

Scheilla Teixeira Strumillo

**ESTUDO DA COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS GTPASES RAS E
RAC1 EM CÉLULAS DA LINHAGEM DE TUMORES HUMANOS DE
MAMA MDA-MB-231 MEDIANTE ATIVAÇÃO POR FONTES
ENDÓGENAS E EXÓGENAS DE ÓXIDO NÍTRICO: ASSOCIAÇÃO
COM A MIGRAÇÃO CELULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de
Doutora em Ciências

São Paulo

2019

Scheilla Teixeira Strumillo

**ESTUDO DA COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS GTPASES RAS E
RAC1 EM CÉLULAS DA LINHAGEM DE TUMORES HUMANOS DE
MAMA MDA-MB-231 MEDIANTE ATIVAÇÃO POR FONTES
ENDÓGENAS E EXÓGENAS DE ÓXIDO NÍTRICO: ASSOCIAÇÃO
COM A MIGRAÇÃO CELULAR**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Hugo Pequeno
Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Wagner Luiz
Batista

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka

Coordenadora do curso de pós-graduação: Profa. Dra. Marimélia Aparecida
Porcionatto

Scheilla Teixeira Strumillo

**ESTUDO DA COMPARTIMENTALIZAÇÃO DAS GTPASES RAS E
RAC1 EM CÉLULAS DA LINHAGEM DE TUMORES HUMANOS DE
MAMA MDA-MB-231 MEDIANTE ATIVAÇÃO POR FONTES
ENDÓGENAS E EXÓGENAS DE ÓXIDO NÍTRICO: ASSOCIAÇÃO
COM A MIGRAÇÃO CELULAR**

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro

Banca examinadora:

Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

Dra. Thaysa Paschoalin

Profa. Dra. Elaine Guadelupe Rodrigues

Prof. Dr. Ivarne Luis dos Santos Tersariol

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha avó Delmina, tia Nair e tia Guiomar (*in memoriam*)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hugo Pequeno Monteiro pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela paciência, pelos desafios e aprendizado.

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Batista que deu suporte principalmente nos momentos mais críticos. Obrigada pela paciência e cuidado com os detalhes deste trabalho.

A Profa. Dra. Elaine Guadelupe Rodrigues que nos deu suporte financeiro durante o desenvolvimento do projeto e sem o qual não seria possível dar andamento a muitos dos experimentos programados.

Ao Dr. Victor Debbas e Dra. Ana Moretti pela doação de anticorpos utilizados nesta tese.

A Betty pelo cuidado e preocupação com o preparo de material e reagentes, mesmo não sendo oficialmente do nosso laboratório. Obrigada também pelas conversas e risadas que me deixaram mais leve nos momentos mais difíceis.

As técnicas Elizabete e Carol do Infar que me auxiliaram no microscópio confocal.

A Marina Navarro, Alison Chaves e aos técnicos Wilson e Palloma pela paciência e auxílio nos experimentos executados no Campus Diadema.

Aos técnicos Sandra, Alex e Ronaldo pela organização do laboratório e preparo de reagentes.

Aos secretários do departamento, Patrícia e Maurício, que muito me auxiliaram com os prazos e informações sobre a pós-graduação.

Aos parceiros de laboratório Maytê, Victor, Ana Caroline, Caroline, Vitória e Paulo pelo companheirismo, discussões científicas, filosóficas e pessoais.

A Marli, Eloísa Castro, Heloísa Rosa, Rita, Mariana, Teresa, Rafaella e Thalita, que já não estão mais no laboratório, mas que também contribuíram para o meu aprendizado.

Aos professores Dra Karina Ramalho Bortoluci, Dr. José Ronnie Vasconcelos Dr. Sang Won Han, Dra. Maria Luiza Vilela Oliva, Dra. Janete Maria Cerutti e Dra.

Thaysa Paschoalin por permitir o uso de equipamentos em seus laboratórios e empréstimo de reagentes.

Aos colegas dos laboratórios vizinhos Kely Catarine, Camila Pontes, Bárbara Moraschi, Isaú Noronha, Carol Monteiro, Aline Pacheco, Alex Nasaré, Marcela Corso, Camila Bonazza e Gabriel Avelar pelo empréstimo de reagentes, discussões de protocolos e conversar filosóficas.

Aos meus queridos familiares, pelo apoio de sempre, paciência e por acreditarem na minha capacidade.

Aos meus queridos amigos Carla, Lidiane, Lessandro, Karina, Midori, Fernanda e Andréia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2013/20633-8, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
Resumo	xviii
Abstract.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Câncer de mama	20
1.2. Câncer e a oncoproteína Ras	20
1.3. Modificações pós-tradução em Ras.....	22
1.4. NO e Ras	25
1.5. iNOS e Ras.....	27
1.6. Compartimentalização de Ras.....	28
1.7. Rac1	33
2. OBJETIVOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Cultivo da linhagem MDA-MB-231	37
3.2. Estimativa da concentração de óxido nítrico endógeno por DAF-2 DA mediante estímulo com LPS	37
3.3. Avaliação da viabilidade celular utilizando-se o reagente MTT	38
3.4. Contagem das células com azul de Trypan.....	38
3.5. Ensaio de migração	39
3.6. Preparação das bactérias competentes utilizando cloreto de cálcio	40
3.7. Produção das beads de Glutationa-Sepharose-GST-RBD e Glutationa-Sepharose-GST-PBD	41
3.7.1. Transformação das bactérias BL21 com pGEX-RBD e pGEX-PBD para obtenção de plasmídeos.....	41
3.7.2. Expressão de RBD e PBD.....	41
3.7.3. Etapa de ligação da glutationa-sepharose (beads de GSH-Sepharose) com RBD ou PBD	42
3.8. Ensaio das atividades de Ras e Rac1	43
3.9. Produção dos plasmídeos pcDNA3-H-Ras ^{WT} , pEYFP-RBD e pEGFP-PBD ...	44
3.9.1. Transformação bacteriana.....	45
3.9.2. Mini-preparação plasmidial	45
3.10. Cotransfecção dos plasmídeos pcDNA3-H-RAS ^{WT} e pEYFP-RBD nas células MDA-MB-231 ou HeLa para análise da H-Ras ativa em microscopia confocal.....	46

3.11. Transfecção do plasmídeo pEGFP-PBD nas células MDA-MB-231 e estimulação com EGF 10 ng/mL ou LPS 1 µg/mL para análise em microscopia confocal.....	46
3.12. Perfil de expressão gênica da RasGRP1 ou CAPRI na ausência e/ou presença de siRNA	47
3.12.1. Transfecção de siRNA RasGRP1 ou siRNA CAPRI	47
3.12.2. Extração de RNA da linhagem MDA-MB-231 com Trizol	48
3.12.3. Determinação das concentrações do RNA total	48
3.12.4. Tratamento do RNA com DNase	49
3.12.5. Transcrição reversa (RT) a partir de RNA extraído da linhagem MDA-MB-231.....	49
3.12.6. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) para RasGRP1 e CAPRI.....	50
3.13. Síntese de S-Nitrosoglutationa (GSNO)	51
3.14. Ensaio de biotina para detecção de Src nitrosilada.....	52
4. RESULTADOS	54
4.1. Ativação de Ras por GSNO	54
4.2. GSNO induziu aumento da viabilidade celular sem afetar a proliferação das células MDA-MB-231.....	55
4.3. GSNO não induziu a migração de células MDA-MB-231	57
4.4. Ras foi localizada na região perinuclear mesmo após o estímulo com GSNO.....	59
4.5. Elevação da produção endógena de NO em células MDA-MB-231 mediante estimulação por LPS	60
4.6. Ativação de Ras por estímulo com LPS	61
4.7. Aumento da viabilidade celular através do estímulo por LPS e contagem das células estimuladas utilizando azul de Trypan	62
4.8. Viabilidade e contagem celular com inibidores de iNOS, Ras, Src ou sequestrador de NO com subsequente estimulação por LPS.....	62
4.9. Estímulo da migração das células MDA-MB-231 após estímulo com LPS e participação de iNOS, Src, Ras e Rac1 neste evento	65
4.10. Participação de PLC- γ e Ca ²⁺ na migração celular	68
4.11. Migração das células MDA-MB-231 após transfecção dos siRNAs RasGRP1 e CAPRI e estímulo com LPS	69
4.12. LPS não estimulou a compartimentalização de Ras nas células MDA-MB-231.....	70
4.13. Soro Fetal Bovino e EGF não estimularam a compartimentalização de H-Ras nas células MDA-MB-231	71
4.14. Soro Fetal Bovino e EGF estimularam a compartimentalização de Ras em células HeLa.....	72
4.15. A atividade de Rac1 é estimulada por LPS em células MDA-MB-231	74

4.16.	Src é s-nitrosilada em células MDA-MB-231 estimuladas com LPS	75
4.17.	LPS promoveu a compartimentalização de Rac1 do citoplasma para a região perinuclear.....	76
5.	DISCUSSÃO.....	78
6.	CONCLUSÃO	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8.	ANEXO	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Descrição do tráfego de Ras e suas modificações pós-tradução nos diferentes compartimentos celulares.** A Farnesilação de Ras é mediada pela enzima farnesiltransferase (FTase) (a). A Ras farnesilada no citosol é transportada para membranas do retículo endoplasmático (RE), onde a sequência CAAX é processada pela enzima 1 conversora de Ras (RCE1) (c) e pela isoprenilcisteína carboxilmetil-transferase (ICMT) (d). A isoforma de Ras KRAS4B desvia da via de palmitoilação das outras isoformas de Ras e prossegue diretamente para a membrana plasmática (MP), através de uma via pouco conhecida que envolve chaperonas (e). A NRAS e HRAS prosseguem para a face citosólica do Complexo de Golgi onde são palmitoiladas (f). Ambas isoformas trafegam por intermédio de vesículas para a MP (g). A fosforilação da Ser181 de KRAS4B promove sua dissociação da MP e retorno ao sistema de endomembranas (e). NRAS e HRAS se dissociam da MP por meio da depalmitoilação e retornam ao Golgi para um novo ciclo de palmitoilação (h) (Ahearn et al., 2012).....24
- Figura 2. Esquema geral da síntese do óxido nítrico pelas NO sintases (NOS).** Para que as NOS tenham sua atividade enzimática, estas necessitam dimerizar e se associarem aos cofatores tetraidrobiopterina (BH4), haem, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Após a ligação a calmodulina (CAL), a enzima ativa catalisa a oxidação da L-arginina em citrulina e óxido nítrico (NO) e requer oxigênio molecular e NADPH como cosubstratos. Cada dímero de NOS coordena um átomo de zinco (Zn) (Vallance e Leiper 2002) ..25
- Figura 3. Apresentação esquemática que resume os eventos de sinalização celular mediados por Ras em dois compartimentos celulares, a membrana plasmática e o complexo de Golgi.** Quando receptores extracelulares são ativados (a), a proteína Src é recrutada e fosforila PLC- γ 1, a qual promove a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato. Este último promove a liberação de íons cálcio do retículo endoplasmático (b). DAG e cálcio induzem a translocação de RasGRP1 do citosol para o complexo de Golgi, ativando Ras associada a esta organela (c). A via “clássica” de ativação de Ras na membrana plasmática é mediada pela proteína Grb2 e Sos (d). A elevação dos níveis de cálcio induzem a ativação de CAPRI (e) que promove a desativação de Ras na membrana plasmática (f) como sugerido por Bivona e colaboradores (2003). .30
- Figura 4. Apresentação esquemática que resume os eventos de sinalização celular mediados por Ras e estimulados por fontes exógenas (GSNO) e endógenas (estímulo por bradicinina) de NO em células HeLa e em células endoteliais humanas.** O GSNO promoveu a S-nitrosilação tanto de Src quanto de Ras em células HeLa. A Ras ativada na membrana plasmática foi observada em tempos precoces por microscopia confocal. Por outro lado, a Src ativada recrutou PLC- γ , a qual promoveu a compartmentalização de Ras tardia no Golgi (esquema esquerdo). Em células endoteliais, a bradicinina promoveu a fosforilação de Akt e indução da produção endógena de NO, através da eNOS,

que causou a S-nitrosilação de Ras e localização desta GTPase somente na membrana plasmática (esquema direito) (Batista et al., 2013)	32
Figura 5. Resumo das principais fases do ciclo funcional de Rac1. Ligação do grupo geranilgeranil ao resíduo de cisteína terminal (CLL) da Rac1 traduzida no citosol catalisada pela enzima geranilgeranil transferase tipo I (GGT1) (1a). Na sequência, Rac1 desloca-se para o retículo endoplasmático (ER), onde é processada pela protease Rce1 e metiltransferase Icmt. A Rcc1 cliva a região C terminal e Rae1 o tripeptídeo LLL (1b). A Icmt incorpora um grupo metil no grupo carboxil α do resíduo de cisteína C terminal que se torna exposto para a finalização da reação catalisada por Rcc1 (1c). Posteriormente, a Rac1 retorna ao citosol e é estabilizada pela RhoGDI e permanece desativada até que a recepção de um sinal extracelular promova sua ativação (2). Com a ativação celular, Rac1 é rapidamente mobilizada para a membrana plasmática (PM) (3a) ou para o núcleo (3b) e é ativada (4). Ao final da fase efetora (5), Rac1 é desativada (6a) se reassocia a RhoGDI (6b) e permanece inativa no citosol até que uma nova ativação celular recomesse o ciclo (Bustelo et al. 2012)	34
Figura 6. Atividade de Ras após estímulo com GSNO 100 μM.....	54
Figura 7. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) após estímulo com GSNO.....	55
Figura 8. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Src e estímulo de GSNO 100 μM.....	56
Figura 9. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Ras FPT II e estímulo de GSNO 100 μM	56
Figura 10. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com pré-incubação das células com cPTIO 30 μM e estímulo de GSNO 100 μM	57
Figura 11. Ensaio de migração das células MDA-MB-231 com estímulo de GSNO 100 μM	58
Figura 12. Microscopia confocal da MDA-MB-231 após transfecção dos plasmídeos e estímulo com GSNO 100 μM	59
Figura 13. Estimativa da produção endógena de NO pelas células MDA-MB-231 após estímulo com concentrações crescentes de LPS	60
Figura 14. Atividade de Ras nas células MDA-MB-231 após estímulo com LPS 1 μg/mL.....	61
Figura 15. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) após estímulo com LPS	62
Figura 16. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de iNOS e LPS	63
Figura 17. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Ras e LPS 1μg/mL.....	63
Figura 18. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Src e LPS 1μg/mL.....	64
Figura 19. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com cPTIO 30 μM e LPS 1μg/mL.....	65
Figura 20. Ensaio de migração de células MDA-MB-231 estimuladas com LPS 1μg/mL na presença dos inibidores de iNOS, Src, Ras e Rac1	66

Figura 21. Ensaio de migração de células MDA-MB-231 não estimuladas e na presença dos inibidores de iNOS, Src, Ras e Rac1 (controles)	67
Figura 22. Ensaio de migração: gráficos representando a taxa de migração das células MDA-MB-231 estimuladas por LPS e na presença dos inibidores da iNOS, Src quinase, Ras e Rac1	67
Figura 23. Ensaio de migração das células MDA-MB-231 estimuladas com LPS 1μg/mL na presença dos inibidores da proteína PLC-γ e quelante de Ca2+	68
Figura 24. Ensaio de migração das células MDA-MB-231 que foram silenciadas para as proteínas RasGRP1 e CAPRI e estimuladas com LPS 1μg/mL.....	69
Figura 25. Expressão gênica relativa de RasGRP1 (A) e CAPRI (B) após o silenciamento dos mRNAs codificadores das duas proteínas. C representa a porcentagem de silenciamento referente a triplicata experimental	70
Figura 26. Microscopia confocal de H-Ras ativa na MDA-MB-231 antes e após o estímulo com LPS 1 μg/mL.....	71
Figura 27. Microscopia confocal da MDA-MB-231 transfetada e estimuladas com SFB 10%.....	71
Figura 28. Microscopia confocal da MDA-MB-231 transfetada e estimulada com EGF 50 ng/mL	72
Figura 29. Microscopia confocal das células HeLa super-expressando H-Raswt, transfetadas com os plasmídeos e estimuladas com SFB 10%.....	73
Figura 30. Microscopia confocal das células HeLa super-expressando H-Raswt, transfetadas com os plasmídeos e estimuladas com EGF 50 ng/mL	73
Figura 31. Atividade de Rac1 após estímulo com LPS 1 μg/mL	74
Figura 32. Atividade de Rac1 com inibidores de Src, Ras, iNOS, PLCγ e quelante de Ca2+ após estimulação com LPS 1μg/mL.....	75
Figura 33. Ensaio de biotina para avaliação da S-nitrosilação de Src quinase em células MDA-MB-231 estimuladas com LPS 1μg/mL.....	76
Figura 34. Ensaio de Microscopia confocal para as células MDA-MB-231 transfetadas com o biosensor de Rac1 ativa. A e B representam a localização de Rac1 nas células não estimuladas; C e D compartimentalização de Rac1 após estímulo com EGF e E e F Rac1 após estímulo com LPS 1 μg/mL	77
Figura 35. Esquema proposto da via de sinalização associada à migração das células MDA-MB-231 mediante o estímulo por LPS	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	serina treonina quinase
AP-1	proteína ativadora 1
BAPTA-AM	1,2-bis(2-aminofenoxy)etano N,N,N',N'-ácido tetraacético-acetoximetil éster
BCA	ensaio de ácido bicinconínico
BSA	albumina de soro bovino
BK	bradicinina
°C	grau Celsius
CaCl₂	cloreto de cálcio
CAPRI	inativador de Ras induzido por cálcio
Cdc42	proteína do ciclo de divisão celular 42
cGMP	guanosina monofosfato cíclico
cPTIO	2-(4-Carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
DAF-2 DA	4,5-Diaminofluoresceína Diacetato
DAG	diacilglicerol
DETA/NO	nonoato de dietilenotriamina
DMEM	meio Eagle modificado por Dulbecco
DTT	1,4-Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidérmico
Elk-1	fator de transcrição ETS Elk-1
ERK	quinase regulada por sinal extracelular

ERN	espécie reativa de nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
FPT II	(E,E)-2-[2-Oxo-2-[(3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienil)oxi]amino]etil] ácido fosfônico , 2Na
FRET	transferência de energia por ressonância fluorescente
GAP	proteína ativadora da atividade de GTPase
GEF	fator de troca do nucleotídeo guanina
GSH	L-glutationa reduzida
GSNO	S-nitrosoglutationa
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfônico
IL-1α	interleucina 1 alfa
IFNγ	interferon gama
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
kDa	kilodalton
LB	Lúria Bertani
L-NAME	N(G)-Nitro-L-arginina metil éster
LPS	lipopolissacarídeo
MEK	proteína quinase ativada por mitógeno
MgCl₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
 mM	milimolar
MMTS	metil metanotiosulfonato
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de dicotinamida e adenina

NF-κB	fator nuclear kappa B
NO	óxido nítrico
Nox-1	NADPH oxidase 1
Nox-2	NADPH oxidase 2
NP40	nonilfenil Polietileno Glicol
PBS	tampão fosfato salino
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PLC-γ1	fosfolipase C gama 1
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	fluoreto de polivinilideno hidrofílico
Rac1	Ras associada ao substrato 1 da toxina botulínica C3
Raf-1	Raf-1 proto-oncogene, serina/treonina quinase
Ras	proteína GTPase oncogênica
RasGRP1	proteína 1 de liberação de guanil de RAS
RhoGDI	inibidor de troca de nucleotídeo guanina
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
Src	proteína tirosina quinase não-receptor codificada pelo oncogene (Src) do vírus de sarcoma de Rous
TBS	tampão Tris salino
TLR4	receptor do tipo Toll 4
TNFα	fator de necrose tumoral alfa

Tris-base tris(hidroximetil)aminometano

µL microlitro

µM micromolar

Resumo

A Ras é uma proteína com atividade GTPásica expressa em todas as células que apresentam altas taxas de proliferação celular e apesar da baixa frequência das formas mutadas do oncogene *RAS* no câncer de mama (menor que 5%), há evidências que sugerem que a hiperatividade da proteína oncogênica Ras promove o crescimento e desenvolvimento desse tipo de câncer. Assim como a Ras, a Rac1 é uma GTPase e é alvo da sinalização mediada por Ras. Trabalhos publicados recentemente evidenciaram o envolvimento de Rac1 na migração de tumores de mama.

O Objetivo Geral que norteou o desenvolvimento deste projeto foi avaliar se a produção endógena de óxido nítrico (NO) pela linhagem celular MDA-MB-231, representativa do câncer de mama triplo-negativo, ou a exposição destas células a uma fonte exógena do radical livre representada neste projeto pelo s-nitrosotiol s-nitrosoglutationa (GSNO), estimularia a sinalização celular através da GTPase Ras e se este era um processo que poderia ocorrer em dois compartimentos celulares, a membrana plasmática e o complexo de Golgi. Posteriormente, analisamos o envolvimento da GTPase Rac1, a qual se encontra *downstream* na via de sinalização de Ras. Também queríamos determinar se a compartmentalização deste processo de sinalização celular mediado pelo NO seria determinante para as capacidades de migração e proliferação da linhagem tumoral MDA-MB-231. Em nossos resultados verificamos que o GSNO estimulou a atividade de Ras nas células MDA-MB-231, porém não estimulou a migração destas células. Embora o tratamento com GSNO tenha estimulado a viabilidade celular, a proliferação das células MDA-MB-231 aumentou ligeiramente, resultados que também observamos após o estímulo com LPS. Especulamos que a alta produção basal de NO nessas células seja um fator crítico para explicar os efeitos pouco acentuados do doador de NO na proliferação das células MDA-MB-231. O estímulo destas células com LPS resultou na produção endógena de NO e na compartmentalização de Rac1 para a região perinuclear após duas horas de estímulo, período que coincidiu com o estímulo de sua atividade. Nossos resultados também sugeriram que nas células MDA-MB-231, Ras se encontrava aparentemente residente na região perinuclear. Concluímos que o NO produzido endogenamente, mediante o estímulo das células com LPS, foi determinante para o estímulo de migração das células MDA-MB-231. Desta via de sinalização associada à migração celular participam as GTPases Ras e Rac1, iNOS, Src, PLC γ e íons Ca $^{2+}$.

Palavras-chave: iNOS; óxido nítrico; Ras; Rac1, migração; compartmentalização de Rac

Abstract

Ras is a protein with GTPase activity expressed in all cells with high cell proliferation rates and despite the low frequency of mutated forms of RAS oncogene in breast cancer (less than 5%), there is evidence to suggest that hyperactivity of Ras oncogenic protein promotes the growth and development of this cancer. Like Ras, Rac1 is a GTPase and is targeted by Ras mediated signaling. Recent published studies have shown the involvement of Rac1 in the migration of breast tumors.

The overall objective that guided the development of this project was to evaluate whether endogenous nitric oxide (NO) production by the MDA-MB-231 cell line, representative of triple-negative breast cancer, or exposure of these cells to an exogenous source of s-nitrosothiol s-nitrosoglutathione (GSNO) would stimulate cellular signaling through Ras GTPase and if this was a process that could occur in two cell compartments, the plasma membrane and the Golgi apparatus. Subsequently, we analyzed the involvement of GTPase Rac1, which is downstream in the Ras signaling pathway. We also wanted to determine whether the compartmentalization of this NO-mediated cell signaling process would be determinant for the migration and proliferation capabilities of the MDA-MB-231 tumor line. In our results we found that GSNO stimulated Ras activity in MDA-MB-231 cells, but did not stimulate the migration of these cells. Although GSNO treatment stimulated cell viability, MDA-MB-231 cell proliferation increased slightly, results that we also observed after LPS stimulation. We speculate that the high baseline NO production in these cells is a critical factor in explaining the mild effects of NO donor on MDA-MB-231 cell proliferation. The stimulation of these cells with LPS resulted in endogenous NO production and compartmentalization of Rac1 to the perinuclear region after two hours of stimulation, a period that coincided with the stimulation of its activity. Our results also suggested that in MDA-MB-231 cells Ras was apparently resident in the perinuclear region. We concluded that endogenously produced NO, by stimulating cells with LPS, was determinant for the migration stimulus of MDA-MB-231 cells. In this signaling pathway associated with cell migration participate the Ras and Rac1 GTPases, iNOS, Src, PLC γ and Ca $^{2+}$ ions.

Keywords: iNOS; nitric oxide; Ras; Rac1, migration; Rac1 compartmentalization

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama

O câncer de mama é o tipo de câncer de maior incidência entre as mulheres, respondendo aproximadamente por 29,5% dos casos novos de câncer a cada ano. Estatísticas indicam aumento de sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. Em 2015, ocorreram 15.403 óbitos de mulheres com câncer de mama no Brasil e estimou-se a incidência de 59.700 novos casos para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA 2018).

O prognóstico e a evolução do câncer de mama caracterizam-no como uma doença extremamente diversificada, o que vem sendo confirmado por estudos moleculares. Faz parte da avaliação-padrão da paciente o estudo imunohistoquímico do tumor com o objetivo principal de obter informações sobre a expressão de receptores de estrógeno, receptores de progesterona e para o receptor do fator de crescimento epidérmico do subtipo 2 (HER-2) pelas células neoplásicas. Essas proteínas funcionam como marcadores tumorais de valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento. O câncer de mama triplo-negativo refere-se a tumores que, quando analisados por imunohistoquímica, não expressam receptores de estrógeno, progesterona e HER-2. Tumores com o fenótipo triplo-negativo apresentam um comportamento mais agressivo e se caracterizam por uma resposta negativa aos protocolos de tratamento existentes (Khosravi-Shahi, Cabezón-Gutiérrez, e Custodio-Cabello 2018; Denkert et al. 2017; Jhan e Andrechek 2017; Corrêa et al. 2010).

1.2. Câncer e a oncoproteína Ras

A proteína Ras, também conhecida como p21^{ras}, pertence a uma grande família de proteínas com atividade GTPásica e com baixo peso molecular (21 kDa). O ciclo ordenado da proteína Ras depende de duas reações: (1) troca de nucleotídeo (GDP por GTP), que ativa a proteína, e (2) hidrólise de GTP, que recupera a forma inativa de Ras associada ao GDP. Ambos os processos são regulados por processos enzimáticos e não-enzimáticos. A troca de nucleotídeo (GDP) é promovida pelos fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs) e a hidrólise do GTP associado a forma ativa de Ras por proteínas ativadoras da atividade de GTPase (GAPs). Ras está

envolvida em vias de transdução de sinal conectando eventos de muitos receptores de superfície celular para processos intracelulares. Mutações pontuais no gene *RAS* (com alterações nos resíduos 12, 13 e 61) são mutações de natureza oncogênica porque tornam Ras independente da reação mediada pelas GAPs, resultando em uma forma permanentemente associada à GTP, que ativa as vias de proliferação e sobrevivência mesmo na ausência de estímulo mitogênico (Shields et al. 2000). A ativação de Ras independente da atividade de GAPs e GEFs ocorre através da s-nitrosilação do aminoácido Cisteína (Cys118) mediada por fontes endógenas e exógenas do radical livre óxido nítrico. (Lander et al. 1995).

Células de mamíferos expressam três isoformas da proteína Ras: K-RAS, H-RAS e N-RAS. K-RAS apresenta duas variantes de *splicing*, A e B, que diferem em suas sequências no domínio C-terminal. A função de Ras depende de sua associação física com a superfície interna da membrana plasmática e consequente transdução do sinal para vários efetores, entre eles a proteína serina/treonina quinase Raf-1. Ras-GTP promove o recrutamento de Raf-1 para a região da face interna da membrana plasmática e sua consequente ativação. Raf-1 por sua vez fosforila MEK1/2 uma proteína quinase de dupla especificidade que irá fosforilar as MAP kinases ERK1/2, que por sua vez irão fosforilar fatores de transcrição como Elk1 e AP-1 (Clarke 1992; Hancock 2003).

A proteína Ras é expressa em todas as células que apresentam altas taxas de proliferação celular e encontra-se mutada em 30% de todos os tipos de câncer (Bos 1989). Nestes tumores, a proteína Ras ativada contribui significativamente para o fenótipo de malignidade, como desregulação do crescimento da célula tumoral e inibição da morte celular programada, além da indução de capacidade de invasão e do estímulo da neo-angiogênese (Shields et al. 2000).

Apesar da baixa frequência das formas mutadas do oncogene *RAS* no câncer de mama (menor que 5%), há evidências que sugerem que a hiperatividade da proteína oncogênica Ras promove o crescimento e desenvolvimento desse tipo de câncer (Clark e Der 1995; Eckert et al. 2004). Koh e Moon (2011) demonstraram que as GTPases H-Ras e Rac1 foram ativadas em resposta ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e observou-se aumento significativo na invasão celular nas linhagens de câncer de mama Hs578T e MDA-MB-231.

A proteína Ras é uma importante mediadora de vias de sinalização anti-apoptóticas e pró-apoptóticas dependendo da natureza dos sinais iniciadores destas

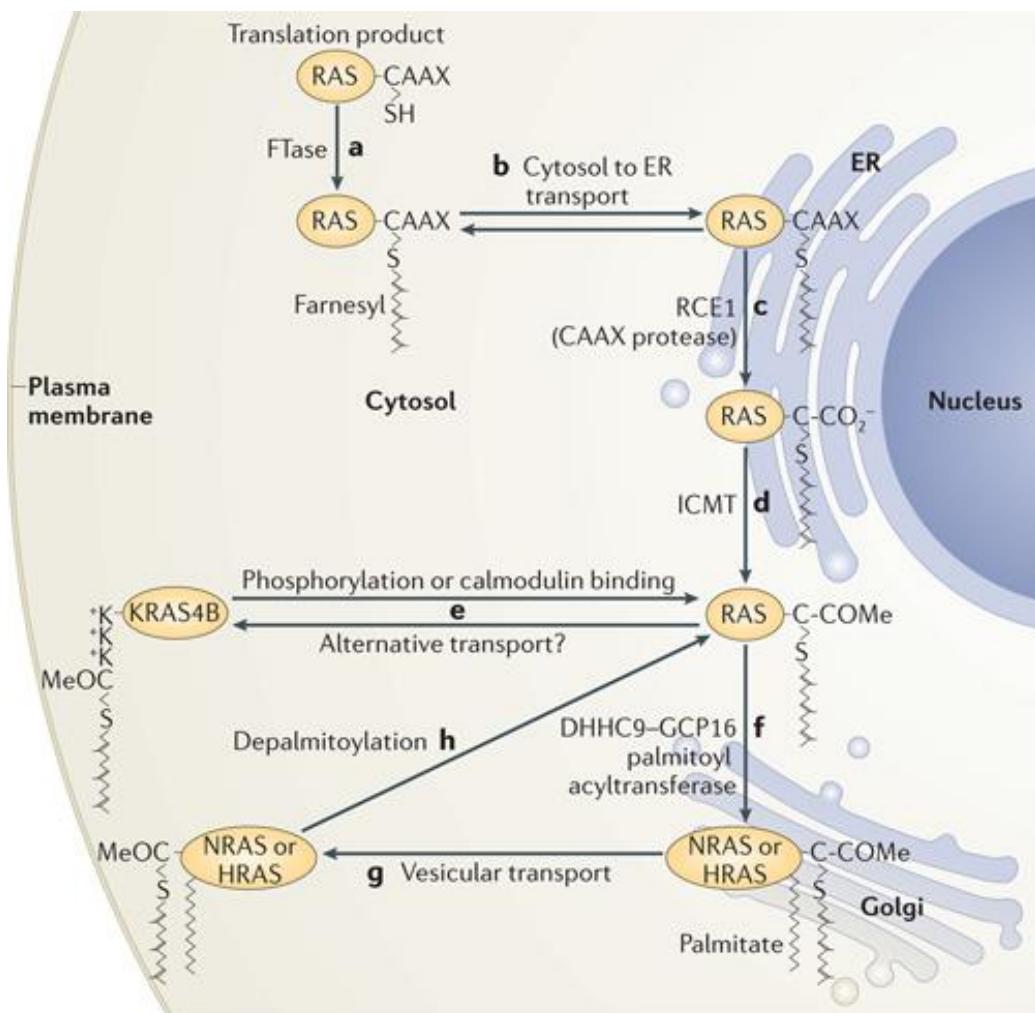
vias. Dessa forma, resultados combinados da sinalização de Ras podem determinar sobrevivência ou morte celular (Cox e Der 2003). Os mecanismos pelos quais a Ras promove desregulação da progressão através do ciclo celular e do controle da morte por apoptose, bem como proliferação celular não controlada, já são bem compreendidos e caracterizados (Shao et al. 2000; Shapiro 2001; Macaluso et al. 2002). Entretanto, as vias de sinalização que contam com a participação de Ras e podem promover a apoptose, ainda não foram completamente elucidadas (Vojtek e Der 1998; Feig e Buchsbaum 2002). O resultado da sinalização desencadeada por Ras depende principalmente do tipo celular e do contexto no qual a célula se encontra (Overmeyer e Maltese 2011; K. H. Lee, Koh, e Moon 2016).

