatidilserina foi acompanhada por marcação com anexina V e analisadas por citometria de fluxo. O percentual de células positivas para anexina V e negativas para 7-AAD está indicado na figura. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

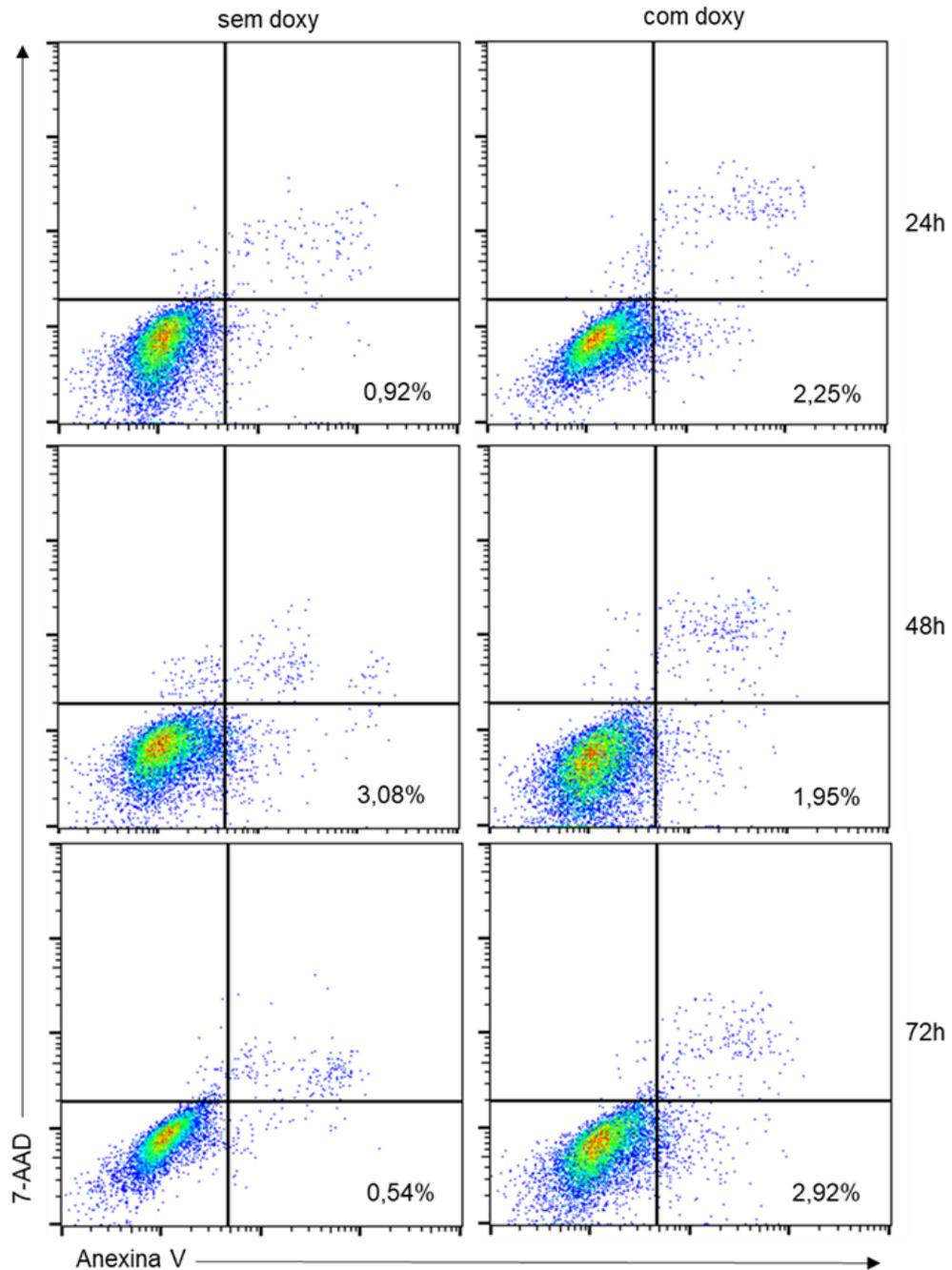


Figura 4.13. A superexpressão de IRF2BP2 não induz morte celular em tempos mais tardios em células NIH3T3 transformadas. Análise de morte celular em células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 por marcação com anexina V e 7-AAD. As células foram cultivadas em garrafas de cultura 75 cm² na ausência ou presença de 1µg/ml de doxiciclina. Depois de 24, 48 ou 72 horas, a exposição de fosfatidilserina foi acompanhada por marcação com anexina V e analisadas por citometria de fluxo. O percentual de células positivas para anexina V e negativas para 7-AAD está indicado na figura. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.6. Avaliação de fenótipos de transformação celular em células com altos níveis da proteína IRF2BP2

Nos experimentos de proliferação foi observado que as células NIH3T3 transformadas superexpressando a proteína IRF2BP2 eram capazes de proliferar menos, sugerindo que essas células poderiam ter os fenótipos de transformação celular sendo reprimidos. Sendo assim, avaliamos se a superexpressão da IRF2BP2 poderia regular diferentes fenótipos associados à transformação celular. Para isso, analisamos três características de transformação celular: perda de inibição de crescimento induzido por contato célula-célula, crescimento na ausência de substrato sólido e capacidade de formação de tumores *in vivo*.

Primeiramente, analisamos se as células com superexpressão de IRF2BP2 eram capazes de superar a inibição do crescimento por contato. Para isso, células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram co-cultivadas com células NIH3T3 selvagens (controle WT) em diferentes proporções (1:100, 1:250 e 1:500), na ausência ou presença de doxiciclina, e foi observada sua capacidade de inibir a formação de focos de transformação em cultura. Enquanto as células transformadas não tratadas com doxiciclina formaram grande número de focos em cultura, as células tratadas com doxiciclina também induziram a formação de focos, mas em menor número e menores (Figura 4.14A). Isto indica que a superexpressão da proteína IRF2BP2 reduz a formação de focos de crescimento mediada por contato em células NIH3T3 transformadas, reduzindo a capacidade de indução de transformação celular em cultura.

Posteriormente, analisamos se as células NIH3T3 transformadas com altos níveis de IRF2BP2 eram capazes de crescer na ausência de substrato sólido para adesão. Para isso, células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram cultivadas em meio semissólido de agarose, na ausência ou presença de doxiciclina por 14 dias. A formação de colônias foi analisada por microscopia de contraste de fase. Células tratadas com doxiciclina formaram um número muito baixo de colônias de pequeno volume. Em contrapartida, células não tratadas com doxiciclina demonstraram capacidade de formar um grande número de colônias com volume bastante aumentado (Figuras 4.14B e C).

Por fim, o último aspecto de transformação celular a ser analisado foi a capacidade de formação de tumores *in vivo*. Para isso, células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram inoculadas subcutaneamente no flanco de camundongos BALB/c nude.

Estes animais foram divididos em dois grupos: o que recebia apenas água (grupo sem tetraciclina) e o que recebia água com tetraciclina dissolvida (grupo com tetraciclina), afim de superexpressar IRF2BP2. Os animais foram monitorados a cada três dias para a formação e crescimento de tumores. Os animais que receberam água com tetraciclina apresentaram tumores menores e de crescimento mais lento. Já os animais que receberam apenas água apresentaram grandes tumores, com um crescimento contínuo durante todo o experimento (Figuras 4.15A e B). Esses dados corroboram as observações anteriores, onde a proteína IRF2BP2 é capaz de reduzir os fenótipos de transformação em células NIH3T3.

Em conjunto, estes dados demonstram que a proteína IRF2BP2 não induz transformação celular em células NIH3T3, atuando como uma proteína supressora tumoral, sendo isto possível através de uma regulação negativa no perfil de ciclo celular.

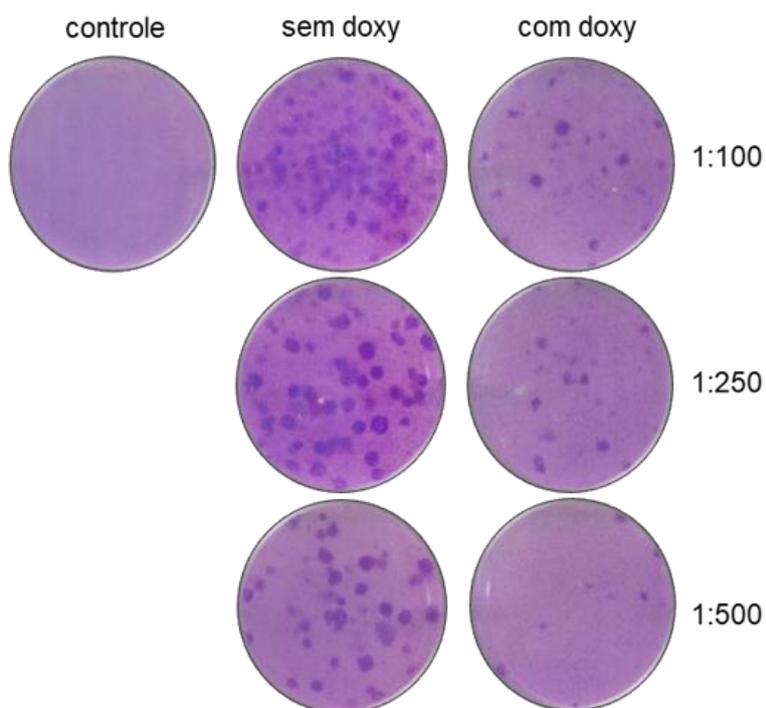
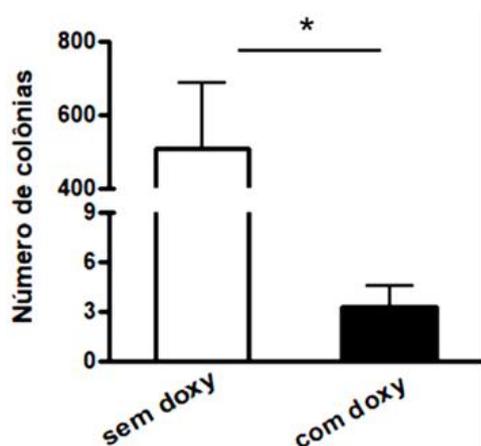
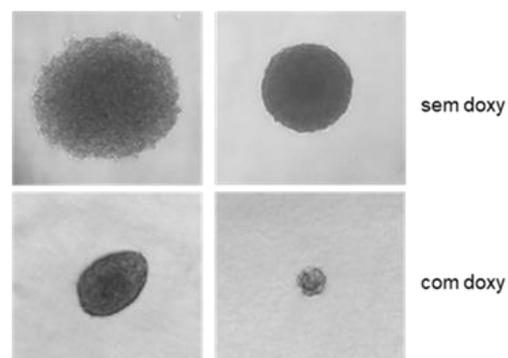
A**B****C**

Figura 4.14. A superexpressão IRF2BP2 reduz os fenótipos de transformação *in vitro*. (A) Ensaio de formação de focos. As células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 foram misturadas em diferentes proporções com células NIH3T3 selvagens não-transduzidas (WT) e mantidas em cultura por aproximadamente 2 semanas. Após esse tempo os focos de crescimento foram marcados com cristal violeta. Estes resultados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes. (B) Ensaio de formação de colônias em meio semissólido. As células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 (10^3 células) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 0,4% de agarose. As células foram mantidas em culturas por 14 dias. A quantificação foi feita por contagem das colônias. Média de três experimentos independentes. As barras indicam o desvio padrão entre os experimentos. (*) indica $p < 0,05$ (C) Microscopia de contraste de fase de colônias representativas de pelo menos 3 experimentos independentes.

