

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Veronica Venturini Rossato

**MODELO LÓGICO DA SINERGIA ENTRE SINALIZAÇÃO  $TGF\beta$  E DANO  
AO DNA NO DESTINO CELULAR**

Santa Maria, RS  
2017

Veronica Venturini Rossato

**MODELO LÓGICO DA SINERGIA ENTRE SINALIZAÇÃO  $TGF\beta$  E DANO AO DNA NO DESTINO CELULAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração em Sistemas Complexos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Física**.

ORIENTADOR: Prof. José Carlos Merino Mombach

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rossato, Veronica Venturini  
Modelo Lógico da Sinergia entre Sinalização TGFB e Dano  
ao DNA no Destino Celular / Veronica Venturini Rossato.-  
2017.  
78 p.; 30 cm

Orientador: José Carlos Merino Mombach  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Física, RS, 2017

1. Modelo Lógico 2. Dano ao DNA 3. Sinalização TGFB 4.  
Destino Celular 5. Fatores Parácrinos I. Mombach, José  
Carlos Merino II. Título.

---

©2017

Todos os direitos autorais reservados a Veronica Venturini Rossato. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

End. Eletr.: rossato.ve@gmail.com

**Veronica Venturini Rossato**

**MODELO LÓGICO DA SINERGIA ENTRE SINALIZAÇÃO TGF $\beta$  E DANO AO DNA NO DESTINO CELULAR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, Área de Concentração em Sistemas Complexos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Física**.

**Aprovado em 29 de agosto de 2017:**

---

**José Carlos Merino Mombach, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Evamberto Garcia de Goés, Dr. (FURG)**

---

**Gilberto Orengo de Oliveira, Dr. (UNIFRA)**

---

**Fábio Mallmann Zimmer, Dr. (UFSM)**

---

**Giovani Rubert Librelotto, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2017

## DEDICATÓRIA

*À minha família*

## AGRADECIMENTOS

*"O agradecimento é a memória do coração." (Lao Tse)*

*Início os agradecimentos citando as pessoas mais importantes em minha vida: meus pais, Cleci Venturini e Adair Rossato, que sempre primaram pela minha educação, muitas vezes abrindo mão de desejos pessoais para me apoiar em minhas escolhas, obrigada por estarem sempre presentes e acreditarem em mim.*

*Agradeço ao meu namorado, que com seu amor e companheirismo esteve ao meu lado me apoiando, alegrando e me acalmando durante essa caminhada.*

*Ao meu orientador professor Dr. José Carlos Merino Mombach, obrigada pela orientação, oportunidade e paciência em me inserir em uma nova linha de pesquisa, só tenho a agradecer seus ensinamentos.*

*Aos meus amigos pela amizade e carinho que sempre me disponibilizaram.*

*Ao Programa de Pós Graduação em Física, por me receberem no curso de doutorado, um agradecimento especial a todos os professores e funcionários.*

*Aos meus colegas de laboratório que me receberam muito bem, obrigada pela ajuda e troca de ideias.*

*Agradeço a todas as pessoas que de uma maneira ou outra estiveram presentes em minha vida me apoiando no período deste trabalho.*

*Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro e a Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de formação profissional e pessoal.*

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.*

*(George Bernard Shaw)*

## RESUMO

### MODELO LÓGICO DA SINERGIA ENTRE SINALIZAÇÃO TGF $\beta$ E DANO AO DNA NO DESTINO CELULAR

AUTORA: Veronica Venturini Rossato

ORIENTADOR: José Carlos Merino Mombach

Diversos fatores podem ocasionar danos ao DNA, dentre eles podemos citar poluição ambiental, radiações ionizantes, dentre outros. A sinalização envolvida após um dano instaurado consiste em vias de ativação e/ou inibições, e as respostas celulares após o dano incluem a remoção do mesmo, ativação dos pontos de checagem do ciclo celular, senescência ou apoptose. Todos estes processos são regidos por proteínas específicas que desempenham suas funções para garantir que as etapas do ciclo celular sejam cumpridas anteriormente a divisão celular. Vários estudos sugerem que células senescentes liberam fatores que induzem senescência permanente como um efeito *bystander* no ambiente celular. Estes fatores são conhecidos como SMS (Senescence-messaging secretome) e dentre eles, TGF $\beta$  é um componente envolvido na chamada “*senescência bystander*”. Este trabalho trata-se de uma proposta de rede regulatória de interação entre proteínas envolvidas nas vias de respostas ao dano no DNA e proteínas envolvidas na sinalização da via de TGF $\beta$ , em adição a uma rede de interação de proteínas proposta por Mombach e colaboradores em 2015. No modelo lógico proposto aqui, as variáveis que representam as proteínas são discretas e as interações entre as mesmas são representadas por operadores lógicos (AND, OR e NOT) utilizados nas regras de interações. As entradas do modelo são: expressão da via TGF $\beta$  em diferentes níveis, quebras simples ou duplas do DNA (SSB - *Single Strand Breaks* e DSB - *Double Strand Breaks*) reparáveis ou irreparáveis, e como saída do modelo temos os fenótipos de senescência, apoptose, parada do ciclo celular e proliferação. A rede foi submetida a mutações simulando perda e ganho de função das proteínas utilizando o software GINsim 2.9.4, estas simulações demonstraram consistência com trabalhos experimentais em fenótipos de crescimento celular obtidos a partir de células mutantes. Observamos também o efeito da sinergia dos *inputs* do sistema, os quais nos deram como resposta um aumento de indução de senescência e apoptose celular. Abordar as diferentes funções da via de TGF $\beta$  em sinergia com proteínas envolvidas na sinalização de dano ao DNA, bem como avaliar os fenótipos ocasionados por estas combinações de interações, podem ser importantes estratégias terapêuticas no tratamento de patologias, como por exemplo, câncer.

**Palavras-chave:** Modelo Lógico. Dano ao DNA. Sinalização TGF $\beta$ . Destino Celular. Fatores Parácrinos.



## ABSTRACT

### LOGICAL MODEL OF SYNERGY BETWEEN TGF $\beta$ SIGNALING AND DNA DAMAGE IN THE CELL FATE

AUTHOR: Veronica Venturini Rossato  
ADVISOR: José Carlos Merino Mombach

Many factors may cause damages to the DNA, among them we can quote environmental pollution, ionizing radiations, amongst others. The signalization involved after an instituted damage consists in activation pathways and/or inhibitions, and the cellular answers after the damage include a removal of it, activation of cell cycle checkpoints, senescence or apoptosis. All of these processes are ruled by specific proteins that perform their functions to ensure that the stages of the cellular cycle are completed before the cellular division. Many studies suggest that senescent cells release factors that induce permanent senescence as a bystander effect in the cellular environment. These factors are known as SMS (Senescence-messaging secretome), and among it, TGF $\beta$  is a component involved in the called "senescence bystander". This work deals with a proposed regulatory network for the interaction between proteins involved in the pathways of DNA damage responses and proteins involved in TGF $\beta$  pathway signaling, in addition to a protein interaction network proposed by Mombach et al. 2015. In the logical model proposed here, the variables that represent the proteins are discrete and the interactions between them are represented by logical operators (AND, OR and NOT) used in the rules of interactions. The inputs of the models are: expression of the TGF $\beta$  pathway in different levels, single strand breaks or doubles of the DNA (SSB – Single Strand Breaks and DSB – Double Strand Breaks) reparable or irreparable, and as outputs we have the phenotypes of senescence, apoptosis, cell cycle arrest and proliferation. The network was submitted to mutations simulating loss and gain of protein functions using the GINsim 2.9.4 software. These simulations show consistency with experimental works in phenotypes of cellular growth obtained from mutant cells. We observed as well the effect of synergy of the inputs of the system, which gave us as answer an increase of induction of senescence and cellular apoptosis. Approach the different functions of the TGF $\beta$  pathway in synergy with proteins involved in the DNA damage signaling, as well as evaluate the phenotypes occasioned by this combinations of interactions may be important therapeutic strategies in the treatment of pathologies, for example cancer.

**Keywords:** Logical Model. DNA Damage. TGF $\beta$  Signaling. Cell Fate. Paracrine Factors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Imagem ilustrativa das fases do ciclo celular - G1, S, G2, M e G0 (estado de repouso, não-proliferativo), juntamente com seus pontos de verificação de DNA G1/S e G2/M ..	20
Figura 2.2 – Controle do ciclo celular por ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) .....	21
Figura 2.3 – Imagem de uma célula, demonstrando os cromossomos que são longas sequências de DNA, presentes no núcleo celular. Os telômeros, que são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos, possuem a função de proteger o material genético e manter a estabilidade estrutural dos cromossomos .....	23
Figura 2.4 – Fatores do secretoma mensageiro da senescência (SMS) que contribuem para a indução e manutenção da senescência. IGF (proteína produzida no fígado em resposta ao hormônio de crescimento (GH)); IGFBP (uma das seis proteínas que se ligam especificamente ao fator de crescimento insulina IGF-I e IGF-II); ILs (constituintes dos sistemas imunológicos dos organismos); PAI1 (inibidor de fibrinólise, processo fisiológico que degrada coágulos de sangue); TGF $\beta$ (controla a proliferação, diferenciação celular, e outras funções na maioria das células); WNT2 (proteína envolvida na oncogenese e em diversos processos como regulação do destino celular e padronização durante embriogênese); IFNs (moléculas de comunicação entre as células para desencadear defesas do sistema imunológico, eliminando assim agentes patológicos) .....	25
Figura 2.5 – Visão geral da via canônica de sinalização de TGF $\beta$ . O receptor T $\beta$ -RIII reforça a ligação de TGF $\beta$ com o receptor T $\beta$ -RII, após esta ligação, TGF $\beta$ fosforila T $\beta$ -RI levando a ativação de SMAD2 e SMAD3 por fosforilação (P). Este processo é inibido pelo SMAD7. SMAD2 ativado e SMAD3 formam heterodímeros com SMAD4 e translocam para o núcleo. Juntamente com co-ativadores, co-repressores e outros fatores de transcrição, o complexo Smad regula a expressão gênica .....	27
Figura 2.6 – TGF $\beta$ na regulação do ciclo celular - TGF $\beta$ inibe a expressão de c-Myc e induz a expressão de $p15^{INK4b}$ o qual previne a formação do complexo ciclina D - Cdk4/6, além disso desloca $p21^{CIP1}$ e $p27^{KIP1}$ dos complexos. Estes inibidores CIP/KIP são posteriormente capazes de inativar outros complexos de fase G1 e S e, assim, inibir o ciclo celular. Baixos níveis de c-Myc permitem a transcrição de $p15^{INK4b}$ e $p21^{CIP1}$ induzida por TGF $\beta$ .....	28
Figura 2.7 – Gráfico regulatório do modelo lógico de MAPK. Cada nó demonstra um componente do modelo. As entradas do modelo, fenótipos e proteínas MAPK (ERK, p38, JNK) são indicados em rosa, azul e rosa claro, respectivamente. As setas verdes e setas vermelhas indicam regulações positivas e negativas, respectivamente .....	33
Figura 2.8 – Rede regulatória para decisão do destino de astrócitos. Nós retangulares = nós Booleanos, e nós elípticos = nós de múltiplos valores. Nós de entrada: quebras simples do DNA (SSB) e quebras duplas (DSB). Nós de saída na cor branca representam as possíveis decisões celulares, e os nós internos são os reguladores das saídas. As linhas em verde representam ativação e as em vermelho, inibição .....	34
Figura 2.9 – Estados estáveis do modelo para caso tipo selvagem de astrócitos. Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores de cada uma das 3 diferentes intensidades de dano. Os números representam valores de estados variáveis e os espaços vazios correspondem ao valor de estado zero .....	36
Figura 4.1 – Janela principal do GINsim exibindo um exemplo de gráfico de rede regulatória de um estudo publicado .....	41
Figura 5.1 – Exemplos de vias moleculares indutoras de senescência. O modelo proposto por Mom-	

	bach (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015) contempla a primeira via ( <i>DNA damage and telomere loss</i> ) representada na imagem, a via SASP destacada é a via considerada na rede demonstrada nesta pesquisa	43
Figura 5.2	– Modelo esquemático da relação entre as vias ATM e TGF $\beta$ após exposição à radiação ionizante. p53 interage fisicamente com Smad2. Smad7 e Smad2 estão envolvidos na via de sinalização de danos ao DNA	44
Figura 5.3	– Imagem da rede proposta - Modelo lógico da sinergia de dano ao DNA e TGF $\beta$ . Nós retangulares representam nós Booleanos e nós elípticos representam nós de múltiplos valores. Entradas: Quebras Simples (SSB), Quebras Duplas (DSB) e sinalização TGF $\beta$ (TGFbeta). Fenótipos de saída na cor vermelha representam os possíveis destinos celulares, e os nós internos são os reguladores das saídas do modelo. Linhas em verde representam interações de ativações, linhas em vermelho representam inibição	46
Figura 6.1	– Interface do GINSim onde é possível gerar as mutações a serem estudadas. A imagem demonstra o exemplo citado no texto da proteína SMAD7 (destacado em vermelho) e seus diferentes níveis 0, 1 e 2. Os pontos vermelho e azul possibilitam a seleção do nível desejado a ser considerado na mutação, por exemplo, variar SMAD7 de 0 a 1 - [0,1], variar de 0 a 2 - [0,2] ou variar sua expressão de 1 a 2 - [1,2]	48
Figura 6.2	– Estados estáveis do modelo para o caso TGF $\beta$ desligado ( <i>knockout</i> ). Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores considerando diferentes níveis de dano ao DNA	49
Figura 6.3	– Estados estáveis do modelo para o caso Quebras Duplas e Quebras Simples desligadas ( <i>knockout</i> ). Destino celular a partir das 3 possíveis combinações de valores de intensidade de expressão para TGF $\beta$	50
Figura 6.4	– Estados estáveis do modelo para caso onde todas as entradas ( <i>inputs</i> ) do sistema são consideradas. Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de cada um dos <i>inputs</i> iniciais do sistema, considerando diferentes níveis de dano e/ou intensidade de expressão de TGF $\beta$	51
Figura 6.5	– Estados estáveis do modelo para a mutação de p53 desligado (KO, <i>knockout</i> ). Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede	54
Figura 6.6	– Estados estáveis do modelo para a mutação de p53 com valor de expressão intermediário (p53 = 1). Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede	55
Figura 6.7	– Estados estáveis do modelo para a mutação de p53 superexpressa (p53 = 2). Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede	56
Figura 6.8	– Teste no modelo do comportamento de supressor tumoral de TGF $\beta$ - Estados estáveis do modelo para o caso TGF $\beta$ desligado, SMAD23 no nível mais alto (igual a 2) e SMAD7 desligado. Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores de entradas do modelo	58
Figura 6.9	– Teste no modelo do comportamento de promotor tumoral de TGF $\beta$ - Estados estáveis do modelo para o caso TGF $\beta$ no nível máximo (igual a 2), SMAD23 desligado e SMAD7 nos níveis 1 e 2. Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando as mutações impostas na rede	59
Figura 6.10	– Estados estáveis do modelo para o caso SMAD7 nos níveis 0 e 1. Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede	61
Figura 6.11	– Estados estáveis do modelo para o caso SMAD7 superexpresso. Destino celular a	

partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede .....	62
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Regras lógicas empregadas no controle da rede da Figura 2.8 e interpretação dos níveis. AND (&), OR ( ) e NOT (!) são operadores lógicos usados para determinar a regra para cada nó definido em termos do estado de seus reguladores .....	35
Tabela 5.1 – Regras lógicas empregadas no controle da rede da Figura 5.3. AND (&), OR ( ) e NOT (!) são operadores lógicos usados para determinar a regra de cada nó constituinte da rede proposta .....	47
Tabela 6.1 – Tabela resumo contendo os resultados apresentados nas Figuras 6.2, 6.3 e 6.4, considerando as diferentes entradas ( <i>inputs</i> ) do sistema .....	52
Tabela 6.2 – Tabela resumo contendo os resultados apresentados nas Figuras 6.5, 6.6 e 6.7, obtidos na simulação de mutações da proteína p53 na rede ...	57
Tabela 6.3 – Resumo dos resultados apresentados nas Figuras 6.8 e 6.9, obtidos na simulação de mutações do Paradoxo do TGF $\beta$ proposto no estudo de Coulouarn et al. ....	59
Tabela 6.4 – Tabela resumo contendo os resultados apresentados nas Figuras 6.10 e 6.11, obtidos na simulação de mutações da proteína SMAD7 na rede....	63
Tabela 6.5 – Tabela resumo contendo todos os resultados obtidos com a rede proposta. As informações contidas na coluna "Resultados" referem-se a uma análise qualitativa que considera como parâmetro o modelo referência (Figura 6.2) como padrão de comparação .....	63
Tabela A.1 – Regras lógicas empregadas no controle da rede da Figura 5.3. AND, OR e NOT são operadores lógicos usados para determinar a regra de cada nó constituinte da rede proposta.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AND</i>	Operador lógico “e”
<i>DDR</i>	Resposta ao Dano no DNA
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DSB</i>	Quebra de cadeia de fita dupla do DNA ( <i>Double Strand Break</i> )
<i>EMT</i>	Transição Epitélio para mesenquimal - processo biológico em que uma célula epitelial adquire o fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão e resistência a apoptose aumenta
<i>G0</i>	Fase complementar a G1, quando a célula não tem estímulos para a divisão e se concentra em exercer sua função vital. A célula só sai dessa fase quando ocorre um estímulo adequado para que ela se prepare para se dividir.
<i>G1</i>	É o primeiro período, começando ao final da divisão celular anterior e se estendendo até o início da duplicação do DNA. Nesse período ocorre o crescimento da célula. Além disso, caracteriza-se por uma intensa síntese de RNA e de proteínas.
<i>G2</i>	Fase do ciclo celular onde, após a separação dos centríolos para os pólos da célula, ocorre a formação de um sistema com importante participação durante a divisão celular: o fuso mitótico ou fuso cariocinético. Ao final dessa fase a célula completa seu crescimento e está preparada para a mitose.
<i>GEO</i>	Banco de dados de expressão genômica ( <i>Gene Expression Omnibus</i> )
<i>GINsim</i>	Simulação de Rede de Interação Gênica
<i>GO</i>	<i>Gene Ontology</i>
<i>GoF</i>	Ganho de função (Gain of function)
<i>LoF</i>	Perda de função ( <i>Loss of function</i> )
<i>LET</i>	Transferência linear de energia - quantidade de energia depositada ou transferida por unidade de comprimento do trajeto percorrido em um material absorvedor
<i>M</i>	Fase mitótica
<i>mRNA</i>	RNA mensageiro
<i>NCBI</i>	Centro Nacional de Informações Biotecnológicas ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )
<i>NOT</i>	Operador lógico de negação

<i>OR</i>	Operador lógico “ou” ciclina capaz de inibir todos os complexos de ciclina/CDK, mas principalmente CDK2
<i>PhDs</i>	Título acadêmico de doutor
<i>ROS</i>	Espécies reativas a oxigênio ( <i>Reactive oxygen species</i> )
<i>S</i>	Fase responsável por desencadear a divisão celular, além de garantir que as células-filhas receberão as informações genéticas que determinam suas características. Ocorre a duplicação das cromátides dos cromossomos
<i>SASP</i>	Fenótipo secretor associado à senescência ( <i>Senescence Associated Secretory Phenotype</i> )
<i>SMS</i>	Secretoma Mensageiro da Senescência ( <i>Senescence-messaging secretome</i> )
<i>Ser/Thr</i>	Quinases Serina/Treonina
<i>SSB</i>	Quebra de cadeia de fita simples do DNA ( <i>Single Strand Break</i> )
<i>STG</i>	Gráfico de transição de estado
<i>STRING</i>	Ferramenta de Pesquisa para Interações de Proteínas/Genes
<i>VP16</i>	Etoposídeo, droga de quimioterapia, é um anticorpo anticâncer (antineoplásico ou citotóxico), inibidor da topoisomerase II

## LISTA DE SÍMBOLOS

<i>ARF</i>	Família do fator de Ribosilação do ADP
<i>ATM</i>	Proteína ataxia-telangiectasia mutante
<i>ATR</i>	Proteína ataxia-telangiectasia e proteína relacionada à Rad3
<i>BRCA1</i>	<i>Breast Cancer, early onset</i> , gene humano
<i>CCL2/20</i>	Citocina que pertence a família da quimiocinas CC
<i>CDC25ABC</i>	Família de proteína 25 do ciclo de divisão celular
<i>CDCs</i>	Proteínas do ciclo de divisão celular
<i>Cdk2</i>	Ciclina dependente de quinase 2
<i>Cdk4/6</i>	Ciclina dependente de quinase 4 e 6
<i>CDKN1A</i>	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1 A
<i>CDKs</i>	Quinases dependentes de ciclinas
<i>CHEK1</i>	Proteína quinase 1 que coordena as respostas aos danos no DNA e os pontos de verificação do ciclo celular
<i>CHEK2</i>	Proteína quinase 2 que coordena as respostas aos danos no DNA e os pontos de verificação do ciclo celular
<i>E2F</i>	Fator de transcrição da família de proteínas E2F (E2F1, E2F2, E2F3)
<i>EGFR</i>	Receptor celular de membrana para os membros da família dos fatores de crescimento epidérmico
<i>ERK</i>	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
<i>FGFR3</i>	Receptor 3 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
<i>GADD45</i>	Proteína induzida por dano ao DNA e parada do crescimento ( <i>Growth Arrest and DNA Damage</i> ), inclui GADD45 $\alpha$ , GADD45 $\beta$ e GADD45 $\gamma$
<i>IFN</i>	Interferon Tipo I
<i>IGF</i>	Fator de Crescimento semelhante à insulina
<i>IGFBP</i>	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 3</i>
<i>IL</i>	Interleucina
<i>INK</i>	Proteína supressora de tumor
<i>Mdm2</i>	Proteína E3 ubiquitina ligase mediadora da ubiquitinação de p53



<i>MAPK</i>	Proteína quinase ativada por mitógeno
$\text{NF}\kappa\beta$	Fator nuclear $\kappa\beta$ , participa da resposta imunitária à infecção
<i>PAI1</i>	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
$p14^{\text{ARF}}$	Também chamado supressor tumoral, proteína 14 quadro de leitura alternativo (do locus CDKN2A)
$p15^{\text{INK4b}}$	Proteína codificada pelo gene CDKN2B em humanos, é inibidora de CDK4 e CDK6, referida como p15 também
$p16^{\text{INK4a}}$	Proteína ciclina inibidora dependente quinase 2A (a partir do locus CDKN2A)
$p21$	Também chamada $p21^{\text{Cip1}}$ e $p21^{\text{Waf1}}$ é uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina capaz de inibir todos os complexos de ciclina/CDK, mas principalmente CDK2
$p27$	Proteína 27, considerada um supressor de tumor
$p38\text{MAPK}$	Proteína quinase ativada por mitógeno 14
$p53$	Proteína 53 supressora de tumor
$pRB$	Proteína Retinoblastoma
<i>SMAD</i>	( <i>Mothers Against Decapentaplegic Homolog</i> ) Proteínas intracelulares que transduzem sinais extracelulares para o núcleo
<i>SMAD2</i>	Membro 2 da família das SMADs
<i>SMAD7</i>	Membro 7 da família das SMADs
<i>SMAD23</i>	Complexo utilizado na rede apresentada para simbolizar as proteínas SMAD2 e SMAD3, as quais são membros da família das SMADs
$\text{T}\beta\text{-RI}$	Receptor tipo I de $\text{TGF}\beta$ - Complexo heteromérico de quinases transmembranares de serina/treonina
$\text{T}\beta\text{-RII}$	Receptor tipo II de $\text{TGF}\beta$ - Complexo heteromérico de quinases transmembranares de serina/treonina
$\text{T}\beta\text{-RIII}$	Receptor tipo III de $\text{TGF}\beta$ - Complexo heteromérico de quinases transmembranares de serina/treonina
$\text{TGF}\beta$	Fator de transformação do crescimento beta, proteína que controla a proliferação, diferenciação celular e outras funções na maioria das células
$\text{TNF-}\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
<i>VEGF</i>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular, é uma proteína de sinalização que promove o crescimento de vasos sanguíneos novos

<i>Wip1</i>	Fosfatase 1 induzida por p53 tipo selvagem ( <i>Wild-type p53 induced phosphatase 1</i> )
<i>WNT2</i>	Proteína proto-oncogênica e membro da família das proteínas Wnt que consistem de genes que codificam proteínas sinalizadoras secretadas envolvidas na via de sinalização Wnt

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>19</b>
2.1	O CICLO CELULAR	19
2.2	SENESCÊNCIA CELULAR	22
2.3	FENÓTIPO SECRETOR ASSOCIADO A SENESCÊNCIA (SASP)	24
2.4	FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO - <i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGF<math>\beta</math>)</i>	26
2.5	MODELOS LÓGICOS	30
2.5.1	Definição	30
2.5.2	Rede Booleana de Transdução de Sinal	31
2.5.3	Modelo de Rede de Sinalização MAPK	32
2.5.4	Modelo Lógico de Senescência Induzida por Dano ao DNA	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>38</b>
4.1	BANCO DE DADOS GENÔMICOS	38
4.1.1	STRING 10	38
4.1.2	Ingenuity Target Explorer	39
4.2	GINSIM 2.9.4	39
<b>5</b>	<b>CONSTRUÇÃO DA REDE</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
6.1	INFLUÊNCIA DAS ENTRADAS SSB E DSB NO MODELO	49
6.2	INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE TGF $\beta$ NO MODELO	49
6.3	SINERGIA ENTRE EXPRESSÃO DE TGF $\beta$ E DANO AO DNA	50
6.4	ESTUDO DE MUTAÇÕES	52
6.4.1	Proteína p53	53
6.4.2	Paradoxo do TGF $\beta$	57
6.4.3	Proteína SMAD7	60
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>66</b>
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	APÊNDICE A – REGRAS LÓGICAS ATRIBUÍDAS AS PROTEÍNAS CONSTITUINTES DA REDE REGULATÓRIA PROPOSTA	76
	ANEXO A –	78

## 1 INTRODUÇÃO

Danos ao genoma, os quais podem ocorrer como uma consequência da exposição a agentes ambientais ou a subprodutos do metabolismo oxidativo, representam uma ameaça à integridade genômica e viabilidade celular. Os efeitos danosos do estresse genotóxico causam lesões genéticas incluindo, quebras simples e duplas do DNA, e modificações químicas de bases nucleotídicas (TIBBETTS et al., 2000).