1.3. Modificações pós-tradução em Ras

A proteína Ras tem sua associação às membranas celulares, mediada por uma série de modificações pós-tradução (PTMs), entre elas algumas são constitutivas e ocorrem imediatamente após a tradução e outras são condicionais. As PTMs constitutivas são classificadas da seguinte forma:

- Processamento de CAAX - Primeiramente, as sequências CAAX (AA representam aminoácidos alifáticos e X geralmente corresponde aos aminoácidos metionina e serina) presentes no domínio C-terminal de todas as proteínas Ras servem como substrato para a prenilação através das enzimas preniltransferases. O aminoácido na posição X for leucina, a geranil-geranil-transferase tipo I (GGTase I) adiciona um lipídeo poliisopreno de 20 carbonos à cisteína de CAAX. Se o aminoácido na posição X de CAAX não for leucina, característica de todas as proteínas Ras, ocorre o processo conhecido como farnesilação, o qual é catalizado pela enzima farnesiltransferase (FTase) que modifica a cisteína de CAAX. Em seguida, ocorre a clivagem proteolítica com a remoção do grupo AAX e por fim, o resíduo de cisteína sofre um processo de metil-esterificação. Essas três modificações promovem o remodelamento do domínio C-terminal das proteínas Ras que antes das modificações é um domínio com características hidrofílicas e após as modificações se torna um domínio com características hidrofóbicas. Estas alterações permitem às proteínas Ras se ancorarem na face interna das membranas celulares, contribuindo para que estas proteínas exerçam sua atividade biológica.

- Palmitoilação: o processamento de CAAX não é suficiente para a entrega das proteínas Ras e para sua associação estável à membrana celular. Elementos da região hipervariável C-terminal (HVC) que estão acima da seqüência CAAX são requeridos. Esses elementos são denominados segundos sinais. Um deles consiste em resíduos de Cisteína que servem como sítios aceptores para a palmitoilação. A palmitoilação é requerida para o tráfego de N-Ras e H-Ras da endomembrana para a membrana plasmática.
- Regiões polibásicas para KRAS4B – processo de segundo sinal para KRAS4B que não pode ser palmitoilada. Essas regiões formam interações eletrostáticas com a membrana plasmática que associadas com a inserção do grupo farnesil em Ras, produzem uma interação estável com a membrana (I. M. Ahearn et al. 2012; I. Ahearn, Zhou, e Philips 2018). Estas alterações estão esquematizadas na **Figura 1**.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figura 1. Descrição do tráfego de Ras e suas modificações pós-tradução nos diferentes compartimentos celulares. A Farnesilação de Ras é mediada pela enzima farnesiltransferase (FTase) (a). A Ras farnesilada no citosol é transportada para membranas do retículo endoplasmático (RE), onde a sequência CAAX é processada pela enzima 1 conversora de Ras (RCE1) (c) e pela isoprenilcisteína carboxilmetil-transferase (ICMT) (d). A isoforma de Ras KRAS4B desvia da via de palmitoilização das outras isoformas de Ras e prossegue diretamente para a membrana plasmática (MP), através de uma via pouco conhecida que envolve chaperonas (e). A NRAS e HRAS prosseguem para a face citosólica do Complexo de Golgi onde são palmitoiladas (f). Ambas isoformas trafegam por intermédio de vesículas para a MP (g). A fosforilação da Ser181 de KRAS4B promove sua dissociação da MP e retorno ao sistema de endomembranas (e). NRAS e HRAS se dissociam da MP por meio da depalmitoilização e retornam ao Golgi para um novo ciclo de palmitoilização (h) (Ahearn et al., 2012)

Dentre as PTMs condicionais destacamos a S-nitrosilação, uma modificação reversível derivada da reação do NO com o grupo tiol de cisteínas específicas (Evangelista, Kohr, e Murphy 2013). Heo e colaboradores (2005) sugeriram que a liberação de nucleotídeo GDP mediada pelo NO ocorre através de um mecanismo radicalar que conta com a participação de NO e do O₂, formando o radical dióxido de

nitrogênio que por sua vez reage com o resíduo Cys¹¹⁸ de Ras gerando Ras-S^{118·}. O radical formado promove alterações conformativas importantes que levam a liberação da molécula de GDP associada a Ras. Assim, Ras pode se associar a GTP e passar a sua forma ativa. A formação do radical Ras-S^{118·} facilita a ocorrência da S-nitrosilação do resíduo Cys¹¹⁸ de Ras. Ras S-nitrosilada e ativa, recruta a proteína quinase Raf que por sua vez desencadeia a sequência de reações de fosforilação que constitui a via Ras- ERK1/2 MAP quinases (Lander et al. 1997; J. Stamler, Lamas, e Fang 2001; Carlos J.R. Oliveira et al. 2003; K. S. Heo et al. 2004).

1.4. NO e Ras

Praticamente todos os tipos celulares são capazes de produzir NO· utilizando heme enzimas da família citocromo P450 redutases, conhecidas como NO· sintases (NOS) (Kleinert et al. 2004). Para sintetizar NO·, todas as isoformas necessitam de L-arginina como substrato. Em mamíferos, estas enzimas apresentam-se em três isoformas: nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (induzível) (Knowles e Salvador , 1994; Lechner, Lirk e Rieder, 2005). Apesar de apresentarem funções comuns, as NOS são codificadas por genes diferentes e possuem características distintas entre si (**Figura 2**).

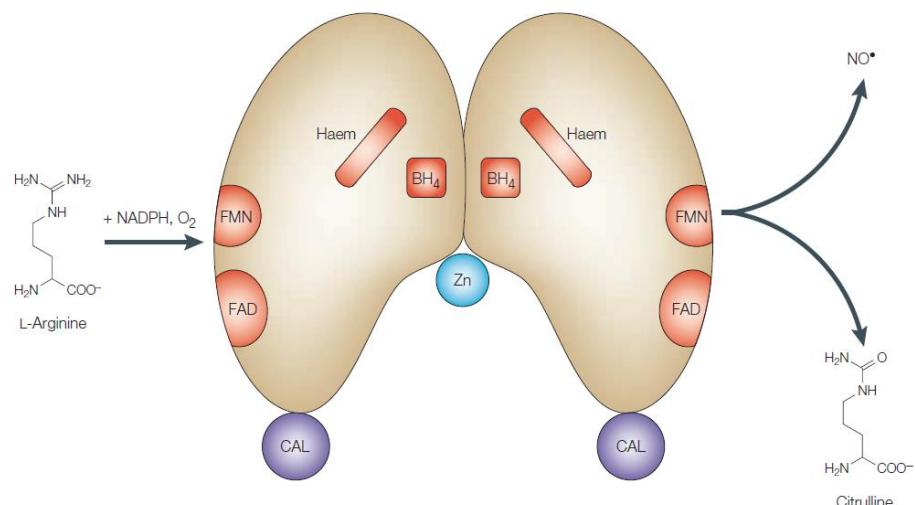


Figura 2. Esquema geral da síntese do óxido nítrico pelas NO sintases (NOS). Para que as NOS tenham sua atividade enzimática, estas necessitam dimerizar e se associarem aos cofatores tetraidrobiopterina (BH4), haem, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Após a ligação a calmodulina (CAL), a enzima ativa catalisa a oxidação da L-arginina em citrulina e óxido nítrico (NO) e requer oxigênio molecular e NADPH como cosubstratos. Cada dímero de NOS coordena um átomo de zinco (Zn) (Vallance e Leiper 2002)

Vários estudos têm demonstrado que tanto as isoformas constitutivas como a isoforma induzível estão expressas em tumores (Lala e Chakraborty, 2001; Fukumura, Kashiwagi e Jain, 2006; Oliveira *et al.*, 2012). Sendo um radical livre com propriedades sinalizadoras, o NO produzido endogenamente ou obtido a partir da metabolização de baixas concentrações de seus doadores, regula vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, tais como funções vasculares (angiogênese, permeabilização vascular) e funções neurológicas (neurotransmissão e desenvolvimento do sistema nervoso). Entretanto, em concentrações relativamente altas, apresenta caráter citotóxico, podendo induzir morte celular. Tem-se demonstrado que o NO pode tanto promover quanto inibir a progressão de vários tipos de tumores (Lala e Chakraborty 2001; Fukumura, Kashiwagi, e Jain 2006; Avtandilyan et al. 2019; Basudhar et al. 2017; Monteiro et al. 2015).

Em nosso laboratório foi demonstrado que NO e/ou cGMP ativa Ras e as ERK1/2 MAP quinases em células endoteliais da aorta de coelho (RAEC), levando a proliferação desta linhagem celular (Oliveira et al. 2003; Oliveira et al. 2008). NO pode mediar a angiogênese por mecanismos diretos e indiretos (Chiarugi, Magnelli, e Gallo 1998; Moraes et al. 2014), e efeitos anti-angiogênicos deste radical livre também já foram documentados (Cooke, 2003; Lau e Ma, 1996). Estes efeitos discrepantes poderiam ser explicados pelo tipo da célula, pelas diferenças na concentração e no tempo de exposição à fonte geradora de NO.

Baixas concentrações de NO estimulam a fosforilação da proteína quinase C e das MAP quinases ERK1/2 e JNK 1/2, enquanto que altas concentrações inibem os níveis de fosforilação destas proteínas, consequentemente não ativam os fatores de transcrição AP-1 e Elk1 que por sua vez são promotores da progressão através do ciclo celular (Deora, Hajjar, e Lander 2000; Jones et al. 2004; Ridnour et al. 2005; Oliveira et al. 2008).

1.5. iNOS e Ras

A iNOS é uma enzima expressa em níveis elevados na inflamação aguda e crônica. Em diversos tipos de tumores sólidos, incluindo o tumor de mama, foram observados níveis elevados de expressão de iNOS que, por sua vez, podem estar associados a uma elevação na produção endógena de NO (Wink et al. 1998; Glynn et al. 2010; Heinecke et al. 2014; Somasundaram et al. 2016; Basudhar et al. 2017; Keshet e Erez 2018).

O efeito do NO é dependente do microambiente, incluindo a tensão de O₂ tecidual e das concentrações locais do ânion radical O₂⁻. Consequentemente, os efeitos do NO nos tumores sólidos humanos são difíceis de prever e podem ser estimados a partir da análise de expressão das NOSs nesses tumores e sua associação com marcadores tumorais e sobrevida. Alguns estudos evidenciaram que a expressão de iNOS está correlacionada com o aumento da fosforilação de Akt em tumores de mama e que o NO induz a fosforilação de Akt e ativação da via oncogênica Akt em cultura de células de câncer de mama (Pervin et al. 2007; Prueitt et al. 2007; Glynn et al. 2010). Além disso, linhagens de tumor de mama MDA-MB-231 e MDA-MB-468 (representativas do tumor de mama triplo-negativo) incubadas com o doador de NO DETA/NO provocou um aumento da motilidade nas duas linhagens e estimulou a capacidade de invasão apenas na linhagem MDA-MB-231 (Glynn et al. 2010).

O tumor de mama triplo-negativo é caracterizado por níveis elevados de expressão de EGFR, o que contribui para sua agressividade (Guerrab et al. 2016). Foi relatado que o NO estimula uma rede de sinalização oncogênica em células da linhagem MDA-MB-231, entre as quais apresentam como eventos iniciais a ativação de EGFR e de Src quinase (mediante sua S-nitrosilação) (Switzer et al. 2012). Os níveis de NO requeridos para a ativação de EGFR (100 μM, 300 μM e 500 μM) e Src (300 μM e 500 μM) são os mesmos que poderiam estar associados aos fenótipos maligno e agressivo destes tumores. Estas observações sugerem que a sinalização iNOS/NO está envolvida no desenvolvimento do câncer de mama triplo-negativo e agressividade da doença (Switzer et al. 2012).

Lee e Choy (2013) avaliaram o envolvimento de EGFR e Src quinase na amplificação da expressão de iNOS mediada por NO. Ambas foram inibidas farmacologicamente e observou-se que a inibição de EGFR e Src quinase não causou

nenhum efeito sobre a expressão de iNOS, indicando que a amplificação dos níveis proteicos de iNOS induzidos por NO é independente dessas vias de sinalização. Por outro lado, a atividade de Ras é regulada pela S-nitrosilação e devido ao fato desta proteína potencialmente participar de diversas vias de sinalização implicadas na regulação da expressão de iNOS, os pesquisadores examinaram se a atividade de Ras era requerida para a amplificação da expressão de iNOS mediada por NO. A atividade de Ras foi inibida por um inibidor de farnesiltransferase e foi observada a redução da expressão de iNOS, que era estimulada por uma mistura de citocinas humanas recombinantes (IL-1 α , TNF α e IFN γ) (M. Lee e Choy 2013). Além disso, a ocorrência de S-nitrosilação de Ras foi demonstrada nas células estimuladas pelas citocinas. Com o objetivo de avaliar a função da S-nitrosilação de Ras na regulação da expressão de iNOS, células do carcinoma epitelial de pulmão A549 foram transfectadas com H-Ras selvagem ou H-Ras C^{118S} (Ras não-nitrosilável - cisteína 118 mutada por serina). A proteína Ras^{C118S} não pode ser ativada por NO, porém apresenta atividade GTPase comparável a Ras selvagem. Células A549 que super-expressam a forma não-nitrosilável de Ras (Ras^{C118S}) não apresentaram ativação da GTPase após indução de produção de NO endógeno. A transfecção das células com Ras selvagem não afetou a indução de iNOS pelas citocinas. Notadamente, a transfecção das células A549 com Ras^{C118S} reduziu os níveis de expressão da proteína iNOS, indicando que a S-nitrosilação de Ras participa na regulação por *feedback* positivo da expressão de iNOS. Apesar destes autores, terem demonstrado que a S-nitrosilação de Ras participava na regulação dos níveis de expressão de iNOS, não foram capazes de observar qualquer diferença na ativação da via Ras/ERK1/2 MAP quinases (M. Lee e Choy 2013).

1.6. Compartimentalização de Ras

A proteína Ras nascente está presente, transitoriamente, no retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Além disso, N-Ras e H-Ras são expressas permanentemente e abundantemente no complexo de Golgi (Choy et al. 1999; Apolloni et al. 2000). Chiu e colaboradores (2002) desenvolveram uma sonda fluorescente que reporta o local e o momento em que Ras está ativa nas células. Dessa forma, os pesquisadores determinaram que H-Ras e N-Ras associam-se a Raf-

1 no complexo de Golgi e que a Ras endógena e H-Ras não-palmitoilada são ativadas em resposta a mitógenos no complexo de Golgi e retículo endoplasmático, respectivamente. Além disso, demonstraram que a H-Ras restrita ao retículo endoplasmático pode ativar a via de sinalização das ERK1/2 MAP quinases, transformar fibroblastos e quando Ras estava localizada em compartimentos diferentes podia desencadear várias vias de sinalização.

Bivona e colaboradores (2003) mostraram que H-Ras poderia estar localizada em endomembranas como o complexo de Golgi e também proporcionaram evidências para o papel biológico que Ras ativada exerce nesta organela. Os autores relataram que a proteína ativada no Golgi induziu a diferenciação de células neuronais PC12, transformou fibroblastos em células malignas e mediou a resistência à radiação em células epiteliais de intestino de ratos. Além disso, sinalização através do receptor de抗ígenos de célula-T, proteína chave no sistema imunológico ativa Ras que esteja localizada somente no Golgi, embora a proteína também esteja presente na membrana plasmática. Quando receptores na superfície da célula são ativados, a proteína tirosina quinase Src é recrutada. Simultaneamente, outra enzima, fosfolipase C γ 1 (PLC- γ 1), é recrutada e fosforilada por Src. PLC- γ 1 metaboliza o fosfolipídeo de membrana fosfatidil-inositol-bis-fosfato promovendo a formação de diacilglicerol (DAG) e de inositol tri-fosfato. O inositol tri-fosfato por sua vez se liga a seus receptores específicos no retículo endoplasmático e promove liberação de íons Ca $^{+2}$ destes estoques. DAG e Ca $^{+2}$ promovem a translocação de uma proteína citoplasmática, RasGRP1 (membro da família das GEFs), para o complexo de Golgi, ativando Ras associada a esta organela. Esta via de sinalização coexiste com a via “clássica” de ativação de Ras na membrana plasmática que é independente de Ca $^{+2}$. Elevações nos níveis intracelulares de Ca $^{+2}$ também induzem a ativação de CAPRI (membro da família das GAPs), que possivelmente inibe a ativação de Ras presente na membrana plasmática da célula (**Figura 3**) (Bivona et al. 2003; Innocenti et al. 2002).

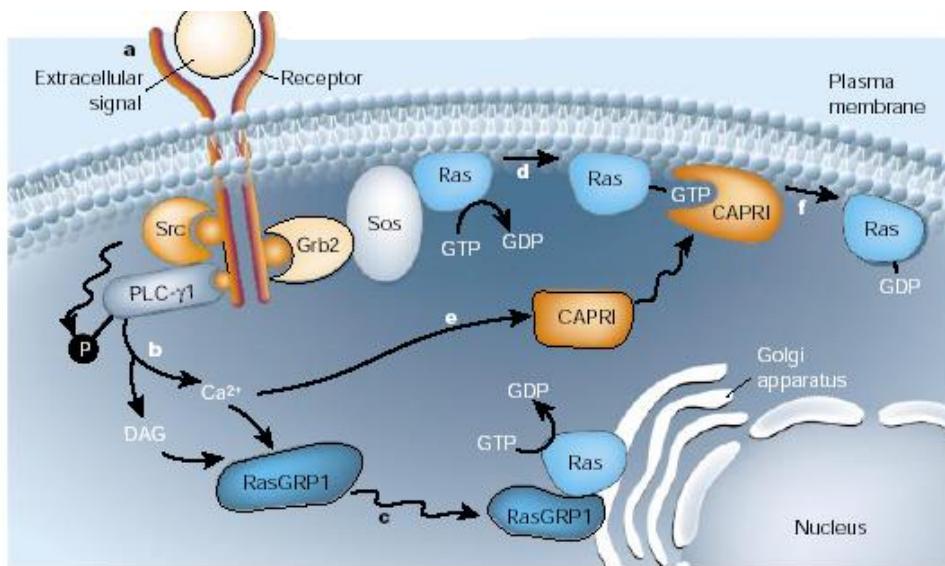


Figura 3. Apresentação esquemática que resume os eventos de sinalização celular mediados por Ras em dois compartimentos celulares, a membrana plasmática e o complexo de Golgi. Quando receptores extracelulares são ativados (a), a proteína Src é recrutada e fosforila PLC- γ 1, a qual promove a formação de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato. Este último promove a liberação de íons cálcio do retículo endoplasmático (b). DAG e cálcio induzem a translocação de RasGRP1 do citosol para o complexo de Golgi, ativando Ras associada a esta organela (c). A via “clássica” de ativação de Ras na membrana plasmática é mediada pela proteína Grb2 e Sos (d). A elevação dos níveis de cálcio induzem a ativação de CAPRI (e) que promove a desativação de Ras na membrana plasmática (f) como sugerido por Bivona e colaboradores (2003).

Cheng e colaboradores (2011) avaliaram que H-Ras presente em endomembranas (Complexo de Golgi, Retículo Endoplasmático) pode ativar Cdc42 de células NIH 3T3, atividade crítica para a transformação celular. Por outro lado, os autores observaram que H-Ras restrita a membrana plasmática não foi capaz de ativar Cdc42 eficientemente, contudo ativou Raf-1 e induziu a senescência em células humanas primárias. Estes autores especularam que enquanto a ativação de Ras na membrana plasmática dessas células promove transformação ineficiente, a mesma ativação de Ras em outros tipos celulares poderia ser suficiente para a tumorigênese.

Em estudo realizado por nosso grupo, demonstrou-se que o NO medeia a ativação de Ras em dois compartimentos celulares e consequentemente regula diferentes vias de sinalização *downstream* em relação a Ras. Neste trabalho foi demonstrado que baixas concentrações de NO promovem a proliferação de células HeLa. A proliferação não foi estimulada nas células HeLa Ras^{C118S}. Em células HeLa que super-expressam H-Ras^{WT} e transfetadas com uma sonda capaz de detectar a forma ativa de Ras (RBD-GFP - contém o domínio ligante de Ras de Raf-1) foi demonstrado que baixas concentrações do doador de NO, S-nitrosoglutationa (GSNO) estimularam de forma rápida e transitória a redistribuição das formas ativas

de Ras na membrana plasmática. Este processo foi seguido por um recrutamento tardio e sustentado de Ras no complexo de Golgi. Nenhuma ativação de H-Ras na membrana plasmática ocorreu em células que super-expressam H-Ras^{C118S}, contrastando com a ativação robusta e sustentada desta GTPase no complexo de Golgi. A ativação de H-Ras no Complexo de Golgi, por GSNO se mostrou dependente da s-nitrosilação e da fosforilação no aminoácido Tyr416 de Src quinase. A inibição de Src quinase impediu a proliferação das células e a ativação de H-Ras por GSNO no complexo de Golgi. Nesta condição a S-nitrosilação de H-Ras na Cys¹¹⁸ e a ativação de Src quinase são eventos espaço-temporalmente ligados à via de sinalização mediada por baixas concentrações de GSNO (Batista et al. 2013). Estes achados estão esquematizados na **Figura 4**:

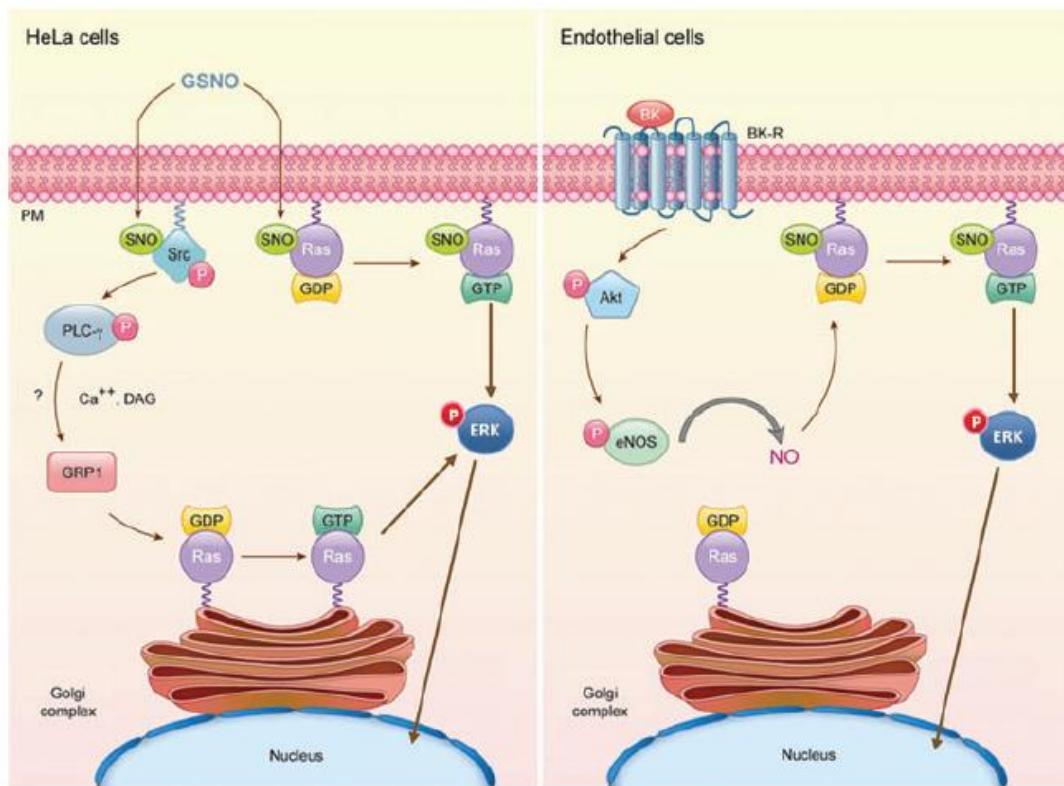


Figura 4. Apresentação esquemática que resume os eventos de sinalização celular mediados por Ras e estimulados por fontes exógenas (GSNO) e endógenas (estímulo por bradicinina) de NO em células HeLa e em células endoteliais humanas. O GSNO promoveu a S-nitrosilação tanto de Src quanto de Ras em células HeLa. A Ras ativada na membrana plasmática foi observada em tempos precoces por microscopia confocal. Por outro lado, a Src ativada recrutou PLC- γ , a qual promoveu a compartimentalização de Ras tardia no Golgi (esquema esquerdo). Em células endoteliais, a bradicinina promoveu a fosforilação de Akt e indução da produção endógena de NO, através da eNOS, que causou a S-nitrosilação de Ras e localização desta GTPase somente na membrana plasmática (esquema direito) (Batista et al., 2013)

1.7. Rac1

Rac é uma proteína da família Rho de GTPases e faz parte da superfamília de Ras. Assim como Ras, Rac possui atividade GTPásica, e suas funções são reguladas de acordo com a ciclagem entre sua forma inativa (RacGDP) e ativa (RacGTP). Apresenta funções diversas, podendo estar envolvidas na sobrevivência, proliferação e migração celular, além de se associar a outras proteínas na constituição das NADPH oxidases (NOX) (Pai, Kim, e Williams 2010).

Uma das condições para a Rac1 executar suas funções é a sua ancoragem na membrana plasmática, a fim de facilitar a ativação subsequente de seus efetores primários. A segunda condição é que Rac1 esteja na sua forma ativa (Rac1GTP). A translocação de Rac1 do citoplasma para a membrana plasmática envolve diversas reações que resumimos a seguir: (1a) ligação do grupo geranilgeranil ao resíduo de Cisteína terminal da Rac1 traduzida, modificação catalisada no citosol pela enzima geranilgeranil transferase tipo I (GGT1); (1b e 1c) na sequência, Rac1 desloca-se para o retículo endoplasmático, onde sofre processamento pela protease Rce1, metiltransferase Icmt, Rcc1 cliva a região C-terminal e Rae1 o tripeptídeo LLL; (2) após passar pelo retículo endoplasmático, a Rac1 se desloca novamente para o citosol onde permanece inativa até que um sinal extracelular promova a ativação da célula. Este “pool” de Rac1 é estabilizado pela formação de complexos estequiométricos com as RhoGDIs, que controlam a ativação e desativação de Rac1; (3a,3b e 4) Rac1 se desloca para a membrana, ou alternativamente para o núcleo mediante estimulação; (5, 6a e 6b) ao final da fase efetora, Rac1 se torna inativa com auxílio das proteínas GAPs, se associam às moléculas RhoGDI e retornam à reserva citosólica até que outro estímulo seja iniciado (**Figura 5**).

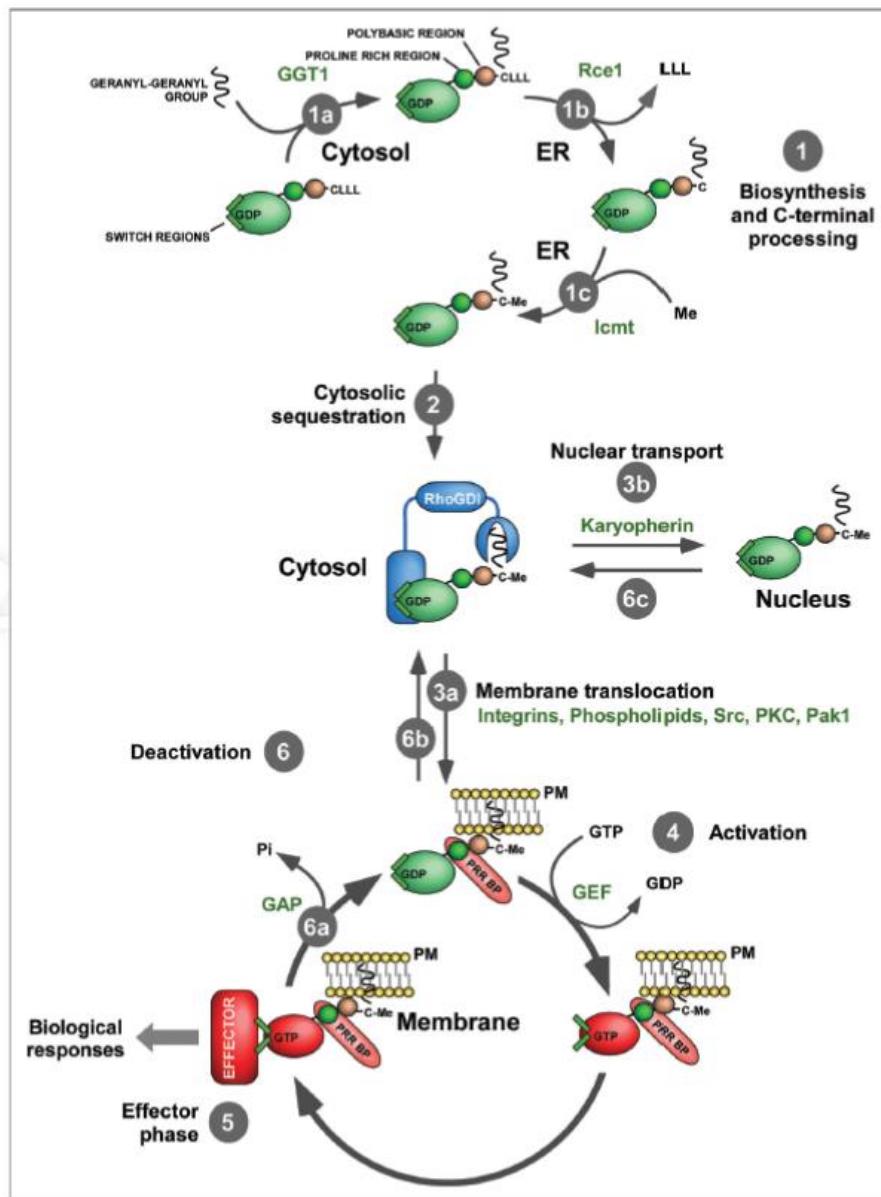


Figura 5. Resumo das principais fases do ciclo funcional de Rac1. Ligação do grupo geranilgeranyl ao resíduo de cisteína terminal (CLL) da Rac1 traduzida no citosol catalisada pela enzima geranilgeranyl transferase tipo I (GGT1) (1a). Na sequência, Rac1 desloca-se para o retículo endoplasmático (ER), onde é processada pela protease Rce1 e metiltransferase Icmt. A Rcc1 cliva a região C terminal e Rae1 o tripeptídeo LLL (1b). A Icmt incorpora um grupo metil no grupo carboxil α do resíduo de cisteína C terminal que se torna exposto para a finalização da reação catalisada por Rcc1 (1c). Posteriormente, a Rac1 retorna ao citosol e é estabilizada pela RhoGDI e permanece desativada até que a recepção de um sinal extracelular promova sua ativação (2). Com a ativação celular, Rac1 é rapidamente mobilizada para a membrana plasmática (PM) (3a) ou para o núcleo (3b) e é ativada (4). Ao final da fase efetora (5), Rac1 é desativada (6a) se reassocia a RhoGDI (6b) e permanece inativa no citosol até que uma nova ativação celular recomesse o ciclo (Bustelo et al. 2012).

