

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

**Descrição Booleana para eventos celulares:  
construção de redes, topologia e análise dinâmica**

**TESE DE DOUTORADO**

**CRISTHIAN AUGUSTO BUGS**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**Descrição Booleana para eventos celulares:  
construção de redes, topologia e análise dinâmica**

por

**Cristhian Augusto Bugs**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, área de concentração em Física, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Física**

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Merino Mombach

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada  
aprova a Tese de Doutorado

**Descrição Booleana para eventos celulares:  
construção de redes, topologia e análise dinâmica**

elaborado por

**Cristhian Augusto Bugs**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**José Carlos Merino Mombach, Dr. (UFSM)**

(Presidente/Orientador)

**Marialva Signaglia, Dra. (UFRGS)**

**Fábio Mallmann Zimmer, Dr. (UFSM)**

**Andres Delgado Cañedo, Dr. (UNIPAMPA)**

**Marcos André Carara , Dr. (UFSM)**

**Santa Maria, 13 de Julho de 2012**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. José Carlos Merino Mombach, por sua dedicação, orientação e paciência durante a realização deste trabalho.

Agradeço também à Coordenação da Pós-Graduação em Física e a secretária Saionara Dutra, que me apoiaram desde o início do curso.

Ao meu colega e compadre Éder que me ensinou e apoio durante a construção do trabalho com muita paciência.

Aos meus colegas de Pós-graduação pelas contribuições durante os seminários.

Agradeço especialmente a minha esposa Marilene Heberlê Bugs pelo apoio e compreensão durante todo o tempo em que me dediquei a este trabalho. Esteve sempre presente ao meu lado, desde o início trabalhando muito para cuidar de mim e dos nossos filhos Leonardo Augusto Heberlê Bugs e Bernardo Augusto Heberlê Bugs.

A Jerônimo Aresço Heberlê e Maria Denecy de Ávila Heberlê que estiveram sempre ao meu lado e da minha família.

Aos meus pais Milton Augusto Bugs e Marly Bugs que sempre me apoiaram durante todas as fases da minha vida para tornar este sonho uma realidade.

Aos colegas da Universidade Federal do Pampa que diretamente ou indiretamente me deram suporte necessário durante o curso.

A Universidade Federal do Pampa pelo apoio financeiro.

**à minha esposa, meus filhos e meus pais.**

# RESUMO

Tese de doutorado

Programa de Pós-Graduação em Física

Universidade Federal de Santa Maria

## Descrição Booleana para eventos celulares: construção de redes, topologia e análise dinâmica

Autor: Cristhian Augusto Bugs

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Merino Mombach

Local e data da defesa: Santa Maria, 13 de Janeiro de 2012

Este trabalho apresenta uma metodologia para descrever a dinâmica e a topologia de redes biológicas regulatórias através da aplicação da teoria de grafos, da modelagem de redes a partir de regras booleanas e através do uso de simulações baseadas em algoritmos implementados no software MATHEMATICA 7.0. Por meio desta metodologia procurou-se caracterizar a rede de regulação de abertura e fechamento dos estômatos de uma planta pelo ácido abscísico (ABA), incluindo a relação entre os elementos da rede durante a dinâmica e a descrição do espaço de estados. No estudo do estado celular de senescência replicativa em humanos, o objetivo é descrever uma rede regulatória de proteínas envolvendo os mecanismos do complexo de *Shelterin* com a sinalização de duplas quebras no DNA e a sinalização da parada do ciclo celular na fase  $G_1$ . Por meio desta rede, a topologia deve envolver a combinação de vias e módulos para garantir a estabilidade da sinalização e a parada permanente da célula no estado senescente. O estado senescente também é caracterizado pelo estabelecimento de um fenótipo secretor (SASP) com efeitos tanto benéficos quanto prejudiciais para o organismo. Diferentes vias estão identificadas juntamente com a ativação de NF- $\kappa$ B na regulação deste fenótipo e nesse sentido, uma rede regulatória do SASP em senescência replicativa é proposta e as principais consequências do SASP para o cólon humano são identificadas através da análise de dados de microarranjos que relacionam cólon normal, cólon inflamado, adenoma de cólon e carcinoma de cólon.

**Palavras-chave:** senescência; vias regulatórias; dinâmica; ABA; espaço de estados; microarranjos.

## ABSTRACT

This work presents a methodology to describe the dynamics and topology of biological regulatory networks through the application of graph theory. We model these networks using Boolean rules and simulations performed with algorithms implemented in MATHEMATICA 7.0. Through this methodology, we characterize the regulatory network of opening and closing of the stomata of a plant by abscisic acid (ABA), including the relationships between the network's elements during the dynamics and the description of the state-space by comparing each one of its elements. For the state of cellular replicative senescence in humans, the goal is to describe a regulatory network of proteins involving the mechanisms of *Shelterin* complex, DNA double-strand break signaling, and the cell cycle arrest in G1 phase. The network topology must involve a combination of pathways and modules to ensure the stability of the signal and the permanent cell-cycle arrest. The state senescent is also characterized by establishing a secretory phenotype (SASP) with both beneficial and harmful effects for the organism. Different pathways are identified along with the activation of NF- $\kappa$ B in the regulation of these phenotypes and in this sense, a regulatory network to regulate the SASP in replicative senescence is proposed and the main consequences of the SASP for human colon are identified via analysis of microarray data related to normal colon, inflamed colon, colonic adenoma and carcinoma of the colon.

**Keywords:** Ssenescence; regulatory pathways; dynamics; ABA; space state; microarrays.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: a) Grafo não direcionado com seis nós $P_1, \dots, P_6$ e 11 arestas $L_1, L_2, \dots, L_{11}$ . b) Grafo direcionado com seis nós $P_1, \dots, P_6$ e 10 arestas $L_1, L_2, \dots, L_{10}$ .....	212
Figura 2: (A) Grafo de interação protéica para células do fígado humano. (B) Porcentagem de proteínas relacionadas às atividades celulares necessárias para a integridade da célula. ....	223
Figura 3: Exemplo de grafo direcionado incluindo uma via de sinalização indicada em amarelo. ....	245
Figura 4: Rede de sinalização de sobrevivência em T-LGL. O grafo direcionado representa as interações entre proteínas, enzimas e moléculas, enquanto que arestas azuis indicam ativação e arestas vermelhas indicam inibição [34]. ....	256
Figura 5. Interações moleculares entre os principais componentes que influenciam a decisão do destino celular [36]. ....	267
Figura 6. Multigrafo direcionado com seis nós $P_1, \dots, P_6$ e 12 arestas $L_1, L_2, \dots, L_{12}$ . ....	267
Figura 7. Grafo não direcionado com módulos conectados. ....	2930
Figura 8. Rede com 564 proteínas representando nós envolvidos em estabilidade cromossômica( nós indicados em preto), ciclo celular(nós indicados em amarelo), apoptose(nós indicados em vermelho) e reparo celular: NER, BER, HR, NHEJ, MMR(nós coloridos) [46]. ....	312
Figura 9. A organização da sinalização envolve a conectividade dos nós, o coeficiente de clusterização de cada nó, a modularidade em diferentes subgrafos e as redundantes vias de sinalização para garantir a execução de uma resposta apropriada. ....	323
Figura 10. Modelo caracterizando os pontos de equilíbrio(atratores) estáveis( $A_1, A_2$ ), os pontos de equilíbrio instáveis ( $I_1, I_2$ ) e ponto de equilíbrio fraco( $M$ ). Além disso, a topologia do sistema indicado na figura caracteriza as bacias de atração, de modo que pequenas perturbações os pontos atratores instáveis $I_1$ e $I_2$ conduzem o estado do sistema para os atratores $A_1, A_2$ [49]. ....	345
Figura 11. Relação entre os elementos fixos, elementos variantes, condições iniciais aleatórias e espaço de estados.....	367
Figura 12. (a) Grafo direto de 6 nós cujas interações são descritas através de mecanismos de ativação ou inibição indicados por arestas com setas normais e arestas com barras na extremidade respectivamente. (b) Descrição das interações através de regras booleanas definidas de forma aleatória para todos os nós da rede. ....	389
Figura 13. Estrutura helicoidal do DNA. Os nucleotídeos de uma cadeia estão conectados aos nucleotídeos da cadeia complementar através de pontes de hidrogênio indicadas na figura através de segmentos conectando as bases [329].	423
Figura 14: Depois de transcrito e processado no núcleo o mRNA é transportado para o citoplasma onde ocorre a tradução a partir dos ribossomos e a síntese de proteínas . ....	434



Figura 15: Divisão do ciclo celular em quatro sucessivas fases.....	456
Figura 16: CDKs e o controle da progressão do ciclo celular.....	467
Figura 17: Fluxograma do controle das respostas celulares em respostas aos danos do DNA .....	478
Figura 18: Rede de transdução de sinal do ABA contendo diferentes moléculas, incluindo proteínas, enzimas, hormônios e mensageiros secundários. Pequenos círculos pretos representam mediadores indiretos na rede regulatória. Arestas com setas indicam ativação, arestas com barras nas extremidades indicam inibição e arestas em azul indicam interações derivadas de diferentes espécies. Nós envolvidos na mesma via de sinalização ou complexo de proteínas estão indicados por caixas retangulares.....	4950
Figura 19: Comparação de eficiência entre as redes selvagem e mutante de afetar o nó Closure. Círculos azuis indica a rede selvagem e amarelo, vermelho, verde, laranja e preto representam os mutantes ABI, S1P, phc, NOS, e PA respectivamente.....	512
Figura 20: Estrutura em fita dupla e simples dos telômeros indicados na extremidade cromossomo.....	545
Figura 21: Sinalização da senescência replicativa através de uma cascata de sinalização envolvendo elementos do complexo de <i>Shelterin</i> , sinalização de quebras duplas, sinalização de quebras simples e a parada do ciclo celular. ....	578
Figura 22: Rede de senescência replicativa. As elipses vermelhas representam as proteínas do complexo de <i>Shelterin</i> , as elipses azuis representam proteínas de sinalização de danos no DNA, as as elipses verdes indicam proteínas do ponto de checagem em G <sub>1</sub> e as elipses amarelas representam os mecanismos inativos durante o estado senescente. O retângulo vermelho indica o início da sinalização da parada, os retângulos verdes indicam os módulos de amplificação do sinal e o retângulo cinza indica as vias de sinalização para a parada rápida e permanente do ciclo celular.....	589
Figura 23: Formação do complexo de <i>Shelterin</i> e sua distribuição sobre os telômeros nas partes dupla fita e fita simples do DNA telomérico composto de uma sequência repetida de hexanucleotídeos 5' – TTAGGG – 3' em uma fita e a complementar 3' – AATCCC – 5' na outra.....	5960
Figura 24: Rede regulatória envolvendo a interação entre os módulos através de 53BP1 e a interação entre as vias para a rápida e permanente ativação do estado permanente na fase G <sub>1</sub> do ciclo celular.....	634
Figura 25: Rede regulatória do SASP envolvendo os principais responsáveis pela regulação tanto da senescência replicativa quanto do SASP. ....	745
Figura 26: Análise de atividade e diversidade das vias envolvidas com a regulação do SASP nas transições do cólon. Na figura 2, o símbolo + indica aumento de atividade da via e 0 indica que a via não está alterada na comparação entre experimento e controle.....	7980
Figura 27: Análise dos genes diferencialmente expressos. Nas transições entre os tecidos os 5 genes mais expressos e os 5 genes menos expressos em cada uma das vias do SASP indicadas por TNF- $\alpha$ , RIGI, P53 e TGF- $\beta$ . ....	812

Figura 28: Diferenciação de expressão dos genes envolvidos com o SASP. A parte superior da tabela indica os genes mais expressos, enquanto que a parte inferior da tabela indica os menos expressos. As comparações controle x experimento indicam que os genes mais expressos, tem o nível de expressão aumentado e os genes expressos tem o nível de expressão diminuído.....834

Figura 29: Nível de diferenciação dos 4 genes que aparecem entre os 5 mais diferenciados e que apresentam importante papel no controle do estado senescente em adenoma do cólon. O gráfico representa através de segmentos contínuos a variação do nível de diferenciação dos valores discretos relativos a cada uma das transições. O nível de expressão na comparação normal x câncer foi também considerado para ser usado como base na análise da dinâmica normal x inflamação x adenoma x câncer. ....867

Figura 30: Nível de expressão nas transições normal x inflamação, normal x adenoma e adenoma x câncer para amostras do cólon. O gráfico representa através de segmentos contínuos a variação do nível de diferenciação dos valores discretos relativos a cada uma das transições. ....889

Figura 31: Nível de Inflamação aproximado pela somatória de expressão dos genes presentes na via SASP. Devido às alterações encontradas de todas as vias, consideramos o envolvimento de todos os genes da via SASP para obter uma estimativa do grau de inflamação entre as transições. A soma total foi normalizada a partir da transição normal x câncer, encontrada com a maior somatória dentre todas transições. O nível de inflamação na comparação normal x câncer foi também considerado para ser usado como base na análise da dinâmica normal x inflamação x adenoma x câncer. ....901

Figura 32: A parte da figura destaca em vermelho indica a inflamação promovida por diferentes vias contendo TNF, TGFB1, RIG-I e TP53 responsáveis pela regulação de NF-KB e por influenciar diferentes respostas das células ao nível de danos no DNA. A parte destacada em azul indica o papel da senescência replicativa na supressão tumoral através da regulação da rede envolvendo os quatros genes TP53, TGFB1, DNMT3B e KLOTHO. Em níveis de inflamação crônica, as setas em vermelho indicam a influência da inflamação sobre a rede e provável escape da célula do estado senescente a partir da desregulação das interações entre os 4 genes. ....923

Figura 33: Rede regulatória do SASP envolvendo os principais responsáveis pela regulação tanto da senescência replicativa quanto do SASP. ....1312

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
SASP	Fenótipo secretor associado ao estado senescente
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear $\kappa$ B
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose de tumor
RIG-I	Gene induzível ácido retinóico I
TP53	Supressor de tumor p53
GO	<i>Gene Ontology</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
BER	Reparo por excisão de bases
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
MMR	Reparo de bases mal pareadas
HR	Reparo por recombinação homóloga
NHEJ	Reparo por terminação não homóloga
DDR	Reparação ao dano do DNA
DC	Doença de Crohn
UC	Colite Ulcerosa
CRC	Câncer colorretal
CAC	Câncer colorretal associado à colite
IBD	Doença inflamatória do intestino
TIF	Resposta aos danos no DNA nos telômeros
CIN	Instabilidade Cromossomal
MSI	Instabilidade de microsátélites
CpG	Regiões do DNA ricas em citosina e guanina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	21
2.1 Teoria de Grafos .....	21
2.2 Redes Booleanas .....	32
2.3 Simulações .....	37
2.4 Aspectos positivos e negativos de redes booleanas.....	40
2.5 DNA e expressão gênica.....	41
2.6 Ciclo Celular .....	44
3. UM MÉTODO PARA IDENTIFICAR IMPORTANTES ESTADOS DINÂMICOS EM UM MODELO BOOLEANO DE REDES REGULATÓRIAS: APLICAÇÃO PARA A REGULAÇÃO DO FECHAMENTO DOS ESTÔMATOS PELO ABA EM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> . .....	48
3.1 Análise da dinâmica da rede selvagem e das redes mutantes .....	49
3.2 Análise do Espaço de Estados .....	51
3.3 Elementos variantes e invariantes da rede .....	52
3.4 Conexão entre as simulações .....	52
4. MODELAGEM DA REDE DE SENESCÊNCIA REPLICATIVA .....	54
4.1 Introdução.....	54
4.2 Sinalização do complexo de <i>Shelterin</i> . .....	59
4.3 Sinalização de quebras duplas do DNA. ....	60
4.4 Vias de sinalização da parada do ciclo celular.....	63
4.5 Dinâmica da rede de senescência replicativa.....	65
4.6 Conclusões.....	67
5. MODELAGEM DA REDE SASP: IMPLICAÇÕES NAS TRANSIÇÕES DO CÓLON HUMANO. ....	68
5.1 Introdução.....	68
5.2 Rede SASP .....	72
5.3 SASP em inflamação, adenoma e câncer do cólon: transições entre os tecidos.....	74
5.4 Resultados .....	78
5.5 Discussão .....	84
5.6 Conclusões .....	93

<b>5.7 Métodos.....</b>	<b>94</b>
<b>5.7.1 Via Complex.....</b>	<b>94</b>
<b>5.7.2 Vias do SASP .....</b>	<b>96</b>
<b>6.CONCLUSÕES .....</b>	<b>98</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>100</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>102</b>
<b>APÊNDICE 1. Vias de sinalização da parada do ciclo celular.....</b>	<b>124</b>
<b>APÊNDICE 2. Rede regulatória do SASP.....</b>	<b>130</b>

# 1. INTRODUÇÃO

Todos os seres vivos são caracterizados por processos biológicos complexos, envolvendo as interações entre os vários sistemas de sinalização da célula, de modo que as interações entre o DNA, RNA e a síntese de proteínas envolvem uma precisa interação e regulação de milhares de moléculas incluindo enzimas, proteínas e mensageiros secundários. As respostas intracelulares envolvendo todos estes elementos coordenados são chamadas de transdução de sinal e as relações entre estas moléculas coordenadas pela transdução de sinais descrevem a evolução do sistema a partir dos estados de cada um dos seus componentes (ALBERT *et al.*, 2009). Apesar da diversidade e complexidade dos processos envolvendo a transdução de sinais, resultados recentes indicam que a compreensão da estrutura e dos mecanismos regulatórios podem contribuir para esclarecer muitas redes biológicas incluindo redes regulatórias vinculadas a transdução de sinal pelo ácido abscísico (ABA) em plantas e várias doenças genéticas humanas (BARABÁSI *et al.*, 2004).

A rede de transdução de sinal do ABA em plantas envolve uma rede de sinalização para garantir uma resposta adequada da planta às condições ambientais adversas. Em condições normais o ABA é mantido em baixos níveis para garantir o desenvolvimento normal da planta, além de regular diversos processos celulares incluindo o desenvolvimento de sementes, germinação, crescimento vegetativo e principalmente resposta ao estresse hídrico (XIONG *et al.*, 2003). Estas diversas funções envolvem redes regulatórias que controlam a sua produção, degradação, percepção e transdução de sinais (UMEZAWA *et al.*, 2010). Os poros estomáticos sobre a superfície da planta são os elementos reguladores da absorção de CO<sub>2</sub> da atmosfera e da perda de vapor de água pela planta através da transpiração. As aberturas dos estômatos são controladas por um par de células-guarda, que por sua vez regulam a fotossíntese e a quantidade de água necessária para a manutenção da planta (LI *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2005; FAN. *et al.*, 2004). Durante períodos de seca, o ABA atua como um inibidor da abertura dos estômatos para garantir que condições mínimas de sobrevivência sejam mantidas através da conservação da água pelo fechamento dos poros estomáticos. A resposta ao estresse hídrico inicia

pelo aumento dos níveis de concentração do ácido abscísico, seguida da formação de uma rede de transdução de sinal para a regulação da abertura e fechamento dos estômatos (XIONG *et al.*, 2003). Esta rede regulatória envolve múltiplas vias de sinalização e um grande número de reguladores incluindo enzimas, proteínas de transdução de sinal, mensageiros secundários e pequenas moléculas de forma que a regulação entre estes diversos elementos pode ser representada através de um grafo direcionado cujas arestas indicam a regulação entre os elementos e a forma de interação (ativação ou inibição) conforme o modelo proposto por Song Li e seus colaboradores (LI *et al.*, 2006). O comportamento dos elementos responsáveis pela sinalização da abertura ou fechamento dos estômatos pode ser visto como um processo complexo determinado não somente pela organização topológica da rede e das suas conexões, mas também pelos processos dinâmicos cujas respostas dependem da fisiologia da planta e das condições ambientais. Tradicionalmente uma dinâmica é caracterizada por um comportamento ordenado ou robusto de forma que condições iniciais similares ou até mesmo condições iniciais aleatórias induzem trajetórias similares no espaço de estados da rede. Diferente do comportamento robusto, condições iniciais também podem gerar diferenças significativas na dinâmica da rede a partir da obtenção de um sistema caótico, de modo que ambos comportamentos da rede são características de redes Booleanas utilizadas para a modelagem de redes biológicas (SHMULEVICH *et al.*, 2010).

Assim como a rede regulatória da sinalização do ABA, o câncer está relacionado a uma rede regulatória envolvendo o acúmulo de mutações somáticas em oncogenes e genes supressores de tumor de modo que as mutações resultam principalmente em defeitos nos mecanismos de reparo do DNA e na regulação do ciclo celular (CHRISTMANN *et al.*, 2003; JONSSON *et al.*, 2006). As proteínas envolvidas com o desenvolvimento do câncer são caracterizadas por uma maior interação proteína-proteína quando comparadas às proteínas que não estão relacionadas diretamente ao câncer, além de participar de grandes aglomerações relacionadas a determinadas funções celulares (JONSSON *et al.*, 2006). As interações entre as proteínas estão relacionadas principalmente aos eventos que ocorrem periodicamente em uma célula. Em condições normais, danos no DNA desencadeiam uma resposta específica da célula com o objetivo de eliminar os danos, contudo se o dano não pode ser eliminado, respostas específicas são ativadas para que a integridade parcial da célula seja mantida, isto significa a

ativação da apoptose ou da senescência (parada permanente do ciclo celular) para impedir que mutações sejam transmitidas para as células filhas (SANCAR *et al.*, 2004). Resultados recentes mostram que no caso de células tronco a diferenciação celular é uma resposta possível para preservar a integridade do tipo celular, tecido ou organismo (SHERMAN *et al.*, 2011). Se por um lado, a adaptação da célula a partir da senescência e a morte celular podem causar declínio funcional das células e dos tecidos através da promoção do envelhecimento e surgimento de doenças, por outro lado, também podem prevenir principalmente o surgimento do câncer.

A senescência celular é um processo que resulta de diferentes ações (oncogenes, danos no DNA, perda da capacidade replicativa pelo encurtamento dos telômeros, disfunção dos telômeros). Este estado senescente é caracterizado por mudanças morfológicas e funcionais que podem contribuir para disfunção celular, alteração do funcionamento de células vizinhas, degradação de componentes estruturais, doenças e formação do câncer (BURTON, 2009; RODIER *et al.*, 2011). A replicação da célula depende de um balanço entre o encurtamento dos telômeros a cada divisão celular e a ação da telomerase (enzima que adiciona sequências repetidas de DNA) no alongamento das extremidades dos telômeros. Os telômeros (extremidades dos cromossomos) de mamíferos contém um específico complexo de proteínas denominado complexo de *Shelterin* que protege as extremidades dos cromossomos, regulam a ação da telomerase e sinalizam o encurtamento dos telômeros (PALM *et al.*, 2008). Após um dado número de divisões ocorre a exposição das extremidades dos telômeros, a sinalização das extremidades expostas como uma dupla quebra no DNA e a parada permanente do ciclo celular em um estado denominado senescência replicativa (BURTON, 2009). Células senescentes permanecem metabolicamente ativas, tornam-se resistentes a apoptose e não entram na fase S em resposta a mitógenos (ZHANG, 2007). Esta caracterização do estado senescente sugere a existência de vários mecanismos para a garantia da manutenção da parada, incluindo várias vias moleculares cuidadosamente coordenadas, visto que a retomada do ciclo celular após o escape do estado senescente é chamada de fase M2 (*crisis*) da senescência replicativa e caracterizada por fusões das extremidades dos cromossomos, disfunção dos telômeros causando aberrações cromossomais, catástrofe mitótica e morte celular por apoptose (STOHR *et al.*, 2008; SHAY *et al.*, 2005).



A parada permanente do ciclo celular pode ocorrer de forma ordenada tanto na fase  $G_1$  quanto na fase  $G_2$  através da ativação dos mecanismos de ponto de checagem. Alguns fatores são importantes na escolha da parada na fase  $G_1$  ou  $G_2$  incluindo a sensibilidade do ponto de checagem  $G_1/S$  em relação à exposição das extremidades do DNA de modo que tem sido sugerido que uma simples quebra pode induzir a parada em  $G_1$ , enquanto que uma maior quantidade de duplas quebras são necessárias para ativação do ponto de checagem  $G_2/S$  no caso de senescência induzida por danos no DNA (D'ADDA DI FAGAGNA, 2008). Além disso, a manutenção da parada do ciclo da célula é outro fator importante na hora da decisão entre fases do ciclo celular. Do ponto de vista lógico, a manutenção da parada após a fase S requer a habilidade da célula em permanecer com o DNA duplicado o que implica um maior volume para a célula e conseqüentemente uma maior necessidade energética. Considerando que uma célula permanece metabolicamente ativa, a parada permanente da célula na fase  $G_1$  do ciclo celular parece ser a escolha mais adequada para um longo período de atividade em um tecido. Sendo assim, a manutenção dos telômeros pelo complexo *Shelterin*, a identificação dos telômeros como quebras duplas e a parada do ciclo celular preferencialmente na fase  $G_1$  do ciclo celular, sugere uma rede regulatória de proteínas de forma que o objetivo principal é garantir a manutenção da sinalização e da parada do ciclo celular. Diversos mecanismos regulatórios de senescência replicativa tem sido propostos envolvendo importantes marcadores do estado senescente, nesse sentido, o objetivo do trabalho é também descrever uma rede regulatória do estado senescente considerando-se como modelo fibroblastos humanos, para integrar os mais importantes marcadores.

Atualmente o estado senescente tem recebido uma atenção maior devido o poder do fenótipo secretor das células senescentes, capaz de promover mudanças funcionais significativas de células do próprio tecido, células do sistema imune e células dos estromas, todas indispensáveis para a promoção de tumores. O SASP (fenótipo secretor associado ao estado senescente) inclui fatores de crescimento que afetam as células e tecidos pela ativação de receptores de membrana que iniciam a transdução de sinais e cuja desregulação é responsável por inúmeras patologias associados ao fenótipo secretor senescente incluindo câncer (COPPÉ *et al.*, 2010). Uma revisão recente destaca os principais articuladores do SASP, todos de alguma forma envolvidos com a regulação de NF- $\kappa$ B, uma família de fatores de

transcrição responsáveis pela regulação de genes envolvidos com o fenótipo secretor (SAIMINEN *et al.*, 2012). A ativação do SASP ocorre basicamente pela formação de danos de DNA, de modo que diferentes tipos de estresses causadores de danos no DNA, incluindo encurtamento dos telômeros, responsáveis pela entrada da célula no estado senescente, estão também relacionados com a formação do SASP. Para relacionar o SASP somente com senescência replicativa, através de uma revisão da literatura, utilizando como modelo resultados obtidos principalmente com fibroblastos humanos, foi construída uma rede regulatória do SASP e juntamente identificamos as influências deste fenótipo sobre a apoptose, metilação, inflamação e sobre o estado senescente. A construção da rede permite identificar as principais conexões de NF- $\kappa$ B com os seus principais reguladores, incluindo TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , p53 e RIG-I. A construção da rede foi utilizada para a análise dos dados de microarranjos obtidos do cólon humano, caracterizado por diversas disfunções em indivíduos com doenças inflamatórias nos intestinos que podem influenciar no avanço ou controle dos processos inflamatórios, incluindo as transições

Normal  $\rightarrow$  inflamação  $\rightarrow$  adenoma  $\rightarrow$  câncer

de modo que a evolução gradual acima é dependente do SASP e de NF- $\kappa$ B, além de outros fatores já bem documentados. Importantes marcadores do estado senescente foram identificados e uma rede regulatória marcadora envolvendo o estado senescente como mecanismo supressor de tumor em adenoma do cólon é identificada e envolve os genes TP53, TGFB1, KLOTHO e DNMT3B.

Independente da rede biológica, o problema fundamental para a completa compreensão das respostas celulares envolve a evolução temporal dos complexos processos sujeitos a diferentes perturbações. Vários modelos têm sido propostos para a modelagem de redes biológicas incluindo redes booleanas, equações diferenciais, redes dinâmicas Bayesianas e equações lineares por partes, esta última caracterizada pelo uso simultâneo de variáveis contínuas e discretas para representar o sistema (SHMULEVICH *et al.*, 2010; XIOMG *et al.*, 2008). Evidentemente a escolha da melhor técnica depende da problemática envolvendo uma rede de interação, de forma que entre todas elas, uma rede booleana pode ser considerada a forma mais simples e direta de caracterizar redes envolvendo muitas variáveis discretas. A modelagem de redes através de regras Booleanas, apesar da

simplificação da descrição do processo, tem condições de descrever aspectos essenciais da dinâmica conforme resultados já obtidos na modelagem de diversas redes, incluindo a rede booleana de regulação dos estômatos por ABA (ALBERT *et al.*, 2008), o modelo Booleano para o controle do ciclo celular de mamíferos (FAURÉ *et al.*, 2006) e o modelo Booleano da rede regulatória do ciclo celular de levedura (*Schizosaccharomyces Pombe*) (DAVIDICH *et al.* 2008).

As simulações *in silico* descrevem com certo grau de precisão, a partir do modelo booleano, as principais características da dinâmica de uma rede: topologia do espaço de estados, elementos fixos e variantes, sensibilidade das condições iniciais e sensibilidade à diferentes perturbações do sistema. Diversos algoritmos *BooleanNet*, *BoolNet* e *GINsim*, foram implementados em diferentes linguagens, *Phyton*, *R* e *Java* respectivamente, para simulações de redes (ALBERT *et al.*, 2008; MUSSEL *et al.*, 2010; GONZALES *et al.*, 2006), caracterizadas pelas dinâmicas:

- *Synchronous*: as atualizações de todas as variáveis discretas da rede ocorrem de forma sincronizada(ordenada) no final de cada atualização dos elementos da rede (SHMULEVICH *et al.* 2010; MUSSEL *et al.*, 2010);
- *Asynchronous*: as atualizações de alguns elementos da rede são escolhidas de forma aleatória e a mudanças servem para atualizar determinadas variáveis no mesmo período de atualização tornando este processo de atualização estocástico (SHMULEVICH *et al.* 2010; MUSSEL *et al.*, 2010);
- Probabilística: diferentes atualizações são permitidas para cada variável discreta da rede (MUSSEL *et al.*, 2010).

A construção de uma rede biológica, a sua validação e o uso de simulações para análise da dinâmica consiste em um grande desafio considerando-se as especificidades de cada organismo que influenciam uma resposta específica de cada indivíduo.

Dessa forma , os objetivos desta tese foram os seguintes:

- Para a rede de regulação do ABA, compreender os resultados da evolução temporal do sistema através da interpretação das simulações que caracterizam:
  1. Evolução temporal da rede regulatória;
  2. Elementos variantes;
  3. Elementos fixos;
  4. Evolução temporal do espaço de estados.

Com as simulações usando o software MATHEMATICA 7.0 o objetivo é determinar no espaço de estados os estados mais frequentes e com as simulações identificar nós da rede (Anion EM e Closure) cujas iterações durante a dinâmica da rede são fundamentais para a regulação da abertura e fechamento dos estômatos de forma a garantir a sobrevivência da planta em condições extremas.

- Construção de uma rede regulatória das vias de sinalização responsáveis pela parada do ciclo celular em senescência replicativa.
- Construção de uma rede regulatória das vias de sinalização responsáveis pela regulação do fenótipo secretor associado ao estado senescente (SASP), acompanhado de análises do cólon humano, através do uso de dados de microarranjos obtidos das séries GSE4183, GSE9452, GSE8671 e GSE20916. Estudo das regras envolvendo os genes destacados nas vias SASP responsáveis pelo controle do estado senescente e cujas interações são responsáveis pela supressão tumoral em tecidos de adenoma do cólon.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

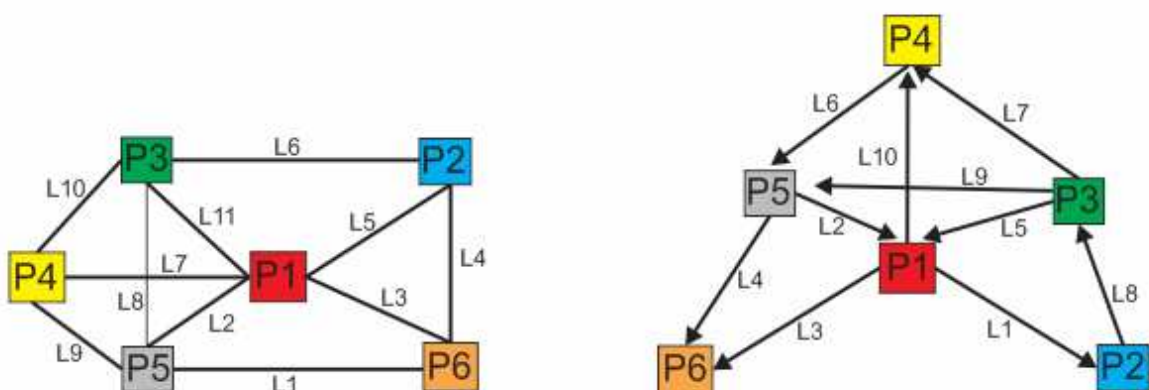
### 2.1 Teoria de Grafos

As relações entre os seres vivos e entre os diversos elementos da natureza sempre foram baseadas em processos interativos que descrevem a evolução do sistema como um todo a partir dos estados de cada um dos seus componentes. É impossível pensar sobre uso de computadores ou doenças genéticas humanas sem pensar a respeito de Internet e interação entre proteínas e genes respectivamente. Todos estes processos podem ser descritos a partir do conceito comum a todas estas diferentes situações: redes complexas.

A teoria de redes complexas surgiu a partir da teoria de grafos que consiste em uma noção simples e bem intuitiva para representar as relações entre os elementos do sistema. Tomando um sistema composto de um conjunto P de pontos indicados por  $P_1, P_2, P_3, \dots, P_n$ , estes elementos devem estar relacionados de modo que podemos representar estas relações através de um conjunto ordenado L de pares ordenados

$$a_{ij} = (P_i, P_j)$$

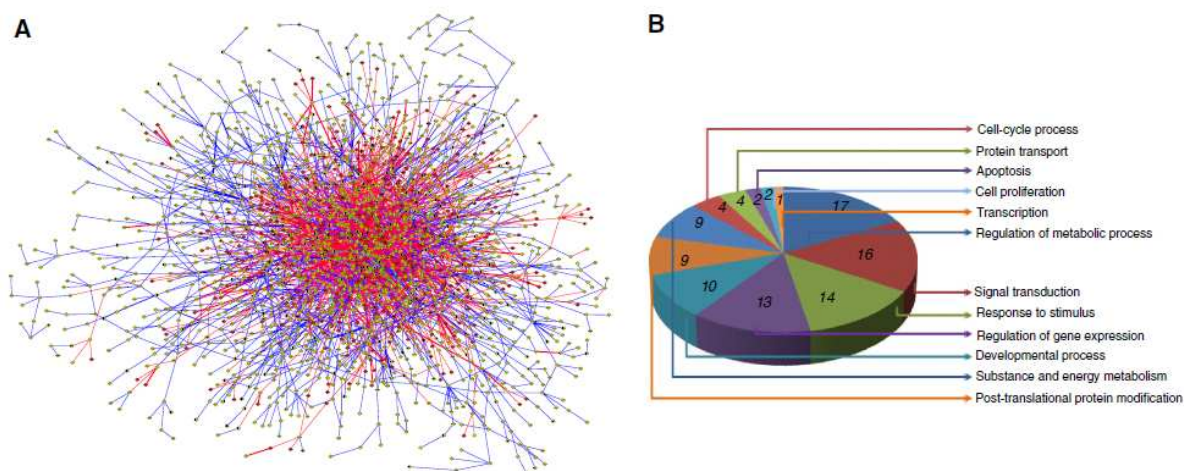
indicando que  $P_i$  e  $P_j$  estão conectados através de uma relação.



**Figura 1:** a) Grafo não direcionado com seis nós  $P_1, \dots, P_6$  e 11 arestas  $L_1, L_2, \dots, L_{11}$ . b) Grafo direcionado com seis nós  $P_1, \dots, P_6$  e 10 arestas  $L_1, L_2, \dots, L_{10}$ .

Dessa forma, dizemos que um grafo não direcionado  $G=(N,L)$  consiste de um conjunto  $N$  de nós com cardinalidade  $n$  e um conjunto de arestas  $L=\{l_1, l_2, \dots, l_k\}$  com cardinalidade  $k$  onde  $l_m=a_{ij}$  para algum  $i$  e  $j$ . Podemos representar um grafo simplesmente utilizando pontos e curvas para indicar a interação entre os nós (figura 1(a)): o conjunto de proteínas produzidas por uma célula tem como um dos principais objetivos preservar a sua integridade, mas envolve processos complexos e extremamente dinâmicos para garantir as respostas adequadas aos estímulos externos e internos. As caracterizações das propriedades de um conjunto de proteínas e suas redes regulatórias tornam-se complexas devido às várias formas de transcrição alternativas dos genes e pelas modificações pós-traducionais sofridas pelas proteínas em resposta às várias necessidades da célula, alterando interações proteína-proteína (WALSH *et al.*, 2005).

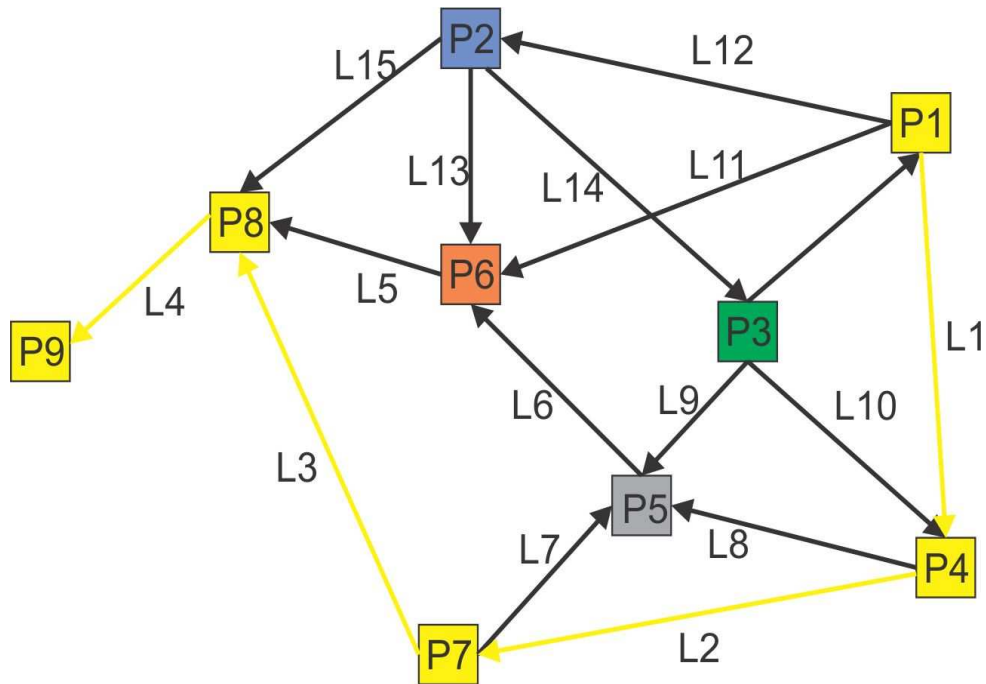
A teoria de grafos é uma ferramenta importante para revelar funções de proteínas, vias moleculares e módulos de proteínas funcionais, considerando-se que somente uma fração do número total de interações entre proteínas humanas estão identificadas e bem descritas. Para a rede de interação de proteínas de células do fígado humano (HLPN), a rede de interação demonstrada na figura 2, relaciona 3484 interações entre 2582 proteínas. Além disso, esta rede permite descrever as categorias de processos biológicos de acordo com o GO (Gene Ontology) onde as seções indicadas na figura 2(b) refletem a porcentagem de proteínas associadas a cada módulo funcional indispensável para a integridade da célula (WANG *et al.*, 2011).



**Figura 2:** (A) Grafo de interação protéica para células do fígado humano. (B) Porcentagem de proteínas relacionadas às atividades celulares necessárias para a integridade da célula (WANG *et al.*, 2011).

