



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Estudo do papel desempenhado
pela proteína anexina A2 na
regulação de vias de transdução de
sinal ativadas por Ras**

Fábio Miguel Vicente Anastácio

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Faro, Portugal
2015



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Estudo do papel desempenhado
pela proteína anexina A2 na
regulação de vias de transdução de
sinal ativadas por Ras**

Fábio Miguel Vicente Anastácio

Dissertação de Mestrado orientada pela Doutora Patrícia
Madureira

e co-orientada pela Professora Leonor Cancela

Faro, Portugal
2015

Título do trabalho: “Estudo do papel desempenhado pela proteína anexina A2 na regulação de vias de transdução de sinal ativadas por Ras”

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright Fábio Miguel Vicente Anastácio

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Doutora Patrícia Madureira por me ter orientado e aturado durante todo o projeto, pela paciência e horas perdidas na escolha e definição dos parâmetros e tema do projeto e claro por toda a sabedoria que me transmitiu.

A todos os professores do mestrado de Biologia Molecular e Microbiana porque sem eles nada poderia ter sido feito.

A todo o pessoal do CBMR que, diretamente ou indiretamente contribuíram para a sua realização.

E também a algumas pessoas em particular, como à Gisela e ao Tom que estiveram sempre presentes naqueles momentos em que precisava de juízo!

À minha família, em especial pais e avós, mas ainda mais em especial à minha mãe, que sempre me ajudou em todas as etapas da minha vida incluindo esta, entre preocupações, telefonemas e mensagens que me ajudaram a concluir mais uma etapa.

À Cláudia, que me acompanhou em todas as etapas deste projeto, foi sem dúvida alguma uma grande companheira, que me alegrou e aturou a todas as horas.

A todas essas pessoas um grande muito obrigado.

Resumo

As Espécies Reativas de Oxigénio (ERO), têm a capacidade de oxidar o DNA o que leva à ocorrência de mutações génicas, estando o desenvolvimento do cancro intimamente relacionado com os genes que sofrem mutações.

O oncogene *Ras* é um dos genes que se encontra frequentemente mutado no cancro e está associado à sobre produção de ERO pelas vias de transdução de sinal responsáveis pela ativação das NADPH oxidases. A sobre-expressão de *Ras* induz constitutivamente a expressão de *Nox1* que irá produzir o anião superóxido (O_2^-) que será subsequentemente convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A anexina A2 é uma proteína antioxidante que interage diretamente com o H_2O_2 convertendo-o em H_2O e O_2 . Esta proteína está comumente sobre-expressa numa grande variedade de cancros. No entanto, o papel desempenhado pela anexina A2 em células cancerígenas que expressam o oncogene *Ras* não foi ainda estudado.

Neste estudo foram analisadas por *western blot* vias de sinalização induzidas por *Ras* e proteínas do sistema antioxidante em duas linhas celulares distintas (MDA-MB 231 e HT1080) com *knockdown* para a anexina A2 e controlo ambas sem e com sobre-expressão de *Ras* oncogénico. De seguida foram realizados ensaios com ciclohexamida e actinomicina-D para avaliar se a sobre-expressão do oncogene *Ras* e o *knockdown* de anexina A2 teriam efeito sobre a estabilidade proteica e mRNA, respectivamente. Por fim as linhas celulares foram submetidas a ensaios de viabilidade (MTT) e à medição de ERO (DCF-DA).

Os resultados demonstraram um aumento na expressão da via de sinalização PI3-K/Akt e da proteína do sistema antioxidante peroxirredoxina II em células *knockdown* para a anexina A2 e a sobre-expressar *Ras* comparativamente com as células controlo. A análise da estabilidade proteica demonstrou uma maior estabilização da proteína peroxirredoxina II e *Ras* em células com depleção de anexina A2. Os ensaios de viabilidade celular e medição de ERO demonstraram um maior número de células e uma maior produção de ERO em células a sobre-expressar *Ras*, respetivamente.

Palavras-chave: Espécies Reativas de Oxigénio (ERO), anexina A2, *Ras* oncogénico, vias de sinalização celular, proteínas antioxidantes.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are oxygen containing molecules that have the ability to oxidize DNA leading to gene mutations. The development of cancer is closely related to mutagenesis. The *Ras* proto-oncogene is frequently mutated in cancer and is associated with over production of ROS by signal transduction pathways responsible for the activation of NADPH oxidases. Ras over-expression constitutively induces the expression of Nox1 that will produce the superoxide anion (O_2^-) which will be subsequently converted to hydrogen peroxide (H_2O_2). The protein annexin A2 directly interacts with H_2O_2 converting it into H_2O and O_2 . Annexin A2 is over-expressed in a large variety of cancers. However the role of annexin A2 in cancer cells over-expressing the Ras oncogene has not been studied. In this study I have evaluated by western blotting the expression of signaling pathways downstream of Ras and proteins of the cellular antioxidant system in two different cell lines (MDA-MB 231 and HT1080) with *knockdown* for annexin A2 and respective control either non expressing or over-expressing oncogenic H-Ras. Then tests were carried out with cycloheximide and actinomycin D to assess whether overexpression of the Ras oncogene, and the knockdown of annexin A2 have or not effect on protein and mRNA stability, respectively. Finally the cell lines were subjected to viability tests (MTT) and ROS production measurement assay (DCF-DA). The results demonstrated an increased activation of the PI3K/ Akt signaling pathway as assessed by P-Akt western blotting in the annexin A2 knockdown cells over-expressing H-Ras, compared to all other cells analyzed. I also observed enhanced expression of the antioxidant protein, PRDX II in these cell lines. Assays for assessing protein stability demonstrated greater stability of Ras and peroxiredoxin II proteins in annexin A2 depleted cells. Viability and ROS measurement assays demonstrated an increase number of cells and ROS production in cells over-expressing oncogenic Ras.

Keywords: Reactive oxygen species (ROS), Annexin A2, oncogenic Ras, cellular signaling pathways, Antioxidant proteins.

Índice

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1 - Célula Cancerígena/ Cancro	1
1.2 - (Onco) genes e cancro	3
1.2 - Oncogene Ras	4
1.2.1 - Vias de sinalização ativadas por Ras.....	5
1.3 - Espécies reativas de oxigénio.....	7
1.3.1 - Organelos produtores de ERO	9
1.4 - Proteínas antioxidantes	11
1.4.1 - Antioxidantes enzimáticos.....	12
1.5 - Anexina A2.....	13
2. Objetivos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1 - Materiais.....	17
3.1.1 - Equipamentos.....	17
3.1.3 - Géis para SDS-PAGE.....	18
3.1.4 – Plasmídeos	19
3.1.5.1 - Linhas celulares	20
3.1.6 - Anticorpos	22
3.2 Métodos.....	23
3.2.1 - Cultura de células	23
3.2.2 - Congelação de células – <i>stocks</i> celulares.....	24
3.2.3 - Estabelecimento das linhas celulares para experiências	24
3.2.4 - Estabelecimento de linhas celulares a sobre-expressar Ras oncogénico e <i>knockdown</i> para a anexina A2	25
3.2.5 - Ensaio com ciclohexamida e actinomicina D	26
3.2.6 - Quantificação proteica	27

3.2.7 - Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	27
3.2.8 - <i>Western Blotting</i>	28
3.2.9 - Ensaio de viabilidade – MTT.....	29
3.2.10 - Medição de espécies reativas de oxigénio	30
3.2.11 - Análise estatística.....	30
4. Resultados.....	31
4.1 Estabelecimento de linhas celulares.....	31
4.2 Análise das vias de sinalização celular.....	32
4.3 Análise das proteínas do sistema antioxidante.....	34
4.4 - Análise da estabilidade proteica.....	36
4.4.1 - Ensaio com cicloheximida	36
4.4.2- Ensaio com actinomicina D	38
4.3 - Ensaio de viabilidade celular – MTT	39
5. Discussão.....	43
5.1 - Análise da expressão das vias de sinalização celular e das proteínas do sistema antioxidante.....	44
5.2 - Análise da estabilidade proteica e do mRNA	45
Ensaio com ciclohexamida e actinomicina D	45
5.3 - Ensaio de viabilidade celular – MTT	46
5.4 - Medição da concentração de ERO	47
6 - Conclusões	49
7 - Perspetivas Futuras	50
8 - Bibliografia	51

Índice de figuras

Figura 1.1 – Mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor.....	3
Figura 1.2 - Ciclo de sinalização de Ras.....	5
Figura 1.3 - Esquema demonstrativo dos efeitos das ERO na progressão tumoral.....	8
Figura 1.4 - Modelo de funcionamento da enzima Nox1 quando ativada por Ras.....	10
Figura 1.5 - Modelo da função antioxidante desempenhada pela anexina A2.....	14
Figura 4.1 – Descrição das linhas celulares, após inserção do shRNA referente à anexina A2 e respetivo controlo (p36-4 e P36-scramble) e do cDNA referente ao HRas (pBABE e pBABE HRas-v12).....	31
Figura 4.2 – Descrição das linhas celulares, após inserção do shRNA referente à anexina A2 e respetivo controlo (p36-4 e P36-scramble) e do cDNA referente ao HRas (pBABE e pBABE HRas-v12).....	32
Figura 4.3 – Western blotting para análise das vias de sinalização ativadas por Ras.....	35
Figura 4.4 – Western blotting para análise das vias de sinalização ativas por Ras.....	36
Figura 4.5 - Análise da estabilidade proteica em células HT1080 e MDA-MB 231 submetidas a tratamento com ciclohexamida.....	37
Figura 4.6 – Análise da estabilidade do mRNA em células HT1080 submetidas a tratamento com actinomicina D.....	38
Figura 4.7 - Ensaio de viabilidade celular MTT nas células HT1080 com knockdown para a anexina A2 (p36-4) e respetivo controlo (p36-scramble) com sobre-expressão de H-Ras (H-Ras) e controlo (pBABE).....	39
Figura 4.8 - Western blotting de células MDA-MB 231 knockdown para a anexina A2, sem ou com sobre-expressão de H-Ras.....	41
Figura 4.9 - Medição da concentração de ERO pelo ensaio DCF-DA em células MDA-MB 231 com knockdown para a anexina A2 (p36-3 e p36-4) e respetivo controlo (p36-scramble) com sobre-expressão de H-Ras (H-Ras) ou controlo (pBABE).....	42

Índice de tabelas

Tabela 3.1 – Descrição da composição dos géis para SDS-PAGE.....	18
Tabela 3.2 - Descrição dos plasmídeos utilizados para <i>knockdown</i> da anexina A2.....	19
Tabela 3.3 - Descrição dos plasmídeos utilizados para a sobre-expressão de H-Ras.....	20
Tabela 3.4 - Identificação, descrição e origem celulares.....	20
Tabela 3.5 - Descrição dos anticorpos utilizados.....	22

Lista de Abreviaturas

A

Akt- Protein kinase B;

APC- Adenomatous polyposis coli;

ATCC- *American Type Culture Collection*;

B

BAD- Bcl-2-associated death promoter;

BCA-*Bicinchoninic acid*;

BSA – *Bovine serum albumin*; albumina de soro bovino;

C

CTE- Cadeia Transportadora de Electrões;

D

DCF-DA- diclorofluoresceína diacetato

DMEM- *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; DMSO- Dimetilsulfóxido;

DNA- *deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico

E

ECL- enhanced chemiluminescence

EGF- *Epidermal growth factor*; fator de crescimento epidermal;

EGFR- *Epidermal growth factor receptor*; recetor do fator de crescimento epidermal;

ERK- extracellular signal-regulated kinase

F

FBS – *Fetal bovine serum*; soro bovino fetal;

G

GTP- Guanina Trifosfato;

GDP- Guanina Difosfato;

GSH- Glutathiona reduzida;

H

H₂O₂- Peróxido de hidrogénio

HRP –*Horseradish peroxidase*; peroxidase de rábano;

K

KGDH- enzima desidrogenase ketoglutarato

M

MAPK- Mitogen-activated protein kinase

MPTP- Poro permeável de transição mitocondrial

N

NaCl- Cloreto de Sódio;

NaVO₄ – Ortovanadato de sódio;

NO- Oxido Nítrico;

NP40 – *Nonidet P40 substituto*, surfactante não iónico;

O

O₂⁻ Anião Superóxido;

O₂- Oxigénio;

OH- Radical hidroxilo

P

p36 – proteína de peso molecular de 36 KDa; também denominada anexina A2;

PBS – *Phosphate buffer saline*; tampão fosfato salino;

PDGF- *Platelet-derived growth factor*

PDGFR- Platelet-derived growth factor receptor

PDH- desidrogenase de piruvato

PI3-K- Phosphatidilinositol 3-kinase

PIP-2- Phosphatidilinositol 4,5 – biphosphate;

PIP-3- Phosphatidilinositol 4,5 – triphosphate;

PTEN- Phosphatase and tensin homolog

pRb- *retinoblastoma protein*

R

ROO- Radicais peroxilo

S

SDS – *Sodium dodecil sulphate*; dodecilsulfato de sódio;

SDS-PAGE – *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*; electroforese desnaturante em gel de poliacrilamida;

SH2- Scr homology 2

shRNA - *Short hairpin RNA*;

TBS-T – *Tris buffer saline* – Tween 20; tampão Tris salino - Tween 20;

TEMED – Tetrametiletlenodiamina;

Trx- Tiorredoxina

1. Introdução

1.1 - Célula Cancerígena/ Cancro

O organismo humano é constituído por uma grande variedade de tipos celulares e tecidos podendo o cancro iniciar-se a partir de qualquer um deles. No processo de se tornar cancerígena, a célula, sofre mutações ao nível do DNA que irão alterar a sua fisiologia de modo a que se torne independente das vias de transdução de sinal que controlam a sua sobrevivência e proliferação, diferenciando-as das células normais. (Hanahan, Weinberg, & Francisco, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011; Hejmadi, 2010; Koeffler, McCormick, & Denny, 1991; Weinberg, 2014).

A iniciação e progressão do cancro depende de diversos fatores; estes podem ser fatores intrínsecos, como mutações hereditárias, alterações hormonais, condições imunológicas e mutações ocorridas devido ao metabolismo celular; ou fatores extrínsecos como tabagismo, alcoolismo, radiação, xenobióticos e infeções causadas por vírus ou bactérias. Estes fatores podem atuar separadamente ou em conjunto, resultando num ambiente anormal para a célula. (Hanahan et al., 2000; Hejmadi, 2010)

A tumorigénese engloba múltiplos passos e uma variedade de genes que codificam para proteínas com diversas funções que se complementam na transformação de uma célula normal em cancerígena.

As mutações génicas são aleatórias, não ocorrem apenas num determinado tipo de genes, sendo a probabilidade de ocorrência igual entre todos eles. É de salientar também que as mutações não são todas iguais, isto é nem todas contribuem para a transformação de uma célula normal em cancerígena. O que determina o desenvolvimento do cancro são o tipo de genes que sofrem mutações nomeadamente genes que possuam funções essenciais para a célula como aqueles que regulam o crescimento celular: os que promovem o ciclo celular – oncogenes – estes apresentam várias classes como: fatores de crescimento e respetivos recetores – EGF/EGFR, PDGF/PDGFR; genes transdutores de sinais – dando origem a proteínas cinase (i.e. *abl*, *raf-1*, *scr*); ou proteínas G (i.e. *H-ras*, *K-ras*, *N-ras*); genes de fatores de transcrição (i.e. *erb A*, *fos*, *jun*, *c-myc*) e reguladores de *checkpoints* do ciclo celular (i.e. *ciclina D*).

(Anderson, Reynolds, You, & Maronpot, 1992; Hanahan et al., 2000; Schulz, 1996; Weinberg, 2014)

Em células cancerígenas, é também frequente observarem-se mutações em genes que inibem o crescimento celular – genes supressores de tumor – que se dividem em três classes: fatores de transcrição – p53, WT1; repressores do ciclo celular – Rb, INK4; reguladores de proteínas proto-oncogênicas – APC, PTEN. Neste caso, a inativação destes genes contribui para a transformação de uma célula normal numa célula cancerígena. Estes genes podem ser inativados por mutações que causam a alteração estrutural da proteína codificada por esse mesmo gene, ou por mutações que causam uma diminuição da expressão proteica como por exemplo metilação dos promotores e/ou translocações (Hanahan et al., 2000; Lozano, Hulboy, & The, 1995; Weinberg, 2014., Cooper GM, 2000).

A sobre-expressão e/ou ativação de oncogenes e a supressão e/ou inativação de genes supressores de tumor irão promover a oncogênese.