Além desse modelo padrão de ativação de Rac1, alguns trabalhos mostraram que esta GTPase pode sofrer ciclos de ativação e desativação se deslocando entre a membrana plasmática e endomembranas (Bustelo et al. 2012; Palamidessi et al. 2008; Balasubramanian et al. 2007).

Anglesio e colaboradores (2004) reportaram que HACE1, uma ubiquitina ligase, regula a ubiquitinação de Rac1 e funciona como supressora tumoral no tumor de Wilm's. Outros estudos revelaram que a expressão de HACE1 é reduzida em diversos tipos de tumores (Zhang et al. 2007; Anglesio et al. 2004) e, como consequência, há aumento da atividade de Rac1 que induz a migração celular e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Castillo-Lluva et al. 2012; Torrino et al. 2011; Daugaard et al. 2013), efeitos que contribuem para a progressão tumoral (Goka e Lippman 2015; Olson 2018).

Chan e colaboradores (2005) usaram RNA de interferência (siRNA) para o silenciamento das proteínas Rac 1 e Rac 3 em células SNB19 de glioblastoma e BT549 de carcinoma mamário e observaram os efeitos sobre a invasão e proliferação celular. O silenciamento das duas isoformas de Rac inibiu significativamente a invasão tanto nas células SNN19 quanto nas células BT549. Porém, a proliferação dessas células não foi afetada significativamente. O ensaio de migração somente foi conduzido na linhagem SNB19 de glioblastoma e se observou que o silenciamento de Rac1 inibiu a formação de lamelipodia que levou, consequentemente, a diminuição da migração celular. Em publicações recentes, ficou evidenciada a participação de Rac1 na migração celular de células originárias de tumores de mama (Amin et al. 2018; Tian et al. 2018).

A Rac1 é alvo da sinalização mediada por Ras (Eller-Borges et al. 2015; Zohn et al. 2002; Van Aelst e D'Souza-Schorey 1997). Em estudo realizado por nosso grupo observou-se que o NO produzido mediante a estimulação da eNOS por bradicinina (Bk) foi capaz de S-nitrosilar Ras em células RAEC e ativou Rac1, que por sua vez induziu a migração dessas células com a participação da proteína quinase PI3K. A utilização de um biossensor constituído por um plasmídeo que expressa o domínio ativo de Rac1 associado à proteína fluorescente verde (GFP-PBD) permitiu a avaliação da Rac1 ativa por microscopia confocal, onde foi observado que Rac1 migra para a membrana plasmática após estímulo com Bk (Eller-Borges et al. 2015).

2. OBJETIVOS

Diante das informações descritas e fundamentadas na introdução desta tese, nossos objetivos principais foram os seguintes:

- a) Determinar se as fontes endógena e exógena de NO atuam sobre a compartmentalização das GTPases Ras e Rac1 na linhagem de tumor de mama humano MDA-MB-231;
- b) Avaliar os efeitos das fontes exógena e endógena de NO sobre a proliferação e migração desta linhagem tumoral e associar estes efeitos à compartmentalização de Ras e Rac1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo da linhagem MDA-MB-231

As células MDA-MB-231 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas em incubadora a 37°C em 5 % de CO₂.

3.2. Estimativa da concentração de óxido nítrico endógeno por DAF-2 DA mediante estímulo com LPS

O princípio deste método consiste na incorporação celular do fluoróforo 4,5-Diaminofluoresceína Diacetato (DAF-2 DA) (Millipore, Alemanha) por permeabilidade através da membrana. O composto é hidrolisado por esterases no citoplasma e o produto DAF-2, não é fluorescente em pH fisiológico. Na presença de O₂ e NO forma-se o DAF-2 triazol que é fluorescente.

A mensuração da concentração de NO endógeno usando DAF-2 DA foi realizada a partir da semeadura de 2×10^5 células/mL em placa de 12 poços. No dia seguinte, as células foram carenciadas em meio DMEM sem soro por 24 horas. Após o carecimento, as células foram estimuladas com 0,5, 1 ou 2 µg/ mL de LPS na presença de 0,1% de soro durante 16 horas. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS, o PBS foi removido e foram adicionados 10µM de DAF-2 em meio DMEM sem soro por poço de células cultivadas. As células com DAF-2 DA foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 30 minutos. Ao término da incubação o meio de cultura foi aspirado e os poços lavados com PBS, para posterior destacamento das células em tripsina e neutralização dessas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Recolhemos as células em suspensão em tubos de 1,5 mL para centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado com cuidado e então resuspendemos o *pellet* com 500 µL de PBS para uma nova centrifugação com os mesmos parâmetros. O sobrenadante foi removido novamente, e adicionamos 600 µL de PBS estéril, por amostra, dos quais foram utilizados 200 µL da diluição das células para cada poço da placa de 96 poços. As amostras armazenadas na placa foram lidas no citômetro Guava EasyCyte 8HT (Millipore, Alemanha) e os parâmetros

utilizados para aquisição SSC/FSC (side scater/forward scatter) foram de 10.000 eventos, utilizando o detector de fluorescência que captura a luz no comprimento de onda 530 nm, correspondente a luz verde.

3.3. Avaliação da viabilidade celular utilizando-se o reagente MTT

Para determinação da viabilidade, foram semeadas 1×10^4 células em placa de 96 poços, conforme descrito em **3.1**. A seguir as células foram carenciadas por 24 horas e neste período foram adicionados 25 μM do inibidor da enzima farnesil transferase, FTP II ou 10 mM do inibidor das NOS, N(G)-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). O inibidor da tirosina quinase Src, PP2 (2 μM) e o sequestrador de NO, carboxi-PTIO (30 μM) foram adicionados uma hora antes dos estímulos de LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ ou GSNO 100 μM . Foram realizados experimentos com concentrações crescentes feitas de LPS (0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$) e GSNO (10 μM , GSNO 50 μM , GSNO 100 μM e GSNO 250 μM). As células transfectadas com os siRNAs foram estimuladas com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ na presença ou ausência de L-NAME.

As placas preparadas foram avaliadas quanto ao crescimento celular na presença ou ausência de estímulo. Assim, 5 mg/mL de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio brometo) foi adicionado para o volume de meio de cultura referente ao número de poços com e sem estímulos. As células foram incubadas com MTT por 2 horas a 37°C e 5 % de CO₂ ao abrigo da luz e ao término, o sobrenadante foi removido e a cada poço foram adicionados 200 μL de DMSO (para solubilizar o precipitado formado com a reação de MTT) seguido de leitura a 570 nm em leitora de microplacas SpectraMax Plus (Molecular Devices, EUA).

3.4. Contagem das células com azul de Trypan

Neste ensaio foram semeadas 2×10^4 células em placa de 24 poços *overnight*. Utilizamos o protocolo de carenciamento, estímulos e inibidores descrito em **3.3**. e conduzimos a contagem das células no contador digital de células Countess™ (Invitrogen, EUA) conforme descrito a seguir. As células foram lavadas com PBS 1 x, destacadas dos poços com tripsina, neutralizadas com o meio de cultura DMEM com 10% de soro e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido

e o *pellet* de células foi resuspendido em 50 µL de DMEM. Aliquotamos 10 µL das células ressuspendidas, diluímos em 10 µL de uma solução 0,4 % de Trypan, aplicamos na câmara de contagem e ajustamos os parâmetros conforme as instruções do fabricante. O equipamento revela a quantidade de células contadas por mL de solução ressuspendida.

3.5. Ensaio de migração

Foram semeadas 1×10^5 células por poço em placas de 24 poços. Na manhã seguinte, quando foi atingida a confluência de aproximadamente 80%, afidicolina 5 µg/mL (Millipore, Alemanha), um antibiótico promotor de sincronização do ciclo celular que mantêm as células na fase S, o inibidor de Ras (FPT II) e inibidor das NOS (L-NAME) foram incubados no momento do carenciamento celular que se estendeu por 24 horas. Depois do carenciamento, foi feita a “ferida” (esta “ferida” pode ser descrita como uma descontinuidade introduzida por uma ponteira estéril na camada de células que recobre a superfície de uma placa de 24 poços tratada para manter a cultura de células de mamíferos que crescem aderidas) e nos pontos experimentais com o inibidor de Src PP2 (Curcio et al., 2010), inibidor de Fosfolipase C γ U73122, quelante de cálcio BAPTA-AM (Batista et al., 2013) e inibidor de Rac1 NSC23766 (Eller-Borges et al., 2015) foram incubados por uma hora a 37°C e 5% CO₂ com DMEM logo após a “ferida” ter sido feita. Depois desse período, foi adicionado meio DMEM com 0,1% de soro e os estímulos de produção endógena de NO (LPS a 1 µg/mL) ou exógena de NO (GSNO a 100 µM de acordo com Batista e colaboradores, 2013).

O protocolo deste ensaio para as células transfetadas com os siRNA sofreu algumas adaptações. A afidicolina não pode ser adicionada por se tratar de um antibiótico, e o fabricante não aconselha a utilização de nenhum antibiótico durante a incubação dos siRNAs devido a possibilidade de interferência deste na eficiência das transfeções. Além disso, os siRNA foram transfetados no momento do carenciamento (Dharmacon-GE, EUA).

Foram analisadas as seguintes condições experimentais: Controle, LPS 1 µg/mL, GSNO 100 µM, PP2 2 µM+LPS 1 µg/mL, PP2 2 µM+GSNO 100 µM, FPT II 25 µM, FPT II 25 µM +LPS 1 µg/mL, FPT II 25 µM+GSNO 100 µM, L-NAME 10 mM, L-NAME 10 mM+LPS 1 µg/mL, BAPTA-AM 10 µM, BAPTA-AM 10 µM+LPS 1 µg/mL,

U73122 10 μ M, U73122 10 μ M+ LPS 1 μ g/mL, NSC23766 100 μ M, NSC23766 100 μ M+ LPS 1 μ g/mL. Para este ensaio com os siRNAs, analisamos as seguintes condições experimentais: MOCK, MOCK+ LPS 1 μ g/mL, siRNA controle negativo 100 nM, siRNA controle negativo 100 nM+LPS 1 μ g/mL, siRNA RasGRP1 100 nM, siRNA RasGRP1 100 nM+LPS 1 μ g/mL, siRNA CAPRI 100 nM, siRNA CAPRI 100 nM+ LPS 1 μ g/mL.

As células estimuladas com “ferida” foram fotografadas com a câmera acoplada ao microscópio invertido Axio Observer Z1 Zeiss (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram obtidas nos tempos 0 e 16 horas após os estímulos e execução das “feridas” na monocamada de células. Foram medidas as distâncias entre as bordas das “feridas” nos tempos citados para cada ponto experimental e a diferença entre o tempo inicial e final comparada em μ m entre todos os grupos.

3.6. Preparação das bactérias competentes utilizando cloreto de cálcio

As bactérias BL21 ou DH5 α foram semeadas em meio LB sólido e incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas. Uma colônia foi isolada e inoculada em 3 mL de meio LB por aproximadamente 16 horas. Após esse período, transferiu-se 1 mL do meio rico em bactérias em 100 mL de meio LB. A cultura foi incubada por aproximadamente 3 horas a 37°C sob forte agitação (300 ciclos/minutos). O crescimento da cultura foi monitorado espectrofotometricamente.

O volume da cultura foi transferido para dois tubos de 50 mL, mantendo-os em gelo por 15 minutos. As células foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos contendo os *pellets* foram invertidos por aproximadamente 1 minuto. Os *pellets* foram ressuspendidos em 10 mL de solução gelada de CaCl₂ (0,1M) em banho de gelo. Centrifugou-se novamente as células a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e descartou-se o sobrenadante. Os *pellets* foram ressuspensos em 2 mL da solução de CaCl₂ (0,1M) + 15% de glicerol. As bactérias foram aliquotadas (200 μ L /tubo) e congeladas a -80°C.

3.7. Produção das beads de Glutationa-Sepharose-GST-RBD e Glutationa-Sepharose-GST-PBD

3.7.1. Transformação das bactérias BL21 com pGEX-RBD e pGEX-PBD para obtenção de plasmídeos

Adicionou-se 0,5 µL de solução da miniprep contendo o plasmídeo pGEX-RBD ou pGEX-PBD a 100 µL de solução de BL21. O choque térmico foi executado da seguinte forma: incubou-se a solução do plasmídeo com as bactérias a 4°C por 30 minutos, posteriormente a 42°C por 1 minuto e 30 segundos e por fim a 4°C por 2 minutos. Adicionou-se 400 µL de SOC e incubou-se durante 1 hora a 37°C sob agitação (shaker). Foram semeados 300 µL da suspensão em placa com meio LB contendo ampicilina (100 mg/mL).

3.7.2. Expressão de RBD e PBD

O plasmídeo pGEX-RBD (plasmídeo pGEX-2T, no qual está clonado o fragmento correspondente ao domínio RBD, denominado *Ras Binding Domain*, do gene c-raf, o qual detecta Ras-GTP) ou pGEX-PBD (semelhante ao pGEX-RBD, porém em substituição ao RBD foi clonado o fragmento PAK-1 PBD, *Pak Binding Domain*, referente ao domínio da proteína quinase PAK-1 responsável por sua interação com Rac1-GTP) foi introduzido em bactérias E.coli BL21 conforme descrito no item 3.7.1. e algumas colônias foram induzidas para a verificação da presença da proteína recombinante. Uma colônia da placa de “transformação” foi pega com ponteira p100, adicionada em falcon de 15 mL com 3 mL de meio LB (com concentração 100 µg/mL) e incubada no shaker a 37°C por 16 horas. No dia seguinte, foram transferidos 300 µL do pré-inóculo do dia anterior para 30 mL de LB com ampicilina a 100 µg/mL. Depois, incubou-se por 1 hora e verificou-se a OD a 600 nm (deve estar entre 0,6 e 0,8). Após verificar que a OD foi atingida, acrescentou-se o IPTG (concentração 1 mM) e coletou-se 1 mL em tubo Eppendorf nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após a indução. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* resuspendedido com tampão de amostra. Posteriormente, as amostras dos tempos de indução foram

submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Após correr o gel, incubou-se este por 5 minutos com Comassie blue G-250 com agitação e, depois, adicionou-se o descorante forte para remover o comassie, também com agitação. As amostras dos tempos de indução de RBD ou PBD com IPTG apresentam uma banda de aproximadamente 42 e 35 kDa, respectivamente.

O próximo passo foi lisar o *pellet* do produto de indução. O *pellet* foi lisado com o seguinte tampão de lise: 50 mM Tris (pH 7,5), 1% de Triton X-100, 150 mM de MgCl₂, 1 mM DTT e inibidores (1 mM PMSF, 10 µM de aprotinina e 10 µM de leupeptina para 10 mL de tampão por amostra). Após colocar o tampão foi feita a sonicação com amplitude de 40, pulso 2 por 10 minutos. Depois, centrifugou-se a 14.000 rpm, 4°C por 10 minutos, separou-se o sobrenadante do lisado bacteriano que teve sua concentração determinada pelo método do BCA.

3.7.3. Etapa de ligação da glutationa-sepharose (beads de GSH-Sephrose) com RBD ou PBD

O sobrenadante do lisado bacteriano foi descongelado. As beads de GSH-Sephrose foram lavadas 4 vezes com PBS 1X com inibidores (os mesmos indicados no tampão de lise do item **3.7.2.**). Sempre centrifugando a 2100 rpm a 4°C durante 5 minutos a cada lavagem. A reação foi feita com aproximadamente 2 mL do lisado (este volume é referente a aproximadamente 1500 µg de proteína) para 500 µL GSH-Sephrose e 4,5 mL de PBS 1X com os inibidores . A solução foi incubada em tubos cônicos de 15 mL sob agitação a 4°C *overnight*. No dia seguinte, centrifugou-se o produto de ligação de GSH-Sephrose-GST-RBD ou GSH-Sephrose-GST-PBD a 2100 rpm durante 5 minutos e 4°C. O pellet foi lavado 6 vezes com uma solução de PBS 1X com inibidores. O sobrenadante foi descartado a cada lavagem, e as beads foram resuspensas em 900 µL de PBS 1X com inibidores e 100 µL de glicerol (glicerol 10%) e foram armazenadas a - 80°C. Uma alíquota das beads foi separada e ressuspensas em tampão de amostra, a fim de confirmar a ligação de GSH-Sephrose-GST-RBD ou GSH-Sephrose-GST-PBD em gel de poliacrilamida 12%. Assim, a conjugação foi confirmada com a obtenção da banda de, aproximadamente, 35 kDa referente à GSH-Sephrose-GST-RBD e GSH-Sephrose-GST-PBD.

3.8. Ensaio das atividades de Ras e Rac1

Foram semeadas 1×10^6 células por placa p100 com meio DMEM *overnight*, quando foi atingida a confluência de aproximadamente 80 %. Posteriormente, as células foram carenciadas por 24 horas e foram dados os estímulos com GSNO 100 μM ou LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ durante 0, 2, 5, 15, 30, 60 e 120 minutos (este último tempo de incubação somente para Rac1). Após os tempos estipulados, as células estimuladas foram lavadas uma vez com PBS 1X e lisadas com tampão contendo 20 mM Tris base, 137 mM NaCl, 1% NP40, 10% glicerol, 1% SDS e inibidores (1 mM PMSF, 10 μM de aprotinina e 10 μM de leupeptina) para a obtenção de Ras e tampão contendo 50mM Tris Base (pH 7.5), 1% NP-40, 200mM NaCl, 10% glicerol e inibidores (1 $\mu\text{g/mL}$ aprotinina, 1 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina e 1mM PMSF) para obtenção de Rac. Os lisados protéicos foram centrifugados a 12.000 rpm, por 15 minutos e 4 °C, os sobrenadantes aliquotados e suas concentrações de proteína determinadas pelo método de BCA. O sobrenadante do lisado bacteriano contendo o produto de expressão do plasmídeo pGEX-RBD, foi utilizado para os ensaios de atividade de p21ras ou pGEX-PBD para os ensaios de atividade de Rac1 (produzidos conforme descrito no item 3.7.2.). O volume correspondente a 100 μL do complexo GSH-Sepharose-GST-RBD ou GSH-Sepharose-GST-PBD (preparado conforme descrito no item 3.7.3.) foi incubado com 1000 μg de lisado protéico obtido das células MDA-MB-231 descrito acima por 1 hora a 4°C. Após incubação, as amostras foram lavadas em PBS 1X com inibidores e centrifugadas a 3.000 rpm durante 3 minutos por 3 vezes. Após as lavagens, as amostras foram ressuspendidas em tampão de amostra, aquecidas a 100° C por 5 minutos e submetidas a análise por Western blot em gel de poliacrilamida contendo SDS (Laemmli, 1970). Após a eletroforese, foi feita a transferência das proteínas em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 20% de metanol, pH 8,3), por 1:30 horas em membrana de PVDF. A eficácia da transferência foi verificada pela coloração reversível com Ponceau S (0,5%, p/v, em ácido acético 5%, v/v) para visualização das bandas. As membranas foram lavadas em TBS-0,1% Tween 20 e incubadas em tampão de bloqueio (TBS-Tween 20 0,1% com 5% de BSA para Ras e TBS-Tween 20 0,1% com 5% de leite para Rac1) por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação constante. Em seguida as membranas foram incubadas com o anticorpo

primário anti-Pan-Ras com diluição 1:1000 (Millipore, Alemanha) em TBS-Tween 20 0,1 % com 5% de BSA ou anti-Rac1 com diluição 1:1000 (BD, EUA) em TBS-Tween 20 0,1 % com 3% de BSA durante toda a noite, sob agitação. Após 3 lavagens de 15 min com TBS-Tween 20 0,1%, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase), durante 1 h, sob agitação. A revelação foi realizada pela metodologia de quimioluminescência, utilizando-se o luminol como substrato (Super Signal, ThermoFisher-EUA) no foto-video-documentador LAS-4000 (Fujifilm, Japão). As densitometrias das imagens obtidas foram analisadas no programa Image J (Research Services Branch – National Institute of Mental Health, EUA).

3.9. Produção dos plasmídeos pcDNA3-H-Ras^{WT}, pEYFP-RBD e pEGFP-PBD

O vetor de expressão pEYFP-RBD (sonda de Ras ativada) foi gentilmente cedido pelo Dr. Mark R Philips, New York University School of Medicine, EUA. O vetor de expressão de Ras^{WT} (pcDNA3-H-RAS^{WT}) foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Harry M. Lander da University of Cornell, EUA.

O vetor de expressão GST-PAK (pGEX-PBD/PAK1) foi gentilmente cedido pelo Dr. G.M. Bokoch (The Scripps Research Institute, La Jolla, EUA). O gene codificador de PAK-1 PBD foi fusionado ao gene codificador de GFP, resultando no plasmídeo pEGFP-PBD (Eller-Borges et al., 2015).

3.9.1. Transformação bacteriana

Foram adicionados 0,5 µL da solução da miniprep (referente a cada plasmídeo separadamente) em 100 µL de solução contendo a bactéria DH5 α . O choque térmico e a semeadura foram conduzidos conforme descrito no item 3.7.1.

3.9.2. Mini-preparação plasmidial

Coletamos uma colônia obtida de cada placa semeada (descrita no item 2.7.1.) e cultivamos em 5 mL de meio LB ,com canamicina para os plasmídeos pEYFP-RBD e pEGFP-PBD (100 µg/mL) ou ampicilina (100 µg/mL) para o plasmídeo pcDNA3-H-RAS^{WT}, em falcon de 15 mL a 37° C em *shaker* a 170 rpm *overnight*. No próximo dia, aliquotamos o volume de cada falcon de 15 mL em eppendorfs de 1,5 mL, centrifugamos por 2 minutos a 12.000 rpm e descartamos o sobrenadante. Adicionamos ao *pellet* 200 µL da solução de 50 mM de glicose, 25 mM Tris-HCl pH = 8 e 10 mM EDTA pH=8 em cada tubo e vortexamos. Adicionamos 400 µL da solução 0,2 M NaOH com 1% SDS e homogeneizamos até que o aspecto da solução se tornasse translúcido. Adicionamos 300 µL da solução 3 M de acetato de potássio e 5 M de ácido acético glacial e homogeneizamos e centrifugamos por 5 minutos a 12.000 rpm. Transferimos o sobrenadante para tubos de 1,5 mL limpos e descartamos o *pellet*. Adicionamos isopropanol até completar o volume do tubo, homogeneizamos e incubamos por 20 minutos a -20° C. Centrifugamos por 15 minutos a 12.000 rpm e 4° C e descartamos o sobrenadante. Secamos as amostras a temperatura ambiente até que o *pellet* ficasse transparente. Posteriormente, adicionamos 30 µL de RNase 100 µg/mL, homogeneizamos e incubamos por 5 minutos a 37° C. Após esse período, soltamos o *pellet* do tubo e dissolvemos na solução, incubamos por mais 15 minutos a 37° C. Ao final da incubação, centrifugamos brevemente os tubos, retiramos o sobrenadante, transferimos para tubos de 1,5 mL e armazenamos a -20°C.

3.10. Cotransfecção dos plasmídeos pcDNA3-H-RAS^{WT} e pEYFP-RBD nas células MDA-MB-231 ou HeLa para análise da H-Ras ativa em microscopia confocal

Foram semeadas 2×10^5 células sobre lamínulas de vidro de 20 mm acondicionadas em placa de 6 poços. No dia seguinte, preparou-se uma solução contendo 6 μL de Gene Juice em 200 μL de OPTI-MEM e os dois reagentes foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 2,5 μg da diluição 2:1 dos plasmídeos pcDNA3-HRas^{WT} e pEYFP-RBD, respectivamente, ao tubo contendo a solução do agente de transfecção e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente. O complexo de plasmídeos e reagente de transfecção foi adicionado às células e completou-se o volume do poço para um total de 3 mL com meio de cultura sem soro onde foram incubados por 24 horas. No dia seguinte, trocou-se o meio de cultura por DMEM com 0,1% de SFB e incubou-se *overnight* a 37°C em 5 % de CO₂. Cada lamínula foi retirada do poço, acondicionada no microscópio confocal LSM 780 (Zeiss, Alemanha), as células foram estimuladas com GSNO, LPS, EGF ou soro, fotografadas antes e após os estímulos. As imagens obtidas (cortes z em μm) foram analisadas e editadas com o software Zen 2.3 (Zeiss, Alemanha).

3.11. Transfecção do plasmídeo pEGFP-PBD nas células MDA-MB-231 e estimulação com EGF 10 ng/mL ou LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para análise em microscopia confocal

Foram semeadas 2×10^5 células sobre lamínulas de vidro de 20 mm acondicionadas em placa de 6 poços. No dia seguinte, preparou-se uma solução contendo 6 μL de Gene Juice em 200 μL de OPTI-MEM e os dois reagentes foram incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 2 μg do plasmídeo foi adicionado ao tubo contendo a solução do agente de transfecção e incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente. O complexo de plasmídeos e reagente de transfecção foi adicionado às células e completou-se o volume do poço para um total de 3 mL com meio de cultura. Após 24 horas de transfecção, o meio foi removido e as células foram estimuladas com EGF por 10 minutos ou LPS por 2 horas e incubou-se

a 37°C em 5 % de CO₂. Cada lamínula foi lavada duas vezes com PBS 1x, fixada em solução de paraformaldeído 4% por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS 1x e permeabilizadas com Triton-X 0,25% por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS 1x antes da incubação com o anticorpo primário anti-GFP (Invitrogen, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, foram feitas três lavagens com PBS 1x e, posteriormente, incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Fluoresceína (KPL, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente e sob o abrigo da luz. Por fim, cada lamínula foi lavada três vezes com PBS 1x e acondicionadas em lâminas de vidro com Fluormount (ThermoFisher, EUA), a fim de conservar a fluorescência até a avaliação das lamínulas no microscópio confocal Leica DMi8 (Leica Microsystems, Alemanha). As imagens obtidas (cortes z em μm) foram analisadas no software LAS X (Leica Microsystems, Alemanha).

3.12. Perfil de expressão gênica da RasGRP1 ou CAPRI na ausência e/ou presença de siRNA

3.12.1. Transfecção de siRNA RasGRP1 ou siRNA CAPRI

As células MDA-MB-231 foram transfectadas com 100 nM de cada siRNA utilizando-se Dharmafect 4 como reagente de transfecção. Resumidamente, foram plaqueadas 1x10⁵ células com DMEM suplementado com 10% SFB contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 μg/mL) e mantidas em incubadora a 37°C em 5 % de CO₂ *overnight*. No dia seguinte, cada siRNA e Dharmafect 4 foram diluídos em 200 μL de meio OPTI-MEM em tubos distintos e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, as duas soluções foram homogeneizadas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente. Após lavar as células semeadas com meio sem soro, o complexo obtido entre o siRNA e Dharmafect 4 foi adicionado ao poço, completou-se o volume deste para 2 mL de volume final e incubou-se a 37°C em 5 % de CO₂ por 24 horas.

3.12.2. Extração de RNA da linhagem MDA-MB-231 com Trizol

Para a extração de RNA total da MDA-MB-231 não transfectada e/ou transfectada com os siRNA controle negativo, siRNA RasGRP1 ou siRNA CAPRI foi utilizado o reagente *Trizol* (Invitrogen, EUA). Após 24 horas de incubação das células com os siRNA, estas foram lavadas duas vezes com PBS 1x para a retirada de qualquer resíduo de meio de cultura. Então, foi acrescentado 500 µL de *Trizol* em cada poço, e as células foram lisadas mecanicamente com o auxílio de uma micropipeta. Todo o lisado de células foi transferido para microtubos de 1,5mL, e estes foram mantidos a -80°C por pelo menos 24 horas. Para prosseguir com a extração, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. Então, foram adicionados 200µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada microtubo, sendo, em seguida, realizada uma agitação vigorosa por 15 segundos, uma incubação por 2 minutos em temperatura ambiente e uma centrifugação a 12000g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada microtubo (fase transparente) foi transferido para outro microtubo de 1,5mL, onde foram adicionados 500µL de isopropanol (Merck, Alemanha). Após homogeneizar, as amostras foram mantidas a -20°C durante 1 hora para a precipitação do RNA. Os microtubos foram novamente centrifugados a 12000g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 1 mL de etanol 75% (Merck, diluído em água Mili-Q) e, após agitação manual, os microtubos foram centrifugados a 7500g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi desidratado por evaporação em temperatura ambiente. Após a secagem parcial do precipitado, este foi diluído em 20µL de água livre de DNase e RNase. Após a extração, o RNA foi estocado a -80°C até o uso.

3.12.3. Determinação das concentrações do RNA total

Para a obtenção da quantificação do RNA total, foi aplicado no spectrofotômetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific. EUA) 1 µL de cada amostra, primeiramente adicionando o branco (no caso, água livre de RNase e DNase). Este equipamento emite um comprimento de onda de 260 nm, onde ocorre a absorbância de RNA e o resultado é convertido em ng de RNA por µL da amostra (ng/µL). O Nanodrop® 2000

também emite comprimentos de onda de 230 nm e 280 nm que indicam a presença de impurezas nas amostras de RNA quantificadas. O equipamento emite as relações de absorbância da amostra entre 260 nm e 280 nm (260/280) e 260 nm e 230 nm (260/230). A relação 260/280 permite detectar a pureza do RNA. A obtenção da relação igual ou próxima a 2,0 indica que o RNA está puro. A relação 260/230 também detecta a pureza do RNA e, normalmente atingem a taxa de 1,8 a 2,2. Valores abaixo dessa faixa podem indicar a presença de contaminantes (Nanodrop Technologies, Inc., 2007).

3.12.4. Tratamento do RNA com DNase

A DNase é uma enzima que cliva DNA que possa ser co-extraído com o RNA. O tratamento do RNA com DNase (Promega, EUA) foi utilizado a fim de eliminar uma possível contaminação com DNA durante o processo de extração.

O protocolo consiste em adicionar 1 μ L de DNase a cada 1 μ g de RNA a ser tratado, 1 μ L de tampão RQ1 10x e completar o volume com água livre de RNase para um volume final de 10 μ L. Essa solução foi incubada a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, adicionou-se 1 μ L de RQ1 DNase Stop Solution a 65°C por 10 minutos para parar a reação. Após, o tratamento com DNase, o RNA foi submetido à transcrição reversa.

3.12.5. Transcrição reversa (RT) a partir de RNA extraído da linhagem MDA-MB-231

Para verificar a expressão dos genes da RasGRP1 e CAPRI entre culturas de MDA-MB-231 transfetadas ou não com seus respectivos siRNA RasGRP1 ou siRNA CAPRI, foi realizada a RT, para a produção do DNA complementar (cDNA), utilizando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as especificações do fabricante.

O RNA retrotranscrito em cDNA foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR). Este processo que está descrito detalhadamente no item **3.12.6.**

3.12.6. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) para RasGRP1 e CAPRI

Para a obtenção da expressão dos mRNA referentes às proteínas RasGRP1, CAPRI e RPL13A foi utilizada a sonda Sybr Green contida no *Power Sybr Green PCR Master mix* (Applied Biosystems, EUA). Resumidamente, foram preparados mix para cada par de primers contendo 12,5 µL de *Power Sybr Master Mix* (2 x), 50 nM dos *primers forward* e *reverse* (IDT, EUA), 200 ng de cDNA e o volume da reação completado com água MilliQ.

A termociclagem empregada foi de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos seguidos de 60°C por 1 minuto. Ao final da reação, foi obtida a curva de dissociação do *Sybr*, a fim de identificar se houve ou não a amplificação de produtos secundários a partir do cDNA utilizado como *template*.

O mesmo protocolo foi utilizado para o controle endógeno RPL13A, porém utilizando seus *primers* (IDT, EUA) desenhados especificamente para sua detecção.