As relações entre os nós de um grafo podem também ser caracterizadas pelo modo como os nós estão relacionados. Diferente de um grafo não direcionado, um grafo direcionado consiste de um sistema representado por um grafo onde ocorre um fluxo de informação considerando-se um vértice inicial e um vértice final para indicar a direção deste fluxo. Em um grafo direcionado cada aresta é direcionada do primeiro ao segundo vértice do par (figura 1(B)).

As redes regulatórias de processos biológicos envolvem muitos detalhes e a integração dos dados moleculares em um modelo simples é muitas vezes extremamente necessária. Dessa forma, grafos direcionados são ferramentas úteis para identificar as principais propriedades referentes à regulação de processos nestas redes. Vias de sinalização celular são importantes mecanismos para sentir e responder a mudanças em seu ambiente através de integração de sinais externos e internos, gerando mudanças nas atividades transcricionais, metabolismo e outros mecanismos regulatórios incluindo a transdução de sinais. Uma célula está exposta a diferentes moléculas sinalizadoras diferentes em seu ambiente e deve responder a essa combinação de sinais de acordo com a sua função especializada, garantindo desta forma a sobrevivência sob condições variáveis (KLIPP *et al.*, 2006). Redes de proteínas, enzimas e moléculas fazem parte dos mecanismos utilizados para a execução e controle da maior partes dos eventos celulares, de modo que estes elementos funcionam como interruptores moleculares, ou seja, a recepção de um sinal faz com que eles comutem de um estado inativo para ativo. Sendo assim, as vias de sinalização celular são mecanismos que atuam de forma muito específica em reações caracterizadas pela ação de elementos interruptores que conectam uma entrada a uma saída em uma rede de sinalização intracelular conforme a Figura 3.

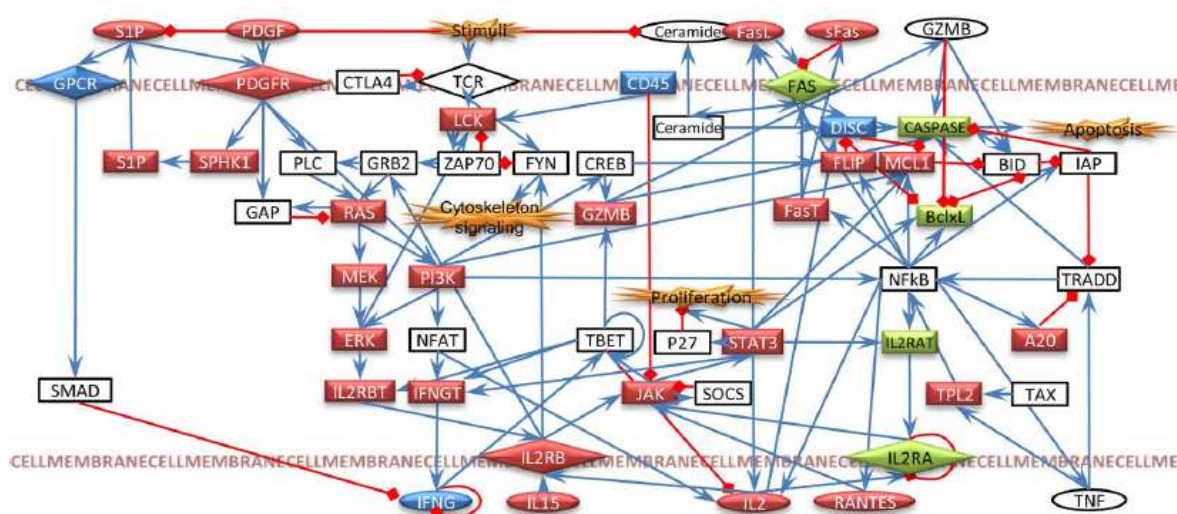


**Figura 3:** Exemplo de grafo direcionado incluindo uma via de sinalização indicada em amarelo.

No caso da manutenção da integridade do DNA, vias de sinalização são essenciais para uma resposta específica da célula quando o DNA é danificado através da regulação dos mecanismos envolvendo ponto de checagem, reparo no DNA, senescência e apoptose. Defeitos nestas vias de sinalização podem causar transformações celulares e uma propensão a inúmeras doenças incluindo câncer, doenças cardiovasculares, neurodegeneração e o envelhecimento prematuro (LIANG *et al.*, 2009; KASTAN, 2008). Para uma rede complexa envolvendo vias de sinalização representadas por um grafo direcionado, as vias podem ser representadas por caminhos que consistem de nós distintos conectados por arestas diretas indicando um fluxo direcionado de uma sinalização. As análises de redes regulatórias sugerem inclusive a presença de múltiplas vias para garantir a completa execução de respostas específicas, garantindo dessa forma a robustez da rede regulatória (AITTOKALLIO *et al.*, 2006). Geralmente os mecanismos de interação entre os elementos da rede podem ser representados por grafos direcionados onde as arestas indicadas com setas ou barras nas extremidades podem descrever a ativação ou inibição de um processo respectivamente, indicando principalmente a variabilidade de fatores que influenciam uma cascata de sinalização. Além de arestas representadas por barras e setas, os mecanismos de ativação também podem ser representados por arestas com diferentes cores. Um exemplo de um



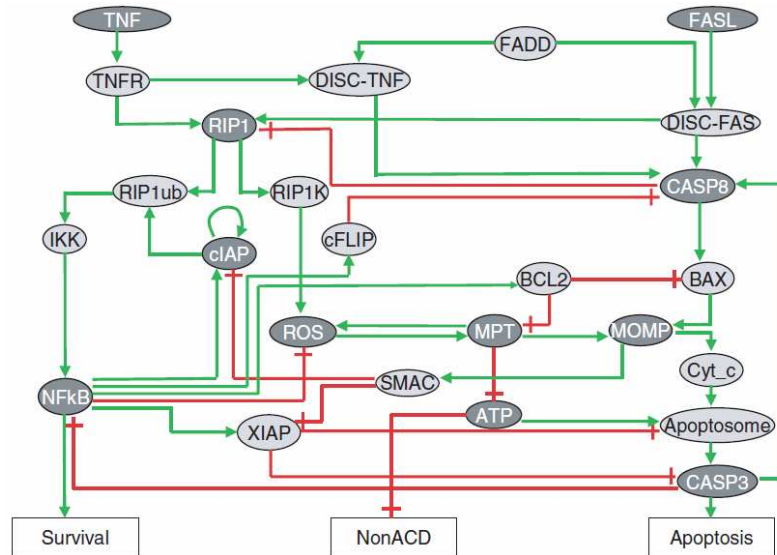
grafo direto pode ser dado a partir da rede de regulação da sobrevivência através de uma expansão clonal de linfócitos T citotóxicos em leucemia linfocítica grande granular T(T-LGL). A rede de sinalização de sobrevivência dos linfócitos T é obtida através da integração das vias de sinalização envolvendo a normal ativação de linfócitos T e as vias de sobrevivência conhecidas em leucemia (Figura 4) (ZHANG *et al.*, 2008).



**Figura 4:** Rede de sinalização de sobrevivência em T-LGL. O grafo direcionado representa as interações entre proteínas, enzimas e moléculas, enquanto que arestas azuis indicam ativação e arestas vermelhas indicam inibição. Os nós que se encontram ativos são indicados em vermelhos, os inibidos em em verde, nós desregulados em verde e os nós com estados desconhecidos são indicados em branco. Retângulos indicam componentes intracelulares, elipses componentes extracelulares e losangos indicam receptores presentes da membrana celular (ZHANG *et al.*, 2008).

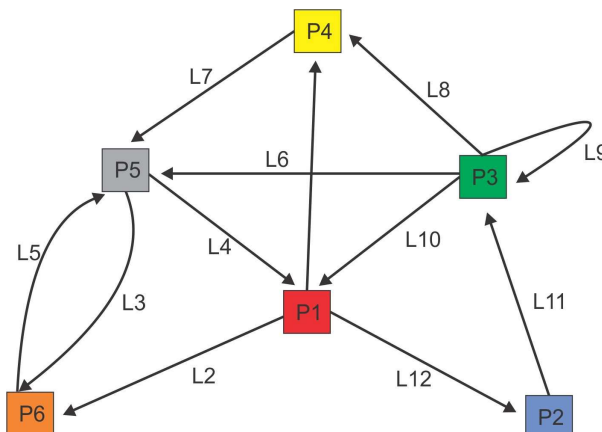
Diversos mecanismos biológicos envolvendo elementos de uma rede podem ser caracterizados por uma regulação recíproca entre dois nós da rede ou até mesmo uma autoregulação. Como ocorre na sinalização de quebras duplas do DNA em uma célula, a ativação de ATM pelo complexo MRN é seguido da autofosforilação de ATM, de modo que este processo de autoregulação é necessário para estabilizar ATM nos locais de dano no DNA (SO *et al.*, 2009), garantindo assim a parada do ciclo celular, necessária para a adequada reposta ao dano no DNA. Para uma rede que descreve as principais vias de resposta de sobrevivência ou morte celular envolvendo os receptores da morte TNF e FAS e o receptor NF-kB que ativa uma via de sinalização de sobrevivência, diversos elementos e processos regulatórios estão envolvidos incluindo a regulação recíproca. Espécies reativas de

oxigênio (ROS) funcionam como importantes reguladores de processos biológicos e vias de sinalização intracelular, mas a desregulação destas moléculas pode contribuir para uma série de doenças humanas (FINKEL, 2011). A mitocôndria é a principal fonte destas moléculas, mas ROS por sua vez, também é importante no controle da oxidação de componentes mitocondriais (CALZONE *et al.* 2010), o que sugere uma regulação recíproca conforme representação apresentada na Figura 5.



**Figura 5.** Interações moleculares entre os principais componentes que influenciam a decisão do destino celular. O destinos celulares envolvendo sobrevivência (Survival), apoptose (Apoptosis) e morte celulares com características morfológicas de necrose (NonACD) são representados na figura por retângulos brancos (CALZONE *et al.* 2010).

A necessidade de regulação de elementos de uma rede através da autoregulação e através da regulação recíproca, sugere a definição de multigrafo. Um grafo  $G=(N,L)$  é chamado de multigrafo quando existem múltiplas arestas entre pares de vértices do grafo e arestas (laços) podem conectar um nó a si mesmo conforme a Figura 6.



**Figura 6.** Multigrafo direcionado com seis nós  $P_1, \dots, P_6$  e 12 arestas  $L_1, L_2, \dots, L_{12}$ .

A partir da construção de uma rede, propriedades referentes à distribuição dos nós e também referentes à distribuição das arestas descrevem a topologia da rede. No que se refere à distribuição dos nós, o grau de distribuição ou simplesmente conectividade de um nó  $P_i$ , denotado por grau ( $P_i$ ), é o número de arestas incidentes a  $P_i$  mais duas vezes o número de laços de  $P_i$ . A relação entre um nó específico  $P_j$  e seus nós vizinhos também pode ser evidenciada através do número de arestas conectando os vizinhos de  $P_j$ , de modo que se o grau( $P_j$ )=  $d_j$  e  $E_j$  é o número de arestas entre os vizinhos de  $P_j$ , então o coeficiente de clusterização de  $P_j$ , denotado por  $C_j$ , é definido como o número de arestas conectando os vizinhos de  $P_j$  dividido pelo número máximo de arestas entre os vizinhos de  $P_j$ :

$$C_j = \frac{2E_j}{d_j(d_j - 1)}$$

ou seja, o coeficiente de clusterização é a fração média de pares de vizinhos de um nó que são também vizinhos um do outro (BOCACALETTI *et al.*, 2006). Na Figura 1(b), se tomarmos os pontos  $P_1$  e  $P_2$ , obtemos diferentes valores para o grau e o coeficiente de clusterização de cada um deles:

**Tabela 1:** Conectividade e Coeficiente de clusterização para a rede dada na figura(1) indica as diferentes relações entre os elementos da rede.

Nó	Grau(Conectividade)	Coeficiente de clusterização
$P_1$	5	0,5
$P_2$	2	1

Dados os coeficientes de clusterização de cada nó da rede, o coeficiente de clusterização do grafo é dado pela média  $\langle C \rangle$  de todos os  $C_i$  do grafo. Estes conceitos relacionando nós e arestas são importantes para a organização da rede, consequentemente influenciam a dinâmica e as respostas a determinadas perturbações no sistema. Para uma rede humana de interações proteína-proteína contendo 53.255 interações entre 10.549 proteínas construída a partir dos bancos de dados Human Protein Reference Database (HPRD), Biomolecular Interaction Network Database (BIND), IntAct, Molecular INTeraction database (MINT), Reactome e Database of Interacting Proteins (DIP), foram obtidos 342 genes cujas proteínas

são encontradas no interatoma humano relacionados a câncer e divididos em grupos dominantes e recessivos. Além disso, foram considerados um grupo de genes essenciais e um grupo de genes de controle com 2217 e 8402 genes respectivamente (SUN *et al.*, 2010), de modo que o grau médio dos nós da rede e o coeficiente de clusterização médio são dados na Tabela 2 abaixo:

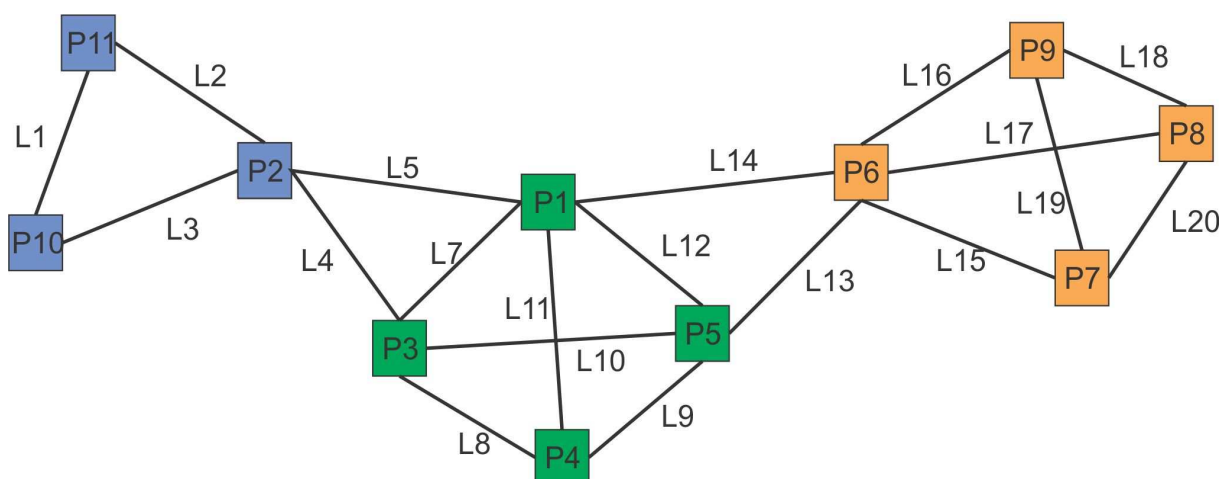
**Tabela 2:** Propriedades topológicas médias da rede para cinco conjuntos de proteínas no interatoma humano (SUN *et al.*, 2010).

Grupo de proteínas	Número de proteínas	Grau médio da rede	Coeficiente de clusterização médio da rede
Proteínas de câncer	342	25,41	0,13
Proteínas essenciais	1896	18,39	0,14
Proteínas controle	8402	8,25	0,19
Proteínas recessivas de câncer	69	33,03	0,13
Proteínas dominantes de cancer	273	23,44	0,13

Estes resultados mostram que a conectividade média é maior e o coeficiente de clusterização é menor em proteínas relacionadas a câncer quando comparadas a proteínas dos grupos essenciais e controle, indicando uma caracterização entre estes diferentes grupos, além de mostrar um descontrole nas atividades funcionais destas proteínas em vias que correspondem a subgrafos da rede.

Um subgrafo de  $G = (N, L)$  é um grafo  $H = (W, F)$  onde  $W$  é um subconjunto de  $N$  e  $F$  é um subconjunto de  $L$ , de modo que todas as arestas em  $F$  indicadas por  $f_{ij} = (P_i, P_j)$  são tais que  $P_i, P_j \in W$ , ou seja, todas as arestas em  $F$  tem seus pontos finais pertencentes ao conjunto  $W$ . Subgrafos (Subredes) podem ser usados para descrever importantes vias moleculares em uma rede biológica (FAUST *et al.*, 2010). As vias de sinalização em uma célula funcionam de forma combinada para garantir a manutenção e funcionalidade da célula e do organismo. Muitas proteínas distribuídas em redes de interação protéica estão relacionadas a diferentes processos, contribuindo desta forma para garantir a comunicação e a coordenação entre as diferentes respostas celulares. Isto sugere que os sistemas biológicos são organizados em módulos funcionais onde cada módulo é um subgrafo composto de

elementos densamente conectados quando comparados com o número de arestas que conectam elementos do módulo com outros elementos da rede conforme a Figura 7. Dessa forma, módulos específicos executam uma tarefa relativamente independente dos outros módulos, que por sua vez estão conectados por elementos que pertencem ao mesmo tempo a diferentes processos biológicos.



**Figura 7.** Grafo não direcionado com módulos conectados.

Uma definição mais precisa para módulos em grafos pode ser dada através da comparação entre o grau de entrada e grau de saída de um subgrafo  $H$  de  $N$ . O número de arestas conectando os elementos de  $H$  é o grau de entrada e o número de arestas que conectam os elementos de  $H$  com os demais elementos da diferença  $G-H$  é definida como sendo o grau de saída de  $H$ , denotados por  $\text{Ind}(H)$  e  $\text{Outd}(H)$ , respectivamente. No caso da Figura 7, os módulos cor laranja, verde e azul são caracterizados pelos valores exibidos na Tabela 3:

**Tabela 3.** Comparação entre os módulos dados na figura 7.

Módulo	Grau de entrada	Grau de saída
Laranja	6	2
Verde	6	4
Azul	3	2

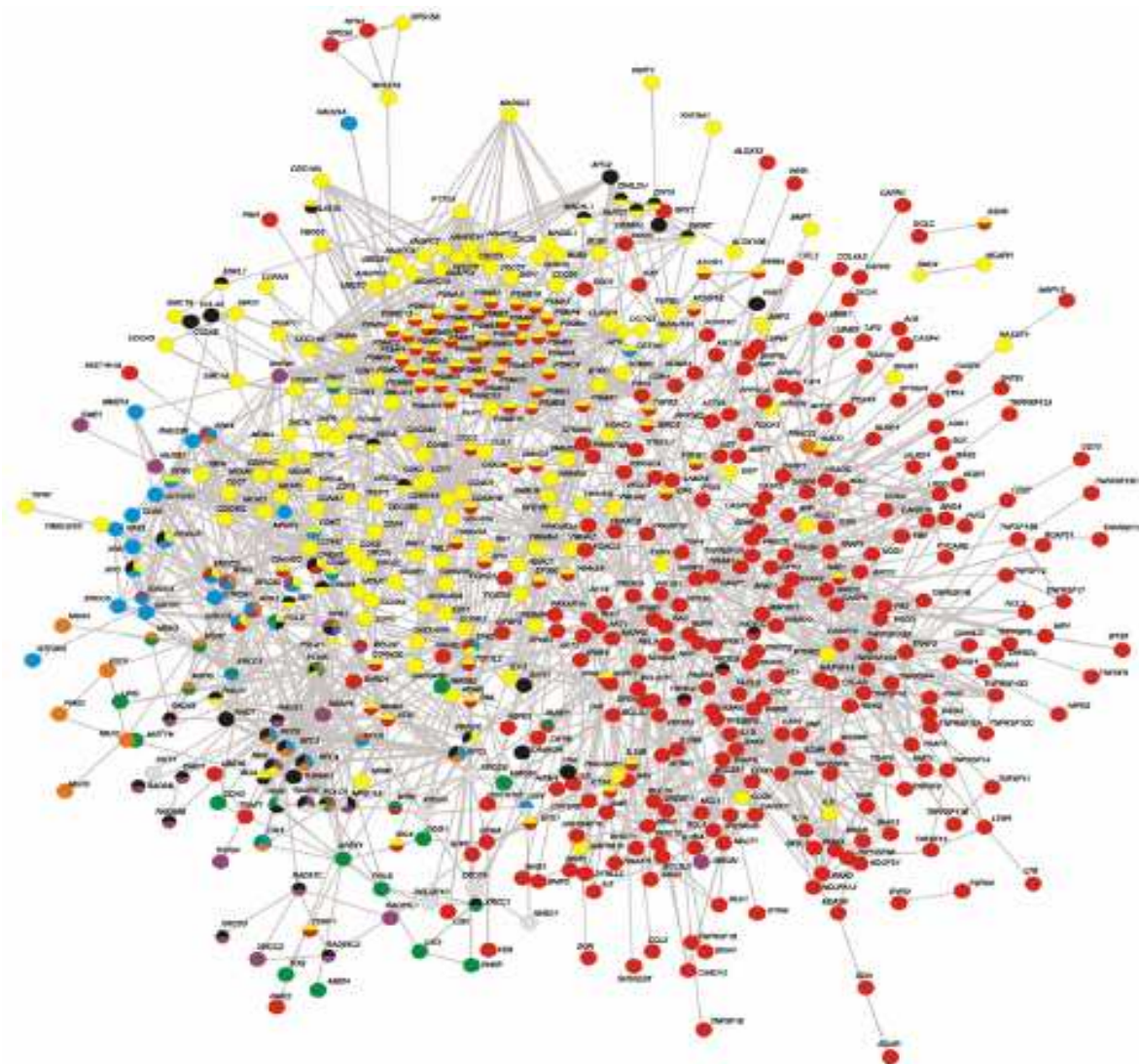
Comparando os diferentes valores dos graus de entrada e saída de um subgrafo H, podemos definir o quociente

$$M_H = \frac{\text{Ind}(H)}{\text{Outd}(H)}$$

de modo que se  $M_H > 1$  então definimos H como sendo um módulo (LUO *et al.*, 2007). Coeficiente de clusterização e modulação em redes estão relacionados de forma que o coeficiente de clusterização caracteriza a relação entre os elementos em um módulo e o módulo descreve a relação dos elementos do módulo com os demais elementos da rede. Como a estrutura modular é uma propriedade comum a muitas redes biológicas, a descrição destes módulos e a relação entre os módulos pode ajudar a descrever e compreender a organização específica da biologia de sistemas (LUO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2007).

Se considerarmos as constantes ameaças e danos ao DNA que ocorrem diariamente em uma célula, uma resposta celular coordenada deve ocorrer para reparar o dano, impedir a replicação do DNA danificado e a transmissão das mutações para as células filhas. Este processo coordenado inclui a ativação dos mecanismos do ponto de checagem, reparo no DNA, mudanças na transcrição de genes em resposta ao dano no DNA, apoptose e em último caso a senescência (HOUTGRAAF *et al.*, 2006). Após o início do ciclo celular, a resposta a qualquer tipo de dano no DNA inicia com a ativação dos mecanismos do ponto de checagem com o objetivo de parar o ciclo para fornecer um tempo necessário para os mecanismos de reparo, de modo que o sucesso no reparo do dano implica no restabelecimento do ciclo através de vias específicas de sinalização (ALVAREZ-FERNANDEZ *et al.*, 2010). Se o dano não é reparado então dependendo do tipo de célula e do tipo de dano, a célula escolhe entre a parada permanente e a apoptose para a manutenção dos tecidos. A falha nestes processos podem induzir mutações e instabilidade genômica que resultam na maior parte das vezes em câncer e envelhecimento de células (HOEIJMAKERS, 2007). Para descrever a relação entre os mecanismos de manutenção do genoma (GMM) envolvendo vias de reparo, apoptose, ciclo celular, estabilidade cromossômica e outras, uma rede contendo 564 proteínas foi proposta por Simão e colaboradores através do Ontocancro (SIMÃO *et al.*, 2010). Os resultados obtidos de acordo com a Figura 8 mostram os mecanismos regulatórios

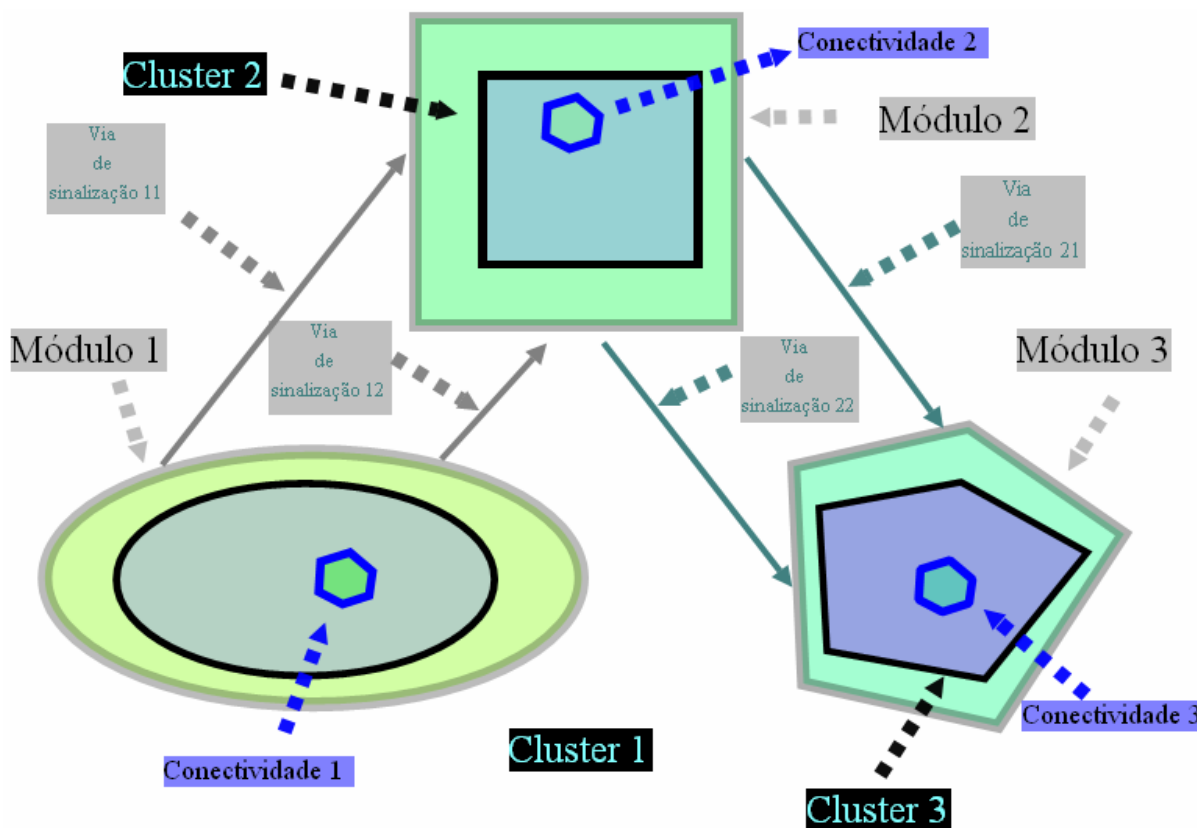
de diferentes vias, de modo que ciclo celular, reparo do DNA e apoptose estão bem caracterizados através da modularidade, juntamente com a conexão entre estes diferentes módulos caracterizada por diversos nós identificados com várias cores, indicando a sinalização entre os módulos através de vias específicas.



**Figura 8.** Rede com 564 proteínas representando nós envolvidos em estabilidade cromossômica( nós indicados em preto), ciclo celular(nós indicados em amarelo), apoptose(nós indicados em vermelho) e reparo celular: NER, BER, HR, MMR, NHEJ (nós indicados em azul, verde, roxo, laranja e branco respectivamente) (SIMÃO *et al.*, 2010).

Considerando as definições de grafo direcionado, juntamente com as definições de conectividade, caminho, coeficiente de clusterização e modularidade, a funcionalidade de uma rede biológica pode ser resumida pela Figura 9, onde as relações entre estes elementos topológicos geram uma reação específica do

sistema biológico a partir de uma sinalização inicial para garantir a integridade de uma célula e do organismo.



**Figura 9.** A organização da sinalização envolve a conectividade dos nós, o coeficiente de clusterização de cada nó, a modularidade em diferentes subgrafos e as redundantes vias de sinalização para garantir a execução de uma resposta apropriada.

## 2.2 Redes Booleanas

Para compreender os processos biológicos representados através de redes, a análise da topologia e da dinâmica é essencial para o entendimento da complexidade das interações entre os nós da rede.

Redes Booleanas são usadas como modelos que simplificam as relações entre os elementos de uma rede, servindo como um modelo genérico para a análise da dinâmica e das principais propriedades que caracterizam a rede regulatória. Variáveis contínuas são modeladas por estados binários e as atualizações são definidas a partir das características de ativação ou inibição de cada elemento da



rede. Em outras palavras, uma rede booleana consiste de um grupo de  $N$  nós  $\{N_1, N_2, \dots, N_N\}$  de modo que

$$\sigma_i \in \{\text{Verdadeiro}, \text{Falso}\}$$

é o estado do nó  $N_i$ . O estado Verdadeiro ou Falso de cada nó é determinado pelas condições iniciais juntamente com as operações booleanas que determinam o estado de  $N_i$  a partir do estado de seus reguladores  $\{N_{i1}, N_{i2}, \dots, N_{ik}\}$ . As operações booleanas são usadas como segue: se dois ou mais elementos podem induzir a ativação ou inibição de um nó de uma forma independente, pode-se combinar ambos com a função lógica OR, se dois ou mais componentes induzem a regulação de forma dependente, associamos a ambos o operador lógico AND, o operador NOT está associado a inversão de estados e finalmente a combinação de todos operadores booleanos pode ser usada para nós da rede caracterizados por uma alta conectividade. Denotando por

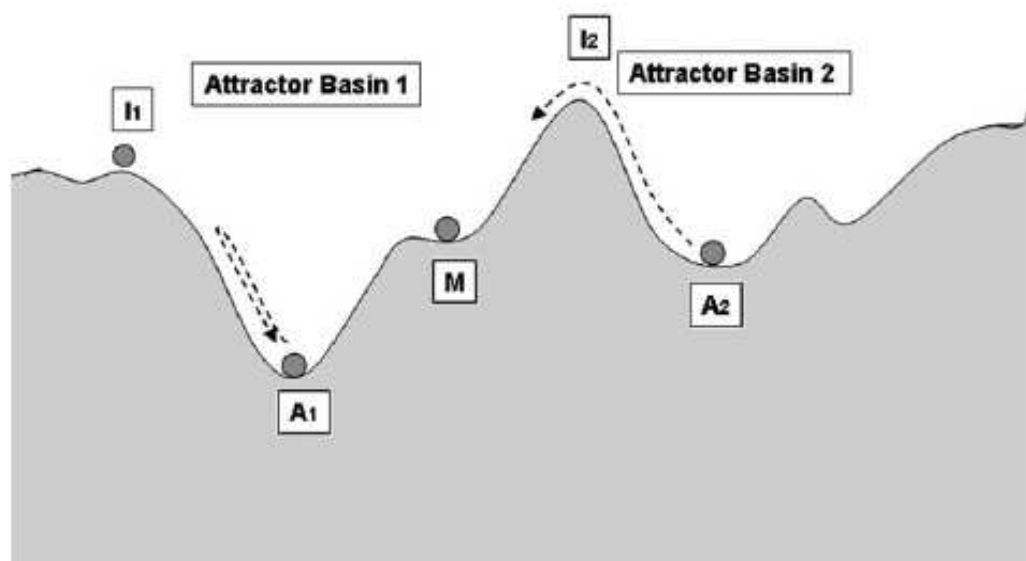
$$\Sigma_t = \{\sigma_1(t), \sigma_2(t), \dots, \sigma_k(t)\}$$

o estado de cada nó para uma atualização  $t$ , temos que

$$\Sigma_{Total} = \{\Sigma_1, \Sigma_2, \Sigma_3, \dots, \Sigma_{t_m}\}$$

representa um conjunto de estados da rede para  $t_m$  atualizações, obtidos a partir de uma dada condição inicial que define uma possível trajetória da rede em seu espaço de estados (EE), de modo que a dinâmica do espaço de estados pode ser obtida para um grafo direto onde um nó A conectado a um nó B, indica que A evolui para B a partir de uma atualização. Um espaço de estados tipicamente consiste de subgrafos (clusters), bacias de atração e também estados atratores que caracterizam a evolução do sistema de uma forma geral (SHEREIM *et al.*, 2008). Uma sequência de estados consecutivos determinados a partir de uma condição inicial é chamada de trajetória, de modo que um conjunto de trajetórias pode ser caracterizado pela convergência para um único estado chamado de atrator. Neste caso, o conjunto destas trajetórias para diferentes condições iniciais é chamado de

bacia de atração (DUBROVA *et al.*, 2005), conforme representação mostrada na Figura 10 (DEMICHELI *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Modelo caracterizando os pontos de equilíbrio (atratores) estáveis ( $A_1, A_2$ ), os pontos de equilíbrio instáveis ( $I_1, I_2$ ) e ponto de equilíbrio fraco ( $M$ ). Além disso, a topologia do sistema indicado na figura caracteriza as bacias de atração, de modo que pequenas perturbações os pontos atratores instáveis  $I_1$  e  $I_2$  conduzem o estado do sistema para os atratores  $A_1, A_2$  (DEMICHELI *et al.*, 2010).

O comportamento de uma rede booleana também pode ser descrito pela existência de um grande número de atratores, além da sensibilidade às variações mínimas das condições iniciais, caracterizando um sistema caótico. Resultados experimentais indicam que redes genéticas operam em regimes ordenados (número reduzido de atratores) ou em regimes entre a ordem e os caos, juntamente com propriedades relacionadas com robustez e estabilidade conforme fenótipos obtidos através de perturbações genéticas (SHMULEVICH *et al.*, 2005).

Se tomarmos um número  $t$  de atualizações em uma rede booleana, a cardinalidade de  $\Sigma_{\text{Total}}$  depende de  $t$ , da topologia da rede e das operações booleanas descritas para cada nó, mas independente das características da rede, a cardinalidade do espaço de estado converge para uma cardinalidade específica dependendo do número de atratores e bacias de atração com um número máximo de  $\Omega=2^N$  elementos.

Tomando uma rede regulatória genética (GRN) e considerando as constantes perturbações na expressão de genes de uma célula devido a diferentes sinalizações recebidas dos ambientes extracelular e intracelular, as células precisam responder de forma robusta através da rápida mudança na concentração de proteínas, RNAs,

conformação da cromatina e taxa de catálise enzimática, refletindo em mudanças no comportamento celular incluindo a sinalização para proliferação, apoptose, diferenciação celular, parada permanente (senescência) e parada reversível (quiescência). Neste caso, a dinâmica da rede descreve um espaço de estados composto por atratores e bacias de atração ( DEMICHELI *et al.*, 2010; DEL SOL *et al.*, 2010). Resultados experimentais indicam que o fenótipo dos diferentes tipos de células é determinado pela mesma rede regulatória, mas com diferentes perfis de expressão gênica, de modo que a existência de atratores definidos por um conjunto de genes correspondem a estes diferentes tipos celulares (HUANG *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2009). Diferentes estabilidades caracterizam os diferentes atratores de uma rede genética, principalmente quando comparamos células quiescentes com células senescentes no que se refere a manutenção dos estados de parada reversível e parada permanente, respectivamente. A estabilidade destes atratores garante que mudanças na rede genética regulatória não tenham fortes influências sobre o fenótipo e comportamento da célula (DELSOL *et al.*, 2010). Pequenas perturbações na rede genética podem influenciar a expressão gênica mantendo as trajetórias no espaço de estados dentro das bacias de atração para garantir a integridade da célula, no entanto, as certas perturbações podem ser suficientes e dirigir um elemento do espaço de estados para um outro atrator, eventualmente relacionado a proliferação celular e conseqüentemente um fenótipo de câncer (PLANKAR *et al.*, 2011).

Para uma rede booleana N dimensional qualquer, cada elemento  $\Sigma_t$  do espaço de estados pode ser comparado com os demais elementos da rede para que seja possível estabelecer uma frequência em relação aos estados que são mais frequentemente visitados para um determinado número de atualizações. Para encontrar estes estados em um dinâmica, é possível utilizar a distância de Hamming denotada por

$$D(\Sigma_t, \Sigma_{t'})$$

e definida pelo número de variáveis booleanas com diferentes valores para  $\Sigma_t, \Sigma_{t'} \in \Sigma_{\text{Total}}$ . Evidentemente deve-se encontrar

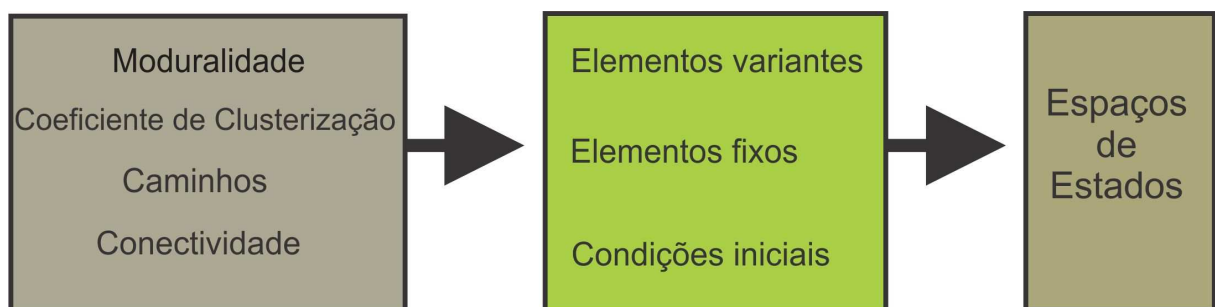
$$D(\Sigma_t, \Sigma_{t'}) \neq 0$$

e

$$D(\Sigma_t, \Sigma_{t'}) = 0$$

de modo que se a distância de Hamming entre dois elementos do espaço de estados for nula, então  $\sigma_i(t) = \sigma_i(t')$  indica o mesmo estado para todas as  $N$  variáveis da rede. Outra característica importante de uma rede booleana é o comportamento geral dos seus nós. Em relação à variação de cada um dos nós, a rede é dividida entre o conjunto dos nós que se encontram em estados fixos e o conjunto dos nós que se encontram em estados variáveis (KAUFFMAN *et al.*, 2003). A particularidade da dinâmica de cada elemento da rede, as condições iniciais e as regras booleanas determinam a cardinalidade e o comportamento dinâmico (atratores, bacia de atração, aleatório) de  $\Sigma_{Total}$  conforme a Figura 11, de modo que se a fração de nós fixos é alta, a cardinalidade do espaço de estados é baixa e vice-versa.

Para uma rede booleana qualquer a topologia do grafo direto tem forte influência sobre os elementos fixos e variantes da rede, visto que vias de sinalização tendem a desencadear uma cascata de interações entre os elementos da mesma via, gerando um conjunto de elementos com o mesmo estado para diferentes atualizações, indicando que várias variáveis discretas podem ser agrupadas em um único elemento para obtenção das propriedades dinâmicas do espaço de estados. Além dos caminhos (vias) existentes em redes booleanas, os conceitos de modularidade, coeficiente de clusterização e conectividade também ajudam a descrever os elementos variantes e invariantes da rede, de modo que a relação entre as características topológicas e dinâmicas pode ser resumida a partir da Figura 11.