Os genes que regulam a apoptose podem também ser alvo de mutações. Assim a inibição de genes pró-apoptóticos (*p53*, *BAD*) e à ativação de genes anti-apoptóticos (*Bcl-xl*, *Bcl2*) permitem a proliferação de células com mutações no seu genoma promovendo a tumorigênese (Weinberg, 2014). Mutações em genes que promovem a sobrevivência celular, como – *PI3-K/Akt*, *MAPK/ERK*; e no gene que codifica para a enzima telomerase tornando a célula cancerígena imortal, têm um papel fundamental no processo de carcinogênese. (Weinberg, 2014)

Para a continuidade e persistência das mutações os genes reparadores de DNA encontram-se também muitas vezes inativos –*BRCA1*, *BRCA2* (Weinberg, 2014)

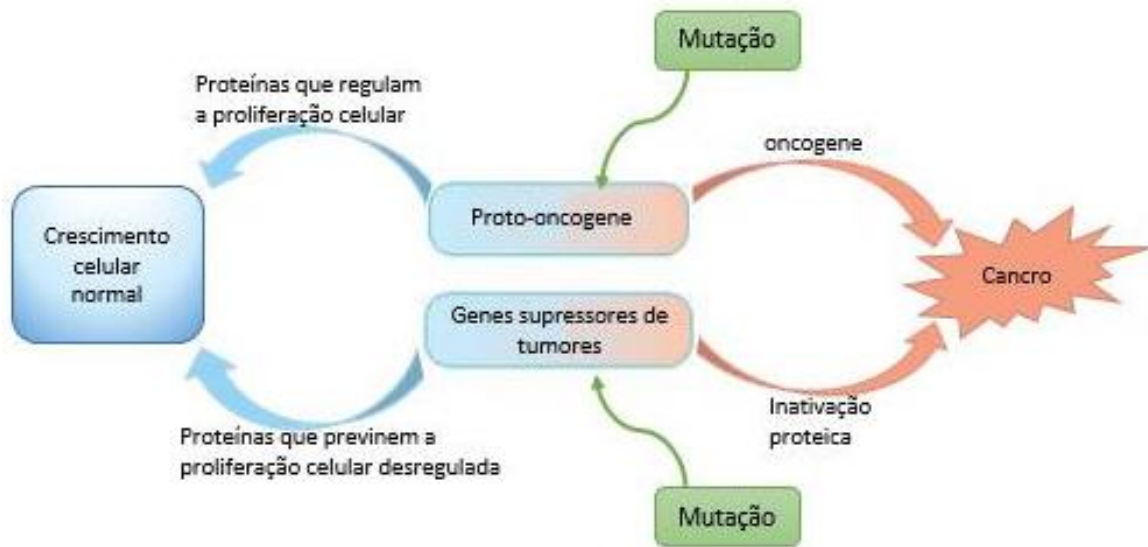


Figura 1.1 – Mutações em proto-oncogenes e genes supressores de tumor. O desenvolvimento do cancro está intimamente relacionado com o tipo de genes que sofrem mutações nomeadamente genes que possuam funções essenciais para a célula, como os proto-oncogenes e genes supressores de tumor. (Adaptado de http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Proto-Oncogenes&lang=3)

1.2 - (Onco) genes e cancro

Habitualmente as mutações ocorridas nestes genes são na sua grande maioria dominantes, e são as versões mutadas dos proto-oncogenes que são denominadas oncogenes. (Anderson et al., 1992; Croce, 2008; Wallis & Macdonald, 1999).

Por regra os oncogenes codificam proteínas que controlam a proliferação celular e/ou a apoptose. Podem ser ativados por modificações estruturais, fusões génicas, mutações, e por amplificação. Estes quatro mecanismos irão causar alterações na estrutura do oncogene e/ou um aumento da sua expressão. As mutações ocorrem maioritariamente no processo de tornar a célula cancerígena e respetiva progressão enquanto que a amplificação génica ocorre preferencialmente durante a progressão tumoral (Anderson et al., 1992; Croce, 2008; Weinberg, 2014).

Durante o processo de transformação da célula maligna os oncogenes cooperam entre si de modo a acelerar o processo sendo necessário pelo menos dois oncogenes. Por exemplo o gene *BCL2* possui a capacidade de inativar a apoptose, contudo não é capaz

de induzir a proliferação celular como é o caso dos oncogenes *Ras* e *Myc*, pelo que é necessária a cooperação entre estes genes para promover a transformação de uma célula normal numa célula cancerígena (Croce, 2008; Shortt & Johnstone, 2012).

Os oncogenes encontram-se divididos em seis classes: fatores de crescimento, fatores de transcrição, remodeladores da cromatina, transdutores de sinal, recetores de fatores de crescimento e reguladores de apoptose (Croce, 2008; Weinberg, 2014).

1.2 - Oncogene Ras

Ras é um dos oncogenes que se encontra mais frequentemente mutado (cerca de 30%) no cancro sendo que estas mutações estão associadas a um ganho de função (Lowy & Willumsen, 1993; Prior, Lewis, & Mattos, 2012; Pylayeva-Gupta, Grabocka, & Bar-Sagi, 2011).

No ser humano existem três genes que codificam para quatro proteínas: HRAS, NRAS, KRAS4A, KRAS4B (estas duas últimas diferem na maneira em que o *splicing* ocorre sendo ambas variantes de KRAS). Estas proteínas fazem a ligação entre os recetores membranares e vias efetoras no interior celular. As proteínas Ras alternam entre a conformação *on* e *off* conforme a sua ligação a GTP (Guanina Trifosfato) ou a GDP (Guanina Difosfato), respetivamente. No proto-oncogene a conformação adotada pela proteína é regulada pelos *GEF's* (*Guanine nucleotide exchange factors*) que irão estimular e promover a preferência da ligação ao GTP ao invés de GDP, alterando a conformação de estado *off* para *on*. A função GTPase da proteína Ras é controlada pelas *GAP's* (*GTPase-activating proteins*) que irão acelerar o processo de hidrólise levado a cabo pela proteína Ras hidrolisando o GTP a GDP, ficando a proteína em estado *off* (Cox & Der, 2003; Fernández-medarde & Santos, 2011; Pylayeva-Gupta et al., 2011; Rajalingam, Schreck, Rapp, & Albert, 2007).

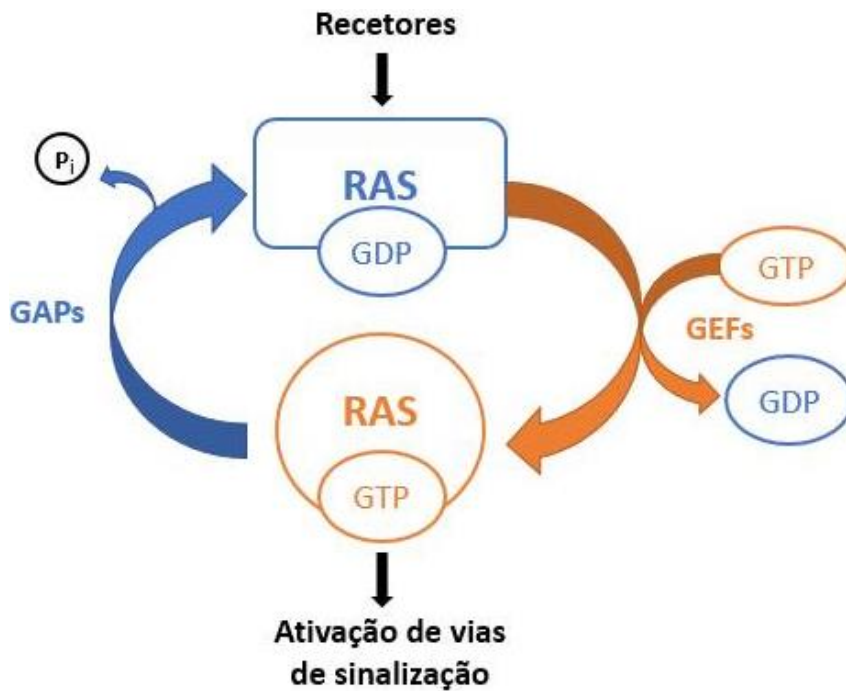


Figura 2.2 - Ciclo de sinalização de Ras – A proteína Ras inativa encontra-se ligada a GDP, pela ação da GEF, leva à libertação do GDP e ligação à molécula de GTP passando ao estado ativo. Usualmente o período de sinalização é curto, e estimulado pelas GAPs hidrolisam o GTP em GDP voltando ao estado inativo. Contudo, devido a mutações oncogénicas, a função GTPase fica comprometida, pelo que o oncogene Ras se torna constitutivamente ativo (Adaptado de Weinberg, 2014).

As mutações no oncogene *Ras* ocorrem predominantemente nos codões 12, 13 e 61. Estas mutações oncogénicas resultam numa sub-regulação da função GTPase e consequente ativação constitutiva da proteína levando ao aumento na ativação de vias de sinalização reguladas por Ras, como é o caso das vias MAPK/ERK e PI3-K/Akt, que se encontram intimamente ligadas com a promoção dos processos de oncogénese e progressão tumoral, uma vez que a ativação constitutiva destas vias resulta na ativação de fatores de transcrição que regulam genes envolvidos na proliferação e sobrevivência celular. (Lowy & Willumsen, 1993; Mineo, Anderson, & White, 1997; Pylayeva-Gupta et al., 2011; Rajalingam et al., 2007).

1.2.1 - Vias de sinalização ativadas por Ras

A oncoproteína Ras quando expressa constitutivamente, por consequência, torna ativa a via de sinalização mitótica MAPK (mitogen-activated protein kinase) ou também

denominada Ras/MEK/ERK que culmina na ativação das proteínas cinase 1 e 2 ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (Mendoza, Er, & Blenis, 2011). A ativação desta via inicia-se pela interação da proteína Ras com a cinase Raf, a primeira MAPK da via de sinalização. A cinase de serina/treonina Raf situa-se no citosol em estado inativo com o domínio N-terminal como auto-repressor do domínio cinase C-terminal e o dímero 14-3-3 ligado a ambos os terminais atuando como estabilizador dessa mesma repressão. Devido à ativação constitutiva de Ras, a proteína Raf é recrutada para a membrana plasmática e liga-se ao Ras, esta ligação promove a libertação do dímero do domínio N-terminal e permite a ativação da proteína Raf. Após ativação de Raf inicia-se a cascata de sucessivas fosforilações em que Raf ativa a cinase MEK e esta por sua vez ativa a cinase ERK. Esta via, como próprio nome indica, é uma via mitogénica e desempenha como função a fosforilação de fatores de transcrição tais como Ets-1, c-Jun e c-Myc. Estes fatores estão envolvidos na regulação do ciclo celular, diferenciação, proliferação e senescência, pelo que a sua ativação constitutiva culmina num aumento significativo das funções desempenhadas promovendo a oncogénese (Khan, Tania, Zhang, & Chen, 2010; McCubrey et al., 2007; McKay & Morrison, 2007; Mineo et al., 1997; Rajalingam et al., 2007; Tidyman & Rauen, 2009).

Outra das vias de sinalização ativadas por Ras é a via anti-apoptótica PI3-K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) /Akt (Proteína cinase B). A PI3-K pertence à família das cinases lipídicas e na sua forma ativa é constituída pela sub-unidade regulatória p85 e pela sub-unidade catalítica p110, esta sub-unidade possui na sua formação um domínio de ligação à proteína Ras. (Fresno Vara et al., 2004; Lim & Counter, 2005; McCubrey et al., 2007; Meier, 2005; Yuan & Cantley, 2008)

Em células normais, a ativação de um recetor de tirosina cinase (RTK) resulta na ligação da subunidade p85 da PI3-K ao recetor da RTK através de um ou dois domínios SH2 (são pequenas proteínas que regulam as interações proteína-proteína em vias de transdução de sinal que são ativadas por cinases de tirosina), seguidamente o segundo mensageiro da via PIP-2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) é convertido por fosforilação em PIP-3 (phosphatidylinositol 4,5-triphosphate) e recruta para a membrana a proteína cinase 1 dependente de fosfatidilinositol (PDK1) e proteínas com *pleckstrin homology* (proteínas com capacidade de ligação a lípidos fosfatidilinositol das membrana

biológicas). Em células cancerígenas a sobre-expressar Ras oncogénico o mecanismo de ativação não necessita de quaisquer outras proteínas, havendo uma interação direta da proteína Ras com o domínio de ligação da proteína Ras na sub-unidade catalítica p110. Uma das proteínas que apresenta *pleckstrin homology* é a proteína cinase B/AKT que está envolvida na regulação da transcrição de genes anti-apoptóticos, como é o caso da proteína BAD que quando fosforilada liga-se preferencialmente ao dímero 14-3-3 impedindo a inativação das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-X_L (Castellano & Downward, 2011; Cox & Der, 2003; Fresno Vara et al., 2004; Meier, 2005; Rajalingam et al., 2007; Rodriguez-Viciano et al., 1997; Wong, Engelman, & Cantley, 2010).

1.3 - Espécies reativas de oxigénio

As Espécies reativas de oxigénio (ERO) são formadas a partir da redução parcial da molécula de O₂ e podem ser classificadas em dois grupos, os radicais livres de oxigénio como o superóxido (O₂⁻), o radical hidroxilo (OH), o óxido nítrico (NO), radicais peróxido (ROO); e os ERO não radicais incluindo o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e o ozono (O³). As ERO exercem uma multitude de funções fundamentais em processos fisiológicos associados a mecanismos de proteção como, sistema imune, atividade antibacteriana e transdução de sinal, contudo na grande maioria dos estudos já efetuados, as ERO, estão também associadas a doenças sendo o cancro uma delas (Bedard & Krause, 2007; Behrend, Henderson, & Zwacka, 2003; Görlach et al., 2015; Liou & Storz, 2012; Pelicano, Carney, & Huang, 2004; Ray, Huang, & Tsuji, 2012; Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006; Waris & Ahsan, 2006).

Os efeitos nocivos das ERO devem-se à capacidade oxidante que possuem, e consequentemente causam danos em macromoléculas como o DNA, proteínas e lípidos, sendo grande parte dos danos atribuídos aos iões hidroxilo. (Görlach et al., 2015; Schumacker, 2006)

Encontra-se devidamente documentado que as células cancerígenas produzem uma maior quantidade de ERO em comparação com células normais, facto esse já evidenciado no século passado por *Konstantinov et al* que descreveu que o nível de

produção de superóxido pela mitocôndria em células cancerígenas do fígado era significativamente mais elevada do que em células não cancerígenas. O aumento da concentração de ERO em células cancerígenas, confere-lhes uma vantagem proliferativa e promove também a progressão tumoral (Pelicano et al., 2004).

Nas células cancerígenas a maior parte das ERO são resultantes da intensa atividade metabólica, mal funcionamento da mitocôndria, da atividade dos peroxissomas e oncogenes, aumento da atividade das oxidases: NADPH oxidases, ciclooxigenases, lipoxigenases, fosforilases de timidina e da atividade das células do sistema imunitário (macrófagos). Das espécies produzidas, o peróxido de hidrogénio, o superóxido e o radical hidroxilo são as mais estudadas (Görlach et al., 2015; Lu, Ogasawara, & Huang, 2008; Storz, 2005).



Figura 1.3 - Esquema demonstrativo dos efeitos das ERO na progressão tumoral - As ERO produzidas têm um efeito imediato sobre a proliferação celular, causam instabilidade genómica, promovem a motilidade celular e a angiogénese pelo que contribuem para a progressão do tumor. Contudo, podem também induzir à senescência celular e/ou apoptose atenuando o crescimento tumoral (Adaptado de Storz, 2005)

1.3.1 - Organelos produtores de ERO

Devido às funções dos lisossomas, as macromoléculas degradadas podem ter na sua constituição íons de ferro e/ou cobre. Devido ao ambiente ácido do lisossoma os íons de ferro são majoritariamente divalentes pelo que podem produzir ERO pela reação de Fenton (na presença de metais de transição (ferro ou cobre), estes doam ou recebem elétrons durante as reações intracelulares e utilizam o H_2O_2 para catalisar a formação de radicais livres) e afetar a integridade do lisossoma (Görlach et al., 2015; Storz, 2005).

Os peroxissomas participam em diversos processos metabólicos, β -oxidação de ácidos gordos de cadeia longa, (processo que origina maior quantidade de H_2O_2) oxidação na via das pentoses de fosfato, biossíntese de fosfolípidos, oxidação de aminoácidos) e uma das enzimas que atua nestas vias são as oxidases dependentes de flavina, que como resultado da sua atividade produzem peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Görlach et al., 2015; Storz, 2005).

No retículo endoplasmático a produção de ERO é resultado do enrolamento das proteínas, sendo um subproduto das enzimas oxigenases e oxidases (oxireductin 1 – ERO1). As ERO são também um produto da reação das NADPH oxidases (NOX4 e NOX5) e dos depósitos de ferro que pela reação de Fenton originam o radical hidroxilo (OH) (Bedard & Krause, 2007; Görlach et al., 2015; Lambeth, Kawahara, & Diebold, 2007; Lassègue & Griendling, 2010; Storz, 2005).

Na mitocôndria, a elevada produção de ERO é consequência da fosforilação oxidativa na cadeia transportadora de elétrons (CTE). A formação de O_2^- inicia-se pela ligação de elétrons entre complexo I (NADH-CoQ redutase) e o complexo III (citocromo C redutase) sendo libertado para o espaço intermembranar (80% do total do íon superóxido) e para a matriz mitocondrial (20% do total do íon superóxido). O íon superóxido atravessa até ao citoplasma pelo poro permeável de transição mitocondrial (MPTP). No citosol é convertido posteriormente por via enzimática em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) pela superóxido dismutase 2 (SOD2). Em conjunto com a CTE, a acetil-CoA produz a enzima desidrogenase de piruvato (PDH) e a enzima desidrogenase ketoglutarato (KGDH) que são também uma fonte de O_2^- (Alfadda & Sallam, 2012; Görlach et al., 2015; Liou & Storz, 2012).