As sequências dos primers de CAPRI e RASGRP1 foram obtidas através do Primer Bank website de Harvard (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) (Wang et al. 2012)

As sequências de primers utilizada da qRT-PCR foram as seguintes:

CAPRI

Forward Primer 5'-CAGCCGGGACGACGTTATC-3'

Reverse Primer 5'-CCACCCGCTGAAACCCTTAG-3'

RASGRP1

Forward Primer 5'-ACATCACCCAGTTCCGAATGA-3'

Reverse Primer 5'-GCTGTCAATGAGATCGTCCAG-3'

RPL13A

Forward Primer 5'- CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3'

Reverse Primer:5'- TTGAGGACCTCTGTGTATTGTCAA-3'

O método para quantificação relativa da expressão gênica permitiu quantificar diferenças no nível de expressão do alvo específico (mRNA) a partir do cDNA proveniente das células MDA-MB-231 silenciadas os não com os siRNA. A produção dos dados é expressa como uma alteração ou uma diferença no número de vezes nos níveis de expressão. O método C_T comparativo utiliza a expressão matemática $2^{-\Delta\Delta C_T}$. O resultado da quantificação relativa pode ser representado como “uma amostra x é 10 vezes mais expressa que uma amostra y”, por exemplo. Onde o y refere-se aos valores obtidos com o calibrador da reação (Page e Stromberg, 2011; Litvak e Schmittgen, 2001).

3.13. Síntese de S-Nitrosoglutationa (GSNO)

O GSNO foi sintetizado a partir de uma solução de nitrito de sódio (1M) em água deionizada e solução de L-Glutationa reduzida (GSH) 1 M em HCl 1 M. A reação entre estes componentes tem como produtos o GSNO (com coloração vermelha) e o O_2 e foi realizada ao abrigo da luz. Para determinarmos a concentração da solução de GSNO, diluímos a solução 1000 vezes e determinamos sua absorbância a 335 nm em cubeta de quartzo no espectrofotômetro. O coeficiente de extinção molar (ϵ) do GSNO em 335 nm é $586 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e a concentração molar foi obtida através da equação $A = \epsilon \times l \times c$, onde “A” representa a absorbância de 335 nm, “ ϵ ” o coeficiente de extinção

molar descrito acima, “l” é o volume da cubeta em cm³ e “c” a concentração molar que se deseja obter (Sahoo et al. 2006).

3.14. Ensaio de biotina para detecção de Src nitrosilada

O ensaio de biotina foi conduzido de acordo com o protocolo estabelecido por Forrester e colaboradores (2009). Foram semeadas 1x10⁶ células em placa p100 *overnight*, e no dia seguinte carenciadas. Durante o careciamento as células foram mantidas na presença de L-NAME por 24 horas. Após o careciamento as células foram estimuladas com LPS 1 µg/mL por 2 horas. Na sequência, as células foram lisadas com tampão de lise contendo HEPES 25 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, NP-40 1%, PMSF 0,5 Mm, Aprotinina 1 µg/mL e Leupeptina 1 µg/mL (pH 7,4). Os lisados proteicos foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes coletados para novos tubos de 1,5 mL para dosagem com o kit QPRO BCA de acordo com o protocolo do fabricante (Cyanagen, Itália). Utilizamos no ensaio 500 µg de proteínas para cada ponto experimental e estas amostras foram diluídas para 1,8 mL de tampão HEN (HEPES 100 mM, EDTA 1 mM e neocuproína 0,1 mM – pH 8,0). Em seguida, as amostras foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL onde foram adicionados 200 µL de SDS 25% e 20 µL de MMTS 10% (metil-metanotiosulfonato) e incubadas a 50°C por 20 minutos, agitando-se os tubos a cada 2 minutos e ao abrigo da luz. Na etapa de precipitação, 3 volumes de acetona 100% (6 mL) foram adicionados a cada amostra e incubadas por 20 minutos a -20°C, centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* de proteínas lavados com 5 mL de acetona por duas vezes. A marcação com biotina foi realizada através da resuspensão dos *pellets* em 240 µL de tampão HENS (HEPES 100 mM, EDTA 1 mM, neocuproína 0,1 mM e SDS 1% – pH 8,0), transferência do material para novos tubos de 1,5 mL contendo 30 µL de biotina-HPDP (2,5 mg/mL). A reação de marcação se inicia com a adição de 30 µL de ascorbato de sódio 200 mM e as amostras foram incubadas por 1 hora em agitador orbital ao abrigo da luz. Para a próxima precipitação, 3 volumes de acetona refrigerada (900 µL) foram adicionados a cada amostra, incubamos por 20 minutos a -20°C, centrifugamos a 5.000 g por 5 minutos, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* lavados duas vezes com 1 mL de acetona. Posteriormente, os *pellets* foram ressuspendidos em

tampão HENS/10 (HEPES 100 mM, EDTA 1 mM e neocuproína 0,1 mM , diluído 10 vezes e adição de SDS 1% – pH 8,0) e adicionamos 750 µL de tampão de neutralização. O material foi transferido para novos tubos de 1,5 mL contendo 30 µL das *beads* de afinidade por avidina pré-lavadas e incubados em agitador orbital *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as *beads* de avidina foram centrifugadas a 200 g por 10 segundos e lavadas com 1 mL de tampão de lavagem por 4 vezes. As *beads* foram eluídas com 40 µL de tampão HENS/10 e tampão de amostra livre de β-mercaptoetanol e aquecidas a 95°C por 5 minutos. Por fim, conduzimos a eletroforese e transferência da membrana de PVDF conforme descrito no item x. Para a análise da Src nitrosilada, bloqueamos a membrana em solução de TBS Tween 20 0,1% com 5% de leite por 2 horas a temperatura ambiente. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS Tween 20 0,1% por 10 minutos, incubamos com anticorpo anti-Src a diluição 1:1000 (Merck-Millipore, Alemanha) *overnight* e, no dia seguinte, incubamos a membrana com o anticorpo secundário correspondente para a revelação da membrana.

4. RESULTADOS

4.1. Ativação de Ras por GSNO

Baseados em publicação anterior do nosso grupo de pesquisa onde demonstramos que células HeLa expostas a concentrações crescentes de GSNO proliferavam nas concentrações de 50 e 100 μM e que nestas concentrações Ras era ativada e se distribuía em dois compartimentos celulares, a membrana plasmática e o Complexo de Golgi (Batista et al., 2013), passamos então a investigar os efeitos de concentrações crescentes de GSNO na atividade Ras de células MDA-MB-231. Na concentração de 100 μM , GSNO induziu a atividade de Ras após 2 minutos de estímulo, com subsequente queda entre 5 e 15 minutos e incremento da atividade de Ras entre 30 e 60 minutos após o estímulo. Este resultado indica uma ativação bifásica de Ras em momento precoce (2 minutos) que se repete em um momento considerado tardio (entre 30 e 60 minutos), como podemos observar na **Figura 6**.

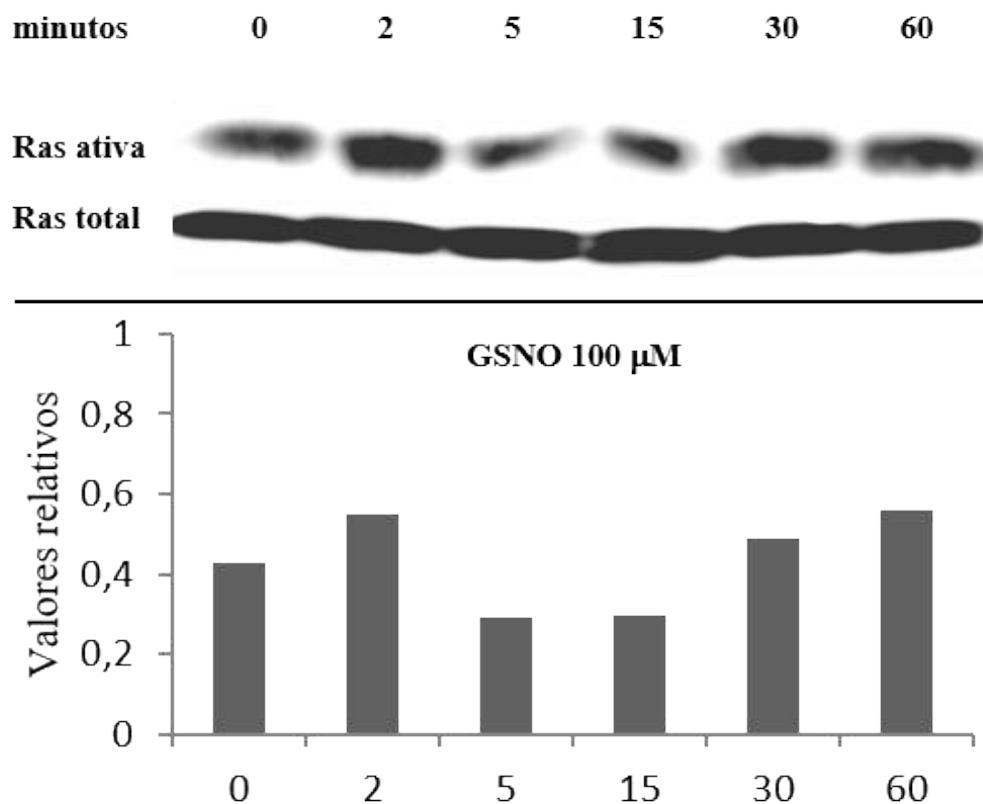


Figura 6. Atividade de Ras após estímulo com GSNO 100 μM

4.2. GSNO induziu aumento da viabilidade celular sem afetar a proliferação das células MDA-MB-231

O GSNO induziu o aumento da viabilidade celular no intervalo de concentrações que variou entre 10 e 100 μM , sendo que esta última concentração estimulou significativamente a viabilidade. A concentração de 250 μM causou uma ligeira queda de viabilidade (**Figura 7A**). Na contagem celular observamos o mesmo perfil, porém não obtivemos significância estatística quando analisamos a proliferação das células MDA-MB-231 estimuladas com GSNO 100 μM (**Figura 7B**).

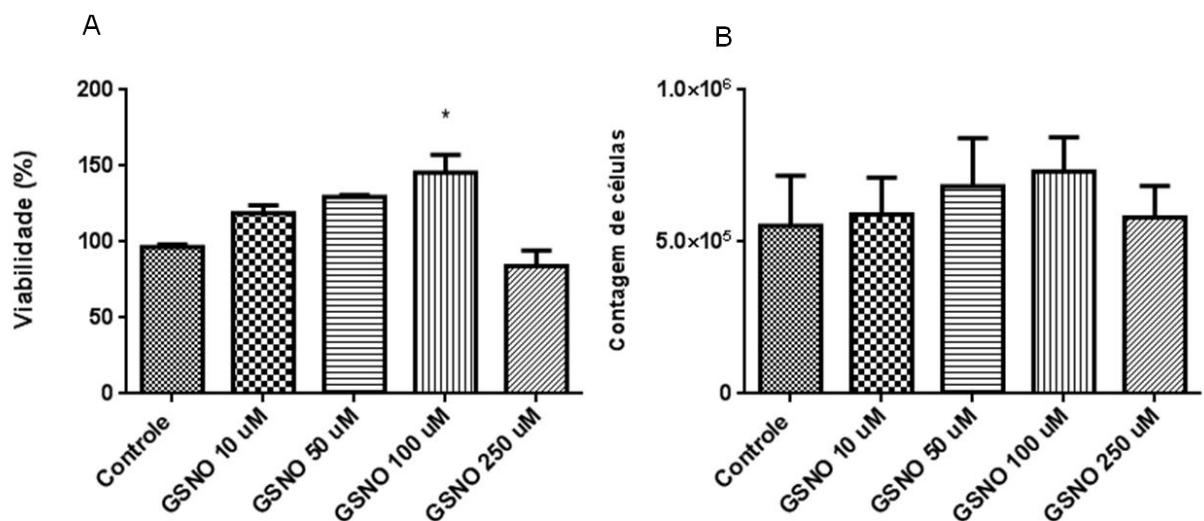


Figura 7. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) após estímulo com GSNO

Os efeitos de GSNO sobre a viabilidade células HeLa guardavam uma dependência da atividade de Src quinase (Batista et al., 2013). Assim, investigamos os efeitos do inibidor de Src quinase, PP2 sobre a viabilidade celular das células MDA-MB-231 incubadas com GSNO. Nestas condições, observamos queda da viabilidade celular em relação ao ponto experimental somente com GSNO (**Figura 8A**). A contagem de células indicou que esta queda não foi significativa quando avaliamos a proliferação celular (**Figura 8B**).

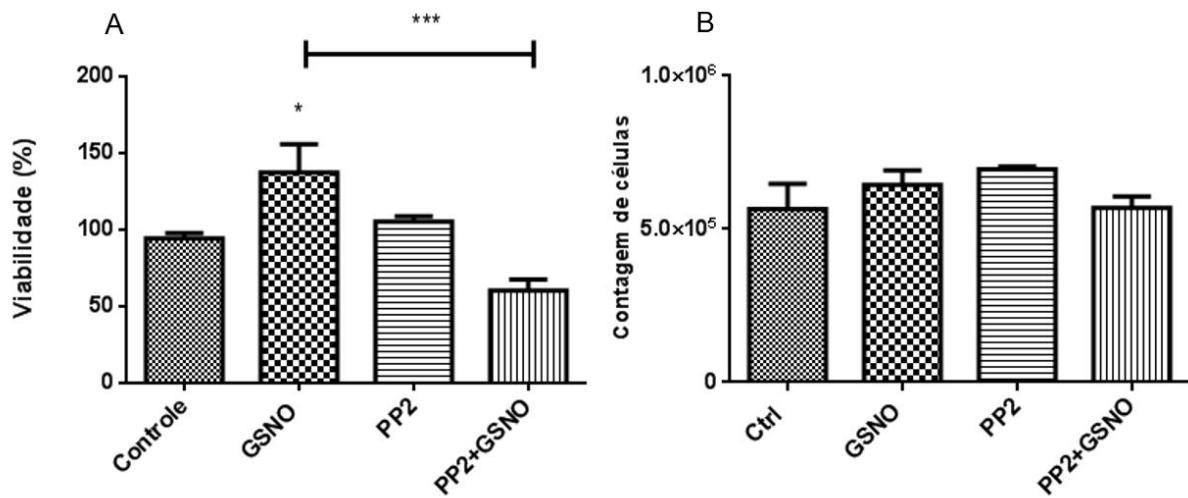


Figura 8. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Src e estímulo de GSNO 100 μ M

Na **Figura 9A**, avaliamos a possibilidade de Ras estar participando na promoção da proliferação das células MDA-MB-231, mediada por GSNO. O tratamento das células com FPT II (inibidor da enzima farnesiltransferase e, consequentemente, inibidor de Ras) resultou em redução da viabilidade celular incrementada pelo GSNO. A contagem apresentou o mesmo perfil do ensaio de viabilidade, mas não foram observadas diferenças significativas (**Figura 9B**).

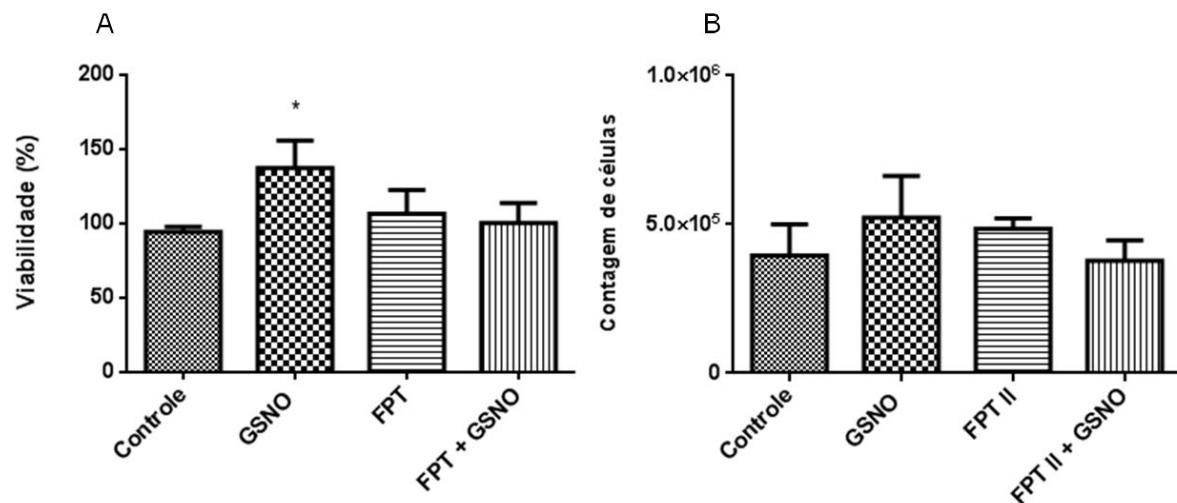


Figura 9. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Ras FPT II e estímulo de GSNO 100 μ M

Observamos aumento da viabilidade celular nas células pré-incubadas com cPTIO, o sequestrador de NO, e estimuladas posteriormente com GSNO (**Figura**

10A). Na contagem celular observamos o mesmo efeito, porém as diferenças obtidas não apresentaram significância estatística (**Figura 10B**).

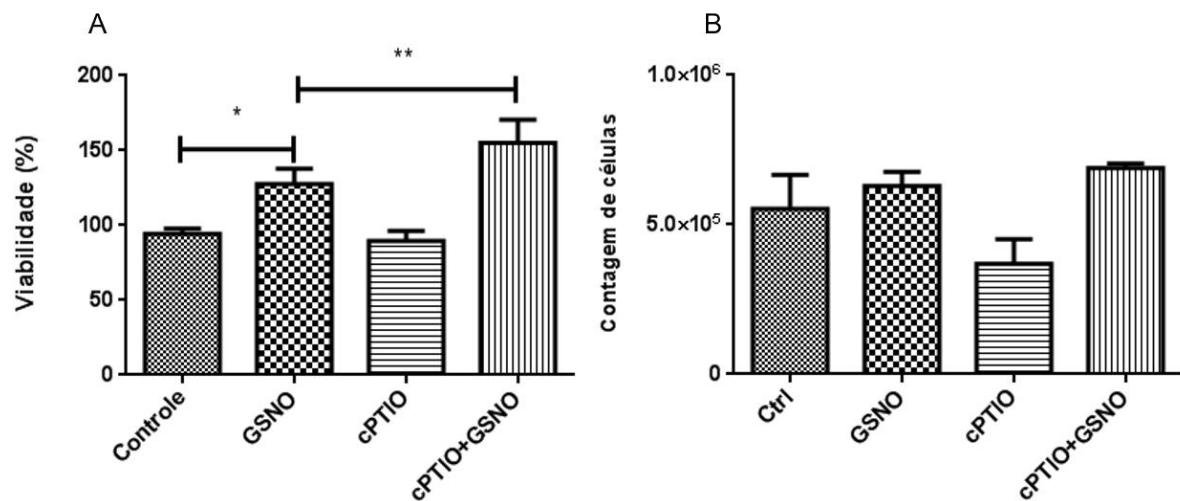


Figura 10. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com pré-incubação das células com cPTIO 30 μ M e estímulo de GSNO 100 μ M

4.3. GSNO não induziu a migração de células MDA-MB-231

Não tendo encontrado resultados significativos quando avaliamos os efeitos do doador exógeno de NO sobre a proliferação das células MDA-MB-231, investigamos os efeitos deste sobre a migração das células. O GSNO 100 μ M não induziu a migração celular (**Figura 11**). Incubamos previamente as células com os inibidores de Src e Ras (PP2 e FPT II, respectivamente) antes do estímulo com o GSNO e igualmente não obtivemos alterações na migração (**Figura 11**).

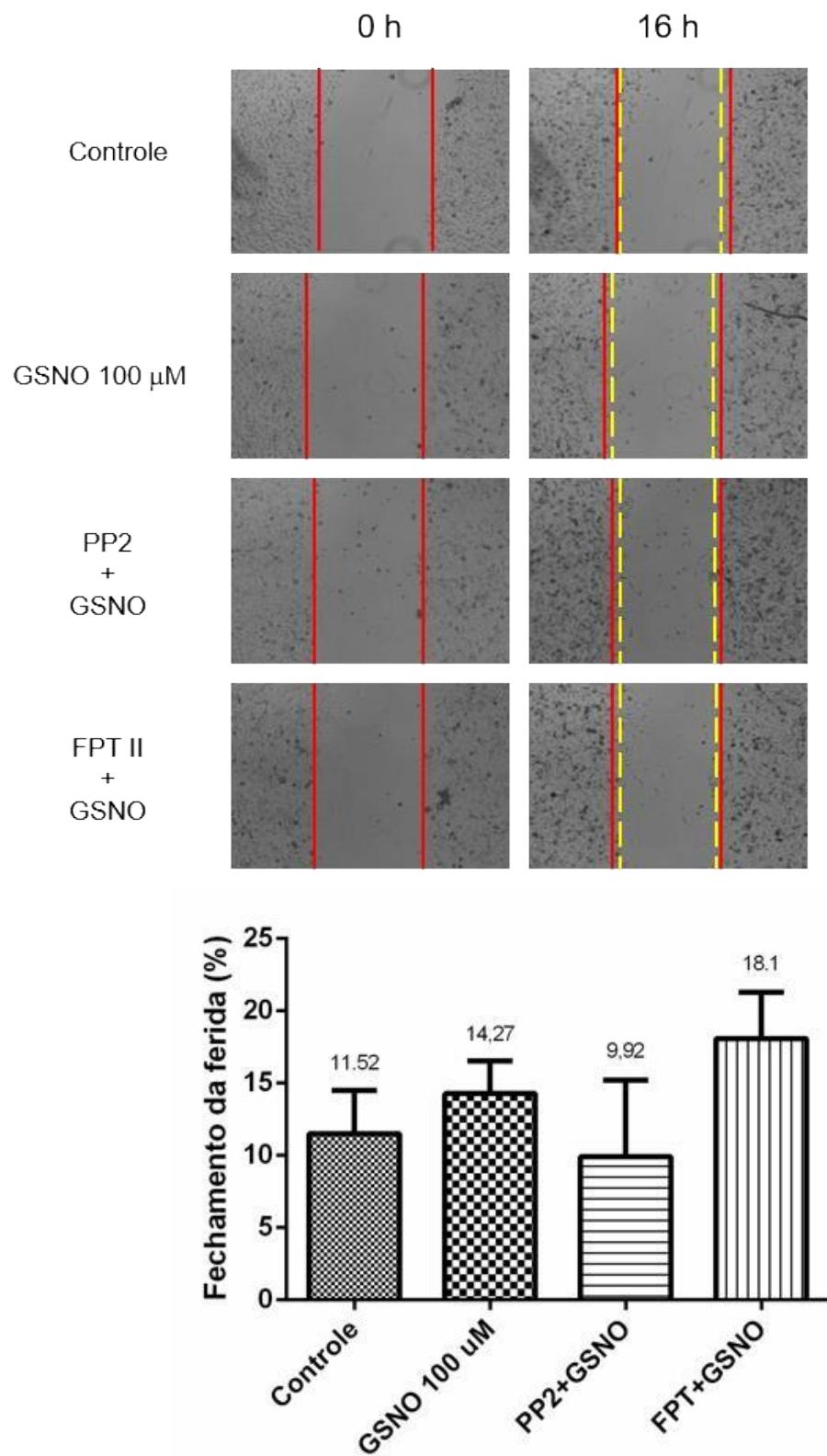


Figura 11. Ensaio de migração das células MDA-MB-231 com estímulo de GSNO 100 μ M

4.4. Ras foi localizada na região perinuclear mesmo após o estímulo com GSNO

No ensaio de microscopia confocal, avaliamos a compartmentalização de Ras nas células transfectadas com os plasmídeos antes e após o estímulo com GSNO 100 μM . Observamos a localização de Ras na região perinuclear antes e após o estímulo. A seta amarela indica a localização do núcleo da célula e as setas vermelhas Ras na região perinuclear. Não ocorreram mudanças significativas na fluorescência e também não observamos a distribuição de Ras entre os dois compartimentos celulares, o complexo de Golgi e a membrana plasmática (**Figura 12**).

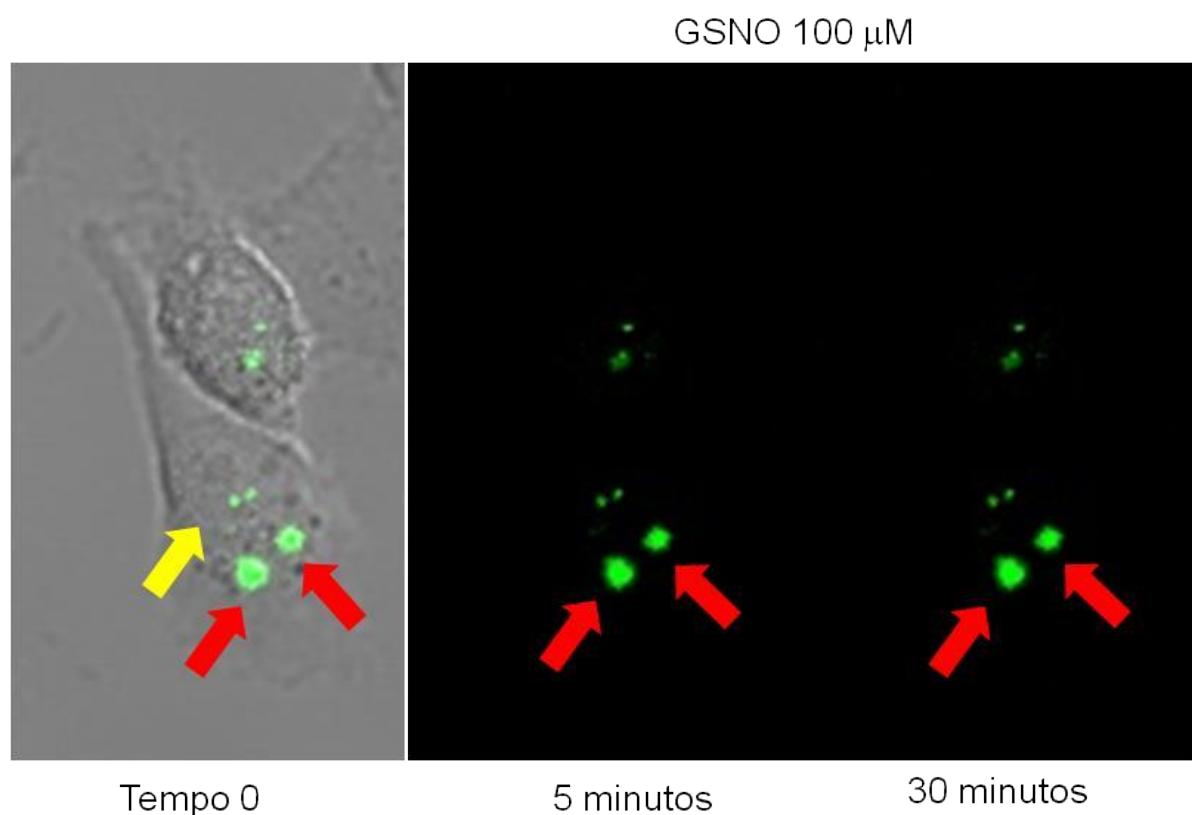


Figura 12. Microscopia confocal da MDA-MB-231 após transfecção dos plasmídeos e estímulo com GSNO 100 μM

4.5. Elevação da produção endógena de NO em células MDA-MB-231 mediante estimulação por LPS

Não havendo encontrado resultados significativos na proliferação, migração e compartimentalização das células MDA-MB-231 quando submetíamos estas células à fonte exógena de NO, passamos a investigar os efeitos de uma fonte endógena de NO sobre a proliferação, migração e compartimentalização destas células. Estas células expressam o receptor TLR4 e são estimuladas a produzir NO após estímulo com o lipopolissacarídeo de parede bacteriana, LPS (Eswarappa, *et al.*, 2008).

Com o objetivo de estimarmos a produção endógena de NO em células MDA-MB-231, utilizamos o fluoróforo DAF-2DA conforme descrito no item **3.2.** da seção de **Materiais e métodos**. O método baseia-se na observação de alterações na intensidade de fluorescência do fluoróforo DAF-2DA e estas alterações são representadas pela mediana de fluorescência obtida para cada grupo experimental. Houve um aumento da produção endógena de NO após o estímulo com 0,5 µg/mL ($p \leq 0,05^*$) e 1 µg/mL ($p \leq 0,01^{**}$) de LPS. O uso de uma concentração mais elevada de LPS (2 µg/mL) provocou um incremento de NO que não foi significativo (**Figura 13**).

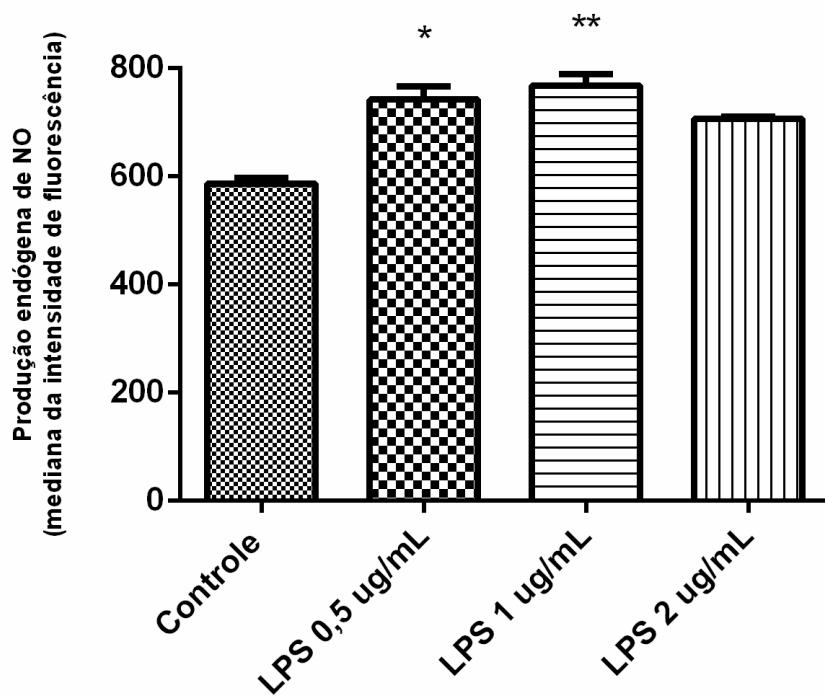


Figura 13. Estimativa da produção endógena de NO pelas células MDA-MB-231 após estímulo com concentrações crescentes de LPS

Concluímos que a concentração de 1 µg/mL de LPS foi a que mais eficientemente estimulava a produção endógena de NO e passamos a utilizá-la para todos os experimentos subsequentes.

4.6. Ativação de Ras por estímulo com LPS

O ensaio de atividade de Ras descrito no item **3.8.** nos permitiu observar que 1 $\mu\text{g/mL}$ de LPS promoveu a atividade da GTPase em momentos precoces representados a partir de 2 minutos de ativação e máximo de ativação obtida com 30 minutos de estímulo. Observou-se uma queda na atividade de Ras após 60 minutos de estimulação com LPS. Constatamos que LPS é capaz de estimular de maneira sustentada a atividade de Ras por um período que variou entre 2 e 30 minutos (**Figura 14**).