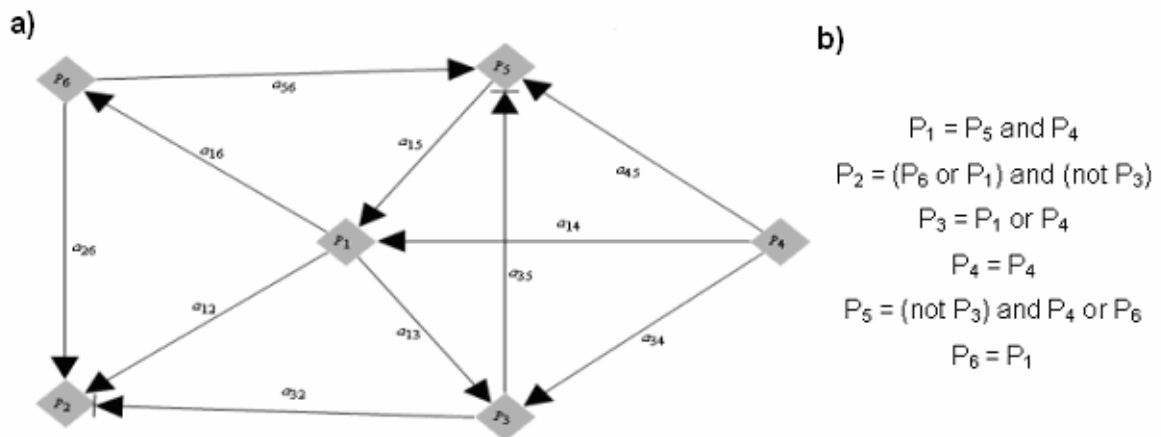


**Figura 11.** Relação entre os elementos fixos, elementos variantes, condições iniciais aleatórias e espaço de estados.

## 2.3 Simulações

Para uma rede booleana contendo os nós  $P_1, P_2, \dots, P_6$  cujas as interações são determinadas de forma aleatória, a escolha da forma de atualização dos elementos da rede envolve dois fatores: a necessidade de condições iniciais para alguns elementos da rede e a distribuição das regras booleanas para cada elemento conforme indicado na Figura 12 a seguir. Os dois fatores são decisivos para a descrição do espaço de estados e também para caracterizar uma rede biológica onde a tendência mais natural é a organização através de complexas redes de sinalização. A partir da Figura 12(b) é possível observar que o início de um processo de atualização depende dos valores iniciais para  $P_4$  e  $P_5$  para a primeira atualização de  $P_1$ . Já para  $P_2$ , uma condição inicial para  $P_1$  já não é necessária, visto que o valor assumido por  $P_1$  na primeira atualização já foi determinado por  $P_4$  e  $P_5$ . No entanto, um valor inicial para  $P_6$  deve ser determinado, visto que  $P_6$  será atualizado somente depois de  $P_2$ , de modo que esta sequência de atualizações pode representar uma cascata de sinalização em uma rede biológica. Em particular, existem elementos da rede cujos estados não podem ser determinados devido à pouca informação biológica disponível ou devido simplesmente à complexidade do sistema, conforme o elemento  $P_4$  da rede dada na Figura 12 cujo estado pode ser indefinido. Nesse sentido, a atribuição de valores aleatórios para estes elementos específicos é necessária, tornando o processo dinâmico de atualização dos estados de cada nó da rede estocástico.

Em uma rede de sinalização celular as principais vias de sinalização estão conectadas por interações de muitos tipos, incluindo uma interação recíproca entre as diferentes rotas e entre todos os sistemas de controle da célula. As principais cascatas de sinalização estão conectadas por proteinoquinasas presentes em cada uma das rotas para regular as componentes de outras rotas de sinalização além dos componentes das rotas às quais elas pertencem (ALBERTS *et al.*, 2006).



**Figura 12.** (a) Grafo direto de 6 nós cujas interações são descritas através de mecanismos de ativação ou inibição indicados por arestas com setas normais e arestas com barras na extremidade respectivamente. (b) Descrição das interações através de regras booleanas definidas de forma aleatória para todos os nós da rede.

Analisando novamente a rede descrita na Figura 12, no que se refere ainda à distribuição das regras booleanas, pode-se notar que determinados nós da rede são reguladores de outros nós que são atualizados antes da sua própria atualização. É o caso do  $P_6$  que nesta rede é regulador de  $P_2$ , que por sua vez é atualizado antes da atualização de  $P_6$  por  $P_1$ . Isto sugere uma maior participação de  $P_6$  como regulador das interações entre os elementos da rede e também pode indicar que este elemento pode participar de outras vias regulatórias em um sistema biológico, de modo que pode-se atribuir um estado aleatório para este nó para representar as interações recíprocas envolvendo outras vias.

Considerando as particularidades das regras booleanas e das condições iniciais, quatro algoritmos podem ser implementados envolvendo:

- (1) a dinâmica da rede;
- (2) os elementos invariantes;
- (3) elementos variantes;
- (4) descrição do espaço de estados.

de modo que todos os algoritmos nesse trabalho foram desenvolvidos através do software MATHEMATICA 7.0.

### Algoritmo 1: Dinâmica da rede.

Neste algoritmo a dinâmica é obtida considerando as atualizações de cada um dos elementos da rede através de uma atualização síncrona / assíncrona com objetivo de caracterizar a aleatoriedade envolvendo determinadas variáveis de uma rede, incluindo o mecanismo descrito anteriormente para representar a participação de determinados elementos em supostos processos diferentes. Considerando as condições iniciais aleatórias, uma análise da convergência das dinâmicas para as diferentes condições iniciais pode ser obtida a partir da média do número de estados Verdadeiro ou Falso de cada variável discreta, em particular, a média dos nós que representam as saídas (resposta final) da rede regulatória. A partir da média o algoritmo permite construir um gráfico indicando a evolução da variável ou das variáveis para um determinado número de atualizações  $t$ .

### Algoritmo 2: Elementos invariantes

Para a obtenção dos elementos invariantes da rede devemos levar em consideração que a variação de determinados elementos pode depender não somente das regras booleanas, mas também da particularidade das condições iniciais de acordo com as propriedades do espaço de estados que pode admitir um comportamento ordenado assim como um comportamento caótico. Para testar a dependência das condições iniciais, o algoritmo compara a variação de cada elemento da rede, de modo que são considerados elementos fixos aqueles que não mudam de estado independente das condições iniciais. De uma forma geral, para uma rede booleana contendo  $N$  variáveis o número de condições iniciais ( $NCI = V$ ) depende da topologia da rede e do número  $N$ . Para esse número  $V$  de condições iniciais, todas as dinâmicas podem ser exploradas e todos os elementos fixos podem ser obtidos.

### Algoritmo 3: Elementos variantes.

Os elementos variantes de uma rede podem ser obtidos através de um algoritmo que descreve a exclusão dos elementos fixos para a obtenção somente dos elementos variantes da rede. Os elementos variantes podem também ser relacionados através de tabelas comparativas, visto que muitos elementos que são variantes podem se encontrar no mesmo estado caracterizando a participação de cada um em uma mesma via de sinalização.

### Algoritmo 4: Espaço de estados

Considerando a exclusão dos elementos fixos, o algoritmo implementado para a obtenção do espaço de estados de uma rede booleana envolve o uso da distância de Hamming para a comparação de cada elemento de  $\Sigma_{Total}$  juntamente com uma descrição gráfica do espaço de estado obtido para cada simulação, indicando a evolução temporal e a cardinalidade de cada atrator.

## **2.4 Aspectos positivos e negativos de redes booleanas.**

O uso de uma rede booleana para representar uma rede qualquer tradicionalmente modelada por um sistema de equações diferenciais é extremamente útil para a simplificação do sistema, principalmente pela substituição dos detalhes cinéticos por variáveis discretas. Tradicionalmente o uso de equações diferenciais envolve uma quantidade significativa de parâmetros e constantes cinéticas essenciais para descrever o conjunto de equações de algumas redes, incluindo redes genéticas cujos genes são caracterizados pelos efeitos regulatórios dependentes de seu nível de expressão, cuja melhor representação é dada através de variáveis contínuas. O problema da modelagem através de equações diferenciais ocorre quando a maior parte dos parâmetros são desconhecidos, tornando o modelo quase impossível de ser resolvido. Desconsiderando diferentes níveis de regulação para os nós de uma rede, as interações entre os elementos podem ser simplificadas através de mecanismos de ativação e inibição relacionados através de regras

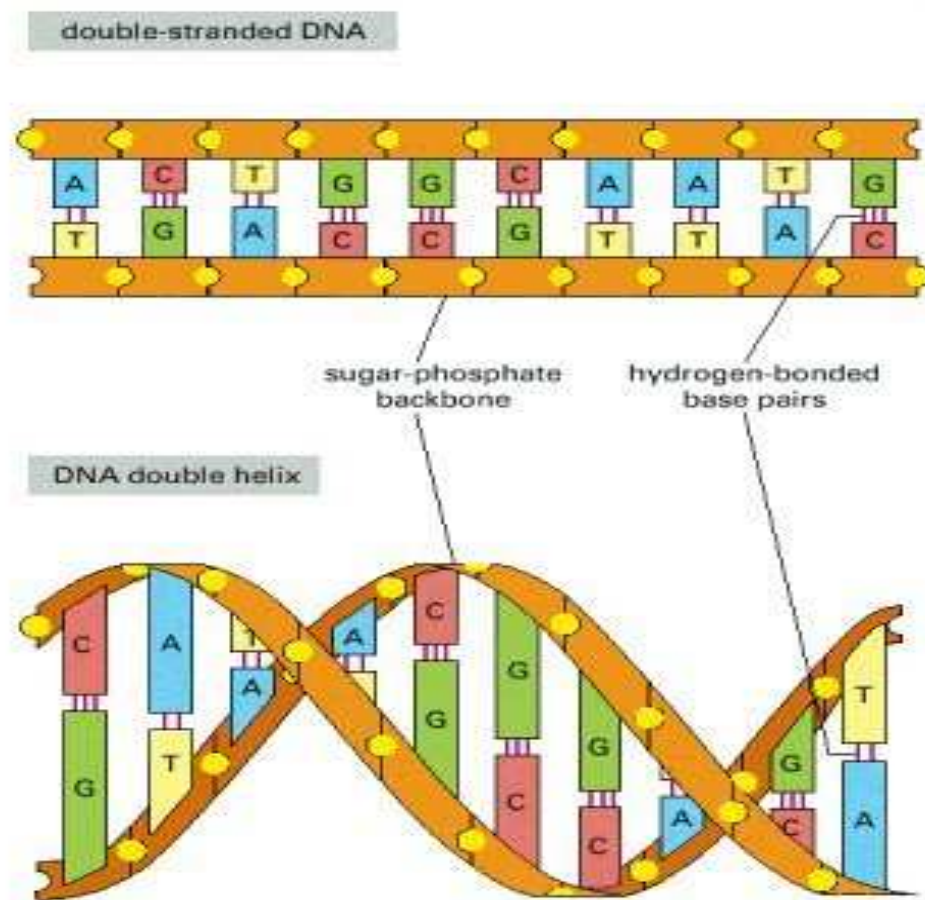


booleanas, de modo que uma boa aproximação qualitativa pode ser obtida. Redes booleanas não capturam a evolução temporal através de variáveis contínuas, mas são eficientes para descrever nós e propriedades essenciais de sistemas reais que incorporam uma grande quantidade de dados. Contudo, a simplificação do modelo através do uso de variáveis binárias também requer tempo computacional para que seja obtida uma convergência, no que se refere à descrição das principais propriedades que relacionam as variáveis do sistema, além de um tempo considerável para que todas as regras booleanas descrevendo as interações entre os elementos da rede sejam descritas manualmente.

## **2.5 DNA e expressão gênica**

A coordenação do funcionamento de todos os seres vivos depende de dois tipos básicos de ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucléico (DNA) e o ácido ribonucléico (RNA). Normalmente o DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas enroladas uma ao redor da outra na forma de dupla hélice conforme a Figura 13 a seguir. Cada fita da hélice é composta por unidades menores denominadas nucleotídeos, formados a partir de uma molécula de ácido fosfórico (fosfato) ligada a uma pentose (monossacarídeo com cinco átomos de carbono), à qual uma base está ligada. As bases encontradas no DNA são: adenina, guanina, citosina e timina, de maneira que a adenina e a timina se combinam através de 2 pontes de hidrogênio, enquanto que a combinação entre citosina e guanina apresenta três pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio entre as bases contribuem para a estabilidade da estrutura dupla hélice e para a especificidade do pareamento de bases. A adenina está sempre ligada por pareamento de bases com a timina, enquanto que a guanina sempre realiza o pareamento de bases com a citosina (WATSON, 2006) conforme a Figura 13. Um gene corresponde a uma sequência de nucleotídeos ao longo de uma ou mais regiões de uma molécula de DNA ou RNA que pode ser transcrita em uma versão de RNA funcional. Muito semelhante ao DNA, o RNA é uma molécula longa contendo quatro tipos de nucleotídeos ligados entre si, encontrado como uma molécula de fita simples, contudo ao invés de conter timina como no DNA o RNA contém uracila. A menos da região promotora do gene, a transcrição de um gene

produz uma molécula de RNA de extensão comparável ao próprio gene, que por sua vez é traduzida pelos ribossomos, organelas celulares presentes em todo o citoplasma conforme a Figura 14, além de expressar RNA transportadores responsáveis pelo transporte de aminoácidos para a síntese de proteínas e RNAs ribossômicos presentes na maquinaria de síntese de proteínas no ribossomo. Essa tradução tem como função sintetizar proteínas que serão utilizadas em todos os processos necessários para as funções celulares (WATSON, 2006; WEINBERG, 2008).

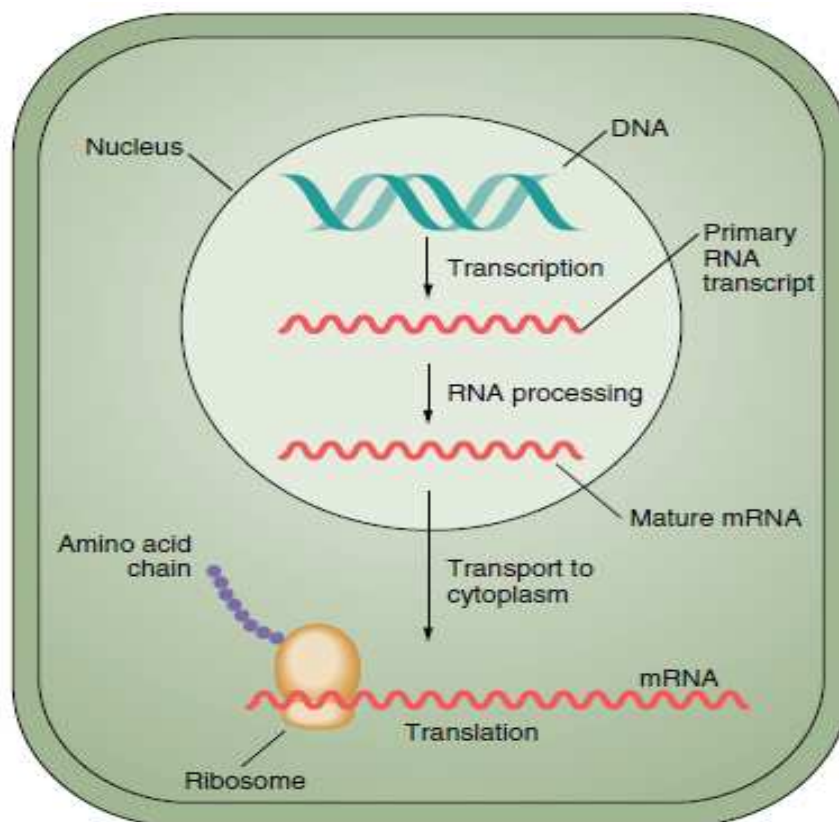


**Figura 13.** Estrutura helicoidal do DNA. Os nucleotídeos de uma cadeia estão conectados aos nucleotídeos da cadeia complementar através de pontes de hidrogênio indicadas na figura através de segmentos conectando as bases. Imagem obtida de EDD, 2012. .

Grupos de genes devem ser coordenadamente expressos enquanto que outros grupos devem ser reprimidos para que sejam sintetizadas somente proteínas necessárias para a célula. A coordenação da expressão ocorre a partir dos fatores de transcrição, proteínas que são capazes de se ligar à região de controle dentro de um gene para controlar o processo de transcrição. A transcrição da maioria dos

genes depende das ações de vários fatores de transcrição que devem se ligar juntos, cada um em sua região de controle para ativar ou reprimir a expressão gênica em eucariotos (WEINBERG, 2008).

Muitos genes são compostos por sequências codificantes separadas entre si por blocos com sequências não codificantes. As sequências codificantes são chamadas éxons e as sequências não codificantes são chamadas de íntrons que logo são desprezadas e não tem impacto sobre o RNA codificante. A molécula final das modificações pós-transcricionais do RNA é denominada RNA mensageiro (mRNA), que serve de molde aos ribossomos para formar as proteínas. A região do mRNA que codifica uma proteína consiste em uma sequência ordenada de unidades trinucleotídicas denominadas códons, que especificam a ordem de cada um dos 20 aminoácidos que formam as proteínas. A tradução da informação contida nos códons para aminoácidos é executada por moléculas de tRNA, denominada RNA transportador. Enzimas acoplam os aminoácidos aos seus tRNAs específicos que por sua vez reconhecem o códon apropriado.



**Figura 14:** Depois de transcrito e processado no núcleo o mRNA é transportado para o citoplasma onde ocorre a tradução a partir dos ribossomos e a síntese de proteínas (GRIFFITHS, 2005).

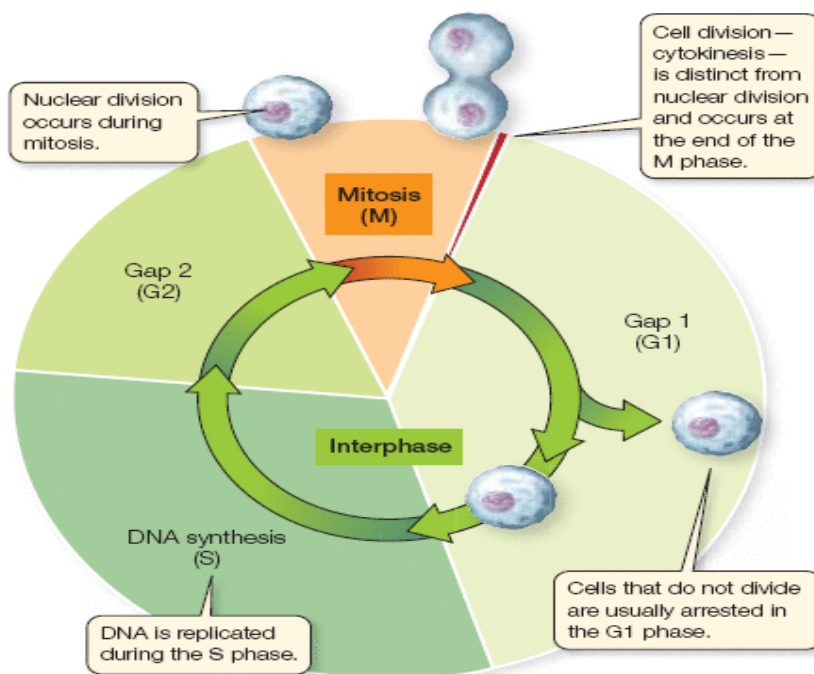
Existem vários tipos de moléculas de tRNA que se ligam a aminoácidos específicos e reconhecem um determinado códon. O mecanismo de tradução que envolve mRNA, tRNA e aminoácidos é dependente do ribossomo, que por sua vez é composto por dois subconjuntos de RNA e proteínas conhecidos como subunidades maior e menor. O tRNA e o mRNA são posicionados nos ribossomos de modo que o códon de um mRNA pode interagir com um anticódon do tRNA. Mais precisamente, a tradução começa com a ligação do mRNA e de um tRNA de iniciação à subunidade ribossômica menor, que em seguida recruta a subunidade maior, com o mRNA intercalado entre eles, iniciando a tradução a partir do códon inicial AUG do mRNA de modo que o ribossomo move-se de códon a códon junto com os tRNAs para prolongar a cadeia de aminoácidos até encontrar três códons UAA, UAG, UGA que funcionam como códons de parada e não especificam nenhum aminoácido. Quando o ribossomo encontra a sequência de parada então a cadeia polipeptídica é liberada e os ribossomos se separam nas subunidades dando origem a uma proteína (WATSON, 2006).

## 2.6 Ciclo Celular

O ciclo celular é uma sequência de eventos responsáveis pelo controle da duplicação celular e de todos os componentes da célula para dar origem a duas células filhas conforme necessidade do organismo (TYSON et al., 2001). O ciclo celular é dividido em 4 fases: fase G1 (síntese de proteínas e crescimento celular), fase S (replicação do DNA), fase G2 (síntese de proteínas e crescimento celular) e fase M (Mitose) conforme a Figura 15. A divisão celular deve ser cuidadosamente controlada por fatores de crescimento que coordenam os processos que ocorrem durante o ciclo celular para garantir que as células ao final do ciclo celular permaneçam com o DNA intacto (COLEMAN et al., 2004).

Se os fatores de crescimento necessários para a entrada da célula na fase S não estão disponíveis, a célula entra no estado quiescente (G0), ou seja, ocorre a parada do ciclo celular, as células permanecem metabolicamente ativas, mas mantêm a capacidade de dar continuidade ao ciclo quando as condições

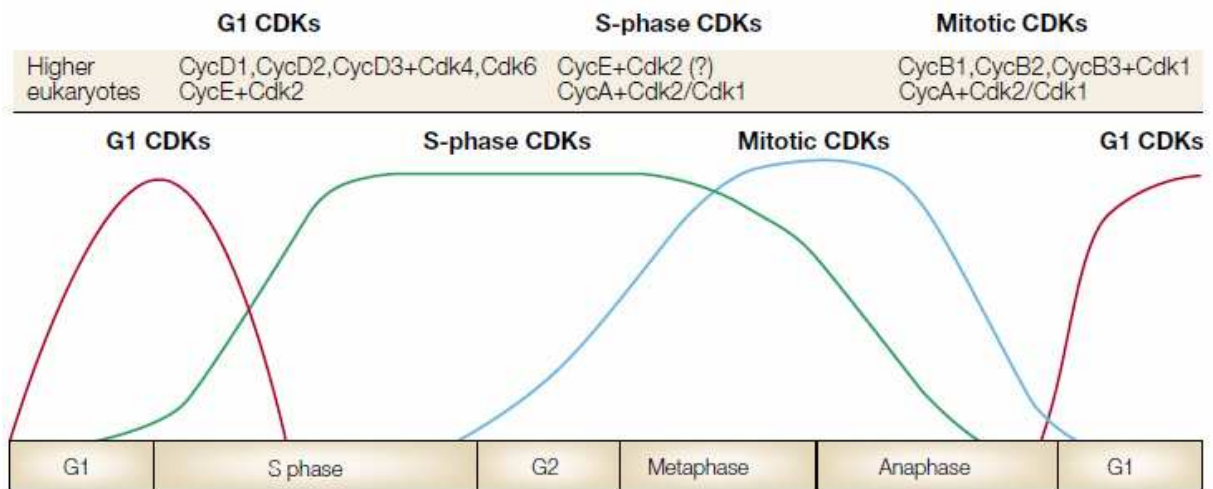
necessárias para que o ciclo celular ocorra normalmente são satisfeitas (SANG *et al.*, 2008), diferente de células senescente cuja parada do ciclo celular é mantida de forma independente de estímulos mitogênicos



**Figura 15:** Divisão do ciclo celular em quatro fases sucessivas (O'CONNOR, 2008).

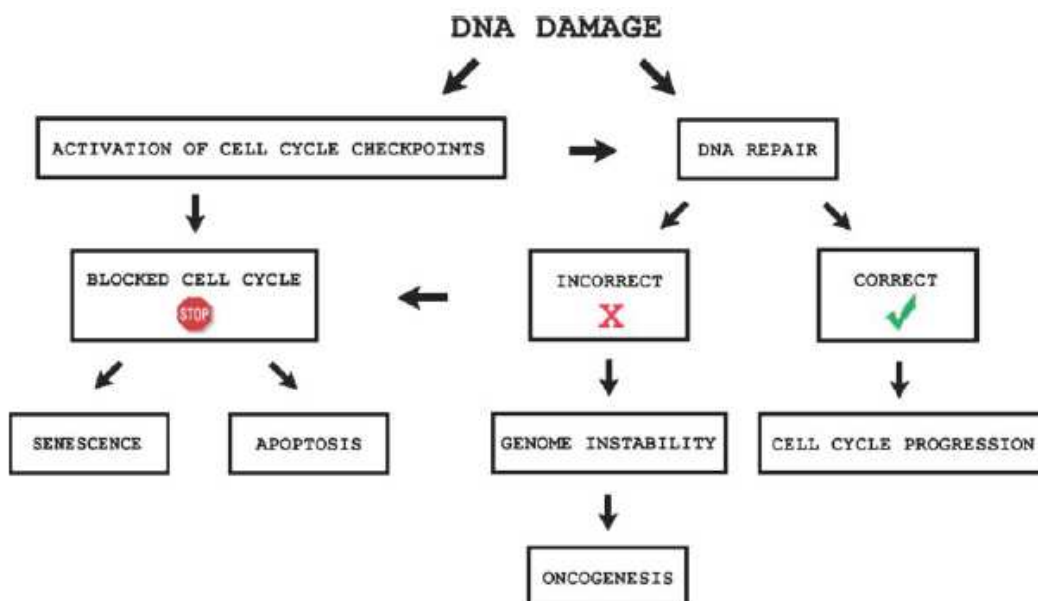
A decisão entre continuar o ciclo celular ou entrar na fase G0 é tomada em um ponto de restrição (ponto R) localizado no final da fase G1, mas passando este ponto R, as células estão comprometidas a completar o ciclo celular (DEHAY *et al.*, 2007). A transição entre as fases do ciclo celular é controlada por complexos Ciclina-CDK (ciclina dependente de quinase), diferentes em cada uma das transições de fase conforme a Figura 16, que garantem que todas as fases do ciclo celular são executadas de uma forma correta (DEHAY *et al.*, 2007). Para controlar a parada do ciclo celular ocorre o aumento de inibidores das CDKs, não somente na ausência de fatores de crescimento mas também na presença de danos no DNA. Pontos de checagem são vias bioquímicas que param a progressão do ciclo celular em resposta a danos no DNA, de modo que três pontos de checagem (G1/S, S e G2/M) controlam a parada do ciclo nas fases G1, S e G2 respectivamente para permitir que os danos no DNA sejam reparados antes da entrada da célula na nova fase do ciclo (SANCAR *et al.*, 2004; BARTEK *et al.*, 2001). Estes pontos de checagem também são responsáveis pelo controle da replicação do DNA e segregação dos cromossomos, garantindo que ambos sejam corretamente

completados antes da célula progredir através do ciclo celular com o DNA danificado (DEHAY *et al.*, 2007) .



**Figura 16:** CDKs e o controle da progressão do ciclo celular (BARDING *et al.*, 2001).

Além de regular a parada do ciclo celular, dependendo das lesões no DNA, os pontos de checagem também são responsáveis pelo encaminhamento da célula para a apoptose (morte celular programada) ou para a parada permanente do ciclo celular, ou seja, as células entram no estado senescente (BARTEK *et al.*, 2007). Alguns reguladores do ciclo celular participam também do controle da morte celular programada e da senescência, particularmente c-Myc, p53, pRb e Bcl-2, NF- $\kappa$ B entre outros, estão entre os principais reguladores de ambas as respostas celulares (VERMEULEN *et al.*, 2003). Trabalhos recentes apontam p53 como elemento central no controle das respostas à danos no DNA, de modo que baixos níveis de ativação de p53, juntamente com uma constante sinalização de p53 devem favorecer o estado senescente, enquanto que níveis altos de ativação desta proteína devem desencadear a apoptose (ZUCKERMAN *et al.*, 2009; PURVIS, 2012), de maneira que a apoptose elimina células com alto risco de transformações oncogênicas e a senescência atua para impedir que a continuidade do ciclo celular seja a responsável pela tumorigênese (ZUCKERMAN *et al.*, 2009). Um resumo da organização das respostas celulares que ocorrem a partir de danos no DNA é indicado na Figura 17, onde o controle do reparo de danos no DNA, senescência, apoptose e o restabelecimento do ciclo celular é dependente dos pontos de checagem em cada fase do ciclo.



**Figura 17:** Fluxograma do controle das respostas celulares em respostas aos danos do DNA (HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

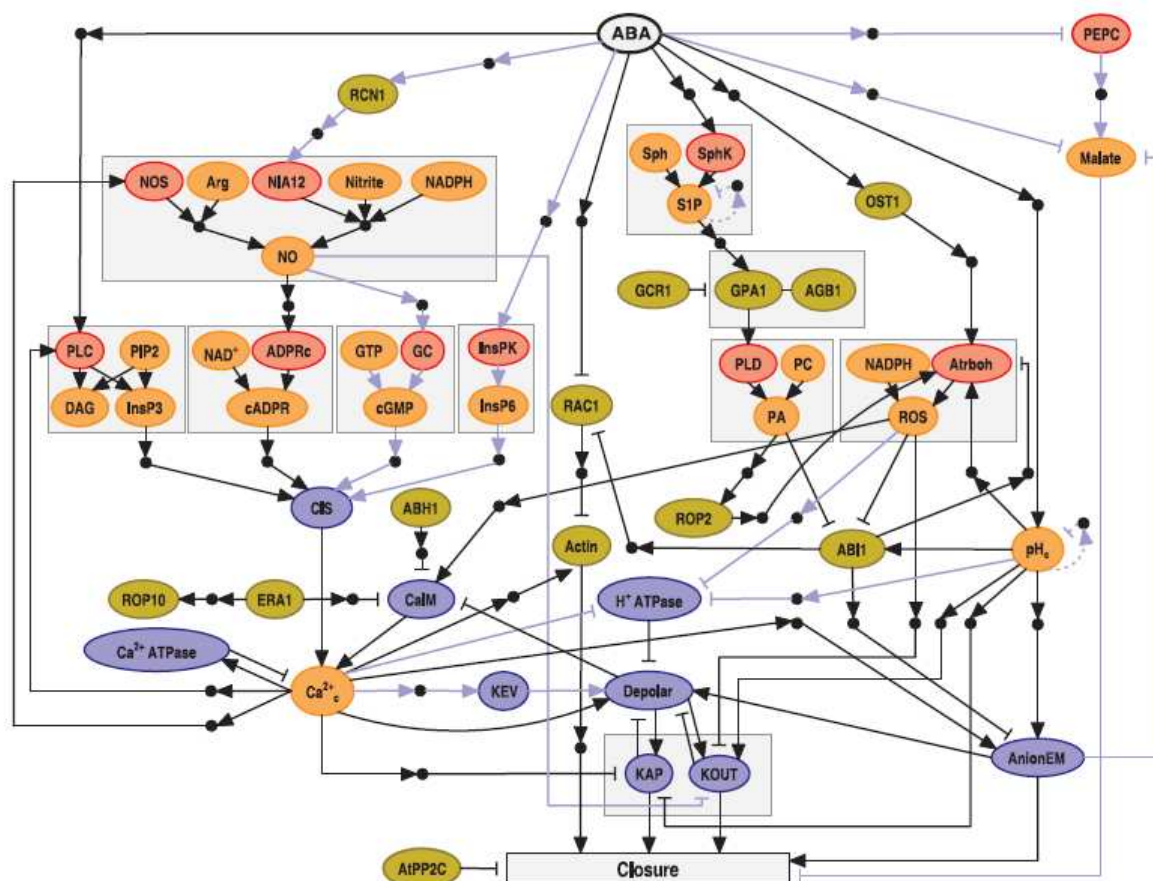
Dado que os pontos de checagem são decisivos para o controle do ciclo celular, mutações ou diminuição da expressão de genes que participam dos pontos de checagem estão entre as principais causas de instabilidade genômica e por isso são detectados em muitos tipos de cânceres (SHIMADA *et al.*, 2007; KASTAN *et al.*, 2004).

### **3. UM MÉTODO PARA IDENTIFICAR IMPORTANTES ESTADOS DINÂMICOS EM UM MODELO BOOLEANO DE REDES REGULATÓRIAS: APLICAÇÃO PARA A REGULAÇÃO DO FECHAMENTO DOS ESTÔMATOS PELO ABA EM *ARABIDOPSIS THALIANA*.**

Nas plantas a transpiração ocorre principalmente nas folhas, enquanto seus estômatos são mantidos abertos para a passagem de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> durante a fotossíntese. Este processo é extremamente dispendioso para uma planta, especialmente quando o suprimento de água é limitado. A maior quantidade de água transpirada por uma planta superior é perdida através dos estômatos que são controlados por células-guarda que regulam a taxa de transpiração. Quando as células-guarda tornam-se túrgidas, causam a abertura dos estômatos permitindo que a água seja evaporada. Quando a transpiração excede a absorção de água pelas raízes, a perda de turgor ocorre e os estômatos se fecham equilibrando a água perdida e o ganho de CO<sub>2</sub>. Durante condições de seca, as plantas sintetizam o hormônio ABA para atuar como um regulador em várias vias de sinalização para o fechamento dos estômatos, reduzindo desta forma a quantidade de água perdida para garantir a sua sustentabilidade em meio ao estresse.

Song Li e colaboradores desenvolveram uma rede da regulação da abertura e fechamento de estômatos de plantas pelo ácido abscísico (ABA) utilizando uma rede booleana (LI *et al.*, 2006). A rede contém 43 nós e 69 interações representados através de um grafo direto indicado na Figura 18 de modo que informações experimentais sobre o envolvimento de componentes específicas na rede foram consideradas para a construção das interações.





**Figura 18:** Rede de transdução de sinal do ABA contendo diferentes moléculas, incluindo proteínas, enzimas, hormônios e mensageiros secundários. Pequenos círculos pretos representam mediadores indiretos na rede regulatória. Arestas com setas indicam ativação, arestas com barras nas extremidades indicam inibição e arestas em azul indicam interações derivadas de diferentes espécies. Nós envolvidos na mesma via de sinalização ou complexo de proteínas estão indicados por caixas retangulares (LI *et al.*, 2006).

### 3.1 Análise da dinâmica da rede selvagem e das redes mutantes

Para analisar a dinâmica da rede booleana proposta denominada rede booleana selvagem (ALBERT *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2006), cujas regras estão indicadas na Tabela 4 conforme a Figura 18, foram utilizados algoritmos para identificar importantes elementos no espaço de estados e sua influência sobre a dinâmica global da rede regulatória. Os algoritmos consistem em (1) encontrar os estados da rede que são visitados (atratores), (2) identificar os nós com estados variantes e invariantes da rede e (3) uma simulação para comparar a rede selvagem com algumas redes mutantes obtidas pela fixação dos estados de determinados elementos da rede.

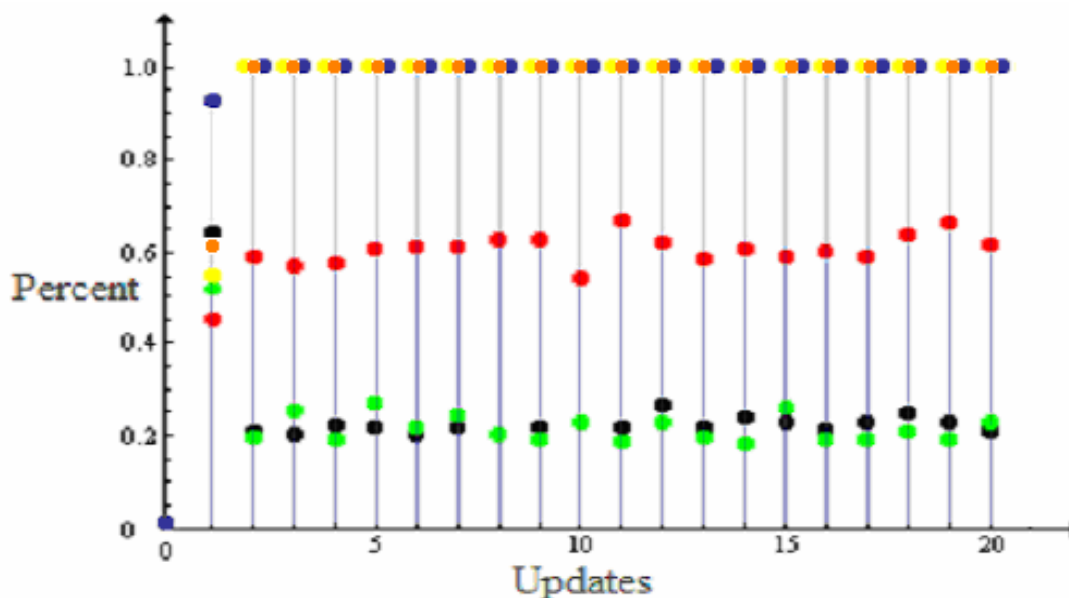
**Tabela 4:** Regras booleanas para os elementos da rede indicada na figura 18 (Li *et al.*, 2006).

NO	NO* = NIA12 and NOS
PLC	PLC* = ABA and Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub>
CaIM	CaIM* = (ROS or not ERA1 or not ABH1) and not Depolar
GPA1	GPA1* = (S1P or not GCR1) and AGB1
Atrboh	Atrboh* = pH <sub>c</sub> and OST1 and ROP2 and not ABI1
H <sup>+</sup> ATPase	H <sup>+</sup> ATPase* = not ROS and not pH <sub>c</sub> and not Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub>
Malate	Malate* = PEPC and not ABA and not AnionEM
RAC1	RAC1* = not ABA and not ABI1
Actin	Actin* = Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub> or not RAC1
ROS	ROS* = ABA and PA and pH <sub>c</sub>
ABI1	ABI1* = pH <sub>c</sub> and not PA and not ROS
KAP	KAP* = (not pH <sub>c</sub> or not Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub> ) and Depolar
Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub>	Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub> * = (CaIM or CIS) and not Ca <sup>2+</sup> ATPase
CIS	CIS* = (cGMP and cADPR) or (InsP3 and InsP6)
AnionEM	AnionEM* = ((Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub> or pH <sub>c</sub> ) and not ABI1 ) or (Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub> and pH <sub>c</sub> )
KOUT	KOUT* = (pH <sub>c</sub> or not ROS or not NO) and Depolar
Depolar	Depolar* = KEV or AnionEM or not H <sup>+</sup> ATPase or not KOUT or Ca <sup>2+</sup> <sub>c</sub>
Closure	Closure* = (KOUT or KAP ) and AnionEM and Actin and not Malate

Em seu artigo original Reka Alert (ALBERT *et al.*, 2008) estudou a influência de perturbações sobre a dinâmica da rede (mutações) envolvendo os nós S1P, PA, ABI1 and pH<sub>c</sub>, onde as perturbações são simuladas através da fixação dos elementos S1P, PA, ABI1 and pH<sub>c</sub>. Além disso, analisamos a importância do nó NOS (óxido nítrico sintase) na rede, visto que o estado de NOS é importante para definir a dinâmica dos estados de vários outros elementos da rede. Óxido nítrico é um elemento chave para o fechamento dos estômatos em resposta ao ABA, durante estresse hídrico este elemento participa da rápida indução do fechamento dos estômatos e também na ativação de defesas antioxidantes (NEILL *et al.*, 2008; CRAWFORD, 2006; WILSON *et al.*, 2008). O comportamento das redes selvagem e mutantes é mostrado na Figura 19, considerando as simulações com 300 condições iniciais aleatórias e 20 atualizações, de modo que o nó ABA é mantido fixo no estado “True” para indicar que o hormônio está sendo sinalizado pela planta. O estado final do nó “Closure” que representa na rede o estado final dos estômatos, é obtido a partir das simulações através da média entre os diferentes estados obtidos em cada atualização considerando-se 300 simulações.

A partir das simulações é possível identificar que para os mutantes PA, S1P e pH<sub>c</sub> cuja eficiência em relação ao fechamento dos estômatos é baixa, o par {AnionEm, Closure} alterna entre os estados {True, True} ou {False, False}. Já para

a rede selvagem e os mutantes NOS e ABI1, cuja eficiência em relação ao fechamento dos estômatos é alta, o par assume somente os estados {True, True}. Isto demonstra que os nós AnionEM e Closure estão sincronizados nestas redes e isto sugere que esta deve ser uma característica essencial da dinâmica, o que não foi observado no trabalho original de Reka Albert (Li *et al.*, 2006).



**Figura 19:** Comparação de eficiência entre as redes selvagem e mutante de afetar o nó Closure. Círculos azuis indicam a rede selvagem e amarelo, vermelho, verde, laranja e preto representam os mutantes ABI, S1P, phc, NOS, e PA respectivamente.

Esta sincronização entre os nós Closure e AnionEM é suportada experimentalmente (PEI *et al.*, 1997), de modo que as mutações S1P, PA e phc causam a variação do AnionEM que interfere indiretamente nos estados dos nós KAP e KOUT que por sua vez, induzem a variação do estado do Closure e conseqüentemente os estômatos alternam entre abertura e fechamento de acordo com as Figuras 18 e 19.