As NADPH oxidases (Nox) constituem outra enorme fonte de produção de ERO, mais precisamente do ião superóxido, em termos estruturais as Nox estão classificadas em três grupos: Nox1–4, Nox5 e Duox. Todos os membros pertencentes a esta família (Nox) são proteínas transmembranares e fazem o transporte de elétrões entre membranas biológicas para além de partilharem entre si grande parte das suas características estruturais, como o local de ligação de NADPH na extremidade carboxilo. Dentro das Nox, a Nox1 desempenha funções essenciais no desenvolvimento do tumor, isto na medida em que promove a proliferação celular quando induzida por fatores de crescimento (PDGF), tendo o oncogene Ras um papel fundamental neste (Bedard & Krause, 2007; Datta, Sinha, & Chattopadhyay, 2012; Kamata, 2009; Liou & Storz, 2012).

A ativação da via de sinalização Ras/MEK/ERK desempenha um papel fundamental na regulação da transcrição da enzima NOX1. Um estudo efetuado por *Adachi et al* demonstrou que a expressão de NOX1 é dependente da fosforilação do fator de transcrição GATA-6 pela via Ras/MEK/ERK em célula cancerígenas do cólon. (Adachi et al., 2008; Kamata, 2009)

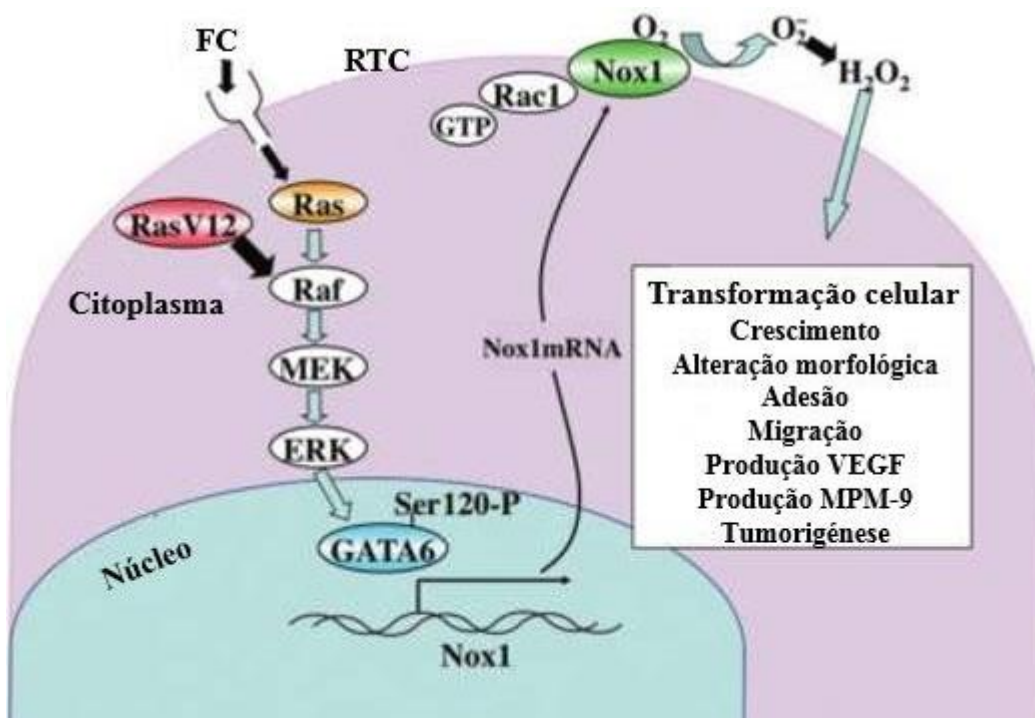


Figura 1.4 - Modelo de funcionamento da enzima Nox1 quando ativada por Ras -A ligação do fator do crescimento (FC) ao recetor tirosina cinase (RTC) induz a transcrição de NOX1 através da via Ras–Raf–MEK–ERK–GATA- 6. A Atividade de Nox1 é controlada por Rac1 cuja atividade produz H₂O₂ como molécula de sinalização. Na presença de Ras oncogénico a enzima Nox1 encontra-se sobre-expressa aumentando os níveis de ERO e consequentemente perturbando diversas atividades celulares, incluindo o crescimento, alteração da morfologia e migração e

aumento da expressão das metaloproteases da matriz e do fator endotelial vascular de crescimento (VEGF) (Adaptado de Kamata, 2009)

A enzima Nox1 é regulada pela ação de diversos fatores citosólicos incluindo as GTPases Rac1 e Rac2 e a sua atividade depende da ativação da proteína denominada p67^{phox} (NOXA1), interagindo ainda de forma não dependente com outras proteínas como p47^{phox}, p40^{phox}, e NoxO1 (Kamata, 2009; Lambeth et al., 2007; Storz, 2005).

Como acima referido, apesar de maioritariamente atribuídas as ERO danos celulares algumas espécies e particularmente o H₂O₂ constitui um importante mensageiro secundário na ativação de vias de transdução de sinal que regulam a proliferação, diferenciação, migração celular e apoptose. Isto deve-se principalmente ao facto do H₂O₂ ter a capacidade de oxidar resíduos de cisteína no domínio catalítico de proteínas fosfatases de tirosina inativando-as e conseqüentemente levando à ativação de proteínas cinases de tirosina envolvidas na ativação de vias de transdução de sinal. Contudo o H₂O₂ em concentrações elevadas é o maior responsável pela danificação do DNA, oxidação de proteínas e peroxidação de lípidos que ao longo do tempo poderá levar à morte celular ou tumorigênese (P. A. Madureira et al., 2011).

1.4 - Proteínas antioxidantes

O aumento sucessivo das ERO torna as células cancerígenas dependentes das enzimas antioxidantes. O constante stress oxidativo a que estas células se encontram sujeitas deve-se à produção constitutiva de sinais oncogénicos à proliferação constitutiva (aumento e alteração do seu metabolismo) e a células do sistema imune pelo que o potencial antioxidante das células cancerígenas desempenha um papel fundamental para a sua sobrevivência (Khan et al., 2010; Matés, Pérez-Gómez, & Núñez de Castro, 1999; Pelicano et al., 2004).

Os efeitos das ERO são contrabalançados pela ação de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos pelo que estas proteínas são de extrema importância pois fornecem proteção contra a oxidação de biomoléculas.

Uma proteína antioxidante é caracterizada por: especificidade para determinado radical livre; possuir uma atividade quelante sobre os iões metálicos; capacidade de reduzir outras proteínas antioxidantes de modo a que possam ser oxidadas novamente de modo reversível; exista em elevada concentração nos tecidos; seja capaz de atuar em meio aquoso e membranar. (Valko et al., 2006)

A classe dos antioxidantes enzimáticos mais eficientes é constituída pelas proteínas dismutases de superóxido, catalase, e peroxidases de glutathiona e de tioredoxina. Existem também os antioxidantes não enzimáticos como a vitamina C e E, carotenoides, antioxidantes de tiol (glutathiona, tioredoxina, e ácido lipóico), entre outros. Destes antioxidantes, uma parte tem ação em ambientes hidrofóbicos, hidrofílicos ou em ambos. (Khan et al., 2010; Matés et al., 1999)

1.4.1 - Antioxidantes enzimáticos

1.4.1.1 - Dismutases de superóxido

As SOD catalisam a dismutação de O_2^- em O_2 mas também para espécies menos reativas como o H_2O_2 . Existem em diferentes isoformas, diferindo no átomo metálico central e na constituição de aminoácidos. No corpo humano existem três isoformas, uma citoplasmática (Cu, Zn-SOD), extracelular (EC-SOD) e mitocondrial (Mn-SOD). A SOD elimina o O_2^- através de sucessivas oxidações e reduções do ião metálico (metal de transição) situado no centro ativo (Khan et al., 2010; Matés et al., 1999).

1.4.1.2 - Catalase

Esta enzima situa-se no peroxissoma e é extremamente eficaz na conversão de H_2O_2 em O_2 e H_2O . A catalase apresenta uma estrutura tetramérica, constituída por quatro subunidades idênticas cada uma com um peso molecular de cerca de 60 kDa e cada subunidade possui um grupo ferriprotoporfirina (Khan et al., 2010; Matés et al., 1999).

Em alguns tumores a diminuição dos níveis de catalase está relacionada com uma diminuição nos níveis de destoxificação de peróxido de hidrogénio (Matés et al., 1999; Valko et al., 2006)

1.4.1.3 - Peroxidases de glutathione

Esta enzima coexiste em duas formas, uma selênio-independente (glutathione-S-transferase) e uma selênio-dependente (glutathione peroxidase). Estas duas enzimas diferem no número de subunidades, na natureza do átomo de selênio central e nos mecanismos catalíticos (Khan et al., 2010; Matés et al., 1999).

As peroxidases de glutathione adicionam dois elétrons para reduzir os peróxidos levando à formação de selenol (Se-OH). Estas selênio-enzimas atuam em conjunto com tripéptidos de glutathione (GSH), o substrato para a reação catalítica é o H₂O₂ ou um peróxido orgânico (ROOH). O H₂O₂ é convertido em água e simultaneamente o tripéptido de glutathione é oxidado (Khan et al., 2010; Matés et al., 1999).

Existem outras proteínas que possuem também atividade redox, sendo a de interesse neste estudo a anexina A2.

1.5 - Anexina A2

A anexina A2 encontra-se inserida na superfamília das anexinas, geralmente caracterizada pela capacidade de se ligar a fosfolípidos aniônicos de membrana de forma dependente de cálcio. A anexina A2 localiza-se majoritariamente no citoplasma e membrana celular, contudo uma pequena fração localiza-se no núcleo. As anexinas, possuem domínios bastante conservados de sequências repetidas. Estes domínios são constituídos tipicamente por quatro repetições de cerca de aproximadamente setenta aminoácidos. Cada repetição tem cinco hélices α , contendo múltiplos locais de ligação ao Ca²⁺. A anexina A2 tem uma conformação molecular planar, apresentando um lado convexo que se encontra virado para a membrana celular e neste encontram-se múltiplos locais de ligação ao Ca²⁺ e a fosfolípidos e um lado côncavo que fica virado para o exterior da membrana sendo este o local que contém as regiões C e N-terminais da anexina A2. A região C-terminal possui na sua constituição um resíduo reativo de cisteína, vários locais de ligação de actina F, fosfolípidos, fibrina e de heparina. Por sua vez na região N-terminal da anexina situa-se um resíduo de cisteína reativo (Cys8), um domínio de ligação à proteína S100A10, vários locais de fosforilação e um sinal de

exportação nuclear. (Bharadwaj, Bydoun, Holloway, & Waisman, 2013; Lokman, Ween, Oehler, & Ricciardelli, 2011; P. a. Madureira & Waisman, 2013; P. A. Madureira et al., 2011)

O domínio amino-terminal da anexina A2 possui locais propícios a alterações pós-translacionais sendo alvo de acetilação, fosforilações e ainda glutationilação. Estas alterações têm como finalidade a regulação das propriedades da anexina A2. A fosforilação de resíduos de serina e tirosina N-terminais da anexina A2 permitem regular a importação e exportação nuclear e a translocação para a superfície celular desta proteína (P. a. Madureira & Waisman, 2013).

A anexina A2 é comumente sobre-expressa numa grande variedade de cancros como no cancro colorectal, pancreático, da mama, dos pulmões e também em tumores cerebrais. A sobre-expressão de anexina A2 está também associada à quimioresistência em cancro da mama e dos ovários (Lokman et al., 2011).

A existência de cisteínas reativas na molécula de anexina A2 está cientificamente comprovada por diversos estudos efetuados com diferentes abordagens, sendo que a primeira vez que foram evidenciadas as modificações pós-translacionais ocorridas nas cisteínas foi com recurso à técnica de espectrometria de massa por ionização de electrospray que demonstrou que a cisteína reativa (cys-8) pode formar pontes dissulfido com uma homocisteína (P. a. Madureira & Waisman, 2013).

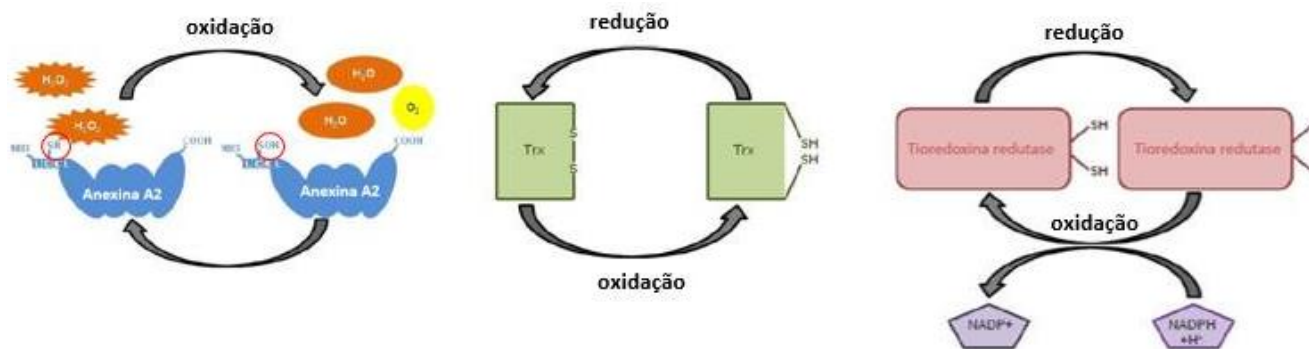


Figura 1.5 - Modelo da função antioxidante desempenhada pela anexina A2 - O resíduo de cisteína (rodeado a vermelho) é oxidado pela molécula de H_2O_2 sendo reduzida a H_2O e O_2 . A anexina A2 é seguidamente reduzida pelo sistema da tioredoxina, pelo que apenas uma molécula é suficiente para degradar várias moléculas de H_2O_2 (Adaptado de P. a. Madureira & Waisman, 2013)

Como acima referido, o H_2O_2 é uma ERO com funções variadas. Foi demonstrado que na depleção de anexina A2 existe um aumento na concentração de ERO e como consequência um aumento na oxidação de proteínas sensíveis a redox após tratamento com H_2O_2 . Este resultado evidencia a habilidade que molécula de H_2O_2 tem para oxidar o resíduo de cisteína da anexina A2 (P. A. Madureira et al., 2011).

O efeito antioxidante da anexina A2 deve-se ao resíduo de cisteína (cys-8), que, na presença de H_2O_2 é oxidado, reduzindo a molécula de H_2O_2 a H_2O e O_2 . Após oxidação, a anexina A2, mais concretamente o resíduo de cisteína, será reduzido pelo sistema da tioredoxina, permitindo assim que participe em múltiplos ciclos redox, pelo que apenas uma molécula de anexina A2 pode degradar várias moléculas de H_2O_2 (P. a. Madureira & Waisman, 2013).

Durante a tumorigénese, as células cancerígenas exibem tipicamente um aumento da produção de ERO. Este aumento trará vantagens a nível proliferativo, contudo também trará desvantagens. Para regular os riscos impostos pelo aumento das ERO, as células cancerígenas induzem a sobre-expressão e/ou ativação de proteínas do sistema antioxidante. Devido às funções antioxidantes da anexina A2 já descritas, foi proposto por *Madureira et al.* que a anexina A2 é essencial para a progressão tumoral. Esta hipótese foi comprovada pela inserção de células HT1080 e A549 depletadas de anexina

A2 e células controlo em ratinhos. Quando comparados, o crescimento dos tumores com células controlo foi substancialmente maior que o crescimento dos tumores provenientes de células cancerígenas depletadas da anexina A2. Contudo para comprovar que o crescimento se devia de fato às funções redox desempenhadas pela anexina A2, repetiram-se estas experiências com a administração do antioxidante N-acetil cisteína (NAC). Os resultados obtidos demonstraram um crescimento igual entre os tumores provenientes de células cancerígenas depletadas de anexina A2 e os tumores controlo. Pelo que a função antioxidante da anexina A2 desempenha um papel fundamental para a progressão tumoral neste sistema. (P. a. Madureira & Waisman, 2013; P. A. Madureira et al., 2011)

2. Objetivos

Com este trabalho pretendeu-se investigar o papel desempenhado pela proteína anexina A2 na regulação de vias de transdução de sinal e na eliminação de espécies reativas de oxigénio em células a sobre expressar o oncogene H-Ras.

Para atingir o objetivo principal propôs-se as seguintes tarefas:

- I. Estabelecer linhas celulares cancerígenas *knockdown* para anexina A2 e respetivas linhas controlo, ambas sem sobre-expressão e com sobre-expressão de H-Ras oncogénico;
- II. Investigar se a depleção de anexina A2 em células cancerígenas a sobre expressar Ras oncogénico leva à acumulação de ERO comparativamente com as células controlo;
- III. Comparar a ativação de vias de transdução de sinal induzidas por Ras em células sem e com sobre expressão de H-Ras oncogénico, na presença ou depleção de anexina A2;
- IV. Investigar a proliferação celular de células cancerígenas a sobre expressar H-Ras oncogénico, na presença ou depleção de anexina A2.

3. Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

3.1.1 - Equipamentos

- Microscópio invertido *Primo Vert* (Zeiss)
- Câmara de Fluxo Laminar *Microflow® Biosafety Cabinet Class II* (Astec)
- Centrífuga *Himac CT6EL* (Hitachi)
- Centrífuga refrigerada *Heraeus™ Fresco 17 Centrifuge* (Thermo Scientific)
- Banho-maria *SHEL LAB Digital Water Bath* (Seldon MFG Inc.)
- Incubadora *Forma™ Series II Water-Jacketed CO2 Incubators* (Thermo Scientific)
- *Dry Block Thermostat Bio TDB-100* (Biosan)
- *Power Pac™* (Biorad)
- Incubadora *Forma™ Series II Water-Jacketed CO2 Incubators* (Thermo Scientific)
- Espectrofotômetro *NanoDrop2000c* (Thermo-Scientific)
- Agitador de placas VWR® *Mini Blot Mixer*
- Equipamento *ChemiDoc™ XRS* (BioRad)
- Microscópio eletrônico invertido com câmara incorporada *Axio vert 40 CFL* (Zeiss)
- Leitor de microplacas *Infinite® M200* (Tecan)
- Balança analítica *Acculab ALC 210.4* (Sartorius group)

3.1.2 - Soluções Tampão

- Tampão de Lise: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 5 mM EGTA, 0.1% Deoxicolato de Sódio; 1:200 cocktail de inibidores de proteases (SIGMA, ref: P2714-1BTL), 1 mM NaVO₄, 10 mM NaF;
- Tampão *Loading* de Proteínas (4x): 8% SDS, 120 mM Tris pH 6.8, 20 % glicerol, 0.02 % azul de bromofenol, 20 % β-mercaptoetanol; Tampão de eletroforese (10x): 250 mM Tris base, 2.5 M glicina, 1 % SDS;
- Tampão de transferência (10x): 25mM Tris Base, 20mM glicina, + 20% Metanol;
- Tampão Tris salino – Tween 20 (20x): 400 mM Tris pH 7.5, 2.4 M NaCl, + 1:2000 Tween 20;

3.1.3 - Géis para SDS-PAGE

Tabela 3.1 – Descrição da composição dos géis para SDS-PAGE

Running gel			Stacking gel	
[acrilamida:bisacrilamida]	10%	12%	[acrilamida:bisacrilamida]	5 %
1M Tris pH 8,8	3 ml	3 ml	1M Tris pH 6,5	312,5 µl
40% de acrilamida:bisacrilamida (29:1)	2 ml	2,4 ml	40% de acrilamida:bisacrilamida (29:1)	312,5 µl
Água destilada	2,9 ml	2,5 ml	Água destilada	1,8 ml
10% de SDS	80 µl	80 µl	10% de SDS	25 µl
25% de Persulfato de Amónia	32 µl	32 µl	25% de Persulfato de Amónia	12,5 µl
TEMED	12 µl	12 µl	TEMED	5 µl

3.1.4 – Plasmídeos

Tabela 3.2 - Descrição dos plasmídeos utilizados para *knockdown* da anexina A2

Identificação	Descrição	Origem/ Referência
pSUPER-retro-p36 shRNA 3 (shRNA-3 para anexina A2 em células humanas)	Clonagem do dsDNA oligo 5'-GAT CCC CCC TGG TTC AGT GCA TTC AGT TCA AGA GAC TGA ATG CAC TGA ACC AGG TTT TTA-3' 5'-AGC TTA AAA ACC TGG TTC AGT GCA TTC AGT CTC TTG AAC TGA ATG CAC TGA ACC AGG GGG-3' com o vetor pSUPER-retro-neo (OligoEngine) como "backbone"	P. A. Madureira et al., 2011
pSUPER-retro-p36 shRNA 4 (shRNA-4 para anexina A2 em células humanas)	Clonagem do dsDNA oligo 5'-GAT CCC CGT GCA TAT GGG TCT GTC AAT TCA AGA GAT TGA CAG ACC CAT ATG CAC TTT TTA-3' 5'-AGC TTA AAA AGT GCA TAT GGG TCT GTC AAT CTC TTG AAT TGA CAG ACC CAT ATG CAC GGG-3' com o vetor pSUPER-retro-neo (OligoEngine) como "backbone"	P. A. Madureira et al., 2011
pSUPER-retro-p36 <i>scramble</i> (shRNA- <i>Scr</i> para anexina A2 em células humanas)	Clonagem do dsDNA oligo 5'-GAT CCC CGT GCA TAT GGG TCT GTC CAT TAG AGA GAT TGA CAG ACC CAT ATG CAC TTT TTA-3' 5'-AGC TTA AAA AGT GCA TAT GGG TCT GTC AAT CTC TCT AAT GGA CAG ACC CAT ATG CAC GGG-3' com o vetor pSUPER-retro-neo (OligoEngine) como "backbone"	P. A. Madureira et al., 2011

Tabela 3.3 - Descrição dos plasmídeos utilizados para a sobre-expressão de H-Ras

Identificação	Descrição	Origem/Referência
pBABE-Puro	Vetor vazio que confere resistência à puromicina.	Hartmut Land & Jay Morgenstern & Bob Weinberg / 1764
pBABE-Puro H-Ras v12	-Vetor que contém o cDNA do gene H-Ras com uma mutação. -O gene origina a proteína H-Ras com um resíduo de valina (V12) o que a torna constitutivamente ativa. -É um vetor retroviral com expressão em células mamíferas. -Tem como “backbone” o plasmídeo pBABE-Puro. -Confere resistência à puromicina.	Julian Downward / 39526

3.1.5 - Material Biológico

3.1.5.1 - Linhas celulares

Tabela 3.4 – Identificação, descrição e origem celulares.

Identificação	Descrição	Origem
HT1080	Linha celular humana de fibrosarcoma	ATCC
HT1080 pBABE	Células HT1080 com vetor vazio (pBABE) para HRas	Este estudo
HT1080 pBABE HRas-v12	Células HT1080 com cDNA pBABE HRas-v12 para HRas	Este estudo
HT1080 Hras p36-3	Células HT1080 com shRNA 3 para o p36	Este estudo
HT1080 Hras p36-4	Células HT1080 com shRNA 4 para o P36 anexina A2	Este estudo
HT1080 Hras p36-scramble	Células HT1080 com shRNA inespecífico (<i>scramble</i>) para o P36	Este estudo
HT1080 pBABE p36-3	Células HT1080 com shRNA 3 para o P36	Este estudo
HT1080 pBABE p36-4	Células HT1080 com shRNA 4 para o P36	Este estudo

HT1080 pBABE p36- <i>scramble</i>	Células HT1080 com shRNA inespecífico (<i>scramble</i>) para o p36	Este estudo
MDA-MB 231	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário	ATCC
MDA-MB 231 pBABE	Células MDA-MB 231 com vetor vazio (pBABE) para HRas	Este estudo
MDA-MB 231 pBABE HRas-v12	Células HT1080 com cDNA pBABE HRas-v12 para HRas	Este estudo
MDA-MB 231 Hras p36-3	Células MDA-MB 231 com shRNA 3 para o p36	Este estudo
MDA-MB 231 Hras p36-4	Células MDA-MB 231 com shRNA 4 para o p36	Este estudo
MDA-MB 231 Hras p36- <i>scramble</i>	Células MDA-MB 231 com shRNA inespecífico (<i>scramble</i>) para o P36	Este estudo
MDA-MB 231 pBABE p36-3	Células MDA-MB 231 com shRNA 3 para o P36	Este estudo
MDA-MB 231 pBABE p36-4	Células MDA-MB 231 com shRNA 4 para o P36	Este estudo
MDA-MB 231 pBABE p36- <i>scramble</i>	Células MDA-MB 231 com shRNA inespecífico (<i>scramble</i>) para o P36	Este estudo
Phoenix	Linha celular derivada das células 293T transformadas com adenovírus E1a	Allelebiotech

3.1.6 - Anticorpos

Tabela 3.5 - Descrição dos anticorpos utilizados

Identificação	Descrição	Referencia	Origem
Anti- p36	Anticorpo de ratinho anti-anexina A2	Sc-1925M	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti- HRas	Anticorpo de coelho anti- Hras	Sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti- P-Erk 1/2	Anticorpo de ratinho anti - P- Erk ½	Sc-7985	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Erk 1/2	Anticorpo de ratinho anti - Erk ½	Sc-135900	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-P-Akt	Anticorpo de coelho anti - P-Akt	Sc-7985	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Akt	Anticorpo de cabra anti – Akt		Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-PRDX II	Anticorpo de cabra anti-peroxiredoxina II	Sc-23967	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-PRDX I-IV	Anticorpo de cabra anti-peroxiredoxina 1-4		Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-Trx	Anticorpo de ratinho anti – tioredoxina	Sc-20146	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-tub	Anticorpo de coelho anti-tubulina	Sc-9104	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-actina	Anticorpo de cabra anti-actina	Sc-1615	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-GAPDH	Anticorpo de anti-GAPDH	Sc-25778	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP de ratinho	Anticorpo secundário de ratinho conjugado à peroxidase (HRP)	Sc-2314	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP de coelho	Anticorpo secundário de coelho conjugado à peroxidase (HRP)	Sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
HRP de cabra	Anticorpo secundário de cabra conjugado à peroxidase (HRP)	Sc-2020	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

3.2 Métodos

3.2.1 - Cultura de células

As linhas celulares foram cultivadas em meio DMEM (GIBCO) suplementado com soro bovino fetal (SIGMA), penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (0,1mg/ml) e 2 mM de L-glutamina.

O procedimento iniciou-se pela descongelação das células a 37°C em banho-maria, e colocadas em transferência para tubos de 15 ml contendo 10 ml de meio completo previamente aquecido. As células foram centrifugadas a 1000 g durante 5 minutos.

Após centrifugação, foi aspirado o sobrenadante contendo o meio e o DMSO, a centrifugação destina-se a retirar o DMSO das células devido à sua toxicidade. Ao pellet foi adicionado 5 ml ou 15 ml de meio em que as células foram ressuspendidas, posteriormente, as células e o meio foram transferidas para frascos T25 (VWR) ou T75 (VWR), respetivamente.

As células foram incubadas, à temperatura de 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. A cada dois ou três dias as condições do meio DMEM foram avaliadas e este foi substituído sempre que a concentração celular era elevada e/ou se verificava uma maior diferença na coloração do meio (devido ao indicador de pH.)

Para se proceder à passagem das células retirou-se o meio, adicionou-se às células tampão fosfato salino (PBS), agitou-se durante 1 minuto e removeu-se o mesmo. A lavagem com PBS permitiu remover os resíduos do meio antigo que na sua constituição tem FBS que inativa a tripsina.

Ao frasco foi adicionado tripsina-EDTA a 0,25%, 3 ml (frasco T75) ou 1,5 ml (frasco T25), incubou-se durante cerca de 5 minutos a 37°C com 5% CO₂. Após incubação as células foram visualizadas ao microscópio para garantir que a maioria das células se encontrava em suspensão, a solução composta por células e tripsina foi homogeneizada.

Parte da solução homogénea foi mantida no frasco (entre 100-200 µl para T25 e entre 500µl-1ml para T75) a restante foi descartada, o restante volume foi perfazido com meio

de cultura. A quando as transfecções com os shRNA foi adicionado ainda 2µl/ml de puromicina (SIGMA) e/ou 2µl/ml de neomicina (marca/concentração).

3.2.2 - Congelação de células – stocks celulares

A criopreservação garantiu a continuidade das linhas celulares ao longo de todo o trabalho.

O meio criopreservante foi composto por 90 % de FBS e 10 % de DMSO. Após a tripsinização e posterior centrifugação a 1000 g durante 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e o pellet ressuspendido na solução criopreservante. A solução foi bem homogeneizada e 10^6 células foram ressuspendidas com 1 ml de meio criopreservante e transferidas para um tubo de criopreservação (VWR). Os tubos são incubados a -80°C cerca de 24h e posteriormente são transferidos para a arca a -150°C .

3.2.3 - Estabelecimento das linhas celulares para experiências

Após tripsinização, deixou-se parte da mistura homogénea no frasco (T25 ou T75) como referido a cima e o restante volume colocou-se num tubo falcon de 15 ml. Previamente tinha sido guardado 5 ml do meio antigo (tanto T25 como T75), este, serve para inativar a tripsina (tóxica para as células), as células foram centrifugadas a 1000g durante 5 minutos e removeu-se o sobrenadante. Ao pellet, adicionou-se meio DMEM (1ml – 5ml) e homogeneizou-se a solução. Pipetou-se 10 µl desta solução para uma câmara de Neubauer de $0,0025\text{ mm}^2$ e observou-se ao microscópio para efetuar a contagem do número de células presentes em quadrados de 1mm^2 . Utilizou-se a seguinte equação para determinar o volume celular em 1 mm^2 : média do número de células em cada quadrado \times Fator de diluição $\times 10^4 =$ número de células por ml.

Depois de determinado o volume necessário da solução homogénea de células e meio DMEM, com o auxílio de uma micropipeta (VWR), foi distribuída por placas de Petri de 35mm ou em placas de 96 poços.

3.2.4 - Estabelecimento de linhas celulares a sobre-expressar Ras oncogénico e *knockdown* para a anexina A2

Para efetuar o *knockdown* da anexina A2 ou a sobre-expressão de H-Ras utilizaram-se os sistemas retrovirais pSUPER-retro-Neo (Addgene) e pBABE (Hartmut Land & Jay Morgenstern & Bob Weinberg), respetivamente. Utilizaram-se as células Phoenix como células de empacotamento. Estas derivam da linhagem celular 293T e foram transformadas com adenovírus E1a e adicionado um gene de resistência. Os retrovírus formados serviram para infetar as células alvo (MDA-MB 231 e HT1080) com os shRNAs para a anexina A2 também denominada p36 devido ao seu peso molecular de 36 KDa (p36-3, p36-4), um shRNA inespecífico como controlo (p36-*scramble*) e cDNA para o H-Ras oncogénico (pBABE-H-ras v12) ou o vetor vazio (pBABE).

O processo iniciou-se com a descongelação das células Phoenix pelo mesmo processo descrito para as restantes linhas celulares e foram colocadas em crescimento até atingirem uma confluência de cerca de 50-70% num frasco T25.

Usou-se um tubo *ependdorp* aonde se colocou 400µl de *buffer* JetPRIME e diluiu-se 4µg de DNA plasmídico. Esta mistura foi homogeneizada no vórtex durante 10 segundos. Ao *ependdorp* contendo a mistura adicionou-se 8 µl de reagente JetPRIME e submeteu-se novamente a uma homogeneização da solução recorrendo ao vortex durante cerca de 10 segundos e incubou-se à temperatura ambiente durante um período de 10 minutos.

A transfeção efetuou-se em seguida no frasco T25 contendo as células Phoenix em que a solução de DNA plasmídico e reagente JetPRIME foi colocada gota a gota de modo a cobrir toda a superfície do frasco.

As células foram incubadas à temperatura de 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂, entre 48 e 72 horas.

Foram colocadas em cultura células MDA-MB 231 e HT1080 em frascos T25 de modo a que uma confluência entre 50 a 70% fosse atingida. Após término da transfeção o sobrenadante das células Phoenix é filtrado por um seringal com um filtro de 0,45 µM.

Às células a serem infectadas, retirou-se o meio DMEM e colocou-se o meio filtrado das células Phoenix em cada um dos frascos correspondentes e adicionou-se ainda 10µg/ml de reagente *Polybrene* (SIGMA). Incubou-se a 37°C em atmosfera húmida com 5% CO₂ durante 24 horas.

Decorridas as 24 horas o meio contendo os retrovírus foi substituído por meio completo DMEM e incubou-se novamente nas condições acima referidas durante 48 horas.

Após 48 horas adicionou-se aos frascos contendo o vector pBABE ou pBABE-HRas 2µg/ml de puomicina para se dar início à seleção das células. A seleção celular foi efetuada até que foram obtidas culturas de células estáveis.

O *knockdown* da anexina A2 foi efetuado recorrendo ao procedimento acima descrito, foram utilizados três shRNA: p36-3, p36-4 e p36-*scramble*. A seleção foi efetuada com neomicina utilizando 2 mg/ ml por frasco.

Posteriormente foram realizados *Western-blotting* para verificar a eficácia da sobre-expressão de HRas e o *knockdown* da anexina A2, respetivamente.

3.2.5 - Ensaios com ciclohexamida e actinomicina D

Os ensaios com ciclohexamida e actinomicina D foram efetuados em placas de Petri de 35 mm com confluência de 3x10⁶ células por placa. Cada linha celular foi dividida por 5 placas de Petri de 35 mm e este ensaio decorreu durante 24 horas.

Quando as placas apresentavam uma confluência de cerca de 80% foi adicionado 50 nM de ciclohexamida ou de actinomicina-D segundo uma escala de tempo.