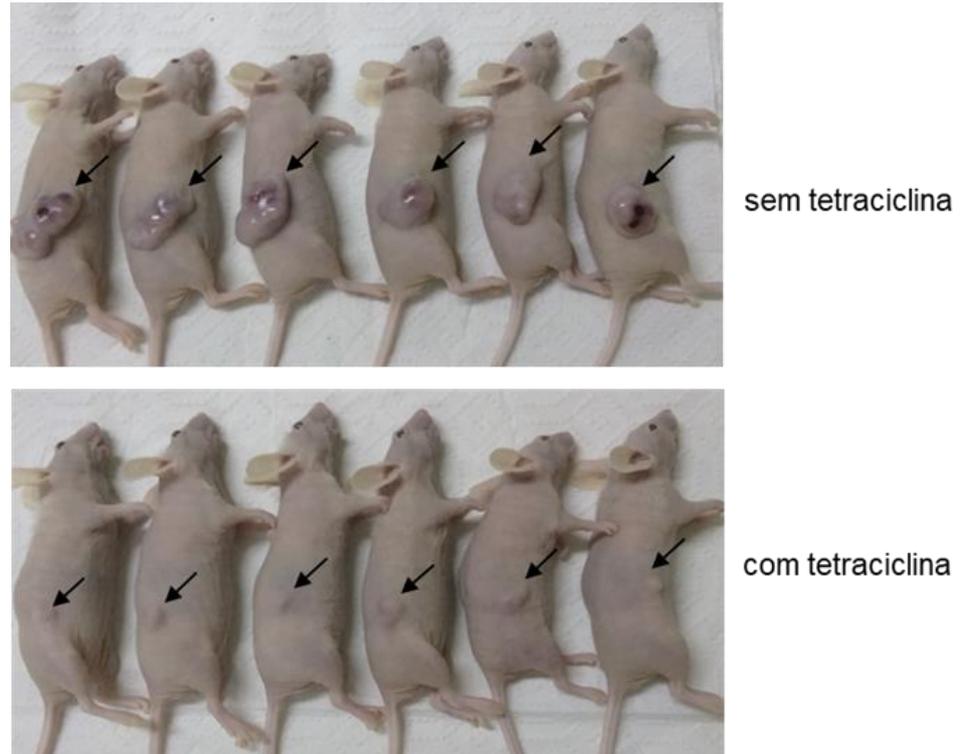
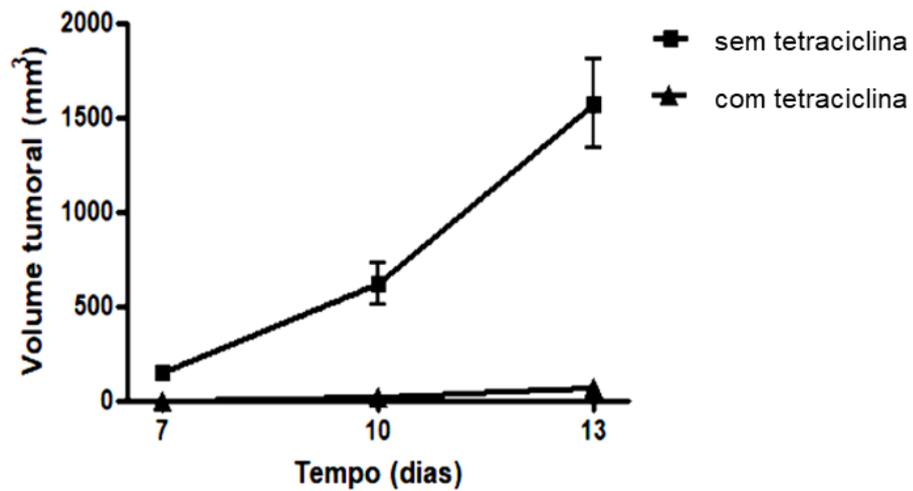
A**B**

Figura 4.15. A superexpressão IRF2BP2 reduz os fenótipos de transformação *in vivo*. (A, B) Formação de tumores em camundongos nude. Células NIH3T3-TetR-BP2-H-rasV12 (3×10^5 células) foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos atímicos BALB/c nude/nude, que foram divididos em dois grupos: um grupo que recebeu apenas água (n=6) e um grupo que recebeu água com tetraciclina dissolvida (n=6). O volume tumoral foi medido a cada 3 dias através da fórmula: $V=0,52 \times \text{comprimento}^2 \times \text{largura}$. As barras indicam o erro padrão da média dentro de um experimento.

4.7. Avaliação da correlação entre a expressão de IRF2BP2 e genes de ciclo celular em dados de RNA-Seq de amostras de fibroblastos humanos

Nos experimentos de ciclo celular foi observado que células NIH3T3 com altos níveis da proteína IRF2BP2 apresentam um atraso na saída de G₀/G₁, configurando uma diminuição na taxa de proliferação dessas células. Portanto, esses dados sugerem que a proteína IRF2BP2 pode estar regulando de forma negativa a transcrição de genes importantes para a transição G₁/S do ciclo celular. Com o objetivo de corroborar os resultados observados em células de fibroblastos embrionários murinos NIH3T3, analisamos dados de RNA-seq de 343 amostras de fibroblastos humanos transformados por imortalização celular, através de protocolos de passagens de células em cultura, disponíveis no banco de dados GTEx. Essas amostras foram, inicialmente, divididas por quartis de acordo com seu nível de expressão de IRF2BP2. Amostras com valor menor ou igual ao primeiro quartil foram definidas como IRF2BP2^{low} (n=86), enquanto as amostras com valor de expressão de IRF2BP2 maior ou igual ao terceiro quartil foram definidas como IRF2BP2^{high} (n=86). Em seguida, foi comparada a expressão de cerca de 24.000 genes entre os dois grupos a fim de identificar genes diferencialmente expressos. Estas análises mostraram que aproximadamente 12.000 genes apresentaram expressão diferencial entre as amostras IRF2BP2^{high} e IRF2BP2^{low}, de acordo com o p valor ajustado < 0,001 (Figura 4.16).

Posteriormente, esses genes diferencialmente expressos foram utilizados para análise de enriquecimento de vias de sinalização. Dentre as principais vias celulares que estavam enriquecidas a partir dos genes diferencialmente expressos destacam-se as vias de ciclo celular ($p < 0,0005$), de replicação do DNA ($p < 0,0005$) e de senescência ($p < 0,001$) (Figura 4.17). Todas essas vias estão relacionadas com mecanismos de controle do ciclo celular e regulam de forma importante as taxas de proliferação e viabilidade celular.

Dos 12.000 genes diferencialmente expressos entre os grupos high e low, 102 apresentam um papel na regulação da via de ciclo celular (Figura 4.18A). Podemos observar que nas amostras IRF2BP2^{high}, a maioria dos genes envolvidos nessa via estão tendo sua expressão regulada de forma negativa (Figura 4.18B). A análise de expressão mostrada pelo gráfico de Heatmap indica uma clusterização bem definida dos genes de ciclo celular com as amostras IRF2BP2^{high}, onde se observa dois grupos

distintos: genes que estão sendo regulados positivamente e os que são regulados negativamente, sendo que estes últimos constituem a maioria dos genes diferencialmente expressos (Figura 4.18B). Na figura 4.19A é possível observar as proteínas codificadas pelos diferentes genes da via de ciclo celular que estão diferencialmente expressos entre os grupos IRF2BP2^{high} e IRF2BP2^{low}. Por fim, foram feitas análises de correlação entre a expressão de IRF2BP2 e a expressão de diferentes genes envolvidos na via de ciclo celular (Figura 4.19B e ANEXO II). Os dados mostram que a expressão de IRF2BP2 se correlaciona de forma inversa com a expressão de genes que codificam para proteínas importantes na regulação positiva da progressão do ciclo celular. Dentre estas proteínas podemos destacar as ciclinas, em especial a Ciclina E (LEW & REED, 1991), e proteínas importantes para a replicação do DNA, como as MCMs (proteínas de manutenção dos cromossomos) (BELL & DUTTA, 2002) e ORCs (complexo de reconhecimento da origem) (STILLMAN, 2005), todos potentes reguladores da transição entre as fases G₁/S do ciclo celular. Por outro lado, os níveis de IRF2BP2 se correlacionam de forma direta com genes que codificam para reguladores negativos do ciclo celular, como por exemplo a proteína p21^{Cip1} (codificada pelo gene *CDKN1A*), que inibe o complexo ciclina E/CDK2 e, portanto, a entrada na fase S do ciclo celular. Em conjunto, estes dados mostram que a expressão de IRF2BP2 está correlacionada com a expressão de diversos genes de ciclo celular, sugerindo que a proteína IRF2BP2 pode atuar de forma negativa no processo de carcinogênese, através do atraso da progressão entre as fases G₁/S do ciclo celular, regulando de forma diferencial a transcrição de genes importantes para regulação dessa transição.

High → Low

• Up: 6459 • Down: 6152 • NS

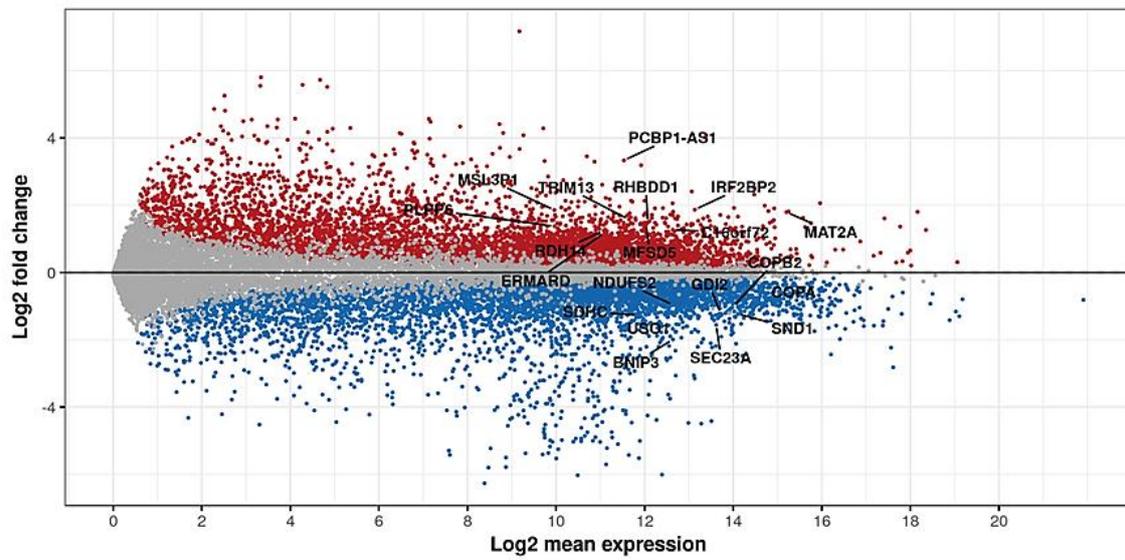


Figura 4.16. A expressão diferencial de IRF2BP2 modifica o perfil de expressão de diferentes genes em fibroblastos humanos transformados. (A) MA plot. Expressão gênica diferencial entre fibroblastos expressando altos e baixos níveis de IRF2BP2 (IRF2BP2^{high} e IRF2BP2^{low}, respectivamente). O total de genes com diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (p ajustado $< 0,001$) estão indicados no topo do gráfico e os genes estão representados em vermelho (genes regulados positivamente) ou azul (genes regulados negativamente) significativas. Os 20 genes com menor valor de p estão indicados no gráfico.