### 3.2 Análise do Espaço de Estados

Os resultados obtidos para o espaço de estados mostram uma dinâmica contendo diferentes atratores, mas considerando que nos algoritmos implementados as atualizações de alguns elementos da rede podem ocorrer de forma aleatória, isto indica que uma trajetória no espaço de estados não converge para um estado fixo

caracterizando um atrator, contudo a alta incidência de estados específicos aproxima um sistema dinâmico composto de dois atratores.

### **3.3 Elementos variantes e invariantes da rede**

Considerando os estados de cada nó durante a dinâmica, descobrimos que apenas 16 dos 43 nós são elementos variáveis, enquanto os 27 restantes são fixos com estados Verdadeiro ou Falso. Devido ao tempo computacional, utilizamos simulações com diferentes condições iniciais e diferentes números de atualizações. Os elementos variáveis foram determinados por meio de simulações com 300 diferentes condições iniciais e 10 atualizações, 100 condições iniciais com 50 atualizações e duas diferentes condições iniciais com 800 atualizações, de modo que em cada simulação os elementos variáveis e fixos são os mesmos. Os resultados demonstram que a rede selvagem e as redes mutantes possuem diferentes conjuntos de elementos variáveis, mas em qualquer caso observa-se que alguns elementos podem sincronizar seus estados, como resultado da topologia e dinâmica da rede. Independente do número de atualizações e das condições iniciais usadas, os elementos variáveis estão dispostos em grupos onde todos estão no mesmo estado booleano, alguns pertencem à mesma via metabólica, mas outros nós possuem o mesmo estado devido às regras booleanas que definem os seus estados. Isto explica a baixa cardinalidade do espaço de estados, visto que muitos nós são encontrados no mesmo estado e sendo assim, as trajetórias percorrem uma pequena porção dos  $2^{43}$  estados teoricamente possíveis.

### **3.4 Conexão entre as simulações**

A partir dos algoritmos implementados foi possível caracterizar o comportamento dinâmico no espaço de estados, principalmente pela existência de dois estados mais frequentes, diferentes para cada rede analisada. É possível prever um aparente mecanismo chave para a ativação do Closure, caracterizado pela sincronização entre os nós Closure e AnionEm (representando o fluxo de

ânions na membrana plasmática). Comparando a dinâmica dos mutantes com a dinâmica da rede selvagem, é possível perceber que as mutações PA, S1P e pH<sub>c</sub> desestabilizam a sincronização entre os AnionEM e Closure, enquanto que para a rede selvagem e as redes mutantes NOS e ABI1 os dois nós estão fixos no mesmo estado. Análises experimentais com estes mutantes suportam o comportamento das redes simuladas e a importância do envolvimento do fluxo de ânions para uma resposta da planta ao ABA (PEI *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2009). Estes resultados foram publicados na revista BMC Genomics em dezembro de 2011. Uma versão do artigo encontra-se em Anexo.



Esta fita simples está envolvida com a formação de uma estrutura denominada alça T, formada pela invasão da fita simples na porção fita dupla de maneira que a estabilidade desta estrutura é dependente de um conjunto de seis proteínas que formam o chamado complexo de *Shelterin*. A deformação da alça T através do encurtamento da parte fita simples rica em G, pode dar início a disfunções nos telômeros e ativação de respostas aos danos no DNA (DDR) (RIETHMAN, 2008). A alça T pode auxiliar na proteção das extremidades dos cromossomos, cuja exposição é responsável por fusões entre cromossomos e instabilidade genômica (WEINBERG, 2008).

A replicação da célula depende de um equilíbrio entre o encurtamento dos telômeros a cada divisão celular e a ação da telomerase hTERT (telomerase humana com atividade catalítica de transcriptase reversa), enzima que contém em sua estrutura um modelo de RNA utilizado como molde para adicionar sequências repetidas de DNA (sequências teloméricas) para o alongamento das extremidades dos telômeros. Células humanas expressando a telomerase podem se dividir sem nenhuma limitação, indicando que o encurtamento dos telômeros controla a entrada e a manutenção da célula no estado senescente.

A senescência replicativa é normalmente definida pela limitação no potencial de proliferação e vida útil de uma célula (CHEUNG *et al.*, 2009), mas considerando a ação da telomerase, a senescência replicativa pode ser definida de forma mais precisa, ou seja, senescência replicativa ocorre quando os telômeros são limitantes para a proliferação celular e a expressão da proteína hTERT pode diretamente imortalizar uma célula (SHAY *et al.*, 2005). Este estado é caracterizado por um fenótipo alterado, se por um lado contribui para disfunções celulares, predisposição a doenças, envelhecimento e câncer, por outro lado, a senescência também está relacionada à mecanismos de supressão de tumor através da parada permanente do ciclo celular (RODIER *et al.*, 2011; TRESINI *et al.*, 2007). São em partes responsáveis por várias patologias humanas, incluindo aterosclerose, osteoartrite, degeneração muscular, formação de úlceras, Alzheimer, diabetes e exaustão imunológica (FAURÉ *et al.*, 2006; HWANG *et al.*, 2009; CARNES *et al.*, 2008). A relação entre senescência replicativa, doenças e envelhecimento torna-se evidente considerando que doenças degenerativas produzem uma deterioração progressiva das células e tecidos ao longo do tempo, efeitos que também são atribuídos a células senescentes. No caso de células do sistema imunológico, uma inflamação de

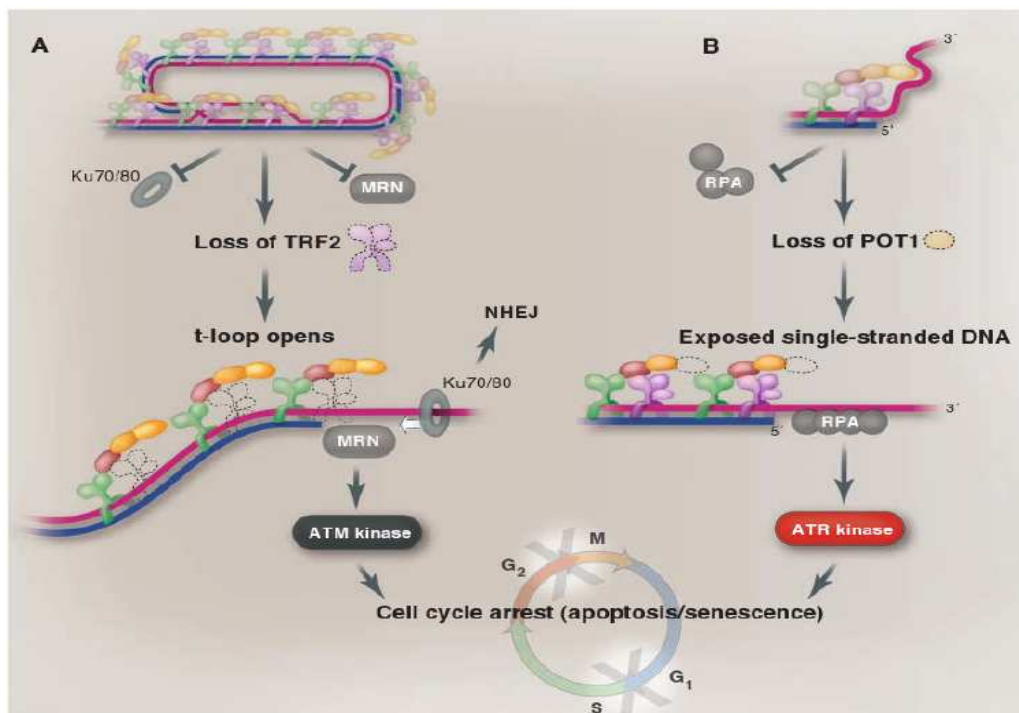
baixo grau criada por um sistema imunológico senescente pode reduzir ainda mais a funcionalidade dos tecidos e contribuir para o surgimento de doenças relacionadas à idade (HWANG *et al.*, 2009; ZUCKERMAN *et al.*, 2009; SIKORA *et al.*, 2011). Células senescentes são observadas em tecidos de mamíferos *in vivo* (D'ADDA DI FAGAGNA, 2008; CAINO, 2009), assim como vários tecidos humanos são caracterizados por células com significativo encurtamento dos telômeros, mas em um número muito maior quando comparado com o número de células senescentes, sugerindo que o encurtamento dos telômeros em humanos não é suficiente para induzir um acúmulo maior de células senescentes nos tecidos (JIANG *et al.*, 2007). Células tronco adultas são capazes de se diferenciar e de se auto renovar para a manutenção e regeneração de tecidos humanos (KONG, *et al.*, 2011), o que sugere que a renovação dos tecidos e a substituição de células senescentes está relacionada com a apoptose e a disponibilidade de células tronco (BURTON, 2009; CAMPISI *et al.*, 2011) .

A parada permanente da célula durante o ciclo celular pode ocorrer tanto na fase G1 quanto na fase G2 do ciclo, através da ativação dos mecanismos dos pontos de checagem. Alguns fatores são importantes na escolha da parada na fase G1 ou G2, incluindo a sensibilidade do ponto de checagem G1/S em relação à exposição das extremidades do DNA de modo que tem sido sugerido que uma simples quebra no DNA pode induzir a parada em G1, enquanto que uma quantidade maior de quebras duplas são necessárias para ativação do ponto de checagem G2/S no caso de senescência induzida por danos no DNA (D'ADDA DI FAGAGNA, 2008). Para uma célula entrando em um estado de senescência replicativa, a manutenção da parada do ciclo da célula é outro fator importante na hora da decisão entre as fases do ciclo celular. Do ponto de vista lógico, a manutenção da parada após a fase S requer a habilidade da célula em permanecer com o DNA duplicado o que implica em um maior volume para a célula e conseqüentemente uma maior necessidade energética. Considerando que uma célula permanece metabolicamente ativa, a parada permanente da célula na fase G1 do ciclo celular parece ser a escolha mais adequada para um longo período de atividades em um tecido. Além disso, a sinalização da parada envolve três redes distintas de sinalização associadas à três diferentes propósitos no caso da parada em G1:



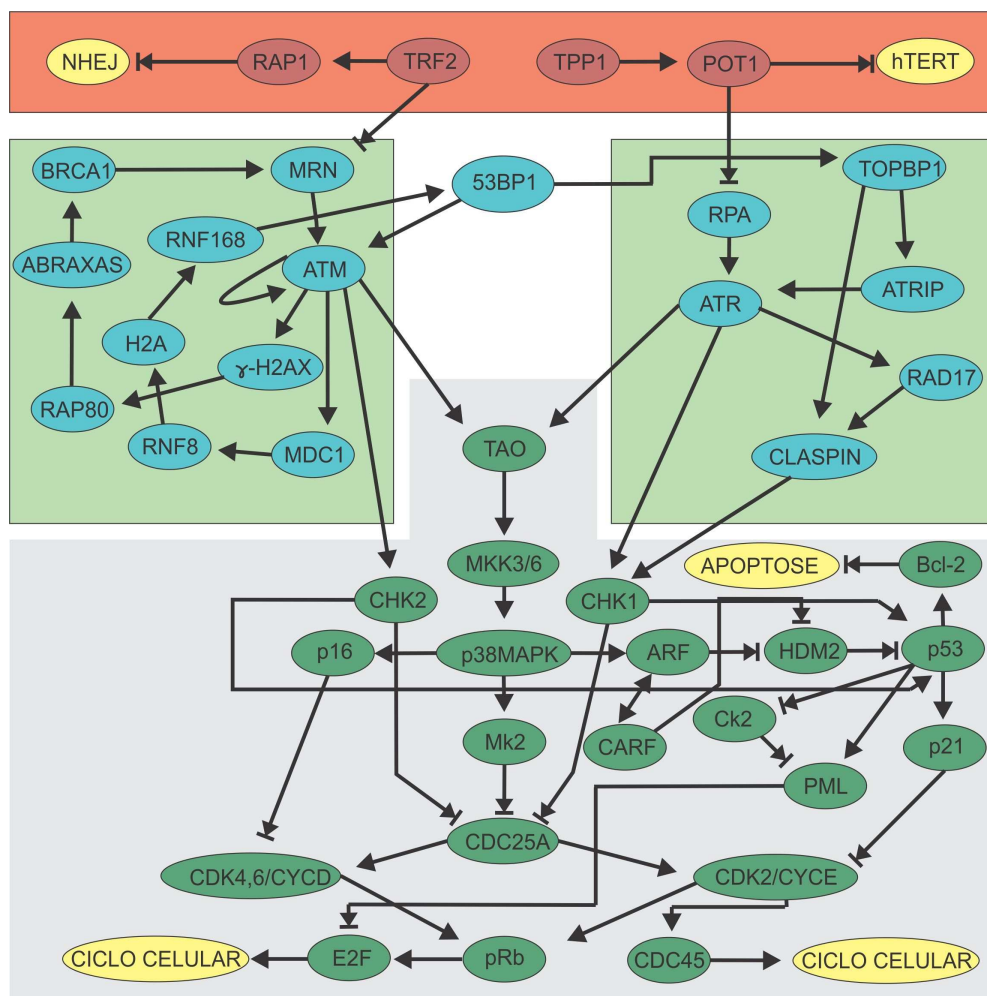
1. Criação do sinal: Sinalização do encurtamento dos telômeros pelos elementos do complexo de *Shelterin* (CAMPISI *et al.*, 2011; DE LANGE, 2009).
2. Amplificação do sinal: Seguindo a sinalização do encurtamento dos telômeros, as extremidades expostas dos telômeros são identificadas e sinalizadas como quebras duplas no DNA (SIKORA *et al.*, 2011, DE LANGE, 2009).
3. Execução do sinal: A partir da amplificação do sinal pela maquinaria de quebras duplas do DNA, ocorre a ativação do ponto de checagem e a sinalização da parada permanente do ciclo celular preferencialmente na fase G1 do ciclo celular (CAINO, 2009; CAMPISI *et al.*, 2007).

Esta divisão na sinalização sugere uma resposta ao encurtamento dos telômeros através de uma rede regulatória de proteínas dividida em módulos e vias, onde alguns elementos da rede são ainda caracterizados por uma conectividade acima da média, quando comparada com a conectividade dos demais elementos da rede. Esta conectividade aumentada ocorre tendo em vista que algumas proteínas como ATM e ATR atuam tanto na sinalização da quebra dupla, quanto na regulação dos pontos de checagem conforme indicado de forma resumida pela Figura 21.



**Figura 21:** Sinalização da senescência replicativa através de uma cascata de sinalização envolvendo elementos do complexo de *Shelterin*, sinalização de quebras duplas e sinalização de quebras simples conforme indicado em A e B respectivamente e a parada do ciclo celular (DE LANGE, 2009).

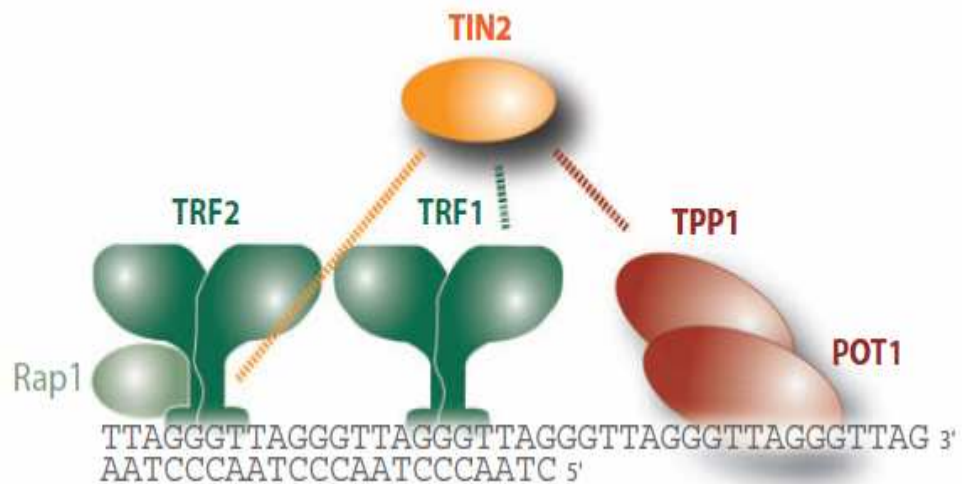
As interações entre os principais elementos da rede de sinalização de senescência replicativa não estão totalmente claras, como é o caso dos mecanismos redundantes para garantir a manutenção da parada, incluindo o complexo consistindo das kinases p38MAPK e MK2, que são ativadas pelas vias clássicas contendo ATM e ATR em resposta ao dano no DNA e cujas interações não estão totalmente esclarecidas (REINHARDT *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2007). Considerando os mecanismos descritos na Figura 21 envolvendo a sinalização do encurtamento dos telômeros, uma rede com as interações entre os principais marcadores de senescência replicativa é proposta conforme a Figura 22:



**Figura 22:** Rede de senescência replicativa. As elipses vermelhas representam as proteínas do complexo de *Shelterin*, as elipses azuis representam proteínas de sinalização de danos no DNA, as elipses verdes indicam proteínas do ponto de checagem em  $G_1$  e as elipses amarelas representam os mecanismos inativos durante o estado senescente. O retângulo vermelho indica o início da sinalização da parada, os retângulos verdes indicam os módulos de amplificação do sinal e o retângulo cinza indica as vias de sinalização para a parada rápida e permanente do ciclo celular.

## 4.2 Sinalização do complexo de *Shelterin*

Quando uma célula alcança o seu limite de replicação, após uma dada quantidade de divisões celulares que pode variar em cada tipo celular e em cada organismo, aproximadamente 50-100 pares de bases a cada divisão celular em fibroblastos (JIANG *et al.*, 2007), as extremidades dos cromossomos perdem sua proteção natural e são identificadas como quebras duplas e como quebras simples do DNA. Para impedir esta identificação em condições normais, a estrutura de alça *t* é mantida a partir do complexo de *Shelterin*, formado pelas proteínas TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 and TPP1 com funções distintas para a manutenção e regulação desta estrutura telomérica conforme Figura 23 (DE LANGE, 2009; DENG *et al.*, 2008; XIN *et al.*, 2008).



**Figura 23:** Formação do complexo de *Shelterin* e sua distribuição sobre os telômeros nas partes dupla fita e fita simples do DNA telomérico composto de uma sequência repetida de hexanucleotídeos 5' – TTAGGG – 3' em uma fita e a complementar 3' – AATCCC – 5' na outra (WILHELM *et al.*, 2008).

Elementos específicos deste complexo (POT1 and TRF2) impedem o início de um inapropriado ponto de checagem que ativado pode resultar em fusões de cromossomos através dos mecanismos de reparo HR and NHEJ (DENG *et al.*, 2008). No entanto, considerando a indisponibilidade do reparo por homologia na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular, a inibição da maquinaria de NHEJ é controlada por TRF2 através do recrutamento da proteína RAP1 em humanos, sugerindo que RAP1 é um importante mediador da estabilidade genômica (SARTHY *et al.*, 2009). Além disso, a estrutura *t-loop* nos telômeros é mantida por TRF2 para garantir que não ocorra o

acúmulo do complexo MRN e a consequente ativação da via ATM (DE LANGE, 2009). A ativação desta via a partir da inibição de TRF2, pode resultar em senescência na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular no caso de fibroblastos humanos, enquanto que a apoptose ocorre para linfócitos e células epiteliais (DE LANGE, 2005; WILHELM *et al.*, 2008). Enquanto TRF2 atua na inibição da via de sinalização ATM, o outro membro do complexo de *Shelterin* POT1, interage com a parte fita simples do DNA telomérico através de seu recrutamento por TPP1 (WILHELM *et al.*, 2008), garantindo dessa forma a inativação da via ATR através do bloqueio do acesso da proteína RPA, pelo qual ATR é recrutada (DE LANGE, 2009; XIN *et al.*, 2008). Além disso, a regulação do alongamento dos telômeros pela telomerase hTERT é dependente do acúmulo do heterodímero TPP1-POT1 no DNA telomérico (DE LANGE, 2005; XIN *et al.*, 2008), garantindo desta forma que a célula não seja imortalizada pela ação da telomerase e que o estado senescente seja mantido.

Sendo assim, para uma célula no limite de sua capacidade replicativa, os mecanismos envolvendo o complexo de *Shelterin* garantem que a desestabilização da estrutura *t-loop* pode iniciar a ativação de vias redundantes ATM/ATR para garantir que a sinalização da parada permanente da célula seja mantida (ZUCKERMAN *et al.*, 2009), visto que a inibição destas vias, garante a continuidade das divisões celulares e o contínuo desgaste dos telômeros que pode eventualmente induzir a célula ao estágio de *crisis* (M2) (SHAY *et al.*, 2005).

### **4.3 Sinalização de quebras duplas do DNA.**

A deformação da estrutura *t-loop* nas extremidades dos telômeros inicia o reconhecimento do DNA telomérico exposto como uma quebra dupla no DNA e a ativação de mecanismos de resposta ao dano (DDR) (SIKORA *et al.*, 2011). Em fibroblastos humanos as proteínas marcadoras de duplas quebras no DNA são identificadas e incluem  $\gamma$  - H2AX, MDC1, NBS1 e 53BP1. Juntamente com os marcadores de quebras duplas no DNA, marcadores de pontos de checagem em G<sub>1</sub> incluem CHK1, CHK2, ATM e ATR (D'ADDA DI FAGAGNA *et al.*, 2003), indicando o fluxo da sinalização envolvendo os três módulos: sinalização do complexo de

*Shelterin*, sinalização de quebras duplas e sinalização da parada através dos mecanismos de ponto de checagem na fase G<sub>1</sub>.

Com o desgaste da estrutura *t-loop*, o início da sinalização de quebras duplas ocorre através do sensor MRN (SIKORA *et al.*, 2011, DE LANGE., 2009; DIMITROVA *et al.*, 2009) e a parte fita simples do DNA telomérico inicia a sinalização por RPA (DE LANGE, 2009), seguidos da ativação das quinases ATM e ATR e uma cascata de sinalização envolvendo diferentes mecanismos (SIKORA *et al.*, 2011; DERHEIMER *et al.*, 2010). De um modo geral, os mecanismos utilizados pelas vias de transdução de sinal envolvem a propagação de sinais através de proteínas que são categorizadas da seguinte maneira (BOHGAKI, 2010; GOOD, 2011; FREEMAN *et al.*, 2010; PANIERA *et al.*, 2009):

1. Quinases: Enzimas cuja sinalização ocorre através da transferência de um grupo terminal da ATP para um aminoácido específico de uma proteína alvo. Este processo provoca uma mudança na proteína alvo, induzindo a ativação ou inibição de suas funcionalidades;
2. Fosfatases: Enzimas que possuem uma função inversa em relação às quinases, elas atuam na remoção de grupos fosfato de seus substratos. Podem igualmente ativar ou inibir proteínas alvos;
3. Proteínas plataforma: proteínas que funcionam como um suporte para a conexão entre duas ou mais proteínas. São conhecidas por interagir com múltiplos membros de uma via de sinalização;
4. Ubiquitinas: Ubiquitinação é uma forma de modificação pós-traducional que covalentemente atribui ubiquitina, pequena proteína regulatória formada por 76 aminoácidos, a um resíduo de lisina em uma proteína alvo;

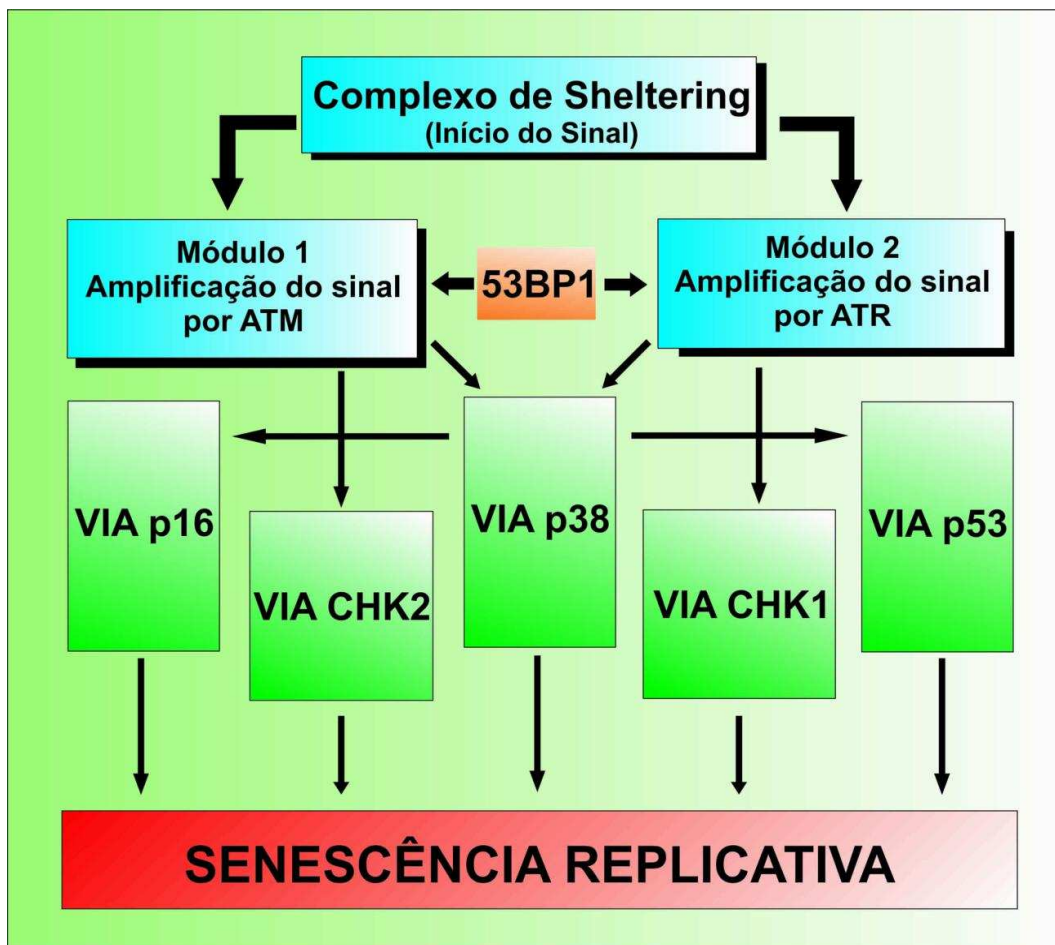
Diversas evidências indicam que a topologia da rede de sinalização da senescência replicativa pode ser modelada através de (1) dois módulos e (2) 5 diferentes vias de sinalização para a parada do ciclo celular, onde os módulos e as vias são regulados por quinases, fosfatases, proteínas plataforma e ubiquitinas(BOHGAKI, 2010; D'ADDA DI FAGAGNA, 2003).

A organização dos módulos tem como objetivo principal a amplificação dos sinais do encurtamento dos telômeros, de modo que os dois módulos tem como reguladores principais ATM e ATR.

**Módulo 1** : A sinalização de ATM pelo complexo MRN em células humanas depende das interações entre os mediadores 53BP1 e BRCA1 com MRN, cujos efeitos resultam na amplificação da sinalização de ATM e a consequente regulação dos seus principais substratos CHK2 e p53 (LEE *et al.*, 2010).

**Módulo 2:** A sinalização de ATR depende da sinalização da proteína POT1 do complexo de *Shelterin*. A inativação desta proteína inicia a cascata de sinalização de ATR através do acúmulo de RPA na parte fita simples do DNA telomérico, seguido da ativação de ATR por RPA. ATR forma um complexo com ATRIP (ATR proteína de interação) cuja função é regular a localização de ATR em resposta ao dano no DNA. Além da ATRIP, TOPBP1 é essencial para estimular e amplificar a atividade quinase do complexo ATR-ATRIP (MORDES *et al.*, 2008) e o recrutamento de TOPBP1 nos locais de duplas quebras do DNA é dependente de 53BP1 na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular (CESCUTTI, 2010).

Dessa forma, considerando que 53BP1 é um marcador de senescência em fibroblastos humanos (D'ADDA DI FAGAGNA *et al.*, 2003; VERGEL *et al.*, 2011) e tem papel fundamental na amplificação da sinalização através de ATM e ATR, um modelo descrevendo a sinalização de senescência replicativa pode ser proposto através da regulação dos Módulos 1 e 2 por 53BP1 de acordo com a Figura 24.



**Figura 24:** Rede regulatória envolvendo a interação entre os módulos através de 53BP1 e a interação entre as vias para a rápida e permanente ativação do estado permanente na fase  $G_1$  do ciclo celular.

#### 4.4 Vias de sinalização da parada do ciclo celular.

Considerando as diferentes vias envolvidas com o estado senescente, um modelo consistindo de uma rede regulatória para a execução da parada permanente do ciclo celular envolve cinco vias distintas: duas vias envolvendo CHK1 e CHK2 estão relacionadas com a rápida sinalização da parada e as outras três estão relacionadas com a manutenção da parada do ciclo celular através da regulação de p53 e p16 por p38 conforme a Figura 24. Dessa forma, pode-se supor que o DNA telomérico é organizado em fita dupla e fita simples para manter a integridade da célula através da estrutura *t-loop* em células mitóticas e a integridade da célula senescente através da amplificação da sinalização de danos no DNA a partir da ativação de várias vias de sinalização da parada na fase  $G_1$  do ciclo celular.

A parada do ciclo celular em células normais com desgaste dos telômeros é dividida em dois momentos relacionados a uma rápida sinalização da parada do ciclo, seguido de uma segunda resposta para a manutenção da parada na fase G1 do ciclo celular. A parada inicial ocorre através das vias ATR-CHK1-Cdc25A e ATM-CHK2-Cdc25A, que por sua vez regulam a inibição das CDKs necessárias para a progressão do ciclo para a fase S (WILHELM *et al.*, 2008; SANCAR *et al.*, 2004; KUILMAN *et al.*, 2010).

Recentes trabalhos descrevem a dinâmica de p53 e a relação desta dinâmica com o destino da célula. A dinâmica de p53 depende do seu nível de expressão e de modificações pós-traducionais, de maneira que a ativação de p53 ocorre de forma progressiva, ou seja, p53 é ativado parcialmente para induzir a parada do ciclo celular, enquanto o seu nível varia em uma série de pulsos dependentes de ATM. Se os danos no DNA não podem ser reparados após um número crítico de pulsos, então ocorre a ativação total de p53 para induzir a apoptose (ZHANG *et al.*, 2011). Se por outro lado, o número o nível de expressão for mantido ou o número de pulsos de expressão aumentar significativamente, então p53 é responsável pela ativação de substratos envolvidos na indução do estado senescente (PURVIS *et al.*, 2012). Contudo o controle da transição G1/S pode resultar da ativação da via envolvendo p53, ativação da via envolvendo p16<sup>INK4a</sup> ou a parada do ciclo celular depende de ambas. Além disso, o escape dos telômeros em células humanas é responsável pela indução de p16<sup>INK4a</sup> e senescência até mesmo na ausência de p53, indicando que há uma certa independência do estado de senescência replicativa em relação á p53 (VANDENBERK *et al.*, 2011). Além das quinases tradicionais CHK1 e CHK2, uma terceira quinase MK2 forma um complexo com p38MAPK com o objetivo de sinalizar danos no DNA (REINHARDT *et al.*, 2009). Em particular, p38MAPK é um importante regulador de senescência replicativa em fibroblastos humanos e resultados experimentais obtidos com a inativação desta quinase mostram uma reduzida entrada destas células no estado senescente, incluindo p38MAPK como um regulador negativo da proliferação celular em vários tipos de células incluindo fibroblastos (HAN *et al.*, 2007; WAGNER *et al.*, 2009).

A descrição das 5 vias no que se refere ao controle da parada do ciclo celular no contexto senescente de acordo com a Figura 21 estão indicadas no Apêndice 1.



#### 4.5 Dinâmica da rede de senescência replicativa

Senescência replicativa é um dos muitos mecanismos utilizados pela célula para restringir a sua proliferação e principalmente o acúmulo de mutações que estão relacionadas ao desenvolvimento do câncer. A relação entre senescência replicativa, desgaste dos telômeros, envelhecimento e câncer é evidenciada em uma variedade de tecidos humanos (COLLADO *et al.*, 2007). A necessidade de regeneração dos tecidos resulta no acúmulo de células senescentes, que por sua vez, impede a renovação das células, reduz a funcionalidade do tecido e contribui desta forma com o envelhecimento (KONG *et al.*, 2011). O estado senescente pode contribuir para o envelhecimento, mas a regulação da parada permanente em detrimento do câncer é um mecanismo quase perfeito para garantir a integridade dos tecidos. A estabilidade de uma célula no estado de senescência replicativa depende da persistente manutenção dos mecanismos de sinalização de parada do ciclo celular originados a partir de danos no DNA. A habilidade de uma célula de escapar da parada permanente geralmente garante a sua imortalidade, visto que 80% - 90% dos carcinomas humanos estão relacionados à reativação da telomerase para garantir a extensão dos telômeros e a inibição dos mecanismos de sinalização de danos no DNA (KONG *et al.*, 2011).

Tendo em vista a relação entre senescência, envelhecimento e câncer, a topologia da rede descrita através de módulos e várias vias de ativação da parada em G1 conforme a Figura 16 é caracterizada por mecanismos alternativos para garantir que uma flutuação da ativação de elementos da rede não cause um prejuízo para célula através do recomeço do ciclo celular.

Essa topologia é descrita também experimentalmente através de fibroblastos humanos, onde diferentes situações são descritas:

1. A inativação de ambos p53 e pRb é necessária para prevenir a senescência replicativa (BEM-PORATH *et al.*, 2005; KONG *et al.*, 2011);
2. A inativação de p21 é suficiente para prevenir a senescência (BEM-PORATH *et al.*, 2005);
3. p16<sup>INK4</sup> tem sua expressão aumentada durante a senescência replicativa, mas o aumento da expressão de p16<sup>INK4</sup> ocorre após a entrada da célula no estado senescente (KONG *et al.*, 2011);

4. PML tem expressão aumentada e está associado a ativação das vias p16/p16<sup>INK4</sup>/pRb e p53/pRb (CAINO, 2009) ;
5. pRb pode ser inativado por p21 ou por p16 senescência (BEM-PORATH *et al.*, 2005);
6. A inativação de p38 atrasa o início de senescência replicativa (HAN *et al.*, 2007);

Conforme os diferentes resultados obtidos pode-se supor uma resposta específica de cada célula através da combinação de diferentes elementos da rede de sinalização, incluindo a rápida sinalização da parada através de CHK1, CHK2 e MK2 com a regulação de CDC45, seguida da sinalização da permanente parada através de p16 e p21 cuja ativação ocorre após a entrada no estado senescente para regular a transcrição de genes dependentes de E2F. Do ponto de vista funcional, em condições normais a ativação de todas as vias de sinalização devem estar ativadas através da amplificação do sinal por ATM e ATR, o que é evidenciado quando a senescência replicativa não ocorre na fase G1, mas sim na fase G2 do ciclo celular. Células com perda funcional de ATM ativam o ponto de checagem em G2 através de ATR/CHK1 ( HERBIG *et al.*, 2006), o que reforça o envolvimento de ATM e 53BP1 na amplificação da sinalização da parada do ciclo celular em G1 e a utilização de diferentes meios para impedir a continuidade do ciclo celular.

As interações entre cada par de elementos de redes de proteínas envolvem de um modo geral diferentes mecanismos como a transcrição de genes específicos e as modificações pós-traducionais. Estas modificações incluindo fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, acetilação e metilação são coordenadas e dependentes de cascatas de sinalização. Nesse sentido, novamente a senescência replicativa deve ser caracterizada por uma dinâmica onde as diferentes vias devem ser descritas a partir de modificações pós-traducionais extremamente coordenadas e dinâmicas, mas principalmente independentes umas das outras para garantir a permanente e eficiente sinalização da parada do ciclo celular.

## 4.6 Conclusões

A modelagem da rede regulatória de senescência replicativa permite identificar os principais marcadores do estado senescente e de que maneira estes marcadores estão conectados para induzir a parada permanente do ciclo celular. Neste modelo o objetivo é também destacar a importância da sinalização do encurtamento dos telômeros e a organização desta sinalização em três etapas: criação do sinal, amplificação do sinal e execução do sinal. A rede proposta na Figura 22 unifica estes três estágios e identifica, além dos principais marcadores de senescência replicativa, os inibidores de reparo de quebras duplas (NHEJ) e os inibidores de apoptose. Em destaque em cada uma destas três etapas está a utilização de diferentes vias, enquanto que TRF2 e POT1 podem desencadear a criação do sinal do encurtamento dos telômeros, na amplificação do sinal ATM e ATR são fundamentais para a ativação de CHK2, CHK1 e p53 de uma forma dependente de 53BP1, dando início à execução do sinal para a parada do ciclo celular através de diferentes vias. O estado de senescência é dependente da permanente sinalização de p53, contudo a mudança no nível de expressão em relação ao número de pulsos de expressão de p53 que ocorre quando danos no DNA podem ser reparados, também é acompanhada por um aumento da expressão de p21 e PML, dois dos mais importantes marcadores de senescência replicativa (PURVIS, 2012), além de envolver a regulação de outros marcadores incluindo p16<sup>INK4a</sup> (YAMAKOSHI *et al.*, 2009) e provavelmente outros substratos de p53, de maneira que a dinâmica entre diferentes as vias de parada do ciclo celular devem estar relacionadas para garantir o estado senescente quando há um descontrole em vias específicas. Portanto, a integridade de uma célula após a entrada no estado senescente é extremamente dependente da manutenção da sinalização de danos no DNA e nesse sentido, o envolvimento de diferentes vias para regular a parada do ciclo celular é o melhor meio de se evitar o escape do estado senescente, a entrada da célula no estágio de *crisis* e muitas doenças incluindo o câncer. Com a ampliação dos mecanismos regulatórios da rede de senescência replicativa, pretende-se trabalhar a modelagem da rede a partir de redes booleanas e equações diferenciais de maneira que simulações com estas modelagens podem contribuir para uma compreensão das propriedades essenciais para a manutenção da senescência como mecanismo supressor de tumor.

## 5. MODELAGEM DA REDE SASP: IMPLICAÇÕES NAS TRANSIÇÕES DO CÓLON HUMANO.

### 5.1 Introdução

As células mitóticas como fibroblastos, células endoteliais, células musculares, entre outras são caracterizadas pela sua habilidade de se dividirem quando estimuladas para proliferar, geralmente a partir do estado quiescente (BURTON, 2009). O controle da divisão celular destas células em diferentes organismos é fundamental para a manutenção da integridade da célula e de sua fisiologia. Quando uma célula alcança o seu limite de replicação (limite de *Hayflick*), o principal mecanismo para garantir a integridade do *DNA* e da célula é a sinalização da parada permanente do ciclo celular através da ativação de mecanismos envolvendo *DDR* (*DNA damage response*) a partir da identificação de danos no *DNA* presentes no *DNA* telomérico, cuja estrutura normal de proteção denominada *t-loop* foi perdida devido ao desgaste dos telômeros que ocorre a cada divisão celular (JIANG *et al.*, 2007). O estado de parada permanente do ciclo celular denominado senescência replicativa, dependente da rede regulatória indicada na Figura 22, é observado em tecidos *in vivo* de humanos (colon, pulmão, pancreas, próstata entre outros) (COPPÉ *et al.*, 2010; D'ADDA DI FAGAGNA *et al.*, 2008; GYRD-HANSEN *et al.*, 2010) e diferentes tipos de células incluindo células endoteliais, epiteliais e células do estroma (DAVALOS *et al.*, 2010; COPPÉ *et al.*, 2010). Além disso, vários tecidos humanos são caracterizados por células com significativo encurtamento dos telômeros, mas em um número muito maior quando comparado com o número de células senescentes, sugerindo que o encurtamento dos telômeros não é suficiente para induzir um acúmulo maior de células senescentes nos tecidos (MIYAMOTO, 2011), mas também são necessários *DDR* presentes em mais de um telômero (KAUL *et al.*, 2011).