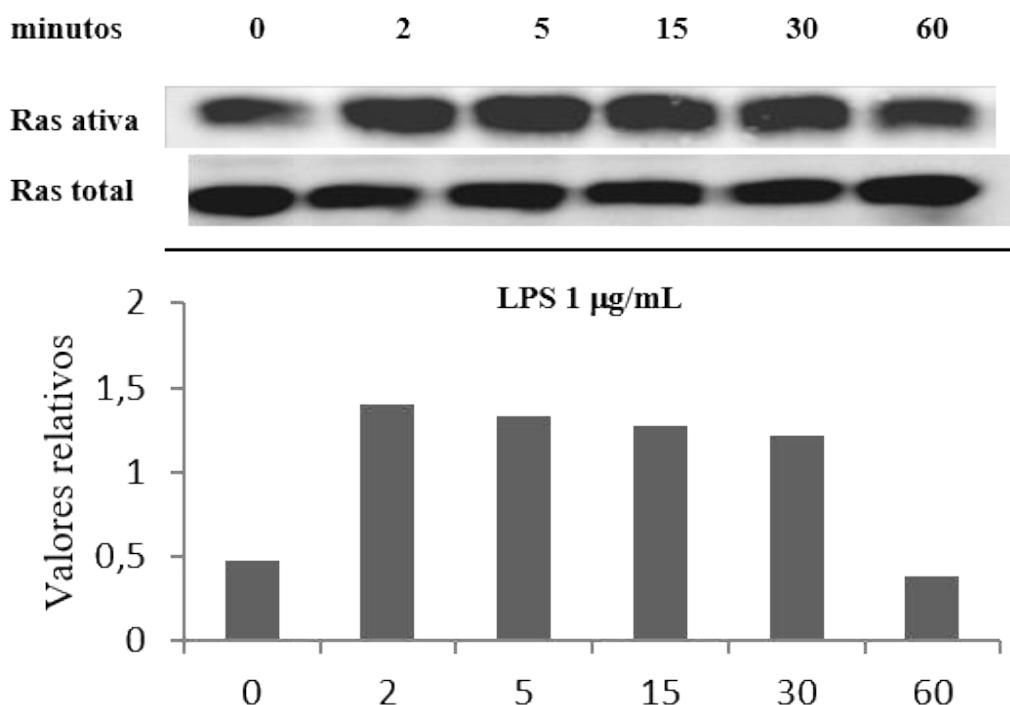


Figura 14. Atividade de Ras nas células MDA-MB-231 após estímulo com LPS 1 $\mu\text{g/mL}$

4.7. Aumento da viabilidade celular através do estímulo por LPS e contagem das células estimuladas utilizando azul de Trypan

Nossa próxima investigação foi direcionada aos efeitos que o LPS poderia induzir na viabilidade das células MDA-MB-231. Concentrações crescentes de LPS promoveram elevações graduais de viabilidade destas células (**Figura 15A**). A concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, revelou-se a mais eficiente ($p \leq 0,05^*$). O LPS na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não foi capaz de promover o aumento da viabilidade celular. Ao analisarmos o perfil de contagem na **Figura 15B**, verificamos que o LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziu um pequeno aumento da proliferação celular que entretanto não foi significativo.

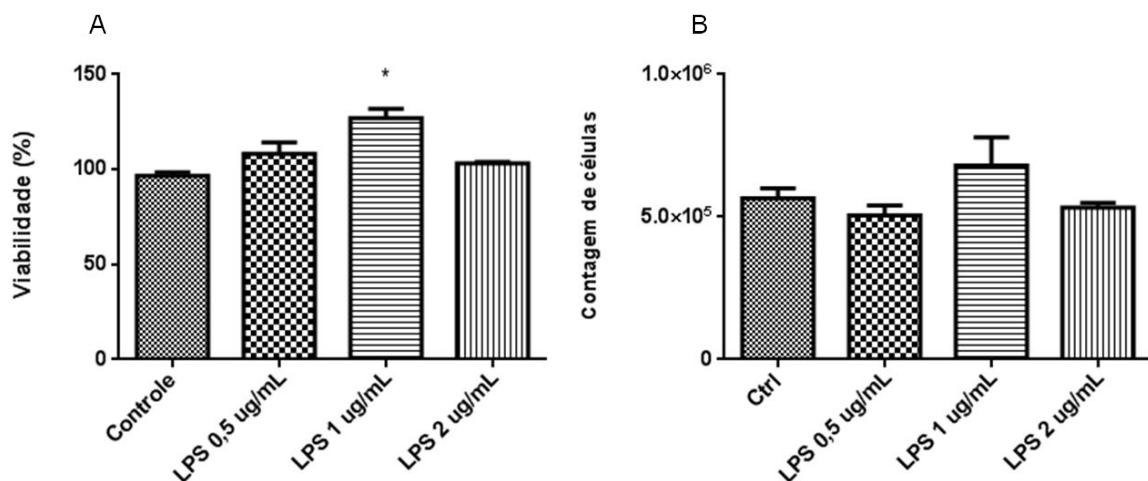


Figura 15. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) após estímulo com LPS

4.8. Viabilidade e contagem celular com inibidores de iNOS, Ras, Src ou sequestrador de NO com subsequente estimulação por LPS

Na **Figura 16A** observamos que a viabilidade das células MDA-MB-231 se manteve em níveis similares àqueles determinados para a condição controle, quando estas células foram incubadas com L-NAME, inibidor geral das NOSs. A incubação com L-NAME resultou em inibição da viabilidade estimulada pelo LPS. Na **Figura 16B** a incubação das células com L-NAME manteve o nível de proliferação com uma ligeira

queda após o estímulo com LPS quando comparamos ao ponto experimental com LPS na ausência de L-NAME, porém esta redução não foi significativa.

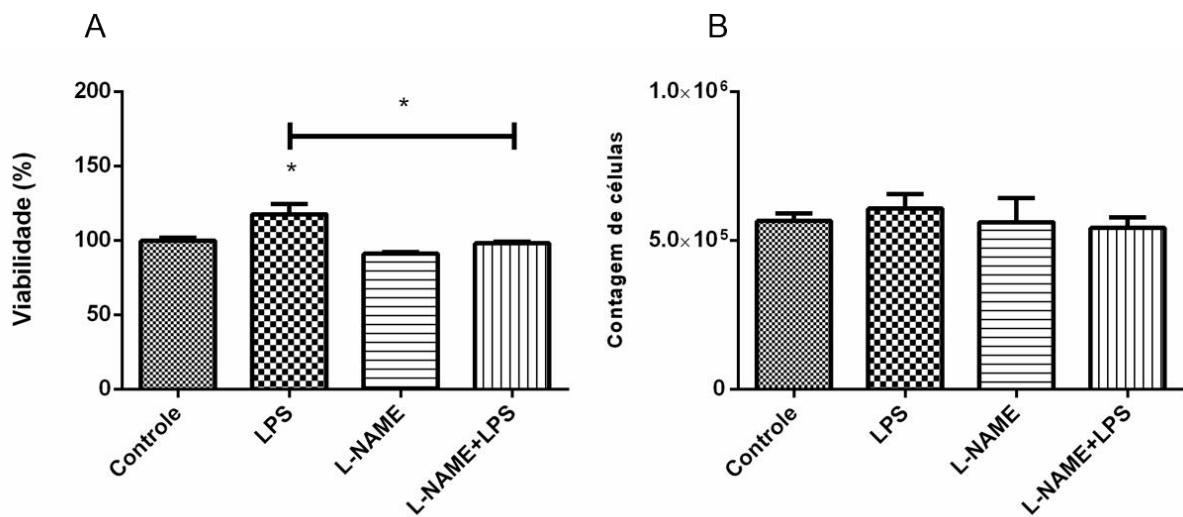


Figura 16. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de iNOS e LPS

O estímulo com LPS após incubação com FPT II resultou em aumento da viabilidade ($p \leq 0,05^*$) em comparação à situação onde incubávamos as células com LPS na ausência do inibidor (**Figura 17A**). Observamos o mesmo perfil no ensaio de contagem celular, mas sem obtenção de significância estatística (**Figura 17B**).

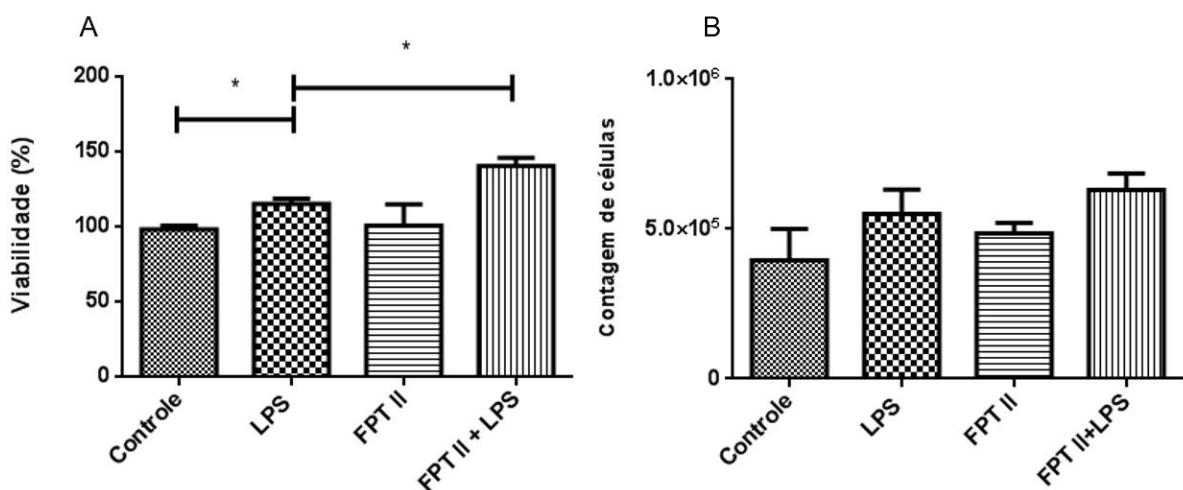


Figura 17. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Ras e LPS 1 μ g/mL

Ao incubarmos as células com o inibidor de Src (PP2) e estimularmos posteriormente com LPS 1 μ g/mL, observamos que não houve diminuição na

viabilidade celular (**Figura 18A**). No ensaio de contagem observamos o mesmo perfil (**Figura 18B**), porém sem significância estatística.

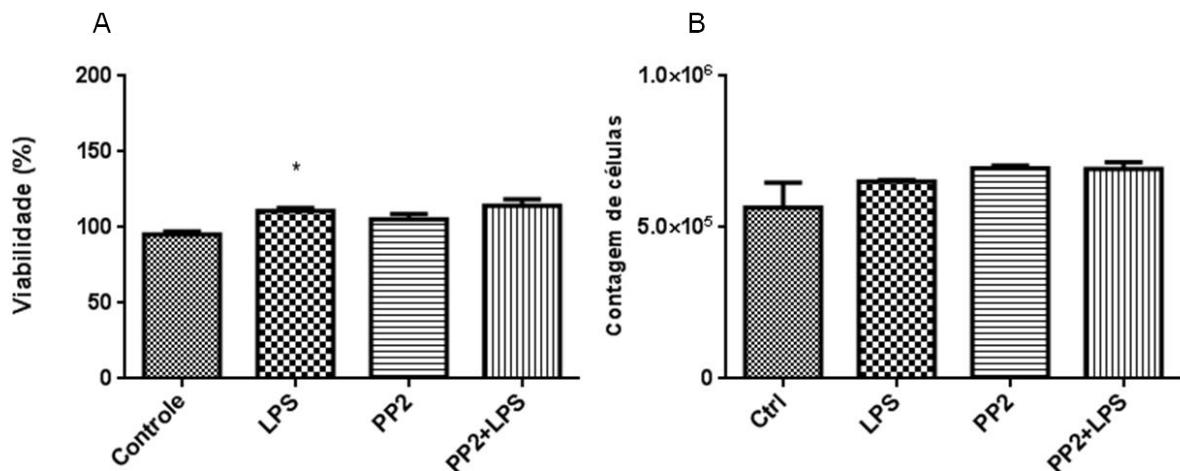


Figura 18. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com inibidor de Src e LPS 1 μ g/mL

A incubação das células com cPTIO nos mostrou que este foi capaz de interferir no aumento da viabilidade celular estimulada pelo LPS ($p < 0,001$ ***) conforme mostrado na **Figura 19A**. Ao realizarmos a contagem celular, o incremento de proliferação das células incubadas com cPTIO na presença de LPS foi semelhante à condição experimental onde as células eram estimuladas somente com LPS (**Figura 19B**). As elevações nas taxas de proliferação nas condições experimentais LPS e cPTIO+LPS não foram estatisticamente significativas.

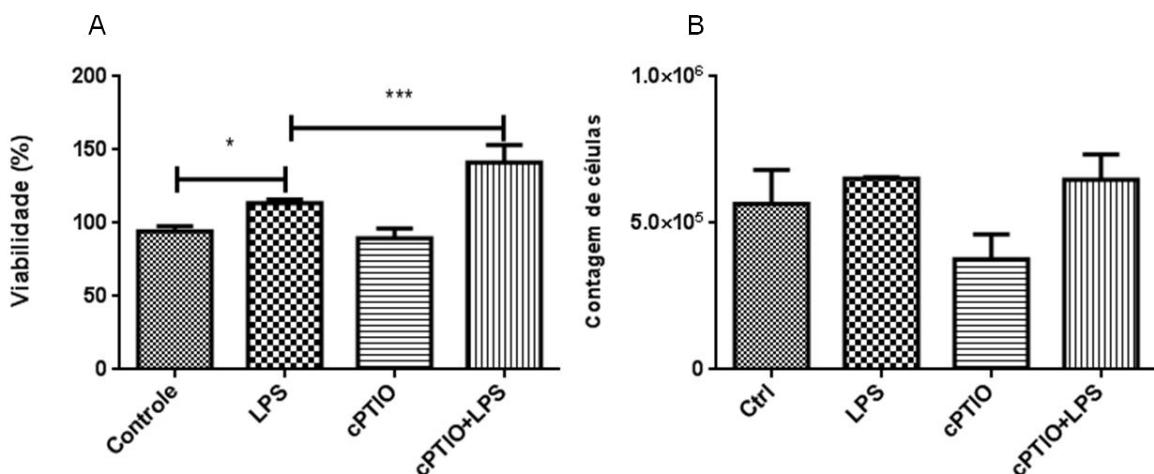


Figura 19. Ensaio de viabilidade (A) e contagem celular (B) com cPTIO 30 μ M e LPS 1 μ g/mL

4.9. Estímulo da migração das células MDA-MB-231 após estímulo com LPS e participação de iNOS, Src, Ras e Rac1 neste evento

Nossos resultados demonstraram que LPS 1 μ g/mL promoveu a migração das células MDA-MB-231 após 16 horas de incubação. A incubação prévia das células com L-NAME, PP2, FPT II ou NSC23766, que são respectivamente inibidores da iNOS, Src, Ras e Rac1, resultou em inibição da migração celular após o estímulo com LPS (**Figura 20**). Este resultado nos levou a sugerir que um eixo de sinalização celular constituído pelas proteínas iNOS, Src, Ras e Rac1 está associado à migração das células MDA-MB-231 estimulada por LPS. Este provável eixo de sinalização celular está mostrado na **Figura 20**. A **Figura 21** se refere aos resultados obtidos nas condições controle com inibidores e a **Figura 22** ilustra o tamanho da fenda em μ m após 16 horas de estímulo com LPS (gráfico à esquerda) e comparação entre a condição de estímulo com LPS e na ausência e na presença de inibidores (gráfico à direita).

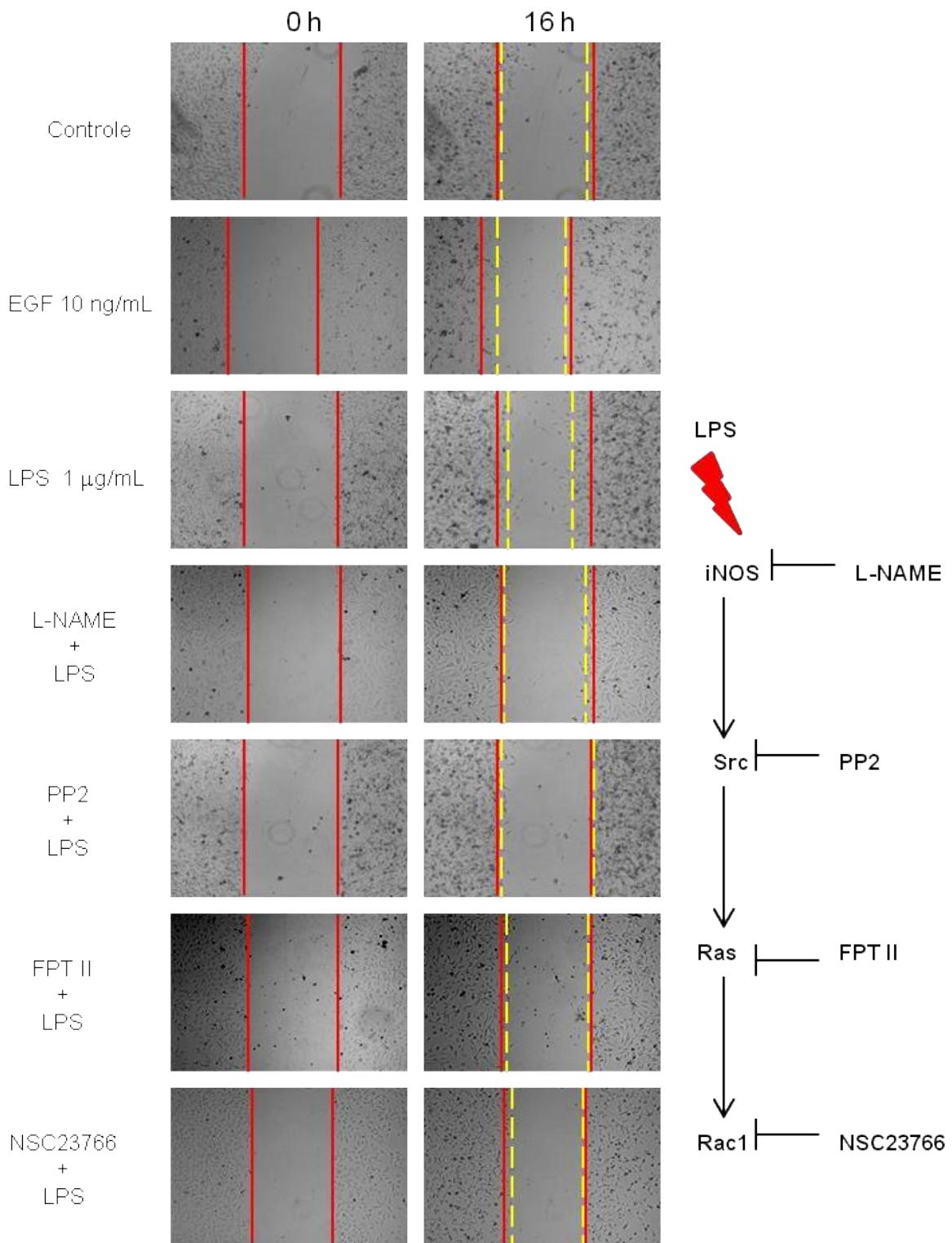


Figura 20. Ensaio de migração de células MDA-MB-231 estimuladas com LPS 1 μ g/mL na presença dos inibidores de iNOS, Src, Ras e Rac1

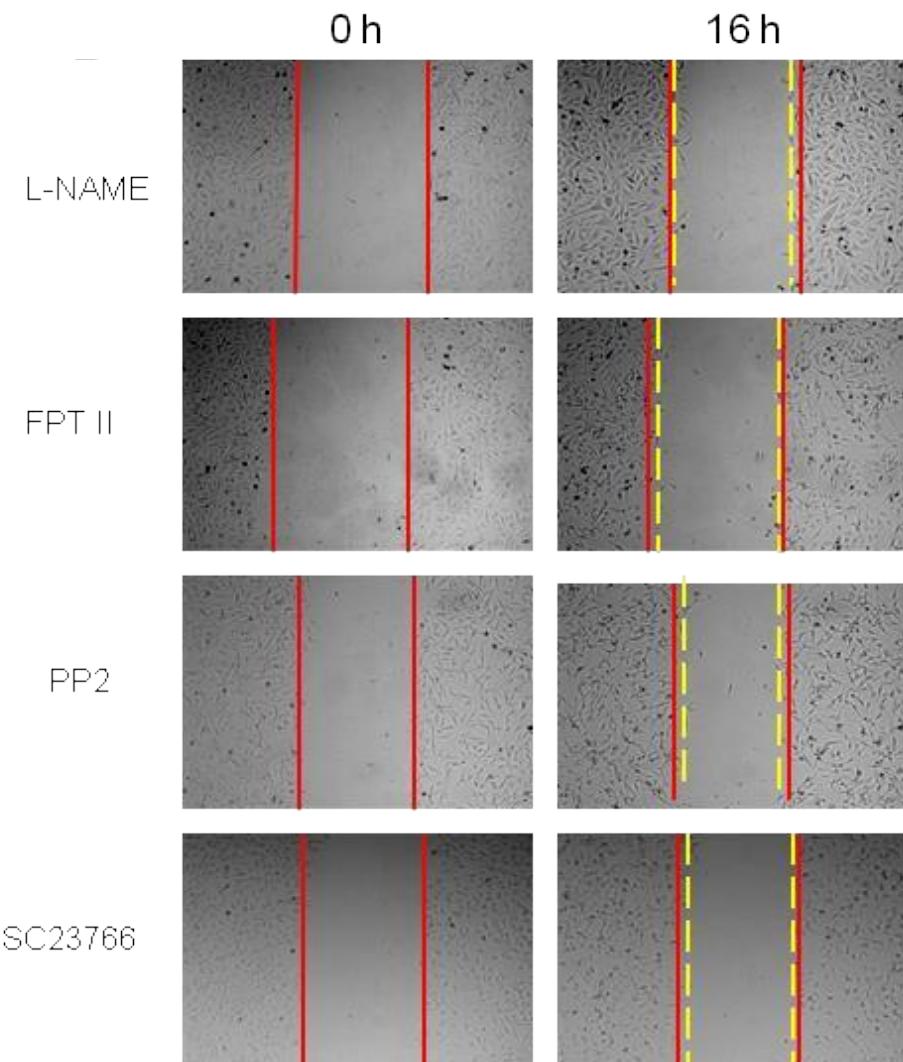


Figura 21. Ensaio de migração de células MDA-MB-231 não estimuladas e na presença dos inibidores de iNOS, Src, Ras e Rac1 (controles)

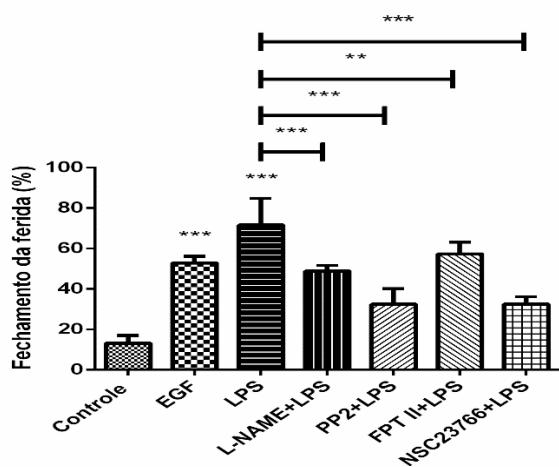


Figura 22. Ensaio de migração: gráficos representando a taxa de migração das células MDA-MB-231 estimuladas por LPS e na presença dos inibidores da iNOS, Src quinase, Ras e Rac1

4.10. Participação de PLC- γ e Ca²⁺ na migração celular

Bivona e colaboradores (2003) sugeriram a participação da PLC- γ e dos íons Ca²⁺ na via de sinalização que descreve a ativação de Ras em dois compartimentos celulares, a membrana plasmática e o Complexo de Golgi. O ensaio mostrou que ambos estão envolvidos na migração, pois tanto a utilização do inibidor de PLC- γ (U73122) quanto a do quelante de Ca²⁺ (BAPTA-AM), inibiram a migração celular mediada pelo LPS (**Figura 23**).

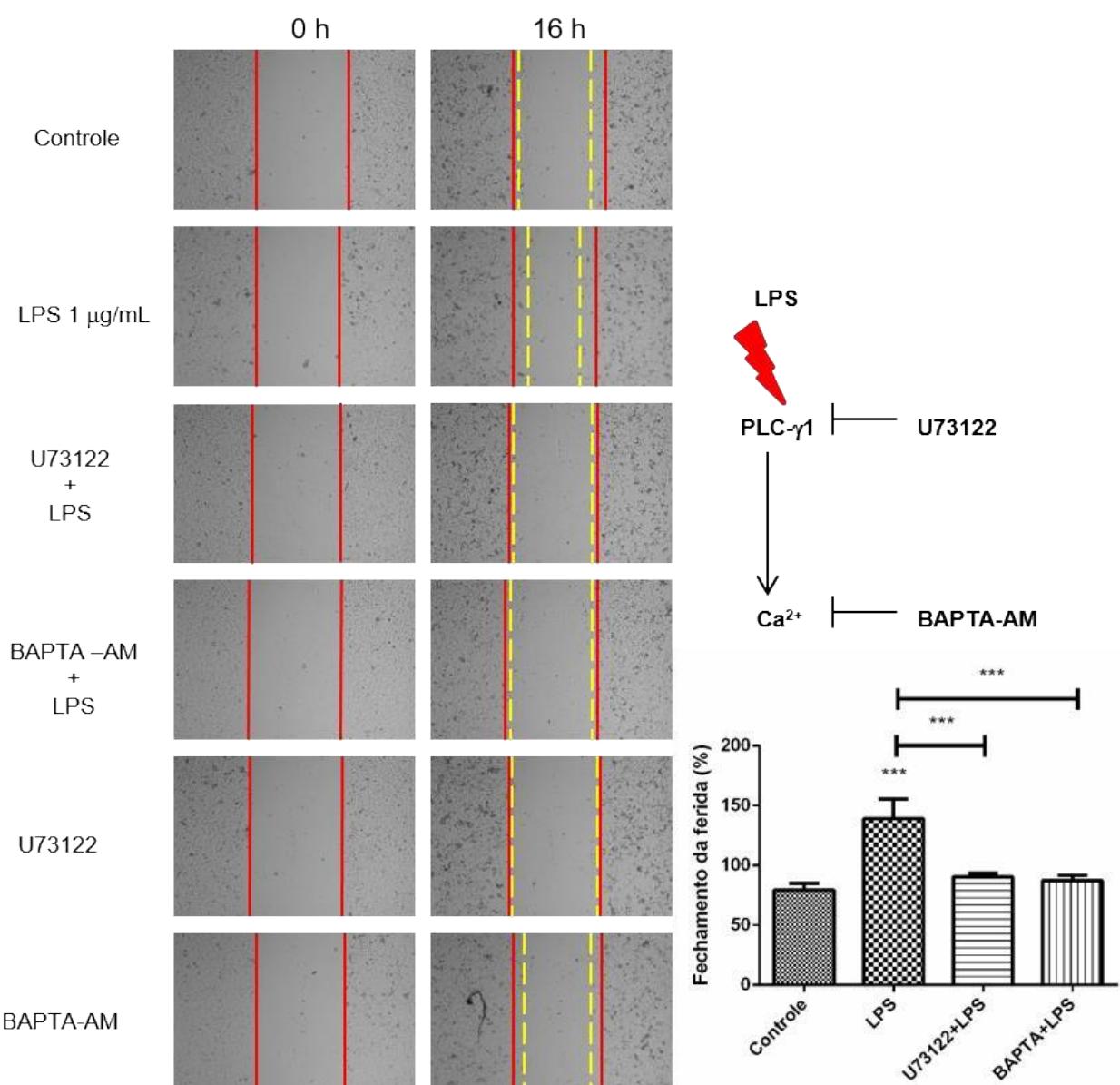


Figura 23. Ensaio de migração das células MDA-MB-231 estimuladas com LPS 1 μ g/mL na presença dos inibidores da proteína PLC- γ e quelante de Ca²⁺

4.11. Migração das células MDA-MB-231 após transfecção dos siRNAs RasGRP1 e CAPRI e estímulo com LPS

Como observamos que a Ras está envolvida na migração celular, complementamos esta avaliação com o silenciamento das proteínas RasGRP1 e CAPRI, que ativam e desativam Ras, respectivamente. A **Figura 24** nos mostra que mesmo após o silenciamento de RasGRP1 e CAPRI as células migram com a estimulação de LPS, porém a migração é menor em relação ao siRNA Controle negativo com LPS ($p \leq 0,05^*$) (gráfico superior da **Figura 24**). Nos pontos experimentais de silenciamento de RasGRP1 e CAPRI sem subsequente estimulação com LPS, obtivemos um aumento de migração quando comparamos ao siRNA controle negativo (gráfico inferior da **Figura 24**).

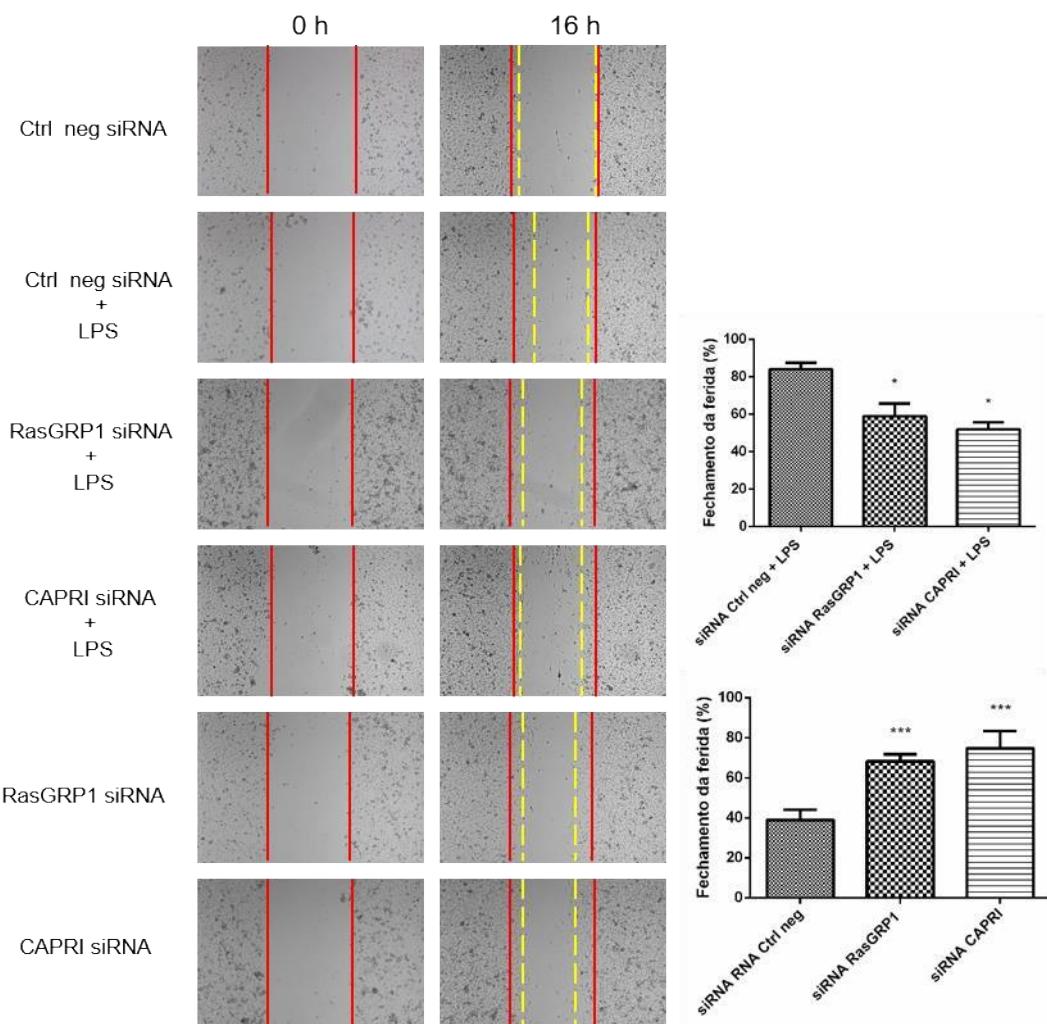


Figura 24. Ensaio de migração das células MDA-MB-231 que foram silenciadas para as proteínas RasGRP1 e CAPRI e estimuladas com LPS 1 μ g/mL

As eficiências de silenciamento determinadas pela técnica de qPCR em Tempo Real foram respectivamente de 66% para RasGRP1 e 53% para CAPRI (**Figura 25C**). As **Figuras 25 A e B** representam a expressão gênica relativa de RasGRP1 e CAPRI, respectivamente. As taxas de transfecções não foram muito eficientes e discutiremos este resultado detalhadamente na sessão **Discussão**.