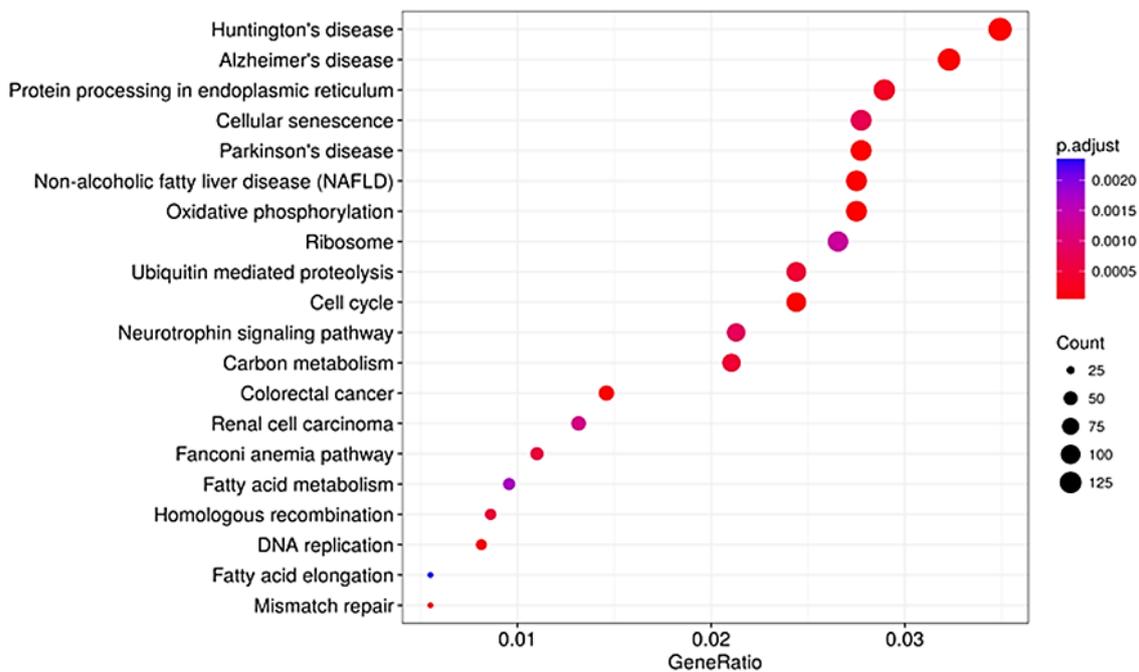


Figura 4.17. A expressão de IRF2BP2 correlaciona-se à expressão de genes envolvidos em diferentes vias celulares em fibroblastos humanos transformados. Análise de enriquecimento. Os genes diferencialmente expressos entre amostras de fibroblastos humanos IRF2BP2^{high} e IRF2BP2^{low} foram utilizados para análise de enriquecimento pela ferramenta KEGG, usando o pacote ClusterProfiler. As principais vias celulares enriquecidas estão indicadas no gráfico.

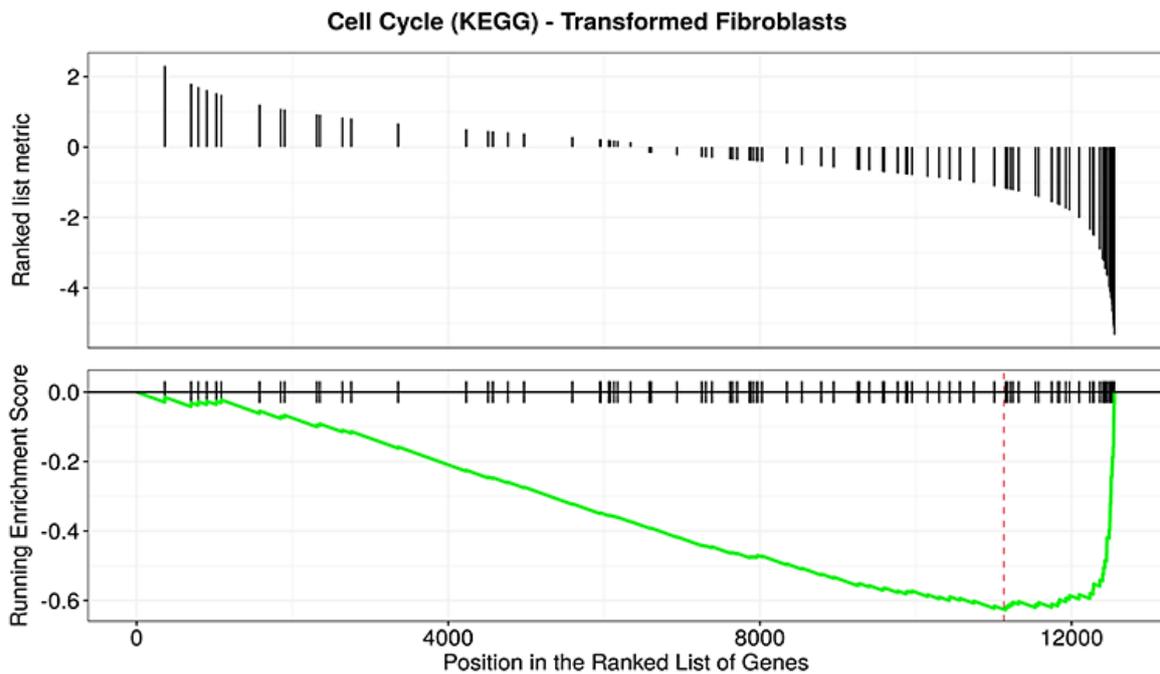
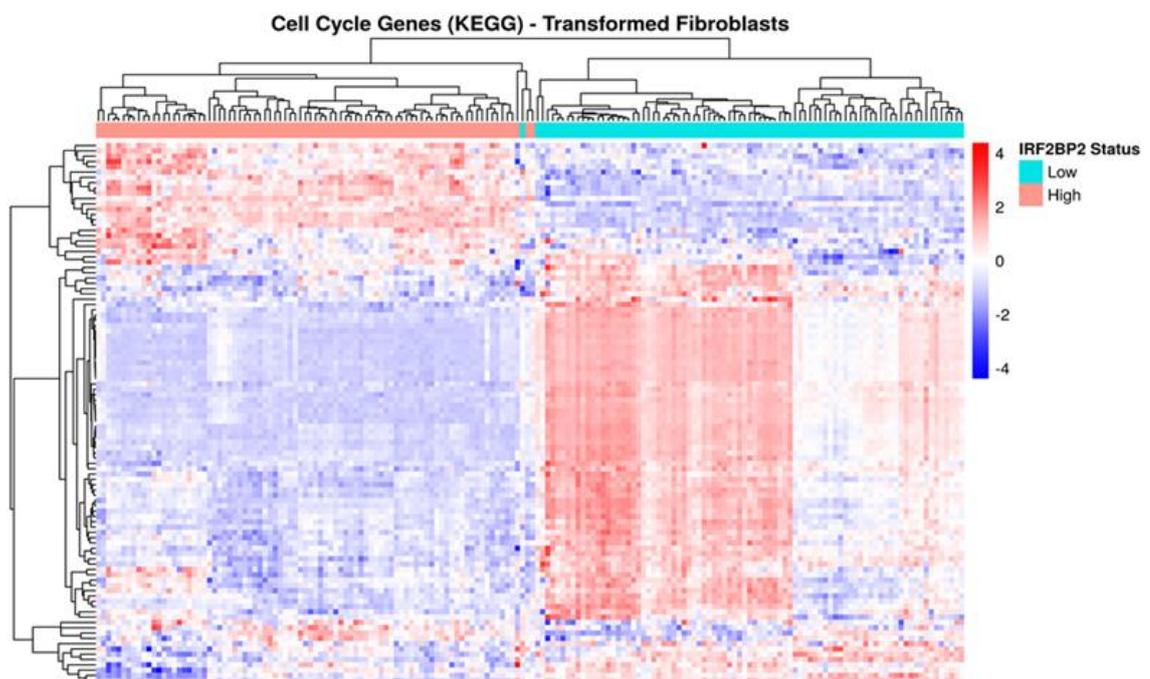
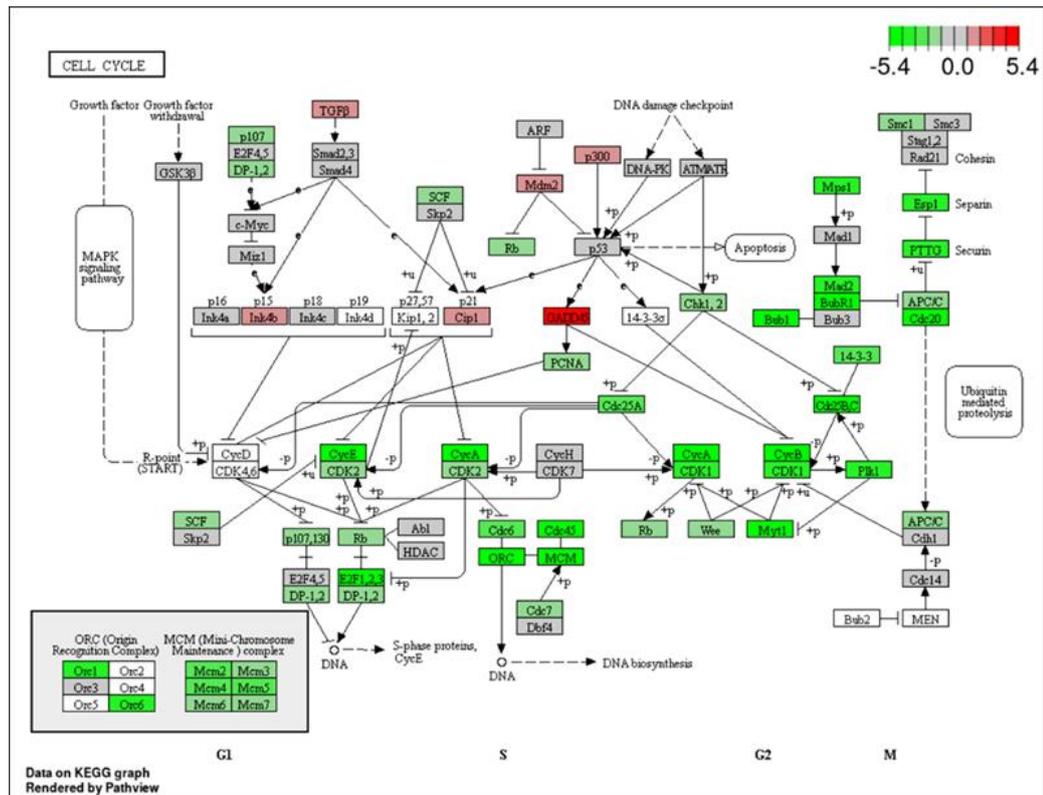
A**B**

Figura 4.18. A expressão de IRF2BP2 está correlacionada de forma diferencial à expressão de genes envolvidos com a via de ciclo celular em fibroblastos humanos transformados. (A) Enriquecimento da via de ciclo celular. Gsea plot indicando a expressão diferencial de genes de ciclo celular entre amostras de fibroblastos humanos IRF2BP2^{high} e IRF2BP2^{low}. Os 102 genes de ciclo celular diferencialmente expressos estão indicados no gráfico ordenados em ordem crescente de valor de fold change. A linha pontilhada indica o score de enriquecimento da via. **(B)** Heatmap dos genes de ciclo celular. O gráfico mostra os 102 genes de ciclo celular diferencialmente expressos entre as amostras de fibroblastos humanos IRF2BP2^{high} e IRF2BP2^{low}.