A entrada de uma célula no estado senescente ocorre a partir de diferentes estímulos incluindo danos no *DNA*, encurtamento ou disfunção dos telômeros, atividade de oncogenes, estresse oxidativo e pela super expressão de inibidores do ciclo celular incluindo p16 e p21 (VERGEL, *et al.*, 2011; COPPÉ *et al.*, 2010). A

entrada da célula no estado senescente é acompanhada pelo surgimento de alterações na fisiologia celular, ambos senescência replicativa e a senescência prematura induzida por estresse (SIPS) se destacam pela presença de diversos marcadores do estado senescente *in vivo* (SIKORA *et al.*, 2011; COPPÉ *et al.*, 2010). Um dos principais marcadores e reguladores do estado senescente chamado SASP (fenótipo secretor associado ao estado senescente) é dependente de danos no DNA, portanto o reconhecimento do desgaste dos telômeros como DNA DSB (SIKORA *et al.*, 2011; KAUL *et al.*, 2011; VON ZGLINICKI *et al.*, 2005) indica a presença de SASP e a secreção de interleucinas (fatores de crescimento e diferenciação que estimulam componentes celulares do sistema imune), citocinas (fatores regulatórios do sistema imune incluindo interferons e interleucinas) e fatores de crescimento que podem ter efeitos benéficos ou danosos sobre a própria célula (efeito autócrino) e também sobre células vizinhas (efeito parácrino) (DAVALOS *et al.*, 2010; COPPÉ *et al.*, 2010; CAMPISI *et al.*, 2011).

Enquanto que os efeitos parácrinos do SASP promovem principalmente a proliferação de células do tecido epitelial e de células do estroma (DAVALOS *et al.*, 2010; COPPÉ *et al.*, 2010; REN *et al.*, 2009; FREUND *et al.*, 2010), a sinalização autócrina em células senescentes é importante para a comunicação com o sistema imune e para reforçar a parada permanente de células senescentes através da regulação de p53 e pRb (REN *et al.*, 2009; NOACK-CHUAIRE *et al.*, 2010; FREUND *et al.*, 2010; RODIER *et al.*, 2009). O fenótipo secretor de células sofrendo senescência replicativa ou senescência induzida por oncogenes (OIS – senescência induzida por oncogenes) é mantido através de mudanças na expressão gênica e por danos persistentes no DNA responsáveis pelo aumento do número de fatores secretados pela célula e envolvidos em sinalização intracelular (DAVALOS *et al.*, 2010; RODIER *et al.*, 2009).

O SASP é um dos principais responsáveis por processos de envelhecimento e câncer (CAMPISI *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2011; NOACK-CHUAIRE *et al.*, 2010), além de contribuir para o surgimento de diversos tipos de patologias humanas como obesidade, diabetes, aterosclerose, osteoartrite e Alzheimer (SIKORA *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2009; CARNES *et al.*, 2008). A inflamação relacionada com senescência depende também do tipo de tecido em humanos, enquanto que o aumento da inflamação ocorre em fibroblastos da derme, em células endoteliais vasculares no estado de senescência replicativa nenhuma inflamação é observada

(REN *et al.*, 2009). A transformação de células epiteliais normais é um dos principais fatores responsáveis pelo surgimento de carcinomas e mutações envolvendo genes supressores de tumor, oncogenes e genes envolvidos no reparo de danos no DNA que ocorrem durante a replicação são os principais responsáveis por estas transformações (VERBEKE *et al.*, 2011; SHAN *et al.*, 2010). No entanto, mutações pontuais nestes genes não são suficientes para o desenvolvimento de um carcinoma, alterações em células do estroma incluindo fibroblastos, células do sistema imune e células que revestem os vasos sanguíneos e linfáticos são também necessárias (SHAN *et al.*, 2010; TISTY *et al.*, 2006).

Inflamação é também indispensável para a progressão tumoral através da promoção de sobrevivência, proliferação e migração. Além das células do sistema imune incluindo granulócitos, macrófagos, células NK e mastócitos que são importantes devido à liberação de mediadores solúveis, fibroblastos senescentes também participam dos processos inflamatórios através do SASP para promover o desenvolvimento tumoral de células epiteliais neoplásicas (CAMPISI *et al.*, 2011; SHAN *et al.*, 2010; TISTY *et al.*, 2006; COUSSENS *et al.*, 2002; ALLAVENA *et al.*, 2008). Dentre os fatores secretados por células no estado de senescência replicativa, destacam-se as interleucinas IL-6 e IL-8 na regulação tanto do estado senescente quanto na promoção tumoral, de modo que ambos são secretados na presença de danos persistentes no DNA e dependem principalmente da ativação de ATM, NBS1 e CHK2 (RODIER *et al.*, 2009; FUMAGALLI *et al.*, 2009).

Resultados experimentais envolvendo o cólon em humanos indicam que na transição de adenoma colorretal para câncer colorretal (CRC), IL-8 aumenta gradualmente (CUI *et al.*, 2009; ACOSTA *et al.*, 2009). Em adenoma do colon a expressão de IL-8 é observada nas criptas, cavidades na parede do intestino na qual ocorre a proliferação e a diferenciação inicial de células-tronco, indicando que a expressão desta interleucina e do receptor CXCR2 podem contribuir para reforçar a parada permanente das células senescentes através de p53 (ACOSTA *et al.*, 2009), mas na promoção tumoral do câncer colorretal, IL-8 é expresso também por células do estroma para promover o crescimento tumoral e o crescimento de vasos vasculares necessários para o fornecimento de oxigênio e nutrientes essenciais para a manutenção e progressão do tumor (CUI *et al.*, 2009; VERNEKE *et al.*, 2011). A expressão de IL-8 depende principalmente de NF- $\kappa$ B que está diretamente

envolvido na progressão de CRC pela regulação da expressão de IL-8. Em adenomas do cólon o aumento da expressão de IL-8 depende principalmente de TNF- $\alpha$  (VERNEKE *et al.*, 2011), mas considerando a regulação de TNF- $\alpha$  por NF- $\kappa$ B a partir de DSB presentes no DNA (BITON *et al.*, 2011), a presença de células senescentes em adenoma do colon com diferentes marcadores com funções de inibição do crescimento (SAAB, 2011) e o encurtamento dos telômeros caracterizando a transição adenoma – carcinoma em CRC (PLENTZ *et al.* 2003), podemos concluir que senescência replicativa e o SASP são os principais responsáveis pelas transições de adenoma para câncer.

CRC tem diferentes origens incluindo instabilidade genética devido a mutações no gene APC, inflamação a partir de Colite Ulcerosa (UC) e doença de Crohn (CD) e por último pode ter origem esporádica (AUBERT *et al.*, 2008; KRAUS *et al.*, 2009). Particularmente as doenças inflamatórias do intestino (IBD) incluindo UC e DC aumentam os riscos de CRC principalmente devido à atividade de NF- $\kappa$ B na promoção da inflamação (KRAUS *et al.*, 2009), além de acelerar o encurtamento dos telômeros, causar danos no DNA, promover o estado senescente (RISQUES *et al.*, 2008; RISQUES *et al.*, 2011) e desregular IL-8 para promover inflamação em IBD (MAZZUCHELLI *et al.*, 1994; REDDY *et al.*, 2007). Além disso, enquanto que em câncer esporádico do cólon a perda de função de APC é mais frequente, em câncer associado à Colite Ulcerativa mutações do gene TP53 são mais frequentes e ocorrem cedo e são geralmente detectadas na mucosa com displasia ainda indefinida (BAUMGART, 2008).

Como o nível mRNA de IL-8 aparece elevado em adenomas do colon quando comparado com a inflamação crônica da mucosa em IBD (CUI *et al.*, 2009), podemos supor um gradual aumento da inflamação nas transições:

Normal → inflamação → adenoma → câncer

diretamente dependente do estado de senescência replicativa e do SASP cuja regulação depende principalmente de NF- $\kappa$ B. Resultados recentes indicam a regulação de NF- $\kappa$ B por diferentes vias envolvendo diferentes marcadores do estado senescente envolvidos principalmente com insultos genotóxicos (SAILMINEN *et al.*, 2012). Contudo a regulação de NF- $\kappa$ B a partir do estado de senescência replicativa nas transições do cólon acima, depende também da ativação de diferentes vias contendo importantes reguladores do SASP, incluindo TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , p53 e RIG-I

(SALMINEN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; BITON *et al.*, 2011). O objetivo neste trabalho é primeiramente revisar os principais mecanismos envolvidos com senescência replicativa e que estão também relacionados com o SASP. Além disso, a partir desta rede proposta será analisada a dinâmica de 4 vias distintas contendo separadamente TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , p53 e RIG-I na regulação de NF- $\kappa$ B através da sequência normal, inflamação, adenoma e câncer no cólon para identificar os principais mecanismos responsáveis por cada uma das transições.

## 5.2 Rede SASP

A senescência replicativa e a ativação do SASP estão relacionadas de forma que danos persistentes no DNA são necessários para a formação de ambos. A partir de uma revisão de literatura, a identificação das interações entre os principais reguladores de ambos os estados envolvem, não somente o fenótipo secretor, mas também os mecanismos de regulação da parada do ciclo celular, apoptose, extensão dos telômeros e metilação, de modo que o principal efeito benéfico do SASP é a manutenção da senescência celular como um estado supressor de tumor (REN *et al.*, 2009; EVAN *et al.*, 2009).

Nesse sentido, a partir de informações obtidas de fibroblastos humanos e células Hela é possível identificar a rede regulatória e os principais mecanismos de ativação do fenótipo secretor em células senescentes. O estado de senescência replicativa em fibroblastos humanos está relacionado com a formação de uma resposta à danos no DNA que ocorre nos telômeros (TIF – resposta aos danos no DNA nos telômeros) e envolve ATM, ATR,  $\gamma$ -H2AX, 53BP1 e p53 para coordenar a parada permanente do ciclo celular (KAUL *et al.*, 2011; CESARE *et al.*, 2009), de modo que aproximadamente 5 TIFs (DDR + Telomeres) estão presentes em células replicativas senescentes de uma maneira dependente de p53 (KAUL *et al.*, 2011), o que sugere uma persistente sinalização de danos no DNA, que estabelecem as condições necessários para a ativação do fenótipo secretor depende principalmente de NF- $\kappa$ B. O SASP em fibroblastos humanos também é dependente de segmentos no DNA com alterações na cromatina para reforçar o estado senescente (DNA-SCARS) (COPPÉ *et al.*, 2010; FUMAGALLI *et al.*, 2009; RODIER *et al.*, 2010).



A revisão da literatura permitiu a construção da rede regulatória do SASP relacionado com senescência replicativa conforme a Figura 25. Esta rede envolvendo quinases, fosfatases, fatores de transcrição entre outros, contém 47 nós indicados em elipses amarelas e 79 arestas indicando as interações entre os nós, todas de alguma forma relacionadas com pelo menos uma das elipses verdes representando apoptose, desgaste dos telômeros (TIF), parada permanente do ciclo celular representada pela elipse senescência replicativa, inflamação e metilação. A regulação entre os elementos da rede é representada por dois tipos diferentes de setas: setas normais e setas com barras nas extremidades representando ativação ou inibição na interação entre as proteínas da rede respectivamente. Diferentes segmentos que se conectam a um único segmento representando a interação entre nós da rede, indicam que a regulação do nó de chegada é independente do nó de saída, ou seja, a ativação do nó de chegada ocorre a partir de qualquer um dos seus reguladores conforme indicado na Figura 25. A descrição das interações pode ser encontrada no Apêndice 2.



inflamados, adenomas e adenocarcinomas do cólon, juntamente com a colaboração de diferentes tipos de células e do nível de inflamação presentes no tecido (EVAN *et al.*, 2009; VERBEKE *et al.*, 2011). Enquanto que células epiteliais senescentes já estão presentes em tecidos inflamados e adenomas do cólon, atuando como supressores de tumor nestes estágios, durante a evolução displásica esta função é perdida e o estado senescente de células epiteliais passa a ter funções na progressão tumoral, incluindo proliferação celular, angiogênese e metástase principalmente através de seus efeitos parácrinos (CAMPISI *et al.*, 2011; RODIER *et al.*, 2011; RISQUES *et al.*, 2008; RISQUES *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2009). Dentre os principais fatores resultantes do SASP em células epiteliais, IL-8 é o principal marcador presente nas transições entre os diferentes estados do cólon, principalmente pela mediação das interações entre células tumorais e células do estroma. Esta interleucina tem a expressão aumentada em células cancerosas e em células do estroma incluindo células endoteliais, macrófagos e neutrófilos além dos fibroblastos. Contudo a expressão de IL-8 parece ser diferenciada considerando que outras quimiocinas (família especializada de citocinas que funcionam como potentes mediadores ou reguladores da inflamação) não são expressas em todos estes tipos de células e por isso, IL-8 é o principal marcador nas transições:

Normal → inflamação → adenoma → câncer

do cólon com efeitos tanto benéficos quanto prejudiciais para o tecido (CUI *et al.*, 2009; VERBEKE *et al.*, 2011).

Pacientes com doenças inflamatórias do intestino tem um risco aumentado de desenvolver câncer colorretal a partir de Colite Ulcerosa (UC) e doença de Crohn (DC) e os principais tipos de instabilidade genômica envolvidas com estas doenças inflamatórias do intestino e que contribuem para carcinogênese são instabilidade cromossomal (CIN), instabilidade de microssatélite (MSI) correspondendo a 85% e 15% dos casos respectivamente. Hipermetilação também é responsável pelo aumento de alterações genéticas em câncer colorretal associado à colite ulcerosa (BAUMGART, 2008; TRIANTAFILLIDIS *et al.*, 2009). Instabilidade cromossomal e metilação estão relacionados com o estado senescente, contudo a relação de senescência com instabilidade de microssatélites não está muito clara. Desse modo, podemos considerar que a instabilidade do estado senescente pode contribuir de alguma maneira, para a formação de CAC (câncer colorretal associado a UC).

Instabilidade cromossomal, que em UC resulta em aneuploidia, está relacionada com o encurtamento dos telômeros e com a alta frequência de pontes de anáfase (O'SULLIVAN *et al.*, 2002).

A senescência é também responsável por instabilidade cromossomal, ou seja, células que escapam do estado senescente através da inativação das vias p53 e pRb voltam a replicar até que os telômeros tornam-se criticamente curtos e a célula entra no estágio de *crisis*, um estado caracterizado pelo encurtamento dos telômeros, fusões entre cromossomos e pontes de anáfase, de modo que dessa forma, células podem escapar do estágio de *crisis* e alcançar a imortalidade (O'SULLIVAN *et al.*, 2002). Na transição adenoma-carcinoma em IBD, perda de funções de p53 e APC são muito comuns. Em câncer de cólon esporádico a perda de função de APC é o principal responsável pela transição maligna e corresponde a 85% dos casos, em CAC a perda de função de p53 ocorre na transição adenoma carcinoma é a principal causa, enquanto que a perda de função de APC é menos freqüente (TRANTAFILLIDIS *et al.*, 2009). Citocinas e fatores de crescimento liberados durante a inflamação podem influenciar de forma negativa células e tecidos, estimulando o desenvolvimento e o crescimento de CAC. Os mecanismos moleculares responsáveis por inflamações em IBD (doença inflamatória do intestino) envolvem principalmente TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B, relacionados tanto com p53 quanto a APC, de modo que um balanço entre o nível destas citocinas é decisivo em carcinomas associados com inflamação do cólon (HARTNETT *et al.*, 2012 ;TRANTAFILLIDIS *et al.*, 2009). Inflamação e citocinas também são responsáveis por metilações aberrantes do DNA em IBD, principais causas de mudanças epigenéticas e transformações malignas (HARTNETT *et al.*, 2012). Hipermetilações aberrantes em câncer ocorrem nas ilhas CpG, que são normalmente não metiladas em células somáticas normais, genes envolvidos com a regulação do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e senescência são hipermetilados e silenciados em quase todos os tipos de tumores, de modo que hipermetilações aberrantes são também detectadas em lesões precursoras do câncer de cólon (ROBERTSON, 2005). Inflamações crônicas em UC são responsáveis pela metilação do DNA através da ativação das metiltransferases DNMT1 and DNMT3b (SAITO *et al.*, 2011). A expressão de DNMT1 aumenta significativamente em carcinomas e se torna estabilizada por IL-6 e NF- $\kappa$ B em CAC (HARTNETT *et al.*, 2012), quando comparado com lesões benignas, enquanto que nenhuma diferença pode ser notada para

DNMT3B quando são feitas as mesmas comparações (SCHMIDT *et al.*, 2007). Marcadores de senescência são hipermetilados em pacientes com UC, particularmente a metilação de p14<sup>ARF</sup> e p16<sup>INK4a</sup> são prejudiciais para a célula (HARTNETT *et al.*, 2012), considerando o envolvimento de ambos no controle do estado senescente e também no controle do ciclo celular. Além de p14<sup>ARF</sup> e p16<sup>INK4a</sup>, resultados recentes indicam que o gene anti-senescente Klotho, cuja expressão ocorre nos intestinos (WANG *et al.*, 2009) e cujo nível de expressão é reduzido em carcinoma colorretal quando comparado com tecidos adjacentes não tumorais, de modo que a metilação de Klotho foi detectado em tumores primários, quando comparado com o tecido normal do colon (PAN *et al.*, 2011).

**Tabela 5:** Principais marcadores de células epiteliais e tumorais presentes na regulação das transições do Cólon e que estão de alguma forma relacionadas com senescência replicativa.

GENE	INFLAM.	REF.	ADENO.	REF.	CARC.	REF.
TIF	X	RISQUES <i>et al.</i> , 2011	X	PLENTZ <i>et al.</i> , 2003		
IL-8	X	CUI <i>et al.</i> , 2009	X	CUI <i>et al.</i> , 2009	X	CUI <i>et al.</i> , 2009
IL-6	X	BERNARDO <i>et al.</i> , 2012	X	KIM <i>et al.</i> , 2008		
p16			X	RISQUES <i>et al.</i> , 2011		
p53	X	HUSSAIN <i>et al.</i> , 2000	X	FUZITA <i>et al.</i> , 2009		
NF- $\kappa$ B	X	WANG <i>et al.</i> , 2009			X	WANG <i>et al.</i> , 2009
TGF- $\beta$	X	FEAGINS, 2010	X		X	GRADY, 2007
WIP1					X	PARK <i>et al.</i> , 2012
p38	X	WAETZIG <i>et al.</i> , 2002	X	LEE <i>et al.</i> , 200	X	WAGNER <i>et al.</i> , 2009
TAK1					X	NISHIMURA <i>et al.</i> , 2009
p21	X	WONG <i>et al.</i> , 2003	X	DOGLION <i>et al.</i> , 1996	X	ABBAS, 2009
TNF- $\alpha$	X	WAETZIG, 2002	X	KIM <i>et al.</i> , 2008		
CXCR 2					X	VARNEY <i>et al.</i> , 2011
COX2	X	ROMERO <i>et al.</i> , 2008	X	ELDER <i>et al.</i> , 2002	X	AGGARWAL <i>et al.</i> , 2006
hTERT					X	RAMPAZZO, <i>et al.</i> , 2010
RIG-1	X	LI <i>et al.</i> , 2011				

A rede proposta indicada na Figura 25 foi obtida a partir de resultados obtidos com fibroblastos humanos pela quantidade de resultados disponíveis para este tipo de célula na literatura envolvendo a expressão de IL-6 e IL-8, no entanto, conforme

as evidências descritas na Tabela 5, podemos supor esta rede regulatória envolvida no também no SASP de células epiteliais do cólon e verificar não somente a dinâmica de IL-8 nas transições dos diferentes fenótipos de tecido, mas também a dinâmica envolvendo toda a rede regulatória em termos de ativação e inibição de diferentes vias quase todas envolvidas na ativação de NF- $\kappa$ B.

#### 5.4 Resultados

A partir da rede do SASP e de quatro vias destacadas na regulação de NF- $\kappa$ B conforme a Figura 25, a atividade e a diversidade de cada via indicam uma dinâmica com alterações nas transições:

Normal → inflamação → adenoma → câncer

a partir da colaboração de genes importantes na regulação de cada via e sua relação na supressão ou promoção tumoral. Dados relacionados com cada uma destas amostras do cólon foram selecionadas do GEO (Gene Expression Omnibus database) através da série GSE4183, de modo que no estudo das transições, são considerados como controle e experimento a sequência ordenada acima. Neste série foram tomados:

- 8 amostras do cólon normal;
- 15 amostras de adenoma do colon;
- 15 amostras de câncer colorretal;
- 15 amostras de IBD (doenças inflamatórias do intestino).

e todas as amostras foram normalizadas usando RMA (*Robust Multichip Average*) (IRIZARRY, 2003).

Para confirmar a ativação da senescência replicativa em inflamação, adenoma e câncer do cólon, uma via de senescência replicativa foi testada, contendo os principais marcadores do desgaste dos telômeros, marcadores de sinalização de DSB (quebra de fita dupla) no DNA e também os principais reguladores do ponto de checagem na fase G1 do ciclo celular. A via contendo 56 genes se encontra em Métodos 5.7.2 e também pode ser obtida a partir do banco de dados Ontocancro ([www.ontocancro.inf.ufsm.br](http://www.ontocancro.inf.ufsm.br)). Utilizando o software ViaComplex (CASTRO *et al.*, 20090)(Ver Métodos 5.7.1) foi possível identificar a

ativação da senescência replicativa no tecido inflamado do cólon, adenoma do cólon e câncer do cólon, indicando a importância do estado senescente tanto no controle quanto na promoção da progressão tumoral (CAMPISI *et al.*, 2011; RODIER *et al.*, 2011; RISQUES *et al.*, 2011; FUJITA *et al.*, 2009). As vias analisadas com funções na regulação de NF- $\kappa$ B indiretamente indicadas na Figura 26, foram tomadas com base em 4 genes com importantes funções na regulação da inflamação no estado senescente, a saber, TNF- $\alpha$ , RIG-I, TP53 e TGF- $\beta$  contendo 15, 14, 17 e 14 genes respectivamente e uma via contendo os genes das 4 vias, conforme descrição dada na Seção 5.7.2 em Métodos. As vias serão denominadas simplesmente por TNF, RIGI, TP53 e TGF, enquanto a via contendo todos genes será chamada de SASP. Todos as quatro vias de alguma forma são os principais reguladores do SASP e de NF- $\kappa$ B, mas enquanto as vias TNF- $\alpha$ , RIGI e TP53 são dependentes principalmente de ATM para a ativação da atividade transcricional de NF- $\kappa$ B (SALMINEN *et al.*, 2011; BITON *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011), a via TGF- $\beta$  é independente de ATM e sua regulação ocorre de forma autócrina e parácrina para induzir a inflamação a partir do estado senescente (GRADY, 2007; KEMIK *et al.*, 2011).

SASP PATHWAYS											
NORMAL X INFLAMMATION			INFLAMMATION X ADENOMA			ADENOMA X CANCER			NORMAL X CANCER		
PATHWAY	ACT	DIV	PATHWAY	ACT	DIV	PATHWAY	ACT	DIV	PATHWAY	ACT	DIV
TNF	+	0	TNF	0	0	TNF	+	0	TNF	+	0
RIG1	+	0	RIG1	0	0	RIG1	+	+	RIG1	+	0
P53	+	0	P53	0	0	P53	0	0	P53	+	+
TGF	+	0	TGF	0	0	TGF	+	0	TGF	+	+
SASP	+	0	SASP	0	0	SASP	+	+	SASP	+	+

**Figura 26:** Análise de atividade e diversidade das vias envolvidas com a regulação do SASP nas transições do cólon. Na figura 2, o símbolo + indica aumento de atividade da via e 0 indica que a via não está alterada na comparação entre experimento e controle. ACT indica a atividade das vias e DIV indica a diversidade das vias.

Na Figura 26 são comparados os resultados das análises das vias através do ViaComplex. Destacam-se a ativação das quatro vias em tecidos inflamados do cólon quando comparados ao tecido normal, incluindo a ativação da via SASP. Em

tecidos inflamados do cólon NF- $\kappa$ B é o principal regulador de inflamação crônica, uma das principais causas de câncer de colon (KRAUS *et al.*, 2009), de modo que a ativação de todas as vias a partir do estado senescente, reforça os processos inflamatórios, contribui para a formação de danos no DNA e acelera o encurtamento dos telômeros, favorecendo desta forma a evolução de um baixo grau para um alto grau de displasia (RISQUES *et al.*, 2011). Na análise do adenoma do cólon, tomamos como controle o tecido inflamado e não encontramos alterações significativas nas vias, o que indica que o grau de inflamação permanece o mesmo ou até mesmo aumenta sensivelmente. Este comportamento das vias é também demonstrado pela dinâmica de IL-8 nas transições de inflamação para adenoma em doenças inflamatórias do intestino (IBD), onde o nível de IL-8 mRNA é elevado quando comparado ao tecido inflamado do cólon (CUI *et al.*, 2009) o que sugere que a rede de inflamação relacionada com o estado senescente é necessária para a formação de um adenoma. Tomando agora como controle o adenoma do cólon, na transição para câncer identificamos novamente um aumento da atividade das vias do SASP, com exceção da via P53 que agora não apresenta alteração de atividade e diversidade. Diferentemente da transição de inflamação para adenoma, a diversidade das vias RIG-I e SASP aparecem aumentadas indicando que genes específicos destas vias podem ser os principais responsáveis pelo início formação do carcinoma do cólon. Finalmente comparando câncer com o tecido normal, diferente da análise de adenoma x câncer, os resultados mostram alterações de atividade para todas as vias e alteração de diversidade para as vias reguladas por P53, TGF- $\beta$  e SASP. Quando comparados câncer e adenoma, as vias P53 e TGF- $\beta$  não apresentam alteração de diversidade, o que sugere a necessidade destas vias para a transição adenoma x câncer, no entanto, as alterações de diversidade destas vias nas comparações normal x câncer confirmam a dependência destas vias para a formação do carcinoma e destacam a necessidade de atividade de genes específicos.

Para identificar os genes responsáveis pelas alterações de diversidade que ocorrem nas transições, decidimos fazer uma análise de expressão diferencial de genes a partir do quociente definido entre o nível de expressão do gene no tecido controle e o nível de expressão do gene no tecido experimento. Para uma análise mais criteriosa das alterações das vias, avaliamos o grau de expressão dos genes



nas vias separadamente e consideramos os 5 genes mais expressos e os 5 genes menos expressos em cada uma das 4 vias conforme indicado na Figura 27.

Diversas observações podem ser feitas a respeito da dinâmica dos genes nas transições, contudo é muito evidente o aumento de expressão de IL-6, IL-8 e IL1A, os principais responsáveis pela inflamação associada ao estado senescente (ORJALO *et al.*, 2009).

TOP EXPRESSED GENES																
PATHWAYS	NORMAL X INFLAMMATION				INFLAMMATION x ADENOMA				ADENOMA X CANCER				NORMAL X CANCER			
	TNF	RIGI	P53	TGF	TNF	RIGI	P53	TGF	TNF	RIGI	P53	TGF	TNF	RIGI	P53	TGF
TOP FIVE UPREGULATED GENES																
IL-6	IL-6	PTGS2	IL-6	RAD50	Tp53	Tp53	MYC	IL-6	IL-6	IL-6	IL-6	IL-6	IL-6	PTGS2	IL-6	
IL-8	IL-8	IL-6	IL-8	CHECK2	MYC	MYC	DNMT3B	IL-8	KL	PTGS2	IL-8	IL-8	IL-8	IL-6	IL-8	
IL1A	WNT2	IL-8	IL1A	MRE11A	RAD50	RAD50	MAP3K7	TNFRS1A	IL-8	IL-8	TGFB1	IL1A	WNT2	IL-8	IL1A	
TNF	NBN	IL1A	TGFB1	RELA	GSK3B	BAX	Sp1	IL1A	LRIG1	MAPK14	MAPK14	CHECK2	NBN	IL1A	MAPK14	
NBN	ATM	NBN	NFKBIA	NBN	MRE11A	GSK3B	MAPK14	MAPK10	WNT2	IL1A	IL1A	NBN	RAD50	NBN	MYC	
TOP FIVE DOWNREGULATED GENES																
RAD50	APC	RAD50	CEBPA	IL-8	KL	IL-8	IL-8	CHECK2	Tp53	Tp53	MYC	MAPK10	CDKN1A	PTGER2	CEBPA	
RIPK1	AXIN1	PPM1D	Sp1	IL-6	IL-8	IL-6	TGFB1	RAD50	MYC	MYC	CDKN1A	TNFRS1A	KL	CDKN1A	CDKN1A	
MRE11A	RAD50	PTGER2	MAPK14	TNF	IL-6	ATM	IL-6	MRE11A	RAD50	PTGER2	RELA	RIPK1	CTNNB1	CTNNB1	TERT	
MAPK10	PPM1D	Tp53	MAP3K7	TNFRS1A	APC	CDKN1A	NFKBIA	RELA	CDKN1A	BAX	TERT	NFKBIA	APC	PTGES2	NFKBIA	
NFKB1	Tp53	MDM2	DNMT3B	MAPK10	ATM	IL1A	CDKN1A	NFKBIA	MRE11A	RAD50	DNMT3B	IKBKG	AXIN1	MDM2	NFKB1	

**Figura 27:** Análise dos genes diferencialmente expressos. Nas transições entre os tecidos os 5 genes mais expressos e os 5 genes menos expressos em cada uma das vias do SASP indicadas por TNF- $\alpha$ , RIGI, P53 e TGF- $\beta$ .

Diferentemente das outras transições, estes três genes não aparecem entre os mais expressos na transição inflamação x adenoma, mas como ambos estão entre menos expressos, isto confirma juntamente com os resultados das atividades das vias que a manutenção da inflamação iniciada no tecido inflamado do cólon é mantida em adenoma do cólon. Investigando ainda mais a atividade dos genes nas vias, determinamos os cinco genes mais expressos e os cinco menos expressos da

via SASP conforme indicado pela Figura 28. Todos os genes indicados na parte superior da tabela são caracterizados por um aumento de expressão, enquanto que todos os genes na parte inferior são caracterizados por uma diminuição de expressão quando comparados ao controle. Desse modo, além de IL-6, IL-8 e IL1A, podemos considerar conforme a Figura 28, que PTSG2 e TNF que codifica TNF- $\alpha$  são também os principais responsáveis pela inflamação do cólon (KRAUS *et al.*, 2009), enquanto que TNF- $\alpha$  é produzido na mucosa e é um dos responsáveis pela ativação do sistema imune, que por sua vez podem contribuir para o desenvolvimento tumoral (BURSTEIN *et al.*, 2008). O gene PTSG2 é o responsável pela expressão de cyclooxygenase-2 (COX-2), expresso por células senescentes com funções importantes, incluindo a inibição da apoptose para a manutenção do estado senescente (COPPÉ *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2005), mas com funções também em inflamação (KRAUS *et al.*, 2009). Importante também já na transição normal x inflamação é a ativação das 5 vias e o início da inflamação sem a ativação de TP53 indicando que o nível de danos na células e no DNA ainda são controláveis e as funções dos tecidos e células são mantidos em níveis aceitáveis pelo organismo. Inflamação crônica é responsável por disfunções celulares, radicais livres gerados durante o processo inflamatório são responsáveis por danos no DNA (HUSSAIN *et al.*, 2007; HARTNETT *et al.*, 2012), com isso há uma evolução do tecido inflamado para uma displasia do cólon, seguido da ativação de gene TP53 para a formação de uma barreira tumoral envolvendo não somente senescência, mas também a ativação da apoptose conforme indicado pela expressão de BAX, juntamente com a ativação de mecanismos de reparo conforme a ativação de RAD50 e MRE11 e o controle do ciclo celular através da expressão de CHECK2, de modo que nesta transição inflamação x adenoma, a ativação de todos estes genes indica um nível considerável de danos no DNA e a formação de uma barreira envolvendo os mecanismos de manutenção do genoma (RISQUES *et al.*, 2008). Comparando a expressão dos genes em inflamação x adenoma com a expressão dos genes na transição adenoma x câncer, encontramos o resultado inverso, ou seja, os genes mais expressos em adenoma, são os genes menos expressos em câncer do cólon conforme as Figuras 27 e 28, deste modo há uma indicação de que a célula não sofreu apoptose, os mecanismo de reparo foram perdidos e ocorreu o escape da célula do estado senescente, uma das principais causas da transição adenoma x cancer de uma forma dependente de p53 (FUJITA *et al.*, 2009). É

importante destacar o aumento do nível de expressão de Myc na transição inflamação x adenoma, seguido de uma diminuição de expressão na transição adenoma x câncer. Este gene é expresso por células epiteliais do cólon e também participa na ativação das principais vias de sinalização responsáveis pela geração de adenomas intestinais, incluindo a ativação da via envolvendo Wnt através de  $\beta$ -Catenin (CIZNADIJA *et al.*, 2009). Conforme indicado na Figura 25, Myc também é responsável pela expressão de hTERT quando não é inibido por TGF- $\beta$ .

Analisando os genes MYC e TGFB1 nas transições inflamação x adenoma e adenoma x câncer, podemos perceber que o nível de expressão de MYC é inversamente proporcional ao de TGF- $\beta$  nestas transições, o que nos leva a crer que a formação do adenoma depende também da extensão da capacidade replicativa das células epiteliais do cólon através da ativação da telomerase e a consequente extensão dos telômeros, ou seja, as células destinadas a sofrer apoptose ou entrar no estado senescente, conseguem escapar da morte celular e da parada do ciclo celular, condições necessárias para a formação do adenoma.

TOP EXPRESSED GENES OF THE SASP				
TISSUES	NORMAL X INFLAMMATION	INFLAMMATION x ADENOMA	ADENOMA X CANCER	NORMAL X CANCER
TOP FIVE UPREGULATED GENES				
	PTGS2	Tp53	IL-6	PTGS2
	IL-6	MYC	PTGS2	IL-6
	IL-8	RAD50	KL	IL-8
	IL1A	CHECK2	IL-8	IL1A
	TNF	DNMT3B	TGFB1	WNT2
TOP FIVE DOWNREGULATED GENES				
	CEBPA	KL	Tp53	PTGER2
	APC	IL-8	MYC	CEBPA
	AXIN1	TGFB1	PTGER2	CDKN1A
	RAD50	IL-6	BAX	MAPK10
	PPM1D	TNF	CHECK2	TERT

**Figura 28:** Diferenciação de expressão dos genes envolvidos com o SASP. A parte superior da tabela indica os genes mais expressos, enquanto que a parte inferior da tabela indica os menos expressos. As comparações controle x experimento indicam que os genes mais expressos, tem o nível de expressão aumentado e os genes menos expressos tem o nível de expressão diminuído.

Outro importante gene com funções na sinalização do estado senescente é Kloto (KL), cujas interações ocorrem principalmente com RIG-I para controlar processos inflamatórios relacionados com a ativação de NF-kB e do SASP por RIG-I pelo menos em fibroblastos humanos (LIU *et al.*, 2011). Klotho também regula o estado senescente através de uma interação com p53, normalmente este gene impede a entrada das células no estado senescente através da inibição de p53, contudo, quando este gene é pouco expresso, acaba sendo responsável pela entrada prematura da célula no estado senescente (DE OLIVEIRA, 2006; WANG *et al.*, 2009). A Figura 28 indica a regulação do estado senescente através do alto nível de expressão de p53 e pelo baixo nível de expressão de Klotho em adenoma. Inclusive na análise da via SASP contendo 43 genes, Klotho é o menos expresso dentre todos e TP53 é o mais expresso, de modo que estes resultados destacam a Klotho como peça fundamental para evitar a transição adenoma x câncer. Além dos principais marcadores do estado senescente também presentes em adenoma do cólon de acordo com Figura 28, aparece em destaque DNMT3B, uma enzima metiltransferase expressa em células senescentes e em adenoma do cólon, principal responsável por *de novo* metilações, ou seja, metilações que ocorrem em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação (ZHANG *et al.*, 2008).

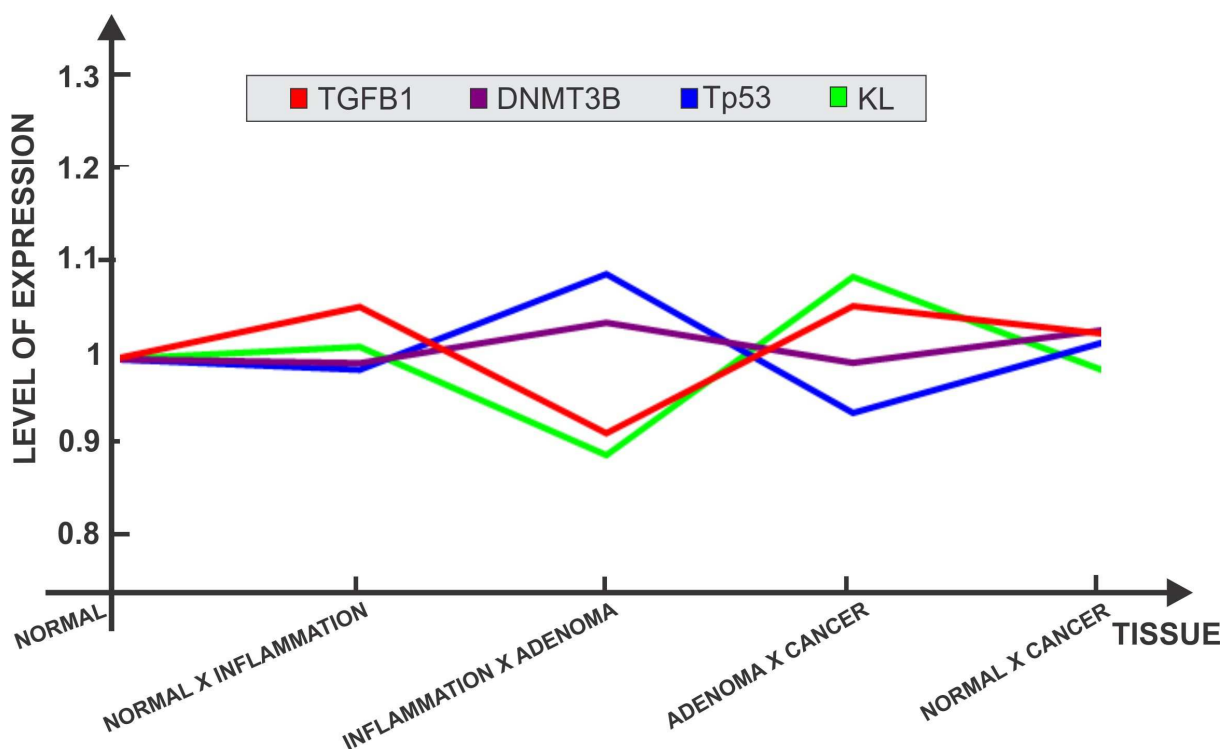
## 5.5 Discussão

A alteração das atividades das vias inflamatórias envolvidas com o SASP é uma condição necessária para a transição entre os tecidos do cólon, contudo não é suficiente. A única alteração da diversidade envolvendo a via RIGI na transição de adenoma para câncer indica que uma alteração específica de determinados genes da via pode ser responsável pela transição de adenoma para câncer. Nas Figuras 27 e 28, Klotho aparece como sendo o menos expresso em adenoma e depois em câncer um dos mais expressos. Considerando esta dinâmica de KLOTHO nas transições, decidimos avaliar a importância deste gene para a alteração de diversidade da via RIGI na transição adenoma x câncer. Tomando a via RIGI com o gene KLOTHO excluído, calculamos novamente a atividade e diversidade e encontramos que a via permanece com atividade aumentada, mas o aumento da

diversidade desta via desapareceu. Juntamente com o aumento da diversidade da via RIGI, as análises indicam que não há uma alteração da via p53, de modo que a regulação de TP53 por KLOTHO parece estar desregulada na transição adenoma x câncer, sendo o escape do estado senescente pelo aumento da expressão de KLOTHO a provável causa para a transição. Como a via SASP também aparece com aumento da diversidade, calculamos novamente a diversidade da via sem o KLOTHO e encontramos novamente a diversidade normal e atividade aumentada, de modo que podemos concluir que o nível de expressão de KLOTHO é o principal responsável pela manutenção do estado senescente em combinação com TP53. Conforme sugere a Figura 29, o aumento de expressão em adenoma impede que o estado senescente seja mantido por TP53, iniciando a formação tumoral no cólon. Resultados recentes mostram que KLOTHO aparece com baixa regulação ou completamente silenciado em câncer colorretal (PAN *et al.*, 2011), o que pode ser confirmado pela análise de diferenciação de genes tomando como controle o tecido normal e como experimento câncer. Na Figura 28 que indica os 5 genes mais e menos expressos da via SASP na transição direta normal x câncer não encontramos KLOTHO entre os 5 menos expressos, mas analisando a via toda encontramos KLOTHO com expressão diminuída entre todos os 43 genes na sexta posição entre os genes menos expressos, quando comparados tecido normal e câncer. Como explicar uma diminuição de expressão quando comparados os tecidos normal e câncer?