Após término do período de tempo (*time course*), removeu-se o meio de cultura e adicionou-se 2ml de PBS com Ca²⁺ e Mg²⁺ a cada placa para lavagem das células, incubou-se durante 1 minuto com agitação e retirou-se o PBS. Adicionou-se 150 µl de tampão de lise (composição em 3.1.2) a cada uma das placas, utilizou-se um raspador para desagregar as células da superfície das mesmas, e transferiu-se com o auxílio de uma micropipeta todo o conteúdo da placa para os tubos *ependdorf* correspondentes. Os tubos *ependdorf* contendo o tampão de lise e as células foram incubados durante 10 minutos em gelo, finalizada a incubação, os tubos *ependdorf* foram centrifugados a 12000 g a 4°C durante 15 minutos. Terminada a centrifugação, são retirados os sobrenadantes e armazenados em novos tubos *ependdorf* e guardados na arca a -80°C.

3.2.6 - Quantificação proteica

Para a quantificação das proteínas obtidas através de lisados celulares utilizou-se o kit Pierce® *BCA Protein Assay* de acordo com as instruções do fabricante.

O ensaio de BCA define-se pela redução do Cu^{2+} a Cu^+ pelas proteínas contidas no lisado que estão em ambiente alcalino (reação do Biureto). A reação estequiométrica combina duas moléculas de BCA por cada íon de cobre, formando um complexo molecular que emite uma forte absorvência a 562 nm, absorvência essa que é diretamente proporcional à concentração proteica contida no lisado.

Para além das amostras a quantificar é necessário ter uma amostra como valor de referência tendo-se usado a água, foi também necessário uma curva de calibração que foi estabelecida de acordo com os valores esperados (0,4µg/µl-1µg/µl). Para a realização da curva foi utilizado a albumina do soro bovino (*bovine serum albumin* – BSA).

O Pierce® *BCA Protein Assay Kit* é constituído pelo reagente A (BCA em tampão bicarbonato) e reagente B (solução aquosa de sulfato de Cobre a 4%) em que a solução utilizada para a quantificação foi feita na proporção de 50 (reagente A):1 (reagente B). A amostra a quantificar foi preparada a partir da diluição (1:10) do lisado proteico (1µl) com H_2O (9µl). Desta diluição retirou-se 1µl e adicionou-se 8µl da mistura do *BCA Protein Assay Kit*, homogeneizando-se a solução final.

Incubou-se durante 30 minutos a 37°C, término a incubação, a quantificação proteica foi efetuada usando um espectrofotómetro *NanoDrop2000c* (Thermo-Scientific®) registando os valores no comprimento de onda de 562 nm.

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

Os géis de poliacrilamida são constituídos por dois géis o *running gel* (constituído por 10% a 12% de poliacrilamida) e o *stacking gel* (constituído por 5% de poliacrilamida). A constituição do *running gel* encontra-se na tabela 3.1.

A constituição do *stacking gel* (solução tampão para carregar as amostras) encontra-se também na tabela 3.1.

Após polimerização dos géis (30 minutos), estes são colocados num suporte e em seguida no tanque de eletroforese *Mini-Protean* (BioRad®) segundo as instruções do fabricante e colocou-se o tampão de eletroforese (constituição em solução tampão) até cobrir a totalidade do gel.

As amostras para carregar o gel possuem na sua constituição proteínas, água *milipore* e tampão *loading*. A concentração de proteína por poço é de 1 µg/µl. O tampão *loading* (2x ou 4x) corresponde a ½ ou a ¼ do volume final, ou seja 50 µl ou 25 µl dependendo da concentração proteica existente na amostra. Seguidamente as amostras são fervidas a 96°C durante 5 minutos.

Colocou-se em cada poço do gel cerca de 20 µl da amostra e no primeiro poço do gel 2 µl de marcador do peso molecular *Precision Plus Protein™ All Blue Standards* (Biorad®). Em seguida aplicou-se uma corrente de 105 V (0.05 e 0.08 A) para permitir a migração das amostras no gel até que entrassem no *running gel*. Após entrada no gel, aumentou-se a voltagem para valores entre 125-135 V.

3.2.8 - Western Blotting

A transferência de proteínas foi feita com recurso a membranas de nitrocelulose de 0,2 µm *BioTrace™ NT* (Pall Corporation®). Após a eletroforese, retirou-se o gel, colocou-se em contato com a membrana e aplicou-se uma voltagem de 100V (0,25A a 0,4^a) durante cerca de 1hora e 10 minutos (esquematizado em (...)).

Finalizada a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite magro em pó solubilizado em Tampão de Tris salino – Tween 20 (TBS-T) com agitação e à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora. Em seguida retirou-se a solução de bloqueio e colocou-se o anticorpo primário dissolvido em TBS-T ou em solução de leite magro (5%) e incubou-se durante a noite a 4°C com agitação. No dia seguinte lavou-se a membrana 4-5 vezes com 5 ml de TBS-T tendo cada lavagem a duração de 5 minutos, à temperatura

ambiente e com agitação. Após as lavagens, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP), à temperatura ambiente, com agitação durante 1 hora. Finalizou-se o processo com a lavagem da membrana 4-5 vezes com TBS-T, 5 minutos cada lavagem como descrito acima.

Para visualização da quimiluminescência utilizou-se uma solução ECL (*enhanced chemiluminescence*) preparada a partir de duas soluções, I e II na proporção de 1:1. A solução I é composta por 100mM Tris pH 8,5; 2,5mM luminol; 360 μ M ácido p-cumárico; a solução II por 100mM Tris pH 8,5; H₂O₂ a 0,0185%.

A solução de ECL foi colocada sobre a membrana de modo a cobrir a sua totalidade durante cerca de 1-5 minutos, em seguida foi colocada no equipamento ChemiDoc™ XRS (BioRad®) para visualização das bandas proteicas.

Para a incubação das membranas utilizaram-se os anticorpos anti-p36, anti-Hras, anti-ERK, anti-Perk, anti-actina, anti-peroxiredoxina II, anti-peroxiredoxina I-IV, anti-tubulina, anti-PAkt, anti-Akt. Os anticorpos secundários utilizados foram preparados com diluição de 1:5000.

3.2.9 - Ensaio de viabilidade – MTT

Para a realização deste ensaio utilizou-se o CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

Inicialmente preparou-se uma placa de 96 poços em que foram colocadas as linhas celulares e meio completo DMEM com uma concentração de 2.5×10^4 células por poço e incubou-se por um período de 24 horas, a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂.

Adicionou-se 15 μ l da solução de sal de tetrazólio (solução corante) a cada poço e incubou-se cerca de 4 horas nas mesmas condições a cima referidas. O sal de tetrazólio adicionado foi convertido pelas células vivas resultando um produto sólido – *formazan*. Após as 4 horas adicionou-se a solução de solubilização que tornou o *formazan* solúvel, pelo que se registou uma alteração na cor do meio.

Posteriormente a absorvência da placa de 96 poços foi medida recorrendo a um espectrofotómetro. A absorvência a 570 nm é diretamente proporcional ao número de células.

3.2.10 - Medição de espécies reativas de oxigênio

Para a medição das ERO utilizou-se o reagente 2',7' – diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA), de acordo com as instruções do fabricante.

Este reagente é um marcador molecular/fluoresceína, que possui cargas negativas na sua constituição, pelo que permite a retenção das espécies reativas de oxigênio durante um maior período de tempo. Após difusão, o DCFDA é desacetilado pelas esterasas celulares resultando num composto não fluorescente, em seguida é oxidado por ERO o que leva à formação de uma molécula fluorescente: 2', 7' – diclorofluoresceína (DCF) que pode ser quantificada por espectroscopia de fluorescência (Excitação: 492 nm; Emissão: 530 nm). Desta forma, quanto maior a concentração de ERO maior o sinal de fluorescência obtido.

Iniciou-se pela preparação da placa de 96 poços. Utilizou-se a linha celular MDA-MB 231 com os respetivos *knockdown* da anexina A2 e sobre-expressão de HRas. A concentração utilizada foi de 3×10^4 células/poço.

Incubou-se a placa durante toda a noite a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Na manhã seguinte retirou-se o meio DMEM e lavaram-se as células com 100µl de PBS com Ca²⁺ e Mg²⁺. Em seguida colocou-se novamente 100 µl de PBS com Ca²⁺ e Mg²⁺ contendo 200µM de DCF-DA em cada poço. Incubou-se durante 30 minutos a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. Por fim foram medidas as respetivas fluorescências num espectrofotómetro (Excitação a 492nm e emissão a 530nm).

3.2.11 - Análise estatística

Para a análise estatística recorreu-se ao teste *t* de Student. Os valores de $P \leq 0,05$ consideraram-se estatisticamente significativos. Os resultados encontram-se expressos em média +/- desvio padrão.

4. Resultados

4.1 Estabelecimento de linhas celulares

Para se iniciar o estudo proposto, foi necessário estabelecer as linhas celulares humanas de adenocarcinoma mamário MDA-MB 231 e de fibrossarcoma HT1080. Primeiramente inseriram-se os plasmídeos contendo os shRNAs referentes à anexina A2 (p36-4) e respetivo controlo (p36 *scramble*) nas células de empacotamento Phoenix por transfeção utilizando o reagente Polyplus (JetPRIME) de acordo com as instruções do fabricante. Após 48h retirou-se e filtrou-se o sobrenadante das células Phoenix e adicionou-se o mesmo às linhas celulares MDA-MB 231 e HT1080. Após o período de infecção de 48 h deu-se início à seleção das linhas celulares com antibiótico (neomicina). Após três semanas de seleção procedeu-se à inserção do cDNA para a sobre-expressão de HRas (pBABE HRas-v12) ou vetor vazio (pBABE, controlo) utilizando o reagente Polyplus (JetPRIME) de acordo com as instruções do fabricante. Seguiu-se um procedimento de infecção semelhante ao descrito acima, mas utilizou-se para a seleção de células contendo os plasmídeos pBABE ou pBABE HRas-v12 o antibiótico puromicina. Após a infecção cada tipo celular deu origem a quatro linhas celulares distintas como ilustrado na figura 4.1.

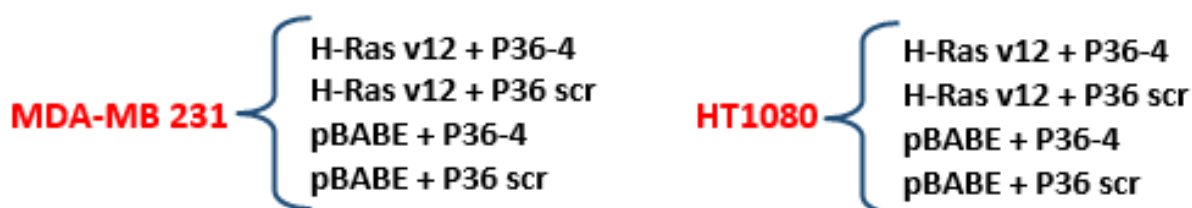


Figura 4.1 – Descrição das linhas celulares, após inserção do shRNA referente à anexina A2 e respetivo controlo (p36-4 e p36-scramble) e do cDNA referente ao H-Ras (pBABE e pBABE H-Ras-v12).

De modo a avaliar a qualidade do *knockdown* da anexina A2 e da sobre-expressão de H-Ras v12 foram preparados lisados proteicos destas células, que foram submetidos a SDS-PAGE. Em seguida, a expressão das proteínas anexina A2 e HRas foi analisada por

western blotting. A análise dos níveis de actina/ β tubulina/GAPDH permitiu confirmar que a quantidade de proteína total de cada amostra foi idêntica.

Os resultados destas experiências encontram-se representados nas Figuras 4.2 A e B. Estes resultados mostraram uma diminuição na expressão de anexina A2 nas células a expressar o shRNA para a anexina A2, (HT1080 e MDA-MB 231 p36-4) comparativamente com as células controlo (HT1080 e MDA-MB 231 p36-*scramble*). Observou-se também a sobre-expressão de H-Ras nas células com pBABE-H-Ras-v12 (HT1080 e MDA-MB H-ras) comparativamente com o respetivo controlo pBABE (HT1080 e MDA-MB pBABE). É de salientar que nas células HT1080 a expressão de HRas é mais elevada aquando da depleção de anexina A2.

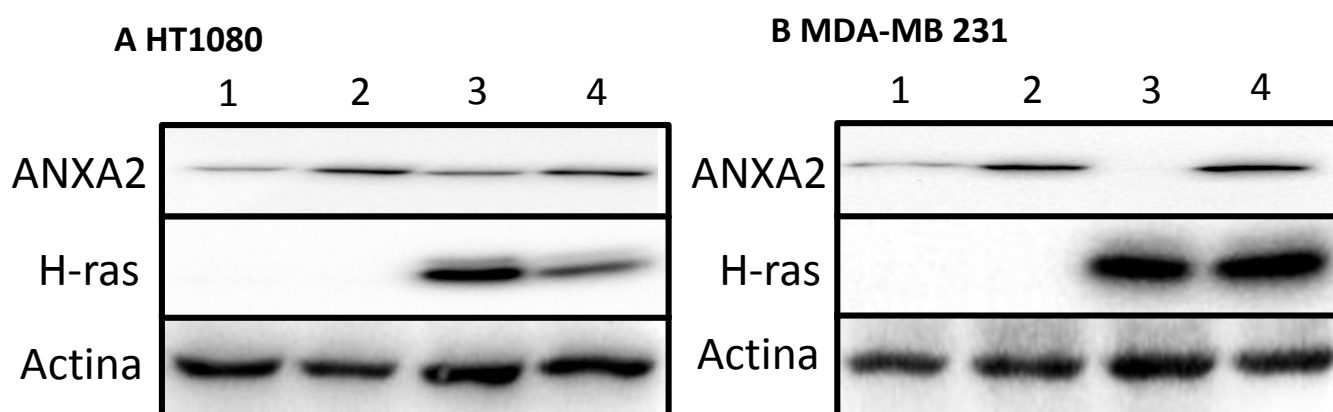


Figura 4.2 – Descrição das linhas celulares, após inserção do shRNA referente à anexina A2 e respetivo controlo (p36-4 e P36-*scramble*) e do cDNA referente ao H-Ras (pBABE e pBABE H-Ras-v12) - Células HT1080 e MDA-MB 231 foram infetadas primeiramente com sobrenadante retroviral de células Phoenix transfetadas com pBABE-H-Ras v12 (3 e 4) ou pBABE (1 e 2). Foram sujeitas a nova infeção pelo mesmo processo usando o retrovírus pSUPER-retro-Neo *knockdown* para anexina A2 (p36-4) ou *scramble* (p36-*scramble*). Foram preparados lisados das linhas celulares e 20 μ g de cada lisado proteico foi sujeito a SDS-PAGE seguido de *western blotting* com os anticorpos indicados.

4.2 Análise das vias de sinalização celular

De modo a investigar se a anexina A2 desempenharia algum papel na regulação de vias de sinalização ativadas por H-Ras, utilizei as linhas celulares descritas acima. Foram avaliadas as vias de sinalização ativadas por Ras: MAPK/ERK e PI3-K/Akt. Estas vias, como já referido, estão envolvidas na proliferação e sobrevivência celular.

Foram preparados lisados proteicos das células MDA-MB 231 e HT1080 p36 shRNA4 ou p36 scramble, a expressar pBABE ou H-Ras v12 que foram submetidos a SDS-PAGE. Em seguida, a análise das vias de sinalização ativadas por HRas (P-Akt e P-Erk 1/2) foi feita por *western blotting*.

Os resultados obtidos (figura 4.3) mostraram que as vias de sinalização MAPK/ ERK (P-Erk 1/2) e PI3K/Akt (P-Akt) se encontram mais ativas nas linhas celulares a sobre-expressar H-Ras quando comparadas com as linhas controlo (pBABE, sem sobre-expressão de H-Ras). Em células a sobre-expressar H-Ras observou-se também que a depleção de anexina A2 levou a um aumento significativo na ativação da via PI3-K/ Akt (P-Akt) comparativamente com as células controlo (com níveis endógenos de anexina A2 e a sobre-expressar H-Ras).