A reprodução celular é regida pelo processo chamado de ciclo celular, e sua precisão garante a sobrevivência dos organismos vivos, desempenhando um papel central na operação e desenvolvimento de toda a vida. Após a célula sofrer um dano no seu DNA, ela pára em algum dos *checkpoints* do ciclo celular e as respostas possíveis incluem a remoção do mesmo que consiste no reparo do dano; caso não seja possível a célula sofrerá senescência celular, que é a parada permanente da divisão celular ou apoptose, que é a morte celular programada. Todos esses processos são regidos por proteínas específicas que desempenham suas funções para garantir que as etapas do ciclo celular sejam cumpridas anteriormente à divisão celular (SANCAR et al., 2004).

A senescência celular contribui para as defesas do organismo contra o desenvolvimento do câncer, porém ela também está relacionada com a secreção de fatores pró-inflamatórios e pró-proliferativos, assim como um bloqueio da citocinese (divisão do citoplasma e da célula, como um todo) que pode conduzir a instabilidade cromossômica e danos no DNA, que são fenômenos associados ao câncer (OHTANI; HARA, 2013; KUILMAN; PEEPER, 2009). Esses fatores estão associados às várias proteínas inflamatórias, as quais são secretadas quando há um estado senescente devido ao encurtamento dos telômeros (estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos); exposição ao estresse, exposição à radiação ionizante ou ativação de genes supressores de tumor. Estas proteínas caracterizam o Fenótipo Secretor Associado à Senescência (SASP) (RODIER; CAMPISI, 2011) e o Secretoma Mensageiro de Senescência (SMS), também designado como secretoma associado à senescência, os quais podem induzir o estado senescente a outras células.

As células senescentes exibem expressão aumentada de genes que codificam uma série de proteínas tais como, citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores de remodelação da matriz extracelular (malha tridimensional organizada de moléculas que rodeiam as células), os quais alteram o ambiente de tecido local e/ou contribuem para a inflamação crônica e tumorigênese (origem do tumor) (OHTANI; HARA, 2013; KUILMAN; PEEPER, 2009).

O Secretoma Mensageiro de Senescência (SMS) produzido pelas células senescentes pode induzir senescência em células vizinhas pelo chamado efeito parácrino, também conhecido como senescência “*bystander*” (termo referido a morte, crescimento al-

terado ou dano em células que não receberam diretamente quimioterapia ou irradiação), como tem sido pesquisado e relatado em diversos artigos da área (HODNY; HUBACKOVA; BARTEK, 2010; DI et al., 2008; HUBACKOVA et al., 2012). Um dos fatores secretados por células senescentes é o Fator de Transformação do Crescimento ( $TGF\beta$ ), este fator parece desencadear o estado senescente em células (ACOSTA et al., 2013).

A via de sinalização de  $TGF\beta$  e seus receptores desempenham diversas funções no meio intracelular, participam de processos de ativação e inibição de diversas proteínas, são amplamente expressos nos tecidos e desempenham um papel importante em doenças humanas (MASSAGUÉ; BLAIN; LO, 2000).  $TGF\beta$  pode atuar de maneira adversa nas células, como supressor tumoral em células normais e estágios iniciais de carcinogênese e como promotor tumoral nos tumores em estágios mais avançados, caracterizando assim o Paradoxo do  $TGF\beta$ , objeto de diversas pesquisas, porém ainda não totalmente compreendido (KUBICZKOVA et al., 2012; PRINCIPE et al., 2014).

Entender o mecanismo de interação entre a via de reparo de danos ao DNA e a via canônica de sinalização de  $TGF\beta$ , bem como os processos envolvidos na tomada de decisão celular frente a diferentes cenários aos quais as células podem ser submetidas, é importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para diversas patologias.

A tomada de decisão celular sobre qual destino seguir após sofrer dano no seu DNA, entre apoptose ou senescência, é uma questão não muito clara ainda, sendo assim este assunto tem se tornado alvo de muita pesquisa, e o uso de modelos computacionais podem esclarecer os processos biológicos como por exemplo, a decisão celular (GRIECO et al., 2013).

Elucidar os mecanismos que a célula dispõe frente a um dano no DNA e a expressão da via de  $TGF\beta$ , bem como os determinantes dos fatores ou proteínas envolvidas nestas vias de sinalização, é de fundamental interesse na comunidade científica, pois este entendimento nos permitirá uma melhor compreensão a respeito da evolução de diversas patologias, dentre elas o câncer.

Esta tese apresenta no capítulo 2 uma revisão bibliográfica com conceitos básicos e revisão da literatura e trabalhos relacionados a este projeto. No capítulo 3 apresentamos os objetivos deste trabalho de pesquisa, no capítulo 4 apresentamos o embasamento teórico de todas as proteínas e interações que foram adicionadas ao modelo lógico apresentado. O capítulo 5 apresenta todos os métodos empregados para desenvolver esta pesquisa. Os resultados e discussões estão apresentados no capítulo 6, as conclusões no capítulo 7 e por fim, temos as referências bibliográficas, o apêndice e o anexo deste trabalho.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo são apresentados os conceitos pertinentes para o entendimento desta pesquisa, como os conceitos envolvidos no ciclo celular e seus pontos de verificação do DNA, senescência celular, fenótipo secretor associado à senescência, fator de transformação do crescimento  $TGF\beta$ , e três modelos lógicos como exemplos de trabalhos que fizeram uso da mesma metodologia utilizada nesta pesquisa.

### 2.1 O CICLO CELULAR

Os processos de divisão celular, replicação do DNA, e crescimento celular são eventos coordenados que garantem a divisão e formação de células filhas com genomas corretos e intactos. Esses processos nos quais uma célula duplica seu genoma, sintetiza constituintes da célula e, eventualmente, se divide em duas células-filhas é denominado de ciclo celular, sendo sua principal característica a natureza cíclica que o compõe.

As células possuem pontos de verificação (*checkpoints*) para interromper a progressão do ciclo celular em resposta ao dano no DNA, permitindo assim tempo para o reparo do mesmo (OTTO; SICINSKI, 2017). Se o dano em questão for reparável, após seu reparo, a célula segue o ciclo, e no caso do dano ser irreparável a célula poderá sofrer apoptose ou senescência (MEDEMA; MACUREK, 2012). De uma maneira geral, a ativação dos pontos de verificação de danos no DNA ocorrem pelo reconhecimento deste dano por meio de sensores, seguido por uma ativação ordenada de quinases (proteínas que transferem grupos fosfato) efetoras.

O ciclo celular é dividido em fases, e sua progressão inicia na fase G1 depois passa para a fase S, conseguinte a fase G2 e por fim a fase M (Mitose). Na fase G1 (*Gap 1*) ocorre o crescimento em volume e a síntese de RNA e proteínas diversas, requeridas para a fase seguinte, que é a fase S (síntese), onde ocorre a duplicação do DNA. Na fase G2 (*Gap 2*), que antecede a divisão, ocorre a síntese de moléculas necessárias à divisão celular; e por fim a fase M, na qual ocorre a divisão celular (HUSTEDT; DUROCHER, 2017).

A indução de dano pode ocasionar a parada do ciclo em dois pontos de verificação distintos do ciclo celular: G1/S (entre as fases G1 e S) ou G2/M (entre as fases G2 e M), conforme demonstrado na Figura 2.1.

A célula cresce continuamente na interfase, a qual consiste em três fases, G1, S e G2, estas podem levar 23 horas das 24 horas de duração do ciclo celular humano, deixando somente 1 hora para a fase M. As duas fases G (G1 e G2) servem para dar tempo a célula de monitorar o ambiente interno e externo para garantir que as condições são adequadas e tudo está correto antes da célula partir para as fases S e M. A fase G1 é especialmente

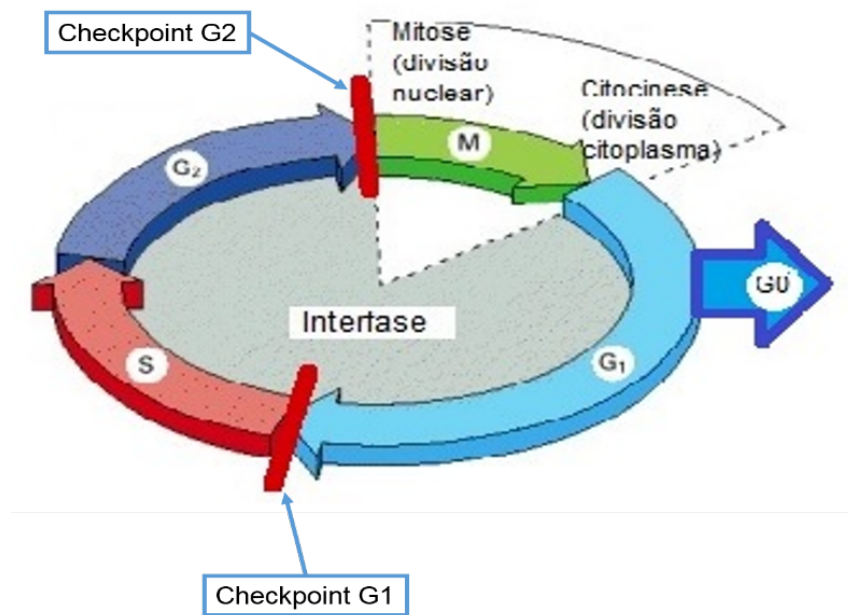


Figura 2.1 – Imagem ilustrativa das fases do ciclo celular - G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M e G<sub>0</sub> (estado de repouso, não-proliferativo), juntamente com seus pontos de verificação de DNA G<sub>1</sub>/S e G<sub>2</sub>/M

Fonte: Adaptado de (ALBERTS et al., 2002; WEINBERG, 2008).

importante neste quesito. Se as condições externas são não favoráveis, as células atrasam o progresso desta fase e entram em um estado de repouso, não-proliferativo, conhecido como estado quiescente (TERZI; IZMIRLI; GOGEBAKAN, 2016) ou estado G<sub>0</sub>, em que podem permanecer por dias, semanas ou até mesmo anos antes de retomar a proliferação (SALAZAR-ROA; MALUMBRES, 2017). Se as condições extracelulares são favoráveis, as células passam para a fase de síntese do DNA, fase S. Sequencialmente a fase S, a célula passa pela fase G<sub>2</sub>, onde há a sua preparação para ir a fase M (mitose) e divisão celular (citocinese) (ALBERTS et al., 2002).

A fase M divide-se em duas fases: a mitose, que é um processo contínuo de divisão celular, onde há a divisão do núcleo e a consequente formação de duas células filhas com o mesmo número de cromossomos; e a citocinese, que é a divisão do citoplasma da célula, esta é a última fase do ciclo celular (COOPER; HAUSMAN, 2000).

A garantia de formação de duas células filhas normais, depende da execução precisa dos processos intracelulares ocorridos principalmente em duas fases do ciclo celular: fase S (replicação correta do genoma celular) e a fase M (distribuição correta do DNA duplicado às células filhas); se na evolução dos processos do ciclo celular, os danos no DNA não forem reparados, pode haver consequências adversas, como por exemplo, o desenvolvimento de um tumor maligno (NURSE, 2000).

Diversos tipos de fatores exógenos podem danificar o DNA, como por exemplo, a luz ultravioleta, radiação ionizante e inúmeras substâncias orgânicas e inorgânicas. As espécies reativas de oxigênio (ROS), por exemplo, podem causar diferentes alterações no

genoma, como mutações simples, quebra simples do DNA (SSB), e rupturas de filamentos duplos (DSB), ou mudanças mais complexas, como deleções, translocações e fusões (POEHLMANN; ROESSNER, 2010). Porém, enquanto a molécula de DNA é um alvo constante de agentes danosos, os organismos possuem pontos de verificação ou *checkpoints* de danos no DNA, os quais servem como uma barreira para manutenção da transmissão correta da informação genética de célula à célula (ROOS; KAINA, 2013).

Com relação ao ciclo celular, inúmeros complexos de ciclinas e de quinases dependentes de ciclinas participam do controle das fases do ciclo celular (Figura 2.2) e têm suas atividades inibidas por numerosos inibidores, tais como a proteína p21 (CICENAS et al., 2014). As quinases dependentes de ciclina (CDKs) são membros da subfamília de quinases serina/treonina, as quais são encontradas em organismos unicelulares como, leveduras e organismos multicelulares tais como plantas, seres humanos e outros mamíferos. Quando ativados, estes complexos levam à progressão do ciclo e inativados levam à parada do ciclo celular.

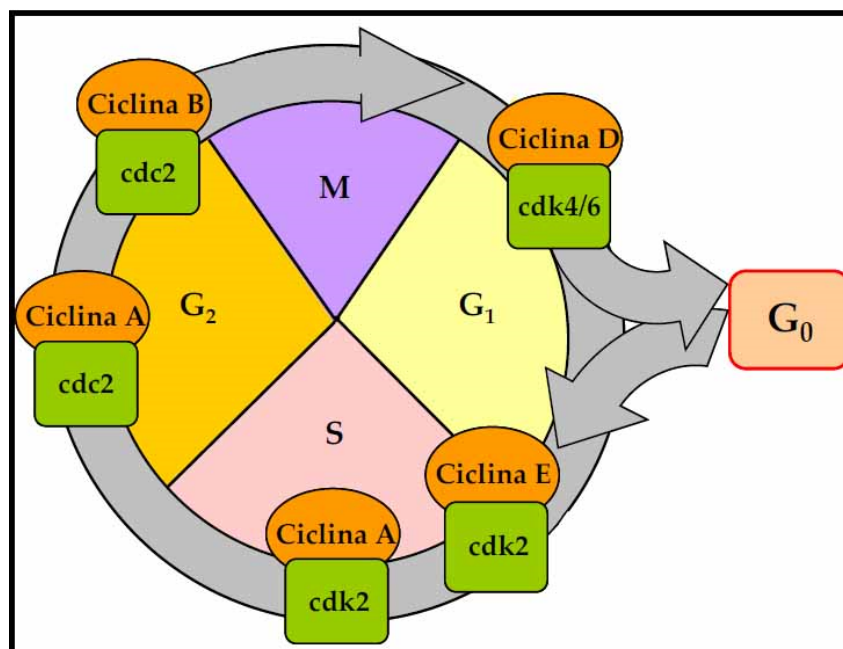


Figura 2.2 – Controle do ciclo celular por ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs)

Fonte: Retirado de <<http://www.noticiascientificas.info/2011/03/tipos-de-ciclinas.html>>.

Após o estímulo de fatores mutagênicos ou seja, fatores que podem causar danos ao DNA, ocorre a elevação dos níveis de ciclina D e consequente formação do complexo envolvendo as quinases *CDK4* e *CDK6*. A entrada e progressão na fase S é regulada por *ciclina E – CDK2* e *ciclina A – CDK2*, respectivamente, enquanto o início da mitose é regulado por *ciclina B – CDK1 (Cdc2)* (POEHLMANN; ROESSNER, 2010). Na fase G<sub>2</sub> a principal quinase que atua é a *CDK1*, que forma complexos tanto com a *ciclina B* quanto com a *ciclina A*, a *CDK1* fosforila importantes substratos que serão cruciais para a mitose.



Quando o DNA sofre algum dano em sua estrutura ocorrem respostas intracelulares e estas respostas são organizadas como vias de transdução de sinais. Inicialmente o dano é reconhecido e posteriormente estes sinais relativos ao dano serão transmitidos para outras proteínas (POEHLMANN; ROESSNER, 2010; NIIDA; NAKANISHI, 2006). Caso o dano sofrido pelo DNA seja irreparável, a célula seguirá destinos como senescência celular ou apoptose. A apoptose celular ocorre quando a célula sofre um dano irreversível, ou seja, não reparável, sendo assim, é liberada uma cascata de eventos com proteínas que atuam especificamente para que esta célula seja morta, ocorre então, a chamada morte celular programada ou apoptose (HOUTGRAAF; VERSMISSEN; GIESSEN, 2006). O outro destino possível desta célula, a senescência, é assunto do próximo tópico deste trabalho.

## 2.2 SENESCÊNCIA CELULAR

Em 1965, Hayflick (HAYFLICK, 1965) descreveu formalmente a senescência celular quando demonstrou que células normais apresentavam uma habilidade limitada de proliferação em cultura celular.

Experimentos clássicos com fibroblastos humanos mostram que inicialmente estas células se dividem em cultura, entretanto, gradualmente ao longo de muitas duplicações celulares, a proliferação celular diminui. Eventualmente, todas as células na cultura perdem a habilidade de se dividir e, as que não se dividem, permanecem viáveis durante várias semanas, mas não crescem mesmo estando em um meio com nutrientes e fatores de crescimento ideais (CAMPISI; FAGAGNA, 2007).

A senescência celular é uma forma metabolicamente ativa de parada irreversível de crescimento de células, que impossibilita a proliferação de células danificadas ou envelhecidas impedindo a progressão de danos às células filhas (DAVALOS et al., 2010). Este estado celular ocorre em resposta a uma série de estímulos genotóxicos intrínsecos e extrínsecos mediados através de vias de supressão tumoral que envolvem as proteínas p21, p53 e  $p16^{INK4a}$ /pRb, o que acaba inibindo a indução de quinases dependentes de ciclinas (*Cdks*) (CAMPISI, 2001; BEN-PORATH; WEINBERG, 2005).

Existem dois tipos principais de senescência, a que ocorre de forma "natural"/ programada (senescência replicativa - telomérica) ou a senescência prematura. A senescência replicativa ocorre devido ao encurtamento dos telômeros, que são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos (Figura 2.3), os quais possuem uma sequência repetida de DNA e tem como função preservar a integridade do genoma, evitar a recombinação indesejada e a fusão com outros cromossomos (BLASCO, 2007).

Estas estruturas são encurtadas a cada divisão celular até que um comprimento crítico é atingido e seguido de disfunção, as vias de reparo do DNA são então ativadas e

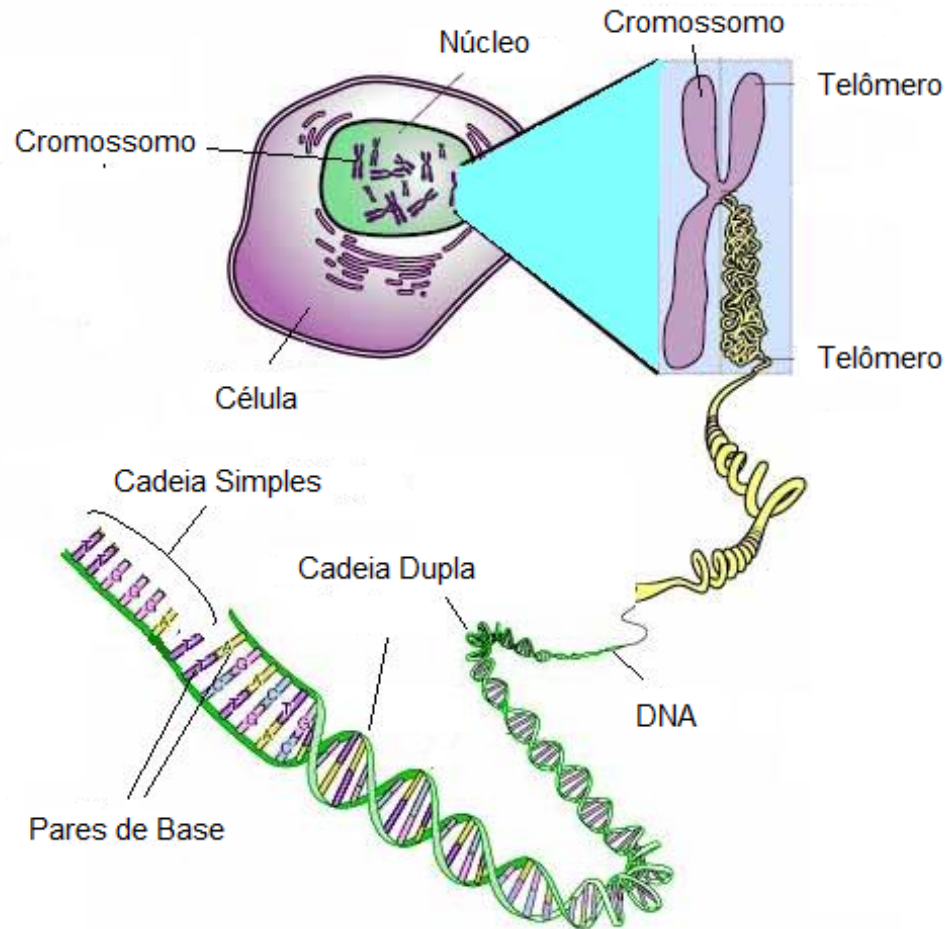


Figura 2.3 – Imagem de uma célula, demonstrando os cromossomos que são longas seqüências de DNA, presentes no núcleo celular. Os telômeros, que são estruturas presentes nas extremidades dos cromossomos, possuem a função de proteger o material genético e manter a estabilidade estrutural dos cromossomos

Fonte: Adaptado de <<http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/burgoine/origins.txt.html>>

as células entram em senescência, perdendo sua capacidade de proliferação como mencionado anteriormente. Além da divisão celular, outros fatores como danos no DNA, inflamação e estresse oxidativo, causam encurtamento dos telômeros (FYHRQUIST; SAIJONMAA; STRANDBERG, 2013).

Já a senescência prematura é associada ao dano no DNA, impulsionada por muitos fatores, incluindo estresse oxidativo, ativação de oncogenes (gene alterado, cujo produto pode agir de modo dominante, auxiliando a originar uma célula cancerosa) (*Oncogene-induced Senescence– OIS*), instabilidade genômica/dano no DNA e superexpressão ou diminuição de expressão de supressores tumorais (p21, p16, etc.) (NAKAGAWA; OPITZ, 2007).

Dentre as vias indutoras de senescência está a via p53 que induz senescência como resposta ao dano do DNA (DDR), e é regulada por inúmeras proteínas tais como MDM2 (*murine double minute 2* - regulador negativo de p53), e ARF (*alternate-reading-frame protein*), a qual inibe a atividade de MDM2 (SHERR; MCCORMICK, 2002).

A proteína p21 é um marcador transcricional crucial de p53 e um mediador de senescência dependente de p53, além disto, p21 é um inibidor de *CDKs* que medeia uma parada transitória de crescimento induzida por dano no DNA, através da supressão da fosforilação e então a inativação de pRB (BROWN; WEI; SEDIVY, 1997).

A outra via indutora de senescência, a via p16-pRB ocorre secundária ao envolvimento da via p53, a primeira também é ativada após um estímulo que produz DDR, no entanto alguns estímulos indutores de senescência atuam preferencialmente através da via p16-pRB, como por exemplo, as células epiteliais que são mais propensas a indução de p16 e parada do crescimento do que os fibroblastos (CAMPISI; FAGAGNA, 2007).