A diferença de expressão de KLOTHO que ocorre quando comparamos o tecido câncer com os tecidos normal e adenoma, se justifica pelo nível de expressão muito baixo de KLOTHO em adenoma e um rápido aumento em câncer, sendo que o nível de expressão em câncer, embora muito maior que em adenoma, é inferior ao nível de expressão que ocorre no tecido normal conforme está indicado nas Figuras 29 e 30. Este comportamento diferencial de KLOTHO é confirmado pelas análises feitas com o ViaComplex que mostram alteração da diversidade da via RIGI contendo KLOTHO. Conforme já mencionamos, excluindo este gene da via e analisando novamente a atividade e diversidade da via através do ViaComplex, continuamos obtendo aumento da atividade da via, mas sem KLOTHO não há mais aumento de diversidade, o que confirma que KLOTHO pode ser um dos principais responsáveis pela atividade de TP53. Ao analisar novamente as Figuras 29 e 30 é possível perceber o comportamento inverso entre TP53 e KLOTHO, ou seja,

enquanto que em adenoma TP53 aparece muito expresso e KLOTHO pouco expresso, o inverso ocorre em câncer onde TP53 aparece pouco expresso e KLOTHO aparece bastante alterado, o que também sugere que a principal causa do escape da célula do estado senescente, apontado como sendo uma das principais causas da transição, seja justamente a dinâmica envolvendo estes dois genes. Se a causa do escape do estado senescente é a dinâmica envolvendo TP53 e KLOTHO, então a hipometilação de KLOTHO parece ser fator determinante para o seu aumento de expressão e para uma diminuição de TP53 na transição de adenoma para câncer. Como DNMT3B está entre os mais expressos na transição de inflamação para adenoma, enquanto que na transição de adenoma para câncer ocorre uma diminuição no nível de expressão desta metiltransferase inversamente proporcional ao nível de KLOTHO, podemos supor que o maior controle da dinâmica entre KLOTHO e TP53 também depende de DNMT3B. Mas os resultados obtidos e indicados nas figuras 29 e 30, também mostram TGFB1 entre os menos expressos em adenoma, enquanto que em câncer este gene aparece entre os mais expressos.



**Figura 29:** Nível de diferenciação dos 4 genes que aparecem entre os 5 mais alterados e que apresentam importante papel no controle do estado senescente em adenoma do cólon. O gráfico representa através de segmentos contínuos a variação do nível de diferenciação dos valores discretos relativos a cada uma das transições. O nível de expressão na comparação normal x câncer foi também considerado para ser usado como base na análise da dinâmica normal x inflamação x adenoma x câncer.

Entre todos os genes mais e menos expressos TP53, KLOTHO, TFGB1 e DNMT3B parecem de alguma forma estar envolvidos na regulação do estado senescente, enquanto que todos os outros, ou são consequência direta do processo inflamatório a partir do estado senescente (IL6, IL8, PTSG2, MYC, TNF) ou indireta na regulação da sinalização do desgaste dos telômeros (RAD50), regulação do ciclo celular (CHECK2) e apoptose (BAX). Biópsias de pacientes com Colitis Ulcerosa demonstram a formação de adenomas (LOFFELD, 2009) e altas taxas de apoptose especialmente em áreas inflamadas (TRANTAFILLIDIS *et al.*, 2009).

Para entender melhor a relação entre TP53, KLOTHO, TFGB1 e DNMT3B, analisamos outras amostras do GEO:

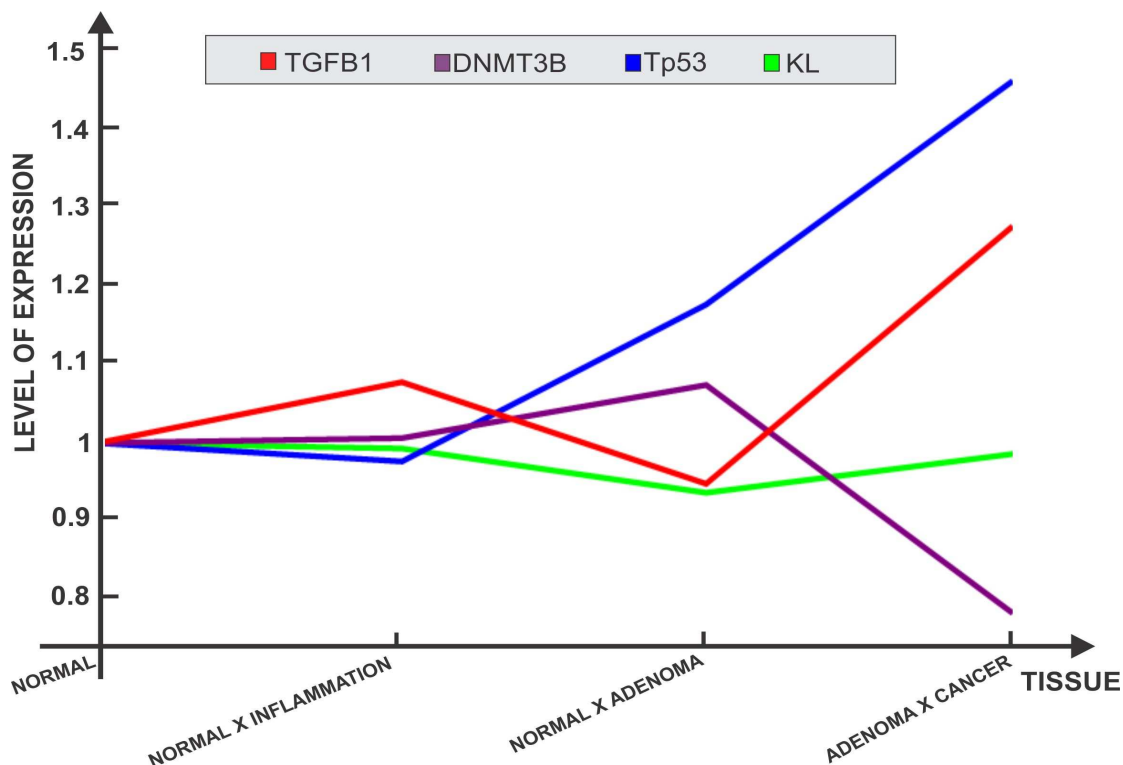
- GSE9452: 16 amostras do tecido não inflamado do colon foram tomadas como controle e 8 amostras de pacientes com UC foram tomadas como experimento.
- GSE8671: foram tomadas 15 amostras referentes à biópsias da mucosa normal do cólon como controle e 15 amostras referentes a biópsias de adenoma colorretal foram tomadas como experimento.
- GSE20916: 5 amostras de adenoma colorretal como controle e 10 amostras de adenocarcinoma do cólon.

onde todas as amostras foram normalizadas usando RMA (*Robust Multichip Average*) (IRIZARRY, 2003).

Considerando novamente a dinâmica de TP53, KLOTHO, TFGB1 e DNMT3B os valores de expressão destes genes são indicados na Figura 30 abaixo nas transições normal x inflamação, normal x adenoma e adenoma x câncer:

Em ambas as Figura 29 e 30 a dinâmica envolvendo os quatro genes é comum, ou seja, enquanto que em adenoma TP53 e DNMT3B aparecem com expressão aumentada, TGFB1 e KLOTHO aparecem com a expressão diminuída, indicando uma rede regulatória envolvendo entre estes quatro genes através de ativação e inibição de expressão, conforme a dinâmica indicada na Figura 8 entre os genes. Tanto TP53 quanto TGFB1 são supressores de tumores expressos em quase todos os tipos de células humanas. A via envolvendo TGFB1, responsável pela expressão de TGF- $\beta$ , regula a transdução de sinais através de membros da família SMAD, fatores de transcrição que interagem com o tipo selvagem de p53 para induzir principalmente a transcrição de genes supressores de tumor (ELSTON *et al.*, 2012). Mutações de p53 geralmente são responsáveis pela diminuição da atividade

transcricional de genes alvos de TGF- $\beta$  e também reduzem a expressão do receptor TGF tipo II (KALO *et al.*, 2007).



**Figura 30:** Nível de expressão nas transições normal x inflamação, normal x adenoma e adenoma x câncer para amostras do cólon. O gráfico representa através de segmentos contínuos a variação do nível de diferenciação dos valores discretos relativos a cada uma das transições.

Adenomas do cólon realmente apresentam baixo nível de expressão de TGFB1 quando comparados com câncer colorretal, inclusive a perda dos efeitos inibidores do crescimento de TGFB1 é acompanhada pela transição de adenoma colorretal para câncer (BERNDT *et al.*, 2007). As duas isoformas p53 $\beta$  e  $\Delta$ 133p53 de p53 regulam a entrada da célula no estado de senescência replicativa, a primeira aparece aumentada e a segunda diminuída a nível de expressão, enquanto que em carcinoma do cólon ocorre o processo inverso em relação à expressão destes dois mutantes de p53, indicando o escape da barreira senescente e a progressão de adenoma para carcinoma (FUJITA *et al.*, 2009). Juntando os resultados discutidos envolvendo TP53 e TGFB1, tudo indica que deve haver uma relação inversa entre estes dois genes a nível de expressão, tanto em adenoma quanto em carcinoma, mesmo que a regulação seja indireta.

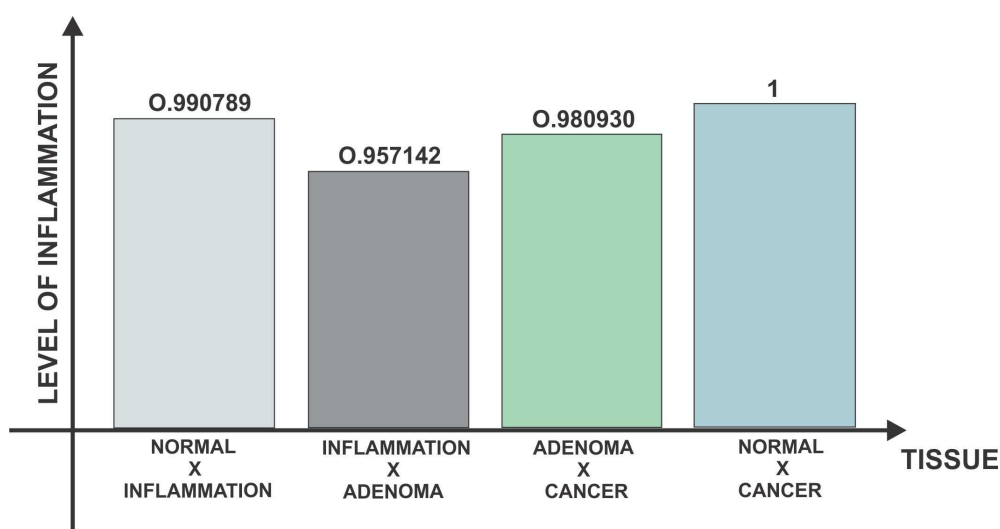


A metilação do DNA é um potente mecanismo de regulação de expressão gênica e manutenção da estabilidade genômica. A Hipometilação em células tumorais ocorre em vista da perda de metilação de regiões repetitivas do genoma e este descontrole na metilação normal do DNA de células somáticas pode resultar em descontrole do crescimento celular (ROBERTSON, 2005). Como já discutido, DNMT3B tem expressão aumentada em senescência replicativa, enquanto que DNMT1 tem expressão diminuída neste estado, ao contrário do que ocorre em carcinomas (ZHANG *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2007). A relação envolvendo TGFB1 e DNMT3B não é tão evidente e não existem resultados que descrevam a regulação de DNMT3B em adenoma do cólon por TGFB1, contudo em células humanas CaP, TGFB1 é o maior mediador envolvido com a regulação das DNMTs (ZHANG *et al.*, 2011). Metilações aberrantes ocorrem em lesões primárias e em adenomas do cólon, de modo que a metilação de genes supressores de tumor, incluindo p14<sup>ARF</sup> e CDKN2A, favorecem a formação de carcinomas no cólon (ROBERTSON, 2005; KIM *et al.*, 2006). Além disso, em células Huh7, o estímulo de TGFB1 inibe a expressão de DNMT3B (YOU *et al.*, 2010). Juntando novamente os resultados envolvendo TGFB1, DNMT3B e o estado de senescência replicativa, é possível que ocorra novamente um controle, mesmo que indireto, na regulação da expressão da expressão de DNMT3B por TGFB1. Enquanto que o controle de TP53 por KLOTHO já é bem documentado em senescência (DE OLIVEIRA, 2006), a regulação de KLOTHO por DNMT3B não é evidente, ocorre que a metilação aberrante em adenoma de genes supressores de tumor, a metilação de KLOTHO em câncer colorretal (PAN *et al.*, 2011) e a influência da inflamação crônica em UC em relação a metilação do DNA (HARTNETT *et al.*, 2012), em conjunto com os dados de expressões indicados nas Figuras 27 e 28 sugerem a regulação da hipermetilação de KLOTHO POR DNMT3B em senescência replicativa.

Além de IL6 e IL8, dois importantes marcadores nas transições dos tecidos anormais do cólon (CUI *et al.*, 2009; KRAUS *et al.*, 2009), merece destaque a dinâmica de PTSG2 que codifica Cox-2 na regulação da inflamação desde a transição do tecido normal até o câncer, onde aparece muito expresso juntamente com IL6 e IL8 na transição de adenoma para câncer. Este gene merece um destaque maior devido ao nível de expressão quando são comparados o tecido normal e câncer conforme indicado nas Figuras 27 e 28. Diversas atribuições estão relacionadas com Cox-2 em câncer, além da inflamação, ele também é responsável

pelo aumento da proliferação, angiogênese, invasão e metástase. A expressão de Cox-2 em tumores humanos pode ocorrer através de diferentes fatores de crescimento, citocinas entre outros (AGGARWAL *et al.*, 2006), mas o seu controle dependente também de p53, como demonstrado para fibroblastos de embriões de camundongos, onde a expressão de Cox-2 é reprimida por p53, enquanto que a forma mutante de p53 não impede a sua expressão (SUBBARAMAIAH *et al.*, 1999). Em outros contextos a relação entre p53 e Cox-2 é diferente, dependendo da extensão da ativação, p53 pode ativar ou inibir Cox-2 (PERWEZ *et al.*, 2007) e pode também envolver NF-kB neste processo de ativação, pelo menos em linhagens celulares de câncer de cólon (BENOIT *et al.*, 2006).

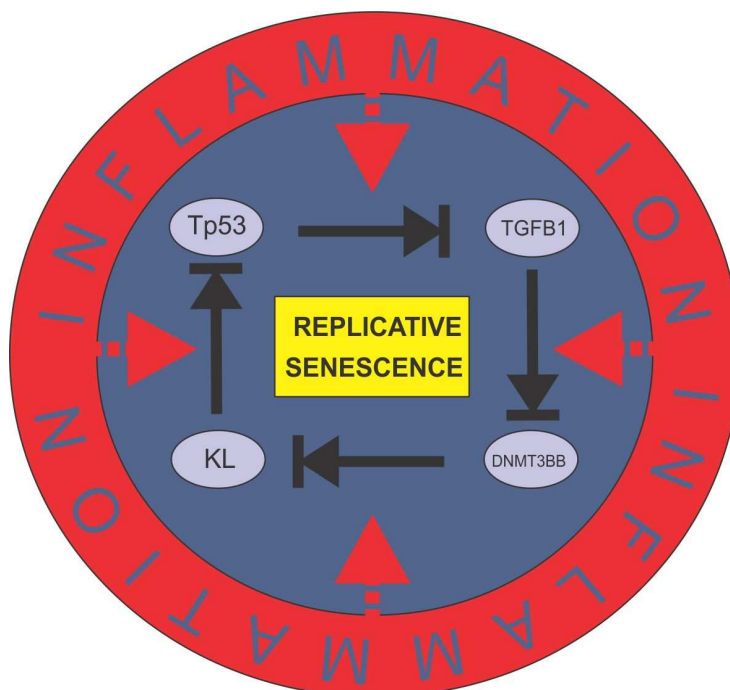
Nessa rede envolvendo inflamação, p53, Cox-2, Klotho e NF-kB em adenoma, devemos considerar mais um personagem responsável principalmente pelo controle da inflamação conforme indicado pela Figura 25, onde o nível de inflamação nas diferentes transições foi estimado rudemente a partir da soma da expressão de todos os genes envolvidos na via SASP. Para comparar o nível de inflamação os resultados foram normalizados e representados em um histograma indicado na Figura 31. Esta comparação sugere uma diminuição da inflamação na transição do tecido inflamado para adenoma, mas um aumento do grau de inflamação em câncer quando comparado ao adenoma como já era esperado.



**Figura 31:** Nível de Inflamação aproximado pela somatória de expressão dos genes presentes na via SASP. Devido às alterações encontradas de todas as vias, consideramos o envolvimento de todos os genes da via SASP para obter uma estimativa do grau de inflamação entre as transições. A soma total foi normalizada a partir da transição normal x câncer, encontrada com a maior somatória dentre todas as transições. O nível de inflamação na comparação normal x câncer foi também considerado para ser usado como base na análise da dinâmica normal x inflamação x adenoma x câncer.

Para fibroblastos diplóides senescentes a atividade de NF-kB é diminuída, mesmo sendo NF-kB o principal responsável pelo fenótipo secretor (GREENHOUGH *et al.*, 2009), de modo que células epiteliais do cólon demonstram o mesmo compartamento dinâmico. Neste caso, a diminuição da inflamação relacionada com estado senescente deve envolver o controle de NF-kB e da inflamação por p53 através de PPM1D, o gene que codifica WIP1, uma fosfatase que pode ser induzida por p53 e também pode inibir a atividade de NF-kB (SALMINEN *et al.*, 2011), o que pode de certa forma ser confirmado pelo aumento de expressão de PPM1D na transição do tecido inflamado do cólon para o adenoma conforme resultados obtidos com diferenciação, onde identificamos que PPM1D aparece entre os genes mais expressos das vias RIGI e P53. Este controle de NF-kB também pode ser percebido através da diminuição da expressão de IL-6 e IL-8 em adenoma conforme as Figuras 27 e 28, juntamente com o baixo nível de expressão dos genes da via SASP conforme a Figura 31. Enquanto que o controle de NF-kB ocorre através de PPM1D, a atividade controlada de COX-2 e Klotho parece envolver diretamente p53 considerando a expressão inversa destes genes encontrada tanto em adenoma, quanto em câncer, onde neste último p53 é o gene menos expresso, enquanto que PTSG2 e KL aparecem entre os mais expressos conforme indicado nas Figuras 27 e 28.

Considerando a inflamação relacionada com o estado senescente, as vias com alteração de atividade, os resultados de diferenciação de expressão e a dinâmica envolvendo TP53, KLOTHO, TGFB1 e DNMT3B, um modelo relacionando todos os detalhes e partir do estado senescente é proposto na Figura 32.



**Figura 32:** A parte da figura destaca em vermelho indica a inflamação relacionada com o SASP, promovida por diferentes vias contendo TNF, TGFB1, RIG-I e TP53 responsáveis pela regulação de NF-KB e por influenciar diferentes respostas das células dependendo do nível de danos no DNA. A parte destacada em azul indica o papel da senescência replicativa na supressão tumoral através da regulação da rede envolvendo os quatro genes TP53, TGFB1, DNMT3B e KLOTHO. Em níveis de inflamação crônica, as setas em vermelho indicam a influência da inflamação sobre a rede e provável escape da célula do estado senescente a partir da desregulação das interações entre os 4 genes.

Enquanto que em tecidos com baixo grau de inflamação, o nível de danos no DNA é muito pequeno e o controle da inflamação impede maiores danos ao tecido, inflamação crônica é a principal fonte de danos no DNA responsáveis por alterações na célula e ativação tanto da senescência a partir do desgaste dos telômeros quanto da apoptose nos tecidos inflamados. Nesse sentido, há uma pressão muito grande sobre a homeostase da célula, diversos mecanismos são fontes de inflamação, enquanto que o controle das respostas adequadas aos diferentes estressores depende de poucos genes como proposto na Figura 32, pelo menos no estado senescente. A dependência de TP53 em adenomas do cólon, cuja formação ocorreu a partir de doenças inflamatórias nos intestinos, em relação principalmente ao controle do estado senescente destaca a importância do controle da inflamação, sob pena do escape da célula do estado senescente a partir de mutações deste gene e o conseqüente descontrole da rede destacada no modelo proposto na Figura 32.

## 5.6 Conclusões

A rede relacionada com o fenótipo secretor associado ao estado senescente envolve diferentes vias no controle de NF- $\kappa$ B após o desgaste dos telômeros e a formação dos TIFs. A ativação do fenótipo secretor em células senescentes é dependente principalmente de danos no DNA e do gene ATM (RODIER *et al.*, 2009), sendo ATM necessário para a regulação de NF- $\kappa$ B a partir das vias envolvendo TNF- $\alpha$ , RIG-I e p53, mas desnecessário para a regulação da via envolvendo TGF- $\beta$ . Enquanto que o aumento de inflamação nos tecidos ocorre por meio de TNF- $\alpha$ , RIG-I e TGF, a via envolvendo p53 parece exercer um controle maior sobre NF- $\kappa$ B no controle da inflamação associada ao estado senescente. Por outro lado, p53 também colabora para promover a expressão de COX-2 em células senescentes, um gene com inúmeras funções no controle celular, observado em muitos tipos de tumores, de maneira que o aumento de atividade de COX-2 estimula a proliferação, angiogênese, invasão e inibição da apoptose (MORAES *et al.*, 2007). A inflamação que ocorre a partir do estado senescente não tem efeitos somente sobre a atração do sistema imune, apoptose, sinalização autócrina e sobre a expressão gênica da célula, mas também tem efeitos diretos na extensão dos telômeros (controle da telomerase) e metilação, dois efeitos que interferem de forma direta no controle da parada do ciclo celular a partir do desgaste dos telômeros.

Em câncer colorretal associado à colite, mutações do gene TP53 ocorrem no início da sequência adenoma-carcinoma, enquanto que a perda de APC é menos frequente em CAC e usualmente ocorre mais tarde na sequência adenoma-carcinoma (BAUMGART, 2008). Ambos estes genes estão presentes na regulação do estado senescente, pelo menos em fibroblastos, e de certa forma estão relacionados com o SASP. Ocorre que o escape do estado senescente através de mutações de p53 é uma das principais causas da transição de adenoma para câncer no cólon em humanos (FUJITA *et al.*, 2009), mas considerando a dependência encontrada de p53 em relação ao gene Klotho (DE OLIVEIRA, 2006), a sensibilidade de TGF- $\beta$  em relação à mutações de p53 (KALO *et al.*, 2007), a capacidade de TGF- $\beta$  em suprimir a transcrição de hTERT em células senescentes (GRADY, 2007), a metilação presente em adenomas do cólon juntamente com a expressão da metiltransferase DMT3B e finalmente a repressão da via WNT acompanhada da

regulação de GSK3 ( ADAMS *et al.*, 2008) por APC, sugerem uma sub-rede regulatória do estado senescente responsável não somente por regular a inflamação principalmente a partir de NF- $\kappa$ B, mas também regular o estado senescente como mecanismo supressor de tumor.

Baseado nestas evidências e considerando que a etiologia de CRC é multifatorial (SAMEER *et al.*, 2010), o objetivo foi o de propor um mecanismo regulatório envolvendo o controle da célula e do estado senescente por p53. Contudo no balanço geral envolvendo inflamação, modificações epigenéticas e danos no DNA, o controle depende também de KLOTHO, TGFB1 e DNMT3B, de modo que a desregulação destes genes a partir de inflamações crônicas é a chave para a formação de CAC.

## 5.7 Métodos

### 5.7.1 Via Complex

Para as análises de alterações das vias foi utilizado o software ViaComplex ( CASTRO *et al.*, 2009). O software é utilizado para calcular significâncias de vias (atividade e diversidade) pelo método de *bootstrap* e pela correção de falsos positivos. Os falsos positivos são usados como método de controle estatístico quando se faz os testes de múltiplas hipóteses (*bootstrap*) para efetuar uma correção nas múltiplas comparações (entre as vias).

Para calcular a atividade relativa de uma dada via  $\alpha$  com um número de genes  $i$ , deve-se somar a expressão dos genes em dois grupos de vias: O primeiro grupo representa as amostras de tecidos alterados ou experimentais e o segundo grupo é composto pelas amostras de tecidos normais ou controle. Então, a atividade relativa da via  $\alpha$  será dada por:

$$n_{\alpha} = \frac{N^e_{\alpha}}{N^e_{\alpha} + N^{\gamma}_{\alpha}}$$

O valor de  $n_{\alpha}$  varia entre  $0 < n_{\alpha} < 1$ . Se  $n_{\alpha} < 0.5$ , então isto implica que

$$N^e_\alpha < N^\gamma_\alpha,$$

isto é, a atividade da via com amostras experimentais é menor do que a atividade do controle, enquanto que  $n_\alpha > 0.5$  corresponde ao caso inverso.

Para caracterizar de forma quantitativa a diversidade relativa para uma via  $\alpha$  é utilizada a entropia de Shannon definida como segue:

$$H_\alpha = -\frac{1}{\ln(M_\alpha)} \sum_1^{M_\alpha} p(i, \alpha) \ln p(i, \alpha)$$

onde  $M_\alpha$  é o número de genes na via e  $p(i, \alpha)$  é a frequência da diversidade do gene  $i$ , dada por:

$$p(i, \alpha) = \frac{s(i, \alpha)}{N_\alpha}$$

com  $s(i, \alpha)$ , sendo a atividade do gene ( $i$ ) e  $N_\alpha$  a soma da atividade da via ( $\alpha$ ). O termo  $N_\alpha$  é um fator de normalização que garante, desta forma, pode-se comparar as vias com diferentes quantidades de genes. Tendo como referência o sinal controle da amostra, pode-se definir a diversidade relativa  $h_\alpha$  como:

$$h_\alpha = \frac{H^e_\alpha}{H^e_\alpha + H^\gamma_\alpha}$$

onde  $H^e_\alpha$  e  $H^\gamma_\alpha$  são as diversidades das amostras com alteração (experimento) e o controle, respectivamente. O valor de  $h_\alpha$  varia entre  $0 \leq h_\alpha \leq 1$ . Se  $h_\alpha < 0.5$  então

$$H^e_\alpha < H^\gamma_\alpha,$$

o que indica que a diversidade dos valores de expressão dos genes na via é menor para a amostra alterada do que para o controle. Por outro lado, se  $h_\alpha > 0.5$  então os valores de expressão dos genes na via é maior para a amostra alterada do que para o controle.

### 5.7.2 Via de senescência replicativa e Vias do SASP

Os genes da via de senescência replicativa foram obtidos do banco de dados Ontocancro ([www.ontocancro.inf.ufsm.br](http://www.ontocancro.inf.ufsm.br)). Os genes de cada uma das vias SASP foram tomados com base nas interações descritas na Figura 25.

<b>Senescência replicativa</b>	<b>SASP</b>	<b>TNF</b>	<b>TP53</b>	<b>RIGI</b>	<b>TGFB</b>
RAD50	PTGS2	IL6	PTGS2	IL6	IL6
CDK2	IL6	IL8	IL6	IL8	IL8
CDK4	IL8	IL1A	IL8	WNT2	IL1A
CDK6	IL1A	CHEK2	IL1A	NBN	MAPK14
CDKN1A	WNT2	NBN	NBN	RAD50	MYC
CDKN2A	CHEK2	RAD50	MAPK14	PPM1D	DNMT3B
CHEK1	NBN	MRE11A	MYC	GSK3B	MAP3K7
CHEK2	MAPK14	RELA	RAD50	MRE11A	TGFB1
MAPK14	MYC	TNF	PPM1D	TP53	IKBKB
E2F1	DNMT3B	NFKB1	AKT1	DVL1	RELA
E2F2	MAP3K7	ATM	GSK3B	RIG-I	SP1
RPA4	RAD50	IKBKG	MRE11A	RELA	NFKB1
H2AFX	TGFB1	NFKBIA	TP53	NFKB1	NFKBIA
MDM2	PPM1D	RIPK1	CDKN2A	ATM	TERT
MRE11A	AKT1	TNFRSF1A	RELA	MYC	CDKN1A
NBN	GSK3B	MAPK10	BAX	AXIN1	CEBPA
ATM	MRE11A		NFKB1	APC	
ATR	TP53		ATM	CTNNB1	
MAP2K3	IKBKB		MDM2	KL	
TAOK1	CDKN2A		PTGES2	CDKN1A	
RB1	DVL1		CTNNB1		
CCND1	RIG-I		CDKN1A		
BCL2	RELA		PTGER2		
RPA1	SP1				
RPA2	BAX				
RPA3	TNF				
CLSPN	NFKB1				
BRCA1	ATM				
TERF2	IKBKG				
TP53	NFKBIA				
TP53BP1	MDM2				
CDC45L	RIPK1				
ATRIP	PTGES2				
CCND2	MYC				
CCNE1	AXIN1				
CCNE2	APC				
MDC1	CTNNB1				
CDC25A	TNFRSF1A				
CSNK2A1	KL				



CSNK2A2	TERT
FAM175A	MAPK10
HIST1H2AC	CDKN1A
MAP2K6	CEBPA
MAPK11	PTGER2
MAPK12	
MAPK13	
MAPKAPK2	
PML	
POT1	
RNF8	
RNF168	
TAOK2	
TAOK3	
TERF2IP	
TOPBP1	
UIMC1	

## 6. CONCLUSÕES

Analisando as redes de regulação dos estômatos pelo ABA e a rede de senescência replicativa em humanos fica evidenciado um mecanismo comum envolvendo uma resposta inicial e uma resposta final para ambos os mecanismos:

- ABA x fechamentos dos estômatos;
- Encurtamento dos telômeros x senescência replicativa;
- Rede do SASP.

Em ambas as redes a garantia de uma resposta final adequada depende de mecanismos muitas vezes independentes organizados em módulos e vias, de modo que a sobrevivência de cada organismo ou célula é mantida através de estados que descrevem conjuntos atratores no espaço de estados de cada rede, juntamente com suas devidas bacias de atração.

A descrição booleana da rede ABA permitiu identificar a dinâmica da rede através de diferentes perturbações do sistema, indicando de uma forma simples e direta o resultado de possíveis mutações que podem influenciar a adaptação da planta a diferentes condições de estresse. A análise dos elementos variantes da rede e do espaço de estados também permitiu descrever a dinâmica dos atratores, além de permitir relacionar as condições iniciais com o número de atualizações e a cardinalidade do espaço de estados.

Assim como a rede booleana para o ABA, a modelagem da senescência replicativa deve também permitir a exploração da dinâmica da rede através de uma modelagem booleana e a caracterização do estado atrator, além de contribuir para elucidar os mecanismos específicos de regulação envolvendo sinalização. A rede proposta unifica estes três estágios e identifica os mecanismos regulatórios dos principais marcadores de senescência pelo desgaste dos telômeros, além de identificar e descrever os inibidores de reparo de quebras duplas (NHEJ) e os inibidores de apoptose.

A modelagem da rede SASP utilizando resultados obtidos com fibroblastos humanos permitiu identificar as principais vias de ativação de NF- $\kappa$ B para a formação do SASP em senescência replicativa. Enquanto que o SASP contribui para inflamação já em amostras do cólon inflamadas, com o aumento das vias

inflamatórias e o aumento da instabilidade genômica, a senescência surge como um mecanismo supressor de tumor, inclusive com o poder de controlar a inflamação através da regulação de NF- $\kappa$ B por p53 através de Wip1. O trabalho permitiu relacionar inflamação crônica, instabilidade genômica e modificações epigenéticas de genes, sendo que a metilação, quando ocorre normalmente, é indispensável para impedir a transição de um tecido pré-maligno para um tecido maligno a partir da regulação de oncogenes, assim como a regulação de genes supressores de tumor.

Resultados recentes indicam que muitas redes biológicas podem ser explicadas por redes booleanas e que relevantes questões podem ser respondidas através deste formalismo. Esta forma de modelagem é atrativa devido a sua simplicidade de aplicação e facilidade de implementação para a análise de redes com um grande número de variáveis, de modo que descrições qualitativas podem ser obtidas para simular o comportamento de redes moleculares no que se refere à funcionalidade de módulos e de vias regulatórias. Redes booleanas são úteis para uma descrição qualitativa, mas não são apropriados quando detalhes cinéticos são necessários e o objetivo principal é o comportamento quantitativo dos elementos do sistema.

## 7. PERSPECTIVAS

A regulação de uma rede biológica depende da interação entre diversos elementos e diferentes mecanismos. Considerando uma rede como um sistema de elementos variáveis, a modelagem do processo biológico é extremamente dependente de informações detalhadas para cada variável relacionando os diversos elementos da rede. Muitos destes mecanismos envolvem simplesmente a ativação e inibição de proteínas, enzimas, moléculas e nesse sentido, uma rede booleana é uma ferramenta útil para uma simples modelagem do sistema.

Considerando-se a importância da senescência como supressor de tumor através da possibilidade da parada permanente tanto na fase  $G_1$  quanto na fase  $G_2$  do ciclo celular, uma descrição booleana a partir da rede proposta neste trabalho pode contribuir para a uma melhor compreensão deste processo biológico, além de permitir corroborar os resultados experimentais obtidos com mutações e possibilitar a análise dinâmica através de simulações *in silico*. A rede proposta para a senescência replicativa na fase  $G_1$  também poderá servir de base para a modelagem da senescência na fase  $G_2$ , visto que muitas proteínas ativas na fase  $G_1$  também participam de mecanismos regulatórios na fase  $G_2$ . A senescência na fase  $G_2$  parece fazer parte do último recurso utilizado pela célula antes da completa divisão celular ou início do estágio M2 de senescência replicativa e por isso a descrição da parada permanente nestas fases possibilitará o amplo uso da senescência como uma importante ferramenta no controle do câncer e outras doenças. Além de células somáticas senescentes, a regulação de células tronco adultas na regeneração de tecidos é também dependente do estado senescente. Por adotar o estado quiescente, precisam regular de forma adequada a manutenção da integridade do seu genoma através dos pontos de checagem e vias de reparo, é notável que muitos tumores humanos estão associados com o estado senescente de células tronco (ROSSI *et al.*, 2008; MANDAL, 2011; MASLOV *et al.*, 2009). A regulação das respostas ao dano no DNA são específicas em células tronco e o entendimento dos mecanismos envolvendo apoptose e senescência replicativa poderá contribuir para uma melhor compreensão da dinâmica envolvendo as células somáticas e as células tronco, juntamente com a relação destas células com a apoptose e senescência (JONES *et al.*, 2011).

A partir dos resultados obtidos com a análise de microarranjos pretende-se encaminhar um artigo para submissão com uma discussão a respeito da rede regulatória do SASP, além de apresentar os importantes resultados obtidos que relacionam o estado senescente com inflamações crônicas relacionadas com doenças inflamatórias do intestino, incluindo doença de Chron e colite Ulcerosa, cada uma caracterizada por um longo período de duração da doença, ambas associadas com um risco aumentado de ser a origem de carcinomas no cólon humano.

A rede regulatória de senescencia replicativa e a rede utilizada para a modelagem do SASP, de certa forma se complementam, ou seja, o SASP ocorre naturalmente após a entrada da célula no estado senescente, contudo o SASP, além de regular o fenótipo secretor, também é um importante mecanismo para a manutenção do estado senescente a partir da secreção de citocinas que reforçam a parada do ciclo celular através de uma sinalização autócrina. Portanto, a integração de ambas redes, uma modelagem booleana da rede obtida e simulações *in silico* devem permitir uma melhor interpretação da rede regulatória e dos mecanismos utilizados pela célula para evitar o escape do estado senescente, além de oferecer meios alternativos de análise dos principais marcadores do estado senescente, incluindo a inibição da apoptose, regulação do ciclo celular, inibição do reparo, SASP entre outros.

Resultados recentes exploram a dinâmica de redes envolvendo p53 e a regulação de respostas celulares a partir de danos no DNA (ZHANG *et al.*, 2011; PURVIS, 2012; BATCHELOR, 2008). Para obtenção da dinâmica envolvendo p53, parâmetros cinéticos são utilizados para a modelagem das redes de interação através de equações diferenciais, de modo que a descrição de importantes propriedades a respeito da regulação de funções celulares são obtidas. Nesse sentido, as redes propostas neste trabalho podem servir de base para a construção de modelos contínuos cujo objetivo é a obtenção de uma melhor descrição do estado senescente, considerando o seu papel como mecanismo supressor de tumor tanto em estágios pré-malignos quanto em tratamentos contra o câncer.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, T., DUTTA, A. **p21 in cancer: intricate networks and multiple activities.** Nat Rev Cancer., v. 9(6), 400–414, 2009.
- ABRAHAM, S. *et al.* **Evidence for Activation of the TGF- $\beta$ 1 Promoter by C/EBP $\beta$  and Its Modulation by Smads.** Journal of Interferon & Cytokine Research, v. 29, n.1, 1 – 8, 2009.
- ACOSTA, J. C., GIL, J. **A Role for CXCR2 in Senescence, but What about in Cancer?** Cancer Res., v. 69, 2167-2170, 2009.
- ACOSTA, J. C, *et al.* **Control of senescence by CXCR2 and its ligands.** Cell Cycle, v. 7:19, 2956-2959, 2008.
- ADAMS, P. D., ENDERS, G. H. **Wnt signaling and senescence: a tug of war in early neoplasia.** Cancer Biol Ther., v. 7(11): 1706–1711, 2008.
- AGGARWAL, B. B. *et al.* **Inflammation and cancer: How hot is the link?** Biochemical Pharmacology, v. 72, 1605-1621, 2006.
- AITTOKALLIO, T., SCHWIKOWSKI, B. **Graph-based methods for analyzing networks in cell biology.** Briefings in Bioinformatics, v. 7, n.3, p. 243 – 255. 2006.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da Biológica Celular.** 2. ed. Tradução: Ana Leonor Chies Santiago – Santos. Porto Alegre: Artemed, 2006.
- ALBERT, R., WANG, R-S. **Discrete Dynamic Modeling of Cellular Signaling Networks.** Methods in Enzymology: Computer Methods, vol. 476, p. 281 – 306, 2009
- ALBERT, I. *et al.* **Boolean Network simulations for life scientists.** Source Code for Biology and Medicine, v. 3: 16, p. 1 – 8, 2008.
- ALLAVENA, P. *et al.* **Pathways connecting inflammation and câncer.** Current Opinion in Genetics & Development, v. 18, 3–10, 2008.
- ALVAREZ-FERNANDEZ, M. *et al* **Recovery from a DNA-damage-induced G2 arrest requires Cdk-dependent activation of FoxM1.** EMBO Reports, vol. 11, n.6, p. 542-457, 2010.
- AUBERT, G. LANSDORP, P. M. **Telomeres and Aging.** Physiol Rev., v. 88, 557–579, 2008.
- BARABÁSI, A-L. *et al.* **Network Biology: understanding the cell's functional organization.** Nature Reviews Genetics, vol. 5, p. 101- 114 , feb. 2004.