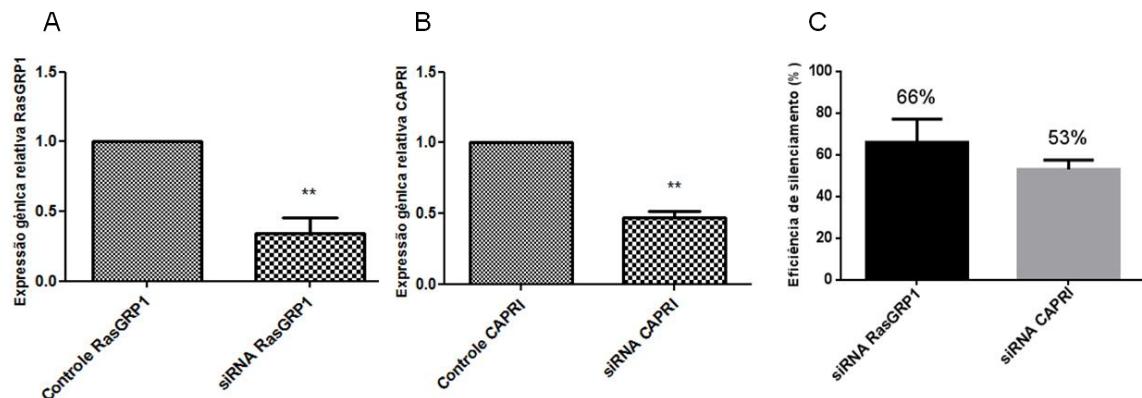


Figura 25. Expressão gênica relativa de RasGRP1 (A) e CAPRI (B) após o silenciamento dos mRNAs codificadores das duas proteínas. C representa a porcentagem de silenciamento referente a triplicata experimental

4.12. LPS não estimulou a compartimentalização de Ras nas células MDA-MB-231

No ensaio de microscopia confocal, observamos a localização perinuclear de Ras antes e após o estímulo com LPS 1 µg/mL e não houve mudanças significativas da fluorescência (**Figura 26**). A seta amarela indica a localização do núcleo da célula e as setas vermelhas a localização de H-Ras ativa.

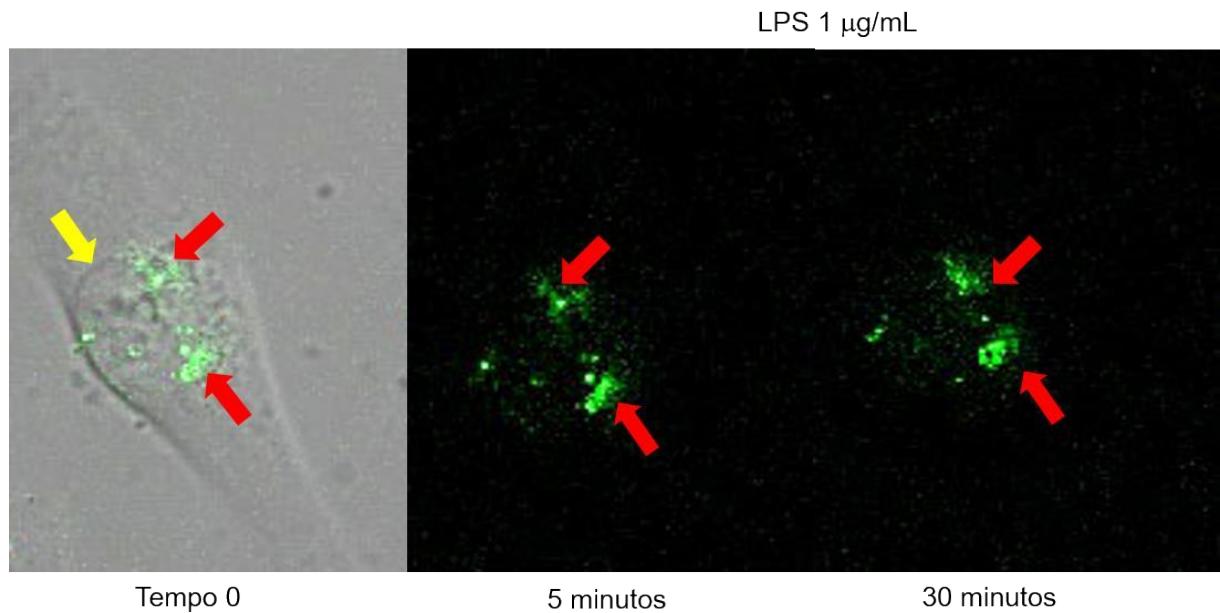


Figura 26. Microscopia confocal de H-Ras ativa na MDA-MB-231 antes e após o estímulo com LPS 1 µg/mL

4.13. Soro Fetal Bovino e EGF não estimularam a compartimentalização de H-Ras nas células MDA-MB-231

Ao analisarmos as células transfectadas na microscopia confocal, observamos que tanto o SFB 10% (Figura 27) quanto o EGF 50 ng/mL (Figura 28) não induziram a compartimentalização de H-Ras.

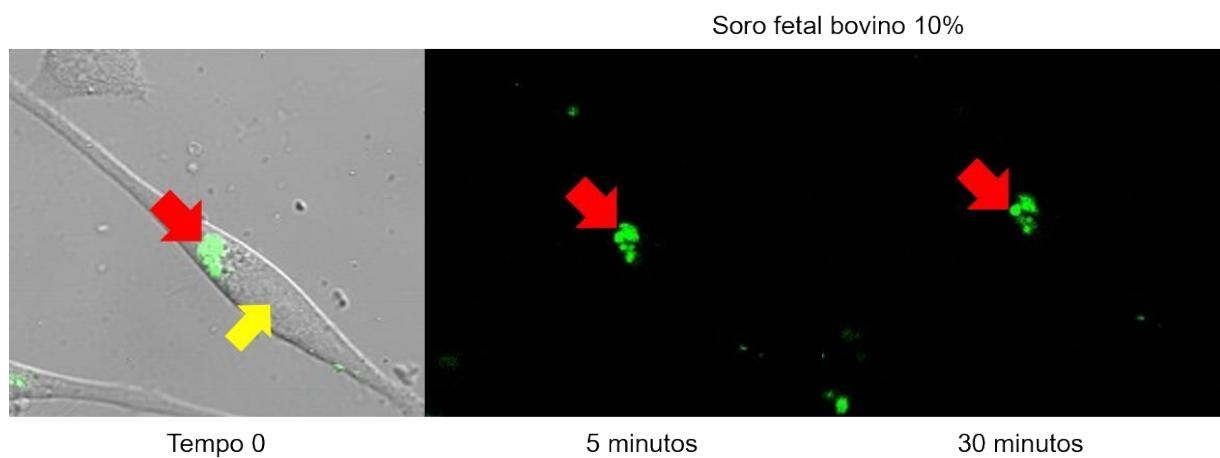


Figura 27. Microscopia confocal da MDA-MB-231 transfectada e estimuladas com SFB 10%

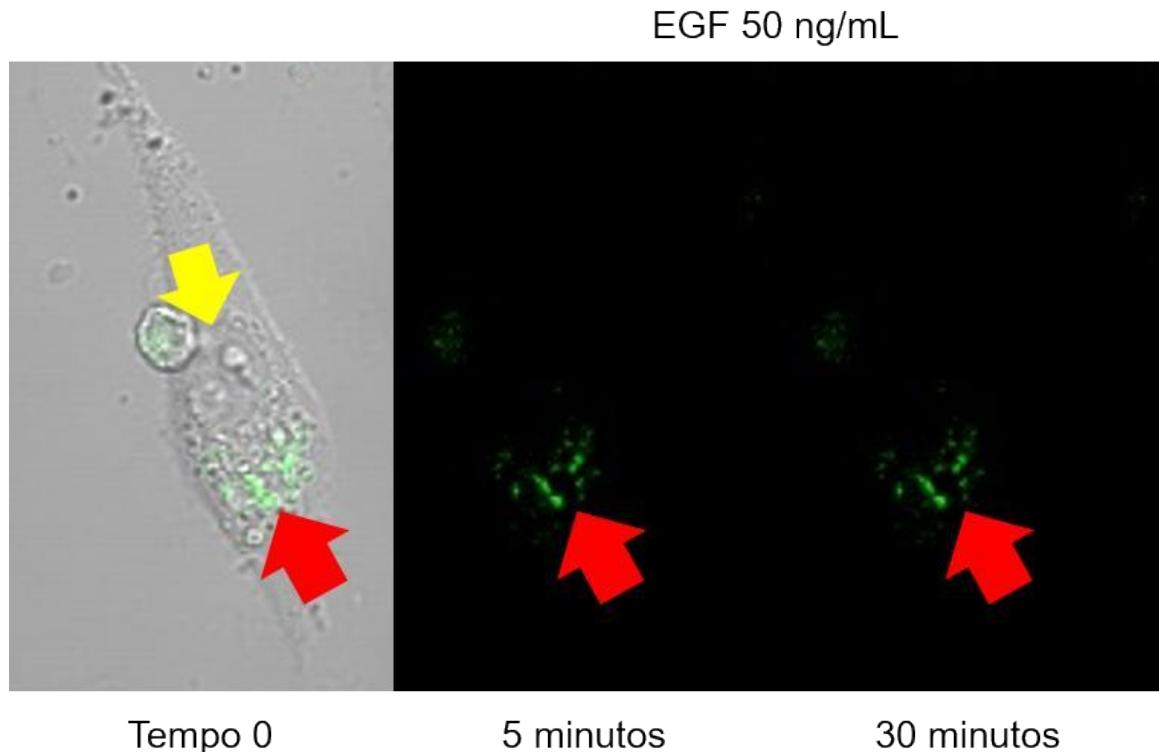


Figura 28. Microscopia confocal da MDA-MB-231 transfectada e estimulada com EGF 50 ng/mL

4.14. Soro Fetal Bovino e EGF estimularam a compartimentalização de Ras em células HeLa

A fim de verificar se os plasmídeos estavam funcionando adequadamente, transfectamos células HeLa super-expressando H-Ras^{WT} com os plasmídeos e estimulamos com SFB 10% ou EGF 50 ng/mL. O SFB induziu a compartimentalização de H-Ras ativa para a membrana plasmática após 5 minutos (setas azuis) e para a região perinuclear após 30 minutos (seta vermelha) (**Figura 29**).

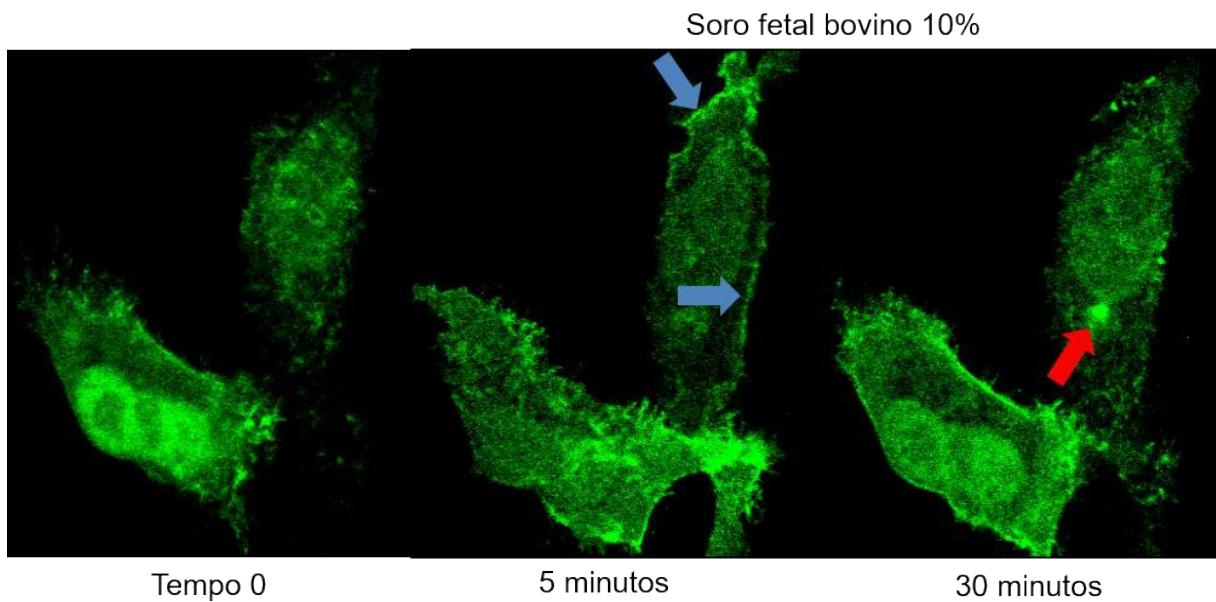


Figura 29. Microscopia confocal das células HeLa super-expressando H-Raswt, transfectadas com os plasmídeos e estimuladas com SFB 10%

A estimulação das células com EGF causou uma resposta similar ao estímulo com SFB, compreendendo a compartimentalização de H-Ras ativa para a membrana plasmática nos primeiros 5 minutos de estímulo (seta azul) e posterior compartimentalização para a região perinuclear após 30 minutos (seta vermelha) (**Figura 30**).

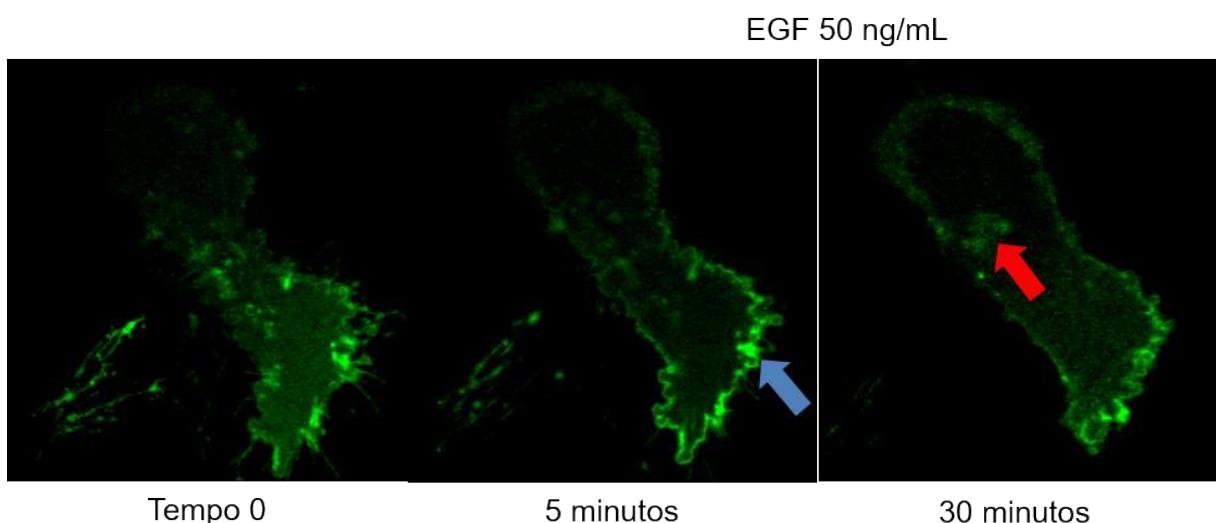


Figura 30. Microscopia confocal das células HeLa super-expressando H-Raswt, transfectadas com os plasmídeos e estimuladas com EGF 50 ng/mL

4.15. A atividade de Rac1 é estimulada por LPS em células MDA-MB-231

Rac é uma GTPase que se encontra *downstream* em relação a Ras (Cho *et al.*, 2002; Innocenti *et al.*, 2002; Eller-Borges *et al.*, 2015) e está envolvida na migração de diversos tipos celulares (Koh e Moon, 2011; Eller-Borges *et al.*, 2015). O ensaio de atividade de Rac1 demonstrou aumento de sua atividade após 2 horas do estímulo com LPS 1 μ g/mL (**Figura 31**).

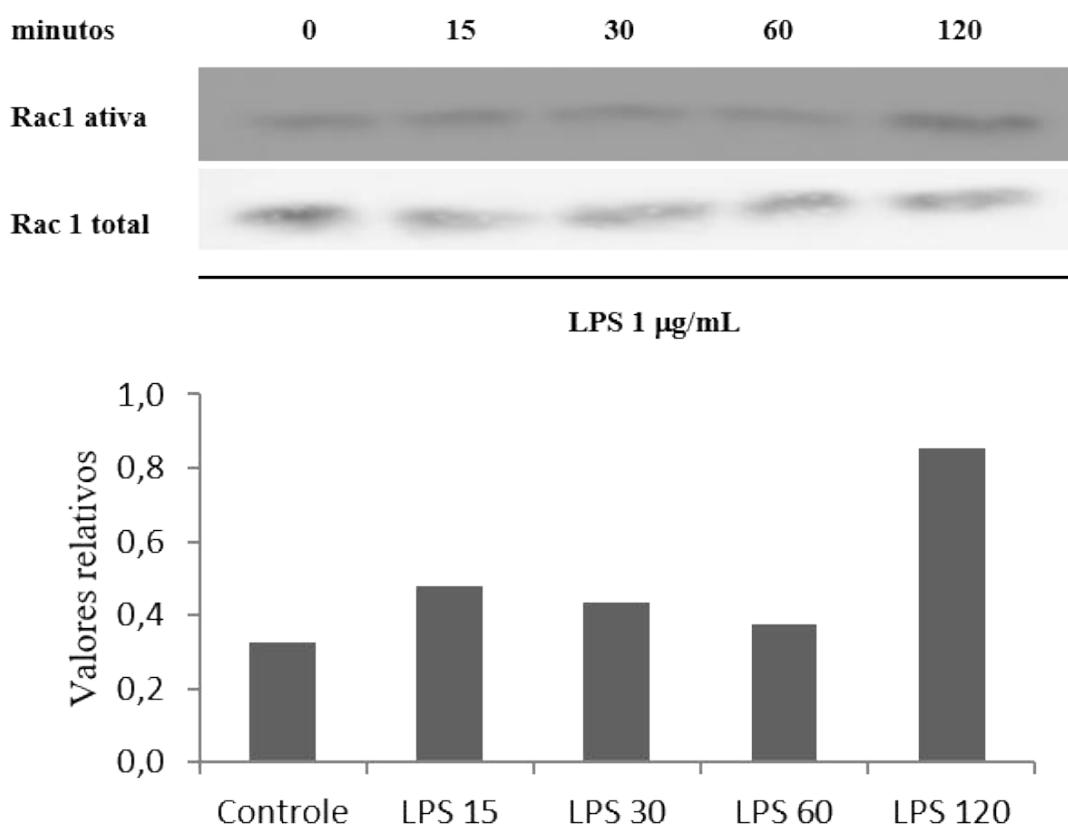


Figura 31. Atividade de Rac1 após estímulo com LPS 1 μ g/mL

Os inibidores do eixo de sinalização bloquearam a estimulação por LPS. Sendo o quelante Ca²⁺ (BAPTA-AM) e os inibidores de Src e iNOS (PP2 e L-NAME, respectivamente) mais eficazes no bloqueio da estimulação por LPS (**Figura 32**).

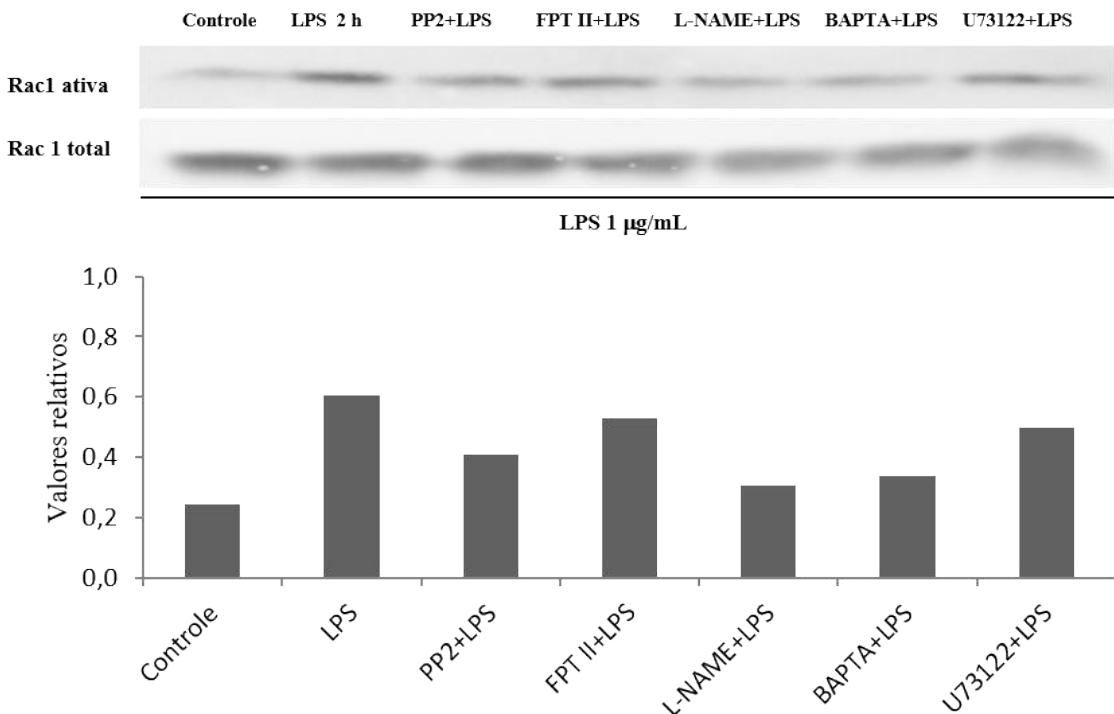


Figura 32. Atividade de Rac1 com inibidores de Src, Ras, iNOS, PLC \square e quelante de Ca $^{2+}$ após estimulação com LPS 1 μ g/mL

4.16. Src é s-nitrosilada em células MDA-MB-231 estimuladas com LPS

A ativação sustentada de Src promove ativação de Rac1 e estes eventos de sinalização são essenciais no desenvolvimento de tumores de mama (Servitja et al., 2003). A s-nitrosilação de Src e a sua ativação foram associadas à ativação do eixo de sinalização Src/Ras/ PLC- γ (Batista et al., 2013). A S-nitrosilação da proteína Src foi avaliada em nosso estudo e observamos que esta modificação pós-tradução ocorre após 2 horas de estímulo com LPS. A pré-incubação de L-NAME com as células antes do estímulo com LPS inibiu a s-nitrosilação de Src (**Figura 33**). O resultado sugeriu que a s-nitrosilação de Src mediada pelo NO, produzido endogenamente via LPS, foi responsável pelo desencadeamento da via de sinalização que envolve a ativação de Ras e, por fim, a ativação de Rac1 que estimulou a migração celular.

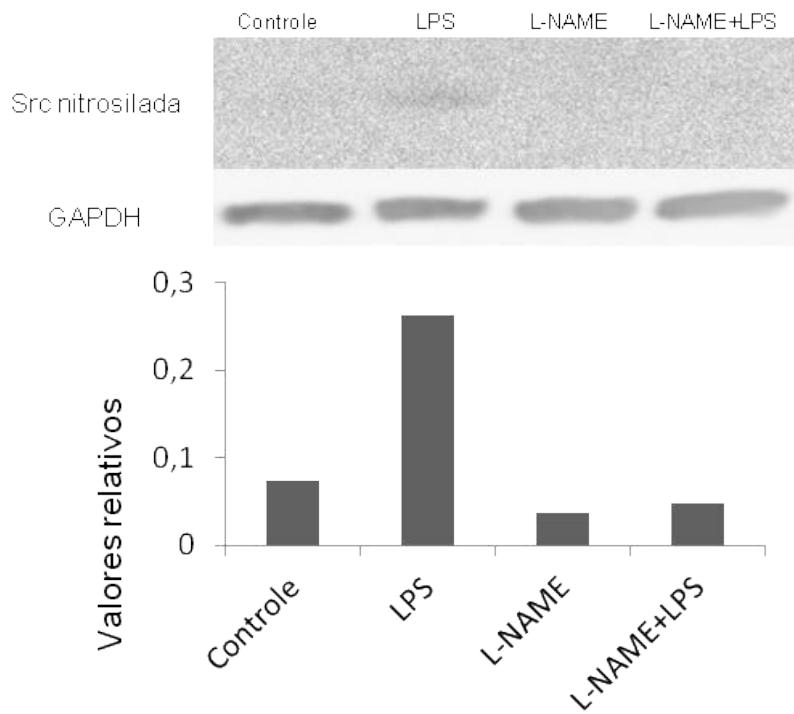


Figura 33. Ensaio de biotina para avaliação da S-nitrosilação de Src quinase em células MDA-MB-231 estimuladas com LPS 1 μ g/mL

4.17. LPS promoveu a compartimentalização de Rac1 do citoplasma para a região perinuclear

Ao conduzirmos o experimento de microscopia confocal para a análise da localização de Rac1, assumimos que esta proteína estava localizada principalmente no citosol, o que se confirmou como mostrado na **Figura 34A** referente ao controle (75% de presença no citosol). Diante do estímulo com LPS, houve a compartimentalização de Rac1 para a região perinuclear de aproximadamente 90% das células (**Figura 34F**). O controle positivo experimental, representado por EGF 10 ng/mL, demonstrou a compartimentalização de Rac1 para a região perinuclear em 79% das células (**Figura 34D**).

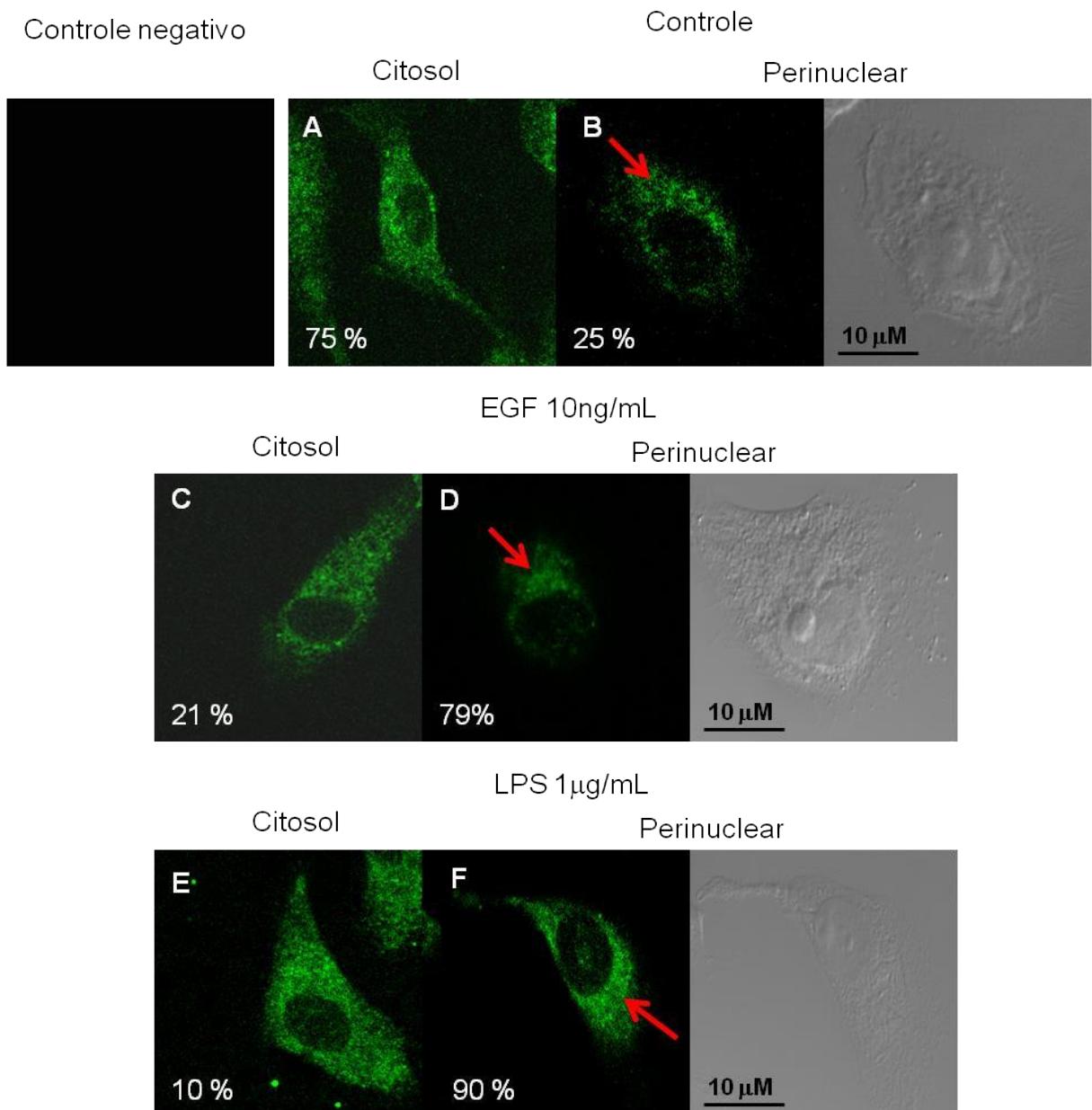


Figura 34. Ensaio de Microscopia confocal para as células MDA-MB-231 transfectadas com o biossensor de Rac1 ativa. A e B representam a localização de Rac1 nas células não estimuladas; C e D compartimentalização de Rac1 após estímulo com EGF e E e F Rac1 após estímulo com LPS 1 μ g/mL

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliamos os efeitos da utilização de uma fonte exógena de NO e uma fonte indutora da produção endógena de NO sobre a proliferação e migração das células da linhagem de tumor de mama triplo-negativo MDA-MB-231. Os resultados obtidos em nosso estudo utilizando como fonte exógena de NO, o s-nitrosotiol GSNO que é fisiologicamente relevante (J. S. Stamler e Meissner 2001), não evidenciaram efeitos sobre as vias de sinalização dependentes de Ras. Os ensaios conduzidos com a fonte exógena de NO, representada por GSNO 100 µM, estimularam a atividade de Ras com um perfil bifásico de ativação, representado pelo aumento após 2 minutos de estímulo, queda entre 5 e 15 minutos e novo aumento entre 30 e 60 minutos após o estímulo. Além disso, GSNO promoveu aumento na viabilidade celular, mas não alterou as taxas de migração celular. As células MDA-MB-231 apresentam uma produção basal relativamente alta de NO (**Figura 13**), e expressão elevada de iNOS (Somasundaram et al. 2016; Glynn et al. 2010; Heinecke et al. 2014; Basudhar et al. 2017), fatores que podem explicar a relativa ausência de resposta ao GSNO por parte destas células. Então, nos concentramos no estudo dos efeitos sobre estas vias de sinalização por fonte endógena de NO. Inicialmente, alguns trabalhos descreveram a ação do LPS sobre a expressão de iNOS e consequente aumento da produção de NO em macrófagos e celular musculares lisas (Knowles RG e Salvador M 1994). Heinecke e colaboradores (2014) induziram a expressão da iNOS em células MDA-MB-231 utilizando um mix de citocinas acrescido de LPS. Em nosso grupo de pesquisa, foram observados os mesmos efeitos do LPS em células musculares lisas vasculares de coelho (Barbosa de Oliveira et al. 2002). Também observamos estes efeitos em células tumorais de mama MCF-7 (Curcio et al., 2018 - resultados não publicados). Confirmamos em nosso estudo a capacidade do LPS, na concentração de 1 µg/mL, de induzir a produção endógena de NO por células MDA-MB-231 após 16 horas de estímulo. O LPS é ligante do receptor TLR4, um dos receptores mais estudados da família TLR (Rakoff-Nahoum e Medzhitov 2009; Murad 2014). Elevações nos níveis de expressão deste receptor estão correlacionadas diretamente a uma redução na sobrevivência de pacientes com câncer de mama triplo-negativo (Mehmeti et al. 2015). Níveis elevados de expressão do TLR4 estão associados à migração celular (J. Li et al. 2017) e ocorrência de metástase nestes tumores (X. Yang et al. 2018).