A



B

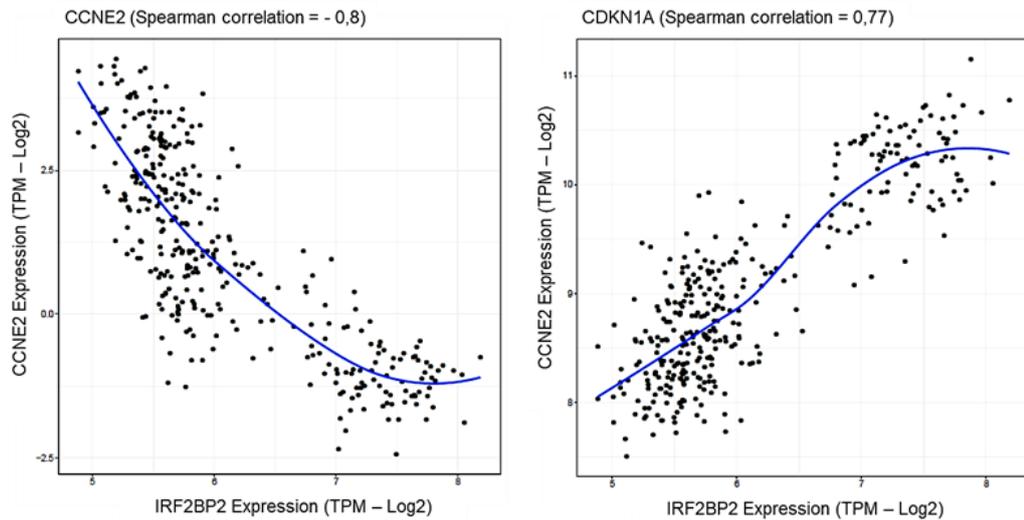


Figura 4.19. A expressão IRF2BP2 correlaciona-se direta ou inversamente com diferentes genes envolvidos na progressão das fases G₁/S do ciclo celular. (A) Via de ciclo celular gerado pelo pacote Pathview com os genes indicados pela análise de enriquecimento da ferramenta KEGG. As diferentes proteínas que regulam o ciclo celular são indicadas no esquema e a expressão diferencial de seus genes entre amostras de fibroblastos humanos IRF2BP2_{high} e IRF2BP2_{low} é indicada pelas cores. A escala de cores indica o log₂ do valor de expressão diferencial. (B) Correlação entre a expressão de IRF2BP2 e genes de ciclo celular. O gráfico mostra a correlação entre a expressão de IRF2BP2 e a expressão de diferentes genes envolvidos no ciclo celular nas amostras de fibroblastos humanos (n = 343). O valor do coeficiente de correlação de Spearman é indicado nos gráficos.

4.8. Avaliação da expressão de genes envolvidos com a transição G₁/S do ciclo celular em células NIH3T3-TetR-BP2

Dado que a superexpressão de IRF2BP2 atrasa a progressão das células NIH3T3 para as fases S e G₂/M do ciclo celular, avaliamos a expressão do mRNA de genes importantes durante G₁ e durante a transição de G₁/S das células NIH3T3-TetR-BP2. As células transduzidas foram replaqueadas após confluência e privação de soro e o mRNA total foi extraído após 0, 3, 6, 8 e 16 horas. A expressão do mRNA foi avaliada por PCR em tempo real (Figura 4.20).

Avaliamos os níveis de expressão dos genes das Ciclinas D (D1 e D2), que são expressos antes do ponto de restrição de G₁. Para a Ciclina D1 observamos um pico de expressão após 8h de suplementação nas células controle e um pico de expressão em 16h nas células tratadas com doxiciclina. Já para a Ciclina D2, foi possível observar um pico de expressão em 3 e 6h nas culturas controle e um pico de expressão em 8h após suplementação nas culturas tratadas com doxiciclina. Curiosamente, quando comparamos os níveis de expressão dessas ciclinas nas culturas tratada e não tratada com doxiciclina, podemos observar que há uma diminuição nos níveis de mRNA da Ciclina D1 apenas em 8h após replaqueamento na cultura tratada com doxiciclina, porém nesse tempo não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão de IRF2BP2 entre as culturas. Já a expressão de Ciclina D2 não foi reprimida nas células transduzidas com a IRF2BP2 durante todos os tempos indicados (Figura 4.20).

Também foram avaliados os níveis de expressão dos genes das Ciclinas E (E1 e E2) (Figura 4.20), que são importantes reguladores da transição G₁/S do ciclo celular. Para as duas ciclinas foi possível observar um pico de expressão após 16h de suplementação, com aumentos de aproximadamente 16x para a E1 e de 150x para a E2 em ambas as culturas. Não foram observados níveis de expressão para as duas ciclinas E no tempo de 3h após suplementação nas culturas tratada e não tratada com doxiciclina. Esse resultado está de acordo com o esperado, uma vez que após 3h de replaqueamento, aproximadamente 90% das células ainda se encontram na transição G₀/G₁ do ciclo celular devido a uma sincronização prévia (Figura 4.5A), e, portanto, não havendo expressão dos genes de Ciclina E. Não encontramos diferenças estatísticas na expressão de ambas as Ciclinas E entre as culturas tratada e não tratada com doxiciclina em todos os tempos analisados (Figura 4.20).

Ainda para determinar a re-entrada de células em ciclo celular, foi realizada a análise dos níveis de fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb). Rb é um regulador central da entrada de células no ciclo celular, levando à ativação de genes envolvidos na transição G₁/S mediante hiperfosforilação. Para isso, células NIH3T3-TetR-BP2 foram sincronizadas por confluência e privação de soro e posteriormente replaqueadas com meio contendo 10% SFB por diferentes tempos (0, 12 e 24h). Nos tempos indicados, os extratos proteicos foram obtidos e avaliados por *Western blot* (Figura 4.21). A partir do estímulo proliferativo por suplementação com soro, é possível observar um aumento na proporção de proteínas Rb hiperfosforiladas após 12 e 24h, não havendo diferenças entre as culturas controle e tratada com doxiciclina. Esses resultados sugerem que, a partir de 12h após suplementação com soro, células NIH3T3 sincronizadas progrediram pela fase G₁ do ciclo celular e começaram a entrar em fase S, e que possivelmente essa progressão independe de uma regulação da fosforilação da proteína Rb pela IRF2BP2, já que não foram observadas diferenças nos níveis de hiperfosforilação entre as culturas.

A regulação do ciclo celular é extremamente complexa e envolve diferentes famílias de proteínas além das ciclinas e Rb, como as CDKs e CKIs (DUBRAVKA & SCOTT, 2000). Assim, é necessária a avaliação da expressão desses outros reguladores para tentar entender qual mecanismo de ação da proteína IRF2BP2 no controle da progressão do ciclo celular.

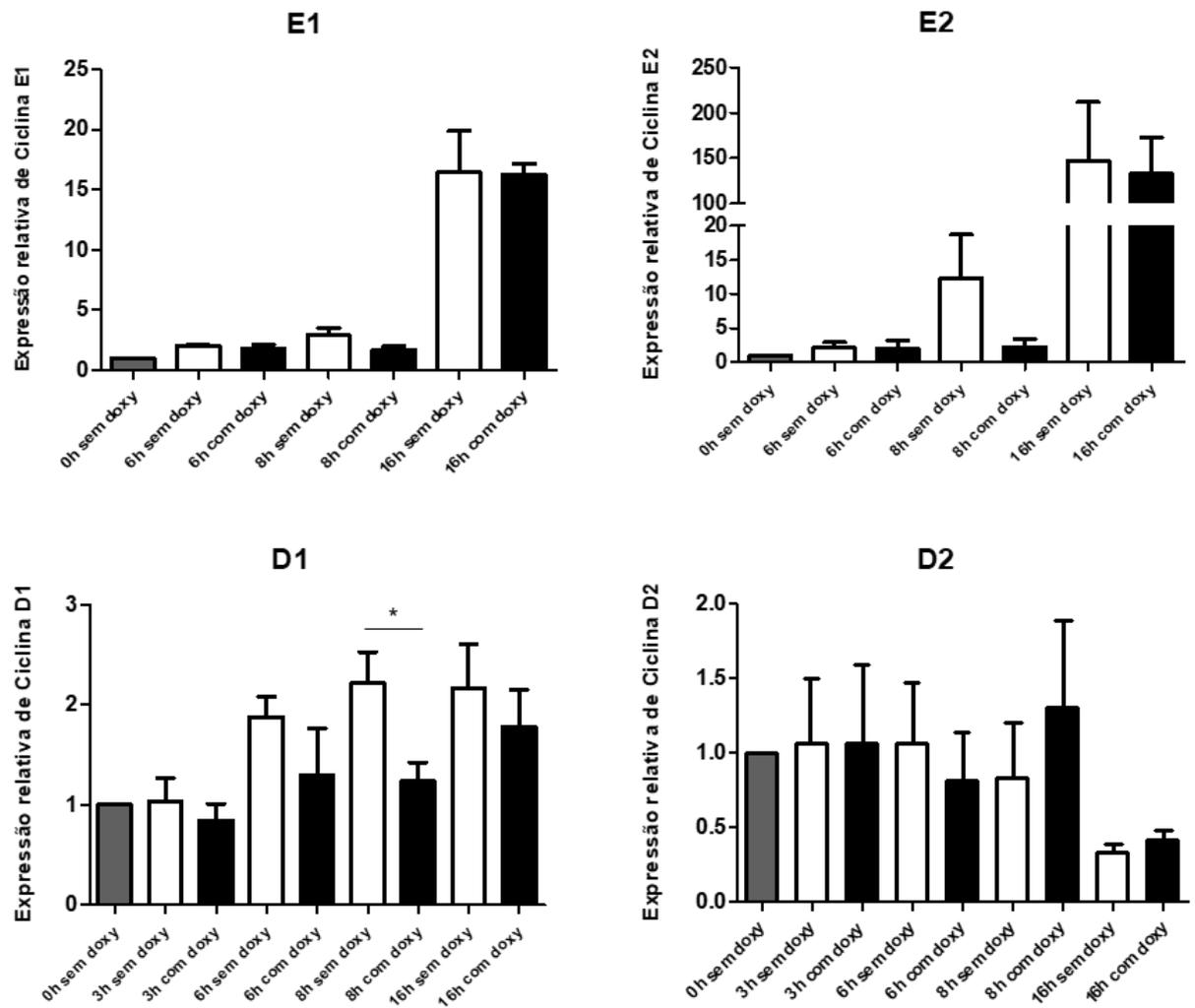


Figura 4.20. A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente não regula a expressão de genes em importantes para a transição G₁/S do ciclo celular em células NIH3T3. Células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas foram suplementadas com meio contendo soro 10% na presença ou ausência de doxiciclina. Extratos de RNA foram preparados utilizando Trizol[®] nos tempos indicados, e a síntese de cDNA foi feita por RT-PCR. cDNAs sintetizados foram usados para avaliar a expressão relativa dos mRNAs das ciclinas D1, D2, E1 e E2 por PCR em tempo real, usando sondas TaqMan[®]. A quantidade de RNA foi normalizada a partir dos níveis de mRNA de HPRT, e a expressão relativa foi considerada 1 para o tempo 0h. Todos os resultados são representativos de quatro experimentos independentes. (*) indica p < 0,05.