- BARDING, A. J., AMOM, A. **Men and sin: what's the difference.** *Molecular Cell Biology*, v. 2, 815 – 826, 2001.
- BARTEK, J., LUKAS, J. **DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 19, p. 238–245, 2007.
- BARTEK, J., LUKAS, J. **Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 13:738–747, 2001.
- BARTEK, J., LUKAS, J. **Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage.** *FEBS Letters*, v. 490, 117-122, 2001.
- BATCHELOR, E. *et al.* **Recurrent Initiation: A Mechanism for Triggering p53 Pulses in Response to DNA Damage.** *Molecular Cell*, v. 30, 277–289, 2008.
- BAUMGART, D. C. **Cancer in inflammatory bowel disease.** *World J. Gastroenterol*, v. 21; 14(3): 378-389, 2008.
- BENOIT, V. *et al.* **Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 by tumor suppressor p53 requires nuclear factor-kappaB.** *Oncogene*, v. 25, 5708–5718, 2006.
- BEN-PORATH, I., WEINBERG, R. A. **The signals and pathways activating cellular senescence.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37 p. 961–976, 2005.
- BERNARDO, D. *et al.* **IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and T cells they stimulate.** *Eur. J. Immunol.*, v. 42: 1337–1353, 2012.
- BERNDT, S. I. *et al.* **Transforming growth factor beta 1 (TGFB1) gene polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma.** *Carcinogenesis*, v.28, n.9, 1965–1970, 2007.
- BERTELSEN, M., SANFRIDSON, A. **TAB1 modulates IL-1 $\alpha$  mediated cytokine secretion but is dispensable for TAK1 activation.** *Cellular Signalling*, v. 19, 646–657, 2007.
- BINET, R. *et al.* **WNT16B Is a New Marker of Cellular Senescence That Regulates p53 Activity and the Phosphoinositide 3-Kinase/AKT Pathway.** *Cancer Res.*, v. 69:9183-9191, 2009.
- BITON, S., ASHKENAZI, A. **NEMO and RIP1 Control Cell Fate in Response to Extensive DNA Damage via TNF- $\alpha$  Feedforward Signaling.** *Cell*, v. 145, 92 – 103, 2011.

- BOCACALETTI, S., *et al.* **Complex networks: Structure and dynamics.** Physics Reports, Vol. 424, p. 175 – 308, 2006.
- BOHGAKI, T. **DNA double-strand break signaling and human disorders.** Genome Integrity, v. 1, p. 1 -15, 2010.
- BURSTEIN, E, FEARON, E. R. **Colitis and cancer: a tale of inflammatory cells and their cytokines.** J. Clin. Invest., v. 118, 464–467, 2008.
- BURTON, D. G. A. **Cellular senescence, ageing and disease.** AGE, Vol. 31, 1 -9, 2009.
- CAINO, M. C. **Hallmarks for senescence in carcinogenesis: novel signaling players.** Apoptosis, v. 14, p. 392–408, 2009.
- CALZONE, L. *et al.* **Mathematical Modelling of Cell-Fate Decision in Response to Death Receptor Engagement.** PLoS Computational Biology, vol. 6, p.1 – 15, 2010.
- CAMPISI, J. *et al.* **Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease?** Seminars in Cancer Biology, v. 21 p. 354- 359, 2011.
- CAMPISI, J., d'ADDA DI FAGAGNA, F. **Cellular senescence: when bad things happen to good cells.** Nature reviews molecular cell biology, v. 8, p. 729 – 740, 2007.
- CAPPELLO, C. *et al.* **C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha.** Cell Signal., v. 21(12), 1918-24, 2009.
- CARNERO, A., LLEONART, M. E. **Epigenetic mechanisms in senescence, immortalisation and cancer.** Biol. Rev., v. 86, pp. 443–455, 2011.
- CARNES, B. A., STAATS, D. O., SONNTAG, W. E. **Does senescence give rise to disease? Mechanisms of Ageing and Development,** vol. 129, 693–699, 2008.
- CASTELLONE, M. D. *et al.* **Prostaglandin E2 Promotes Colon Cancer Cell Growth Through a Gs-Axin-b-Catenin Signaling Axis.** Science, v. 310, 1504 – 1510, 2005.
- CASTRO, M. A., *et al.* **ViaComplex: software for landscape analysis of gene expression networks in genomic context.** Bioinformatics, v.25, n.11, p.1468-69, 2009.
- CESARE, A. J. *et al.* **Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions.** Nature Structural & Molecular Biology, v. 16, 1244 – 1252, 2009.
- CESCUTTI, R. **TopBP1 functions with 53BP1 in the G1 DNA damage checkpoint.** The EMBO Journal, v. 29, 3723–3732, 2010.



- CHIEN, Y. *et al.* **Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity.** *Genes Dev.* , v. 25, 2125-2136, 2011.
- CHEUNG, C. T. Y. *et al.* **CARF: An emerging regulator of p53 tumor suppressor and senescence pathway.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 130, p. 18 – 23, 2009.
- CHEUNG, C. T. *et al.* **Molecular bridging of aging and cancer. A CARF link.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1197, p. 129 – 133, 2010.
- CHOI, E. *et al.* **COX-2 regulates p53 activity and inhibits DNA damage-induced apoptosis.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 328, 1107–1112, 2005.
- CHRISTMANN, M., *et al.* **Mechanisms of human DNA repair: un update.** *Toxicology*, vol. 193, p. 3-34, 2003.
- CIZNADIJA. D. *et al.* **Intestinal adenoma formation and MYC activation are regulated by cooperation between MYB and Wnt signaling.** *Cell Death and Differentiation*, v. 16, 1530–1538, 2009.
- CLAASSEN, G. F., HANN, S. R. **A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor  $\beta$ -induced cell-cycle arrest.** *PNAS*, v. 97, n. 17, 2000.
- COLEMAN, M. L. *et al.*, **Ras ad RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation.** *Molecular Cell Biology*, v. 5, 355 - 366, 2004.
- COLLADO, M. *et al.* **Cellular Senescence in Cancer and Aging.** *Cell*, v. 130, p. 223 – 233, 2007.
- COLLADO, M., SERRANO, M. **Senescence in tumours: evidence from mice and humans.** *Nature Reviews Cancer*, v. 10, 51 – 57, 2010.
- COPPÉ, J., *et al.* **The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression.** *Ann. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v. 5, 99 - 118, 2010.
- COUSSENS, L. M., WERB, Z. **Inflammation and câncer.** *Nature*, v. 420(6917), 860–867, 2002.
- CORY, S., ADAMS, J. M. **The BCL2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.** *Nature Reviews Câncer*, v. 2, p. 647 - 656 ,2002.
- CRAWFORD, N. M. **Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants.** *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 3, 471–478, 2006.

- CUI, G. *et al.* **Dynamic changes of interleukin-8 network along the colorectal adenoma–carcinoma sequence.** *Cancer Immunol. Immunother.*, v. 58, 1897–1905, 2009.
- DAVALOS, A. R. *et al.* **Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression.** *Cancer Metastasis Rev.*, v. 29, 273–283, 2010.
- DAVIDICH, M I., BORNHOLD, S. **Boolean Network Model Predicts Cell Cycle Sequence of Fission Yeast.** *PLoS ONE*, v. 3(2), p. 1 - 8, 2008.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F. **Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response.** *Nature Reviews Cancer*, Vol. 8, 512 – 522, 2008.
- D'ADDA DI FAGAGNA, F. *et al.* **A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.** *Nature*, v. 426 , p. 194 – 198, 2003.
- DEHAY, C., KENNEDY, H. **Cell-cycle control and cortical development.** *Nature*, v. 8, 438 – 450, 2007.
- DE LANGE, T. **How Telomeres Solve the End-Protection Problem.** *Science*, v. 326, p. 1 – 13, 2009.
- DE LANGE, T. **Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres.** *Genes Dev.*, v. 19: 2100 - 2110, 2005
- DE OLIVEIRA, R. M. **Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway.** *FEBS Letters*, v. 580, 5753–5758, 2006.
- DEL SOL, A. *et al.* **Diseases as networks perturbations.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 566 – 571, 2010.
- DEMICHELI, R., CORADINI, D. **Gene regulatory networks: a new conceptual framework to analyse breast cancer behaviour.** *Annals of Oncology*, p. 1 – 7, 2010.
- DENG, Y., CHAN, S.S., CHANG. S. **Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection.** *Nature Reviews Cancer*, Vol. 8, 450 – 458, 2008.
- DERHEIMER, F. A., KASTAN, M. B. **Multiple roles of ATM in monitoring and maintaining DNA integrity.** *FEBS Letters*, v. 584, p. 3675 – 3681, 2010.
- DI GARBO, A. *et al.* **Variable renewal rate and growth properties of cell populations in colon crypts.** *Physical Review E*, v. 81, 061909-1 - 061909-12, 2010.
- DIMAURO, T., DAVID, G. **Chromatin modifications: The driving force of senescence and aging?** *Aging*, v.1, n.2, 182-190,2009.

- DIMITROVA, N., DE LANGE, T. **Cell Cycle-Dependent Role of MRN at Dysfunctional Telomeres: ATM Signaling-Dependent Induction of Nonhomologous End Joining (NHEJ) in G1 and Resection-Mediated Inhibition of NHEJ in G2.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 29, n. 20, p. 5552–5563, 2009.
- DOGLION, C. *et al.* **p21/WAF1/CIP1 Expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation.** *J. Pathol.*, v. 179(3):248-53, 1996.
- DUBROVA, E., *et al.* **Computing attractors in dynamics networks.** IADIS International Conference on Applied Computing, p. 535 – 542, 2005.
- EDD - **Estrutura do DNA. Disponível em:** <<http://www.mitochondrialdnatesting.com/dna-double-helix-structure.html>> Acesso em:16 de junho de 2011.
- ELDER, D. J. E. *et al.* **Human colorectal adenomas demonstrate a size-dependent increase in epithelial cyclooxygenase-2 expression.** *J. Pathol.*, v. **198**: 428–434, 2002.
- ELSTON, R. INMAN, G. J. **Crosstalk between p53 and TGF- $\beta$  Signalling.** *Journal of Signal Transduction*, v. 2012, 1-10, 2012.
- EVAN, G. I., D'ADDA DI FAGAGNA, F. **Cellular senescence: hot or what?** *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 19, 25–31, 2009.
- FAN, L-M., *et al.* **Guard cells: Transcription Factors Regulate Stomatal Movements.** *Current Biology*, v. 15, n.15, p. 593 -595, 2005.
- FAN, L-M., *et al.* **Guard cells: a dynamic signaling model.** *Current Opinion in Plant Biology*, v. 7, p. 537-546, 2004.
- FAURÉ, A., *et al.* **Dynamical analysis of a generic Boolean model for the control of the mammalian cell cycle.** *Bioinformatics*, v. 22, n. 14, p. 124 – 131, 2006.
- FAUST K. *et al.* **Pathway discovery in metabolic networks by subgraph extraction.** *Bioinformatics*, vol. 26, n. 9, p. 1211 – 1218, 2010.
- FEAGINS, L. A. **Role of Transforming Growth Factor- $\beta$  in Inflammatory Bowel Disease and Colitis-associated Colon Cancer.** *Inflamm Bowel Dis.*, v.16, 1963–1968, 2010.
- FINKEL, T. **Signal transduction by reactive oxygen species.** *J. Cell Biol.*, vol. 194, n. 1, p. 7 – 15, 2011.
- FREUND, A. *et al.* **Inflammatory Networks during Cellular Senescence: Causes and Consequences.** *Trends Mol Med.*, v. 16(5): 238–246, 2010.

- FREUND, A. *et al.* **p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype.** The EMBO Journal, v. 30, 1536–1548, 2011.
- FREEMAN, A.K., MONTEIRO, A. N. **Phosphatases in the cellular response to DNA damage.** Cell Communication and Signaling, v. 8, p. 1 - 12, 2010.
- FUJIKI, T. *et al.* **TAK1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene.** Oncogene, v. 26, 5258–5266, 2007.
- FUJITA, K. *et al.* **p53 isoforms,  $\Delta 133p53$  and  $p53\beta$ , are endogenous regulators of replicative cellular senescence.** Nat Cell Biol., v.11(9): 1135–1142, 2009.
- FUMAGALLI, M., D'ADDA DI FAGAGNA, F. **SASPense and DDRama in cancer and ageing.** Nature Cell Biology, v. 11, n. 8 , 921 – 923, 2009.
- GENTLEMAN, R.; *et al.* **Bioconductor: Open Software Development for Computational Biology and Bioinformatics, Open Access,** v.5, p. 1-16, 2004.
- Gil, J., Peters, G. **Regulation of the *INK4b-ARF-INK4a* tumour suppressor locus: all for one or one for all.** Nature Reviews: Molecular Cell Biology, v. 7, 667 – 677, 2006.
- GIRE, V. *et al.* **DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence.** The EMBO Journal, v. 23, 2554–2563, 2004.
- GONZALES, A. G., *et al.* **GINsim: A software suite for the qualitative modeling, simulation and analysis of regulatory networks.** BioSystems, v. 84, p. 91 – 100, 2006.
- GOOD, M. C. **Scaffold Proteins: Hubs for Controlling the Flow of Cellular Information.** Science, v. 332, p. 680 - 686, 2011.
- GRADY, W. M. **Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling in Colorectal Câncer.** Current Colorectal Cancer Reports, v. 3, 65–70, 2007.
- GREENHOUGH, A. *et al.* **The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment.** Carcinogenesis, v.30, n. 3, 377–386, 2009.
- GRIFFITHS, A. J. F. **An Introduction to Genetic Analysis.** 9. New York: W. H. Freeman and company, 2005.
- GYRD-HANSEN, M., MEIER, P. **IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer.** Nature Reviews Cancer, v. 10, 561 – 574, 2010.
- HAN, J., SUN, P. **The pathways to tumor suppression via route p38.** TRENDS in Biochemical Sciences, v. 32, n. 8, p. 364 – 371, 2007.

- HARDY, K. *et al.* **Transcriptional Networks and Cellular Senescence in Human Mammary Fibroblasts.** *Molecular Biology of the Cell*, v. 16, 943–953, 2005.
- HARTNETT, L., EGAN, L. J. **Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer.** *Carcinogenesis*, v.33, n. .4, 723–731, 2012.
- HAUPT, S. *et al.* **Apoptosis – the p53 network.** *Journal of Cell Science*, v. 116, p. 4077- 4085, 2003.
- HABRAKEN, Y., PIETTE, J. **NF- $\kappa$ B activation by double-strand breaks.** *Biochemical Pharmacology*, v. 72, 1132 – 1141, 2006.
- HARRIS, S. L., LEVINE, A. J. **The p53 pathway: positive and negative feedback loops.** *Oncogene*, v. 24, p. 2899–2908, 2005.
- HAUPT, S. *et al.* **Apoptosis – the p53 network.** *Journal of Cell Science*, v. 116, p. 4077- 4085, 2003.
- HAYDEN, M. S. ,GHOSH, S. **Shared Principles in NF- $\kappa$ B Signaling.** *Cell*, v. 132, 344 – 362, 2008.
- HERBIG,U., SEDIVY, J. **Regulation of growth arrest in senescence: Telomere damage is not the end of the story.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 127, p. 16–24, 2006.
- HOEIJMAKERS, J, H. J. **Genome maintenance mechanisms are critical for preventing cancer as well as other aging-associated diseases.** *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 128, p. 460-462, 2007.
- HORNSBY, P. J. **Senescence and life span.** *Eur. J. Physiol.*, v. 459, 291–299, 2010.
- HOUTGRAAF, J. H. *et al.* **A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells.** *Cardiovascular Revascularization Medicine*, vol. 7, p. 162 – 172, 2006.
- HUANG, S. *et al.* **Cell Fates as High-Dimensional Attractor States of a Complex Gene Regulatory Network.** *PRL*, v. 94, p. 12871-1 - 12871- 4, 2005.
- HUAN, S., ERNBERG, I., KAUFFMAN, S. **Cancer attractors: A systems view of tumors from a gene network dynamics and developmental perspective.** *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 20(7), p. 869 – 876, 2009.
- HUSSAIN, S. P. *et al.* **Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: a cancer-prone chronic inflammatory disease.** *Cancer Res.*, v. 60:3333-3337, 2000.

- HUSSAIN, S. P., HARRIS, C. C. **Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials.** *Int. J. Câncer*, v. 121, 2373–2380, 2007.
- HWANG, E. S., YOON, G., KANG, H. T. **A comparative analysis of the cell biology of senescence and aging.** *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 66, 2503–2524, 2009.
- HYDBRING, P., LARSSON, L. **Cdk2: a key regulator of the senescence control function of Myc.** *Aging*, v. 2, n. 4, 244 – 250, 2010.
- IETA, K. *et al.* **Biological and Genetic Characteristics of Tumor-Initiating Cells in Colon Cancer.** *Annals of Surgical Oncology*, v.15(2), 638–648, 2007.
- IRIZARRY, R. A. **Exploration, Normalization, ad Summaries of High Density Oligonucleotide Array Probe Level Data.** *Biostatistics*, v.4, p.249-64, 2003.
- JEYAPALAN, J. C., SEDIVY, J. M. **Cellular senescence and organismal aging.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 129, p. 467–474, 2008.
- JIANG, H., JU, Z., RUDOLPH, K. L. **Telomere shortening and ageing.** *Z. Gerontol Geriat.* ,v. 40, p. 314–324, 2007.
- JINAWATH, A. *et al.* **Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase 3A and 3B genes by Sp3 and Sp1 zinc finger proteins.** *Biochem. J.*, v. **385**, 557–564, 2005.
- JONES, D. L., RANDO, T. A. **Emerging models and paradigms for stem cell ageing.** *Nature Cell Biology*, v. 13, p. 506 – 512, 2011.
- JONSSON, P. F., BATES, P. **A.Global topological features of cancer proteins in the human interactome.** *Bioinformatics*, vol. 22, n. 18, p. 2291 – 2297, 2006.
- KALLURI, R., ZEISBERG M. **Fibroblasts in cancer.** *Nature Reviews Cancer*, v.6, 392 -401, 2006.
- KALO, E. *et al.* **Mutant p53 Attenuates the SMAD-Dependent Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) Signaling Pathway by Repressing the Expression of TGF-  $\beta$  Receptor Type II.** *Mol. Cell. Biol.* , 27(23):8228, 2007.
- KAMRUL, H. M. *et al.* **CARF Binds to Three Members (ARF, p53, and HDM2) of the p53 Tumor-Suppressor Pathway.** *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1100, p. 312–315, 2007.
- KASTAN. M. B. **DNA Damage Responses: Mechanisms and Roles in Human Disease.** *Mol. Cancer Res.*, v. 6, p. 517 – 524, 2008.
- KASTAN, M. B., BARTEK, J. **Cell-cycle checkpoints and câncer.** *Nature*, v. 432, 316 – 323, 2004.

- KAUFFMAN, S., Peterson, C., Samuelsson, B., Troein, C. **Random Boolean network models and the yeast transcriptional network.** PNAS, v. 100, n.25, p. 14796 – 14799, 2003.
- KAUL, Z. *et al.* **Five dysfunctional telomeres predict onset of senescence in human cells.** EMBO reports, 1 - 8, 2011.
- KEIZER, P. L. J. *et al.* **p53: Pro-aging or pro-longevity?** AGING, v. 2, n. 7, 377 – 379, 2010.
- KEMIK, O. *et al.* **Transforming Growth Factor Beta-1 in Human Colorectal Cancer Patients.** Eur. J. Gen. Med., 8(1), 53-6, 2011.
- KIM, S. R. *et al.* **Selective COX-2 inhibitors modulate cellular senescence in human dermal fibroblasts in a catalytic activity-independent manner.** Mechanisms of Ageing and Development, v. 129, 706–713, 2008.
- KIM, S. *et al.* **Circulating levels of inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas.** Cancer Res. , v. 68(1), 323–328, 2008.
- KIM, Y. *et al.* **CpG Island Methylation of Genes Accumulates During the Adenoma Progression Step of the Multistep Pathogenesis of Colorectal Cancer.** Genes, Chromosomes & Câncer, v. 45:781–789, (2006).
- KLIPP, E., LIEBERMEISTER, W. **Mathematical modeling of intracellular signaling pathways.** BMC Neuroscience, v. 7(Suppl.1), 1-16, 2006.
- KOBAYASHI, T., KAGEYAMA, R. **Dynamic Advances in NF- $\kappa$ B Signaling Analysis.** Science Signaling, v. 2(81), 1 -2, 2009.
- KONG, Y. *et al.* **Regulation of Senescence in Cancer and Aging.** Journal of Aging Research, v. 2011, p. 1 – 15, 2011.
- KRAUS, S. ARBER, N. **Inflammation and colorectal câncer.** Current Opinion in Pharmacology, v. 9, 405–410, 2009.
- KRISHNAMURTHY, J. *et. al.* ***Ink4a/Arf* expression is a biomarker of aging.** The Journal of Clinical Investigation, v. 114, n. 9, p. 1299 – 1307, 2004.
- KUILMAN, T. *et al.* **The essence of senescence.** Genes Dev., v. 24, p. 2463-2479, 2010.
- KUILMAN, T., PEEPER, D. S. **Senescence-messaging secretome:SMS-ing cellular stress.** Nature Reviews Câncer, v.9, 81-94, 2009.
- KWON, Y; CHO, K. **Coherent coupling of feedback loops: a design principle of cell signaling networks.** Bioinformatics, v. 24, n. 17, 1926–1932, 2008.

- LEE, S. D., LEE, T. J., PARK, E. S. **Immunohistochemical analysis of nuclear factor, p38, and cyclin D1 proteins in premalignant lesions and carcinomas of the colorectal mucosa.** Korean J Gastroenterol., v.52(6):359-67, 2008.
- LEE, J. *et al.* **53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex.** The EMBO journal, v. 29, p. 574 – 585, 2010.
- LEEB, S. N. *et al.* **Reduced Migration of Fibroblasts in Inflammatory Bowel Disease: Role of Inflammatory Mediators and Focal Adhesion Kinase.** Gastroenterology, v. 25, 1341–1354, 2003.
- LI, S., *et al.* **Predicting Essential Components of Signal Transduction Networks: A Dynamic Model of Guard Cell Abscisic Acid Signaling.** PLoS Biology, v. 4, p. 1732 – 1748, 2006.
- LI, M., HONG, Y., WANG, X. P **Phospholipase D- and phosphatidic acid mediated signaling in plants.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1791, p. 927 – 935, 2009.
- Li, H., Lin, X. **Positive and negative signaling components involved in TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation.** Cytokine, v. 41, 1–8, 2008.
- LI, X. *et al.* **Mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) monitors commensal bacteria and induces an immune response that prevents experimental colitis.** PNAS, v. 108, n.42, 17390 – 17395, 2011.
- LIANG, Y. *et al.* **DNA Damage Response Pathways in Tumor Suppression and Cancer Treatment.** World J. Surg., v. 33, p. 661 – 666, 2009.
- LIU, S. *et al.* **Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation.** Mol. Cell. Biol., v. 26(16), p. 6056 – 6064, 2006.
- LIU, F. *et al.* **Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation.** Nature Cell Biology, v. 13, n. 3, 254 - 264, 2011.
- LIU H, *et al.* **Selective protein degradation in cell signalling.** Semin Cell Dev Biol (2012), doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.014.
- LOFFELD, R. J. **Colorectal adenomas in patients presenting with inflammatory bowel disease.** Neth. J. Med., v. 67:21–24, 2009.
- LUO, F. *et al.* **Modular organization of protein interaction networks.** Bioinformatics. vol. 23, n.2, p. 207-214, 2007.
- MANDAL, K. M. **DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences.** Molecular cell Biology, v. 12, p. 198 – 202, 2011.



- MASLOV, A., VIJG, J. **Genome instability, cancer and aging.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1790, p. 963–969, 2009.
- MAZZUCHELLI, L. *et al.* **Expression of Interleukin-8 Gene in Inflammatory Bowel Disease is Related to the Histological Grade of Active Inflammation.** American Journal of Pathology, Vol. 144, No. 5, 997 – 1007, 1994.
- MCCOOL, K. W., MIYAMOTO S. **DNA damage-dependent NF- $\kappa$ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out.** Immunological Reviews, v. 246, 311–326, 2012.
- MORAES, F. *et al.* **Cross-talks between cyclooxygenase-2 and tumor suppressor protein p53: Balancing life and death during inflammatory stress and carcinogenesis.** Int. J. Câncer, v. 121, 929–937 (2007)
- MORDES, D. A. *et al.* **TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain.** GENES & DEVELOPMENT, v. 22, p.1478–1489, 2008.
- MIYAMOTO, S. **Nuclear initiated Nf- $\kappa$ B signaling: NEMO and ATM take center stage.** Cell Research, v. 21, 116 -130, 2011.
- MU, Y. *et al.* **Non-Smad signaling pathways.** Cell Tissue Res., v. 347, 11–20, 2012.
- MUSSEL, C., *et al.* **BoolNet – an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean Networks.** Bioinformatics. vol. 26, n.10, p. 1378 - 1380, 2010.
- NAOKO OHTANI, N., MANN, D. J., HARA, E. **Cellular senescence: Its role in tumor suppression and aging.** Cancer Sci., v. 100, n. 5, 792 – 797, 2009.
- NEILL, S. *et al.* **Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress.** Journal of Experimental Botany, Vol. 59, No. 2, 165–176, 2008.
- NISHIMURA, M., *et al.* **TAK1-Mediated Serine/Threonine Phosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor via p38/Extracellular Signal-Regulated Kinase: NF- $\kappa$ B-Independent Survival Pathways in Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling.** Mol. Cell. Biol., v. 29, n. 20, 5529-5539, 2009.
- NOACK-CHUAIRE, L. *et al.* **The Dual Role of Senescence in Tumorigenesis.** Int. J. Morphol., v. 28, 37 -50, 2010.
- NOGUEIRA, V. *et al.* **Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis.** Cancer Cell, v 9; 14(6): 458–470, 2008.
- O'CONNOR, C. **Cell Division: Stages of Mitosis.** Nature Education 1(1), 2008.

- OGATA, H. *et al.* **GRO $\alpha$  promotes invasion of colorectal cancer cells.** ONCOLOGY REPORTS, v. 24, p. 1479-1486, 2010.
- OH, J., HAN, J., HWANG, E. S. **Downregulation of transcription factor, Sp1, during cellular senescence.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 353, 86–91, 2007.
- OHTANI, N. *et al.* **The p16<sup>INK4</sup> – RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression.** The Journal of Medical Investigation, v. 51, p. 146 – 153, 2004.
- OHTANI, N. *et al.* **Cellular senescence: a double-edged sword in the fight against cancer.** Experimental Dermatology, v. 21 (Suppl. 1), 1–4, 2012.
- OREN, M. **Decision making by p53: life, death and cancer.** Cell Death and Differentiation, v.10, 431–442, 2003.
- ORJALO, A. V. *et al.* **Cell surface-bound IL-1 $\alpha$  is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network.** PNAS, v. 106, n. 40, 17031–17036, 2009.
- O’SULLIVAN J. N. *et al.* **Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening.** Nature Genetics, v. 32, 280 – 284, 2002.
- PALLADINO, M. A. *et al.* **Anti-TNF- $\alpha$  Therapies: the next generation.** Nature Reviews: Drug Discovery, v. 2, 736 – 746, 2003.
- PALM, W., DE LANGE, T. **How Shelterin Protects Mammalian Telomeres.** Annu. Rev. Genet., v. 42, p. 301-334, 2008.
- PAN, J. *et al.* **Klotho, an anti-senescence related gene, is frequently inactivated through promoter hypermethylation in colorectal cancer.** Tumor Biol., v. 32, 729–735, 2011.
- PANIERA, S., DUROCHER, D. **Regulatory ubiquitylation in response to DNA double-strand breaks.** DNA Repair, v. 8, p. 436–443, 2009.
- PARK, J. *et al.* **p53-Independent expression of wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) in methylmethane sulfonate-treated cancer cell lines and human tumors.** Int. J. Biochem. Cell Biol., v. 44(6), 896-904, 2012.
- PASPARAKIS, M. **IKK/NF- $\kappa$ B signaling in intestinal epithelial cells controls immune homeostasis in the gut.** Mucosal Immunology, v.1 (Suppl 1), S54–S57, 2008.

- PLANKAR, M., JERMAN, I., Krasovec, R. **On the origin of cancer: Can we ignore coherence?**. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 106, p. 380 – 390, 2011.
- PEARSON, M., PELICCI, P. G. **PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence**. *Oncogene*, v. 20, p. 7250 – 7256, 2001.
- PEI, Z., *et al.* **Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* Wild-Type and *abi1* and *abi2* Mutants**. *Plant Cell*, v. 9, p. 409 – 423, 1997.
- PLENTZ, R. R. *et al.* **Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer**. *Gut*, v. 52:1304–1307, 2003.
- POEHLMANN, A., ROESSNER, A. **Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers**. *Pathology – Research and Practice*, v. 206, p. 591 – 601, 2010.
- POLLOK, S. *et al.* **Human Cdc45 is a proliferation-associated antigen**. *FEBS Journal*, v. 274, p. 3669–3684, 2007.
- PURVIS, J. E. *et al.* **p53 Dynamics Control Cell Fate**. *Science*, v. 336, 1440 – 1444, (2012).
- RAMPAZZO, E. *et al.* **Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers**. *British Journal of Cancer*, v. 102, 1300 – 1305, 2010.
- RANGAMANI, P., SIROVICH, L. **Survival and Apoptotic Pathways Initiated By TNF- $\alpha$ : Modeling and Predictions**. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, N. 5, 1216 – 1229, 2007.
- RANJAN, R. *et al.* **C/EBP $\alpha$  expression is partially regulated by C/EBP $\beta$  in response to DNA damage and C/EBP $\alpha$ -deficient fibroblasts display an impaired G<sub>1</sub>checkpoint**C/EBP $\alpha$  is regulated by C/EBP $\beta$  in response to DNA damage. *Oncogene*, v. 28(36), 3235–3245, 2009.
- REDDY, K. P. *et al.* **Lamina Propria and Circulating Interleukin-8 in Newly and Previously Diagnosed Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients**. *Dig. Dis. Sci.*, v. 52:365–372, 2007.
- REINHARDT, H. C., YAFFE, M. B. **Kinases that Control the Cell Cycle in Response to DNA Damage: Chk1, Chk2, and MK2**. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 21(2), p. 245 – 255, 2009.

- REN, J - L *et al.* **Inflammatory signaling and cellular senescence.** Cellular Signaling, v. 21, 378 – 383, 2009.
- RHEE, I. *et al.* **DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells.** Nature, v. 416, 552-556, 2002.
- RIETHMAN, H. **Human Telomere Structure and Biology.** Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., v. 9:1–19, 2008
- RISQUES, R. A., *et al.* **Ulcerative colitis is a disease of accelerated colon aging: evidence from telomere attrition and DNA damage.** Gastroenterology, v. 135(2), 410–418, 2008.
- RISQUES, R. A., *et al.* **Ulcerative colitis-associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation.** Cancer Res. , v. 71(5), 1669–1679, 2011.
- RIZZO, A. *et al.* **Intestinal inflammation and colorectal cancer: A double edged sword?** World J. Gastroenterol., v. 17(26), 3092-3100, 2011.
- ROBERTS, A. B. WAKEFIELD, L. M. **The two faces of transforming growth factor  $\beta$  in carcinogenesis.** PNAS, v. 100, n. 15 , 8621–8623, 2003.
- ROBERTSON, K. D. **DNA Methylation and Human Disease.** Nature Genetics, v. 6, 597 – 610, 2005
- RODIER, F. CAMPISI, J. **Four faces of cellular senescence.** J. Cell Biol., p. 1-10, 2011.
- RODIER, F. *et al.* **DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion.** Journal of Cell Science, v. 124, 68-81, 2010.
- RODIER, F. *ET AL.* **Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion.** Nature Cell Biology, v. 11, n. 8, 973 – 979, 2009
- ROSSI, D. J. *et al.* **Stems Cells and the Pathways to Aging and Cancer.** Cell, v. 132, p. 681 – 696, 2008.
- ROMERO, M. *et al.* **Evaluation of the Immunoexpression of COX-1, COX-2 and p53 in Crohn's Disease.** Arq. Gastroenterol., v. 45, n.4, 295-300, 2008.
- SAAB, R. **Senescence and pre-malignancy: How do tumors progress?** Seminars in Cancer Biology, v. 21, 385–391, 2011.
- SABATEL, H. *et al.* **Importance of PIKKs in NF-kB activation by genotoxic stress.** Biochemical Pharmacology, v. 82, 1371–1383, 2011.

- SAITO, S. *et al.* **DNA Methylation of Colon Mucosa in Ulcerative Colitis Patients: Correlation with Inflammatory Status.** *Inflamm. Bowel Dis.*, v. 17, n. 9, 1955 – 1965, 2011.
- SALMINEN, A., KAARNIRANTA, K. **Control of p53 and NF- $\kappa$ B signaling by WIP1 and MIF: Role in cellular senescence and organismal aging.** *Cellular Signalling*, v. 23, 747–752, 2011.
- SALMINEN, A., KAUPPINEN, A., KAARNIRANTA, K. **Emerging role of NF- $\kappa$ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP).** *Cellular Signalling*, v.24, 835–845, 2012.
- SALMINEN, A., KAARNIRANTA, K. **NF- $\kappa$ B Signaling in the Aging Process.** *J. Clin. Immunol.*, v. 29, 397–405 2009.
- SALMINEN, A., OJALA, J., KAARNIRANTA, K. **Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhances the aging process.** *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 68, 1021–1031, 2011.
- SALOMONI, P. *et al.* **New insights into the role of PML in tumour suppression.** *Cell Research*, v. 18, p. 622-640, 2008.
- SAMEER, A. S. *et al.* **Colorectal cancer, TGF- $\beta$  signaling and SMADs.** *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, v. 2(6), 101-111, 2010.
- SANG, L. *et al.* **Control of the Reversibility of Cellular Quiescence by the Transcriptional Repressor HES1.** *Science*, v. 321, 1095 – 1100, (2008).
- SANCAR, A., *et al.* **Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage checkpoints.** *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 73, p. 39 – 85, 2004.
- SANTIBAÑES, J. F., QUINTANILLA, M., BERNABEU, C. **TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions.** *Clinical Science*, v. 121, 233–251, 2011.
- SARTHY, J. *et al.* **Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres.** *The EMBO Journal*, v. 28, p. 3390–3399, 2009.
- SCAGLIONI, P. P. *et al.* **A CK2-Dependent Mechanism for Degradation of the PML Tumor Suppressor.** *Cell*, v. 126, p. 269–283, 2006
- SCHMID, A., BIRBACH, A. **I $\kappa$ B kinase b (IKKb/IKK2/IKBKB)—A key molecule in signaling to the transcription factor NF- $\kappa$ B.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 19, 157–165, 2008.

- SCHMIDT, W. M. *et al.* **Progressive Up-Regulation of Genes Encoding DNA Methyltransferases in the Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence.** *Molecular Carcinogenesis*, v. 46:766–772, 2007.
- SCHETTER, A. J. *et al.* **Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways.** *Carcinogenesis*, v.31, n.1, 37–49, 2010.
- SERRANO, M. **A lower bar for senescence.** *Nature*, vol. 464, 363 – 364 , 2010.
- SHAN, W. *et al.* **The inflammatory network: bridging senescent stroma and epithelial tumorigenesis.** *Front Biosci.* , v. 14, 4044–4057, 2010.
- SHAY, J. W., WRIGHT, W. E. **Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase.** *Carcinogenesis*, vol. 26, n. 5, p. 867 -874, 2005.
- SHELTON, D. N. *et al.* **Microarray analysis of replicative senescence.** *Current Biology*, v. 9, 939–945, 1999.
- SHEREIM, A. *et al.* **Complex network analysis of state spaces for random Boolean networks.** *New Journal of Physics*, v. 10, p. 1 – 17, 2008.
- SHERMAN, M. H., *et al.* **Regulation of cell differentiation by the DNA damage response.** *Trends in Cell Biology*, vol. 21, n. 5, p. 312 – 319, 2011.
- SHIMADA, M., NAKANISHI, M. **DNA damage checkpoints and câncer.** *J. Mol. Hist.*, v, 37:253–260, 2007.
- SHIM, J. *et al.* **TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo.** *Genes & Development*, v. 19, 2668–2681, 2005.
- SHIMADA, M., NAKANISHI, M. **DNA damage checkpoints and câncer.** *J. Mol. Hist.* v. 37, p. 253–260, 2006.
- SHMULEVICH, I., DOUGHERTY, E. R. **Probabilistic Boolean Networks: the modeling and control of gene regulatory networks.** *Society for Industrial and Applied Mathematics*, 2010.
- SHMULEVICH, I., KAUFFMAN, S. A., ALDANA, M. **Eukaryotic cells are dynamically ordered or critical but not chaotic.** *PNAS*, v. 102, n. 38, p. 13439 – 13444, 2005.
- SIKORA, E., *et al.* **Impact of cellular senescence signature on ageing research.** *Ageing Research Reviews*, vol. 10, 146–152. 2011.
- SILVERMAN, N. *et al.* **Immune Activation of NF- $\kappa$ B and JNK Requires *Drosophila* TAK1.** *The Journal of Biological Chemistry*. v. 278, n. 49, 48928–48934, 2003.

- SIMÃO, E. M. *et al.* **Modeling the Human Genome Maintenance network.** *Physica A*, v. 389, p.4188 – 4194, 2010.
- SO, S., *et al.* **Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage at sites.** *J. Cell Biol.*, vol. 187,n. 7, p. 977 – 990, 2009.
- ST-DENIS, N. A., LITCHFIELD, D. W. **From birth to death: The role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival.** *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 66, p. 1817 – 1829, 2009.
- STEWART, S. A., WEINBERG, R. A. **Telomeres: Cancer to Human Aging.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 22:531–57, 2006.
- STOHR, B. A, BLACKBURN, E. H. **ATM Mediates Cytotoxicity of a Mutant Telomerase RNA in Human Cancer Cells.** *Cancer Res.*, vol. 68, p. 5309 – 5317, 2008.
- STRACKER, T. H., PETRINI, J. H. J. **The MRE11 complex: starting from the ends.** *Nature Review: Molecular Cell Biology*, v. 12, 90 – 103, 2011.
- SUBBARAMAIAH, K. *et al.* **Inhibition of Cyclooxygenase-2 Gene Expression by p53.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 16, 10911–10915, 1999.
- SUN, J., ZHAO, Z. **A comparative study of cancer proteins in the human protein-protein interaction network.** *BMC Genomics*, Vol. 11, Suppl. 3, 2010.
- TAKAESU, G. *et al.* **TAK1 is Critical for I $\kappa$ B Kinase-mediated Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway.** *J. Mol. Biol.*, v. 326, 105–115, 2003.
- TAKAHASHI, A. *et al.* **DNA Damage Signaling Triggers Degradation of Histone Methyltransferases through APC/CCdh1 in Senescent Cells.** *Molecular Cell*, v. 45, 123–131, 2012.
- TAN, H. H., PORTER, A. G. **p21<sup>WAF1</sup> negatively regulates DNMT1 expression in mammalian cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 382, 171–176, 2009.
- TAPIAS, A *et al.* **Regulation of Sp1 by cell cycle related proteins.** *Cell Cycle*, v. 7(18): 2856–2867, 2008.
- THORNTON, T.M., RINCON, M. **Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival.** *Int. J. Biol. Sci.* 2009, V. 5, p. 44 – 52, 2009.
- TLSTY, T. D., COUSSENS, L. M. **Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development.** *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, v. 1, 119–50, 2006.