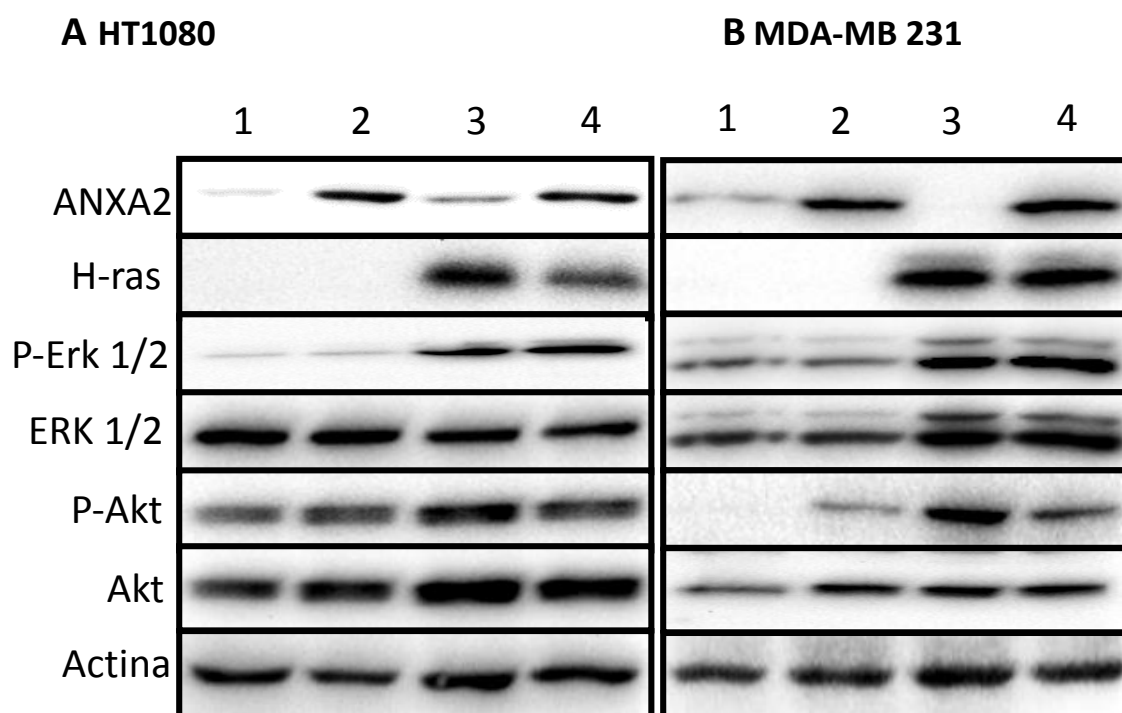


Figura 4.3 – Western blotting para análise das vias de sinalização ativadas por Ras (1- pBABE p36-4; 2- pBABE P36-scramble; 3- H-Ras p36-4; 4- H-Ras p36-scramble). Foram preparados lisados das 4 linhas celulares e 20 µg de proteína foram sujeitas a SDS-PAGE seguido de *western blotting* com os anticorpos indicados.

4.3 Análise das proteínas do sistema antioxidante

A anexina A2 possui funções antioxidantes devido à cisteína reativa que possui na sua região N-terminal, Cys-8, reagindo diretamente e inativando H_2O_2 . A sobre-expressão de HRas tem por consequência o aumento das ERO, nomeadamente a ativação constitutiva de NOX1 que leva à produção de H_2O_2 .

Para analisar o perfil de proteínas redox em células depletadas de anexina A2 (proteína antioxidante) e a sobre expressarem H-Ras (proteína pró-oxidante) procedi à análise por *western blotting* de proteínas do sistema antioxidante utilizando as linhas celulares descritas em 4.1.

Foram preparados lisados proteicos das células MDA-MB 231 e HT1080 p36 shRNA4 ou p36-*scramble*, a expressar pBABE ou H-Ras v12 que foram submetidos a SDS-PAGE. Em seguida, a expressão das proteínas do sistema antioxidante (peroxirredoxina I-IV, peroxirredoxina II e tioredoxina) foram analisadas por *western blotting*.

A partir da figura 4.4 observou-se novamente, como descrito em 4.3, nas células HT1080 H-Ras p36 shRNA4 que existe um aumento significativo na expressão de H-Ras comparativamente com as células HT1080 H-Ras *scramble*.

Nas linhas celulares que apresentam sobre-expressão de H-Ras e depleção de anexina A2 existe um aumento na expressão da proteína do sistema antioxidante peroxirredoxina II. Estes resultados foram observados para os dois tipos celulares estudados (MDA-MB 231 e HT1080).

Nas células MDA-MB 231 HRas p36 shRNA4 observou-se uma diminuição na expressão de tioredoxina (Trx), enquanto que o oposto ocorreu em células HT1080 H-Ras p36 shRNA4, onde se observou, tal como para a peroxirredoxina II, um aumento de expressão de Trx.

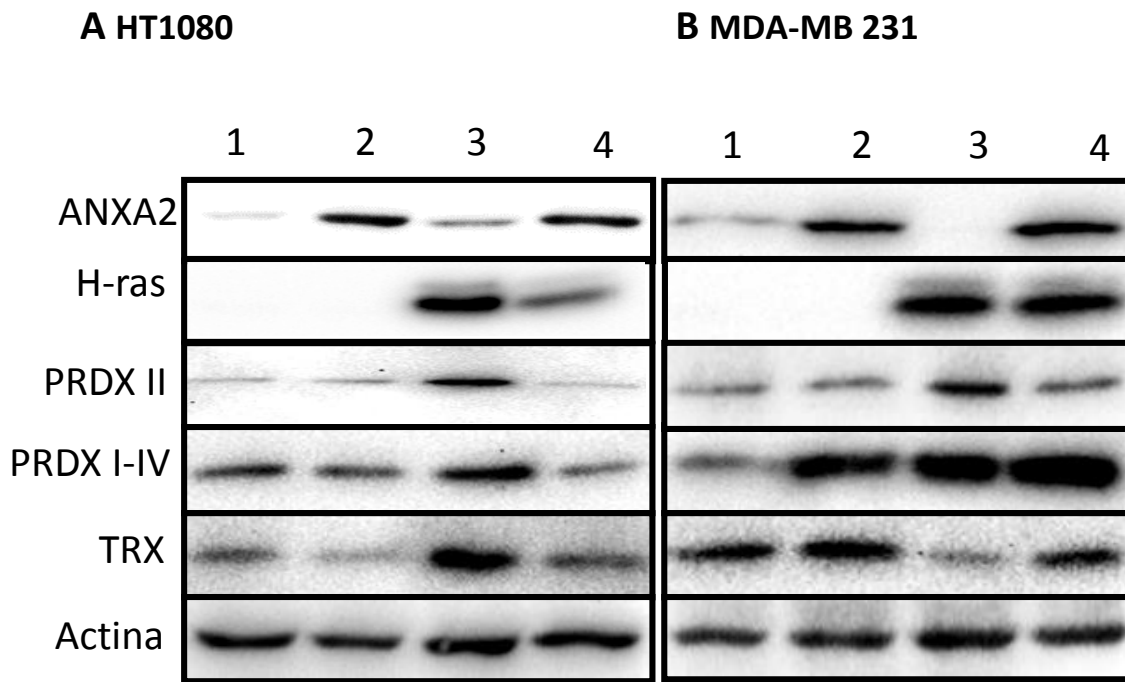


Figura 4.4 – Western blotting para análise das vias de sinalização ativas por Ras - (1- pBABE p36-4; 2- pBABE p36-scramble; 3- H-ras p36-4; 4- H-ras P36-scramble). Foram preparados lisados das 4 linhas celulares e 20 µg de proteína foram sujeitas a SDS-PAGE seguido de western blotting com os anticorpos indicados.

4.4 - Análise da estabilidade proteica

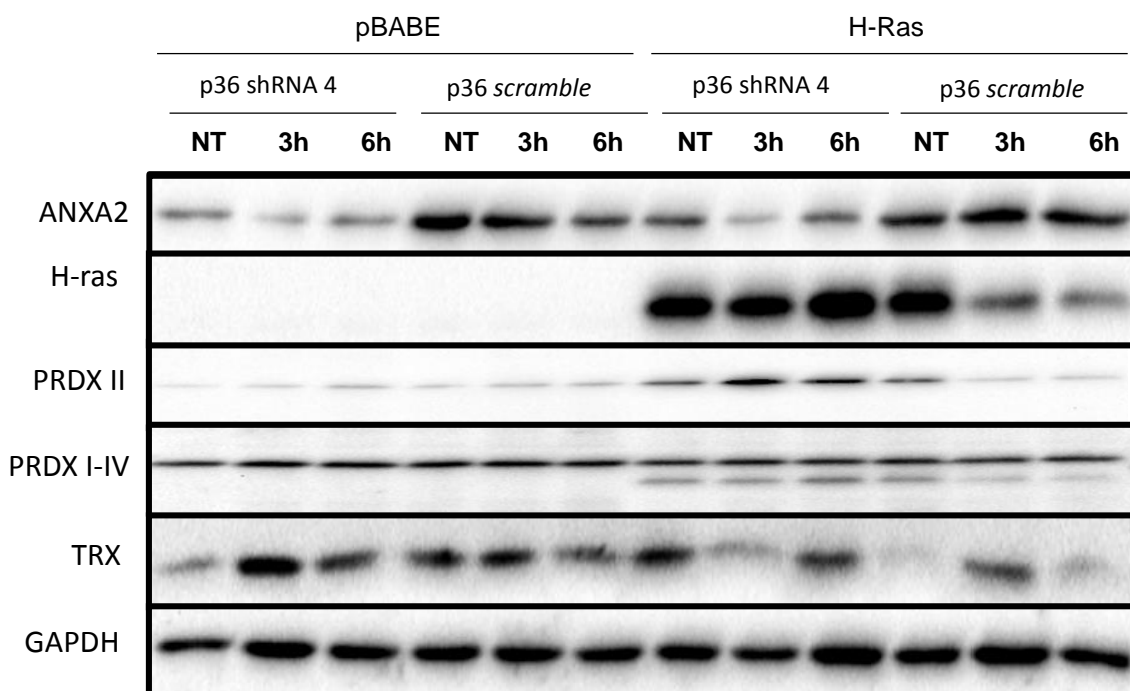
4.4.1 - Ensaio com cicloheximida

Devido aos resultados anteriormente obtidos em que foram observadas diferenças na expressão proteica nomeadamente de H-Ras e de peroxirredoxina II, realizou-se o ensaio com cicloheximida para determinar se o aumento da expressão estava relacionado com uma maior estabilidade das proteínas em questão nas células MDA-MB231 e HT1080 H-Ras p36-4, comparativamente com as restantes linhas celulares.

A cicloheximida é um antibiótico produzido pela bactéria gram-positiva *Streptomyces griseus* e desempenha como atividade biológica a inibição da tradução do mRNA não permitindo a formação de cadeias polipeptídicas pelo ribossoma 80s Assim, após adição de cicloheximida as células não conseguem sintetizar proteínas e a concentração destas mesmas proteínas ao longo do tempo nas células depende do seu tempo de meia vida/ estabilidade.

As células foram expostas a cicloheximida por diferentes períodos de tempo (*time courses*), de modo a determinar se existiam diferenças na estabilidade de proteínas nas diferentes linhas celulares estudadas.

A HT1080



B MDA-MB 231

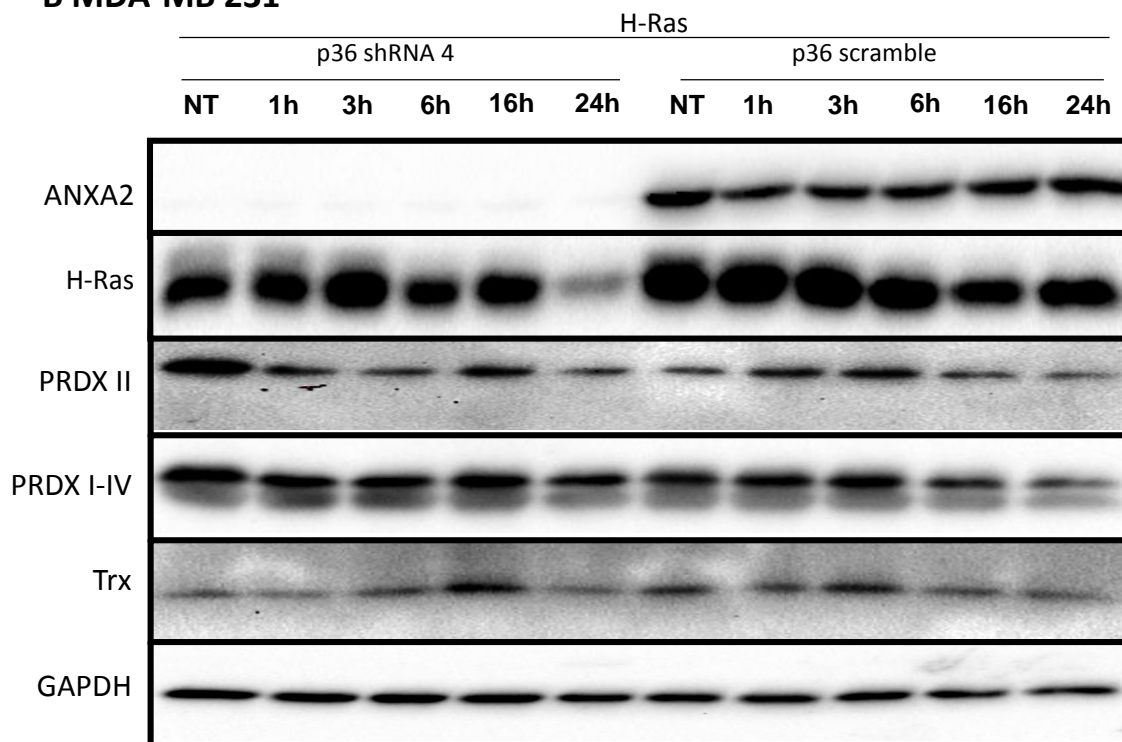


Figura 4.5 - Análise da estabilidade proteica em células HT1080 e MDA-MB 231 submetidas a tratamento com ciclohexamida – Células HT1080 e MDA MB 231 foram não tratadas (NT) ou tratadas com 50 μ M de CHX por diferentes períodos de tempo como indicado na figura (Figura A: NT, 3h e 6h; Figura B: NT, 1h, 3h, 6h, 24h). De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 20 μ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de *western blotting* com os anticorpos indicados na figura.

De acordo com os resultados do ensaio com ciclohexamida representados na figura 4.5 em A, a linha celular HT1080 H-Ras p36 shRNA 4, apresenta uma maior estabilidade da proteína H-Ras em comparação com as células controlo (HT1080 H-Ras P36-scramble) em que na presença de anexina A2 a proteína H-Ras é mais rapidamente degradada.

Não se verificou o mesmo aumento de estabilidade da proteína H-Ras nas células MDA-MB 231, o que está de acordo com os resultados anteriores onde não se verificou o aumento da expressão de H-Ras em células depletadas de anexina A2.

Verificou-se também nas linhas celulares com depleção da anexina A2 e sobre-expressão de H-Ras (HT1080 e MDA-MB 231 H-ras p36-4) uma maior estabilidade da proteína do sistema antioxidante peroxirredoxina II.

4.4.2- Ensaio com actinomicina D

O aumento da expressão de H-Ras e de peroxirredoxina II pode dever-se, como acima descrito, ao aumento da estabilidade proteica, contudo pode também dever-se a um aumento da estabilidade do mRNA tendo-se procedido à realização do ensaio com actinomicina D. Este composto é produzido pelas bactérias do género *Streptomyces* e atua ao nível da transcrição do mRNA, inibindo-a. A actinomicina D liga-se ao DNA na zona do complexo de transcrição impossibilitando o processo de alongação do RNA pela RNA polimerase.

A actinomicina D foi adicionada às células por diferentes períodos de tempo (*time courses*), de modo a determinar se existiam diferenças na estabilidade do mRNA.

A HT1080

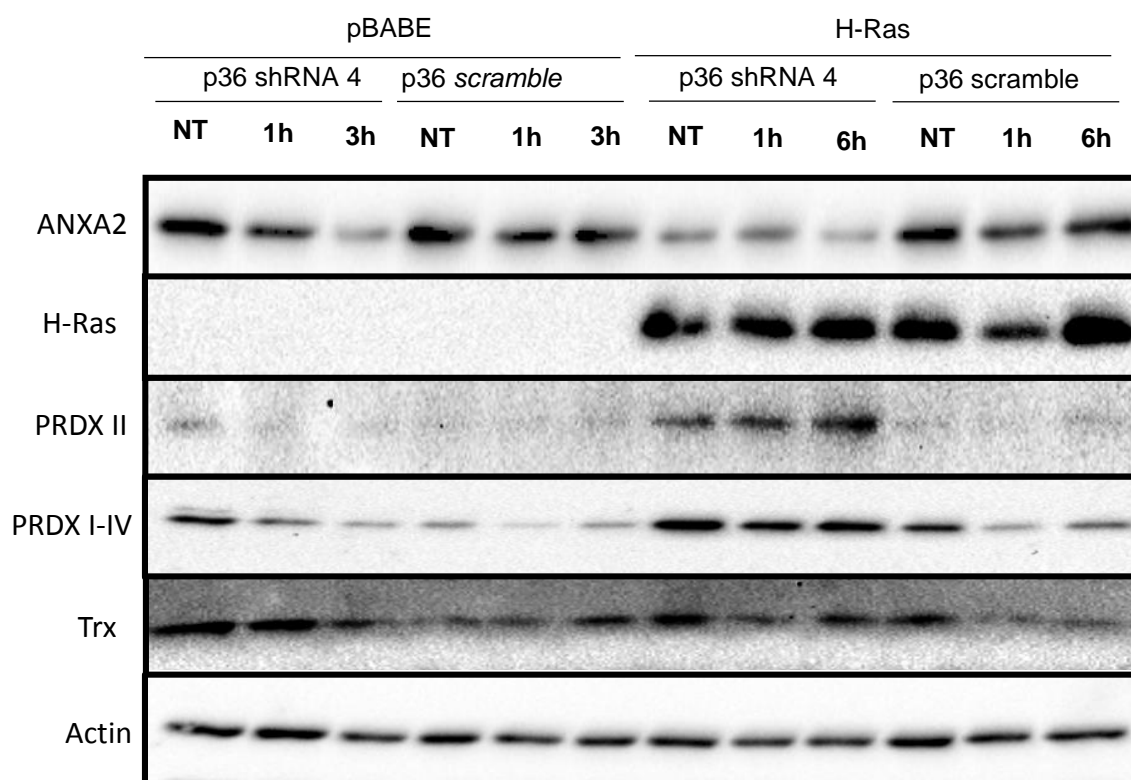


Figura 4.6 – Análise da estabilidade do mRNA em células HT1080 submetidas a tratamento com actinomicina D – Células HT1080 foram não tratadas (NT) ou tratadas com 50 μ M de actinomicina D por diferentes períodos de tempo como indicado na figura. De seguida, obtiveram-se os respetivos lisados celulares, sendo que, 20 μ g de cada amostra foi submetida a SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose e de *western blotting* com os anticorpos indicados na figura.