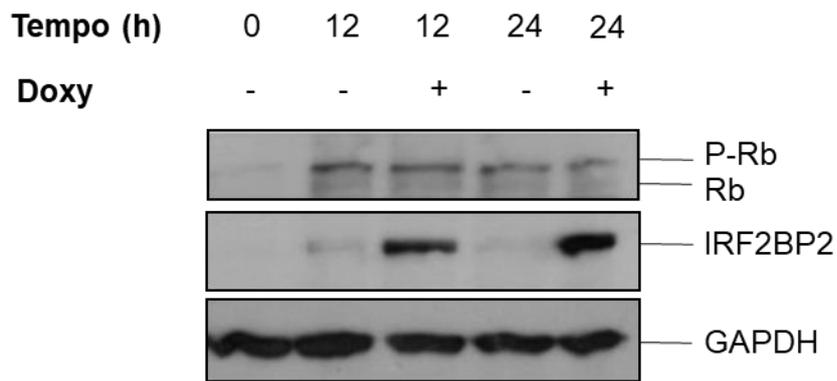


Figura 4.21. A superexpressão de IRF2BP2 aparentemente não regula a expressão da proteína Rb em células NIH3T3. Células NIH3T3-TetR-BP2 sincronizadas foram suplementadas com meio contendo soro 10% na presença ou ausência de doxiciclina. Os extratos proteicos totais foram preparados nos tempos indicados, e então separados por SDS-PAGE. *Western blot* foi realizado utilizando anticorpos específicos contra as proteínas descritas, para análise dos níveis de fosforilação de pRb.

5. DISCUSSÃO

O câncer é uma patologia originada a partir de defeitos nos mecanismos regulatórios que controlam a homeostasia celular (HANAHAN & WEINBERG, 2011). Alguns trabalhos na literatura têm demonstrado a associação da proteína IRF2BP2 na regulação de características essenciais, que, juntas, ditam o desenvolvimento e crescimento tumoral (KOEPEL *et al.*, 2009; TINNIKOV *et al.*, 2009; TENG *et al.*, 2010; CARNEIRO *et al.*, 2011; YEUNG *et al.*, 2011; SECCA *et al.*, 2016), dentre elas a autossuficiência de sinais proliferativos e a insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento celular que contribuem para o descontrole do ciclo celular (HANAHAN & WEINBERG, 2011), porém os mecanismos envolvidos nesta regulação ainda não são bem compreendidos. Baseado nesses dados, este trabalho teve por objetivo estudar o papel da proteína IRF2BP2 na regulação da progressão do ciclo celular e na transformação celular, avaliando a capacidade dessa proteína de reverter um fenótipo carcinogênico *in vitro* e *in vivo*.

Para melhor estudar o papel da proteína IRF2BP2 no controle do ciclo e na transformação celular, optamos por utilizar um modelo de expressão induzível, onde os níveis da proteína são modulados através da utilização de doxiciclina/tetraciclina (Sistema TetOn). Além disso, a utilização da linhagem não transformada NIH3T3, nos permite uma melhor visualização dos fenótipos de transformação celular, etapa importante no processo de carcinogênese.

A sincronização da proliferação de células em cultura é um procedimento amplamente utilizado para estudar os mecanismos que regulam a progressão de células pelo ciclo celular (SCHORL & SEDIVY, 2007). Células sincronizadas são artificialmente induzidas a progredir pelo ciclo celular de maneira homogênea, a partir do enriquecimento de uma população celular em um determinado estágio do ciclo. No presente trabalho, a linhagem de fibroblasto embrionário murino NIH3T3 foi utilizada como modelo de estudo, por ser uma linhagem caracteristicamente não transformada e apresentar inibição de proliferação por contato célula-célula (JAINCHILL *et al.*, 1969). Considerando esses fatos, a sincronização de células da linhagem NIH3T3 foi realizada por confluência e privação de soro e era esperado o arresto observado na fase G₀/G₁ do ciclo celular após este procedimento. Entretanto, a capacidade de restabelecer a proliferação é uma característica fundamental para a utilização de uma população homogênea de células geradas por sincronização (SCHORL e SEDIVY,

2007). Pôde-se confirmar a sincronização de células NIH3T3 após observar o restabelecimento da proliferação após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino.

Neste trabalho foi mostrado que a superexpressão por transdução retroviral do cofator de transcrição IRF2BP2 regula diferencialmente proliferação, morte e transformação celular. Fibroblastos NIH3T3 controle ou superexpressando a proteína, apresentaram fenótipos distintos de proliferação celular, com a IRF2BP2 levando a uma redução no acúmulo de células em cultura (Figuras 4.3A e 4.10A). Além disso, um ensaio clonogênico mostrou que a superexpressão da proteína está associada com a diminuição no número e tamanho de clones formados em cultura (Figuras 4.3B e 4.10B).

Primeiramente, nos perguntamos se a redução da proliferação celular em cultura poderia ser justificada por uma indução de morte celular pela proteína IRF2BP2. Nossos resultados indicam que a superexpressão de IRF2BP2 não é capaz de induzir morte celular por apoptose em fibroblastos NIH3T3 e NIH3T3 transformados, o que foi evidenciada por características tais como fragmentação de DNA (conteúdo de DNA sub-G₀) e exposição de fosfatidilserina (marcação por anexina) (Figuras 4.4A e B ; 4.11A e B; 4.12; 4.13). Portanto, estes dados sugerem que a diminuição da proliferação celular observada em células NIH3T3 não seja devido a uma indução de morte pela proteína IRF2BP2 e sim por outro mecanismo.

Diferentes estudos têm demonstrado a importante função da IRF2BP2 em controlar o ciclo e a proliferação celular e os resultados obtidos neste trabalho estão condizentes com dados já publicados, uma vez que a descrição na literatura é de que a IRF2BP2 funcione como um repressor proliferativo em diferentes linhagens celulares e em modelos *in vivo*, onde camundongos deficientes para a proteína apresentam um severo retardo de crescimento e letalidade perinatal (STADHOUDERS *et al.*, 2015). Koeppel e colaboradores (2009) mostraram que em resposta ao estresse genotóxico, a superexpressão de IRF2BP2 em células U2OS pode induzir mudanças no ciclo celular de células vivas, principalmente diminuindo a população de células em fase S após o tratamento com Act.D, favorecendo, dessa forma, um arresto de ciclo celular e a sobrevivência das células de osteosarcoma. No trabalho desenvolvido por SECCA e colaboradores (2016), foi observado que a superexpressão ectópica de IRF2BP2 em linfócitos primários murinos T CD4 ativados leva à uma diminuição da proliferação e expansão clonal, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de reduzir a expressão das moléculas marcadoras de ativação CD69 e CD25. Um outro estudo identificou a

IRF2BP2 como alvo direto da via Hippo, importante na regulação do crescimento celular (FENG *et al.*, 2020). A superexpressão de IRF2BP2 em duas linhagens de carcinoma hepatocelular (HCC) regula de forma negativa a atividade do gene YAP (*yes-associated protein*) e diminui a expressão dos seus genes alvo. Foi mostrado, através dos ensaios de MTT e formação de colônias, que células superexpressando IRF2BP2 apresentaram uma inibição do crescimento celular e uma diminuição no número de colônias formadas, respectivamente. Além disso, células HCC superexpressando IRF2BP2 foram inoculadas no flanco de animais nude, e de forma interessante, IRF2BP2 foi incapaz de formar tumores quando comparado com o grupo controle.

Em relação à morte celular, a IRF2BP2 é descrita na literatura como sendo um fator antiapoptótico, tanto em células de osteosarcoma (KOEPEL *et al.*, 2009), quando em células de câncer de mama (TINNIKOV *et al.*, 2009; YEUNG *et al.*, 2011). No trabalho desenvolvido por KOEPEL e colaboradores (2009), a IRF2BP2 foi identificada como um alvo direto da proteína p53. Sob condições de estresse genotóxico, induzido pelo tratamento com Actinomicina D, células de osteosarcoma U2OS apresentaram um aumento nos níveis de mRNA de IRF2BP2 dependente da ativação por p53. Além disso, através do ensaio reporter de luciferase, foi observado que a superexpressão ectópica de IRF2BP2 leva à uma inibição de aproximadamente 75% da atividade promotora do gene *BAX* mediada por p53, impedindo ou diminuindo a indução de morte celular após estimulação apoptótica, o que foi observado pela quantificação de células em sub-G₀ após marcação com iodeto de propídio. Já em outro trabalho (YEUNG *et al.*, 2011), foi mostrado que IRF2BP2 é um dos membros de um grande complexo proteico, também formado pelas proteínas EAP1 e IRF2BP1, capaz de reprimir a transcrição do fator pró-apoptótico FASTKD2 em células de câncer de mama. Foi observado, através do ensaio de CHIP, que esse complexo se liga na região 5'UTR do primeiro éxon do gene *FASKD2* e reprime sua transcrição, e dessa forma, a indução de morte celular e esse efeito pode ser revertido pelo *knockdown* de IRF2BP2 usando siRNA. Corroborando com os dados da literatura, nossos resultados indicam que a IRF2BP2 não é capaz de induzir morte celular em células NIH3T3.

Após caracterizar a atividade antiapoptótica da proteína IRF2BP2, nos perguntamos se os fenótipos observados de diminuição da proliferação celular e a redução no número de clones formados em cultura eram consequência de uma alteração na progressão do ciclo celular. Para investigar a função da IRF2BP2 na

progressão do ciclo celular, avaliamos a superexpressão da proteína em células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro. Interessantemente, nossos resultados indicaram que altos níveis de IRF2BP2 induzem uma progressão mais lenta da fase G₀/G₁ para a fase S do ciclo celular (Figuras 4.5A e B; 4.6A e B). Por citometria de fluxo foi possível notar um acúmulo de células na fase G₀/G₁ em diferentes tempos (16h/18h/20h) após suplementação com soro. No ponto de 18h da análise, a diferença no percentual de células em G₀/G₁ era de, aproximadamente, 9% (Figura 4.5) e 16% (Figura 4.6) entre as culturas. Essas diferenças de percentuais de células em G₀/G₁ se mantiveram até 20 horas após o replaqueamento (Figura 4.6). Em relação a este resultado, é importante mencionar que células previamente sincronizadas passam a proliferar de forma não-sincronizada após algumas rodadas de divisão. Além disso, a análise realizada impossibilita a distinção entre células progredindo pelas fases G₁ inicial e G₁ tardio.