### 2.3 FENÓTIPO SECRETOR ASSOCIADO A SENESCÊNCIA (SASP)

A senescência celular tem um comportamento contraditório, benéfico e maléfico, pois além de ser um mecanismo de supressão tumoral, há evidências de que as células senescentes também promovem a secreção de diversas citocinas inflamatórias (que são moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes); quimiocinas (que fazem parte da família das citocinas e funcionam como potentes mediadores ou reguladores de inflamação) e fatores de crescimento e fatores de remodelação da matriz (que alteram o ambiente de tecido local e contribuem para a inflamação crônica e desenvolvimento de câncer) (KUILMAN et al., 2008; COPPÉ et al., 2008). Este fenótipo de senescência recentemente identificado é denominado Fenótipo Secretor Associado a Senescência (SASP), e posteriormente proposto por Daniel Peeper (KUILMAN; PEEPER, 2009), Secretoma Mensageiro de Senescência (SMS) também referido como secretoma associado a senescência, sugere que senescência pode ter um papel mais ativo e patologicamente diversificado (PEREZ-MANCERA; YOUNG; NARITA, 2014); estes fatores secretados associados a senescência estão envolvidos em desordens de homeostase, como por exemplo o câncer.

Fatores como IL-6 (Interleucina 6, atua como citocina pró-inflamatória), IL-8 (Interleucina 8, mediador da resposta imune inata inicial), PAI1 (inibidor do ativador do plasminogênio1), secretados a partir de células senescentes, podem promover supressão tumoral reforçando a senescência e induzindo o bloqueio da proliferação ocasionada por oncogenes ativados ou estresse oxidativo (KUILMAN et al., 2008; KORTLEVER; HIGGINS; BERNARDS, 2006). Entretanto, IL-6 e IL-8 são conhecidos também por promover a transformação maligna em cooperação com certos oncogenes (PARK et al., 2010; ANCRILE; LIM; COUNTER, 2007). Além disso, fatores secretados de fibroblastos senescentes parecem induzir uma transição epitélio-mesenquimal (EMT) (mudança do fenótipo epitélio para mesenquimal - processo que altera a morfologia e a funcionalidade de uma parcela das células do câncer), desta forma células epiteliais passam a se comportar como se fos-

sem células-tronco do câncer, o que é um processo importante na progressão do câncer e metástase (COPPÉ et al., 2008). Esses resultados indicam que a liberação dos fatores associados a senescência, o secretoma mensageiro da senescência (SMS) pode ser benéfico ou deletério dependendo do contexto biológico (OHTANI; HARA, 2013).

Estes fatores SMS podem recrutar células do sistema imunológico para eliminar células senescentes, influenciar na arquitetura ou na função de tecidos circundantes, modular a progressão do tumor, e contribuir para o envelhecimento e doenças associadas a idade (ELZI et al., 2012). O nome “*senescence-messaging secretome*” foi proposto para destacar que os fatores associados ao fenótipo secretor não são essenciais somente para iniciar o estado senescente, mas também para a sua manutenção e comunicação deste estado para o microambiente local (SABIN; ANDERSON, 2011).

O SMS cria uma rede de sinalização complexa na qual fatores secretados afetam não somente as células que os produzem (efeitos autócrinos) mas também as células vizinhas (efeitos parácrinos) (KUILMAN; PEEPER, 2009). A Figura 2.4 demonstra as diversas proteínas secretadas envolvidas na indução do estado senescente

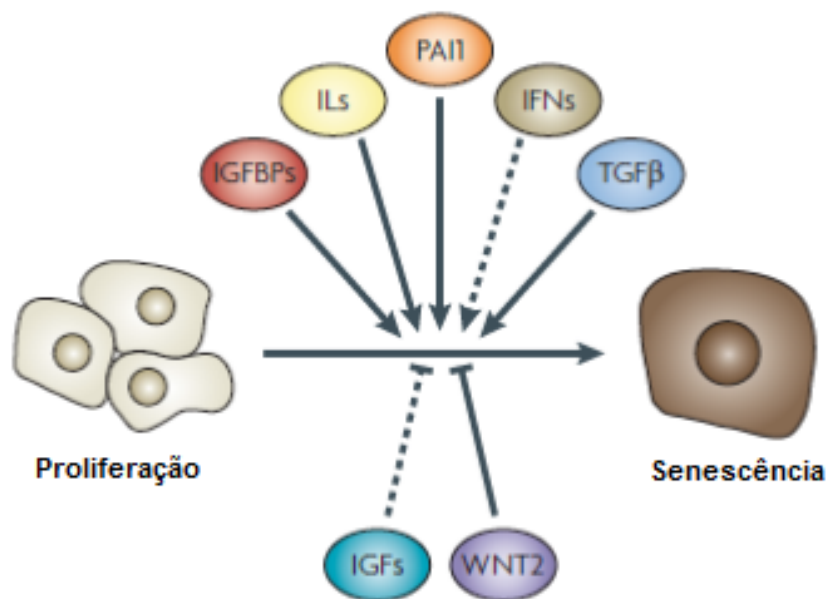


Figura 2.4 – Fatores do secretoma mensageiro da senescência (SMS) que contribuem para a indução e manutenção da senescência. IGF (proteína produzida no fígado em resposta ao hormônio de crescimento (GH)); IGFBP (uma das seis proteínas que se ligam especificamente ao fator de crescimento insulina IGF-I e IGF-II); ILs (constituintes dos sistemas imunológicos dos organismos); PAI1 (inibidor de fibrinólise, processo fisiológico que degrada coágulos de sangue); TGF $\beta$  (controla a proliferação, diferenciação celular, e outras funções na maioria das células); WNT2 (proteína envolvida na oncogenes e em diversos processos como regulação do destino celular e padronização durante embriogênese); IFNs (moléculas de comunicação entre as células para desencadear defesas do sistema imunológico, eliminando assim agentes patológicos)

Fonte: Adaptado de (KUILMAN; PEEPER, 2009).

A indução da senescência em diferentes tipos celulares depende de diversos fatores

secretados, estes incluem: IGF (membros do fator de crescimento semelhante a insulina); IGFBP (proteína de ligação à IGF); IL (família das interleucinas); PAI1 (inibidor do ativador do plasminogênio 1) e  $TGF\beta$  (fator transformador de crescimento  $\beta$ ), que estimulam a indução da senescência, bem como WNT2 (proteína proto-oncogênica), que inibe a implementação desta resposta, e IFNs (Interferon Tipo I), indicado pela linha tracejada na imagem (Figura 2.4) (KUILMAN; PEEPER, 2009).

A vantagem mais simples deste sistema de mensagens utilizado pelos SMS's é a comunicação tanto dentro como entre as células, por exemplo, supõe-se que por meio de sinais de SMS uma célula senescente envia um sinal de perigo para o seu microambiente, e isto seria vantajoso de várias formas. Diversos destes fatores tem sido demonstrados estarem associados com, e contribuir para a parada da proliferação, que opera em conjunto com programas de morte celular, tais como autofagia, apoptose e na prevenção da progressão tumoral (KUILMAN; PEEPER, 2009).

#### 2.4 FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO - *TRANSFORMING GROWTH FACTOR (TGF $\beta$ )*

Como mencionado previamente, dentre os fatores SMS,  $TGF\beta$  parece ter uma contribuição bem importante quando se trata de indução de senescência através do efeito parácrino dos fatores secretados pelas células senescentes. Além desta característica de  $TGF\beta$ , esta via de sinalização parece ter diversas contribuições no meio intracelular, como por exemplo, envolvimento no crescimento celular, diferenciação, apoptose, mobilidade, angiogênese, transição epitélio-mesenquimal (EMT), produção da matriz extracelular e envolvimento em patogêneses incluindo câncer, porém estes efeitos dependem do contexto celular e fisiologia do microambiente intracelular (MASSAGUÉ, 2008).

A via canônica de sinalização de  $TGF\beta$  é iniciada pelas SMAD2 e SMAD3 (Figura 2.5) que são ativadas via fosforilação pelo receptor tipo I de  $TGF\beta$  ( $T\beta$ -RI) e formam complexos heterotriméricos com SMAD4, estes complexos são então translocados ao núcleo (PETROCCA et al., 2008) e atuam como ativadores transcricionais. O membro 7 da família das SMADs (SMAD7) - que é um inibidor de SMAD - interfere na ativação de efetores (proteínas reguladoras de genes, canais iônicos, componentes de uma via metabólica ou componentes do citoesqueleto) de SMADs (SMADs 2 e 3) e atua como inibidor da sinalização da família  $TGF\beta$  (DERYNCK; ZHANG, 2003), porém a sinalização de  $TGF\beta$  induz expressão de SMAD7, formando assim um *loop de feedback negativo* (regulação negativa - controla a taxa de um processo para evitar a acumulação de um produto) (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001).

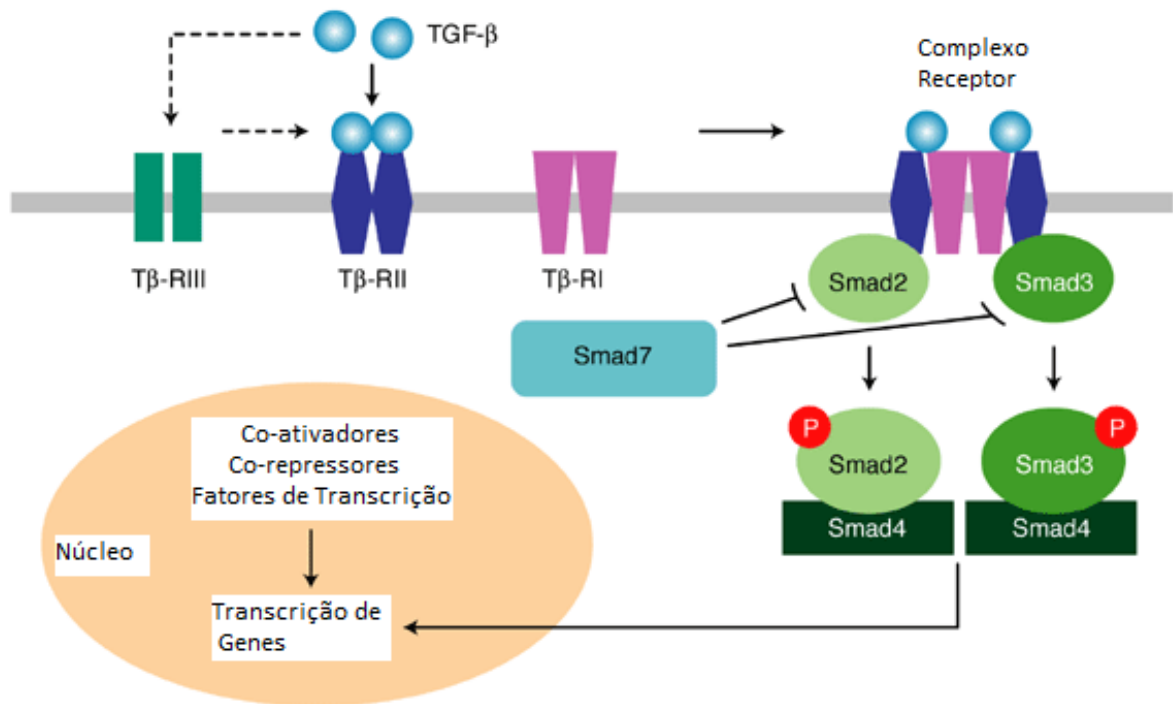


Figura 2.5 – Visão geral da via canônica de sinalização de TGF $\beta$ . O receptor T $\beta$ -RIII reforça a ligação de TGF $\beta$  com o receptor T $\beta$ -RII, após esta ligação, TGF $\beta$  fosforila T $\beta$ -RI levando a ativação de SMAD2 e SMAD3 por fosforilação (P). Este processo é inibido pelo SMAD7. SMAD2 ativado e SMAD3 formam heterodímeros com SMAD4 e translocam para o núcleo. Juntamente com co-ativadores, co-repressores e outros fatores de transcrição, o complexo Smad regula a expressão gênica

Fonte: Adaptado de <[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM5\\_05/S1462399403005684sup008.htm#43](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_05/S1462399403005684sup008.htm#43)>

Diversos estudos demonstram as diferentes funções da via de sinalização de TGF $\beta$ . De acordo com os pesquisadores, esta via pode atuar de duas maneiras distintas dentro do meio intracelular, com uma atividade de supressor tumoral ou atividade pró-tumoral (GUO et al., 2017; PRINCIPE et al., 2014; BACHMAN; PARK, 2005).

TGF $\beta$  assume o papel de supressor tumoral, atuando como inibidor de proliferação celular, entretanto, em células tumorais ele perde sua resposta anti-proliferativa e passa a se tornar um fator oncogênico (KUBICZKOVA et al., 2012). Este papel de inibidor de crescimento celular consiste na capacidade de TGF $\beta$  suprimir a função e expressão da proteína c-Myc (oncogene com diversas funções, dentre elas participa da regulação do ciclo celular) e das CDKs (quinases dependentes de ciclina) e além disto, aumentar a expressão de inibidores de CDKs como por exemplo *p15<sup>INK4b</sup>* (previne a formação do complexo ciclina D - Cdk4/6 que atua na fase G1) (YIKIM; KIM; KIM, 2005; HANNON; BEACH, 1994). Em outras palavras, TGF $\beta$  inibe a progressão do ciclo celular através da regulação de transcrição dos reguladores do ciclo celular, conforme demonstrado na Figura 2.6.

Em qualquer momento durante a divisão do ciclo celular as respostas anti-proliferativas

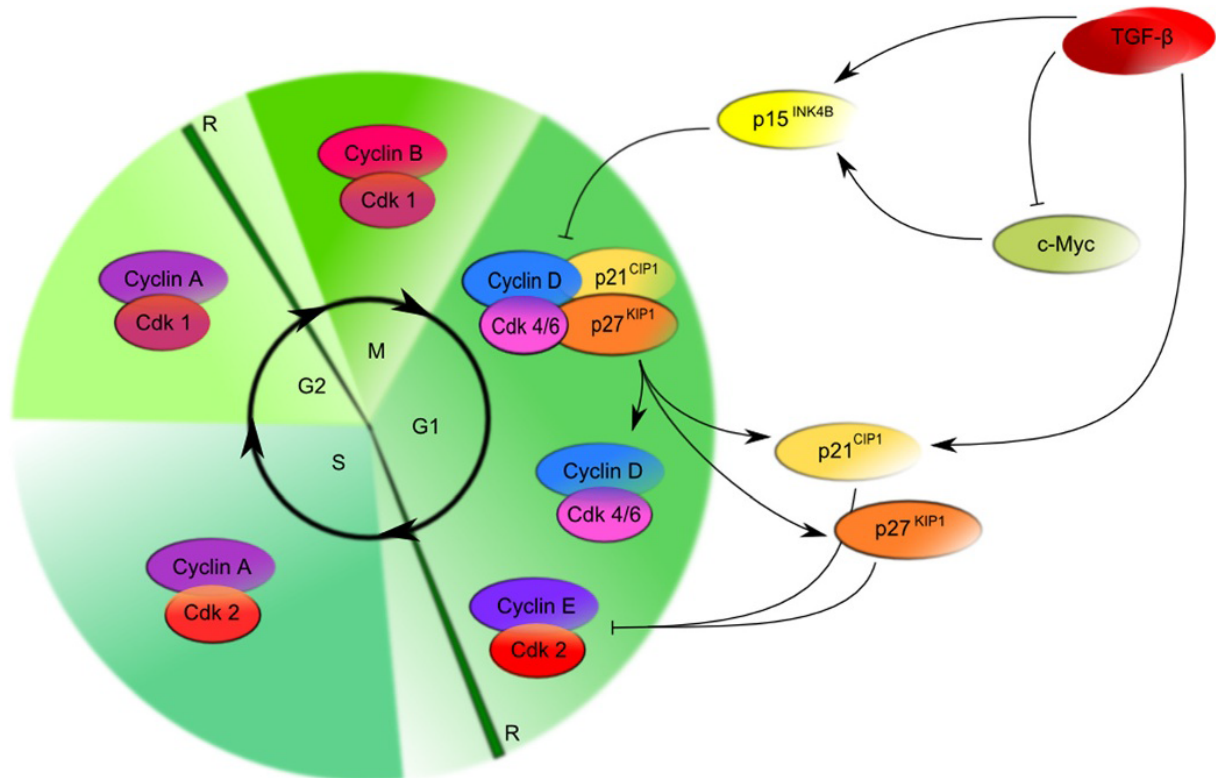


Figura 2.6 – TGF $\beta$  na regulação do ciclo celular - TGF $\beta$  inibe a expressão de c-Myc e induz a expressão de  $p15^{INK4b}$  o qual previne a formação do complexo ciclina D - Cdk4/6, além disso desloca  $p21^{CIP1}$  e  $p27^{KIP1}$  dos complexos. Estes inibidores CIP/KIP são posteriormente capazes de inativar outros complexos de fase G1 e S e, assim, inibir o ciclo celular. Baixos níveis de c-Myc permitem a transcrição de  $p15^{INK4b}$  e  $p21^{CIP1}$  induzida por TGF $\beta$

Fonte: Retirado de (KUBICZKOVA et al., 2012).

podem ser induzidas, porém as mesmas são eficazes apenas na fase G1 do ciclo (MAS-SAGUÉ; BLAIN; LO, 2000). Nesta fase, TGF $\beta$  medeia a parada do ciclo aumentando a expressão de inibidores de CDK, como  $p15^{INK4b}$  e  $p21^{CIP1}$  (também referido por p21), ou seja, uma vez que uma célula está comprometida a entrar em replicação, ela continuará a duplicar seu DNA, dividir e em seguida irá parar quando entrar na fase G1 (KUBICZKOVA et al., 2012).

No estágio inicial do tumor, esta via ocasiona parada do ciclo celular e apoptose, já em estágios tumorais mais avançados, promove mobilidade de células tumorais, invasão, transição epitélio para mesenquimal (EMT), progressão tumoral e metástase, este efeito adverso é conhecido como Paradoxo do TGF $\beta$  ("*TGF $\beta$  Paradox*") (WENDT; TIAN; SCHIEMANN, 2012). O mecanismo regente deste paradoxo permanece inexplicado, o fato é que em células benignas TGF $\beta$  promove inibição do ciclo celular, e em células cancerosas promove progressão celular e metástase (ZHANG; YU; LEE, 2014). Além disto, TGF $\beta$  é secretado por células tumorais e seus níveis aumentados também contribuem para a disseminação e crescimento tumoral, estimulando a transição epitélio mesenquimal, migração, invasão celular e a quimioatração (capacidade das células tumorais migrarem para órgãos

produtores de quimiocinas) da célula tumoral em direção a órgãos distantes (LEBRUN, 2012).

No estudo proposto por Zhang e colaboradores em 2014 (ZHANG; YU; LEE, 2014) eles demonstram as diversas explicações sobre este paradoxo, dentre elas, que  $TGF\beta$  ativa diferencialmente Erk (Quinases Reguladas por Sinais Extracelulares - *Extracellular Signal-Regulated Kinases*) em células benignas e cancerosas, ou seja, ativa Erk em células cancerosas e inativa em células não cancerosas. A via Erk ativada é um regulador chave para a proliferação celular, os pesquisadores observaram proliferação celular em células benignas com uma baixa dosagem de  $TGF\beta$  e parada de crescimento celular com uma alta dose em células benignas de estroma e também em células epiteliais benignas, ao mesmo tempo pode haver uma auto-indução de  $TGF\beta$  o que pode ocasionar uma dose elevada do mesmo e levar a parada do crescimento, ou seja, o nível de  $TGF\beta$  é regulado por um *loop* de *feedback* negativo. Já em células cancerosas Erk será ativado independente do nível de  $TGF\beta$  no microambiente, sendo Erk um regulador de progressão tumoral e metástase, ele também auto-induz  $TGF\beta$  criando um *loop* de *feedback* positivo (o que resulta em  $TGF\beta$  elevado no microambiente) na sinalização de  $TGF\beta$  na progressão tumoral.

Por fim, os pesquisadores do estudo de Zhang et al. 2014 (ZHANG; YU; LEE, 2014) afirmam que o termo paradoxo deve ser modificado, pois como apresentado no trabalho, células benignas podem ser estimuladas pelo  $TGF\beta$  para seguir proliferação se a dose de  $TGF\beta$  for baixa, além disto, células cancerosas em estágios iniciais, podem ser inibidas por  $TGF\beta$ . Em conclusão a este estudo, eles sugerem uma interpretação mais apropriada ao paradoxo, que  $TGF\beta$  medeia, em células benignas a homeostase (meio intracelular em equilíbrio independentemente das alterações que ocorram no meio extracelular), e em células cancerígenas avançadas promove a progressão tumoral e metástase.

$TGF\beta$  parece ter múltiplas funções, podemos destacar também sua contribuição quando se trata de terapia do câncer. Conforme um trabalho de revisão publicado em 2010 (ANSCHER, 2010), a expressão de  $TGF\beta$  é aumentada (*overexpressed*) após exposição a radiação e quimioterapia, de uma certa maneira  $TGF\beta$  parece ser responsável pelo desenvolvimento de lesão tecidual em tecidos normais após a terapia do câncer. A quantificação de  $TGF\beta$  no plasma e/ou o rastreamento de polimorfismos do mesmo podem ser ferramentas de investigação para identificar pacientes em maior ou menor risco de desenvolvimento de injúria tecidual normal, porém mais estudos são necessários para corroborar o uso destas informações genéticas e moleculares na clínica. Além disto, estratégias para monitorar  $TGF\beta$  reduzem claramente a gravidade da lesão tecidual normal em modelos animais.



## 2.5 MODELOS LÓGICOS

Um modelo lógico é definido por um grafo regulatório direcionado onde variáveis discretas são associadas com nós e regras lógicas utilizando os operadores AND, OR, e NOT para descrever as relações que determinam a evolução destas variáveis. Nestes grafos os componentes moleculares como genes e/ou proteínas, uma via (processo biológico) ou eventos fenomenológicos como apoptose e senescência, por exemplo, são representados pelos nós. As linhas representam efeitos de ativação ou inibição e as variáveis denotam níveis de atividade multivariadas (dois ou mais estados), ou booleanas (com estados 0 ou 1). Os componentes de entrada não são regulados e simbolizam condições constantes extrínsecas. A regra lógica define a evolução do nível de cada componente do gráfico submetido aos reguladores deste componente.

### 2.5.1 Definição

Um modelo lógico de uma rede regulatória  $(G, K)$  é definido por um conjunto de  $n$  componentes reguladores discretos  $G = (g_1, g_2, \dots, g_n)$ , onde cada  $g_i$  leva seus valores em  $(0, \dots, M_i)$  representando o intervalo de níveis funcionais do componente.

Os componentes podem representar concentrações de moléculas ou estados biológicos, processos biológicos (por exemplo, uma via) ou fenótipos (apoptose, senescência etc.). Um multi-valor  $g_i$  é considerado quando a variável tem efeitos diferentes em um alvo ou atua em níveis diferentes em alvos distintos. Os componentes de entrada não são regulados e representam condições externas constantes do ambiente.

O espaço de estados  $S$  de um modelo lógico é finito e um estado é um vetor  $g = [g_1, g_2, \dots, g_n]$ . Uma função lógica  $K_i$  define os valores de cada  $g_i$  em termos de interações ativadoras ou inibidoras que ligam o  $g_i$  que caracteriza um gráfico dirigido. A função de transição  $K$  é definida como  $K(g) = (K_1(g), \dots, K_n(g))$ . Variáveis de múltiplos valores são aumentadas ou diminuídas em 1, passo a passo.

Os gráficos de transição de estado (STG) são usados para descrever os comportamentos assintóticos na dinâmica de modelos lógicos chamados atratores. Os nós finais que não têm um estado sucessor em STG, isto é  $K(g) = g$ , correspondem a um estado estável ou, em contraste, a trajetória no STG pode ter um atrator cíclico.

Os esquemas de atualização mais comuns de um modelo lógico são os métodos síncrono e assíncrono. O método síncrono gera uma dinâmica completamente determinística, atualizando todas as variáveis em cada etapa do tempo, enquanto que no assíncrono cada variável é atualizada independentemente e pode gerar comportamento estocástico. Aqui usamos a atualização assíncrona definida da seguinte maneira (Eq. 5.1) para todos os  $i \neq j$ :

$$g_i(t + 1) = g_i(t) + \text{Sign}(K_i(g(t)) - g_i(t)), g_j(t + 1) = g_j(t) \quad (2.1)$$

Onde observamos que o valor  $g_i$  no instante  $(t+1)$  depende do sinal da diferença do estado que ele estava antes e o que influencia neste multi-valor. Se esta diferença for zero, ele permanece no mesmo estado, se for negativo desce para o próximo estado inferior e, se for positivo sobe para o próximo estado superior.

O método lógico permite a simulação de perturbações, conhecidas experimentalmente como perda de função (LoF) ou ganho de função (GoF), que consistem em fixar uma variável aos seus níveis mais baixos ou aos seus níveis mais elevados, respectivamente. O método também permite a consideração de diferentes escalas de tempo no mesmo modelo como acontece com a regulação da transcrição e os processos de fosforilação da proteína.

Para uma descrição mais detalhada sobre o formalismo lógico brevemente explicado aqui, ver a referência (ABOU-JAOUDE et al., 2016).

Nesta seção estão alguns exemplos de modelos lógicos de regulação de redes genéticas, os quais fazem uso de metodologias semelhantes a utilizada por nós neste trabalho de pesquisa.