O ensaio com actinomicina D representado na figura 4.6 não apresentou quaisquer diferenças entre a estabilidade do mRNA das proteínas H-Ras e peroxirredoxina II das linhas celulares HT1080 pBABE e H-Ras, o mesmo resultado verificou-se quando comparadas as linhas celulares HT1080 HRas p36-4 e p36-*scramble*.

4.3 - Ensaio de viabilidade celular – MTT

Este ensaio foi realizado para avaliar se a ativação constitutiva do oncogene Ras conjuntamente com o silenciamento da anexina A2 teriam consequências na sobrevivência e/ou proliferação celular. Visto que as células utilizadas tinham constitutivamente ativo o oncogene Ras, como consequência, deveriam produzir níveis mais elevados de ERO, podendo estes ser tóxicos para as células levando à morte celular ou por outro lado ativar vias de transdução de sinal pró-proliferativas levando a um aumento de proliferação celular. A depleção da anexina A2 nestas células podia por isso baixar a capacidade de inativação de ERO e como tal ter consequências a nível de proliferação e/ou viabilidade celular.

A HT1080

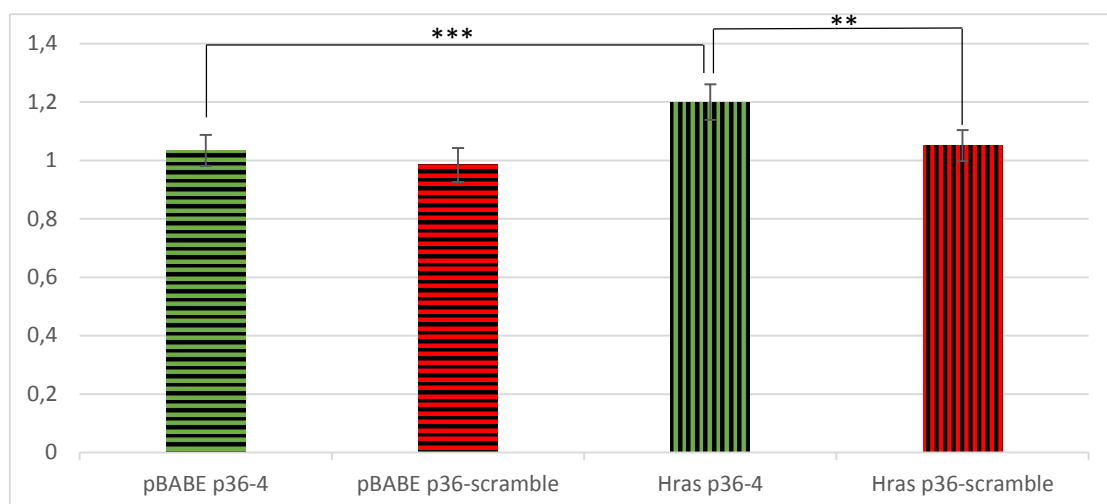


Figura 4.7 - Ensaio de viabilidade celular MTT nas células HT1080 com *knockdown* para a anexina A2 (p36-4) e respetivo controlo (p36-scramble) com sobre-expressão de H-Ras (H-Ras) e controlo (pBABE) - Ao meio celular adicionou-se 15 μ l de solução de sal de tetrazólio (solução corante) a cada poço e incubou-se cerca de 4 horas a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO₂. O sal foi degradado pelas células convertendo-se em *formazan*. Após as 4 horas adicionou-se a solução de solubilização que tornou o *formazan* solúvel, e mediu-se a absorvência a 570 nm. Os valores encontram-se expressos de acordo com a média +/- o desvio padrão sendo que o N=6. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste t Student : *** P < 0,001.

A análise dos resultados representados na figura 4.7, permitiram determinar que as células HT1080 H-Ras p36-4 quando comparadas com as restantes linhas celulares, demonstram uma maior viabilidade celular. Entre as HT1080 H-Ras p36-4 e p36-*scramble* (P=0,00159 **) existe um aumento no número de células viáveis, o mesmo se verifica entre as células HT1080 pBABE e H-Ras p36-4 (P=0,000549 ***).

4.4 - Medição da concentração de ERO

A realização deste ensaio adveio da necessidade de avaliar se a sobre-expressão do oncogene Ras aumenta verdadeiramente a concentração intracelular de ERO. Este ensaio serviu também para avaliar a função antioxidante da anexina A2 na eliminação de ERO em células cancerígenas a sobre-expressar o oncogene Ras.

Para este ensaio submeteram-se as células MDA-MB 231 a um novo *knockdown* para a anexina A2 utilizando o shRNA p36-3.

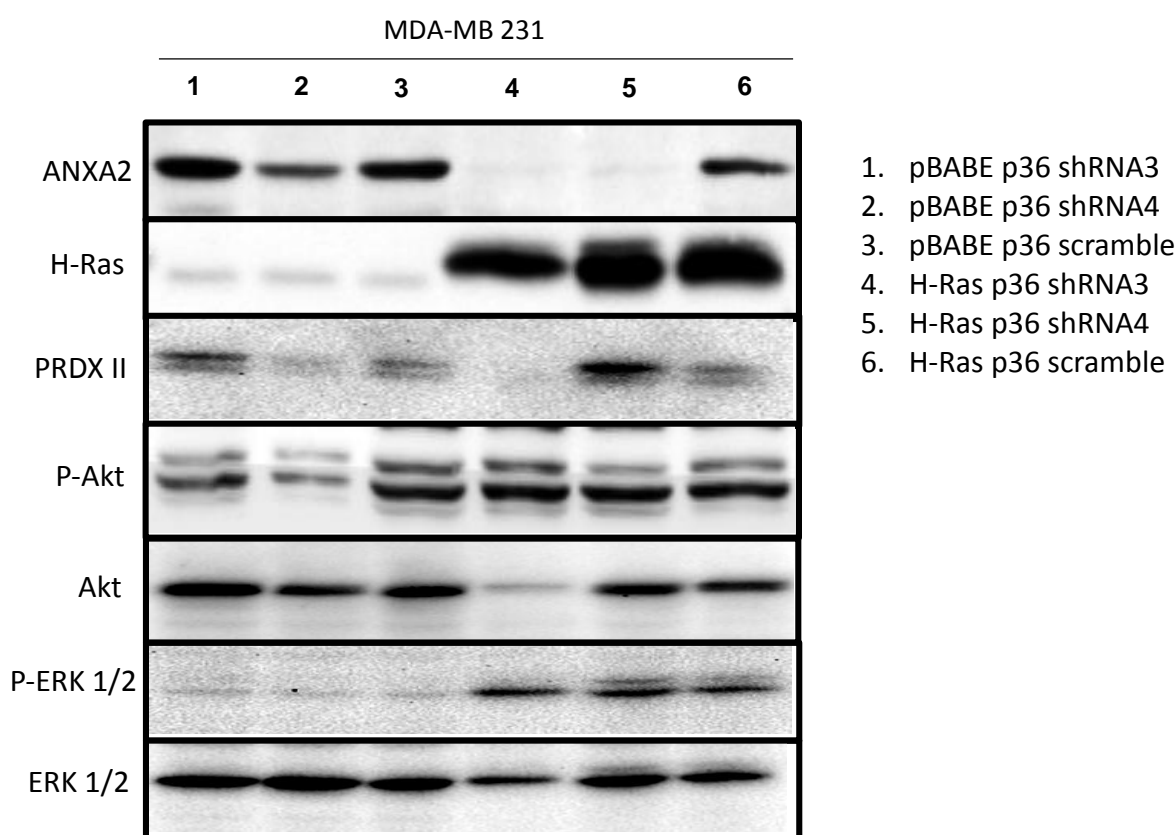


Figura 4.8 - Western blotting de células MDA-MB 231 knockdown para a anexina A2, sem ou com sobre-expressão de H-Ras - Células MDA-MB 231 foram infectadas primeiramente com sobrenadante retroviral de células Phoenix transfetadas com pBABE-H-Ras v12 (4,5 e 6) ou pBABE (1,2 e 3). Foram sujeitas a nova infecção pelo mesmo processo usando o retrovírus pSUPER-retro-Neo *knockdown* para anexina A2 (p36-3 e p36-4) ou *scramble* (p36-*scramble*). Foram preparados lisados das quatro linhas celulares e 20 µg de cada lisado proteico foi sujeito a SDS-PAGE seguido de *western blotting* com os anticorpos indicados.

As mesmas linhas celulares foram posteriormente utilizadas para a medição de ERO pelo ensaio com o reagente DCF-DA.

MDA MB 231

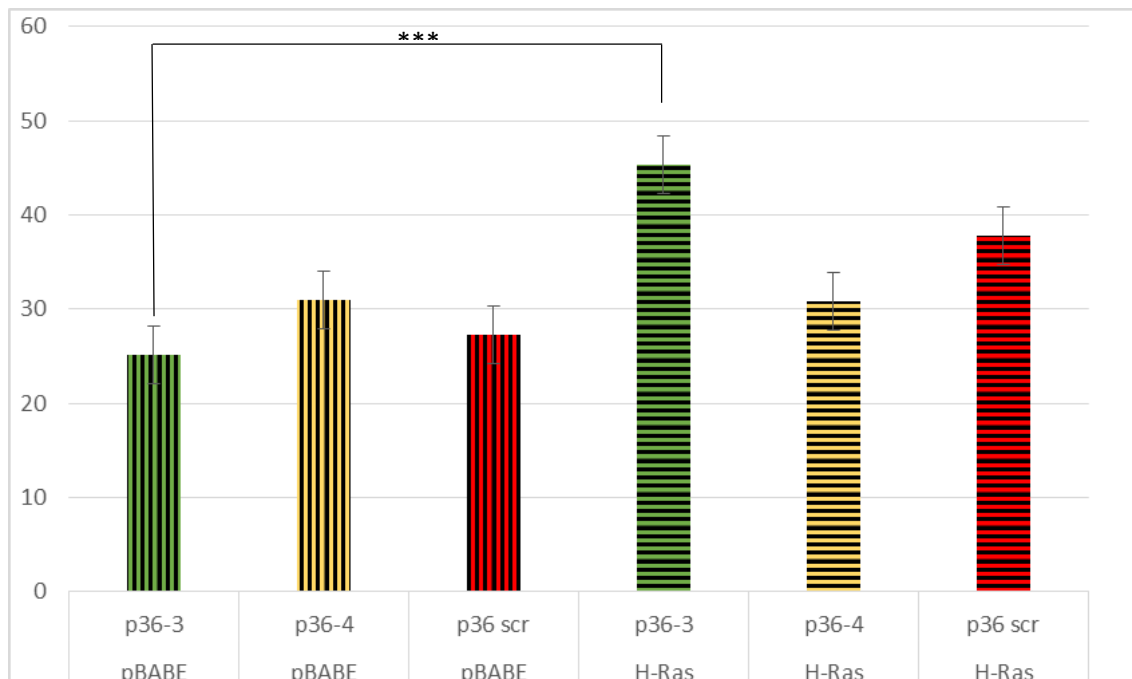


Figura 4.9 - Medição da concentração de ERO pelo ensaio DCF-DA em células MDA-MB 231 com *knockdown* para a anexina A2 (p36-3 e p36-4) e respetivo controlo (p36-scramble) com sobre-expressão de H-Ras (H-Ras) ou controlo (pBABE) - Inicialmente retirou-se o meio DMEM, e lavaram-se as células com PBS, retirou-se. Colocou-se novamente 100 μ l de PBS com Ca^{2+} e Mg^{2+} contendo 200 μ M de DCF-DA em cada poço. Incubou-se durante 30 minutos a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO_2 . Por fim foram medidas as respetivas fluorescências num espectrofotómetro (Excitação a 492nm e emissão a 530nm). Os valores encontram-se expressos de acordo com a média +/- o desvio padrão sendo que o N=6. A análise estatística foi efetuada recorrendo ao teste t Student : *** P < 0,001.

Ao analisar a figura 4.9 verificou-se uma maior concentração de ERO nas células a sobre-expressar HRas excetuando a linha celular HRas p36-4, quando comparadas com as pBABE. Comparando as células HRas e pBABE p36-3 existe uma diferença bastante significativa $P=0.000219$ ***, enquanto que nas H-Ras e pBABE p36-4 o mesmo não se verificou, sendo o valor da concentração de ERO praticamente idêntico.

5. Discussão

Há cerca de três décadas foram identificadas as primeiras mutações somáticas associadas ao gene *Ras* e desde essa época se tem atribuído às proteínas codificadas por este funções essenciais nas vias de transdução de sinal que controlam a proliferação celular, sobrevivência e diferenciação (Fernández-medarde & Santos, 2011). Mutações oncogénicas no gene *Ras* são frequentes, e centram-se na inativação da função GTPase o que torna a proteína constitutivamente ativa (Rajalingam et al., 2007) tendo por consequência a ativação de vias de sinalização envolvidas na proliferação e sobrevivência celular como é caso das vias MAPK/ERK e PI3-K/Akt e paralelamente, devido à ativação da via MAPK/ERK, a transcrição da enzima NOX1, induzindo desta forma a produção de ERO mais especificamente de H₂O₂ (Adachi et al., 2008; Castellano & Downward, 2011; Meier, 2005; Mendoza et al., 2011).

As ERO são tumorigénicas devido à capacidade que possuem em induzir vias de transdução de sinal que regulam a proliferação celular, sobrevivência e migração celular e também por mutagenese de DNA. São ainda capazes de causar lesões devido à oxidação do DNA, de proteínas e lípidos. Diversos estudos apontam para a elevada produção de ERO em células epiteliais tanto *in vivo* como *in vitro* estando as células em constante stress oxidativo o que as torna dependentes de proteínas antioxidantes. (Liou & Storz, 2012; Storz, 2005; Ziech, Franco, Pappa, & Panayiotidis, 2011)

Recentemente foram atribuídas à anexina A2 funções antioxidantes devido ao resíduo de cisteína reativo Cys-8 que, na presença de H₂O₂ é oxidado de forma reversível. A anexina A2 encontra-se sobre-expressa em vários tipos de cancro, estando positivamente associada com a progressão tumoral (P. A. Madureira et al., 2011). No entanto a atividade antioxidante da anexina A2 não foi ainda testada em células a sobre-expressar H-Ras.

5.1 - Análise da expressão das vias de sinalização celular e das proteínas do sistema antioxidante

No ensaio representado pela figura 4.2, na linha celular HT1080 HRas p36-4 a expressão de HRas é mais elevada comparativamente com as células HT1080 HRas p36-*scramble*, a maior expressão é consequência do aumento da estabilidade proteica verificado no ensaio com ciclohexamida (figura 4.5). Na linha celular MDA-MB 231 não se verificou o mesmo resultado pelo que aparenta não ser um mecanismo adotado por todos os tipos celulares, pois as células HT1080 derivam de uma linha celular de fibrossarcoma, pelo que são células mesenquimais enquanto as MDA-MB 231 derivam de um adenocarcinoma de mama sendo uma linha celular de origem epitelial.

Analisando as figuras 4.3 e 4.4 nas células HT1080 e MDA-MB 231 H-Ras verificou-se um aumento significativo na expressão das vias de sinalização celular PI3-k/Akt e ERK 1/2 em comparação com as células controlo HT1080 e MDA-MB 231 pBABE. Estes resultados evidenciam que a sobre-expressão de H-Ras ativa as vias envolvidas na proliferação e sobrevivência celular.

Verificou-se também um aumento na ativação da via de sinalização PI3-k/Akt nas linhas celulares HT1080 e MDA-MB 231 H-Ras p36-4 quando comparadas com as respetivas células controlo HT1080 e MDA-MB 231 H-Ras p36-*scramble* o que indica a anexina A2 desempenha uma função na regulação dessa mesma via de sinalização. A via PI3K/ Akt é regulada negativamente pela fosfatase PTEN que por sua vez contém dois resíduos de cisteína reativos que quando oxidados inibem a sua função. Desta maneira a depleção da proteína antioxidante anexina A2 pode estar associada com um aumento de stress oxidativo nas células H-Ras p36-4 que leva à inativação de PTEN e consequente sobre ativação da via PI3k/Akt.