Afim de impedir a re-entrada das células em G₁ e conseguir observar melhor o efeito da superexpressão da IRF2BP2 no esvaziamento dessa população, células NIH3T3 foram sincronizadas em G₂/M utilizando o Nocodazol, um potente inibidor da polimerização dos microtúbulos. Corroborando os resultados anteriores, observamos que a superexpressão da IRF2BP2 atrasa a saída das células de G₀/G₁ para a fase S do ciclo celular em células NIH3T3, tanto em células previamente sincronizadas em quiescência quanto em células não sincronizadas (Figura 4.8). Em conjunto, estes resultados indicam que a superexpressão de IRF2BP2 induz uma progressão mais lenta pelo ciclo celular, uma vez que observamos uma redução da frequência de células em fase S e um aumento da frequência de células em fase G₁ em fibroblastos NIH3T3, porém, aparentemente, a IRF2BP2 não regula saída de quiescência, uma vez que observamos o fenótipo de atraso de ciclo em células não sincronizadas em G₀/G₁. Os resultados obtidos com os ensaios de ciclo celular, provavelmente estão relacionados e explicam em grande parte, a diminuição da proliferação e a formação de menos clones em células NIH3T3 com superexpressão da proteína IRF2BP2, já que não encontramos evidências de indução de morte celular nessas células. Além disso, o atraso da proliferação celular nas nossas células, corroboram com os resultados descritos na literatura, onde foi visto que em situações de estresse genotóxico, a superexpressão da proteína IRF2BP2 leva à uma redução da população de células em fase S e um acúmulo de células em G₁, induzindo então, mudanças no perfil do ciclo celular, provavelmente para permitir o reparo no DNA devido aos danos causados pelo estresse genotóxico (KOEPPPEL *et al.*, 2009).

Nos perguntamos também, se o atraso na saída de G₁ para a fase S do ciclo celular em células com altos níveis de IRF2BP2 poderia estar induzindo um estresse replicativo, o qual pode ser definido como a progressão lenta ou a total parada da forquilha de replicação durante a síntese de DNA, levando ao retardo na progressão por fase S e que pode interferir com a integridade do genoma e contribuir para o processo de tumorigênese (BARTKOVA *et al.*, 2005; GORGOULIS *et al.*, 2005). Para isso, comparamos a frequência de células que estavam em fase S do ciclo celular, mas que não incorporaram BrdU entre as culturas tratada e não tratada com doxiciclina por diferentes tempos (Figura 4.7). Os resultados obtidos indicam que a frequência de células que não incorporaram BrdU entre as culturas é bastante similar em todos os tempos avaliados (24h/48h/72h), sugerindo que, possivelmente, a IRF2BP2 não é capaz de induzir estresse replicativo, porém novos experimentos, como a análise da interrupção da progressão da forquilha de replicação através de ensaios de fibras de DNA, são necessários para confirmar esses achados.

Dentre os estudos presentes na literatura, que relacionam a função da proteína IRF2BP2 com a regulação da expressão de genes que participam de diferentes vias biológicas, como o ciclo celular e proliferação celular, a maioria é de cunho descritivo, e por isso, os mecanismos de ação dessa proteína e seus genes alvo ainda são pouco conhecidos.

Atualmente, com o crescimento dos estudos utilizando técnicas de análise de expressão gênica em larga escala, como RNA-seq, é possível avaliar quais vias celulares e quais genes podem estar sendo regulados pela proteína IRF2BP2, utilizando amostras depositadas em bancos de dados públicos, como o GTEx. Estas análises poderiam ajudar a identificar possíveis vias celulares onde a IRF2BP2 tenha um papel fundamental, não só fisiologicamente, mas também para a carcinogênese. Além disso, análises de transcriptomas permitem a correlação da expressão da IRF2BP2 a outros genes, a fim de investigar possíveis genes que regulem ou sejam regulados pela proteína. Os resultados descritos neste trabalho apontam para um notável papel do cofator de transcrição IRF2BP2 no controle da homeostasia celular. Mostramos nesse trabalho, através da análise de amostras de fibroblastos humanos transformados por imortalização celular, que a proteína IRF2BP2 pode regular diferentes vias de sinalização (Figura 4.17), em especial a via de ciclo celular (Figura 4.18), através de uma regulação transcricional diferencial de genes envolvidos, principalmente, na transição G₀/G₁ para a fase S do ciclo, corroborando os dados observados em fibroblastos NIH3T3 (Figura 4.19 e ANEXO II). Observamos que a

expressão de IRF2BP2 se correlaciona de forma inversa com diferentes genes que regulam de forma positiva o ciclo celular. Dentre eles, destacamos os genes que codificam para ciclinas e CDKs, em especial o gene *CCNE2*, que codifica para a proteína nuclear Ciclina E2, a qual forma um complexo com CDK2 e participa da regulação da transição das fases G₁/S do ciclo celular (GOPINATHAN *et al.*, 2011; LIM & KALDIS, 2013). Por outro lado, podemos observar que altos níveis de IRF2BP2 se correlaciona de forma direta com genes que atuam como reguladores negativos do ciclo celular, como por exemplo, o gene *CDKN1A*, que codifica para a proteína p21^{Cip1/Waf1}, um importante inibidor dos complexos ciclina-CDK2/CDK4, sendo um potente regulador da progressão da fase G₁ do ciclo celular (HARPER *et al.*, 1993). Apesar de nossos dados de transcriptoma indicarem um possível papel da IRF2BP2 em regular positivamente a expressão do gene *CDKN1A*, um trabalho na literatura mostrou o contrário (KOEPEL *et al.*, 2009). Nesse estudo, foi observado que a superexpressão de IRF2BP2 em células U2OS leva à inibição da transativação mediada por p53 do gene que codifica para a proteína p21^{Cip1/Waf1}. Esses dados, em conjunto com os resultados de ciclo celular encontrados *in vitro*, sugerem que a proteína IRF2BP2 poderia controlar a progressão do ciclo celular através de uma regulação transcricional negativa de genes importantes na transição entre as fases G₁/S do ciclo celular e regular de forma positiva a transcrição de genes que atuam inibindo essa progressão.

Para confirmar nossos achados e com o objetivo de identificar possíveis genes alvo de regulação pela proteína IRF2BP2, voltamos nossa atenção para a regulação do ciclo celular, analisando os níveis de expressão dos mRNAs de genes importantes para a transição G₁/S do ciclo (Figura 4.20), uma vez que nossos resultados apontam para um papel notável da proteína na regulação dessa transição.

Um dos primeiros genes expressos após estimulação mitogênica é o gene da Ciclina D. As ciclinas do tipo D (D1, D2 e D3) se ligam a CDK4/6 e esse complexo fosforila a proteína Rb, liberando o fator de transcrição E2F para transcrever genes importantes para a entrada na fase S do ciclo celular, como por exemplo, os genes de Ciclina E. Em células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro, observamos que a superexpressão de IRF2BP2 não foi capaz de reprimir a expressão das Ciclinas D1 e D2 em nenhum momento até 16h após a adição de soro. Os genes da Ciclina E (E1 e E2) também são muito importantes para regulação a transição G₁/S do ciclo celular, onde proteínas importantes para a regulação da fase de síntese de DNA são fosforiladas. Nós observamos que células com altos níveis de

IRF2BP2 não são capazes de reprimir a expressão das Ciclinas E1 e E2 quando comparado ao controle em todos os tempos analisados. Esses dados indicam que a proteína IRF2BP2 não é capaz de regular a transcrição dos genes das Ciclinas D e E, porém como a regulação da expressão das ciclinas é muito transiente, além das culturas apresentarem uma heterogeneidade de populações de células, são necessárias outras análises para avaliar uma possível regulação direta dos genes das ciclinas pela IRF2BP2, como CHIP-Seq e ensaio repórter de luciferase.

Ainda para determinar os mecanismos de ação da proteína IRF2BP2 na re-entrada de células do ciclo celular, foi realizada a análise dos níveis de fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) por *Western blot* (Figura 4.21). Rb é um regulador da entrada de células no ciclo celular, levando à ativação de genes envolvidos na transição G₁/S e sua atividade é modulada por fosforilação sequencial pelos complexos Ciclina/CDKs. Seu estado ativo (inibitório) seria causado por uma hipofosforilação e sua subsequente hiperfosforilação levaria então à inibição de Rb e progressão do ciclo celular. Foi observado que células NIH3T3 controle e tratadas com doxiciclina, após o estímulo mitogênico por suplementação com soro (12h/24h), apresentaram a maior parte das proteínas Rb hiperfosforiladas, o que estaria relacionado com a progressão do ciclo celular. Porém, esse resultado vai de encontro com os nossos dados de ciclo celular, que mostram que no tempo de 12h, a maioria das células (aproximadamente 90%) ainda se encontram em G₀/G₁, em ambas as culturas. A regulação do ciclo celular é extremamente complexa e envolve diferentes proteínas além das ciclinas e Rb, como as famílias de proteínas CDKs e CKIs, além de proteínas envolvidas na formação dos complexos pré-replicativos. Portanto, é de grande interesse avaliar quais reguladores do ciclo podem ter seus níveis de expressão regulados pela IRF2BP2 e dessa forma, entender os mecanismos de ação dessa proteína na progressão do ciclo celular.

Em relação à transformação celular, dados da literatura já sugeriram um papel da proteína IRF2BP2 no processo de tumorigênese (NI *et al.*, 2012; NYQUIST *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2015; JOVANOVIC *et al.*, 2016; SHIMOMURA *et al.*, 2016), porém nenhum destes investigou como este cofator transcricional poderia estar regulando este processo. Como citado anteriormente, alguns estudos mostram tumores sólidos e hematopoiéticos cuja a proteína IRF2BP2 apresenta papel importante em sua biologia (NI *et al.*, 2012; NYQUIST *et al.*, 2012; YIN *et al.*, 2015; JOVANOVIC *et al.*, 2016; SHIMOMURA *et al.*, 2016), através de mecanismos de fusão gênica e mutações do tipo *missense* e *nonsense* em sequências codificantes do gene. Fusões gênicas e

rearranjos cromossômicos são frequentemente encontrados em diferentes tipos de câncer, como tumores hematopoiéticos e sarcomas e podem representar importantes marcadores de diagnóstico e prognóstico. As funções biológicas das proteínas híbridas resultantes destas translocações gênicas e mutações pontuais ainda não são conhecidas, porém estão envolvidas com um aumento na probabilidade do desenvolvimento tumoral (RAMALHO-OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Células transformadas *in vitro* adquirem características essenciais para a manutenção do fenótipo de transformação, como: (i) proliferar além da confluência, formando aglomerados celulares com empilhamento sem que haja a inibição de crescimento por contato com as demais células e (ii) crescer na ausência de ancoragem a um substrato, sendo capazes de crescer em suspensão. Portanto, células transformadas podem ser cultivadas em meios de cultura relativamente simples, sem adição de fatores de crescimento.

Com objetivo de investigar o papel da IRF2BP2 na transformação celular, realizamos ensaios de transformação *in vitro*, através da formação de focos em cultura e formação de colônias em meio semissólido, utilizando a linhagem NIH3T3-H-rasV12 e *in vivo* através de um modelo tumoral xenográfico. Nossos dados mostram que a superexpressão de IRF2BP2 induz fenótipos de transformação menos robustos quando comparados ao controle, apresentando um baixo potencial oncogênico, conforme observado pela diminuição nos números de focos (Figura 4.14A) e de colônias formados em cultura (Figuras 4.14B e C) e na diminuição do volume dos tumores formados *in vivo* (Figuras 4.15A e B). Uma vez que a proteína IRF2BP2 é capaz de induzir atraso na progressão do ciclo celular em fibroblastos NIH3T3, isso poderia explicar, em parte, estas diferentes intensidades de transformação celular, estando a regulação da via de ciclo celular influenciando negativamente o processo de transformação.