### 2.5.2 Rede Booleana de Transdução de Sinal

Em um artigo publicado em 2009, Poltz e colaboradores (POLTZ et al., 2009) apresentam um modelo de rede Booleana de transdução de sinal induzido por estresse genotóxico em células epiteliais humanas com ênfase na ativação de NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B envolvido em inflamação) e apoptose, devido a quebras duplas no DNA. Os autores integraram diferentes vias de apoptose e investigaram possibilidades diversas de intercomunicação (*crosstalk*) entre essas vias. Foram identificados quatro estados estáveis da rede, dois estados compreendendo sobrevivência celular e dois estados conduzindo à apoptose.

A rede proposta neste estudo (Anexo A) inclui 69 espécies conectadas por 72 reações. Os estímulos genotóxicos constituem a entrada (*Input*) na parte superior da rede. Os sinais são transmitidos para a parte intermediária da rede, e processados. Estes sinais são conectados a proteínas na parte da saída (*output*) na parte inferior da rede, por exemplo, a apoptose.

Os autores simularam um tratamento de células tumorais com radiação ionizante e o inibidor VP16 (etoposídeo, droga citotóxica anticâncer, pertencente à classe de drogas inibidoras de topoisomerase) da topoisomerase II (enzima que desempenha papel nos processos de replicação e empacotamento do DNA), e identificaram moléculas alvo putativas

para impedir a sobrevivência de células de tumor pela anulação da ativação de NF- $\kappa$ B, deixando inalteradas as vias apoptóticas. Este modelo identificou alvos, os quais podem aumentar a eficácia da radioterapia e quimioterapia de tumores, além disso permitiu uma melhor compreensão e visualização das vias de sinalização em resposta ao estresse genotóxico, facilitou a interpretação de dados experimentais publicados, o que pode indicar novos alvos para estratégias terapêuticas ou descoberta de novos medicamentos.

### **2.5.3 Modelo de Rede de Sinalização MAPK**

Em um estudo proposto por Grieco e colaboradores (GRIECO et al., 2013), os autores após uma análise de dados publicados, propuseram um mapa genérico para a rede de sinalização MAPK (Proteína quinase ativada por mitógeno), cuja função é responder a estímulos extracelulares (mitógenos) e regular várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, sobrevivência celular e apoptose. Com o objetivo específico de explorar as respostas MAPK a diferentes estímulos e melhor entender sua contribuição com o destino celular, foram considerados somente componentes e interações cruciais para codificar um modelo lógico utilizando o software GINsim (Gene Interaction Network simulation). Este modelo tem foco em câncer de bexiga, onde a desregulação da rede MAPK está associada muitas vezes a fenótipos específicos. Mecanismos proliferativos ou antiproliferativos podem ser conectados com desregulações em câncer de bexiga estabelecido, como, Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) e mutações de ativação do Receptor do Fator de Crescimento de Fibroblastos do tipo 3 (FGFR3).

A Figura 2.7 demonstra a rede proposta, onde a ativação de alvos de MAPK influencia na escolha entre proliferação, parada do crescimento e apoptose. Cada um dos 52 componentes do gráfico de regulação foi modelado por uma variável Booleana regida por uma regra lógica.

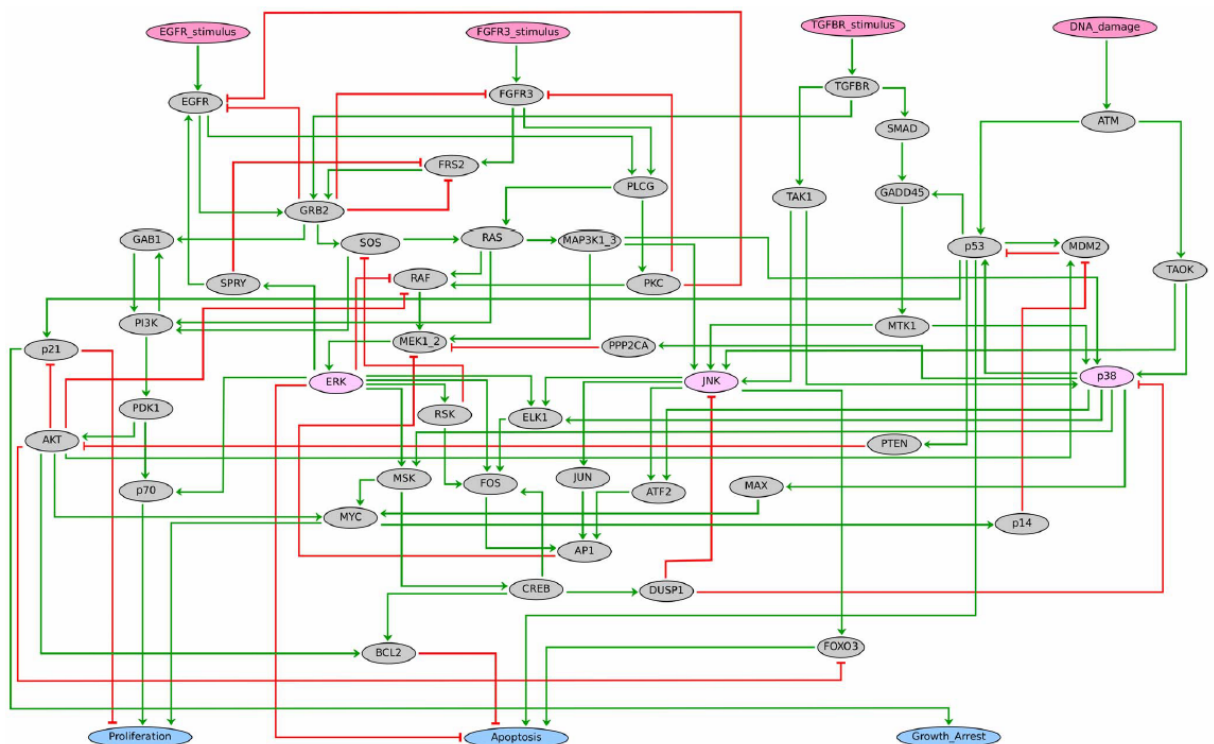


Figura 2.7 – Gráfico regulatório do modelo lógico de MAPK. Cada nó demonstra um componente do modelo. As entradas do modelo, fenótipos e proteínas MAPK (ERK, p38, JNK) são indicados em rosa, azul e rosa claro, respectivamente. As setas verdes e setas vermelhas indicam regulações positivas e negativas, respectivamente

Fonte: Retirado de (GRIECO et al., 2013).

## 2.5.4 Modelo Lógico de Senescência Induzida por Dano ao DNA

O modelo proposto por Mombach e colaboradores (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015) propõe um modelo lógico discreto de senescência em astrócitos determinado pelo nível de dano no DNA, considerando com função central na regulação de senescência e SASP a quinase p38MAPK.

O DNA pode ser danificado de duas maneiras, através de quebra simples (do inglês, *Single Strand Break* - SSB) ou quebras duplas (do inglês, *Double Strand Break* - DSB) da cadeia de DNA (MEDEMA; MACUREK, 2012). As vias de resposta a estes danos ocorrem através de ativação de *checkpoints* do ciclo celular, onde ocorrerá o reparo do DNA e a consequente proliferação celular, ou a parada permanente do ciclo celular onde ocorre a indução da senescência ou apoptose celular, esta decisão e os processos envolvidos nela, estão representados pelo modelo regulatório lógico apresentado na Figura 2.8.

Esta rede é uma proposta do mecanismo envolvido na regulação da senescência em astrócitos e SASP através da indução de *checkpoints*.

Em um trabalho anterior, foi proposto uma rede regulatória para o papel da proteína p38MAPK na senescência, limitado ao *checkpoint* G1/S (MOMBACH; BUGS; CHAOUIYA,

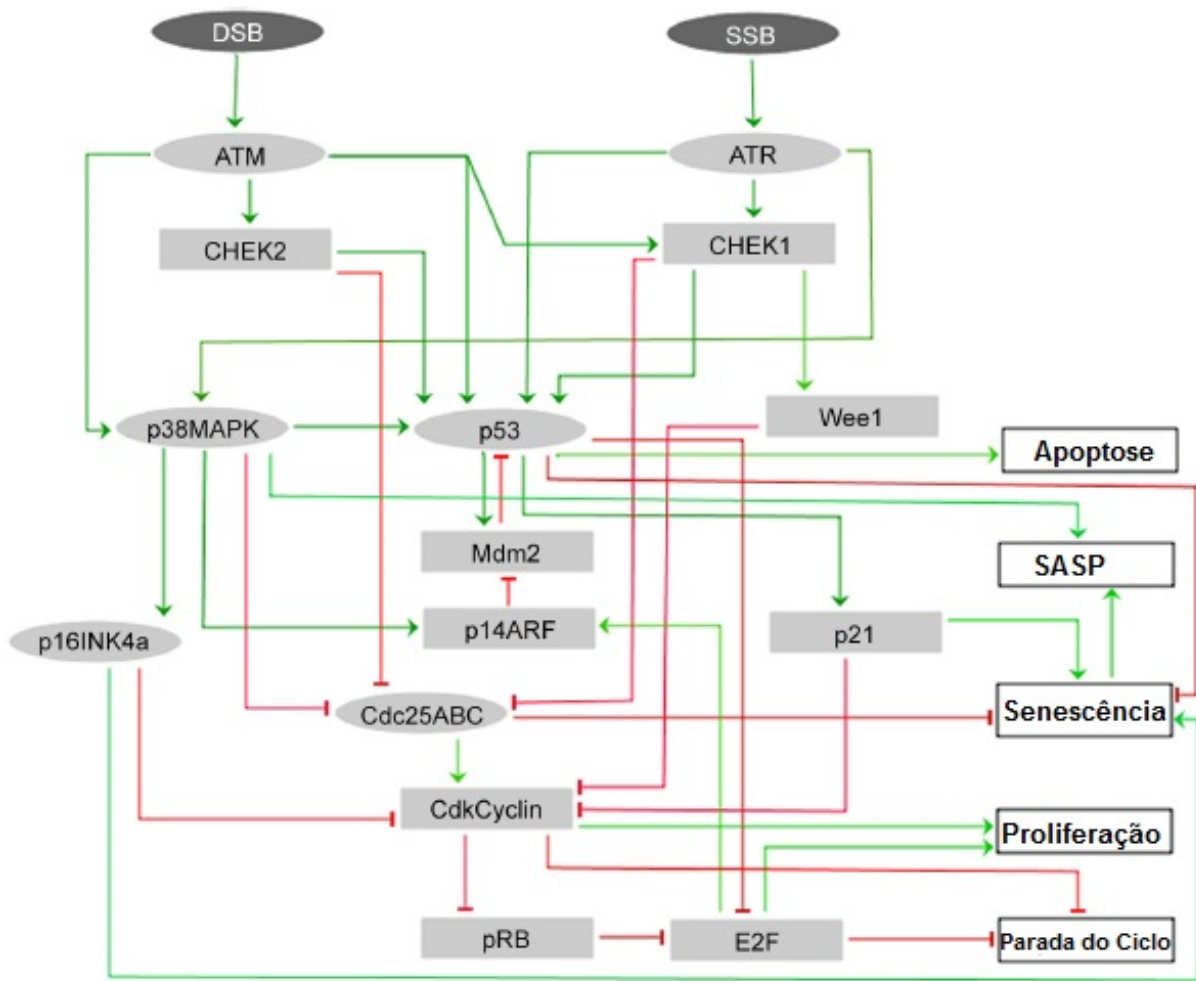


Figura 2.8 – Rede regulatória para decisão do destino de astrócitos. Nós retangulares = nós Booleanos, e nós elípticos = nós de múltiplos valores. Nós de entrada: quebras simples do DNA (SSB) e quebras duplas (DSB). Nós de saída na cor branca representam as possíveis decisões celulares, e os nós internos são os reguladores das saídas. As linhas em verde representam ativação e as em vermelho, inibição

Fonte: Adaptado de (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015).

2014). Neste modelo, Mombach e colaboradores incluíram o ponto de verificação G2/M para construir uma estrutura unificada de ativação do checkpoint no qual p38MAPK regula o destino da senescência. Com o DNA danificado, a progressão do ciclo celular pára transientemente e há ativação dos *checkpoints* G1/S e G2/M, os quais possuem mecanismos moleculares similares, a inibição da família das proteínas 25 (CDC25A/B/C) necessárias para o ciclo celular, é um exemplo de similaridade de mecanismos nestes *checkpoints*.

As regras lógicas utilizadas neste modelo foram baseadas na interpretação dos autores de informações biológicas presentes na literatura, além de vários testes manuais da rede em questão, o que mostrou consistência entre as previsões do modelo e conhecimentos experimentais prévios.

As entradas do modelo (SSB e DSB) podem assumir diferentes valores, dependendo do nível de dano considerado, 0 (sem dano), 1 (dano reparável) e 2 (dano irreparável).

vel). Quando há um dano reparável, p53 é induzida ao nível médio ( $p53 = 1$ ), quando ela atinge seu valor mais alto,  $p53 = 2$ , a apoptose é desencadeada, mas isso ocorre somente para danos altos,  $SSB = DSB = 2$ .

No caso de ausência de dano, ocorre ativação do complexo de proteínas (CDK/Cyclin) que promove o ciclo celular para ambos os *checkpoints* (G1/S e G2/M) e a proliferação, a parada do ciclo é inibida se CDK/Cyclin e E2F estiverem inativadas. Para a ocorrência de senescência, é necessária ativação de p21 e  $p16^{INK4a}$ , inativação de Cdc25ABC e p53 em um nível menor que 2, entretanto, se houver ativação de Cdc25ABC o estado senescente pode ser ativado se  $p16^{INK4a}$  estiver em um nível igual a 2. SASP ocorre quando houver ativação de p38MAPK e senescência. Estas regras lógicas utilizadas para os nós de saída do modelo estão melhor representadas na Tabela 2.1. As regras para os outros elementos da rede podem ser encontradas no artigo original.

Tabela 2.1 – Regras lógicas empregadas no controle da rede da Figura 2.8 e interpretação dos níveis. AND (&), OR (|) e NOT (!) são operadores lógicos usados para determinar a regra para cada nó definido em termos do estado de seus reguladores

	Nó	Regra Lógica
Entradas	SSB e DSB	= 0 (Sem Dano)
		=1 (Dano Reparável)
		=2 (Dano Irreparável)
Saídas	Parada Ciclo	!CdkCyclin   !E2F
	SASP	1: p38MAPK AND senescência
	Proliferação	1: CdkCyclin = 1 AND E2F = 1
	Senescência	[p16INK4a = 1 AND p21 = 1 AND NOT (Cdc25ABC = 1–2) AND NOT (p53 = 2)] OR (p16INK4a = 2 AND p21 = 1 AND NOT (Cdc25ABC = 2) AND NOT (p53 = 2)]
	Apoptose	1: p53 = 2

Fonte: Adaptado de (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015).

A intensidade do dano pode estar em três níveis, e são as responsáveis pela tomada das decisões. Quando não existe ocorrência de dano, a intensidade é considerada 0. No caso do dano ser reparável, a intensidade assume valor 1, e, para os danos irreparáveis, valor 2. No entanto, p38MAPK ainda pode assumir um valor de intensidade igual a 3, quando ATM e ATR estão em seus níveis máximos. Dessa forma, há 9 combinações possíveis de valores SSB e DSB (2 colunas mais à direita) demonstrado na Figura 2.9, resultando cada uma delas, em um único destino estável definido pelos valores das saídas (5 colunas da esquerda). Esta imagem representa as nove possíveis combinações de danos no DNA consideradas no modelo proposto pelos pesquisadores.

		Decisões Destino Celular (Saídas)															Níveis Dano no DNA (Entradas)							
		Apoptose	Parada Ciclo	Senescência	Proliferação	SASP	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	ATM	ATR	DSB	SSB	
Estados Estáveis	Estado Proliferativo			1																				
	Estados Transitórios Parada do Ciclo Celular		1					1		1	1	1		1	1		1			1		1	1	
			1					1	1	1	1	1	1	1	1	1		1		2	1	1	1	1
Estado Senescente		1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2				2		2			
		1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2				2	1	2	2	1	
Estado Apoptótico		1	1			1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2	2	2	2	

Valores das componentes do modelo

Figura 2.9 – Estados estáveis do modelo para caso tipo selvagem de astrócitos. Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores de cada uma das 3 diferentes intensidades de dano. Os números representam valores de estados variáveis e os espaços vazios correspondem ao valor de estado zero

Fonte: Adaptado de (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é estudar e expandir a rede de regulação proposta por Mombach e colaboradores (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015) considerando a sinergia entre a sinalização  $TGF\beta$  e dano ao DNA no destino celular em células humanas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são os seguintes:

1) Estudar e buscar dados acerca da sinalização  $TGF\beta$  bem como seus efeitos na indução de danos ao DNA em células humanas.

2) Utilizar estes dados na construção de uma nova rede regulatória de interação entre proteínas considerando diferentes fenótipos de saída como prováveis destinos celulares frente a diferentes níveis de danos ao DNA e diferentes níveis de expressão da via  $TGF\beta$ .

3) Apresentar uma rede lógica de interação genética e submeter algumas proteínas constituintes da mesma à simulações de perda (*Loss of Function*) e ganho (*Gain of Function*) de funções oriundos de pesquisas bibliográficas realizadas previamente.



## 4 METODOLOGIA

A metodologia deste trabalho foi dividida em três etapas.

Inicialmente foram feitas pesquisas bibliográficas buscando informações sobre as interações biológicas entre as proteínas envolvidas na sinalização de indução de dano ao DNA, bem como as proteínas envolvidas na via de sinalização de TGF $\beta$ .

Após a primeira fase, foi desenvolvida uma nova proposta de rede regulatória de interação entre as proteínas estudadas na fase inicial do projeto, as quais foram adicionadas ao modelo de rede proposto por Mombach e colaboradores.

Por fim, a nova rede foi submetida a diversas simulações como perda e ganho de função de proteínas a fim de validá-la utilizando informações retiradas de trabalhos experimentais ou de revisão.

Este trabalho fez uso de bancos de dados e *software* demonstrados nas seções e subseções seguintes.

### 4.1 BANCO DE DADOS GENÔMICOS

Os bancos de dados biológicos foram criados para disponibilizar dados para os cientistas, concentrando em um único local o máximo possível de informação. O uso de bancos de dados facilita o acesso a dados publicados, diminuindo assim o tempo de coleta, caso fosse necessário buscar dados em bibliografias, e além disto, os dados são disponibilizados juntamente com suas referências bibliográficas, dando um suporte ainda maior a informação disponibilizada ao usuário.

Abaixo, os bancos de dados online utilizados para a pesquisa relacionada às interações das proteínas.

#### 4.1.1 STRING 10

O completo entendimento acerca das interações diretas e indiretas entre proteínas de uma determinada célula é de extrema importância no sentido de uma descrição abrangente de mecanismos e funções celulares. As interações proteicas, atualmente são disponibilizadas em vários níveis de detalhes em recursos online, que vão desde repositórios de dados brutos a bancos de dados altamente formalizados (FRANCESCHINI et al., 2013).

A base de dados do String (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) tem como objetivo fornecer uma avaliação crítica da interação proteína-proteína, incluindo associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). Esta ferramenta baseia-se na associação funcional entre proteínas, ou seja, uma relação funcional específica e produtiva entre duas proteínas, contribuindo para um mesmo propósito biológico. As interações entre proteínas presentes nesta base de dados são derivadas de várias fontes como: oriundas de interações experimentais; conhecimento de vias (analisado a partir de bancos de dados); baseadas em resumos e artigos de textos completos; previstas por algoritmos e análises de co-expressão; interações observadas em um organismo e sistematicamente transferidas para outros organismos através de relações de ortologia pré calculadas (SZKLARCZYK et al., 2014).

No STRING é possível consultar as interações de uma única proteína de interesse, ou de um grupo de proteínas, a rede resultante pode ser analisada, reorganizada de forma interativa ou agrupada em rigor variável. Cada nó de proteína na rede, possui a informação estrutural em 3D e clicando sobre ela abre uma janela com informações a respeito de sua estrutura homóloga, comentários, dentre outras informações. Cada conexão na rede indica uma interação conhecida ou prevista, e leva a uma janela com informações acerca da interação e seus respectivos níveis de confiança.

#### 4.1.2 Ingenuity Target Explorer

Target Explorer (<https://targetexplorer.ingenuity.com/index.htm>) desenvolvido pela *Ingenuity Systems Inc.*, é uma base de dados online com informações de redes de interações entre proteínas e vias biológicas. O banco de dados é composto por milhões de interações que são manualmente organizadas por cientistas na área os quais fazem uso de bibliografias atualizadas para tais. A base de dados comporta 200.000 artigos científicos completos, com mais de 9.800 dados de humanos e 7.900 de ratos (CALVANO et al., 2005).

A interface do site proporciona que o usuário entre com o nome de qualquer proteína e obtenha todas as informações a respeito da mesma, como por exemplo, as vias as quais ela pertence, os marcadores *downstream* e *upstream*, juntamente com as referências bibliográficas das quais as informações foram extraídas, possibilitando assim, informações mais completas aos usuários.

#### 4.2 GINSIM 2.9.4

A maioria das redes de regulação de genes de interesse envolvem muitos componentes conectados através de loops de *feedback* positivos e negativos, sendo assim uma

compreensão intuitiva da dinâmica envolvida neste processo é difícil de se obter, com isto, métodos formais e ferramentas computacionais para a modelagem e simulação de redes de regulação gênica são indispensáveis para o entendimento da dinâmica de interação entre proteínas (JONG, 2002).

A utilização de simulação computacional para a compreensão de processos celulares é amplamente aceita e existe uma variedade de quadros de modelagem os quais foram projetados para atender a esta necessidade, o software GINsim é um exemplo (CHAOUIYA; NALDI; THIEFFRY, 2012).

O GINsim (*Gene Interaction Network Simulation*) é um método computacional desenvolvido em Java, para modelar e simular redes regulatórias, que consiste de um simulador de modelos qualitativos de redes regulatórias genéticas baseadas em um formalismo lógico e discreto. GINsim (<http://www.ginsim.org/downloads>) permite ao usuário utilizar um modelo de rede regulatória genética em termos de funções lógicas assíncronas, multivariadas, e simular e/ou analisar o respectivo comportamento dinâmico qualitativo (Tutorial GINsim).

A Figura 4.1 é um exemplo de rede regulatória produzida através do GINsim de um estudo sobre controle do ciclo celular da levedura de fissão, acima o gráfico da rede, e no painel inferior é possível ver os parâmetros ligados ao nó selecionado (Cdc2\_13): nível máximo = 2, valor controle = 0, cinco interações de entrada (painel inferior direito), e os parâmetros lógicos (inferior ao centro), que são os valores para combinações de interações de entrada.

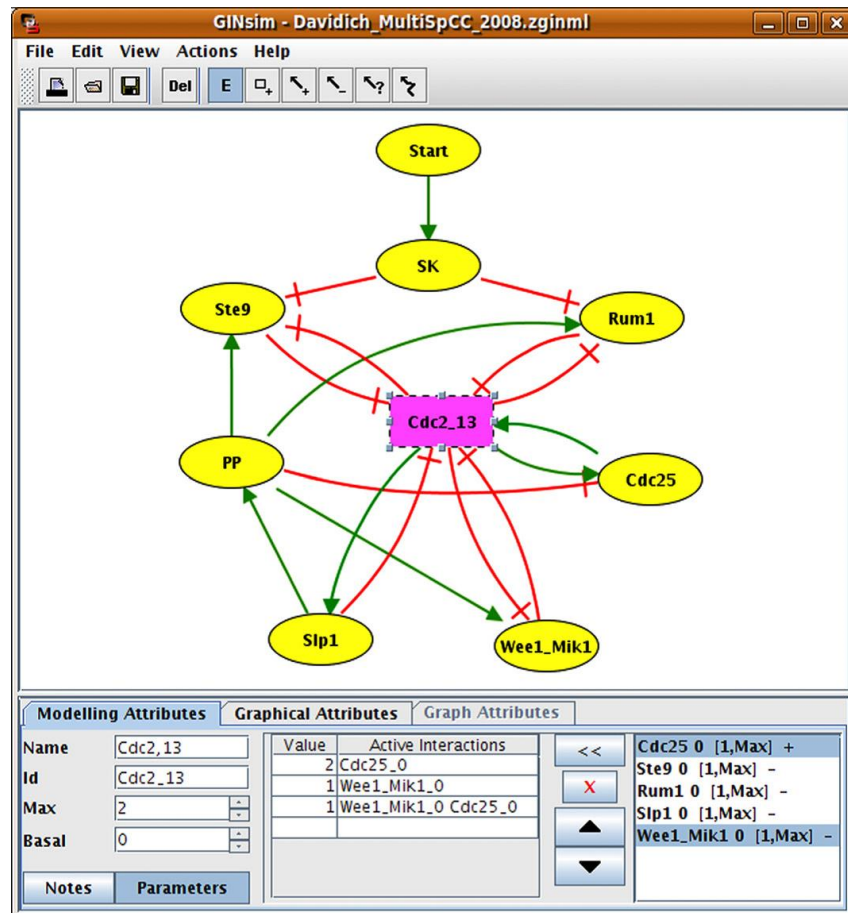


Figura 4.1 – Janela principal do GINsim exibindo um exemplo de gráfico de rede regulatória de um estudo publicado

Fonte: Retirado de (DAVIDICH; BORNHOLDT, 2008).