A análise da expressão das proteínas do sistema antioxidante peroxirredoxina II, peroxirredoxina I-IV e tioredoxina por *western blotting* permitiu constatar que as linhas celulares HT1080 e MDA-MB 231 H-Ras p36-4 quando comparadas com as HT1080 e MDA-MB 231 HRas p36-*scramble* mostram um aumento na expressão da proteína do sistema antioxidante - peroxirredoxina II (Figura 4.4). Este efeito só é visível nas células a sobre expressar H-Ras e com *knockdown* para a anexina A2, pelo que na comparação

das células HT1080 e MDA-MB 231 pBABE p36-4, respetivos controlos e HT1080 e MDA-MB 231 H-Ras p36-*scramble*, não existem diferenças na expressão proteica.

A família das peroxirredoxinas é descrita pela literatura (Hall, Karplus, & Poole, 2009; Rhee, Kang, Chang, Jeong, & Kim, 2001) como peroxidases, pelo que controlam a concentração de H₂O₂. A peroxirredoxina II apresenta semelhanças com a anexina A2 e tal como esta, possui na sua constituição não um, mas dois resíduos de cisteína reativos que quando oxidados pela molécula de H₂O₂, são posteriormente reduzidos pela tioredoxina o que permite a redução de várias moléculas de H₂O₂. Devido ao modo de ação semelhante entre as proteínas, o resultado obtido sugere que, para contrabalançar a depleção de anexina A2 e equilibrar o nível redox existe um aumento na expressão de peroxirredoxina II.

5.2 - Análise da estabilidade proteica e do mRNA

Ensaio com ciclohexamida e actinomicina D

Devido aos resultados obtidos nos ensaios anteriores em que foi verificado o aumento da expressão de HRas e da peroxirredoxina II nas células com depleção de anexina A2, procederam-se aos ensaios com ciclohexamida e actinomicina D para determinar uma possível causa desse aumento podendo este dever-se a vários fatores, entre os quais um aumento estabilidade proteica e/ou da estabilidade do mRNA.

A partir dos resultados obtidos da análise da estabilidade proteica (figura 4.5) em que as células foram submetidas a tratamento com ciclohexamida durante um curso de tempo (*time course*) verificou-se o aumento da estabilidade da proteína Ras nas células HT1080 com *knockdown* para a anexina A2.

Observou-se também o aumento da estabilidade de peroxirredoxina II nas células H-Ras p36 shRNA4, comparativamente com as restantes linhas celulares estudadas. Estes resultados são válidos para as células, MDA-MB 231 e HT1080.

A partir destes resultados concluiu-se que o aumento da expressão de H-Ras e peroxirredoxina II nas células H-Ras p36-4 é devido a um aumento na estabilidade destas proteínas.

Relativamente ao ensaio com actinomicina D (figura 4.6) não foram verificadas diferenças significativas, contudo, no futuro, para investigar se existe ou não alteração ao nível da transcrição dos genes da *peroxiredoxina II* e *Ras* deveria submeter-se o mRNA das mesmas linhas celulares ao método de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) que devido à alta sensibilidade desta técnica, permite a quantificação de transcritos raros bem como de pequenas mudanças na transcrição dos genes.

5.3 - Ensaio de viabilidade celular – MTT

Os resultados referentes ao ensaio de viabilidade celular (figura 4.7), não evidenciam diferenças significativas entre as células pBABE e H-Ras. Contudo, quando são comparadas as linhas celulares H-Ras e pBABE p36-4 a diferença já é bastante significativa ($P= 0,000549^{***}$), pelo que existe um aumento no número de células, o mesmo resultado foi obtido entre a comparação das linhas celulares H-Ras p36-4 e p36-*scramble* ($P=0,00159^{**}$).

O aumento no número de células vai de encontro com os resultados obtidos nos ensaios das vias de sinalização, proteínas do sistema antioxidante e medição de ERO. A sobre-expressão de Ras e *knockdown* da anexina A2 originou, como demonstrado, o aumento da expressão da via mitótica MAPK/ERK, da via anti-apoptótica PI3-K/AKT, e consequentemente contribuiu também para o aumento da concentração de ERO. Para além disso, verificou-se também o aumento da expressão da proteína do sistema antioxidante peroxirredoxina II. Todos os resultados acima descritos são em prole do aumento da sobrevivência e proliferação celular, apoiando os resultados obtidos no ensaio MTT.

Contudo, pode também dever-se à área limitante da placa onde foi efetuado o ensaio. A linha celular utilizada só prolifera se estiver aderente à superfície da placa e no caso da concentração celular utilizada ser demasiado elevada, a área pode ser um fator limitante. Apesar de permitir a aderência celular, não irá permitir a sua proliferação. No futuro este ensaio deverá ser repetido com concentrações celulares mais baixas para permitir uma melhor análise e reprodutibilidade.

5.4 - Medição da concentração de ERO

Começando por comparar apenas as linhas pBABE p36-3, p36-4 e p36 scramble, não se observam diferenças significativas entre elas. Colocando em comparação as linhas celulares pBABE e H-Ras o resultado é outro completamente diferente, apresentando uma muito maior produção de ERO nas células H-Ras, conforme o esperado devido à sobre-expressão de H-Ras.

Comparando as pBABE e H-Ras p36-3, estas últimas, apresentam uma maior produção de ERO. As pBABE e H-Ras p36-4 apresentam níveis de produção praticamente iguais.

As diferenças significativas obtidas nos níveis de produção de ERO nas linhas celulares H-Ras p36-3 e p36-4 podem dever-se à eficiência do *knockdown* da anexina A2. Em ambas as linhas existe expressão de anexina A2, contudo, nas células H-Ras p36-3 a depleção e consequente eficácia do *knockdown* é inferior quando comparada com as H-Ras p36-4 onde a depleção é superior.

Com base nos ensaios e resultados anteriormente obtidos em que se observou um aumento da expressão da peroxirredoxina II em células depletadas de anexina A2, nomeadamente nas H-Ras p36-4, sugere-se então que o mesmo mecanismo aqui atue na eliminação de ERO para manter o equilíbrio redox. Este resultado explica também, o porquê dos níveis semelhantes de ERO verificados nas células H-Ras p36-4 quando comparadas com pBABE p36-4.

Na linha celular H-Ras p36-3 não se verificou, mesmo na depleção de anexina A2, a sobre-expressão de peroxirredoxina II, o que pode explicar a diferença entre os resultados. Nestas células depletadas de anexina A2, parece não haver compensação por parte do sistema antioxidante o que consequentemente eleva os níveis de ERO.

Apesar dos efeitos pró-proliferativos das ERO, são apenas necessárias pequenas quantidades para induzir a proliferação. Em grandes quantidades, colocam a célula em stress oxidativo, o que promove a senescência e consequente morte celular. É necessário e essencial que as células consigam manter os níveis de ERO dentro de

valores ideais pelo que estes resultados evidenciam a necessidade da expressão de proteínas do sistema antioxidante pelas células cancerígenas e não cancerígenas.

6 - Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram uma vez mais a função antioxidante já descrita para a anexina A2 deste vez com linhas celulares a sobre-expressar Ras oncogénico.

Identificou-se pela primeira vez que devido ao *knockdown* de anexina A2 e sobre-expressão de HRas, e conseqüente aumento dos níveis intracelulares de ERO, a célula necessita de reestabelecer os seus níveis redox e para tal aumenta a expressão de outra proteína do sistema antioxidante, nomeadamente da peroxiredoxina II.

Como já descrito pela literatura demonstrou-se também que a sobre-expressão de HRas leva ao aumento da expressão de vias de sinalização celular situadas a jusante nomeadamente as vias PI3-k/Akt e MAPK/ERK 1/2 que estão envolvidas em processos de proliferação celular e de sobrevivência. As conseqüências dos efeitos causados pelo aumento da expressão dessas mesmas vias são comprovados pelo aumento no número de células no ensaio de viabilidade celular nas linhas em que existe a sobre-expressão de HRas.

Conclui-se também que para além dos efeitos ao nível da viabilidade celular, a sobre-expressão de H-Ras acarreta também conseqüências para o aumento dos níveis de ERO, especialmente nas células H-Ras p36-3 em que não se verifica o aumento da expressão de peroxirredoxina II.

7 - Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos demonstraram um aumento na expressão e estabilidade das proteínas H-Ras e peroxirredoxina II em células depletadas de anexina A2, bem como um aumento na ativação das vias de sinalização ativadas por H-Ras, MAPK/ERK e PI3-K/Akt.

Os *western blotting* das células HT1080 demonstram que a expressão de H-Ras é ligeiramente mais elevada nas células depletadas de anexina A2, contudo não se sabe se existe uma interação direta ou indireta entre as duas proteínas pelo que no futuro se deveriam realizar ensaios de co-imunoprecipitação.

O aumento da expressão de H-Ras em células depletadas de anexina A2 foi apenas verificado nas células HT1080 e não nas MDA-MB 231. Estas células são de diferentes origens, as HT1080 são células mesenquimais enquanto que as MDA-MB 231 são epiteliais, pelo que seria interessante estudar as diferenças celulares para identificar a origem dos diferentes fenótipos.

Os ensaios com actinomicina D não demonstraram alteração significativas na estabilidade do mRNA. Contudo no ensaio com cicloheximida as diferenças observadas na estabilidade da peroxirredoxina II não foram muito significativas. O que sugere que esteja haver um aumento na transcrição do mRNA, pelo que no futuro se deveria realizar método de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) de modo a verificar a transcrição do gene da peroxirredoxina II.

Quanto aos ensaios de viabilidade (MTT) apesar de evidenciarem as diferenças entre as linhas celulares a sobre-expressar H-Ras e as controlo e estarem de acordo com os restantes resultados, é necessário realizá-los novamente utilizando concentrações celulares mais baixas de modo a otimizar a análise e os resultados obtidos.

As medições de ERO demonstram como se previa, uma maior concentração nas células a sobre-expressar H-Ras, tendo-se observado também um comportamento semelhante entre a anexina A2 e a peroxirredoxina II na eliminação de ERO o que sugere outro possível estudo sobre as diferenças e semelhanças entre as proteínas do sistema antioxidante.

8 - Bibliografía

- Adachi, Y., Shibai, Y., Mitsushita, J., Shang, W. H., Hirose, K., & Kamata, T. (2008). Oncogenic Ras upregulates NADPH oxidase 1 gene expression through MEK-ERK-dependent phosphorylation of GATA-6. *Oncogene*, *27*(36), 4921–4932. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.133>
- Alfadda, A. a, & Sallam, R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *J.Biomed.Biotechnol.*, *2012*, 936486. <http://doi.org/10.1155/2012/936486>
- Anderson, M. W., Reynolds, S. H., You, M., & Maronpot, R. M. (1992). Role of Proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, *98*(9), 13–24. <http://doi.org/10.1289/ehp.929813>
- Bedard, K., & Krause, K.-H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, *87*(1), 245–313. <http://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- Behrend, L., Henderson, G., & Zwacka, R. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochemical Society ...*, *31*(Pt 6), 1441–4. <http://doi.org/10.1042/>
- Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R., & Waisman, D. (2013). Annexin A2 heterotetramer: Structure and function. *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 14). <http://doi.org/10.3390/ijms14036259>
- Castellano, E., & Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer*, *2*(3), 261–274. <http://doi.org/10.1177/1947601911408079>
- Cox, A. D., & Der, C. J. (2003). The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*, *22*(56), 8999–9006. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1207111>
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *The New England Journal of Medicine*, *358*(5), 502–511. <http://doi.org/10.1126/science.7878455>
- Datta, K., Sinha, S., & Chattopadhyay, P. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *13*(6), 304–310. <http://doi.org/10.1155/2012/936486>
- Fernández-medarde, A., & Santos, E. (2011). Ras in Cancer and Developmental Diseases. *Genes & Cancer*, 344–358. <http://doi.org/10.1177/1947601911411084>
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *30*(2), 193–204. <http://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.07.007>
- Görlach, A., Dimova, E. Y., Petry, A., Martínez-Ruiz, A., Hernansanz-Agustín, P., Rolo, A. P., ... Kietzmann, T. (2015). Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and

- diseases: Problems solved? *Redox Biology*.
<http://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.016>
- Hall, A., Karplus, P. a., & Poole, L. B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins - Structures, mechanisms and functions. *FEBS Journal*, 276(9), 2469–2477.
<http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>
- Hanahan, D., Weinberg, R. a, & Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. a. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hejmadi, M. (2010). *Introduction to Cancer Biology*.
- Kamata, T. (2009). Roles of Nox1 and other Nox isoforms in cancer development. *Cancer Science*, 100(8), 1382–1388. <http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01207.x>
- Khan, M. A., Tania, M., Zhang, D. Z., & Chen, H. C. (2010). Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*, 22(2), 87–92.
<http://doi.org/10.1007/s11670-010-0087-7>
- Koeffler, H. P., McCormick, F. and, & Denny, C. (1991). Conferences and Reviews Molecular Mechanisms of Cancer. *West J Med*, 155, 505–514.
- Lambeth, J. D., Kawahara, T., & Diebold, B. (2007). Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(3), 319–331. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.028>
- Lassègue, B., & Griendling, K. K. (2010). NADPH oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(4), 653–661. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.181610>
- Lim, K. H., & Counter, C. M. (2005). Reduction in the requirement of oncogenic Ras signaling to activation of PI3K/AKT pathway during tumor maintenance. *Cancer Cell*, 8(5), 381–392. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.014>
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2012). Reactive oxygen species in cancer. *Changes*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Lokman, N. a., Ween, M. P., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2011). The role of annexin A2 in tumorigenesis and cancer progression. *Cancer Microenvironment*, 4(2), 199–208. <http://doi.org/10.1007/s12307-011-0064-9>
- Lowy, D. R., & Willumsen, B. M. (1993). Function and regulation of ras. *Annual Review of Biochemistry*, 62, 851–891. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.62.1.851>
- Lozano, G., Hulboy, D. L., & The, O. F. (1995). Transcriptional Regulation by Tumor Suppressor Genes, 224, 215–224.

- Lu, W., Ogasawara, M. a., & Huang, P. (2008). Models of reactive oxygen species in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 4(2), 67–73.
<http://doi.org/10.1016/j.ddmod.2007.10.005>
- Madureira, P. A., Hill, R., Miller, V. A., Wing, P., Lee, K., & Waisman, D. M. (2011). Annexin A2 is a novel Cellular Redox Regulatory Protein involved in Tumorigenesis, 2(12), 1075–1093.
- Madureira, P. a., & Waisman, D. M. (2013). Annexin A2: The importance of being redox sensitive. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 3568–3594.
<http://doi.org/10.3390/ijms14023568>
- Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595–603.
[http://doi.org/10.1016/S0009-9120\(99\)00075-2](http://doi.org/10.1016/S0009-9120(99)00075-2)
- McCubrey, J. a., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., ... Franklin, R. a. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1263–1284.
<http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001>
- McKay, M. M., & Morrison, D. K. (2007). Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 26(22), 3113–3121. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1210394>
- Meier, F. (2005). The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in Bioscience*, 10(1-3), 2986. <http://doi.org/10.2741/1755>
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(6), 320–328.
<http://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>
- Mineo, C., Anderson, R. G. W., & White, M. a. (1997). Physical association with Ras enhances activation of membrane-bound Raf (RafCAAX). *Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10345–10348. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10345>
- Pelicano, H., Carney, D., & Huang, P. (2004). ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, 7(2), 97–110.
<http://doi.org/10.1016/j.drug.2004.01.004>
- Prior, I. a, Lewis, P. D., & Mattos, C. (2012). A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research*, 72(10), 2457–2467. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2612.A>
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, 11(11), 761–774.
<http://doi.org/10.1038/nrc3106>

- Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., & Albert, Š. (2007). Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1177–1195. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.01.012>
- Ray, P. D., Huang, B.-W., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signalling*, 24(5), 981–990. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., & Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*, 52(1-2), 35–41. <http://doi.org/10.1080/15216540252774748>
- Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, D., Das, P., ... Downward, J. (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, 89(3), 457–467. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80226-3](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80226-3)
- Schulz, W. A. (1996). *Molecular Biology of Human Cancers. ... Reviews in Oral Biology & ...*. Retrieved from <http://cro.sagepub.com/content/7/4/319.short>
- Schumacker, P. T. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: Live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, 10(3), 175–176. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.015>
- Shortt, J., & Johnstone, R. W. (2012). Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a009829>
- Storz, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 10(1-3), 1881. <http://doi.org/10.2741/1667>
- Tidyman, W. E., & Rauen, K. a. (2009). The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(3), 230–236. <http://doi.org/10.1016/j.gde.2009.04.001>
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Wallis, Y. L., & Macdonald, F. (1999). Demystified ... oncogenes. *Molecular Pathology : MP*, 52(2), 55–63. <http://doi.org/10.1136/mp.52.2.55>
- Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, 5, 14. <http://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>
- Weinberg, R. a. (2014). *The Biology of cancer* (Second edi). Garland Sciences.

- Wong, K. K., Engelman, J. a., & Cantley, L. C. (2010). Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics and Development*, 20(1), 87–90. <http://doi.org/10.1016/j.gde.2009.11.002>
- Yuan, T. L., & Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*, 27(41), 5497–5510. <http://doi.org/10.1038/onc.2008.245>
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2011). Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 711(1-2), 167–173. <http://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.02.015>
- Cooper GM, 2000 The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.