Corroborando nossos dados de transformação, um estudo mostrou que a expressão ectópica de IRF2BP2 é capaz de reprimir características associadas com o desenvolvimento tumoral. A expressão de IRF2BP2 foi capaz de alterar o perfil do ciclo celular, levando à um aumento da população de células na fase G₁, gerando um arresto do ciclo em células de osteosarcoma, dificultando sua expansão *in vitro* (KOEPPPEL *et al.*, 2009).

O modelo de formação de tumores *in vivo* utilizado no presente trabalho foi importante, pois nos permitiu ter uma ideia do potencial carcinogênico da proteína IRF2BP2. Porém, a carcinogênese induzida pelos modelos xenográficos não

representa de forma fiel o processo de transformação celular que acontece *in vivo*. Portanto, há duas desvantagens principais no uso desses modelos: não permitem o estudo do desenvolvimento tumorigênico e o câncer é tratado como uma doença celular isolada e não como resultado da interação tumor-hospedeiro (HILLMAN *et al.*, 2010). Devido a isso, para avaliar melhor o papel da IRF2BP2 no processo de carcinogênese, é necessário o uso de modelos tumorais mais sofisticados, como o de desenvolvimento tumoral por indução de carcinógenos, pois representam as alterações genéticas que ocorrem no organismo durante o processo de transformação, levando em consideração todas as etapas da tumorigênese: iniciação, promoção e progressão.

Os resultados descritos neste trabalho apontam para um notável papel do cofator transcricional IRF2BP2 na indução de um menor potencial proliferativo, afetando negativamente a proliferação celular através de uma regulação diferencial do ciclo celular, contribuindo para mudanças na homeostase da célula e indicando um possível papel supressor de tumor para esta proteína. Porém, para confirmar esta hipótese, resta ainda elucidar os mecanismos que controlam esse processo. E para isso, são necessários experimentos adicionais onde seja observada a atuação da IRF2BP2 na regulação da transcrição de genes importantes para a prevenção da iniciação tumoral ou na reversão de fenótipos de transformação celular.

Além disso, estudar a reversão dos fenótipos observados quando há superexpressão de IRF2BP2 seria de grande interesse para confirmar nossos achados, e para isso, a utilização de metodologias de *knockout* ou *knock down*, através do uso do sistema *CRISPR* ou shRNA para regular negativamente a expressão de IRF2BP2, nos forneceria uma ideia mais robusta do real papel dessa proteína na biologia da célula.

Portanto, o entendimento de mecanismos supressores de tumor do cofator transcricional IRF2BP2 poderá contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novas estratégias e terapias para o controle de neoplasias.

6. CONCLUSÕES

- A superexpressão de IRF2BP2 reduz a proliferação celular em células NIH3T3 selvagem e transformada;
- A IRF2BP2 não induz morte celular por apoptose em células NIH3T3 selvagem e transformada;
- A superexpressão de IRF2BP2 altera o perfil do ciclo celular em células NIH3T3, levando a um atraso da progressão das fases G₀/G₁ para a fase S do ciclo celular;
- A IRF2BP2 não altera a expressão das Ciclinas D (D1 e D2) e E (E1 e E2) e não altera os níveis de fosforilação da proteína Rb, sugerindo que a diferença de expressão de genes de ciclina e o *status* de fosforilação de Rb não sejam os mecanismos pelos quais a IRF2BP2 atrasa a progressão do ciclo celular;
- A expressão de IRF2BP2 se correlaciona de forma diferencial à expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, especialmente aqueles envolvidos na progressão das fases G₁/S do ciclo celular em amostras de fibroblastos imortalizados;
- IRF2BP2 atua como uma proteína supressora de tumor, sendo capaz de reverter fenótipos robustos de transformação celular *in vitro* e *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, M. et al. Rational development of histone desacetylases inhibitors as anti-cancer agents: a review. **Molec Pharm.**, 68:917-932, 2005.

ADAMS, P. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/CDKs. **Biochim Biophys Acta.**, 1471:123-133, 2001.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell.** Third edition, 1994.

ARRUDA, L. et al. Autologous hematopoietic SCT normalizes miR-16, -155 and -142-3p expression in multiple sclerosis patients. **Bone Marrow Transplant.**, 50(3):380-9, 2015.

BARTKOVA J. et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. **Nature.**, 434:864-70, 2005.

BELL, P., DUTTA, A. DNA replication in eukaryotic cells. **Annu. Rev. Biochem.**, 71:333-371, 2002.

BEROUKHIM R. et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature.**, 463:899–905, 2010.

BERTOLI, C. et al. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 14(8):518-28, 2013.

BRADNER, J. et al. Transcriptional addiction in cancer. **Cell.**, 168:629-643, 2017.

BRUNO, A. et al. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. **Oncotarget.**, 5:5065-75, 2014.

BUNCH, H. Gene regulation of mammalian long non-coding RNA. **Mol Genet Genomics.**, 293(1):1-15, 2017.

BURKE, L.; BANIAHMAS, A. Co-repressors 2000. **FASEB J.**, 14:1876-88, 2000.

BUSHWELLER, J. Targeting transcription factors in cancer - from undruggable to reality. **Nat Rev Cancer.**, 19(11):611-624, 2019.

CAGLAR, H.; AVCI, C. Alterations of cell cycle genes in cancer: unmasking the role of cancer stem cells. **Mol Biol Rep.**10.1007/s11033-020-05341-6, 2020.

CAMPEAU, E. et al. A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. **PLoS One.**, 4(8):e6529, 2009.

CARNEIRO, F. et al. Interferon regulatory factor 2 binding protein 2 is a new NFAT1 partner and represses its transcriptional activity. **Mol Cell Biol.**, 31:2889-2901, 2011.

CHAN, H.; LA THANGUE, N. CBP and p300: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. **Journal of Cell Science.**, 114:2363-2373, 2001.

CHEN, H. et al. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. **Nat Rev Cancer.**, 9:785-797, 2009.

CHEN, H. et al. IRF2BP2 Reduces Macrophage Inflammation and Susceptibility to Atherosclerosis. **Circ Res.**, 117:671-83, 2015.

CHILDS, K.; GOODBOURN, S. Identification of novel co-repressor molecules for Interferon Regulatory Factor-2. **Nucleic Acids Res.**, 31:3016-3026, 2003.

COLLER, H. Regulation of Cell Cycle Entry and Exit: A Single Cell Perspective. **Compr Physiol.**, 10(1):317-344, 2019.

CORCORAN, M. et al. Dysregulation of cyclin dependent kinase 6 expression in splenic marginal zone lymphoma through chromosome 7q translocations. **Oncogene.**, 18(46):6271-7, 1999.

CRUZ, S. et al. Loss of IRF2BP2 in Microglia Increases Inflammation and Functional Deficits after Focal Ischemic Brain Injury. **Front Cell Neurosci.**,11:201, 2017.

DESHPANDE, A. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. **Oncogene.**, 24: 2909–2915, 2005.

DUBRAVKA, D.; SCOTT, D. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. **Cell Research.**, 10: 1 – 16, 2000.

DVIR, A. et al. Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. **Curr Opin Gen Dev.**, 11:209-214, 2001.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev.**, 12:2246-2262, 1998.

ELLEGE, S. Cell Cycle Checkpoints: preventing an identity crisis. **Science.**, 174:1664-1671, 1996.

EZHEVSKY, S. et al. Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G1 cyclin-dependent kinase complexes in vivo. **Mol Cell Biol.**, 21:4773-4784, 2001.

FAGERBERG L. et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Mol Cell Proteomics.**, 13(2):397-406, 2014.

FATICA, A.; BOZZONI, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. **Nat Rev Genet.**, 15(1):7-21, 2014.

FENG, X. et al. The Tumor Suppressor Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2 Regulates Hippo Pathway in Liver Cancer by a Feedback Loop in Mice. **Hepatology.**, 71(6):1988-2004, 2020.

FRIEDBERG, E. How nucleotide excision repair protects against cancer. **Nat Rev Cancer.**, 1:22-33, 2001.

FRIETZE, S., FRNHAM, P. Transcription factor effector domains. **Subcell Biochem.**, 52:261-277, 2011.

FULTON, D. et al. TFCat: the curated catalog of mouse and human transcription factors. **Genome Biol.**, 10, 2009.

GENG, Y. et al. Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. **Oncogene.**, 12:1173-1180, 1996.

GOPINATHAN, L. et al. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development. **Results Probl Cell Differ.**, 53:365-89, 2011.

GORGOULIS, V. et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. **Nature.**, 434:907-13, 2005.

GUO, J. Transcription: the epicenter of gene expression. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology).**, 15(5):409-411, 2014.

HAHN, W.; WEINBERG, R. Rules for making human tumor cells. **N Engl J Med.**, 347:1593-603, 2002.

HALL, M.; PETERS, G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and CDK inhibitors in human cancer. **Adv Cancer Res.**, 68:67-108, 1996.

HAMEL, P.; HANLEY-HYDE, J. G1 cyclins and control of the cell division cycle in normal and transformed cells. **Cancer Invest.**, 15(2):143-52, 1997.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. The hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.**, 144:646-674, 2011.

HARADA, H. et al. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. **Science.**, 259:971-974, 1993.

HARPER, J. et al. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell.**, 75:805-816, 1993.

HARASHIMA, H. et al. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends Cell Biol.**, 23(7):345-56, 2013.

HARTWELL, L.; WEINHART, T. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science.**, 246:629-634, 1989.

HELIN, K. et al. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. **Mol Cell Biol.**, 15:3082-3089, 1993.

HENLEY S.; DICK F. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. **Cell Div.**, 7:10, 2012.

HILLMAN, G. et al. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Sunitinib-Induced Vascular Changes to Schedule Chemotherapy in Renal Cell Carcinoma Xenograft Tumors. **Translational Oncology.**, 3(5):293-306, 2010.

HOUTGRAAF, J.H. et al. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revasc Med.*, 7:165-172, 2006.

IYER, N. et al. P300/CBP and cancer. **Oncogene.**, 23:4225-4231, 2004.

JAINCHILL, J. et al. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. **J. Virol.**, 4:549-553, 1969.

JINNO, S. et al. Oncogenic stimulation recruits cyclin-dependent kinase in the cell cycle start in rat fibroblast. **Proc Natl Acad Sci.**, 96:13197-13202, 1999.

Acad. Sci. USA, 96:13197-13202, 1999.

JOVANOVIC, J. et al. The cryptic IRF2BP2-RARA fusion transforms hematopoietic stem/progenitor cells and induces retinoid-sensitive acute promyelocytic leukemia. **Leukemia.**, 31:747-751, 2017.

KAMB, A. Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer. **Curr Top Microbiol Immunol.**, 227:139-148, 1998.

KASTAN, M.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature.**, 432(7015):316-23, 2004.

KOEPPEL, M. et al. The novel p53 target gene IRF2BP2 participates in cell survival during p53 stress response. **Nucleic Acids Res.**, 37:322-335, 2009.