Com base na definição de um gráfico de regulação e os parâmetros lógicos associados, este software calcula a evolução temporal do sistema, que é representado em termos de um gráfico de transição de estado, e é também possível definir uma série de configurações de simulações como por exemplo: condições iniciais e perturbações, e armazená-las juntamente com o modelo. Em resumo, GINsim fornece um ambiente intuitivo e versátil para definir modelos qualitativos para redes de regulação biológicas e para explorar as suas propriedades dinâmicas (DAVIDICH; BORNHOLDT, 2008).

## 5 CONSTRUÇÃO DA REDE

As células senescentes podem transmitir seu estado a outras células vizinhas de uma maneira parácrina. Sabe-se que essas células secretam uma variedade de fatores e este secretoma induz em células normais próximas às células senescentes esta mesma característica, ocasionando assim a chamada “*senescência bystander*” (ACOSTA et al., 2013). Neste mesmo estudo, os autores identificaram vários fatores de SASP no controle de senescência como por exemplo, membros da família do Fator de Transformação do Crescimento Beta ( $TGF\beta$ ), o qual ativa a transcrição de p21, Fator do Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), e Quimiocinas CCL2 e CCL20 (*chemokine (C-C motif) ligand 2/20*) - as Quimiocinas fazem parte de uma família especializada de citocinas, que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação.

De acordo com a pesquisa de Acosta e colaboradores (2013), os efeitos destes fatores secretados são contraditórios, dependendo do tipo celular e do ambiente, a senescência pode promover ou suprimir o desenvolvimento do câncer. Os fatores que causam a senescência são em sua maioria alvos fáceis para fármacos, pode-se inibir ou ativa-los usando medicamentos já conhecidos. Definir de que maneira os fatores secretados aumentam ou suprimem o desenvolvimento de um tumor será crucial para o desenvolvimento de novas drogas tumorais.

Diversos estudos (ACOSTA et al., 2013; NELSON et al., 2012; HUBACKOVA et al., 2012) relatam que componentes de SASP, mais notavelmente  $TGF\beta$ , podem também desencadear senescência em células vizinhas de uma maneira parácrina, através de um mecanismo que gera ROS (espécies reativas de oxigênio) e dano no DNA.

Em um estudo de revisão publicado em 2013 (MUÑOZ-ESPÍN et al., 2013), os autores investigaram a associação funcional possível da via  $TGF\beta$  com desenvolvimento da senescência programada (developmentally programmed senescence) mediada por p21. Em particular,  $TGF\beta$  ativa a transcrição do gene p21 através dos complexos SMAD (*Mothers Against Decapentaplegic Homolog*), que são proteínas intracelulares que transduzem sinais extracelulares para o núcleo onde há ativação da transcrição de genes.

Os membros da família  $TGF\beta$  controlam crescimento, diferenciação, e apoptose de células e possuem importantes funções durante o desenvolvimento embrionário (MOUSTAKAS; SOUCHELNYTSKYI; HELDIN, 2001). A sinalização de  $TGF\beta$  ocorre através de um complexo de superfície celular de dois tipos de quinases transmembrana de serina/treonina, chamado de receptores “tipo I” e “tipo II” ( $T\beta RI$  e  $T\beta RII$ ).

Em um estudo de revisão publicado em 2014, Daniel e colaboradores (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014) apresentaram as diferentes vias moleculares indutoras de senescência e seus diversos indutores (Figura 5.1), dentre eles o  $TGF\beta$  que é um componente da via SASP (Fenótipo Secretor Associado a Senescência), o qual aumenta a

expressão dos inibidores do ciclo celular (p21, p27 e p15) através do complexo SMAD.

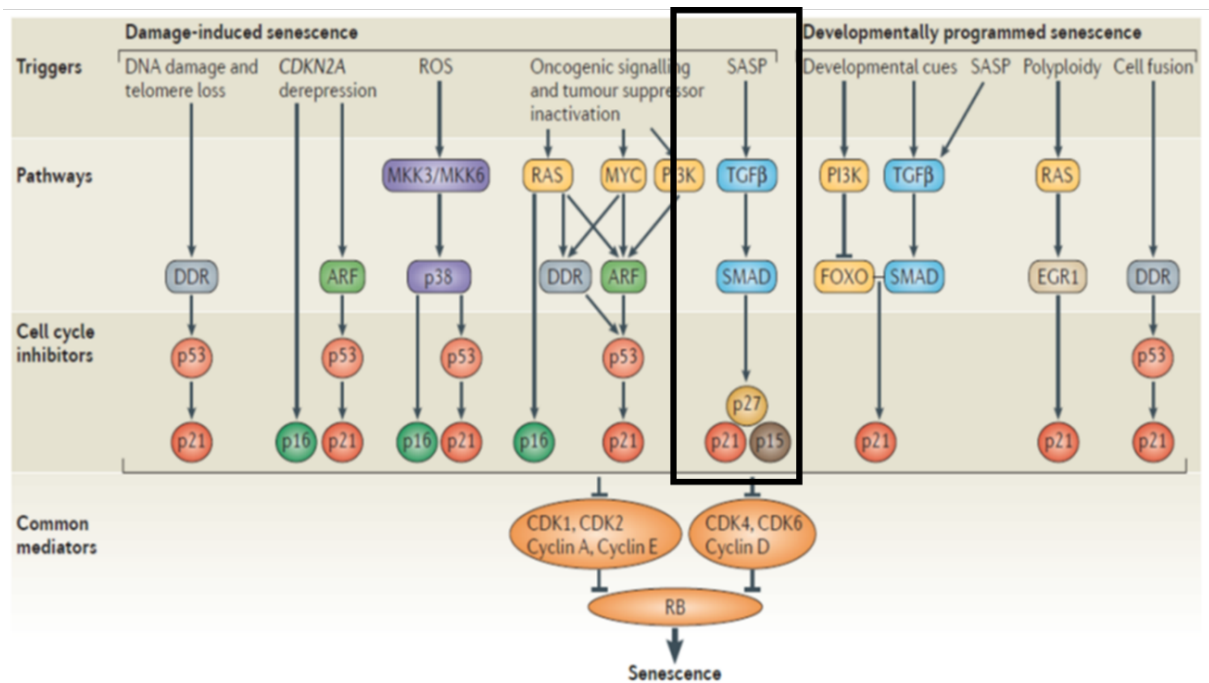


Figura 5.1 – Exemplos de vias moleculares indutoras de senescência. O modelo proposto por Mombach (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015) contempla a primeira via (*DNA damage and telomere loss*) representada na imagem, a via SASP destacada é a via considerada na rede demonstrada nesta pesquisa. Fonte: Adaptado de (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014).

A proteína SMAD7 medeia o *crossstalk* entre  $TGF\beta$  e outras vias de sinalização, sua expressão diminuída (*deregulation expression*) pode ser observada em diversas doenças humanas, incluindo fibrose de tecidos e doenças inflamatórias como a carcinogênese. Já a sua expressão aumentada (*overexpression*) sugere um potencial terapêutico desta proteína, atuando como antagonista na fibrose, inflamação e carcinogênese (YAN; LIU; CHEN, 2009).

Um artigo de revisão publicado em 2013 (STOLFI et al., 2013) nos diz que estudos experimentais comprovam que SMAD7 pode atuar de maneira diferencial em tumores dependendo do contexto analisado, em adicional a isto, é sabido que SMAD7 apresenta sua expressão diminuída em diversos cânceres, com isto, intervenções terapêuticas com esta proteína podem influenciar no desenvolvimento e/ou progressão de tumores humanos.

Um trabalho experimental publicado por Minli Wang em 2012 (WANG et al., 2012) estudou o papel das proteínas SMAD na resposta ao dano do DNA (DDR) e o *cross-talk* entre  $TGF\beta$  e a via ATM. Os autores utilizaram radiações de diferentes tipos (*LET - Transferência Linear de Energia*) e marcadores de quebras duplas (DSBs) em fibroblastos humanos e células epiteliais. Eles concluíram que SMAD2 e SMAD7 contribuem para a sinalização de quebras duplas induzidas por radiação ionizante de uma maneira depen-

dente de ATM ou  $T\beta R1$ , ou seja, a fosforilação de SMAD2 é dependente de ATM enquanto que formação foco de SMAD7 (*SMAD7 focus formation*) é dependente do receptor de  $TGF\beta 1$  seguido de exposição à radiação ionizante, a interação entre as vias de resposta de  $TGF\beta/SMAD$  e ATM foi apresentada conforme demonstrado na Figura 5.2

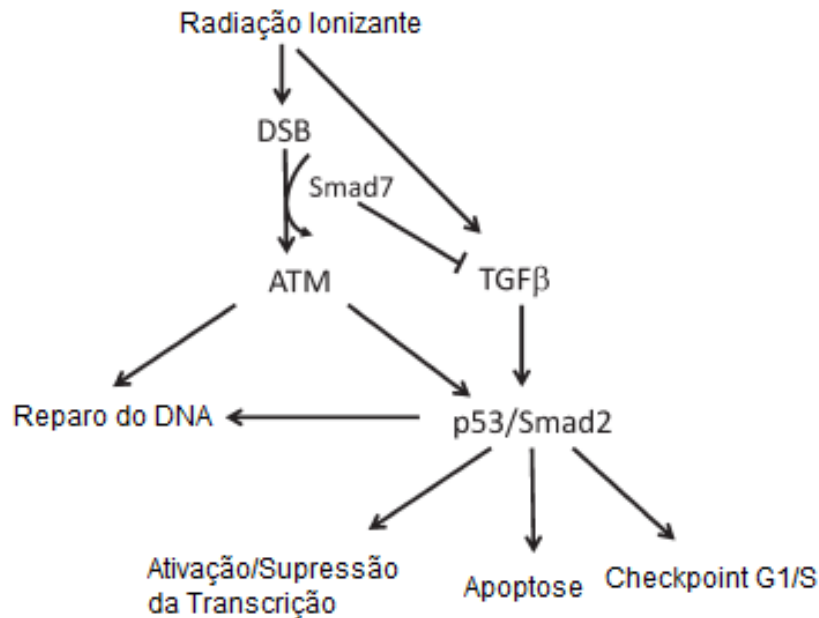


Figura 5.2 – Modelo esquemático da relação entre as vias ATM e  $TGF\beta$  após exposição à radiação ionizante. p53 interage fisicamente com Smad2. Smad7 e Smad2 estão envolvidos na via de sinalização de danos ao DNA

Fonte: Adaptado de (WANG et al., 2012).

$TGF\beta$  é um potente indutor de inibição de crescimento em diversos tipos celulares, incluindo células epiteliais (MOSES; YANG; PIETENPOL, 1990), um dos mecanismos que ocasiona a indução da parada do crescimento por  $TGF\beta$  é a indução da expressão de inibidores de CDK (quinases dependentes de ciclina) como  $p15^{INK4b}$  (SEOANE et al., 2001) e/ou p21 (REYNISDOTTIR et al., 1995), dependendo do tipo celular.

A proteína p21 (codificada pelo gene CDKN1A) é sensível a níveis baixos da proteína p53 (p53 ativa p21), ou seja, na ocorrência de danos leves ao DNA ocasionando um bloqueio de G1 ou G2, é possível que as células sobrevivam até que o reparo celular tenha sido feito ou o estresse tenha sido removido (LI et al., 2012). A p21 interage com os complexos CDK2 e Ciclina A ou Ciclina E e inibe a atividade de CDK2, prevenindo a progressão do ciclo celular (REYNISDOTTIR et al., 1995), além disso, conforme mencionado anteriormente, p21 também pode induzir senescência dependente de p53, que é uma parada irreversível do ciclo celular que pode ser desencadeada após dano ao DNA, ativação de oncogenes, dentre outros fatores (BUNZ et al., 1998). Já a proteína  $p15^{INK4b}$  interage e inativa CDK4 e CDK6 ou associa-se com complexos de Ciclina D de CDK4 e CDK6.

TGF $\beta$  pode também participar da ativação de GADD45 $\beta$  (YOO et al., 2003). Os membros desta família GADD45 - *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible 45* – incluem as proteínas GADD45 $\alpha$ , GADD45 $\beta$  e GADD45 $\gamma$ , participam da sinalização de estresse em resposta a agentes estressores fisiológicos ou ambientais resultando na parada do ciclo celular, reparo do DNA, sobrevivência celular, senescência e apoptose (KIM et al., 2013). Suas funções são similares, mas não idênticas, e suas induções dependem do tipo celular e condições ambientais. Essas proteínas são detectadas em células normais adultas e em tecidos fetais, especialmente em populações de células quiescentes e são altamente expressas durante a fase G1 do ciclo celular, com redução significativa de expressão durante a fase S (KEARSEY et al., 1995).

Após um dano no DNA toda a família das proteínas GADD45 é induzida rapidamente, resultando na parada do ciclo celular e/ou apoptose, ou elas participam ativamente dos mecanismos de reparo do DNA. Esta família de proteínas tem grande relevância no desenvolvimento e progressão do câncer (GARCIA et al., 2005), e além disto após ocorrência de dano ao DNA, elas têm um papel crucial na prevenção da transformação de células normais em células malignas (FORNACE; ALAMO; HOLLANDER, 1988).

A expressão de GADD45 $\alpha$  pode ser induzida por BRCA1 (*Breast Cancer 1, Early Onset*), que é uma fosfoproteína nuclear que desempenha papel na manutenção da estabilidade do genoma, e também atua como supressor tumoral (GILMORE et al., 2003). A superexpressão de BRCA1 induz GADD45, porém o mecanismo molecular de como BRCA1 induz GADD45 ainda não é claro, todavia um estudo publicado em 2000 (JIN et al., 2000), demonstra que o mecanismo pelo qual BRCA1 induz GADD45 é principalmente através da ativação do promotor de GADD45.

BRCA1 além de induzir GADD45 $\alpha$ , induz também a expressão de p21 através da transativação da expressão deste inibidor de Quinase Dependente de Ciclina de uma maneira independente de p53, o que leva a consequente regulação negativa do ciclo celular devido a sua habilidade de induzir p21 (SOMASUNDARAM et al., 1997).

Entre o grupo de proteínas que ativam BRCA1 temos as quinases ATM e ATR. Cortez e colaboradores demonstraram em estudos *in vivo* e *in vitro* que ATM fosforila BRCA1 (CORTEZ et al., 1999). Um outro estudo publicado em 2000 (GATEI et al., 2000) sugere que a fosforilação de BRCA1 requer a presença da proteína ATM funcional, e esta associação é aumentada pela radiação ionizante, este mecanismo faz parte da resposta celular ao dano no DNA ocasionado pela radiação ionizante.

Tibbetts e colaboradores mostraram em seu estudo (TIBBETTS et al., 2000), evidências de que ATR fosforila diretamente BRCA1, em resposta a danos no DNA gerados por exposição à radiação ultravioleta ou a replicação estagnada do DNA, sugerindo que ATR e BRCA1 são componentes da mesma via de resposta ao estresse genotóxico. Os resultados destes estudos reforçam a hipótese de que ATM e ATR servem como quinases imediatas em vias paralelas dos *checkpoints* do ciclo celular ativadas em resposta a



diferentes tipos de estresse genotóxico.

Todo este estudo teórico embasado nas referências citadas nesta pesquisa, nos levaram a construção da rede lógica de interação entre proteínas de células normais de fibroblastos representada na Figura 5.3.

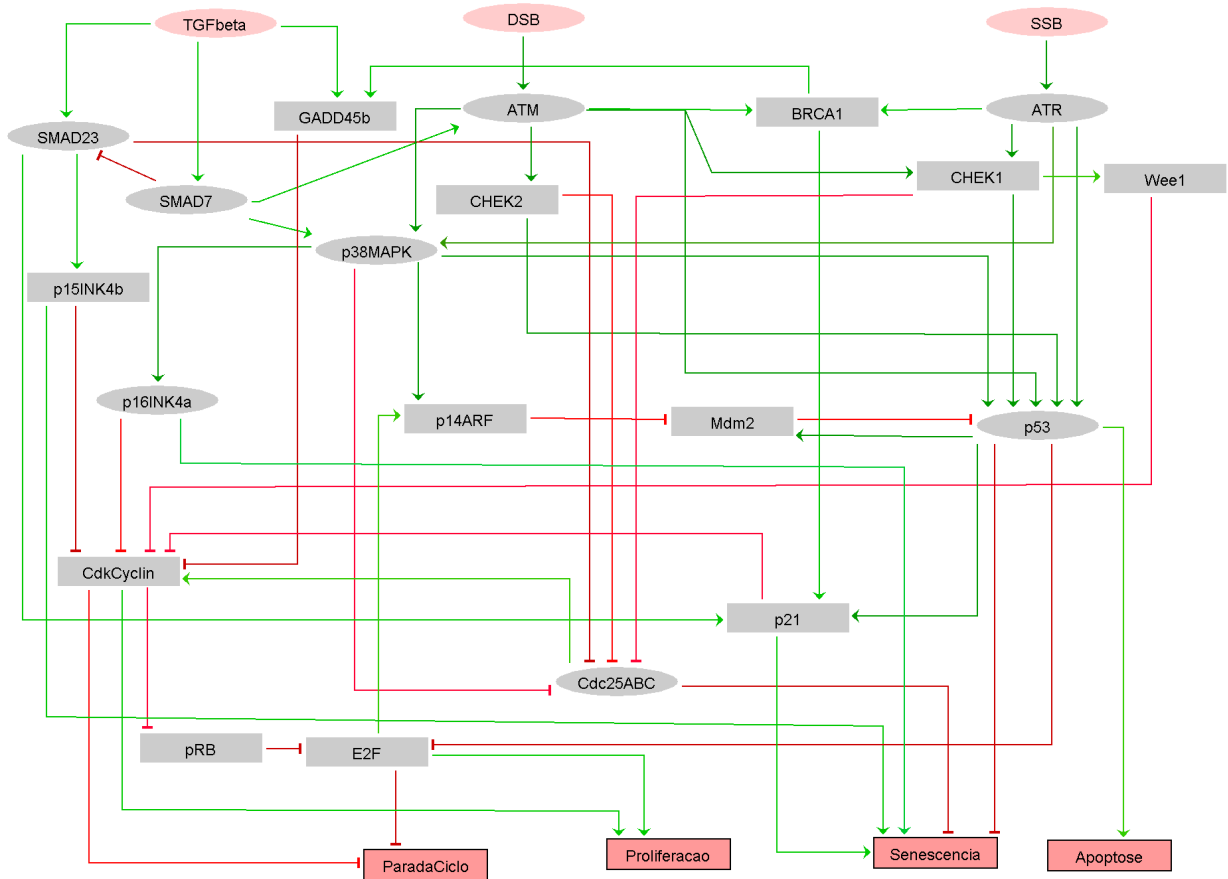


Figura 5.3 – Imagem da rede proposta - Modelo lógico da sinergia de dano ao DNA e  $TGF\beta$ . Nós retangulares representam nós Booleanos e nós elípticos representam nós de múltiplos valores. Entradas: Quebras Simples (SSB), Quebras Duplas (DSB) e sinalização  $TGF\beta$  (TGFbeta). Fenótipos de saída na cor vermelha representam os possíveis destinos celulares, e os nós internos são os reguladores das saídas do modelo. Linhas em verde representam interações de ativações, linhas em vermelho representam inibição

A cada componente da rede, foram estipuladas regras lógicas. Para cada proteína nova adicionada foram definidas as regras que estão demonstradas na Tabela 5.1, para as demais proteínas as regras estão listadas no Apêndice A - Tabela A.1, ao final do texto.

Tabela 5.1 – Regras lógicas empregadas no controle da rede da Figura 5.3. AND (&), OR (|) e NOT (!) são operadores lógicos usados para determinar a regra de cada nó constituinte da rede proposta

	<b>Nó</b>	<b>Regra Lógica</b>
Entradas	SSB e DSB	= 0 (Sem Dano)
		=1 (Dano Reparável) =2 (Dano Irreparável)
	TGFbeta	= 0 (Sem Expressão) =1 (Expressão média) =2 (Superexpressão)
Proteínas Efectoras	GADD45b	=1 (TGFβ   BRCA1)
	SMAD23	=2 (TGFβ = 2 & !SMAD7) =1 (TGFβ = 1 & SMAD7)
	SMAD7	=2 (TGFβ = 2) =1 (TGFβ = 1)
	P15INK4b	=1 (SMAD23)
	P38MAPK	=3 ((ATM:2 & ATR:2)   SMAD7:2) =2 (!ATR:2 & ATM:2 & !SMAD7:2) =1 ((ATM:1   ATR:1   ATR:2) & !ATM:2 & !SMAD7)
	ATM	=2 (DSB:2 & !SMAD7:1) =1 (DSB:1 & !SMAD7:2)
	CdkCyclin	=1 (Cdc25ABC & !p21 & !Wee1 & !p16INK4a & !p15INK4b & !GADD45b)
	BRCA1	=1 (ATM   ATR)
	P21	=1 (p53:1   SMAD23   BRCA1)
	Saídas	Parada Ciclo
Proliferação		CdkCyclin & E2F
Senescência		[(p16INK4a:1 & p21 & !p53:2 & !Cdc25ABC)   (p16INK4a:2 & p21 & !p53:2 & !Cdc25ABC:2)   (p15INK4b & p21 & !p53:2 & !Cdc25ABC)]
Apoptose		p53 =2

As regras lógicas foram construídas com base em nossa interpretação de informações biológicas, o processo também envolve várias simulações para análise de consistência entre as previsões do modelo e o conhecimento experimental oriundo de pesquisas bibliográficas.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O modelo lógico proposto aqui considera dados de interações entre células genéricas normais (não tumorais), e com suas particularidades, nos permite observar diversos processos moleculares, como regulação da transcrição e fosforilação de proteínas, além disso permite analisar perturbações de proteínas que no caso são variáveis consideradas.

Nesta rede lógica foi considerada a via canônica de sinalização de  $TGF\beta$  e a sua interação com as proteínas da rede do modelo de Mombach e colaboradores (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015), levando em consideração os possíveis destinos celulares (Figura 5.3) após indução de quebras duplas ou simples, reparáveis ou irreparáveis e expressão da via  $TGF\beta$  em diferentes níveis, bem como a combinação destas entradas no modelo proposto.

A rede proposta neste trabalho foi submetida a uma série de mutações de algumas proteínas constituintes da mesma, mutações do tipo LoF (*Loss of Function*) quando a proteína é desligada, perde sua função e GoF (*Gain of Function*) quando a proteína é superexpressa, elevada ao nível máximo ou intermediário de expressão. Em algumas proteínas, normalmente as que apresentavam diferentes níveis de expressão, foi possível verificarmos suas contribuições considerando estes diferentes níveis, por exemplo, variamos SMAD7 do valor 0 a 1, representado por SMAD7 [0,1], e também no valor 2, SMAD7 E2 (Figura 6.1), e observamos suas influências (resultados apresentados mais adiante).