O LPS induziu a migração da MDA-MB-231 e a utilização de inibidores farmacológicos de Src, Ras, PLC γ e quelante de Ca $^{2+}$ (inibidores da via de sinalização celular associada a ativação e compartimentalização de Ras proposta por Bivona e colaboradores (vide **Figura 3**)), somada a utilização do inibidor de Rac1, bloqueou a migração mediada pelo LPS. Estes resultados evidenciaram a participação das proteínas Src, Ras, PLC γ e Rac1 na migração mediada pelo LPS. Além disso, confirmamos o envolvimento da iNOS neste eixo de sinalização celular, pois ao utilizarmos no nosso modelo experimental o derivado de L-arginina, L-NAME, inibidor geral das NOSs, com posterior estímulo por LPS, ocorreu uma redução da migração celular. Nessas circunstâncias, as evidências experimentais sugeriram que a redução da produção endógena de NO por L-NAME afetou negativamente a migração celular.

Em um estudo com células de câncer gástrico, o LPS induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir da NADPH oxidase citosólica e ações sobre a mitocôndria dessas células. Além disso, a utilização de LPS 10 μ g/mL provocou a proliferação das células tumorais gástricas com participação de TLR4 e NF- κ B (Yuan et al. 2013). Em outro trabalho desenvolvido com células tumorais de cólon, por O’Leary e colaboradores (2012), o LPS induziu a sinalização mediada por TLR4 e a expressão das enzimas Nox1 e Nox2, que foram responsáveis pelo aumento da produção de ERO. Estes autores também observaram que esta produção era dependente de NF- κ B na linhagem tumoral de cólon primária SW480. Em nossos estudos, verificamos que o LPS promoveu um aumento da viabilidade das células MDA-MB-231. Como o LPS é indutor da produção endógena de NO, e este radical livre pode interagir com as enzimas mitocondriais (Broniowska e Hogg 2012; Dranka, Hill, e Darley-Usmar 2010; Burwell et al. 2006; Diers et al. 2011), conduzimos o ensaio de contagem celular para examinar se as células realmente proliferaram após estímulo de LPS. Os resultados obtidos revelaram a ocorrência de uma tendência de aumento na proliferação celular (**Figura 15B**). Yuan e colaboradores (2013) observaram proliferação de células tumorais gástricas após sua estimulação com LPS 10 μ g/mL. O’Leary e colaboradores (2012) avaliaram que o aumento da produção de ERO induzidas por LPS era dependente da concentração utilizada no ensaio (concentrações de LPS 0,1; 1 e 10 μ g/mL). Em nosso modelo experimental utilizamos LPS 1 μ g/mL, por se tratar da concentração estabelecida em nossos estudos para determinarmos os níveis máximos de indução da produção endógena de NO pelas

células MDA-MB-231. Nosso objetivo era avaliar se o aumento da produção endógena de NO seria capaz de induzir a proliferação dessa linhagem tumoral de mama. Como o LPS pode ser um indutor da produção de ERO em células tumorais (Yuan et al. 2013; O’Leary et al. 2012), especulamos que nas nossas condições experimentais, o LPS possa estar induzindo a produção de ERO nas células MDA-MB-231.

A inibição da iNOS com L-NAME bloqueou o aumento da viabilidade promovido pelo LPS (**Figura 16A**). Este resultado demonstrou que o L-NAME inibiu efetivamente a produção endógena de NO por LPS. Apesar do mesmo perfil ter sido encontrado no ensaio de contagem, as diferenças entre a situação controle e a situação de estímulo com LPS não foram significativas (**Figura 16B**).

A inibição de Src com PP2 e posterior estímulo com LPS não mostrou alteração na viabilidade celular em comparação ao ponto experimental somente com LPS. Este resultado sugere que Src não participa da via de sinalização associada à viabilidade celular mediada por LPS (**Figura 18**).

Surpreendentemente, observamos o aumento da viabilidade celular nos pontos experimentais em que Ras foi inibida com seu inibidor farmacológico FPT II ou quando utilizou-se o sequestrador de NO cPTIO, previamente ao estímulo com LPS (**Figuras 17 e 19, respectivamente**). O mesmo perfil foi observado no ensaio de contagem, porém sem significância estatística.

O conhecimento de que a superatividade de Ras pode estar relacionada ao aumento da produção de ERO (L.-T. Yang et al. 2002; J. Q. Yang et al. 2002; Sundaresan et al. 1996), bem como o fato de estímulos com LPS poderem estar associados não somente ao aumento da produção de NO endógeno, mas igualmente à indução da produção de ERO (Yuan et al. 2013; O’Leary et al. 2012), nos levou a considerar a hipótese de que o aumento da viabilidade das células MDA-MB-231 pré-incubadas com o inibidor de Ras e, posteriormente estimuladas com LPS possa também estar relacionada à produção de ERO (**Figura 17**). O aumento da viabilidade celular nas células pré-incubadas com cPTIO que, posteriormente foram incubadas com LPS, é um indício que o balanço entre espécies reativas de nitrogênio (ERN) e ERO possa estar pendendo para as últimas (**Figura 19**).

Sundaresan e colaboradores (1996) mostraram que fibroblastos que expressavam mutantes ativos de Ras e Rac produziam níveis elevados de ERO, as quais estavam associadas ao aumento de proliferação dessas células. Outros estudos também mostraram que a super-expressão de Ras está correlacionada a elevação

dos níveis de ERO (Yang et al., 1999; Yang et al., 2002). GTPases pertencentes a subfamília de Ras, como H, N, K e E-Ras, por exemplo, possuem um *motif* denominado NKCD sensível a alterações no status redox intracelular (Ferro et al. 2011; J. Heo 2011). A regulação dos níveis de ERO mediada por Ras difere em diversos tipos celulares. Em fibroblastos de camundongo NIH3T3, por exemplo, Ras sinaliza através da PI3K e recruta Rac no processo, levando à regulação das NADPH oxidases (Noxs) (Cho et al. 2002). Em fibroblastos humanos, esta regulação parece envolver a mitocôndria (C. Lee et al. 1999). Alguns trabalhos sugerem que a ativação das Noxs pode induzir o aumento da produção de ERO mitocondrial e vice versa (Dikalov 2011). Desouki e colaboradores (2005) sugeriram que a mitocôndria controla a sinalização mediada por Nox1 e a perda de controle desta sinalização contribui para a tumorigênese em ovário e mama humanos. Y. Li e colaboradores (2017) analisaram a produção intracelular de ERO e ERN em células tumorais de mama, utilizando nanoeletrodos de carbono platinizados em microscopia eletroquímica e os dados obtidos sugeriram que há uma forte correlação entre a produção intracelular de ERO e ERN e a malignidade em células tumorais de mama MDA-MB-231. Estes autores verificaram que o ambiente oxidante observado está associado a uma produção elevada de NO e de outras ERN. As ERO também são produzidas nessa linhagem, mas em menor proporção que as ERN.

O silenciamento da GEF RasGRP1 e GAP CAPRI não proporcionou resultados conclusivos. Os siRNAs utilizados silenciaram RasGRP1 e CAPRI em 66% e 53%, respectivamente. Além disso, os siRNAs utilizados não abrangem todas as sequências de mRNA referentes às isoformas de RasGRP1 e CAPRI. A recomendação do fabricante é a aquisição do SMARTpool siRNA (Dharmacon, EUA), que possui uma maior abrangência de sequências de mRNA das proteínas que se quer silenciar e a eficiência é de aproximadamente 90% (Dharmacon, EUA). Não pudemos obter este produto devido ao alto custo. Possivelmente, a utilização do “SMARTpool siRNA” nos responderia com mais segurança o papel da RasGRP1 e CAPRI na migração celular. Futuros estudos baseados nessas proteínas seriam de grande valia, pois a inibição de Ras por FPT II nos levou a concluir que Ras é importante para a migração das células MDA-MB-231 e o silenciamento dessas proteínas reguladoras de ativação e desativação de Ras poderiam evidenciar a existência de um mecanismo mais seletivo da regulação de Ras.

Um outro objetivo deste trabalho era o estudo da compartmentalização de Ras na linhagem MDA-MB-231 mediante ativação por fontes endógena e exógena de NO. Conforme mencionado na Introdução deste trabalho, Bivona e colaboradores (2003) mostraram que H-Ras poderia estar localizada em endomembranas como o complexo de Golgi e também proporcionaram evidências para o papel biológico que Ras ativada exerce nesta organela. Os autores relataram que a proteína ativada no Golgi induziu a diferenciação de células neuronais PC12, transformou fibroblastos em células malignas e mediou a resistência à radiação em células epiteliais de intestino de ratos. Além disso, sinalização através do receptor de antígenos de célula-T, proteína chave no sistema imune, ativa Ras que esteja localizada somente no Golgi, embora a proteína também esteja presente na membrana plasmática. Em estudo realizado por nosso grupo, demonstrou-se que o NO medeia a ativação de Ras em dois compartimentos celulares e, consequentemente, regula diferentes vias de sinalização *downstream* em relação a Ras. Neste trabalho foi demonstrado que baixas concentrações de NO promovem a proliferação de células HeLa. Em células HeLa que superexpressam H-Ras^{WT} e transfetadas com uma sonda capaz de detectar a forma ativa de Ras (RBD-GFP - contém o domínio ligante de Ras de Raf-1) foi demonstrado que baixas concentrações de GSNO estimularam de forma rápida e transitória a redistribuição das formas ativas de Ras na membrana plasmática. Este processo foi seguido por um recrutamento tardio e sustentado de Ras no complexo de Golgi. A inibição de Src quinase impediu a proliferação das células e a ativação de H-Ras por GSNO no complexo de Golgi. Nesta condição a S-nitrosilação de H-Ras na Cys¹¹⁸ e a ativação de Src quinase são eventos espaço-temporalmente ligados à via de sinalização mediada por baixas concentrações de GSNO. A estimulação da produção endógena de NO por BK em células HUVEC evidenciou a sinalização de Ras somente na membrana plasmática (Batista et al., 2013).

Utilizamos a mesma estratégia para a avaliação da compartmentalização de Ras (Batista et al., 2013; Bivona et al., 2003) na linhagem MDA-MB-231, porém não observamos a sinalização compartmentalizada de Ras quando da utilização da fonte exógena (GSNO 100 µM-**Figura 12**) ou endógena de NO (LPS 1 µg/mL-**Figura 26**). A fluorescência verde avaliada nas imagens e indicada com setas vermelhas é referente a localização de H-Ras na região perinuclear. As setas amarelas indicam a localização do núcleo das células. A localização de H-Ras permaneceu inalterada desde o início da análise (tempo 0) antes dos estímulos até 30 minutos após os

estímulos. Esses resultados nos levaram a utilizar fontes de estímulo alternativas já estabelecidas na literatura, como o SFB e o fator de crescimento EGF para avaliar a compartimentalização de H-Ras (Chiu et al. 2002; Bivona et al. 2003). Novamente observamos a localização de H-Ras na região perinuclear inalterada antes e após os estímulos (**Figura 27** e **Figura 28**). Estas evidências nos levaram ao questionamento do funcionamento das sondas e, a fim de avaliá-las, co-transfectamos células HeLa que super-expressam H-Ras^{wt} com os plasmídeos anteriormente descritos (Batista et al. 2013) e verificamos que a H-Ras ativa compartimentalizou para a membrana plasmática após 5 minutos de estímulo com SFB 10% e, 30 minutos depois, compartimentalizou para a região perinuclear da célula (**Figura 29**). De forma semelhante, o EGF provocou a compartimentalização de H-Ras ativa inicialmente na membrana plasmática e mais tarde na região perinuclear (**Figura 30**). Concluímos assim, que os biossensores de Ras estavam funcionando adequadamente.

Bivona e colaboradores (2005), avaliaram a compartimentalização de Ras em linhagens celulares, como COS-1 ou HeLa, antes e após a estimulação com EGF. Neste trabalho, os autores argumentaram que a escolha do tipo celular a ser estudado e o estímulo utilizado são fatores muito importantes para a avaliação de compartimentalização de Ras em microscopia confocal. É necessário primeiramente avaliar se a linhagem escolhida é responsiva ao estímulo escolhido e se a morfologia celular favorece esse tipo de análise. Uma célula como a COS-1, por exemplo, apresenta um bom tamanho e espraiamento que facilita a visualização da membrana plasmática e endomembranas, como o retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Avaliamos estes fatores ao realizarmos a microscopia confocal, porém não obtivemos a compartimentalização de H-Ras na MDA-MB-231. Especulamos que esta metodologia não é adequada ou a H-Ras não é compartimentalizada para esta linhagem de tumor de mama. Todos esses empecilhos experimentais nos levaram a investigar a possibilidade de outra GTPase, denominada Rac1, estar participando desta via de sinalização celular associada à migração celular que conta com a participação de Ras. David e colaboradores (2005) descreveram a ativação de Ras mediada por LPS em macrófagos primários, enquanto Woo e Kim (2002) mostraram que Rac1 é ativada por LPS em células Rat2. No nosso estudo, a atividade de Ras era estimulada após incubação com LPS por um período que variou entre 2 e 30 minutos, com subsequente queda após 60 minutos. Por outro lado, o aumento da

atividade de Rac1 somente foi observado após 2 horas de estimulação. Esses resultados sugerem uma interação entre as duas GTPases na mesma via de sinalização e que Rac1 está localizada *downstream* em relação a Ras. Assim, baseados nestas premissas, incorporamos a participação de Rac1 em nosso modelo experimental.

Em estudo realizado pelo nosso grupo foi avaliado o efeito da bradicinina (BK) sobre células endoteliais de aorta de coelho (RAEC), onde observamos o aumento da produção endógena de NO. Neste trabalho propusemos que BK induz a eNOS a produzir NO endógeno que por sua vez nitrosilou Ras, ativou PI3K e Rac1. A ativação desta via estimulou a migração da RAEC, sendo a Rac1 fundamental para este processo (Eller-Borges et al. 2015).

A proteína Rac está localizada predominantemente no citosol das células (Bustelo et al. 2012), porém pode se deslocar para outros compartimentos celulares como o núcleo (Navarro-Lérida et al. 2015), nucléolo (Baker, Cooke, e Kazanietz 2017; Justilien et al. 2017) membrana plasmática (Eller-Borges et al. 2015) e região justanuclear, que abrange o complexo de Golgi, retículo endoplasmático e populações de vesículas (Kraynov et al. 2000).

O ensaio de microscopia confocal nos permitiu avaliar a localização de Rac1 antes e depois do estímulo com LPS. O Controle experimental, sem estimulação, mostrou que Rac1 estava localizado predominantemente no citosol das células (**Figura 34A**). Duas horas após a estimulação mediada por LPS, encontramos um predomínio de Rac1 na região perinuclear (**Figura 34F**) e o controle positivo experimental, representado pelo EGF, nos confirmou este resultado (**Figura 34D**). A predominância de Rac1 na região perinuclear sugere que esta compartmentalização está associada à migração das células MDA-MB-231 diante do estímulo com LPS 1 µg/mL. Diferentemente do que observamos, Eller-Borges e colaboradores (2015) obtiveram a compartmentalização de Rac1 do citoplasma para a membrana plasmática após 5 minutos de estímulo com BK, um indutor da produção endógena de NO em células RAEC. Refletindo sobre essa diferença de localização de Rac1, especulamos que diferentes indutores da produção endógena de NO (no caso, BK e LPS) proporcionam compartmentalização diferenciada em tipos celulares distintos (RAEC e MDA-MB-231). Kraynov e colaboradores (2000) avaliaram a dinâmica de ativação da Rac1 em fibroblastos Swiss 3T3 antes a após o estímulo com soro fetal bovino ou fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Para essa avaliação,

os pesquisadores usaram uma metodologia baseada em transferência de energia por ressonância fluorescente (FRET) que quantifica a localização e o tempo de ativação de Rac em células vivas através da interação entre dois biossensores: GFP-Rac e Alexa-PBD. Observaram que antes do estímulo a Rac1 estava localizada no núcleo e região justanuclear, e após 15 minutos do estímulo houve a formação de “ondulações” na periferia das células. Além disso, analisaram o papel da ativação de Rac1 na migração celular e as mudanças no citoesqueleto, e verificaram que durante o processo de migração havia uma maior ativação de Rac1 na região justanuclear e um maior gradiente de atividade de Rac próximo ao núcleo. Kraynov e colaboradores não identificaram a organela localizada na região justanuclear onde estaria ocorrendo a ativação. Estes resultados foram consistentes com outros dados da literatura que sugerem um importante papel de Rac1 do retículo endoplasmático para o transporte no Golgi e na reciclagem de vesículas pinocíticas celulares (Kjøller e Hall 1999). Este trabalho forneceu indícios que a estimulação de fibroblastos mediada por fatores de crescimento (SFB e PDGF) está relacionada à migração celular e ativação de Rac1 na região justanuclear. Nossos resultados mostraram um estímulo da compartimentalização de Rac1 na região perinuclear nas células MDA-MB-231 após estimulação com EGF ou LPS (**Figura 34**). Ademais, os estímulos citados estimularam a migração celular e que Rac1 está envolvida neste processo (**Figura 20**).

Santra e colaboradores (2019) avaliaram a sinalização de H-Ras compartimentalizada em células HeLa transfectadas permanentemente com HRasV12 ou com construções derivadas de HRasV12 para a observação de H-Ras em diferentes compartimentos. Estes compartimentos foram: o complexo de golgi (KDEL-H-RasV12), retículo endoplasmático (M1-H-RasV12), “*lipid rafts*” (LCK-H-RasV12) e membrana plasmática (CD8-H-RasV12). Para a análise da H-Ras ativa nestes compartimentos, foi acrescentado o domínio catalítico de CDC25 (GEF de H-Ras) às construções descritas, e na sequência, foram conduzidos ensaios de migração, apoptose, proliferação e análises proteômica, fosfoproteômica e transcriptoma. Nestas últimas análises, os pesquisadores desenvolveram uma metodologia denominada MiNETi. Com o uso desta metodologia, Santra e colaboradores reconstruíram, integraram e analisaram redes de interações entre proteínas (PPI - proteômica), quinase-substrato (KS - fosfoproteômica) e fatores de transcrição-DNA (transcriptoma). Entre os resultados que o grupo obteve, destacamos

que somente o H-RasV12-CDC25 selvagem e o M1-H-RasV12-CDC25, referente à localização no retículo endoplasmático, estimularam a migração celular eficientemente. A presença de H-Ras em outros compartimentos também teve alguma associação com a migração celular, porém em menor extensão. Este resultado sugeriu que a migração é provavelmente controlada pela H-Ras localizada no retículo endoplasmático. Ademais, observaram que alterações no ciclo celular e na via de sinalização de Rac/PAK estavam relacionadas a uma maior atividade de H-Ras no retículo endoplasmático e sugeriram a relação dessas GTPases com a migração celular.

Em suma, nossos dados evidenciaram que a indução da produção endógena de NO por LPS foi importante para a migração das células MDA-MB-231, onde Src, Ras, PLC γ , Ca $^{2+}$ e Rac1 estão envolvidos no processo. O LPS promoveu uma compartimentalização de Rac1 levando à uma distribuição da GTPase entre o citosol e a região perinuclear, com isso estimulando a migração celular. Por fim, observamos a nitrosilação de Src após a estimulação mediada por LPS e envolvimento da iNOS neste processo. A inibição da iNOS por L-NAME, previamente ao estímulo com LPS, impediu a nitrosilação de Src (**Figura 33**), evidenciando a importância do NO produzido endogenamente nesta via de sinalização. Conforme mencionado na **Introdução** deste trabalho, foi reportado que o NO ativa uma via de sinalização oncogênica em células da linhagem MDA-MB-231. Os eventos iniciais desta via são a ativação de EGFR e de Src quinase (mediante sua S-nitrosilação) (Switzer et al. 2012). Sendo assim, propomos que o NO derivado da estimulação endógena de iNOS mediada por LPS promoveu a s-nitrosilação de Src quinase nas células MDA-MB-231. Nesta condição, Src quinase promoveu a ativação de PLC γ , secreção de Ca $^{2+}$, ativação de Ras e Rac1 na região perinuclear. Esta cascata de sinalização está associada ao estímulo de migração das células MDA-MB-231 por fonte endógena de NO (**Figura 35**).

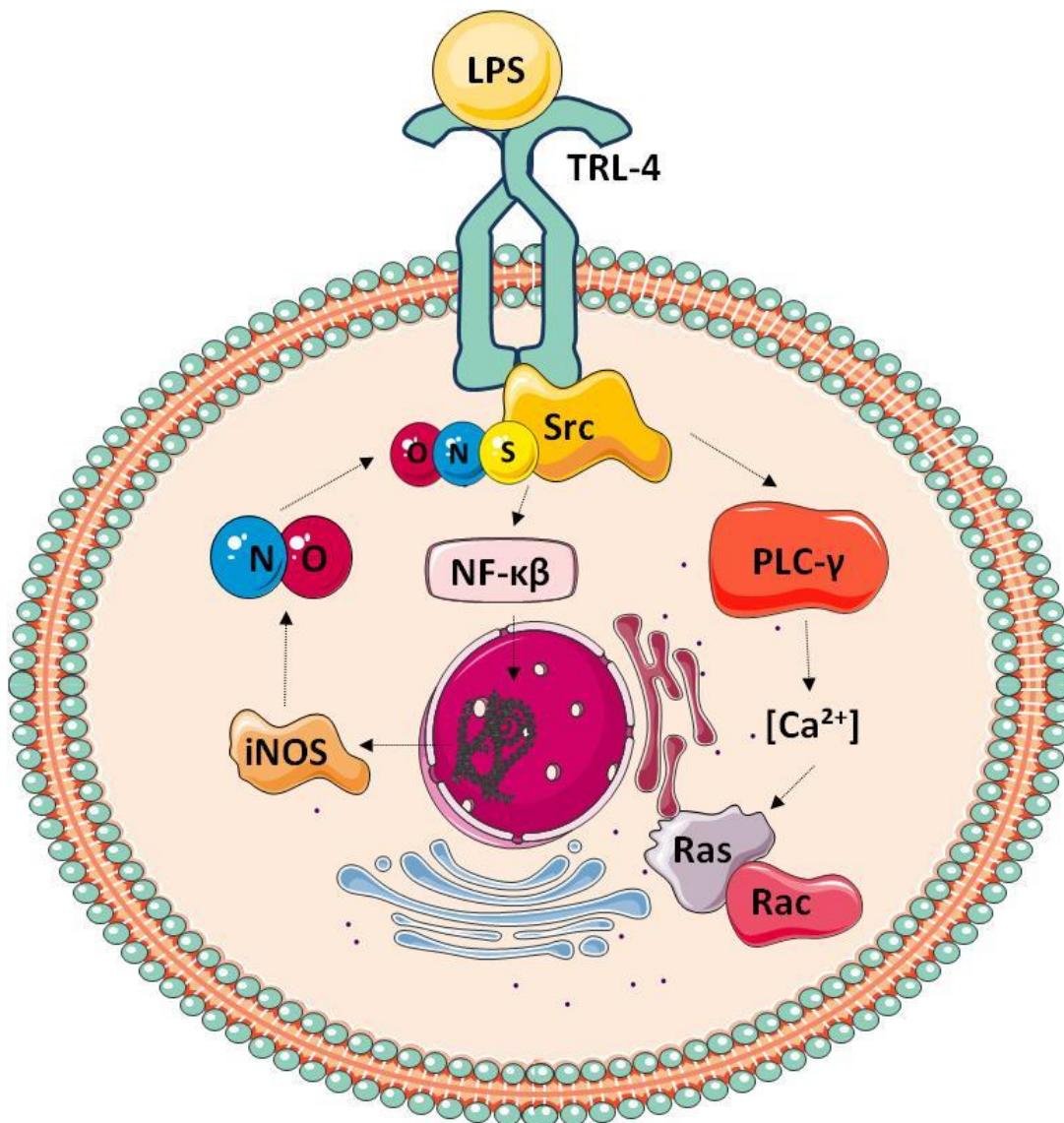


Figura 35. Esquema proposto da via de sinalização associada à migração das células MDA-MB-231 mediante o estímulo por LPS

Possivelmente, a proteína Ras residente no Complexo de Golgi deve interagir com a proteína Rac1 na região perinuclear, que para esta região se deslocou após o estímulo com LPS. Porém, esta hipótese somente poderia ser confirmada através de uma futura avaliação minuciosa da atividade da GEF RasGRP1, devido ao fato dela estar localizada no Complexo de Golgi e ser responsável pela ativação de Ras nesta organela (vide **Figura 3**).

6. CONCLUSÃO

Concluímos que as GTPases Ras e Rac1 estão envolvidas na migração das células MDA-MB-231 mediante a estimulação da produção endógena de NO por LPS com participação de Src, PLC γ e Ca $^{2+}$ nesta via de sinalização. A compartimentalização de Rac1 para a região perinuclear, após o estímulo das células com LPS, mostrou uma associação com a migração destas células. O NO produzido endogenamente teve um papel importante na S-nitrosilação de Src que desencadeiou a via de sinalização que culminou na ativação de Rac1. Por outro lado, a fonte exógena de NO não foi importante para a migração celular. Tanto a fonte exógena quanto endógena de NO estimularam a viabilidade celular, porém não modificaram significativamente as taxas de proliferação das células MDA-MB-231. A compartimentalização de H-Ras não foi observada após os estímulos com LPS, GSNO, SFB ou EGF. Diante desses resultados, sugerimos que a H-Ras possa residir na região perinuclear desta linhagem de tumor de mama humano e futuros estudos serão necessários para definir a localização exata desta GTPase nessas células. A avaliação aprofundada das GEFs e GAPs, proteínas que regulam a ativação e desativação de Ras, respectivamente, seria de grande valia para a confirmação da participação de Ras no processo de migração das células MDA-MB-231.

Ademais, os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram a participação do NO endógeno na ativação de Ras e Rac1 durante a migração das células MDA-MB-23, linhagem celular representativa de tumores de mama triplo-negativos. Estes tumores são bastante refratários aos tratamentos com os regimes quimioterápicos utilizados em outros subtipos de tumores de mama e o conhecimento agregado pelo desenvolvimento deste trabalho poderia resultar no desenvolvimento de inibidores farmacológicos da migração de células de tumores triplo-negativos, um dos primeiros indicativos do caráter invasivo dos tumores e consequentemente da sua capacidade de formar metástases.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aelst, Linda Van, e Crislyn D'Souza-Schorey. 1997. "Rho GTPases and signaling networks". *Genes and Development* 11 (18): 2295–2322. <https://doi.org/10.1101/gad.11.18.2295>.
- Ahearn, Ian M., Kevin Haigis, Dafna Bar-Sagi, e Mark R. Philips. 2012. "Regulating the regulator: Post-translational modification of RAS". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (1): 39–51. <https://doi.org/10.1038/nrm3255>.
- Ahearn, Ian, Mo Zhou, e Mark R. Philips. 2018. "Posttranslational Modifications of RAS Proteins". *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 8 (11): 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031484>.
- Amin, Mohammad Khusni B. Ahmat, Akio Shimizu, Dimitar P. Zankov, Akira Sato, Souichi Kurita, Masami Ito, Toshinaga Maeda, et al. 2018. "Epithelial membrane protein 1 promotes tumor metastasis by enhancing cell migration via copine-III and Rac1". *Oncogene* 37 (40): 5416–34. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0286-0>.
- Anglesio, Michael S., Valentina Evdokimova, Nataliya Melnyk, Liyong Zhang, Conrad V. Fernandez, Paul E. Grundy, Stephen Leach, et al. 2004. "Differential expression of a novel ankyrin containing E3 ubiquitin-protein ligase, Hace1, in sporadic Wilms' tumor versus normal kidney". *Human Molecular Genetics* 13 (18): 2061–74. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh215>.
- Apolloni, A, I A Prior, M Lindsay, R G Parton, e J F Hancock. 2000. "H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway." *Molecular and cellular biology* 20 (7): 2475–87. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.7.2475-2487.2000>. Updated.
- Avtandilyan, Nikolay, Hayarpi Javrushyan, Anna Karapetyan, e Armen Trchounian. 2019. "Inhibition of Tumor Progression by N G -Nitro-L-arginine Methyl Ester in 7 , 12-dimethylbenz (a) anthracene Induced Breast Cancer : Nitric Oxide Synthase Inhibition as an Antitumor Prevention". *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1–11.
- Baker, Martin J., Mariana Cooke, e Marcelo G. Kazanietz. 2017. "Nuclear PKC ι -ECT2-Rac1 and Ribosome Biogenesis: A Novel Axis in Lung Tumorigenesis". *Cancer Cell* 31 (2): 167–69. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.01.008>.
- Balasubramanian, Nagaraj, David W Scott, J David Castle, James E Casanova, e Martin Alexander Schwartz. 2007. "Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts". *Nat Cell Biol.* 9 (12): 1381–91. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_4938.

- Barbosa de Oliveira, L. C., C. J. Rocha Oliveira, D. M. Fries, A. Stern, e H. P. Monteiro. 2002. "Effects of lipopolysaccharide on low- and high-density cultured rabbit vascular smooth muscle cells: Differential modulation of nitric oxide release, ERK1/ERK2 MAP kinase activity, protein tyrosine phosphatase activity, and DNA synthesis". *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (2): 181–90.
- Basudhar, Debashree, Veena Somasundaram, Graciele Almeida de Oliveira, Aparna Kesarwala, Julie L. Heinecke, Robert Y. Cheng, Sharon A. Glynn, Stefan Ambs, David A. Wink, e Lisa A. Ridnour. 2017. *Nitric Oxide Synthase-2-Derived Nitric Oxide Drives Multiple Pathways of Breast Cancer Progression. Antioxidants & Redox Signaling*. Vol. 26. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6813>.
- Batista, Wagner L., Fernando T. Ogata, Marli F. Curcio, Rodrigo B. Miguel, Roberto J. Arai, Alisson L. Matsuo, Miriam S. Moraes, Arnold Stern, e Hugo P. Monteiro. 2013. "S - Nitrosoglutathione and Endothelial Nitric Oxide Synthase-Derived Nitric Oxide Regulate Compartmentalized Ras S -Nitrosylation and Stimulate Cell Proliferation". *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (3): 221–38. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4455>.
- Bivona, Trevor G, Ignacio P Castro, Ian M Ahearn, Theresa M Grana, Vi K Chiu, Peter J Lockyer, Peter J Cullen, Angel Pellicer, Adrienne D Cox, e Mark R Philips. 2003. "Phospholipase C γ activates Ras on the Golgi apparatus by means of RasGRP1". *Nature* 424 (August): 694–98. <https://doi.org/10.1038/nature01898>. Published.
- Bos. 1989. "ras Oncogenes in human cancer: A review". *Cancer Research* 49 (17): 4682–89. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed2&NEWS=N&AN=1989213649>.
- Broniowska, Katarzyna A., e Neil Hogg. 2012. "The Chemical Biology of S-Nitrosothiols". *Antioxidants & Redox Signaling* 17 (7): 969–80. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4590>.
- Burwell, Lindsay S., Sergiy M. Nadtochiy, Andrew J. Tompkins, Sara Young, e Paul S. Brookes. 2006. "Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I". *Biochemical Journal* 394 (3): 627–34. <https://doi.org/10.1042/bj20051435>.
- Bustelo, Xosé R., Virginia Ojeda, María Barreira, Vincent Sauzeau, e Antonio Castro-Castro. 2012. "Rac-ing to the plasma membrane". *Small GTPases* 3 (1): 60–66. <https://doi.org/10.4161/sgtp.19111>.
- Castillo-Lluva, S., C. T. Tan, M. Daugaard, P. H.B. Sorensen, e A. Malliri. 2012. "The tumour suppressor HACE1 controls cell migration by regulating Rac1 degradation". *Oncogene* 32 (13): 1735–42. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.189>.