KORNBERG, R. Eukaryotic transcriptional control. **Trends Cell Biol.**, 12:46-49, 1999.

KNUDSON, A. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci.**, 68:820-823, 1971.

LAMBERT, S. et al. The human transcription factors. **Cell.**, 175:598-599, 2018.

LECCA, P.; PRIAMI, C. Cell Cycle Control in Eukaryotes: A BioSpi model. **Science Direct.**, 180: 51-63, 2007.

LEE, T.; YOUNG, R. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. **Annu Rev Genet**, 34:77-137, 2000.

LEE, T.; YOUNG, R. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. **Cell.**, 152:1237-1251, 2013.

LEMON, B., TIJAN, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factor for gene control. **Genes Dev.**, 15;14:2551-69, 2000.

LEVINE, M.; TIJAN, R. Transcription regulation and animal diversity. **Nature.**, 424:147-151, 2003.

LEW, D.; REED, S. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. **Cell.**, 66:1197-206, 1991.

LIM, S.; KALDIS, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. **Development.**, 140:3079-93, 2013.

LUNDBERG, A.; WEINBERG, R. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two cyclin-CDK complexes. **Mol Cell Biol.**, 18:753 - 761, 1998.

MACKAY, J.; CROSSEY, M. Zinc fingers are sticking together. **Trend Biochem Sci.**, 23:1-4, 1998.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat Rev Cancer.**, 1(3):222-31, 2001.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem Sci.**, 30:630-641, 2005.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, 9:153-166, 2009.

MARTINEZ, E. Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. **Plant Mol Biol.**, 50:925-47, 2002.

MASSAGUÉ, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature.**, 432:298-306, 2004.

MASUMI, A. et al. The histone acetylase PCAF is a phorbol-ester-inducible coactivator of the IRF family that confers enhanced interferon responsiveness. **Mol Cell Biol.**, 19:1810-20, 1999.

MEYERSON, M.; HARLOW, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. **Mol Cell Biol.**, 14:2077-2086, 1994.

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

MORGAN, D. The cell cycle: principles of control. **New Science Press**, 2007.

MURRAY, A.; KIRSCHNER, M. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell state. **Nature.**, 339:275-280, 1989.

MURRAY, A. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. **Cell.**, 116:221–34, 2004.

NEVINS, J. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. **Cell Growth Diff.**, 9:585-593, 1998.

NGUYEN, H. et al. The growing family of interferon regulatory factors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 8:293-312, 1997.

NI, I. et al. Translocation t(11;14) (q13;q32) and genomic imbalances in multi-ethnic multiple myeloma patients: a Malaysian study. **Hematol Rep.**, 4:e19, 2012.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis.**, 21:3-9, 2006.

NOBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. **Annu. Rev. Biochem.**, 61:441-470, 1992.

NYQUIST, K. et al. Whole-transcriptome sequencing identifies novel IRF2BP2-CDX1 fusion gene brought about by translocation t(1;5)(q42;q32) in mesenchymal chondrosarcoma. **PLoS One.**, 7:e49705, 2012.

OGBOURNE, S.; ANTALIS, T. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. **Biochem J.**, 331 (Pt 1):1-14, 1998.

OHTANI, K. et al. Regulation of cyclin E gene by transcription factor E2F. **Proc Natl Acad Sci.**, 92:12146-12150, 1995.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nat Rev Cancer.**, 17(2): 93–115, 2017.

PALAZZO, A.; GREGORY, T. The case for junk DNA. **PLoS Genet.**, 10(5):e1004351, 2014.

PARDEE, A. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci.**, 71:1286-1290, 1974.

PATTERSON, A. et al. Molecular Regulation of Carcinogenesis: Friend and Foe. **Toxicol Sci.**, 165(2):277-283, 2018.

PAVLETICH, N. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk's their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitor. **J Mol Biol.**, 287: 821 – 828, 1999.

PHILLIPS, T. Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. **Nature Education.**, 1:199, 2008.

POON, R. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. **Methods Mol Biol.**, 1342:3-19, 2016.

RAMALHO-OLIVEIRA, R. et al. IRF2BP2: A new player in the regulation of cell homeostasis. **J Leukoc Biol.**, 1–7, 2019.

RAZIN, S. et al. Transcription controlling regulatory elements of the eukaryotic genome. **Mol Biol.**, 49:212-223, 2015.

REITER, F. et al. Combinatorial function of transcription factors and cofactors. **Curr Opin Genet Dev.**, 43:73-81, 2017.

REMÉNYI, A. et al. Combinatorial control of gene expression. **Nat Struct Mol Biol.**, 11:812-815, 2004.

RUAS, M.; PETERS, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. **Biochim Biophys Acta.**, 1378:115-177, 1998.

SCHMIDT, E. et al. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. **Cancer Res.**, 54(24):6321-4, 1994.

SCHORL, C., SEDIVY, J. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. **Methods.**, 41:143-150, 2007.

SCHULZE, A. et al. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. **Proc Natl Acad Sci.**, 92:11264-11268, 1995.

SECCA, C. et al. IRF2BP2 transcriptional repressor restrains naive CD4 T cell activation and clonal expansion induced by TCR triggering. **J Leukoc Biol.**, 100:1081-1091, 2016.

SHANDILYA, J.; ROBERTS, S. The transcription cycle in eukaryotes: from productive initiation to RNA polymerase II recycling. **Biochim Biophys Acta.**, 1819:391-400, 2012.

SHERR, C. Cancer cell cycles. **Science.**, 274:1672-1677, 1996.

SHERR, C.; Mc CORMICK, F. The RB and p53 pathways in cancer. **Cancer Cell.**, 2:103 – 112, 2002.

SHERR, C.; ROBERTS, J. Cdk inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. **Genes Dev.** 13:1501-1512, 1999.

SHIMOMURA, Y. et al. New variant of acute promyelocytic leukemia with IRF2BP2-RARA fusion. **Cancer Sci.**, 107:1165-1168, 2016.

SIDOROVA, J.; BREEDEN L. Precocious G1/S transitions and genomic instability: the origin connection. **Mutat Res.**, 532(1-2):5-19, 2003.

SIGGERS, T. et al. Non-DNA-binding cofactors enhance DNA-binding specificity of a transcriptional regulatory complex. **Mol Syst Biol.**, 7:555, 2011.

SILVA, E.; IDEKER, T. Transcriptional Responses to DNA Damage. **DNA Repair.**, 79:40-49, 2019.

SOUTOURINA, J. Transcription regulation by the mediator complex. **Mol Cell Biol.**, 19:262-274, 2017.

SPERLING, S. Transcriptional regulation at a glance. **BMC Bioinformatics.**, 8:1-6, 2007.

SPROUL, D et al. The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes. **Nat Rev Genet.**, 6(10):775-81, 2005.

STADHOUDERS, R. et al. Control of developmentally primed erythroid genes by combinatorial co-repressor actions. **Nat Commun.**, 23;6:8893, 2015.

STILLMAN, B. Origin recognition and the chromosome cycle. **FEBS Lett.**, 579:877-884, 2005.

TENG, A. et al. IRF2BP2 is a skeletal and cardiac muscle-enriched ischemia-inducible activator of VEGFA expression. **FASEB J.**, 24:4825-34, 2010.

- TENG, A. et al. Identification of a phosphorylation-dependent nuclear localization motif in interferon regulatory factor 2 binding protein 2. **PLoS One.**, 6: e24100, 2011.
- TINNIKOV, A. et al. Identification of a novel pathway that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells. **Cancer Res.**, 69:1375-82, 2009.
- TODESCHINI, A. et al. Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. **Trends Genet.**, 30:211-9,2014.
- TSAI, T. et al. Tumor suppressor gene alteration in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of retinoblastoma (Rb) and p53 gene expression in lymphoblasts of patients with de novo, relapsed, or refractory ALL treated in Southwest Oncology Group studies. **Leukemia.**, 10:1901- 1910, 1996.
- VAQUERIZAS, J. et al. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. **Nat Rev Genet.**, 10:252-63, 2009.
- VAUGHAN, P. et al. Cell cycle regulation of histone H4 gene transcription requires the oncogenic factor IRF-2. **J Biol Chem.**, 273:194-9, 1998.
- VOLGELSTEIN, B.; KINZLER, K. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med.**, 10:789-99, 2004.
- WANG, Y. et al. Involvement of IFN regulatory factor (IRF)-1 and -2 in the formation and progression of human esophageal cancers. **Cancer Res.**, 67:2535-2543, 2007.
- WEINBERG, R. The biology of cancer. **Garland Science**, 2007.
- WELCH, P.; WANG, J. A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. **Cell**, 75:779-790, 1993.
- WRAY, G. et al. The Evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. **Mol Biol Evol.**, 20:1377-1419, 2003.

WÖLFEL, T. et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. **Science.**, 269(5228):1281-4, 1995.

XIE, R. et al. Forced expression of the interferon regulatory factor 2 oncoprotein causes polyploidy and cell death in FDC-P1 myeloid hematopoietic progenitor cells. **Cancer Res.**, 62:2510-2515, 2002.

YANG, V. Cyclins. **Physiology of the Gastrointestinal Tract** (Sixth Edition), 2018.

YAO, G. Modelling mammalian cellular quiescence. **Interface Focus.**, 4(3):20130074, 2014.

YEUNG, K. et al. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. **Mol Cell Biol.**, 31:2287-98, 2011.

YIN, C. et al. Identification of a novel fusion gene, IRF2BP2-RARA, in acute promyelocytic leukemia. **J Natl Compr Canc Netw.**, 13:19-22, 2015.

YOUNG, R. Control of the embryonic stem cell state. **Cell.**, 144:940-954, 2011.

8. ANEXOS

8.1 Anexo I – Protocolo CEUA para utilização dos animais nos experimentos *in vivo*.



PARECER DE AVALIAÇÃO DE PROJETO SUBMETIDO À CEUA – INCA

Protocolo CEUA - INCA nº 004/13

Parecer nº 004/13

Pesquisador: João Paulo de Biaso Viola	
Título do projeto: Estudo do Papel dos Fatores de Transcrição NFAT na Regulação Gênica e Estudo da Influência do Metabolismo Tumoral na Ativação e Função de Células T CD8+	
Data de entrada: 18/02/2013	Data da reunião: 27/02/2013
Situação do Projeto: APROVADO	
Considerações e Parecer:	
<p>Ao analisar o projeto de pesquisa "Estudo do Papel dos Fatores de Transcrição NFAT na Regulação Gênica e Estudo da Influência do Metabolismo Tumoral na Ativação e Função de Células T CD8+", tendo como pesquisador responsável João Paulo de Biaso Viola, verificou-se que o mesmo encontra-se em conformidade com o Regimento Interno desta Comissão e os requisitos éticos na experimentação animal. Desta forma, classifico o protocolo como: APROVADO.</p> <p>Informo que o solicitante possui o prazo de 180 dias a contar da data de hoje para apresentar o relatório parcial de atividades relacionadas ao projeto aprovado e, após o término de validade do mesmo, o prazo de 30 dias para apresentar o relatório final, ambos em modelo aprovado pela CEUA-INCA.</p>	

Rio de Janeiro, 26 de março de 2013.

Renata Batista da Silva Loza Telleria
Coordenadora da CEUA-INCA

8.2 Anexo II – Gráficos de correlação entre a expressão de IRF2BP2 e a expressão de genes envolvidos no ciclo celular.