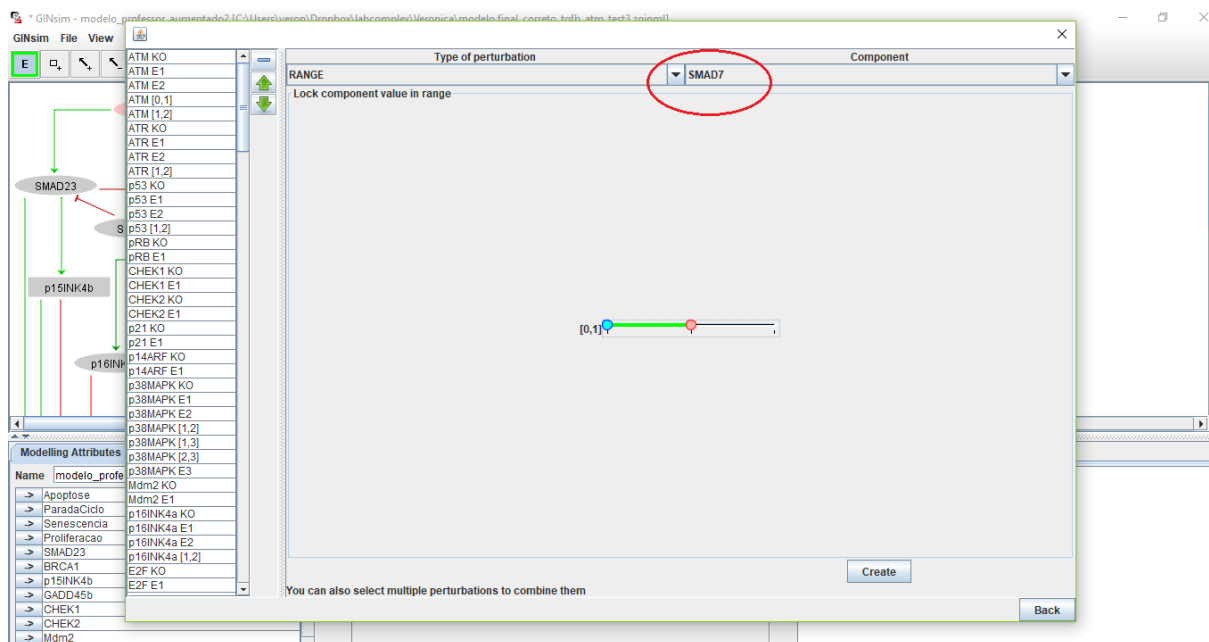


Figura 6.1 – Interface do GINSim onde é possível gerar as mutações a serem estudadas. A imagem demonstra o exemplo citado no texto da proteína SMAD7 (destacado em vermelho) e seus diferentes níveis 0, 1 e 2. Os pontos vermelho e azul possibilitam a seleção do nível desejado a ser considerado na mutação, por exemplo, variar SMAD7 de 0 a 1 - [0,1], variar de 0 a 2 - [0,2] ou variar sua expressão de 1 a 2 - [1,2]

## 6.1 INFLUÊNCIA DAS ENTRADAS SSB E DSB NO MODELO

Ao considerarmos somente como entrada do modelo o dano ao DNA, ou seja, os *inputs* DSB e SSB conforme o modelo inicial proposto no estudo de Mombach e colaboradores (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015), conseguimos reproduzir na rede modificada os mesmos resultados (Figura 6.2) encontrados pelos autores quando levamos em consideração as proteínas estudadas por eles.

	Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferacao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta	
			1									1							1	2	1							
	1					1		1			1		1	1	1		1	1		1				1		1		
	1					1		1			1		1	1	1		1	1		1			1	1	1	1		
	1					1		1	1		1		1	1	1	1	1	1		1				2		2		
	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	1	1		1			1	2	1	2		
	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	1	2					2	1	2	1		
1	1					1		1	1	1		1	2	1	1	1	2	3					2	2	2	2		

Figura 6.2 – Estados estáveis do modelo para o caso  $TGF\beta$  desligado (*knockout*). Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores considerando diferentes níveis de dano ao DNA

Para este caso, ao desligarmos a entrada do modelo que desconsidera a via  $TGF\beta$ , obtivemos como resultado 9 estados estáveis conforme a Figura 6.2, a qual nos demonstra que teremos indução de senescência em 2 dos 9 estados possíveis (o que representa aproximadamente 22,2% de probabilidade de ocorrência) quando tivermos quebras duplas irreparáveis com ou sem quebras simples reparáveis, com expressão da proteína p21. O estado apoptótico ocorrerá em 1 dos 9 estados (11,1%) quando tivermos quebras duplas e quebras simples ambas irreparáveis, com expressão das proteínas p53, p38MAPK e p16 nos níveis máximos, o estado proliferativo ocorre em 1 dos 9 estados (11,1% de probabilidade) apenas quando não há dano, DSB e SSB iguais a 0, e parada do ciclo celular ocorre em 5 estados, o que representa 55,5% do total (resultados apresentados na Tabela 6.1).

## 6.2 INFLUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE $TGF\beta$ NO MODELO

Quando consideramos somente como entrada do modelo a expressão em diferentes níveis do  $TGF\beta$ , ou seja, desligamos as entradas representativas de quebras duplas e simples (DSB e SSB = 0), obtivemos como resultado 3 estados estáveis para o sistema conforme expresso na Figura 6.3 e Tabela 6.1. Este resultado nos diz que sem a expressão da via ( $TGF\beta = 0$ ) a célula seguirá para a proliferação em 1 estado dos 3 possíveis (33,3%);

quando  $TGF\beta$  for igual a 1, a célula poderá entrar em senescência com a probabilidade de 1 estado (33,3%) com as proteínas p21 e  $p15^{INK4b}$  expressas e, quando  $TGF\beta$  assume o seu mais alto nível (igual a 2), a célula poderá sofrer apoptose com uma probabilidade de 33,3%, que é a morte celular programada, neste caso p16, p53, p38MAPK e SMAD7 assumem seus níveis mais altos.

Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferacao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	3	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2

Figura 6.3 – Estados estáveis do modelo para o caso Quebras Duplas e Quebras Simples desligadas (*knockout*). Destino celular a partir das 3 possíveis combinações de valores de intensidade de expressão para  $TGF\beta$

Tomando como referência o modelo inicial o qual tem seus resultados expressos na Figura 6.2, podemos observar que quando somente a via  $TGF\beta$  está ativa e no seu nível intermediário (igual a 1) ocorre um aumento de indução de senescência e quando assume seu nível mais alto ( $TGF\beta = 2$ ) ocorre um aumento de indução de apoptose, este resultado está comprovado em diversos artigos onde estudos experimentais ou de revisão corroboram a ideia de que a via  $TGF\beta$  pode induzir senescência (ZHANG; ALEXANDER; WANG, 2017; CHUNG et al., 2009) e apoptose (JANG et al., 2002; YOO et al., 2003; SCHUSTER; KRIEGLSTEIN, 2002) em células.

### 6.3 SINERGIA ENTRE EXPRESSÃO DE $TGF\beta$ E DANO AO DNA

Quando combinamos as 3 entradas do modelo apresentado aqui, obtivemos como resultado os 27 estados estáveis demonstrados na Figura 6.4 e Tabela 6.1. No lado direito estão representadas as entradas do modelo, que neste caso são quebras simples no DNA (SSB) e quebras duplas (DSB), e a via de sinalização  $TGF\beta$  representada pela proteína  $TGF\beta$ , ligada. Para estas entradas foram considerados diferentes níveis de dano e/ou expressão, 0 (zero) quando não há dano ou expressão, 1 quando o dano for reparável (SSB e DSB) ou expressão baixa de  $TGF\beta$  e 2 quando o dano for irreparável ao DNA ou expressão aumentada de  $TGF\beta$ .

	Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferacao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta
			1									1							1	2	1						
	1					1		1			1		1	1	1		1	1		1				1		1	
	1					1		1			1		1	1	1		1	1		1			1		1	1	1
	1					1		1	1		1		1	1	1	1	1	1		1				2		2	
	1					1		1	1		1		1	1	1	1	1	1		1			1	2	1	2	
	1				1	1	1	1	1		1		1	1	1	1				1		1		2	2	2	1
	1				1	1	1	1	1		1		1	1	1	1				1		1	1	2	1	2	1
	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	1	2					2		2		
	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	1	2					2	1	2	1	
	1	1			1		1	1					1	1								1					1
	1	1			1		1	1					1	1								1			2		1
	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1							1		1		1	1
	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1							1	1		1	1	1
	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1							1	1	1	1	1	1
	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1							1	1	1	1	1	1
	1	1			1	1	1	1			1		1	2	1	1						2				2	2
	1	1			1	1	1	1			1		1	2	1	1						2			1	2	2
	1	1			1	1	1	1			1		1	2	1	1						2		1	1	1	2
	1	1			1	1	1	1			1		1	2	1	1	1	2	3			2		2	2	2	2
	1	1			1	1	1	1			1		1	2	1	1	1	2	3			2	2		2	2	2
	1	1			1	1	1	1			1		1	2	1	1	1	2	3			2	2	1	2	1	2
	1	1			1	1	1	1			1		1	2	1	1	1	2	3			2	2	2	2	2	2

Figura 6.4 – Estados estáveis do modelo para caso onde todas as entradas (*inputs*) do sistema são consideradas. Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de cada um dos *inputs* iniciais do sistema, considerando diferentes níveis de dano e/ou intensidade de expressão de  $TGF\beta$

O modelo nos demonstra que quando  $DSB = SSB = TGF\beta = 0$  (sem dano) o destino possível celular é proliferação com uma probabilidade aproximada de 3,7%, demonstrado em 1 estado estável neste sistema. Podemos observar pelos resultados da Figura 6.4, 8 estados estáveis de senescência a qual ocorre com aproximadamente 30% de probabilidade quando tivermos quebras duplas reparáveis ( $DSB = 1$ ) combinadas com expressão no nível 1 de  $TGF\beta$  ( $TGF\beta = 1$ ) tendo ou não quebras simples no DNA ( $SSB = 0$  ou  $1$ ). Outra possibilidade de ocorrência de senescência é quando há quebras duplas irreparáveis ( $DSB = 2$ ) com ou sem expressão de  $TGF\beta$  ( $TGF\beta = 0$  ou  $1$ ) e com ou sem ocorrência de quebras simples ( $SSB = 0$  ou  $1$ ), em todas estas situações, a proteína p21 permanece ativada no nível 1, a qual é uma potencial indutora de senescência celular.

Apoptose celular ocorre em 10 estados estáveis do sistema representando 37% de probabilidade, quando  $TGF\beta$  está no nível máximo ( $TGF\beta = 2$ ) combinado ou não com dano ao DNA, neste caso as proteínas SMAD7, p53 e p38MAPK estão expressas em seus níveis máximos ou seja,  $SMAD7 = 2$ ,  $p53 = 2$  e  $p38MAPK = 3$ . Ao combinarmos quebras duplas ou simples reparáveis e irreparáveis e expressão baixa de  $TGF\beta < 2$ , o

modelo resulta em 8 estados estáveis (30%) de parada do ciclo celular, o qual ocorre devido a inibição do complexo *CdkCyclins*, que levará a célula à apoptose ou senescência dependendo do nível de dano considerado.

Ao compararmos os resultados obtidos quando consideramos somente as entradas relacionadas a dano ao DNA, SSB e DSB (Figura 6.2) com os resultados obtidos quando consideramos todas as entradas combinadas (Figura 6.4), obtivemos como resultados uma diminuição de indução de proliferação e aumento de indução de senescência e apoptose quando considerarmos dano ao DNA e expressão da via de  $TGF\beta$  combinados.

Tabela 6.1 – Tabela resumo contendo os resultados apresentados nas Figuras 6.2, 6.3 e 6.4, considerando as diferentes entradas (*inputs*) do sistema

Entradas		[DSB + SSB ( $TGF\beta$ KO)]	[ $TGF\beta$ (DSB KO + SSB KO)]	[DSB + SSB + $TGF\beta$ ]
Estados	Estáveis	9	3	27
Fenótipos de Saída		11,1% proliferação (1 estado), 55,5% parada do ciclo celular (5), 22,2% senescência (2), 11,1% apoptose (1)	33,3% proliferação (1), 33,3% senescência (1), 33,3% apoptose (1)	3,7% proliferação (1 estado), 30% parada do ciclo celular (8), 30% senescência (8), 37% apoptose (10)
Resultados		Modelo Referência	Aumento de indução de senescência e apoptose em relação ao modelo referência	Aumento de indução de senescência e apoptose

#### 6.4 ESTUDO DE MUTAÇÕES

Submetemos a rede lógica aqui proposta a uma série de mutações das diversas proteínas que a constituem. Inicialmente fizemos um teste com a proteína p53, após, testamos o Paradoxo do  $TGF\beta$  e também a proteína SMAD7.

### 6.4.1 Proteína p53

A proteína p53, conhecida como "Guardiã do Genoma"(ELSTON; INMAN, 2012), participa de diversos programas antiproliferativos em resposta a diversos tipos de estresse celular ocasionado por exemplo por exposição à radiação ionizante, baixos níveis de oxigênio no meio intracelular, estresse genotóxico, dentre outros. Uma vez ativado, p53 pode provocar senescência replicativa ou apoptose, evitando assim a propagação de células potencialmente malignas (BAR et al., 2009). O tipo de ação antiproliferativa desencadeada por p53 é dependente do tipo celular em questão e também da condição das outras vias de sinalização presentes nas células (FRIDMAN; LOWE, 2003).

O mecanismo de resposta da célula frente a um dano pode resultar em apoptose celular, senescência, autofagia, parada do ciclo celular, dentre outros, dependendo do nível de dano a que foi submetida; porém quando a proteína p53 está expressa os possíveis destinos celulares incluem apoptose, quando superexpressa (KASTAN; CANMAN; LEONARD, 1995) e parada do ciclo celular através da ativação da proteína p21 (XIONG et al., 1991).

Ao fazermos a mutação de p53 KO (*knockout*) na rede aqui proposta obtivemos como resultado o demonstrado na Figura 6.5 e Tabela 6.2.

Como resultados desta mutação obtivemos que dos 27 estados estáveis gerados, 1 estado foi de proliferação celular (3,7%) quando não há indução de dano nem expressão de  $TGF\beta$ ; 10 estados estáveis de parada do ciclo celular (37%) quando há dano ao DNA ou expressão da via de  $TGF\beta$  e 16 estados estáveis de senescência celular (59,3%) quando houveram quebras duplas irreparáveis (DSB = 2) sem expressão de  $TGF\beta$  ou com expressão de  $TGF\beta$  e quebras duplas e/ou quebras simples reparáveis e/ou irreparáveis e não houve indução de apoptose.



	Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferacao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta
	1		1									1							1	2	1						2
	1											1			1		2	3		1		2					2
	1											1		1			3			1					1		2
	1				1									1	1		1	1		1				1		1	
	1				1									1	1		1	1		1			1		1		
	1				1									1	1	1	1	1		1				2		2	
	1				1									1	1	1	1	1		1			1	2	1	2	
	1				1	1								1	1	1				1		1		2		2	1
	1				1	1								1	1	1				1		1		2	2	2	1
	1				1	1								1	1	1				1		1	1	2	1	2	1
	1	1			1							1		1	1		2	3		1		2		1		1	2
	1	1			1							1		1	1		2	3		1		2		1	1	1	2
	1	1			1							1		1	1	1	2	3		1		2		2		2	2
	1	1			1							1		1	1	1	2	3		1		2		2	1	2	2
	1	1			1							1		1	1	1	2	3		1		2		2	1	2	2
	1	1			1							1		1	1	1	2	3		1		2		2	2	2	2
	1	1			1							1		1	1					1		1				1	1
	1	1			1							1		1	1					1		1		2		1	1
	1	1			1	1						1		1	1					1		1		1		1	1
	1	1			1	1						1		1	1					1		1		1	2	1	1
	1	1			1	1						1		1	1					1		1	1	1	1	1	1
	1	1			1	1						1		1	1					1		1	1	1	1	1	1
	1	1			1	1						1		1	1					1		1	1	1	1	1	1

Figura 6.5 – Estados estáveis do modelo para a mutação de p53 desligado (KO, *knockout*). Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede

Ao compararmos este resultado com o modelo referência, podemos perceber que apesar de ter ocorrido um aumento de 2 estados estáveis (modelo referência) para 16 estados (*p53 knockout*) quando observamos as probabilidades vemos que ao considerarmos como entrada do modelo quebras simples e duplas e expressão da via  $TGF\beta$  obtivemos um aumento de indução de senescência quando a proteína p53 está mutada (desligada). Além disto não observamos indução de apoptose na mutação considerada e a parada do ciclo celular diminuiu. Esta indução de senescência foi ocasionada pela ativação da proteína p21 (LI et al., 2012), definida por regra lógica (Tabela A.1), a qual foi ativada pelas proteínas BRCA1 (DENG, 2006) ou SMAD23 (MUNOZ-ESPIN; SERRANO, 2014), a primeira é ativada quando há quebras duplas ou simples no DNA e a segunda é ativada quando há expressão de  $TGF\beta$ .

Observamos também, os resultados quando considerarmos variação no nível de expressão de p53 na rede aqui proposta.

Ao estipularmos  $p53 = 1$  (nível intermediário de expressão), obtivemos os resultados presentes na Figura 6.6, onde podemos observar que mesmo sem dano ao DNA (DSB =

0, SSB = 0 e  $TGF\beta = 0$ ) houve indução de parada do ciclo celular. No total obtivemos 9 estados estáveis (33,3%) para parada do ciclo celular e 18 estados estáveis de indução senescência (66,6%).

	Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferacao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta	
1	1										1		1	1	1		1	1		2								
1	1					1		1			1		1	1	1		1	1		1				1		1		
1	1					1		1			1		1	1	1		1	1		1			1		1		1	
1	1					1		1	1		1		1	1	1	1	1	1		1				2		2		
1	1					1		1	1		1		1	1	1	1	1	1		1			1	2	1	2		
1	1				1	1	1	1	1		1		1	1	1	1				1		1		2		2	1	
1	1				1	1	1	1	1		1		1	1	1	1				1		1	1	2	2	2	1	
1	1	1						1				1	1	1	1		2	3		1		2					2	
1	1	1						1				1	1	1	1		2	3		1		2			1		2	
1	1	1				1		1				1	1	1	1		2	3		1		2		1	1	1	2	
1	1	1				1		1	1			1	1	1	1	1	2	3		1		2		2		2	2	
1	1	1				1		1	1			1	1	1	1	1	2	3		1		2		2	1	2	1	2
1	1	1				1		1	1	1		1	1	1	1	1	2	3		1		2		2	2	2	2	2
1	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	2	3		1		2		2	1	2	1	2
1	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	2	3		1		2		2	2	2	2	2
1	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	2	3		1		2		2	2	2	2	2
1	1	1				1		1	1	1	1		1	1	1	1	2	3		1		2		2	2	2	2	2
1	1	1			1		1	1			1		1	1	1						1						1	
1	1	1			1		1	1			1		1	1	1						1				2		1	
1	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1						1		1			1	1	
1	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1						1		1	2	1	1	1	
1	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1						1	1		1		1	1	
1	1	1			1	1	1	1			1		1	1	1						1	1	1	1	1	1	1	1

Figura 6.6 – Estados estáveis do modelo para a mutação de p53 com valor de expressão intermediário (p53 = 1). Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede

Comparando estes valores ao modelo referência, podemos observar que não houve indução de proliferação celular, nos demonstrando assim que mesmo sem haver danos ao DNA, a expressão da proteína p53 no nível intermediário pode levar a célula a parada do ciclo celular. A p53 neste nível causou também aumento de indução de senescência celular e diminuição de indução de apoptose em relação modelo referência, estes resultados estão melhores apresentados na Tabela 6.2.

É possível observarmos, conforme mencionado acima, que p53 com nível de expressão igual a 1 induziu parada do ciclo celular e senescência. Este resultado está em conformidade com a literatura (KO; PRIVES, 1996; LEVINE, 1997; LAKIN; JACKSON, 1999), pois estes dois fenótipos de saída podem estar sendo induzidos pela expressão da proteína p21 (ativa em todos os estados estáveis da Figura 6.6), que é ativada pela proteína p53. Nesta rede lógica proposta por este trabalho, a regra de interação entre estas

duas proteínas, considera que p21 pode ser ativada por p53 no nível 1 de expressão (ver Tabela 5.1), sendo assim, p21 como é inibidora de ciclinas, atua impedindo que estas quinases promovam a progressão do ciclo celular, e além disto, p21 também é uma ativadora de senescência celular.

Ao submetermos o modelo a mutação que considera p53 em seu nível máximo, igual a 2, obtivemos como resultados a Figura 6.7.

Podemos observar que os 27 estados estáveis gerados são de indução de apoptose celular (100% de probabilidade), o que representa em relação ao modelo referência um aumento de indução de apoptose e diminuição de indução de senescência, parada do ciclo e proliferação celular (ver Tabela 6.2).

	Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta
1	1										1		2	1	1					2							
1	1						1					1	2	1	1		2	3		1		2					2
1	1						1					1	2	1	1		2	3		1		2			1		2
1	1				1		1					1	2	1	1		2	3		1		2		1		1	2
1	1				1		1					1	2	1	1		2	3		1		2		1	1	1	2
1	1				1		1				1		2	1	1		1	1		1				1		1	
1	1				1		1				1		2	1	1		1	1		1			1	1	1	1	
1	1				1		1	1				1	2	1	1	1	2	3		1		2		2		2	2
1	1				1		1	1			1		2	1	1	1	2	3		1		2		2	1	2	2
1	1				1		1	1			1		2	1	1	1	1	1		1			2		2		
1	1				1		1	1	1			1	2	1	1	1	2	3		1			1	2	1	2	
1	1				1		1	1	1			1	2	1	1	1	2	3		1			2	2	2	2	2
1	1				1		1	1	1	1			2	1	1	1	1	2		1		2		2			
1	1				1		1	1	1	1			2	1	1	1	1	2				2	1	2	1		
1	1			1		1	1				1		2	1	1						1						1
1	1			1		1	1				1		2	1	1						1			2			1
1	1			1		1	1	1			1		2	1	1						1			1			1
1	1			1		1	1	1	1		1		2	1	1	1					1		1	1	1	1	1
1	1			1		1	1	1	1		1		2	1	1	1				1		1		2		2	1
1	1			1		1	1	1	1		1		2	1	1	1				1		1		2	2	2	1
1	1			1		1	1	1	1		1		2	1	1	1				1		1	1	2	1	2	1

Figura 6.7 – Estados estáveis do modelo para a mutação de p53 superexpressa (p53 = 2). Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede

Este resultado está em conformidade com a literatura, que nos diz que o nível de ativação da proteína p53 pode ser decisivo para a resposta celular, em outras palavras, baixos níveis de p53 podem favorecer a parada do ciclo celular e senescência e altos níveis podem levar à célula a apoptose (ZUCKERMAN et al., 2009), contudo, os determinantes cruciais para o destino celular em resposta a um dano são o tipo celular, a natureza e a

intensidade do dano ocasionado (CHILDS et al., 2014).

Tabela 6.2 – Tabela resumo contendo os resultados apresentados nas Figuras 6.5, 6.6 e 6.7, obtidos na simulação de mutações da proteína p53 na rede

Mutações	p53 KO ( <i>Knockout</i> )	p53 E1	p53 E2
Estados Estáveis	27	27	27
Fenótipos de Saída	3,7% proliferação (1 estado), 37% parada do ciclo celular (10), 59,3% senescência (16),	33,3% parada do ciclo celular (9), 66,6% senescência (18)	100% apoptose (27)
Resultados	Aumento de indução de senescência e diminuição de parada do ciclo celular em relação ao modelo referência	Aumento de indução de senescência e diminuição de indução de apoptose	Aumento de indução de apoptose e diminuição dos demais fenótipos de saída

#### 6.4.2 Paradoxo do TGF $\beta$

Como mencionado previamente, a via de sinalização de TGF $\beta$  em câncer apresenta dois efeitos diferenciais, o que caracteriza o Paradoxo do TGF $\beta$  ("*TGF $\beta$  Paradox*"), atua como promotor ou supressor tumoral dependendo do estágio da carcinogênese, porém o mecanismo envolvido nesta diferenciação ainda não é claro (NEUZILLET et al., 2015). No microambiente celular, TGF $\beta$  parece contribuir para gerar um ambiente favorável para o crescimento do tumor e metástase ao longo da formação tumoral.

Em um estudo experimental publicado em 2008 (COULOUARN; FACTOR; THORGEIRSSON, 2008) os autores observaram em células tumorais estes efeitos diversos de TGF $\beta$ , o trabalho descreve que a "assinatura precoce de TGF $\beta$ " (*Early TGF $\beta$  Signature*) correspondente ao papel de supressor tumoral desta via, é caracterizada por baixos níveis endógenos de TGF $\beta$  e SMAD7 e forte atividade transcricional de SMAD3, e também pela expressão de genes da família GADD45 os quais são ativos em via de resposta ao dano do DNA; já a "assinatura tardia de TGF $\beta$ " (*Late TGF $\beta$  Signature*) é caracterizada por altas quantidades de TGF $\beta$  e SMAD7 e sinalização de SMAD3 reduzida, correspondente ao fenótipo invasivo e recorrência tumoral aumentada.

Submetemos o modelo aqui proposto às mutações descritas por Coulouarn et al. no artigo mencionado anteriormente (Tabela 6.3 apresenta os resultados encontrados), consideramos inicialmente a mutação relacionada ao papel de  $TGF\beta$  como supressor Tumoral:  $TGF\beta = 0$  e  $SMAD7 = 0$ , ambas *knockout*, juntamente com  $SMAD23 = 2$  (fixada no nível 2), obtivemos como resultado 9 estados estáveis (Figura 6.8) os quais nos dizem que há uma probabilidade de 8 estados estáveis (88,9%) de ocorrência de senescência o que representa um aumento de indução em relação ao modelo referência (Figura 6.2); 1 estado estável (11,1%) de indução de apoptose, representando uma diminuição de indução em relação ao modelo referência.

Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferaçao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta	
1	1			2		1							1	1													
1	1			2	1	1	1			1		1	1	1		1	1					1				1	
1	1			2	1	1	1			1		1	1	1		1	1					1	1	1	1		
1	1			2	1	1	1	1		1		1	1	1	1	1	1						2		2		
1	1			2	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1					1	2	1	2		
1	1			2	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	2					2		2			
1	1			2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	3					2	2	2	2		

TGFbeta KO, SMAD23 E2, SMAD7 KO

Figura 6.8 – Teste no modelo do comportamento de supressor tumoral de  $TGF\beta$  - Estados estáveis do modelo para o caso  $TGF\beta$  desligado, SMAD23 no nível mais alto (igual a 2) e SMAD7 desligado. Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores de entradas do modelo

Este resultado nos diz que quando SMAD23 está em seu nível mais alto e consideramos combinações de quebras duplas e simples do DNA reparáveis e irreparáveis a probabilidade de ocorrência de senescência aumenta em relação ao sistema considerado como referência (Figura 6.2).

A rede foi submetida também ao teste que considera  $TGF\beta$  como promotor tumoral, com a seguinte mutação:  $TGF\beta = 2$  (superexpresso),  $SMAD7 = 2$  e  $SMAD23 = 0$  (*knockout*) obtivemos 9 estados estáveis como resultados. A Figura 6.9 nos demonstra que houve uma indução total de apoptose em todos os 9 estados (probabilidade de 100%), o que representa um aumento de indução de apoptose em relação ao modelo de referência (Tabela 6.3). Este resultado demonstrou que  $TGF\beta$  em seu nível máximo eleva a proteína p38MAPK ao mais alto nível desencadeando assim apoptose nas células, independente do tipo de quebras ocasionadas ao DNA celular.

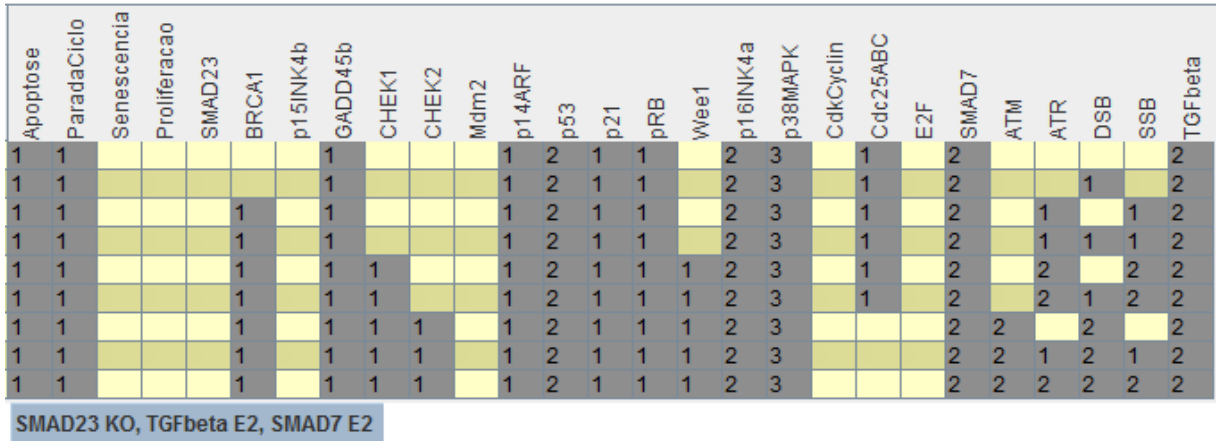


Figura 6.9 – Teste no modelo do comportamento de promotor tumoral de TGFβ - Estados estáveis do modelo para o caso TGFβ no nível máximo (igual a 2), SMAD23 desligado e SMAD7 nos níveis 1 e 2. Destino celular a partir das 9 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando as mutações impostas na rede

Tabela 6.3 – Resumo dos resultados apresentados nas Figuras 6.8 e 6.9, obtidos na simulação de mutações do Paradoxo do TGFβ proposto no estudo de Couluarn et al.

Paradoxo do TGFβ	Supressor Tumoral	Promotor
Mutação	TGFβ KO, SMAD23 E2, SMAD7 KO	TGFβ E2, SMAD23 KO, SMAD7 E2
Estados Estáveis	9	9
Fenótipos de Saída	88,9% senescência (8 estados estáveis), 11,1% apoptose (1 estado estável)	100% apoptose (9 estados estáveis)
Resultados	Aumento de senescência e diminuição de apoptose em relação ao modelo referência	Aumento de apoptose em relação ao modelo referência

Os resultados apresentados na Tabela 6.3 nos demonstram que para o comportamento de TGFβ como supressor tumoral, houve indução de apoptose em 11,1% com indução de parada do ciclo celular em todos os estados estáveis gerados no modelo após submissão do mesmo à mutação proposta. Este resultado pode ser melhor visualizado na Figura 6.8.

Como mencionado por (WENDT; TIAN; SCHIEMANN, 2012), "em estágios tumorais iniciais, a via promove parada do ciclo celular e apoptose", o que corrobora o resultado

gerado pela rede proposta neste trabalho. Outro ponto a observar no resultado gerado demonstrado na Figura 6.8, é que a proteína pRB (*Retinoblastoma Protein*) está ativada em todos os estados estáveis, o que está em conformidade com a literatura (HICKMAN; MORONI; HELIN, 2002), já que este gene é um supressor tumoral.

Em contrapartida, a mutação de  $TGF\beta$  como promotor tumoral (Figura 6.9), nos deu como resultado indução de parada do ciclo celular e apoptose em todos os estados estáveis gerados no sistema; ou seja, este resultado não condiz com o que esperávamos já que o comportamento pró-tumoral seria indução de proliferação (MARKS; FÜRSTENBERGER; MÜLLER-DECKER, 2007) na rede. Uma hipótese para este resultado adverso que encontramos, é de que este comportamento ocorreria em células tumorais avançadas, e a rede aqui proposta adequa-se a células normais, mais especificamente fibroblastos. A mutação imposta a rede eleva  $TGF\beta$  ao nível máximo e conseqüentemente, as proteínas p53 e p38MAPK também são expressas em níveis máximos desencadeando assim apoptose às células.

#### 6.4.3 Proteína SMAD7

Em relação a proteína SMAD7, inicialmente ela foi identificada como um inibidor da via de sinalização de  $TGF\beta$ , porém seu efeito no meio intracelular vai além disto, sua expressão é desregulada em diversos cânceres. Ela parece interagir com diversas outras proteínas (STOLFI et al., 2013) e esta observação foi adicionada ao nosso modelo conforme demonstrado na imagem do modelo de rede proposto aqui (Figura 6.1). Conforme os resultados do estudo realizado por Stolfi et al., o efeito pró e anti apoptótico de SMAD7 através de sua expressão etópica ou deleção em células cancerosas pode regular a tumorigênese diferencialmente dependendo do tipo celular analisado. Por exemplo, em câncer de esôfago a expressão de SMAD7 aumentada é associada a diminuição do tempo de recorrência do câncer (OSAWA et al., 2004), já em câncer gástrico foi observado níveis elevados de SMAD7 em tumores com metástases linfáticas (LENG et al., 2009).

Para avaliarmos a contribuição da proteína SMAD7 no modelo proposto, submetemos a rede uma mutação a qual SMAD7 varia entre 0 a 1 no seu valor de expressão. O resultado obtido está representado na Figura 6.10, onde podemos observar 27 possíveis combinações de entradas do modelo, sendo que 1 estado estável é para o fenótipo de saída apoptose com probabilidade de 3,7%, 8 estados para o fenótipo de senescência com probabilidade de indução de 29,6%, 1 estado para o fenótipo de proliferação com probabilidade de 3,7% e 17 estados estáveis para parada do ciclo celular com probabilidade de ocorrência de aproximadamente 63%.

	Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferaçao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta
			1									1							1	2	1						
	1						1								1					2		1					2
	1						1								1					2		1		2			2
	1				1		1			1		1	1	1						2		1		1	1		2
	1				1		1			1		1	1	1						2		1		1	2	1	2
	1				1		1			1		1	1	1						2		1	1	1	1	1	2
	1				1		1			1		1	1	1		1	1			2		1		1	1		
	1				1		1			1		1	1	1			1	1		1			1	1	1	1	
	1				1		1			1		1	1	1			1	1		1			1	1	1	1	
	1				1		1			1		1	1	1			1	1		1			1	1	1	1	
	1				1		1			1		1	1	1			1	1		1			1	1	1	1	
	1				1		1			1		1	1	1			1	1		1			1	1	1	1	
	1				1		1			1		1	1	1			1	1		1			1	1	1	1	
	1				1		1			1		1	1	1			1	1		1			1	1	1	1	
	1	1			1		1		1	1		1	1	1		1	1	2					2		2		
	1	1			1		1		1	1		1	1	1		1	1	2					2		2		
	1	1			1		1							1	1							1					1
	1	1			1		1							1	1							1			2		1
	1	1			1		1		1		1		1	1								1		1		1	1
	1	1			1		1		1		1		1	1								1		1	2	1	1
	1	1			1		1		1		1		1	1								1	1		1	1	1
	1	1			1		1		1		1		1	1								1	1	1	1	1	1
1	1				1		1		1		1	2	1	1		1	2	3					2	2	2	2	

Figura 6.10 – Estados estáveis do modelo para o caso SMAD7 nos níveis 0 e 1. Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede

Estes resultados estão apresentados de forma resumida na Tabela 6.4. Os valores de probabilidade representam um aumento na indução de parada do ciclo celular (de 8 estados para 17 estados) e diminuição de indução de apoptose (de 10 estados para 1 estado), indução de proliferação e senescência permaneceram nos mesmos valores, em relação ao modelo inicial, sem mutações. Estes resultados mostram que quando a proteína SMAD7 está em níveis mais baixos, ela pode levar as células a pararem o ciclo celular mais facilmente (YAN; LIU; CHEN, 2009).

Para a mutação que leva em consideração a superexpressão de SMAD7 (SMAD7 = 2) o resultado encontrado foi 27 estados estáveis, onde houve uma indução de apoptose celular em todos os estados (Figura 6.11 e Tabela 6.4), ou seja, 100% de probabilidade de ocorrência de apoptose quando SMAD7 assume seu nível mais alto de ativação (YAN; LIU; CHEN, 2009).



	Apoptose	ParadaCiclo	Senescencia	Proliferacao	SMAD23	BRCA1	p15INK4b	GADD45b	CHEK1	CHEK2	Mdm2	p14ARF	p53	p21	pRB	Wee1	p16INK4a	p38MAPK	CdkCyclin	Cdc25ABC	E2F	SMAD7	ATM	ATR	DSB	SSB	TGFbeta
1	1											1	2	1	1		2	3		1		2			1		
1	1											1	2	1	1		2	3		1		2					
1	1							1				1	2	1	1		2	3		1		2			1		2
1	1							1				1	2	1	1		2	3		1		2			1		2
1	1					1		1				1	2	1	1		2	3		1		2		1		1	2
1	1					1		1				1	2	1	1		2	3		1		2		1	1	1	
1	1					1		1				1	2	1	1		2	3		1		2		1	1	1	2
1	1					1		1	1			1	2	1	1	1	2	3		1		2		2	2	2	2
1	1					1		1	1			1	2	1	1	1	2	3		1		2		2	1	2	
1	1					1		1	1			1	2	1	1	1	2	3		1		2		2	1	2	2
1	1					1		1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2		2		2
1	1					1		1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2	1	2	1	
1	1					1		1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2	1	2	1	2
1	1					1		1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2	2	2	2	
1	1					1		1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2	2	2	2	2
1	1				1		1	1				1	2	1	1		2	3		1		2					1
1	1				1		1	1				1	2	1	1		2	3		1		2			1		1
1	1				1	1	1	1				1	2	1	1		2	3		1		2		1		1	1
1	1				1	1	1	1	1			1	2	1	1	1	2	3		1		2		2		2	1
1	1				1	1	1	1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2		2		1
1	1				1	1	1	1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2	1	2	1	1
1	1				1	1	1	1	1	1		1	2	1	1	1	2	3				2	2	2	2	2	1

Figura 6.11 – Estados estáveis do modelo para o caso SMAD7 superexpresso. Destino celular a partir das 27 possíveis combinações de valores de entradas do modelo considerando a mutação imposta à rede

Este resultado representa um aumento de indução de apoptose em relação ao modelo referência (Figura 6.2), nos demonstrando assim o potencial indutor de apoptose da proteína SMAD7 quando superexpressa.

Tabela 6.4 – Tabela resumo contendo os resultados apresentados nas Figuras 6.10 e 6.11, obtidos na simulação de mutações da proteína SMAD7 na rede

Mutações	SMAD7 [0,1]	SMAD7 E2
Estados Estáveis	27	27
Fenótipos de Saída	3,7% proliferação (1 estado estável), 63% parada ciclo celular (17), 29,6% senescência (8), 3,7% apoptose (1)	100% apoptose (27 estados estáveis)
Resultados	Aumento parada do ciclo celular, diminuição de apoptose, proliferação e senescência iguais em relação ao modelo referência	Aumento de apoptose em relação ao modelo referência

Todos os resultados apresentados neste capítulo, estão dispostos na Tabela 6.5 juntamente com as referências bibliográficas as quais caracterizam os resultados encontrados.

Tabela 6.5 – Tabela resumo contendo todos os resultados obtidos com a rede proposta. As informações contidas na coluna "Resultados" referem-se a uma análise qualitativa que considera como parâmetro o modelo referência (Figura 6.2) como padrão de comparação

Mutações	Estados Estáveis	Fenótipos de Saída	Resultados	Referências Bibliográficas
DSB + SSB	9	11% proliferação (1 estado), 55,5% parada do ciclo celular (5), 22,2% senescência (2), 11% apoptose (1)	Modelo Referência	(MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015)
TGF $\beta$	3	33% proliferação (1), 33% senescência (1), 33% apoptose (1)	Aumento de indução de senescência e apoptose	(MUÑOZ-ESPÍN et al., 2013; SCHUSTER; KRIEGLSTEIN, 2002; NELSON et al., 2012)

DSB + SSB + TGF $\beta$	27	3,7% proliferação (1 estado), 30% parada do ciclo celular (8), 30% senescência (8), 37% apoptose (10)	Aumento de indução de senescência e apoptose	-
p53 KO ( <i>Knockout</i> )	27	3,7% proliferação (1 estado), 37% parada do ciclo celular (10), 59,3% senescência (16)	Aumento de indução de senescência e diminuição de parada do ciclo celular	(REYNISDOTTIR et al., 1995; BAR et al., 2009)
p53 E1	27	33,3% parada do ciclo celular (9), 66,6% senescência (18)	Aumento de indução de senescência e diminuição de indução de apoptose	(KO; PRIVES, 1996; LEVINE, 1997; LAKIN; JACKSON, 1999)
p53 E2	27	100% apoptose	Aumento de indução de apoptose	(KASTAN; CANMAN; LEONARD, 1995; ZUCKERMAN et al., 2009)
TGF $\beta$ KO, SMAD23 E2, SMAD7 KO (Supressor Tumoral)	9	88,9% senescência (8 estados), 11,2% apoptose (1)	Aumento de indução de senescência e diminuição de apoptose	(ZHANG; YU; LEE, 2014)
TGF $\beta$ E2, SMAD23 KO, SMAD7 E2 (Promotor)	9	100% apoptose (9 estados estáveis)	Aumento de indução de apoptose	(WENDT; TIAN; SCHIEMANN, 2012)
SMAD7 [0,1]	27	3,7% proliferação (1 estado estável), 63% parada do ciclo celular (17), 29,6% senescência (8), 3,7% apoptose (1)	Aumento de parada do ciclo celular, diminuição de apoptose, indução de proliferação e senescência iguais em relação ao controle	(YAN; LIU; CHEN, 2009)

SMAD7 E2	27	100% apoptose (27 estados estáveis)	Aumento de indução de apoptose	(YAN; LIU; CHEN, 2009)
----------	----	---	--------------------------------------	---------------------------

Estes resultados encontrados e apresentados até aqui, nos levaram as conclusões que serão apresentadas no capítulo seguinte.

## 7 CONCLUSÃO

Esta tese teve por objetivo expandir a rede de regulação de proteínas proposta por Mombach e colaboradores em 2015 levando em consideração a sinergia entre a sinalização  $TGF\beta$  e dano ao DNA na indução de fenótipos celulares como proliferação, parada do ciclo celular, senescência e apoptose das células.

Todos os organismos possuem inúmeras vias de interações entre proteínas, aqui, apresentamos apenas uma parte de interações entre proteínas e vias de sinalização presentes nas células.

O modelo apresentado aqui considera como entradas (*inputs*) na rede, tipos e níveis de danos ocasionados ao DNA (quebras simples e/ou duplas reparáveis e/ou irreparáveis) e expressão da via de sinalização de  $TGF\beta$  considerando diferentes níveis de ativação da mesma. Os *inputs* da rede aqui proposta, podem ser ligados e desligados nos possibilitando assim que observemos os diferentes comportamentos da rede.

Podemos observar pelos resultados obtidos, apresentados na Tabela 6.5, que conforme a bibliografia encontrada e explorada nesta pesquisa, a via de  $TGF\beta$  é extremamente complexa, o que nos permitiu em alguns pontos reproduzir resultados encontrados experimentalmente na literatura, e em outros não encontramos explicações plausíveis, porém as mesmas são consideradas resultados desta pesquisa.

Inicialmente, na rede foram observadas as diferentes contribuições das entradas consideradas no modelo lógico apresentado. Quando como entrada foi considerado somente quebras simples e duplas ao DNA em diferentes níveis, observamos os resultados condizentes com o apresentado no artigo de Mombach e colaboradores (MOMBACH; VENDRUSCULO; BUGS, 2015). Ao considerarmos como entrada somente a expressão da via de  $TGF\beta$  e as outras entradas *knockout*, observamos indução de senescência conforme apresentado na literatura citada na Tabela 6.5. E, ao combinarmos estas entradas, ou seja, todas as entradas do modelo ligadas, observamos em nossa rede um aumento de indução de apoptose e senescência celular, o que pelas regras atribuídas à rede era um resultado esperado, apesar de não encontrarmos trabalhos experimentais que combinem dano ao DNA com via de  $TGF\beta$ .

Devido a sua importância, a proteína p53 foi inicialmente submetida a mutações a fim de validação do modelo. Esta proteína é normalmente ativada quando o DNA sofre algum dano, e através de mecanismos intra-celulares, a célula pára o ciclo celular e pode entrar em apoptose ou senescência, dependendo do tipo de dano e de célula em questão, e dependendo também do nível de dano ocasionado.

Ao submetermos a rede a mutação onde considera p53 *knockout*, igual a 0, observamos que houve aumento de indução de senescência nas células, ao observarmos a regra lógica que determina senescência celular na rede, vemos que de acordo com a regra

atribuída, este fenótipo depende da ativação de p21 e de p53 em níveis baixos, devido a isto, senescência se apresenta com indução aumentada, resultado observado nas mutações p53 KO e p53 fixada no nível intermediário de expressão, igual a 1. Observamos também, que houve indução de parada do ciclo celular mesmo sem dano ao DNA ou expressão da via  $TGF\beta$  quando p53 estava no nível 1, isto nos demonstra que p53 no nível intermediário de ativação desencadeia mecanismos celulares que fazem com que as células parem a progressão do ciclo celular, demonstrando que esta expressão pode ocasionar algum tipo de dano às células.

Quando consideramos p53 no seu nível máximo de expressão, igual a 2, observamos como esperado, indução de apoptose em 100% dos estados estáveis gerados. Estes resultados encontrados para as mutações da proteína p53, corroboram o que a literatura nos apresenta, que nos diz que o nível de ativação de p53 é decisivo no destino celular, ou seja, níveis de expressão mais baixos podem desencadear mecanismos de senescência celular e níveis mais altos de expressão, apoptose celular, que é a morte celular programada. Estes destinos também são dependentes do tipo celular em questão e do nível de dano ocasionado.

Nosso estudo de mutações compreendeu também a reprodução na rede da função indutora de senescência atribuída a via de sinalização  $TGF\beta$  que, de acordo com a literatura, é um fator parácrino secretado por células senescentes, que possui capacidade de induzir este estado às células vizinhas, caracterizando assim a chamada "*Senescência Bystander*". Quando observamos todas as entradas do modelo ativas, ou seja, quebras duplas e simples do DNA reparáveis e irreparáveis combinadas com expressão da via  $TGF\beta$  em diferentes níveis, visualizamos que ocorreu um aumento de indução de senescência e apoptose celular, um resultado esperado, já que  $TGF\beta$  também é um potencial indutor de apoptose e senescência celular.

Neste trabalho, testamos o Paradoxo de  $TGF\beta$ , submetendo a rede a duas mutações que a literatura define como sendo os diferentes comportamentos de  $TGF\beta$  no paradoxo. Ao testarmos a função supressora tumoral, observamos que a rede nos deu como resultado um aumento de indução de senescência, o que está em concordância com a literatura, pois frente a um dano ocasionado ao DNA, senescência celular é um mecanismo de reparo, impedindo assim que células filhas defeituosas sejam geradas.

Já para a função promotora tumoral, atribuída a  $TGF\beta$  não conseguimos reproduzir o resultado encontrado na literatura, pois conforme observado nos resultados obtidos com a simulação, tivemos indução de todos os estados estáveis do sistema para apoptose, o que não seria um resultado esperado para um comportamento de promotor tumoral. Atribuímos este resultado adverso a hipótese de que nossa rede foi construída baseada em interações entre proteínas de células normais, e a função promotora tumoral ocorreria em estágios mais avançados de células tumorais, as quais apresentam mecanismos e interações diferenciadas em relação às células normais, por este motivo, acreditamos que

não foi possível reproduzir este resultado na rede aqui proposta.

A proteína SMAD7 adicionada à rede apresentada neste trabalho, é uma das proteínas que faz parte do *crosstalk* entre a via  $TGF\beta$  e outras vias de sinalização. Segundo a literatura, SMAD7 pode ter sua expressão diminuída em algumas doenças humanas, incluindo inflamações e sua expressão aumentada sugere seu potencial terapêutico atuando como antagonista em diversas doenças humanas. Ao observarmos a mutação imposta a rede onde SMAD7 é fixada nos níveis de expressão 0 a 1 obtivemos aumento de indução de parada do ciclo celular, o que pode representar que a célula está tentando reparar danos ocasionados à ela. Como os demais fenótipos de saída (proliferação, apoptose e senescência) se apresentaram iguais ou diminuídos em relação ao modelo referência, podemos estabelecer que após a parada no ciclo, a célula fez o reparo e prosseguiu normalmente. Em relação a mutação onde SMAD7 é elevada ao seu nível máximo de expressão, igual a 2, obtivemos como resultado aumento de indução de apoptose, confirmando assim seu potencial terapêutico na presença de danos instaurados ao DNA.

Todos os resultados apresentados neste trabalho de pesquisa nos dão suporte a afirmar que o modelo de rede regulatória apresentado nesta tese demonstra com embasamento teórico um modelo útil de interações entre proteínas constituintes das vias de reparo ao dano do DNA e da via de  $TGF\beta$ . Podemos afirmar que este modelo representa teoricamente a sinergia entre dano ao DNA e  $TGF\beta$  de maneira que ao combinarmos as entradas, os resultados condizeram com o que a literatura nos apresenta.

Em resumo, o modelo lógico proposto nesta tese representa algumas das interações entre vias de reparo ao dano no DNA e via  $TGF\beta$  para células de fibroblastos normais.

Como sugestão de continuidade do trabalho, há a possibilidade de modificar esta rede para que a mesma possa ser útil na simulação de processos presentes em células tumorais, onde é possível mapear as alterações fenotípicas presentes na carcinogênese por exemplo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-JAOUDE, W. et al. Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. **Frontiers in genetics**, Frontiers Media SA, v. 7, 2016.

ACOSTA, J. C. et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. **Nature cell biology**, Nature Publishing Group, v. 15, n. 8, p. 978–990, 2013.

ALBERTS, B. et al. An overview of the cell cycle. Garland Science, 2002.

ANCRILE, B.; LIM, K.-H.; COUNTER, C. M. Oncogenic ras-induced secretion of il6 is required for tumorigenesis. **Genes & development**, Cold Spring Harbor Lab, v. 21, n. 14, p. 1714–1719, 2007.

ANSCHER, M. S. Targeting the  $\text{tgf-}\beta\text{1}$  pathway to prevent normal tissue injury after cancer therapy. **The oncologist**, AlphaMed Press, v. 15, n. 4, p. 350–359, 2010.

BACHMAN, K. E.; PARK, B. H. Dual nature of  $\text{tgf-}\beta$  signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. **Current opinion in oncology**, LWW, v. 17, n. 1, p. 49–54, 2005.

BAR, J. et al. Cancer cells suppress p53 in adjacent fibroblasts. **Oncogene**, NIH Public Access, v. 28, n. 6, p. 933, 2009.

BEN-PORATH, I.; WEINBERG, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Elsevier, v. 37, n. 5, p. 961–976, 2005.

BLASCO, M. A. Telomere length, stem cells and aging. **Nature chemical biology**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 10, p. 640–649, 2007.