- Chan, Amanda Y, Salvatore J Coniglio, Ya-yu Chuang, David Michaelson, Ulla G Knaus, Mark R Philips, e Marc Symons. 2005. "Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion". *Oncogene* 24 (53): 7821–29. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208909>.
- Cheng, C.-M., H. Li, S. Gasman, J. Huang, R. Schiff, e E. C. Chang. 2011. "Compartmentalized Ras Proteins Transform NIH 3T3 Cells with Different Efficiencies". *Molecular and Cellular Biology* 31 (5): 983–97. <https://doi.org/10.1128/mcb.00137-10>.
- Chiarugi, V, L Magnelli, e O Gallo. 1998. "Cox-2, iNOS and p53 are markers of angiogenesis". *International Journal of Molecular Medicine* 2 (6): 715.
- Chiu, Vi K., Trevor Bivona, Angela Hach, J. Bernard Sajous, Joseph Silletti, Heidi Wiener, Ronald L. Johnson, Adrienne D. Cox, e Mark R. Philips. 2002. "Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi". *Nature Cell Biology* 4 (5): 343–50. <https://doi.org/10.1038/ncb783>.
- Cho, Hyun Ju, Hye Gwang Jeong, Jung Sup Lee, Eun Rhan Woo, Jin Won Hyun, Myung Hee Chung, e Ho Jin You. 2002. "Oncogenic H-ras enhances DNA repair through the Ras/phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1 pathway in NIH3T3 cells. Evidence for association with reactive oxygen species". *Journal of Biological Chemistry* 277 (22): 19358–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200933200>.
- Choy, Edwin, Vi K. Chiu, Joseph Silletti, Marianna Feoktistov, Takashi Morimoto, David Michaelson, Ivan E. Ivanov, e Mark R. Philips. 1999. "Endomembrane trafficking of ras: The CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi". *Cell* 98 (1): 69–80. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80607-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80607-8).
- Clark, Geoffrey J., e Channing J. Der. 1995. "Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer". *Breast Cancer Research and Treatment* 35 (1): 133–44. <https://doi.org/10.1007/BF00694753>.
- Clarke, S. 1992. "Protein Isoprenylation and Methylation at Carboxy-Terminal Cysteine Residues". *Annual Review of Biochemistry* 61 (1): 355–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.61.1.355>.
- Corrêa, Paula Brito, Maria Bethânia Pereira Toralles, Kiyoko Abe-Sandes, Taisa Manuela Bonfim Machado, Thaís Ferreira Bonfim, Lorena Meyer, Camila Abe-Sandes, e Ivana Nascimento. 2010. "Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana". *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 9 (1): 3. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v9i1.4631>.

- Cox, Adrienne D., e Channing J. Der. 2003. "The dark side of Ras: Regulation of apoptosis". *Oncogene* 22 (56 REV. ISS. 8): 8999–9006. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207111>.
- Daugaard, Mads, Roberto Nitsch, Babak Razaghi, Lindsay McDonald, Ameer Jarrar, Stéphanie Torrino, Sonia Castillo-Lluva, et al. 2013. "Hace1 controls ROS generation of vertebrate Rac1-dependent NADPH oxidase complexes". *Nature Communications* 4: 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms3180>.
- David, M. D., C. L. Cochrane, S. K. Duncan, e J. W. Schrader. 2005. "Pure Lipopolysaccharide or Synthetic Lipid A Induces Activation of p21Ras in Primary Macrophages through a Pathway Dependent on Src Family Kinases and PI3K". *The Journal of Immunology* 175 (12): 8236–41. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8236>.
- Denkert, Carsten, Cornelia Liedtke, Andrew Tutt, e Gunter von Minckwitz. 2017. "Molecular alterations in triple-negative breast cancer—the road to new treatment strategies". *The Lancet* 389 (10087): 2430–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32454-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32454-0).
- Deora, A. A., D. P. Hajjar, e H. M. Lander. 2000. "Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated ras". *Biochemistry* 39 (32): 9901–8. <https://doi.org/10.1021/bi992954b>.
- Desouki, Mohamed Mokhtar, Mariola Kulawiec, Sanjay Bansal, Gokul Das, e Keshav K. Singh. 2005. "Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors". *Cancer Biology and Therapy* 4 (12): 1367–73. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.12.2233>.
- Diers, Anne R., Katarzyna A. Broniowska, Victor M. Darley-Usmar, e Neil Hogg. 2011. "Differential regulation of metabolism by nitric oxide and S -nitrosothiols in endothelial cells ". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 301 (3): H803–12. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00210.2011>.
- Dikalov, Sergey. 2011. "Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases". *Free Radical Biology and Medicine* 51 (7): 1289–1301. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033>.
- Dranka, Brian P, Bradford G Hill, e Victor M Darley-Usmar. 2010. "Mitochondrial reserve capacity in endothelial cells: the impact of nitric oxide and reactive oxygen species" 48 (7): 905–14. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.015>. Mitochondrial.
- Eckert, Lynn B., Gretchen A. Repasky, Aylin S. Ülkü, Aidan McFall, Hong Zhou, Carolyn I. Sartor, e Channing J. Der. 2004. "Involvement of ras activation in human breast cancer

- cell signaling, invasion, and anoikis". *Cancer Research* 64 (13): 4585–92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0396>.
- Eller-Borges, Roberta, Wagner L. Batista, Paulo E. Da Costa, Rita Tokikawa, Marli F. Curcio, Scheilla T. Strumillo, Adriano Sartori, et al. 2015. "Ras, Rac1, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling in nitric oxide induced endothelial cell migration". *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 47: 40–51. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.03.004>.
- Evangelista, Alicia M., Mark J. Kohr, e Elizabeth Murphy. 2013. "S -Nitrosylation: Specificity, Occupancy, and Interaction with Other Post-Translational Modifications". *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (11): 1209–19. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5056>.
- Feig, Larry A., e Rachel J. Buchsbaum. 2002. "Cell signaling: Life or death decisions of Ras proteins". *Current Biology* 12 (7): 259–61. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00787-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00787-X).
- Ferro, Elisa, Luca Goitre, Saverio Francesco Retta, e Lorenza Trabalzini. 2011. "The Interplay between ROS and Ras GTPases: Physiological and Pathological Implications". *Journal of Signal Transduction* 2012: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/365769>.
- Forrester, Michael T., Matthew W. Foster, Moran Benhar, e Jonathan S. Stamler. 2009. "Detection of protein S-nitrosylation with the biotin-switch technique". *Free Radical Biology and Medicine* 46 (2): 119–26. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.034>.
- Fukumura, Dai, Satoshi Kashiwagi, e Rakesh K. Jain. 2006. "The role of nitric oxide in tumour progression". *Nature Reviews Cancer* 6 (7): 521–34. <https://doi.org/10.1038/nrc1910>.
- Glynn, Sharon A., Brenda J. Boersma, Tiffany H. Dorsey, Ming Yi, Harris G. Yfantis, Lisa A. Ridnour, Damali N. Martin, et al. 2010. "Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients". *Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 3843–54. <https://doi.org/10.1172/jci42059>.
- Goka, E. T., e M. E. Lippman. 2015. "Loss of the E3 ubiquitin ligase HACE1 results in enhanced Rac1 signaling contributing to breast cancer progression". *Oncogene* 34 (42): 5395–5405. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.468>.
- Guerrab, Abderrahim El, Mahchid Bamdad, Fabrice Kwiatkowski, Yves-Jean Bignon, Frédérique Penault-Llorca, e Corinne Aubel. 2016. "Anti-EGFR monoclonal antibodies and EGFR tyrosine kinase inhibitors as combination therapy for triple-negative breast cancer". *Oncotarget* 7 (45): 73618–37.

- Hancock, John F. 2003. "Ras proteins: Different signals from different locations". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (5): 373–84. <https://doi.org/10.1038/nrm1105>.
- Heinecke, J. L., L. A. Ridnour, R. Y. S. Cheng, C. H. Switzer, M. M. Lizardo, C. Khanna, S. A. Glynn, et al. 2014. "Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (17): 6323–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401799111>.
- Heo, Jongyun. 2011. "Redox Control of GTPases: From Molecular Mechanisms to Functional Significance in Health and Disease". *Antioxidants & Redox Signaling* 14 (4): 689–724. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2984>.
- Heo, Jongyun, Kirk C. Prutzman, Viorel Mocanu, e Sharon L. Campbell. 2005. "Mechanism of free radical nitric oxide-mediated Ras guanine nucleotide dissociation". *Journal of Molecular Biology* 346 (5): 1423–40. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.050>.
- Heo, K. S., S. J. Lee, J. H. Ko, K. Lim, e K. T. Lim. 2004. "Glycoprotein isolated from Solanum nigrum L. inhibits the DNA-binding activities of NF-κB and AP-1, and increases the production of nitric oxide in TPA-stimulated MCF-7 cells". *Toxicology in Vitro* 18 (6): 755–63. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.03.003>.
- INCA. 2018. *Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019*. Inca. Vol. 1. <https://doi.org/978-85-7318-194-4>.
- Innocenti, Metello, Pierluigi Tenca, Emanuela Frittoli, Mario Fareta, Arianna Tocchetti, Pier Paolo Di Fiore, e Giorgio Scita. 2002. "Mechanisms through which Sos-1 coordinates the activation of Ras and Rac". *Journal of Cell Biology* 156 (1): 125–36. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108035>.
- Jhan, Jing Ru, e Eran R. Andrechek. 2017. "Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy". *Pharmacogenomics* 18 (17): 1595–1609. <https://doi.org/10.2217/pgs-2017-0117>.
- Jones, Michael K., Kouji Tsugawa, Andrzej S. Tarnawski, e Dolgor Baatar. 2004. "Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: Possible roles of PKC, ERK, and AP-1". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318 (2): 520–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.04.055>.
- Justilien, Verline, Syed A. Ali, Lee Jamieson, Ning Yin, Adrienne D. Cox, Channing J. Der, Nicole R. Murray, e Alan P. Fields. 2017. "Ect2-dependent rRNA synthesis is required for KRAS/TP53-driven lung adenocarcinoma". *Cancer Cell* 31 (2): 256–69. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000305.Improved>.

- Keshet, Rom, e Ayelet Erez. 2018. "Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer". *Disease Models & Mechanisms* 11 (8): dmm033332. <https://doi.org/10.1242/dmm.033332>.
- Khosravi-Shahi, Parham, Luis Cabezón-Gutiérrez, e Sara Custodio-Cabello. 2018. "Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies". *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 14 (1): 32–39. <https://doi.org/10.1111/ajco.12748>.
- Kjøller, Lars, e Alan Hall. 1999. "Signaling to Rho GTPases". *Experimental Cell Research* 253 (1): 166–79. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4674>.
- Kleinert, Hartmut, Andrea Pautz, Katrin Linker, e Petra M Schwarz. 2004. "Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase". *Nitric Oxide* 500: 255–66. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373866-0.00007-1>.
- Knowles RG, e Salvador M. 1994. "Nitric oxide synthases in mammals." *The Biochemical journal* 298: 249–58. <https://doi.org/10.1042/bj2980249>.
- Koh, Min Soo, e Aree Moon. 2011. "Activation of H-Ras and Rac1 correlates with epidermal growth factor-induced invasion in Hs578T and MDA-MB-231 breast carcinoma cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 406 (1): 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.092>.
- Kraynov, Vadim S., Chester Chamberlain, Gary M. Bokoch, Martin A. Schwartz, Sarah Slabaugh, e Klaus M. Hahn. 2000. "Localized Rac Activation Dynamics Visualized in Living Cells". *Science* 290: 333–37. <https://doi.org/10.1126/science.290.5490.333>.
- Lala, Peeyush K., e Chandan Chakraborty. 2001. "Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression". *Lancet Oncology* 2 (3): 149–56. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(00\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(00)00256-4).
- Lander, Harry M., David P. Hajjar, Barbara L. Hempstead, Urooj A. Mirza, Brian T. Chait, Sharon Campbell, e Lawrence A. Quilliam. 1997. "A Molecular Redox Switch on p21 ras". *Journal of Biological Chemistry* 272 (7): 4323–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.7.4323>.
- Lander, Harry M., Jason S. Ogiste, S. Frieda A. Pearce, Roberto Levi, e Abraham Novogrodsky. 1995. "Nitric Oxide-stimulated Guanine Nucleotide Exchange on p21 ras". *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7017–20. doi: 10.1074/jbc.270.13.7017.
- Lau, Ying Tung, e Wei Ching Ma. 1996. "Nitric oxide inhibits migration of cultured endothelial cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 221 (3): 670–74.

- [https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0654.](https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0654)
- Lechner, Matthias, Philipp Lirk, e Josef Rieder. 2005. "Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: The two sides of the same coin". *Seminars in Cancer Biology* 15 (4): 277–89. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2005.04.004>.
- Lee, CA, BE Fenster, H Ito, K Takeda, NS Bae, T Hirai, ZX Yu, VJ Ferrans, BH Howard, e T Finkel. 1999. "Ras Proteins Induce Senescence by Altering the Intracellular Levels of Reactive Oxygen Species". *Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 7936–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7936>.
- Lee, Kyung Hun, Minsoo Koh, e Aree Moon. 2016. "Farnesyl transferase inhibitor FTI-277 inhibits breast cell invasion and migration by blocking H-Ras activation". *Oncology Letters* 12 (3): 2222–26. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4837>.
- Lee, Martin, e Jonathan C. Choy. 2013. "Positive feedback regulation of human inducible nitric-oxide synthase expression by Ras protein S-nitrosylation". *Journal of Biological Chemistry* 288 (22): 15677–86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.475319>.
- Li, Jing, Fan Yang, Feng Wei, e Xiubao Ren. 2017. "The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment". *Oncotarget* 8 (39): 66656–67. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19105>.
- Li, Yun, Keke Hu, Yun Yu, Susan A. Rotenberg, Christian Amatore, e Michael V. Mirkin. 2017. "Direct Electrochemical Measurements of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Nontransformed and Metastatic Human Breast Cells". *Journal of the American Chemical Society* 139 (37): 13055–62. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06476>.
- Macaluso, M, G Russo, C Cinti, V Bazan, N Gebbia, e A Russo. 2002. "Ras Family Genes : An Interesting Link Between Cell Cycle and Cancer" 130 (December 2001): 125–30. <https://doi.org/10.1002/jcp.10109>.
- Mehmeti, Meliha, Roni Allaoui, Caroline Bergenfelz, Lao H. Saal, Stephen P. Ethier, Martin E. Johansson, Karin Jirström, e Karin Leandersson. 2015. "Expression of functional toll like receptor 4 in estrogen receptor/progesterone receptor-negative breast cancer". *Breast Cancer Research* 17 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0640-x>.
- Monteiro, Hugo P, Paulo E Costa, Adriana K. C. A. Reis, e Arnold Stern. 2015. "Nitric oxide: Protein tyrosine phosphorylation and protein S-nitrosylation in cancer". *Biomedical Journal* 38 (5): 380. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.158624>.
- Moraes, Miriam S, Paulo E Costa, Wagner L Batista, Taysa Paschoalin, Marli F Curcio, Roberta E Borges, Murched O Taha, Fábio V Fonseca, Arnold Stern, e Hugo P

- Monteiro. 2014. "Endothelium-derived nitric oxide (NO) activates the NO-epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathway in bradykinin- stimulated angiogenesis". *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 558: 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.011>.
- Murad, Sheeba. 2014. "Toll-Like Receptor 4 in Inflammation and Angiogenesis: A Double-Edged Sword". *Frontiers in Immunology* 5 (July): 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00313>.
- Navarro-Lérida, Inmaculada, Teijo Pellinen, Susana A. Sanchez, Marta C. Guadamillas, Yinhai Wang, Tuomas Mirtti, Enrique Calvo, e Miguel A. DelPozo. 2015. "Rac1 nucleocytoplasmic shuttling drives nuclear shape changes and tumor invasion". *Developmental Cell* 32 (3): 318–34. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.019>.
- O'Leary, D. Peter, Lavinia Bhatt, John F. Woolley, David R. Gough, Jiang H. Wang, Thomas G. Cotter, e H. Paul Redmond. 2012. "TLR-4 Signalling Accelerates Colon Cancer Cell Adhesion via NF-κB Mediated Transcriptional Up-Regulation of Nox-1". *PLoS ONE* 7 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044176>.
- Oliveira, Carlos J.R., Fernanda Schindler, Armando M. Ventura, Miriam S. Morais, Roberto J. Arai, Victor Debbas, Arnold Stern, e Hugo P. Monteiro. 2003. "Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells". *Free Radical Biology and Medicine* 35 (4): 381–96. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00311-3).
- Oliveira, Carlos Jorge R., Marli F. Curcio, Miriam S. Moraes, Maristela Tsujita, Luiz R. Travassos, Arnold Stern, e Hugo P. Monteiro. 2008. "The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells". *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* 18 (4): 241–55. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2008.02.001>.
- Olson, Michael F. 2018. "Rho GTPases, their post-translational modifications, disease-associated mutations and pharmacological inhibitors". *Small GTPases* 9 (3): 203–15. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1218407>.
- Overmeyer, Jean H, e William A Maltese. 2011. "Department of Biochemistry and Cancer Biology, University of Toledo College of Medicine, Toledo, Ohio 43614", n° 12: 1693–1713.
- Pai, Sung Yun, Chaekyun Kim, e David A. Williams. 2010. "Rac GTPases in human diseases". *Disease Markers* 29 (3–4): 177–87. <https://doi.org/10.3233/DMA-2010-0738>.

- Palamidessi, Andrea, Emanuela Frittoli, Massimiliano Garré, Mario Fareta, Marina Mione, Ilaria Testa, Alberto Diaspro, Letizia Lanzetti, Giorgio Scita, e Pier Paolo Di Fiore. 2008. "Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration". *Cell* 134 (1): 135–47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.034>.
- Pervin, Shehla, Rajan Singh, Esteves Hernandez, Guoyao Wu, e Gautam Chaudhuri. 2007. "Nitric oxide in physiologic concentrations targets the translational machinery to increase the proliferation of human breast cancer cells: Involvement of mammalian target of rapamycin/eIF4E pathway". *Cancer Research* 67 (1): 289–99. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4623>.
- Prueitt, Robyn L., Brenda J. Boersma, Tiffany M. Howe, Julie E. Goodman, Douglas D. Thomas, Lei Ying, Candice M. Pfeifer, et al. 2007. "Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer". *International Journal of Cancer* 120 (4): 796–805. <https://doi.org/10.1002/ijc.22336>.
- Rakoff-Nahoum, Seth, e Ruslan Medzhitov. 2009. "Toll-like receptors and cancer". *Nature Reviews Cancer* 9 (January): 57–63.
- Ridnour, L. A., J. S. Isenberg, M. G. Espey, D. D. Thomas, D. D. Roberts, e D. A. Wink. 2005. "Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (37): 13147–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502979102>.
- Sahoo, Rupam, Tanmay Dutta, Amlan Das, Sougata Sinha Ray, Rajib Sengupta, e Sanjay Ghosh. 2006. "Effect of nitrosative stress on Schizosaccharomyces pombe: Inactivation of glutathione reductase by peroxynitrite". *Free Radical Biology and Medicine* 40 (4): 625–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.029>.
- Shao, Jinyi, Hongmiao Sheng, Raymond N Dubois, e R Daniel Beauchamp. 2000. "Oncogenic Ras-mediated Cell Growth Arrest and Apoptosis are Associated with Increased Ubiquitin-dependent Cyclin D1 Degradation *" 275 (30): 22916–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002235200>.
- Shapiro, Paul. 2001. "Ras-MAP Kinase Signaling Pathways and Control of Cell Proliferation : Relevance to Cancer Therapy" 39: 285–330.
- Shields, Janiel M, Kevin Pruitt, Amy Shaub, e Channing J Der. 2000. "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'". *Cell* 8924 (00): 147–54.
- Somasundaram, Veena, Sharon A. Glynn, Stefan Ambs, Julie L. Heinecke, Graciele Almeida de Oliveira, Lisa A. Ridnour, Robert Y. Cheng, David A. Wink, Aparna Kesarwala, e

- Debashree Basudhar. 2016. "Nitric Oxide Synthase-2-Derived Nitric Oxide Drives Multiple Pathways of Breast Cancer Progression". *Antioxidants & Redox Signaling* 26 (18): 1044–58. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6813>.
- Stamler, J S, e G Meissner. 2001. "Physiology of nitric oxide in skeletal muscle." *Physiological reviews* 81 (1): 209–37. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.209>.
- Stamler, JS, S Lamas, e FC Fang. 2001. "Nitrosylation: The Prototypic Redox-Based Signaling Mechanism". *Cell* 106: 675–83.
- Sundaresan, M, Z X Yu, V J Ferrans, D J Sulciner, J S Gutkind, K Irani, P J Goldschmidt-Clermont, e T Finkel. 1996. "Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1." *The Biochemical journal* 318 (Pt 2): 379–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809022> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1217632/>
- Switzer, C. H., S. A. Glynn, R. Y.- S. Cheng, L. A. Ridnour, J. E. Green, S. Ambs, e D. A. Wink. 2012. "S-Nitrosylation of EGFR and Src Activates an Oncogenic Signaling Network in Human Basal-Like Breast Cancer". *Molecular Cancer Research* 10 (9): 1203–15. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-12-0124>.
- Tian, Yihao, Liu Xu, Yanqi He, Xiaolong Xu, Kai Li, Yanbin Ma, Yang Gao, Defei Wei, e Lei Wei. 2018. "Knockdown of RAC1 and VASP gene expression inhibits breast cancer cell migration". *Oncology Letters* 16 (2): 2151–60. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8930>.
- Torrino, Stéphanie, Orane Visvikis, Anne Doye, Laurent Boyer, Caroline Stefani, Patrick Munro, Jacques Bertoglio, Gérard Gacon, Amel Mettouchi, e Emmanuel Lemichez. 2011. "The E3 ubiquitin-ligase HACE1 catalyzes the ubiquitylation of active Rac1". *Developmental Cell* 21 (5): 959–65. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.015>.
- Vojtek, Anne B., e Channing J. Der. 1998. "Increasing complexity of the Ras signaling pathway". *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 19925–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.19925>.
- Wang, Xiaowei, Athanasis Spandidos, Huajun Wang, e Brian Seed. 2012. "PrimerBank: A PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update". *Nucleic Acids Research* 40 (D1): 1144–49. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1013>.
- Wink, D. A., Y. Vodovotz, J. Laval, F. Laval, M. W. Dewhirst, e J. B. Mitchell. 1998. "The multifaceted roles of nitric oxide in cancer". *Carcinogenesis* 19 (5): 711–21. <https://doi.org/10.1093/carcin/19.5.711>.
- Woo, Chang-hoon, e Jae-hong Kim. 2002. "M olecules Rac GTPase Activity Is Essential for

Lipopolsaccharide p38 MAP Kinase Activation in Rat-2 Fibroblasts" 13 (3): 470–75.

Yang, Ji Qin, Garry R. Buettner, Frederick E. Domann, Qiang Li, John F. Engelhardt, Christine Darby Weydert, e Larry W. Oberley. 2002. "v-Ha-ras mitogenic signaling through superoxide and derived reactive oxygen species". *Molecular Carcinogenesis* 33 (4): 206–18. <https://doi.org/10.1002/mc.10037>.

Yang, Liang-Tung, Piera Aiello, Marco Greco, Jan Sap, Roberto Agresti, Elda Tagliabue, Sylvie Ménard, e Elena Ardini. 2002. "Expression of protein tyrosine phosphatase alpha (RPTP α) in human breast cancer correlates with low tumor grade and inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo". *Oncogene* 19 (43): 4979–87.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203869>.

Yang, Xiao, Gan Tao Chen, Yan Qing Wang, Shu Xian, Li Zhang, Shao Ming Zhu, Feng Pan, e Yan Xiang Cheng. 2018. "TLR4 promotes the expression of HIF-1 α by triggering reactive oxygen species in cervical cancer cells in vitro-implications for therapeutic intervention". *Molecular Medicine Reports* 17 (2): 2229–38.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8108>.

Yuan, X., Y. Zhou, W. Wang, J. Li, G. Xie, Y. Zhao, D. Xu, e L. Shen. 2013. "Activation of TLR4 signaling promotes gastric cancer progression by inducing mitochondrial ROS production". *Cell Death and Disease* 4 (9). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.334>;

Zhang, Liyong, Michael S. Anglesio, Maureen O'Sullivan, Fan Zhang, Ge Yang, Renu Sarao, Mai P. Nghiem, et al. 2007. "The E3 ligase HACE1 is a critical chromosome 6q21 tumor suppressor involved in multiple cancers". *Nature Medicine* 13 (9): 1060–69.
<https://doi.org/10.1038/nm1621>.

Zohn, Irene M, Sharon L Campbell, Roya Khosravi-Far, Kent L Rossman, e Channing J Der. 2002. "Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested". *Oncogene* 17 (11): 1415–38. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202181>.

8. ANEXO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

COMITÉ DE ÉTICA EN PESQUISA



São Paulo, 15 de julho de 2019
CEP N 8283170216

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a): Scheilla Teixeira Strumillo
Depto/Disc: Bioquímica
Hugo Pequeno Monteiro (orientador)

Título do projeto: "Estudo da compartimentalização de Ras em células da linhagem de tumores humanos de mama MDA-MB-231 mediante ativação por fontes endógenas e exógenas de óxido nítrico (NO)".

Parecer Consustanciado do Comitê de Ética em Pesquisa UNIFESP/HSP

Os primeiros estudos sobre a compartimentalização de Ras demonstraram que essa proteína participava dos processos de sinalização celular exclusivamente a partir da membrana plasmática. O desenvolvimento de sondas fluorescentes permitiu evidenciar, em células vivas, o momento e o compartimento intracelular em que a proteína Ras estava ativada. Ficou demonstrado que essa compartimentalização de Ras estava associada à ocorrência de diferentes vias de sinalização. Outros estudos aprofundaram este entendimento e sugeriram que a ativação de Ras ancorada nas endomembranas constituintes do complexo de Golgi, estaria associada à transformação celular.

O uso de doadores de óxido nítrico (NO) em linhagens celulares evidenciou a ativação e compartimentalização de Ras, observadas na membrana plasmática e no complexo de Golgi.

Com esse projeto pretendemos: (1) Investigar o processo de compartimentalização de Ras em linhagens celulares de mama normal (MCF10A) e tumoral (MDA-MB-231) estimuladas por doadores de NO ou pela produção endógena deste radical através da indução da expressão da óxido nítrico sintase (iNOS) nestas linhagens. (2) Estabelecer uma relação entre os processos de sinalização associados a compartimentalização de Ras estimulada pelo NO e a capacidade de migração e invasão determinadas para as células da linhagem tumoral de mama.

Esta investigação será conduzida utilizando-se transfecção de sondas fluorescentes distintas que possibilitarão a detecção das formas ativadas de Ras em diferentes compartimentos celulares nas linhagens MCF10A e MDA-MB-231. A compartimentalização de Ras será avaliada por microscopia confocal após estímulo com fontes endógenas e exógenas de NO. Além disso, será avaliada a relação da proteína Ras compartimentalizada e ativada por NO com a capacidade de migração, invasão e de proliferação na ausência de ancoragem de células da linhagem MDA-MB-231, através de ensaios apropriados.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo, na reunião de 04/03/2016, ANALISOU e APROVOU o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente ao CEP até a conclusão do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Miguel Roberto Jorge

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ras, Rac1, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) signaling in nitric oxide induced endothelial cell migration



Roberta Eller-Borges ^a, Wagner L. Batista ^b, Paulo E. da Costa ^a, Rita Tokikawa ^a, Marli F. Curcio ^a, Scheilla T. Strumillo ^a, Adriano Sartori ^a, Miriam S. Moraes ^a, Graciele A. de Oliveira ^a, Murched O. Taha ^c, Fábio V. Fonseca ^d, Arnold Stern ^{e,f,*}, Hugo P. Monteiro ^{a,**}

^a Department of Biochemistry, Center for Cellular and Molecular Therapy-CTCMOL, Escola Paulista de Medicina /Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

^b Department of Biological Sciences, Universidade Federal de São Paulo/Campus Diadema, SP, Brazil

^c Department of Surgery, Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

^d Department of Medicine, Institute for Transformative Molecular Medicine, Case Western University, Cleveland, OH, USA

^e Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology, New York University School of Medicine, New York, NY, USA

^f Escuela de Medicina, Universidad Espíritu Santo, Guayaquil, Ecuador

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2014

Revised 13 March 2015

Accepted 18 March 2015

Available online 24 March 2015

Keywords:

Nitric oxide

S-nitrosylation

Bradykinin

Ras

Phosphatidyl-inositol-3-kinase

Rac1

Endothelial cell migration

ABSTRACT

The small GTP-binding proteins Ras and Rac1 are molecular switches exchanging GDP for GTP and converting external signals in response to a variety of stimuli. Ras and Rac1 play an important role in cell proliferation, cell differentiation, and cell migration. Rac1 is directly involved in the reorganization and changes in the cytoskeleton during cell motility. Nitric oxide (NO) stimulates the Ras – ERK1/2 MAP kinases signaling pathway and is involved in the interaction between Ras and the phosphatidyl-inositol-3 Kinase (PI3K) signaling pathway and cell migration. This study utilizes bradykinin (BK), which promotes endogenous production of NO, in an investigation of the role of NO in the activation of Rac1 in rabbit aortic endothelial cells (RAEC). NO-derived from BK stimulation of RAEC and incubation of the cells with the s-nitrosothiol S-nitrosoglutathione (GSNO) activated Rac1. NO-derived from BK stimulation promoted RAEC migration over a period of 12 h. The use of RAEC permanently transfected with the dominant negative mutant of Ras (Ras^{N17}) or with the non-nitrosatable mutant of Ras ($\text{Ras}^{\text{C118S}}$); and the use of specific inhibitors of: Ras, PI3K, and Rac1 resulted in inhibition of NO-mediated Rac1 activation. BK-stimulated s-nitrosylation of Ras in RAEC mediates Rac1 activation and cell migration. Inhibition of NO-mediated Rac1 activation resulted in inhibition of endothelial cell migration. In conclusion, the NO indirect activation of Rac1 involves the direct participation of Ras and PI3K in the migration of endothelial cells stimulated with BK.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The super family of Ras-GTPases is a part of a large number of monomeric G proteins (approximately 150 members in humans) acting as intracellular molecular switches. Cycling between the inactive GDP-bound state and the active GTP-bound state, they transduce signals originating from membrane receptors [1]. Ras-GTPases regulate a variety of cellular processes such as the progression through the G1 phase of the cell cycle, cell differentiation and cell migration [2].

Activation of Ras initiates a complex network of signaling events, including the Raf/MEK/ERK ½ MAP Kinase pathway that is involved in cell proliferation [3] and the PI3K/Akt pathway that is involved in cell survival [4]. Activation of Ras recruits members of the Rho subfamily of low molecular weight GTPases that are involved in cytoskeletal remodeling [5]. Activation of Rho-GTPases by

Abbreviations: BK, bradykinin; FBS, fetal bovine serum; GSNO, S-nitrosoglutathione; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; L-NAME, L-nitro-arginine-methyl ester hydrochloride; NOX, NADPH oxidases; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthases; PI3K, phosphatidyl-inositol-3 kinase; RAEC, rabbit aortic endothelial cells; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Escuela de Medicina, Universidad Espíritu Santo – Ecuador, Guayaquil, Ecuador. Fax: 212-263-7118.

E-mail address: Arnold.Stern@nyumc.org (A. Stern).

** Corresponding author. Department of Biochemistry, Center for Cellular and Molecular Therapy – CTCMOL, Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo, Rua Mirassol nº 207 CEP: 04044-010, São Paulo, Brazil. Fax: +55-11-5573-6407.

E-mail address: hugo.monteiro@pesquisador.cnpq.br (H.P. Monteiro).