BROWN, J. P.; WEI, W.; SEDIVY, J. M. Bypass of senescence after disruption of p21<sup>cip1</sup>/waf1 gene in normal diploid human fibroblasts. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 277, n. 5327, p. 831–834, 1997.

BUNZ, F. et al. Requirement for p53 and p21 to sustain g2 arrest after dna damage. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 282, n. 5393, p. 1497–1501, 1998.

CALVANO, S. E. et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 437, n. 7061, p. 1032–1037, 2005.

CAMPISI, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. **Trends in cell biology**, Elsevier, v. 11, p. S27–S31, 2001.

CAMPISI, J.; FAGAGNA, F. d. di. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nature reviews Molecular cell biology**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 9, p. 729–740, 2007.

CHAOUIYA, C.; NALDI, A.; THIEFFRY, D. Logical modelling of gene regulatory networks with ginsim. **Bacterial Molecular Networks: Methods and Protocols**, Springer, p. 463–479, 2012.

CHILDS, B. G. et al. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? **EMBO reports**, EMBO Press, v. 15, n. 11, p. 1139–1153, 2014.



CHUNG, S.-W. et al. Quantitative modeling and analysis of the transforming growth factor  $\beta$  signaling pathway. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 96, n. 5, p. 1733–1750, 2009.

CICENAS, J. et al. Highlights of the latest advances in research on cdk inhibitors. **Cancers**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 6, n. 4, p. 2224–2242, 2014.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell**. [S.l.]: Sinauer Associates Sunderland, 2000.

COPPÉ, J.-P. et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic ras and the p53 tumor suppressor. **PLoS Biol**, Public Library of Science, v. 6, n. 12, p. e301, 2008.

CORTEZ, D. et al. Requirement of atm-dependent phosphorylation of brca1 in the dna damage response to double-strand breaks. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 286, n. 5442, p. 1162–1166, 1999.

COULOUARN, C.; FACTOR, V. M.; THORGEIRSSON, S. S. Transforming growth factor- $\beta$  gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. **Hepatology**, Wiley Online Library, v. 47, n. 6, p. 2059–2067, 2008.

DAVALOS, A. R. et al. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. **Cancer and Metastasis Reviews**, Springer, v. 29, n. 2, p. 273–283, 2010.

DAVIDICH, M. I.; BORNHOLDT, S. Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast. **PLoS one**, Public Library of Science, v. 3, n. 2, p. e1672, 2008.

DENG, C.-X. Brca1: cell cycle checkpoint, genetic instability, dna damage response and cancer evolution. **Nucleic acids research**, Oxford University Press, v. 34, n. 5, p. 1416–1426, 2006.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. Tgf- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nature genetics**, Nature Publishing Group, v. 29, n. 2, p. 117–129, 2001.

DERYNCK, R.; ZHANG, Y. E. Smad-dependent and smad-independent pathways in tgf- $\beta$  family signalling. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 425, n. 6958, p. 577–584, 2003.

DI, X. et al. A chemotherapy-associated senescence bystander effect in breast cancer cells. **Cancer biology & therapy**, Taylor & Francis, v. 7, n. 6, p. 864–872, 2008.

EDGAR, R.; DOMRACHEV, M.; LASH, A. E. Gene expression omnibus: Ncbi gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic acids research**, Oxford Univ Press, v. 30, n. 1, p. 207–210, 2002.

ELSTON, R.; INMAN, G. J. Crosstalk between p53 and tgf- $\beta$  signalling. **Journal of signal transduction**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012.

ELZI, D. J. et al. Plasminogen activator inhibitor 1-insulin-like growth factor binding protein 3 cascade regulates stress-induced senescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 109, n. 30, p. 12052–12057, 2012.

FORNACE, A. J.; ALAMO, I.; HOLLANDER, M. C. Dna damage-inducible transcripts in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 85, n. 23, p. 8800–8804, 1988.

FRANCESCHINI, A. et al. String v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic acids research**, Oxford Univ Press, v. 41, n. D1, p. D808–D815, 2013.

FRIDMAN, J. S.; LOWE, S. W. Control of apoptosis by p53. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 22, n. 56, p. 9030–9040, 2003.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O.; STRANDBERG, T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. **Nature Reviews Cardiology**, Nature Publishing Group, v. 10, n. 5, p. 274–283, 2013.

GARCIA, V. et al. The gadd45, zbrk1 and brca1 pathway: quantitative analysis of mrna expression in colon carcinomas. **The Journal of pathology**, Wiley Online Library, v. 206, n. 1, p. 92–99, 2005.

GATEI, M. et al. Role for atm in dna damage-induced phosphorylation of brca1. **Cancer research**, AACR, v. 60, n. 12, p. 3299–3304, 2000.

GILMORE, P. et al. **Role played by BRCA1 in regulating the cellular response to stress.** [S.l.]: Portland Press Limited, 2003.

GRIECO, L. et al. Integrative modelling of the influence of mapk network on cancer cell fate decision. **PLoS Comput Biol**, Public Library of Science, v. 9, n. 10, p. e1003286, 2013.

GUO, Q. et al. Mammary gland involution provides a unique model to study the  $\text{tgf-}\beta$  cancer paradox. **Journal of clinical medicine**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 6, n. 1, p. 10, 2017.

HANNON, G. J.; BEACH, D. p15ink4b is a potential effector of  $\text{tgf-}\beta$ -induced cell cycle arrest. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 371, n. 6494, p. 257, 1994.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental cell research**, Elsevier, v. 37, n. 3, p. 614–636, 1965.

HICKMAN, E. S.; MORONI, M. C.; HELIN, K. The role of p53 and prb in apoptosis and cancer. **Current opinion in genetics & development**, Elsevier, v. 12, n. 1, p. 60–66, 2002.

HODNY, Z.; HUBACKOVA, S.; BARTEK, J. Cytokines shape chemotherapy-induced and 'bystander' senescence. **Ageing (Albany NY)**, Impact Journals, LLC, v. 2, n. 7, p. 375, 2010.

HOUTGRAAF, J. H.; VERSMISSEN, J.; GIESSEN, W. J. van der. A concise review of dna damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine**, Elsevier, v. 7, n. 3, p. 165–172, 2006.

HUBACKOVA, S. et al. Il1-and  $\text{tgf}\beta$ -nox4 signaling, oxidative stress and dna damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. **Ageing (Albany NY)**, v. 4, n. 12, p. 932–951, 2012.

HUSTEDT, N.; DUROCHER, D. The control of dna repair by the cell cycle. **Nature Cell Biology**, Nature Research, v. 19, n. 1, p. 1–9, 2017.

JANG, C.-W. et al.  $\text{Tgf-}\beta$  induces apoptosis through smad-mediated expression of dap-kinase. **Nature cell biology**, Nature Publishing Group, v. 4, n. 1, p. 51–58, 2002.

JIN, S. et al. Brca1 activation of the gadd45 promoter. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 19, n. 35, p. 4050, 2000.

JONG, H. D. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. **Journal of computational biology**, Mary Ann Liebert, Inc., v. 9, n. 1, p. 67–103, 2002.

KASTAN, M. B.; CANMAN, C. E.; LEONARD, C. J. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, Springer, v. 14, n. 1, p. 3–15, 1995.

KEARSEY, J. M. et al. Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21cip1. **Oncogene**, v. 11, n. 9, p. 1675–1683, 1995.

KIM, Y.-A. et al. Gadd45 $\beta$  is transcriptionally activated by p53 via p38 $\alpha$ -mediated phosphorylation during myocardial ischemic injury. **Journal of Molecular Medicine**, Springer, v. 91, n. 11, p. 1303–1313, 2013.

KO, L. J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes & development**, Cold Spring Harbor Lab, v. 10, n. 9, p. 1054–1072, 1996.

KORTLEVER, R. M.; HIGGINS, P. J.; BERNARDS, R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. **Nature cell biology**, Nature Publishing Group, v. 8, n. 8, p. 877–884, 2006.

KUBICZKOVA, L. et al. Tgf- $\beta$ —an excellent servant but a bad master. **Journal of translational medicine**, BioMed Central, v. 10, n. 1, p. 183, 2012.

KUILMAN, T. et al. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. **Cell**, Elsevier, v. 133, n. 6, p. 1019–1031, 2008.

KUILMAN, T.; PEEPER, D. S. Senescence-messaging secretome: Sms-ing cellular stress. **Nature Reviews Cancer**, Nature Publishing Group, v. 9, n. 2, p. 81–94, 2009.

LAKIN, N. D.; JACKSON, S. P. Regulation of p53 in response to dna damage. **Oncogene**, v. 18, n. 53, 1999.

LEBRUN, J.-J. The dual role of tgf in human cancer: from tumor suppression to cancer metastasis. **ISRN molecular biology**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2012, 2012.

LENG, A. et al. Smad4/smad7 balance: a role of tumorigenesis in gastric cancer. **Experimental and Molecular pathology**, Elsevier, v. 87, n. 1, p. 48–53, 2009.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **cell**, Elsevier, v. 88, n. 3, p. 323–331, 1997.

LI, T. et al. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. **Cell**, Elsevier, v. 149, n. 6, p. 1269–1283, 2012.

LIBRELOTTO, G. R. et al. An ontology to integrate transcriptomics and interactomics data involved in gene pathways of genome stability. In: SPRINGER. **Brazilian Symposium on Bioinformatics**. [S.l.], 2009. p. 164–167.

MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G.; MÜLLER-DECKER, K. Tumor promotion as a target of cancer prevention. Springer, p. 37–47, 2007.

MASSAGUÉ, J. A very private tgf- $\beta$  receptor embrace. **Molecular cell**, Elsevier, v. 29, n. 2, p. 149–150, 2008.

MASSAGUÉ, J.; BLAIN, S. W.; LO, R. S. Tgf $\beta$  signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. **Cell**, Elsevier, v. 103, n. 2, p. 295–309, 2000.

MEDEMA, R.; MACUREK, L. Checkpoint control and cancer. **Oncogene**, Nature Publishing Group, v. 31, n. 21, p. 2601–2613, 2012.

MOMBACH, J. C.; BUGS, C. A.; CHAOUIYA, C. Modelling the onset of senescence at the g1/s cell cycle checkpoint. **BMC genomics**, BioMed Central, v. 15, n. 7, p. S7, 2014.

MOMBACH, J. C.; VENDRUSCULO, B.; BUGS, C. A. A model for p38mapk-induced astrocyte senescence. **PLoS one**, Public Library of Science, v. 10, n. 5, p. e0125217, 2015.

MOSES, H. L.; YANG, E. Y.; PIETENPOL, J. A. Tgf- $\beta$  stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. **Cell**, Elsevier, v. 63, n. 2, p. 245–247, 1990.

MOUSTAKAS, A.; SOUCHELNYTSKYI, S.; HELDIN, C.-H. Smad regulation in tgf- $\beta$  signal transduction. **Journal of cell science**, The Company of Biologists Ltd, v. 114, n. 24, p. 4359–4369, 2001.

MUÑOZ-ESPÍN, D. et al. Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. **Cell**, Elsevier, v. 155, n. 5, p. 1104–1118, 2013.

MUNOZ-ESPIN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Nature reviews Molecular cell biology**, Nature Research, v. 15, n. 7, p. 482–496, 2014.

NAKAGAWA, H.; OPITZ, O. G. Inducing cellular senescence using defined genetic elements. **Biological Aging: Methods and Protocols**, Springer, p. 167–178, 2007.

NELSON, G. et al. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. **Aging cell**, Wiley Online Library, v. 11, n. 2, p. 345–349, 2012.

NEUZILLET, C. et al. Targeting the tgf $\beta$  pathway for cancer therapy. **Pharmacology & therapeutics**, Elsevier, v. 147, p. 22–31, 2015.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. Dna damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis**, Oxford Univ Press, v. 21, n. 1, p. 3–9, 2006.

NURSE, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, Elsevier, v. 100, n. 1, p. 71–78, 2000.

OHTANI, N.; HARA, E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. **Cancer science**, Wiley Online Library, v. 104, n. 5, p. 525–530, 2013.

OSAWA, H. et al. Prognostic value of the expression of smad6 and smad7, as inhibitory smads of the tgf- $\beta$  superfamily, in esophageal squamous cell carcinoma. **Anticancer research**, International Institute of Anticancer Research, v. 24, n. 6, p. 3703–3710, 2004.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, Nature Research, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.

PARK, E. J. et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing il-6 and tnf expression. **Cell**, Elsevier, v. 140, n. 2, p. 197–208, 2010.

PEREZ-MANCERA, P. A.; YOUNG, A. R.; NARITA, M. Inside and out: the activities of senescence in cancer. **Nature reviews Cancer**, Nature Research, 2014.

PETROCCA, F. et al. E2f1-regulated micrnas impair  $\text{tgf}\beta$ -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. **Cancer cell**, Elsevier, v. 13, n. 3, p. 272–286, 2008.

POEHLMANN, A.; ROESSNER, A. Importance of dna damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. **Pathology-Research and Practice**, Elsevier, v. 206, n. 9, p. 591–601, 2010.

POLTZ, R. et al. Logical network of genotoxic stress-induced  $\text{nf-kb}$  signal transduction predicts putative target structures for therapeutic intervention strategies. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 2, p. 125–138, 2009.

PRINCIPE, D. R. et al.  $\text{Tgf-}\beta$ : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, Oxford University Press, v. 106, n. 2, p. djt369, 2014.

REYNISDOTTIR, I. et al. Kip/cip and ink4 cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to  $\text{tgf-beta}$ . **Genes & development**, Cold Spring Harbor Lab, v. 9, n. 15, p. 1831–1845, 1995.

RODIER, F.; CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **The Journal of cell biology**, Rockefeller University Press, p. jcb–201009094, 2011.

ROOS, W. P.; KAINA, B. Dna damage-induced cell death: from specific dna lesions to the dna damage response and apoptosis. **Cancer letters**, Elsevier, v. 332, n. 2, p. 237–248, 2013.

SABIN, R. J.; ANDERSON, R. M. Cellular senescence-its role in cancer and the response to ionizing radiation. **Genome integrity**, BioMed Central, v. 2, n. 1, p. 7, 2011.

SALAZAR-ROA, M.; MALUMBRES, M. Fueling the cell division cycle. **Trends in Cell Biology**, Elsevier, v. 27, n. 1, p. 69–81, 2017.

SANCAR, A. et al. Molecular mechanisms of mammalian dna repair and the dna damage checkpoints. **Annual review of biochemistry**, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 73, n. 1, p. 39–85, 2004.

SCHUSTER, N.; KRIEGLSTEIN, K. Mechanisms of  $\text{tgf-}\beta$ -mediated apoptosis. **Cell and tissue research**, Springer, v. 307, n. 1, p. 1–14, 2002.

SEOANE, J. et al.  $\text{Tgf}\beta$  influences *myc*, *miz-1* and *smad* to control the cdk inhibitor *p15ink4b*. **Nature cell biology**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 4, p. 400–408, 2001.

SHERR, C. J.; MCCORMICK, F. The *rb* and *p53* pathways in cancer. **Cancer cell**, Elsevier, v. 2, n. 2, p. 103–112, 2002.

SOMASUNDARAM, K. et al. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor *brca1* requires the cdk-inhibitor *p21waf1/cipl*. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 389, n. 6647, p. 187–190, 1997.

STOLFI, C. et al. The dual role of *smad7* in the control of cancer growth and metastasis. **International journal of molecular sciences**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 14, n. 12, p. 23774–23790, 2013.

SZKLARCZYK, D. et al. String v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, Oxford Univ Press, p. gku1003, 2014.

TERZI, M. Y.; IZMIRLI, M.; GOGEBAKAN, B. The cell fate: senescence or quiescence. **Molecular biology reports**, Springer Netherlands, v. 43, n. 11, p. 1213–1220, 2016.

TIBBETTS, R. S. et al. Functional interactions between brca1 and the checkpoint kinase atr during genotoxic stress. **Genes & development**, Cold Spring Harbor Lab, v. 14, n. 23, p. 2989–3002, 2000.

WANG, M. et al. Novel smad proteins localize to ir-induced double-strand breaks: interplay between  $\text{tgf}\beta$  and atm pathways. **Nucleic acids research**, Oxford Univ Press, p. gks1038, 2012.

WEINBERG, S. **Cosmology**. [S.l.]: Oxford University Press, 2008.

WENDT, M. K.; TIAN, M.; SCHIEMANN, W. P. Deconstructing the mechanisms and consequences of  $\text{tgf}\beta$ -induced emt during cancer progression. **Cell and tissue research**, Springer, v. 347, n. 1, p. 85–101, 2012.

XIONG, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Ried**, v. 49, p. 370, 1991.

YAN, X.; LIU, Z.; CHEN, Y. Regulation of  $\text{tgf}\beta$  signaling by smad7. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, Citeseer, v. 41, n. 4, p. 263–272, 2009.

YIKIM, I.; KIM, M. M.; KIM, S.-J. Transforming growth factor- $\beta$ : biology and clinical relevance. **BMB Reports**, Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2005.

YOO, J. et al. Transforming growth factor- $\beta$ -induced apoptosis is mediated by smad-dependent expression of gadd45b through p38 activation. **Journal of biological chemistry**, ASBMB, v. 278, n. 44, p. 43001–43007, 2003.

ZHANG, Q.; YU, N.; LEE, C. Mysteries of  $\text{tgf}\beta$  paradox in benign and malignant cells. **Frontiers in oncology**, Frontiers, v. 4, p. 94, 2014.

ZHANG, Y.; ALEXANDER, P. B.; WANG, X.-F.  $\text{Tgf}\beta$  family signaling in the control of cell proliferation and survival. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, Cold Spring Harbor Lab, v. 9, n. 4, p. a022145, 2017.

ZUCKERMAN, V. et al. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. **The Journal of pathology**, Wiley Online Library, v. 219, n. 1, p. 3–15, 2009.

## APÊNDICE A – REGRAS LÓGICAS ATRIBUÍDAS AS PROTEÍNAS CONSTITUINTES DA REDE REGULATÓRIA PROPOSTA

Tabela A.1 – Regras lógicas empregadas no controle da rede da Figura 5.3. AND, OR e NOT são operadores lógicos usados para determinar a regra de cada nó constituinte da rede proposta

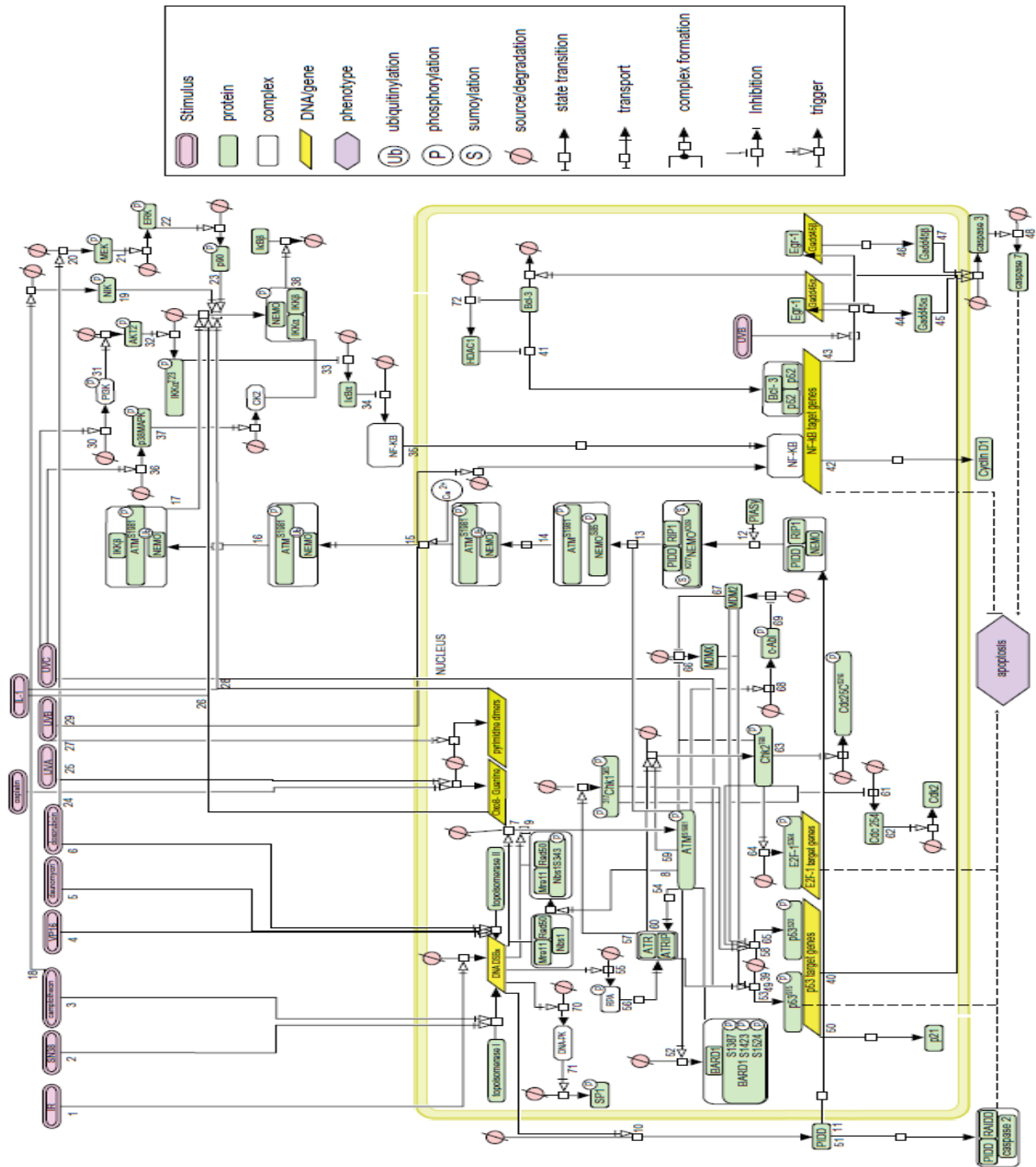
	Nó	Regra Lógica
Entradas	SSB e DSB	= 0 (Sem Dano) =1 (Dano Reparável) =2 (Dano Irreparável)
	TGFbeta	= 0 (Sem Expressão) =1 (Expressão média) =2 (Superexpressão)
Proteínas Efetoras	GADD45b	=1 (TGF $\beta$   BRCA1)
	SMAD23	=2 (TGF $\beta$ :2 & !SMAD7) =1 (TGF $\beta$ :1 & SMAD7)
	SMAD7	=2 (TGF $\beta$ :2) =1 (TGF $\beta$ :1)
	p15INK4b	=1 (SMAD23)
	p38MAPK	=3 ((ATM:2 & ATR:2)   SMAD7:2) =2 (!ATR:2 & ATM:2 & !SMAD7:2) =1 ((ATM:1   ATR:1   ATR:2) & !ATM:2 & !SMAD7)
	p16INK4a	=2 (p38MAPK:3) =1 (p38MAPK:1)
	p14ARF	=1 (p38MAPK   E2F)
	Mdm2	=1 (p53:1 & !p14ARF)
	ATM	=2 (DSB:2 & !SMAD7:1) =1 (DSB:1 & !SMAD7:2)
	CHEK2	=1 (ATM:2)
	BRCA1	=1 (ATM   ATR)
	ATR	=2 (SSB:2) =1 (SSB:1)
	CHEK1	=1 (ATR:2   ATM:2)
	Wee1	=1 (CHEK1:1)
	p53	=2 (!Mdm2 & (p38MAPK   ATR   ATM   CHEK1   CHEK2)) =1 (Mdm2 & (p38MAPK   ATR   ATM   CHEK1   CHEK2))
	p21	=1 (p53:1   SMAD23   BRCA1)
	CdkCyclin	=1 (Cdc25ABC & !p21 & !Wee1 & !p16INK4a & !p15INK4b & !GADD45b)

	Cdc25ABC	=2 (!p38MAPK & !CHEK2 & !CHEK1 & !SMAD23) =1 ((p38MAPK   CHEK1   CHEK2) & !p38MAPK & CHEK1 & CHEK2)) =0 (SMAD23:2)
	pRB	=1 (!CdkCyclin)
	E2F	=1 (!pRB & !p53:2)
Saídas	Parada Ciclo	!CdkCyclin   !E2F
	Proliferação	CdkCyclin & E2F
	Senescência	[(p16INK4a:1 & p21 & !p53:2 & !Cdc25ABC)   (p16INK4a:2 & p21 & !p53:2 & !Cdc25ABC:2)   (p15INK4b & p21 & !p53:2 & !Cdc25ABC)]
	Apoptose	p53 =2



# ANEXO A –

Gráfico A.1 – Modelo lógico de transdução de sinal induzido por estresse genotóxico com ênfase em ativação de NF- $\kappa$ B. Hiperarcos são numerados de acordo com as equações Booleanas presentes no artigo



Fonte: Retirado de (POLTZ et al., 2009).