- TRESINI, M. *et al.* **Modulation of Replicative Senescence of Diploid Human Cells by Nuclear ERK Signaling.** *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 4136 – 4151, 2007.
- TRIANAFILLIDIS, J. K. *et al.* **Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Risk Factors, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies.** *Anticancer Research*, v. 29: 2727-2738, 2009.
- TSIRPANLIS, G. **Cellular Senescence and Inflammation: A Noteworthy Link.** *Blood Purif.*, v.28, 12–14, 2009.
- TSUKADA, J. *et al.* **The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation.** *Cytokine*, v. 54(1), 6-19, 2011.
- TYSON, J. J., NOVAK, B. **Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle: Molecular Antagonism, Hysteresis, and Irreversible Transitions.** *J. Theor. Biol.*, v. 210, 249 -263, 2001.
- UMEZAWA, T. *et al.* **Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport.** *Plant Cell Physiol.*, v. 51(11), p. 1821 – 1839, 2010.
- VANDENBERK, B. *et al.* **p16<sup>INK4a</sup> INK4a: A central player in cellular senescence and a promising aging biomarker in elderly cancer patients.** *Journal of Geriatric Oncology*, v.2 , 259 - 269, 2011.
- VARNEY, M. I. *et al.* **Small molecule antagonists for CXCR2 and CXCR1 inhibit human colon cancer liver metastases.** *Cancer Letters*, v. 300,180–188, 2011.
- VAUGHAN, S. JAT, P. S. **Deciphering the role of Nuclear Factor-κB in cellular senescence.** *Aging*, v. 3 , 913 – 919, 2011.
- VERBEKE, H., STRUYF, S., LAUREYS, G. **The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 22, 345 – 358, 2011.
- VERGEL, M. *et al.* **Cellular Senescence as a Target in Cancer Control.** *Journal of Aging Research*, v. 2011, p. 1 – 12, 2011.
- VERMEULEN, K., BERNEMAN, Z. N., BOCKSTAELE, D. R. V. **Cell cycle and apoptosis.** *Cell Prolif.*, v. 36, 165 -175, 2003.
- VERNIER, M. *et al.* **Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies.** *Genes Dev.*, v. 25, p. 41-50, 2011.



- VON ZGLINICKI, T. *et al.* **Human cell senescence as a DNA damage response.** *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 126, 111–117, 2005.
- WAETZIG, G. H. *et al.* **p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Activated and Linked to TNF- $\alpha$  Signaling in Inflammatory Bowel Disease.** *J. Immunol.*, v. 168;5342-5351, 2002.
- WAGNER, E. F., NEBREDA, A. R. **Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development.** *Nature reviews Cancer*, v. 9, p. 537 – 549, 2009.
- WALSH, C. T. *et al.* **Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications.** *Angew. Chem. Int.*, v. 44, p. 7342 – 7372, 2005
- WANG, M. L. *et al.* **Gene expression signature of c-MYC-immortalized human fibroblasts reveals loss of growth inhibitory response to TGF $\beta$ .** *Cell Cycle*, v. 1; 10(15), 2540 – 25488, 2011.
- WANG, Y., SUN, Z. **Current Understanding of Klotho.** *Ageing Res Rev.*, v. 8(1), 43–51, 2009.
- WANG, J. *et al.* **Toward and understanding of the protein interaction network of the human liver.** *Molecular Systems Biology*, Vol.7, n.536, p. 1 – 10, 2011.
- WANG, S. *et al.* **NF- $\kappa$ B Signaling Pathway, Inflammation and Colorectal Cancer.** *Cellular & Molecular Immunology*, v. 6, n.5, 327 – 334, 2009.
- WANG, Z., ZHANG, J. **In search of the Biological Significance of Modular Structures in Protein Networks.** *PLoS Computational Biology*, v. 3, p. 1011 – 1021, 2007.
- WATSON, J. D. *et al.* **Biologia Molecular do gene.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- WEINBERG, R. A. **A biologia do cancer.** Tradução Bruna Selbach *et al.* Porto Alegre: Artmed, 2008.
- WILHELM, P., De LANGE, T. **How Shelterin Protects Mammalian Telomeres.** *Annu. Rev. Genet.*, v. 2, p. 301–34, 2008.
- WILSON, L. D.; STEVEN, J. NEILL, S. J.; HANCOCK, J. T. **Nitric oxide synthesis and signaling in plants.** *Plant, Cell and Environment*, Vol. 31, 622–631, 2008.
- Wong, N. A. C. S. *et al.* **Cyclin D1 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> in Ulcerative Colitis–Related Inflammation and Epithelial Neoplasia: A Study of Aberrant Expression and Underlying Mechanisms.** *Hum. Pathol.*, v. 34(6):580-8, 2003.
- WU, J., XUE, L., WENG, M., SUN, Y. **Sp1 is essential for p16 expression in human diploid fibroblasts during senescence.** *PLoS ONE* 2, e164, 2007

- XIN, H., LIU, D., SONGYANG, Z. **The telosome/*Shelterin* complex and its functions.** *Genome Biology*, Vol. 9:232, 2008.
- XIONG, L., ZHU, J - K. **Regulation of Abscisic Acid Biosynthesis.** *Plant Physiology*, v. 133, p. 29 – 36, 2003.
- XIOMG, H., CHOE, Y. **Dynamical pathway analysis.** *BMC Systems Biology*, v. 2, n.9, p. 1 – 17, 2008.
- XU, Y., PASCHE, B. **TGF- $\beta$  signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer.** *Hum Mol Genet.*, 16(Spec), R14-20, 2007.
- YAMAKOSHI, K. *et al.* **Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53.** *J. Cell Biol.*, v. 186, n. 3, 393 – 407, 2009.
- YANG, Y. *et al.* **A Cytosolic ATM/NEMO/RIP1 Complex Recruits TAK1 To Mediate the NF- $\kappa$ B and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)/MAPK-Activated Protein 2 Responses to DNA Damage.** *Molecular and Cellular Biology*, 2774–2786, 2011.
- YE, X. *et al.* **Downregulation of Wnt signaling is an early signal for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells.** *Mol Cell.*, v. 27(2): 183–196, 2007.
- YE, X. *et al.* **Downregulation of Wnt Signaling Is a Trigger for Formation of Facultative Heterochromatin and Onset of Cell Senescence in Primary Human Cells Downregulation of Wnt Signaling Is a Trigger.** *Molecular Cell*, v. 27, 183–196, 2007.
- YOU, H., DING, W., ROUNTREE, C. B. **Epigenetic Regulation of Cancer Stem Cell Marker CD133 by Transforming Growth Factor- $\beta$ .** *Hepatology*, v. 51, n. 5, 1635 -1644, 2010.
- YOUNG, A. R. J., NARITA, M. **SASP reflects senescence.** *EMBO reports*, v. 10, 228–230, 2009.
- YUSHENG CONG, Y., SHAY, J. W. **Actions of human telomerase beyond telomeres.** *Cell Research*, v.18:725-732, 2008.
- ZARUBIN, T., HAN, J. **Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway.** *Cell Research*, v. 15(1), p. 11-18, 2005.
- ZDANOV, S. *et al* **p53 and ATF-2 partly mediate the overexpression of COX-2 in H2O2-induced premature senescence of human fibroblasts.** *Biogerontology*, v. 10, 291–298, 2009.

- ZHANG, H. **Molecular Signaling and Genetic Pathways of Senescence: Its Role in Tumorigenesis and Aging.** *Journal of Cellular Physiology*, v. 210, p. 567-574, 2007.
- ZHANG, Q. *et al.* **TGF- $\beta$  Regulates DNA Methyltransferase Expression in Prostate Cancer, Correlates with Aggressive Capabilities, and Predicts Disease Recurrence.** *PLoS ONE*, v. 6(9): e25168, 2011.
- ZHANG, R. *et al.* **Network model of survival signaling in large granular lymphocyte leukemia.** *PNAS*, Vol. 105, n.42, p. 16308-16313, 2008.
- ZHANG, W. *et al.* **Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence.** *Life Sciences*, v. 83, 475–480, 2008.
- ZHANG, X., LIU, F., WANG, W. **Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response.** *PNAS*, v. 108, n.22, 8990 - 8995 , 2011.
- ZHANG, Y. E. **Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling.** *Cell Res.*, v. 19(1): 128–139, 2009.
- ZHU, H., BELCHER, M., HARST, P. V. D. **Healthy aging and disease: role for telomere biology?** *Clinical Science*, v. 120, 427–440, 2011.
- ZHU, Y. *et al.* **Expression of human DNA methyltransferase 1 in colorectal cancer tissues and their corresponding distant normal tissues.** *Int. J. Colorectal Dis.*, v. 22:661–666, 2007.
- ZMIJEWSKI, J. W., JOPE, R. S. **Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts.** *Aging Cell*, v. 3(5): 309–317, 2004.
- ZUCKERMAN, V., *et al.* **Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence.** *Journal of Pathology*, vol. 219: 3–15, 2009.

## APÊNDICE 1 – Vias de sinalização da parada do ciclo celular

Um modelo consistindo de uma rede regulatória para a execução da parada permanente do ciclo celular envolve cinco vias distintas: duas vias envolvendo CHK1 e CHK2 estão relacionadas com a rápida sinalização da parada e as outras três estão relacionadas com a manutenção da parada através da regulação de p53 e p16<sup>ink4a</sup> por p38 conforme a Figura 18. Além disso, resultados obtidos com camundongos *in vivo*, indicam que oncogenes insultos com ativação de ras provocam a desrepressão de expressão de p16<sup>ink4a</sup> através da redução da metiltransferase DNMT1, inclusive a ativação de p16<sup>ink4a</sup> é acelerada na ausência de p53 (YAMAKOSHI *et al.*, 2009), indicando que a dinâmica envolvendo as cinco vias envolve conexões entre as vias para manter a parada do ciclo celular.

Dessa forma, pode-se supor que o DNA telomérico é organizado em fita dupla e fita simples para manter a integridade da célula através da estrutura *t-loop* em células mitóticas e a integridade da célula senescente através da amplificação da sinalização de danos no DNA a partir da ativação de várias vias de sinalização da parada na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular. Abaixo as cinco vias são descritas juntamente com a relação da via com a senescência replicativa.

### Via CHK2

A partir da fosforilação de CHK2 por ATM iniciada por TRF2, ocorre uma rápida parada do ciclo celular através da fosforilação de CDC25A por CHK2 e sua degradação por ubiquitinação, seguido do acúmulo da forma fosforilada (inativa) de CDK2, que por sua vez é incapaz de fosforilar CDC45 e iniciar a replicação (PALM *et al.*, 2008; SANCAR *et al.*, 2004; HERBIG *et al.*, 2006). CDC45 é uma proteína chave no controle da replicação do DNA para garantir que o DNA cromossomal seja replicado somente uma vez por ciclo e contribui também para a entrada da célula no estado senescente. Esta proteína é ausente em células humanas senescentes, mas está ativa através de todo o ciclo celular de células mitóticas e seu nível é aumentado em carcinomas humanos (D'ADDA DI FAGAGNA *et al.*, 2003; PLLOK *et al.*, 2007). CHK2 também é fundamental para a expressão de p21 através de p53 em fibroblastos humanos, visto que a inativação de CHK2 implica em uma falha na expressão de p21 (SANCAR *et al.*, 2004; GIRE *et al.*, 2004). Resultados experimentais mostram a ativação de ambos CHK1 e CHK2 em células senescentes

caracterizadas pelo desgaste dos telômeros, indicando a importância destes elementos para a entrada de uma célula no estado de senescência replicativa (D'ADDA DI FAGAGNA *et al.*, 2003; VERGEL *et al.*, 2011). Além da regulação de CDC45 e p53, CHK2 juntamente com CHK1, fosforilam CDC25A, induzindo a sua degradação e a manutenção do complexo CDK2/CyclinE na forma hiperfosforilada e inativa, impedindo a fosforilação de pRb e liberação de E2F (POEHLMANN *et al.*, 2010).

### Via CHK1

A fosforilação e a atividade quinase de CHK1 dependem de um mecanismo preciso envolvendo ATR e seus reguladores. O recrutamento de ATR na região do DNA telomérico, assim como em uma região com dano no DNA, ocorre através da interação entre ATRIP e RPA (SHIMADA *et al.*, 2006; BARTEK *et al.*, 2007). A atividade quinase de ATR é dependente de sua interação com ATRIP para garantir sua estabilização e promover a sinalização de seus substratos. TOPBP1 é necessário para a ativação de ATR através de ATRIP (BARTEK *et al.*, 2007; MORDES *et al.*, 2008). Esta ativação é competente para ativar muitos substratos de ATR, mas em particular, a ativação de CHK1 requer o mediador CLASPIN, cuja ativação ocorre a partir de TOPBP1 (BARTEK *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2006).

Assim como CHK2, CHK1 induz a rápida parada do ciclo celular através da fosforilação de CDC25A e sua degradação por ubiquitinação, seguido do acúmulo da forma fosforilada (inativa) de CDK2, que por sua vez, é incapaz de fosforilar CDC45 e iniciar a replicação (SHIMADA *et al.*, 2006). Além disso, CHK1 também fosforila p53 para garantir a manutenção da parada do ciclo celular em G<sub>1</sub>.

### Via p16

Tradicionalmente a manutenção da parada do ciclo celular está relacionada a regulação de duas vias independentes representadas por p14<sup>ARF</sup> e p16<sup>INK4</sup> em células humanas, onde ambas são caracterizados por uma expressão aumentada particularmente em fibroblastos humanos (SANCAR *et al.*, 2004; WALSH *et al.*, 2005). O locus *Ink4a/Arf* codifica os supressores de tumor p16<sup>INK4</sup> e p14<sup>ARF</sup> (ARF humanos) para atuarem na mediação da senescência. A importância de p16<sup>INK4</sup> como um supressor de tumor através da senescência é evidenciada por vários tipos

de câncer em humanos onde p16<sup>INK4</sup> aparece frequentemente alterado (POLLOK *et al.*, 2007). Além do câncer, p16<sup>INK4</sup> também é um importante marcador de envelhecimento, seu nível de expressão é basal ou ausente em organismos jovens, mas para organismos velhos é caracterizado por um nível de expressão aumentado (CHEUNG *et al.*, 2009; JEYAPALAN *et al.*, 2008; KONG *et al.*, 2011; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2004).

A ativação de p16<sup>INK4</sup> em senescência replicativa está relacionada a proteínas envolvidas na via p38MAPK, mais precisamente MKK3 e MKK6 que regulam a ativação de p16<sup>INK4</sup> por p38MAPK. Se por um lado o mutante MKK6 induz a inativação de p38 e o atraso do início da senescência replicativa (HAN *et al.*, 2007), as expressões de MKK6 e MKK3 resultam na ativação de p38 e na parada do ciclo celular (KONG, 2011).

Existem dois complexos quinases importantes para a regulação da transição G<sub>1</sub>/S, um é formado pelo complexo CDK4/6-Cyclin D e o outro por CDK2-Cyclin E. Estes dois complexos são reguladores de pRb, que por sua vez, atua na promoção do fator de transcrição E2F, induzindo a expressão de genes necessários para preparar a célula para a fase S (SANCAR *et al.*, 2004). Normalmente a parada do ciclo celular ocorre através da hipofosforilação de pRb na metade de G<sub>1</sub> pelo complexo CDK4/6-Cyclin D seguido pela hipofosforilação pelo complexo CDK2-Cyclin E na fase final de G<sub>1</sub>, para garantir a repressão do fator de transcrição E2F por pRb. Por outro lado, na forma fosforilada pRb dissocia-se de E2F para permitir a transcrição dos genes necessários para a transição para a fase S (SANCAR *et al.*, 2004; HERBIG *et al.*, 2006). Para a parada do ciclo celular através de pRb, p16<sup>INK4</sup> funciona como inibidor de CDK4 e CDK6, de forma que pRb é mantido na sua forma hipofosforilada e conseqüentemente ocorre o bloqueio da transição G<sub>1</sub>/S (POLLOK *et al.*, 2007; JEYAPALAN *et al.*, 2008).

### **Via p53**

Os diferentes tipos de células em humanos sofrendo vários tipos de estresses são os principais motivos da diversidade de mecanismos utilizados para a ativação da senescência replicativa a partir dos encurtamento dos telômeros. Além de p16<sup>INK4</sup>/pRb, a regulação do estado senescente através da via p14ARF/p53/p21/pRb é caracterizada pelo aumento da expressão de p21, que por sua vez, controla a

progressão do ciclo celular inibindo a fosforilação de pRb através do complexo cyclin E/CDK2 (ZHANG, 2007; SIKORA *et al.*, 2011; VERGEL *et al.*, 2011). O aumento da expressão de p21 ocorre com a estabilização de p53, envolvendo uma precisa interação entre as proteínas HMD2, ARF e CARF. HMD2 é o maior regulador negativo de p53 através de sua degradação proteossomal, visto que para uma célula funcionando normalmente, p53 é rapidamente degradada, enquanto o acúmulo de p53 ocorre quando uma célula é exposta à diferentes tipos de estresses (HAUPT *et al.*, 2003). Juntando-se ao mecanismo de regulação de p53, ARF e CARF (colaborador de ARF) tem como principal função promover a degradação de HMD2 de uma maneira colaborativa, células senescentes de fibroblastos humanos expressam estas duas proteínas ao mesmo tempo, sugerindo que as duas estão envolvidas na estabilização uma da outra e atuam juntas também na degradação de HMD2, enquanto que p53 e ARF são degradadas por HMD2 (CHEUNG *et al.*, 2009; CHEUNG *et al.*, 2010). Como estas proteínas são críticas para o estabelecimento da senescência replicativa e estão geralmente inativas em tumores humanos (CHEUNG *et al.*, 2010), isto sugere um mecanismo muito bem articulado entre ARF, CARF, HMD2 e p53. Em células normais HMD2 deve promover a degradação de p53 através da inibição de ARF e CARF, enquanto que para a entrada e a manutenção do estado senescente ARF, CARF formam um mecanismo redundante para garantir que p53 não seja degradado por HMD2, impedindo dessa forma que a célula não avance do estágio M1 para o estágio M2 da senescência replicativa. Na ausência de ARF, a ativação direta de p53 por CARF (KAMRUL *et al.*, 2007), sugere CARF como um potencial supressor de tumor a partir da ativação da parada permanente através da via CARF/p53/p21.

A regulação de p53 em senescência replicativa envolve também dois marcadores importantes p38MAPK e PML (POEHLMANN *et al.*, 2010; SALOMONI *et al.* 2008). Parte da ativação de p53 depende da fosforilação de p53 pela quinase p38MAPK (HARRIS *et al.*, 2005) e a relação entre estas duas proteínas direta ou indiretamente também pode ser evidenciada em senescência replicativa quando a inativação de p38MAPK induz o atraso do início do estado senescente em fibroblastos humanos (WAGNER *et al.*, 2009), o que sugere uma regulação do locus *Ink4a/Arf* INKA por p38MAPK para garantir a inibição de p16<sup>INK4</sup> e ARF (THORNTON *et al.*, 2009; POEHLMANN *et al.*, 2010). A proteína leucemia promielocítica (PML) está relacionada com leucemia promielocítica aguda e também é conhecida como

uma supressora de tumor através da indução de apoptose ou senescência replicativa (PEARSON *et al.*, 2001; SCAGLIONI *et al.*, 2006). A resposta de p53 a diferentes tipos de estresses depende do seu estatus: conformação, localização, atividade e estabilidade (CLASS) (ZUCKERMAN *et al.*, 2009) e nesse sentido PML facilita a acetilação, estabilização e a ativação de p53 por fosforilação principalmente durante respostas à diferentes tipos de estresses. O gene PML é também um transcrito de p53 formando um mecanismo importante para garantir a supressão de tumores (ZUCKERMAN *et al.*, 2009; SIKORA *et al.*, 2011). A caseína quinase 2 (CK2) é expressa em células de mamíferos e está envolvido na regulação da progressão do ciclo celular e apoptose (CAINO, 2009; ST-DENIS *et al.*, 2009), em particular CK2 regula negativamente o supressor de tumor PML através de sua degradação dependente de sua direta fosforilação. Esta proteína está frequentemente mutada em tumores humanos e células PML mutantes que são resistentes a fosforilação por CK2 adquirem funções aumentadas como supressoras de tumor através da indução da senescência replicativa ou apoptose (CAINO, 2009; SCAGLIONI *et al.*, 2006). A regulação de CK2 por sua vez está relacionada também com p53, pelo menos devido ao estresse de oncogenes, p53 induz PML e inibi a atividade de CK2, garantindo dessa forma uma resposta adequada como supressor de tumor.

Além de p53, PLM também participa da regulação da senescência através de pRb independente de p53. Esta regulação envolve os PML corpos nucleares (PML NBs) encontrados em células somáticas com funções específicas, relacionadas com organização celular e a regulação das vias de DDR (SIKORA *et al.*, 2011). PML atua na inibição da atividade transcricional de elementos da família E2F através da localização do complexo pRb/E2F nos corpos nucleares PML. Como os E2Fs participam também de mecanismos de reparo e ponto de checagem, este preciso mecanismo garante a continuidade de sinais de danos no DNA, consequentemente a parada permanente da célula é mantida (VERNIER *et al.*, 2011). Considerando a resistência de células senescentes à apoptose, p53 é um importantes articulador na escolha entre estes dois mecanismos de supressão de tumor. O nível de ativação de p53 pode ser decisivo para a escolha entre senescência e apoptose: baixos níveis de p53 favorecem a parada permanente, enquanto níveis altos devem desencadear a apoptose (ZUCKERMAN *et al.*, 2009). Nesse sentido, a proteína anti-apoptótica Bcl-2 é marcadora de senescência replicativa e o aumento na regulação de Bcl-2



em células senescentes indica um mecanismo de resistência a uma variedade de estímulos apoptóticos (CAINO, 2009). A regulação de Bcl-2 é mediada de uma forma geral por p53 através de elementos da família BH3, de modo que a relação de p53 com apoptose e senescência é evidenciada em células de carcinomas que ignoram o estado senescente e a apoptose quando as funções de p53 são perdidas (CORY *et al.*, 2002).

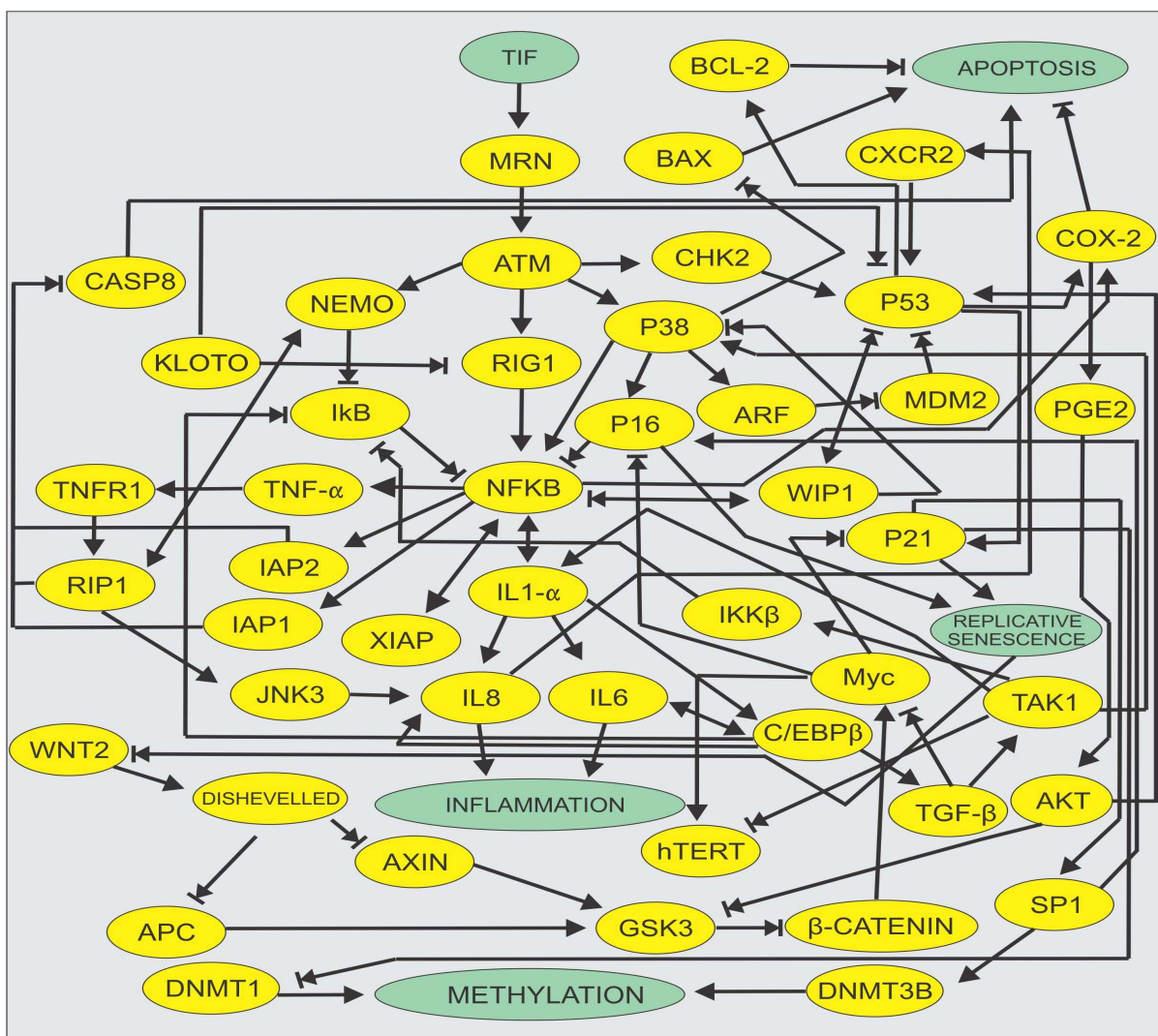
### **Via p38**

O grupo de proteínas p38MAPK consiste de quatro proteínas: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  e p38 $\delta$  codificadas por genes separados. Os dois primeiros membros deste grupo são expressas de uma forma geral, enquanto que as duas últimas são expressas de forma específica em diferentes tecidos (THORNTON *et al.*, 2009). Em particular p38 $\alpha$ , existe em um complexo estável com MK2 e pode regular a parada do ciclo celular na fase G<sub>1</sub> através de diversas vias incluindo a regulação da degradação de CDC25A (REINHARDT *et al.*, 2009; THORNTON *et al.*, 2009).

Como p38MAPK/MK2 é também considerado uma via de resposta a diferentes tipos de estresses (REINHARDT *et al.*, 2009), pode-se atribuir uma importância significativa para p38MAPK na sinalização da parada permanente de uma célula, incluindo a regulação das principais vias de ativação do estado senescente p53-p21-pRb e p16 – pRb (ZHANG, 2007; WAGNER *et al.*, 2009). A ativação de p38MAPK dependente de MKK3 e MKK6 está relacionada com o estado senescente em resposta ao encurtamento dos telômeros, o que sugere um papel importante para MK2 na manutenção da senescência replicativa (ZARUBIN *et al.*, 2005). Resultados recentes tem sugerido a regulação de MKK3 e MKK6 por TAO (Thousand and one kinase) que por sua vez é diretamente regulado por ambos ATM e ATR (REINHARDT *et al.*, 2009; THORNTON *et al.*, 2009).

## APÊNDICE 2 – Rede SASP

O complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) é um sensor de DSB e responsável pelo recrutamento de ATM através da interação direta entre ATM e NBS1 (REINHARDT *et al.*, 2009; STRACKER *et al.*, 2011), além de ser responsável pela ativação de ATM para a entrada da célula no estado de senescência replicativa após o desgaste dos telômeros e a perda de TRF2 (DE LANGE, 2009). A relação de SASP com a senescência não é dada de forma direta, apesar da relação entre os dois, células senescentes induzidas pela expressão de p16 não estão associadas com o fenótipo secretor, enquanto que um DDR persistente em células senescentes é suficiente para a indução do SASP (RODIER *et al.*, 2009; FUMAGALLI *et al.*, 2009). Este fenótipo é diretamente dependente de NBS1, ATM e CHK2, visto que células deficientes de ATM sofrem senescência replicativa e induzem o fenótipo secretor, mas particularmente IL-6 e IL-8 não são secretados. Assim como ATM, a inativação de NBS1 e CHK2 também impede a secreção de IL-6 indicando a dependência parcial do SASP em relação à NBS1, ATM e CHK2 (RODIER *et al.*, 2009; FUMAGALLI *et al.*, 2009). A relação de NBS1 com a regulação do fenótipo secretor não é tão evidente quanto a dependência de IL-6 e IL-8 de ATM, mas NBS1 pode estar envolvido principalmente na correta regulação da ativação de ATM e de seus substratos principalmente CHK2 (LEE *et al.*, 2010), além de uma possível ativação de NF- $\kappa$ B por estes elementos (FUMAGALLI *et al.*, 2009). DNA-SCARS são estruturas que contém formas ativas de CHK2 e p53, indicando a importância de ambos para SASP através de CHK2 e também para a parada do ciclo celular através de p53 (SALMINEN *et al.*, 2012; RODIER *et al.*, 2010). Resultados recentes indicam a relação do SASP com a via de sinalização NF- $\kappa$ B na promoção do fenótipo secretor em senescência replicativa, senescência induzida por danos no DNA e senescência como resposta a diferentes tipos de estresses (FREUND *et al.*, 2010; SALMINEN *et al.*, 2012; SHELTON *et al.*, 1999; FREUND *et al.*, 2011). O Fator Nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) consiste de uma família de 5 fatores de transcrição p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, and RelB, envolvidos na regulação de respostas imunes e inflamatórias, regulação da apoptose, desenvolvimento de tumores além da regulação da senescência (HABRAKEN *et al.*, 2006; SALMINEN *et al.*, 2012; SABATEL *et al.*, 2011).



**Figura 33:** Rede regulatória do SASP envolvendo os principais responsáveis pela regulação tanto da senescência replicativa quanto do SASP.

A persistente sinalização de danos no DNA necessária para a manutenção do estado senescente também estimula a sinalização de NF- $\kappa$ B e a expressão de muitos fatores relacionados com SASP, conforme a dependência do fenótipo secretor dos marcadores de senescência NBS1, ATM e Chk2 responsáveis pela ativação de NF- $\kappa$ B (FUMAGALLI *et al.*, 2009; SALMINEN *et al.*, 2012; SABATEL *et al.*, 2011). A ativação dos fatores de transcrição da família NF- $\kappa$ B através de danos no DNA por IR (radiação ionizante), depende principalmente de ATM e NEMO (NF- $\kappa$ B essencial modulador), juntamente com uma série de modificações pós-traducionais por proteínas SUMO, fosforilação e ubiquitação no núcleo e citoplasma, de modo que a transição destes elementos a partir destas modificações

entre o núcleo e o citoplasma resulta na ativação de diferentes vias para a ativação de NF- $\kappa$ B (SALMINEN *et al.*, 2012; SABATEL *et al.*, 2011), contudo não está clara ainda a ativação das vias coordenadas por ATM em NEMO em células senescentes (VAUGHAN *et al.*, 2011).

A resistência à apoptose é um dos principais marcadores do envelhecimento celular e do estado senescente e o aumento da expressão de Bcl-2 em fibroblastos humanos está envolvido na resistência à morte celular programada e expressão desta proteína depende de p53 (CAINO, 2009; SALMINEN *et al.*, 2012). Além de ser importante para inibir a apoptose p53 também participa da regulação de parada do ciclo celular através de p21 (SIKORA *et al.*, 2011; BEN-PORATH *et al.*, 2005) e há uma dependência indireta do SASP em relação a p53 através do controle de NF- $\kappa$ B por WIP1, cuja expressão depende de p53, como mostram os resultados obtidos com células que não expressam p53, onde altos níveis do SASP foram identificados (SALMINEN *et al.*, 2011; KEIZER *et al.*, 2010). Além disso, WIP é também responsável pela inibição de p38, um dos principais responsáveis pela ativação de NF- $\kappa$ B (SALMINEN *et al.*, 2011). A expressão de WIP1 em senescência replicativa não está clara, contudo considerando as interações desta fosfatase com p53, p38MAPK e NF- $\kappa$ B que estão diretamente envolvidos com este estado, podemos supor a participação deste elemento na regulação do SASP em células senescente replicativas. Assim como WIP, a quinase p38MAPK também participa da regulação do SASP, particularmente a secreção de IL-6, IL-8, depende da regulação de NF- $\kappa$ B por p38MAPK em fibroblastos humanos. Enquanto que a inibição de p38MAPK é responsável pela desregulação do SASP, a sua ativação é suficiente para a formação do fenótipo secretor (SALMINEN *et al.*, 2012; FREUND *et al.*, 2011). Tradicionalmente a manutenção da parada do ciclo celular está relacionada à regulação de duas vias independentes dependentes de p14<sup>ARF</sup> e p16<sup>INK4</sup> em células humanas, onde ambas são caracterizados por uma expressão aumentada em fibroblastos humanos (NAOKO *et al.*, 2009; GIL *et al.*, 2006). A ativação de p16<sup>INK4</sup> e p14<sup>ARF</sup> em senescência depende de p38MAPK (GIL *et al.*, 2006; FREUND *et al.*, 2011; THORNTON *et al.*, 2009) e ambos também participam da regulação do SASP através de NF- $\kappa$ B. Enquanto que p16<sup>INK4</sup> pode inibir de forma direta RelA/p65, principalmente após a indução de ambos por TNF $\alpha$ , p14<sup>ARF</sup> pode regular o SASP estimulando a inibição de RelA/p65 de um forma indireta, dependente de ATR e CHK1 (SALMINEN *et al.*, 2012). Além disso, como também participa na regulação

da via MDM2/p53 (HAUPT *et al.*, 2003; CHEUNG *et al.*, 2010) pode também ser responsável pela inibição de NF- $\kappa$ B por meio de WIP1. Em senescência replicativa, COX-2(Cyclooxygenase-2) (COPPÉ *et al.*, 2010; ZDANOV *et al.*, 2009) tem expressão aumentada, mas em pelo menos em senescência prematura p53 participa da regulação de COX-2 (ZDANOV *et al.*, 2009), contudo a regulação de COX-2 em senescência replicativa não está clara. Em outros contextos, p53 pode ser responsável pelo aumento ou inibição de COX-2, assim como pode haver uma regulação recíproca envolvendo COX-2 e p53 com o objetivo de inibir a apoptose através da regulação da atividade transcricional de p53, necessária para a ativação da morte celular programada (CHOI *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2007; SUBBARAMAIAH *et al.*, 1999). Além de p53, TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B também são responsáveis pela expressão de COX-2 (ZDANOV *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2008), que por sua vez é responsável pelo aumento da produção de PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>), em senescência replicativa de fibroblastos (COPPÉ *et al.*, 2010; ZDANOV *et al.*, 2009). Esta prostaglandina é responsável pela estabilização de  $\beta$  - Catenin, que por sua vez, controla a expressão de genes promotores de crescimento incluindo MYC, mas o controle de  $\beta$  - Catenin por PGE<sub>2</sub> envolve uma cascata de sinalização contendo AKT e GSK-3 $\beta$ ( glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) entre outros, pelo menos em células tumorais do cólon e durante processos inflamatórios (CASTELLONE *et al.*, 2005; OREN, 2003). AKT tem múltiplas funções na regulação de respostas celulares a estresses, principalmente proteção da apoptose, promoção do ciclo celular e também é responsável pela ativação da senescência replicativa em células de mamíferos (SALMINEM *et al.*, 2012). Considerando que PGE<sub>2</sub> pode ativar AKT (GREENHOUGH *et al.*, 2009), que GSK-3 $\beta$  é acumulada em fibroblastos humanos durante a senescência replicativa (ZMIJEWSKI *et al.*, 2004), enquanto que  $\beta$ -Catenin encontra-se diminuída neste estado (ADAMS *et al.*, 2008), podemos considerar que a via ativa em células tumorais do cólon, estão também ativas em senescência replicativa de fibroblastos. Existem também evidências de que AKT participa da regulação da senescência replicativa através da regulação da atividade transcricional de p53 em fibroblastos humanos senescentes (OREN *et al.*, 2003). Se esta via está ativa em senescência então automaticamente devemos encontrar uma diminuição na expressão de GSK-3 $\beta$ , contudo o aumento na expressão deste gene em senescência pode estar relacionado com a participação de GSK-3 $\beta$  em outras vias, incluindo a via WNT. Ambas GSK-3 $\beta$  e  $\beta$ -Catenin participam da via canônica

WNT, ativada em muitos tipos de câncer e reprimida no estado senescente (ADAMS *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2007). Em senescência replicativa de células WI38 a expressão do ligante WNT2 é reprimida, assim como a atividade da via canônica WNT aparece diminuída considerando-se que GSK-3 $\beta$  aparece com um aumento na sua atividade quinase e é essencial para a manutenção do estado senescente (KUILMAN *et al.*, 2009; ADAMS *et al.*, 2008). Nesta via canônica, Wnt2 promove a inibição de GSK-3 $\beta$  através da proteína Dishevelled, cuja ativação ocorre via receptores da Família Frizzled (Frz) e co-receptores LRP5/6. A inibição de  $\beta$ -Catenin ocorre através de sua fosforilação para degradação por meio de GSK-3 $\beta$  estimulada por APC e AXIN (ADAMS *et al.*, 2008; YE *et al.*, 2007), dois genes essenciais para prevenir progressão tumoral através da inibição de  $\beta$ -Catenin e dos genes transcritos incluindo de MYC (ADAMS *et al.*, 2008 ;YE *et al.*, 2007). A repressão de WNT2 em senescência replicativa ocorre de forma independente de pRb e p53 e a dependência de danos no DNA e a sinalização para a repressão de WNT2 ainda não estão claras (YE *et al.*, 2007), de modo que na Figura 33 a repressão de WNT2 é indicada pela sua inibição pelo nó representando o estado de senescência (YE *et al.*, 2007). A persistente sinalização de danos no DNA também está relacionada com a regulação do Fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), uma citocina produzida por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, mastócitos e tecidos neurais (LI *et al.*, 2008), envolvida com inflamação, supressão da apoptose, mas em casos extremos de ativação TNF- $\alpha$  pode induzir a morte celular programada de uma forma dependente de NF- $\kappa$ B, mas independente de p53 (PALLADINO *et al.*, 2003; RANGAMANI *et al.*, 2007). Dependendo do nível de danos no DNA e da quantidade de DSBs, em células HeLa, ATM pode induzir a ativação de NF- $\kappa$ B via NEMO (IKK- $\gamma$ ) e RIP1, seguido da regulação da expressão de TNF- $\alpha$  e cIPAs por NF- $\kappa$ B (PALLADINO *et al.*, 2003; BITON *et al.*, 2011). A ativação de NF- $\kappa$ B e a indução da expressão das cIPAs garante a inibição da apoptose, indicando a importância destes elementos no contexto de células senescentes (BITON *et al.*, 2011). NF- $\kappa$ B regula a expressão de cIPA1, cIPA2 e XIAP, enquanto que XIAP é também capaz de regular NF- $\kappa$ B a partir de danos no DNA, de modo que este mecanismo de regulação recíproca, além de regular a inflamação através de NF- $\kappa$ B, também regula a inibição da apoptose. A inibição da apoptose ocorre através de cIPA1 e cIPA2 que regulam a atividade de RIP1. A formação do complexo FADD-Caspase 8 e a ativação da apoptose depende de RIP1 e da sua regulação por

clAP1 e clAP2, de modo que na ausência de clAPs ocorre uma rápida ativação da caspase 8 e da apoptose (BITON *et al.*, 2011; GYRD-HANSEN *et al.*, 2010; SALMINEM *et al.*, 2009). Além da inibição da apoptose, em células com persistentes e altos níveis de danos no DNA, RIP1 também promove a expressão de IL-8 de uma forma dependente de TNF- $\alpha$ , TNFR1, RIP1, NEMO e JNK3 (BITON *et al.*, 2011), reforçando a indução de IL-8 para alertar outras células a respeito de seus danos e de uma forma autócrina para reforçar a parada do ciclo celular no caso de células senescentes. Vários detalhes envolvem a regulação da ativação de NF- $\kappa$ B via ATM e NEMO, contudo recentes trabalhos descrevem os mecanismos envolvidos na ativação de NF- $\kappa$ B a partir de diferentes tipos de estresse celular (SABATEL *et al.*, 2011; MIYAMOTO, 2011; YANG *et al.*, 2011).

Outra via de regulação de NF- $\kappa$ B e indução da expressão de IL-6 e IL-8, relacionada também com senescência replicativa em fibroblastos humanos, envolve o RIG-I (Retinoic-acid-inducible gene-I) (LIU *et al.*, 2011) e Klotho, um gene envolvido com a regulação da senescência e envelhecimento (LIU *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA, 2006; WANG *et al.*, 2009). A expressão de Klotho ocorre em humanos nos rins, placenta, próstata, intestino delgado e colon, participa de diversas funções biológicas e influencia diversas vias de sinalização intracelular, incluindo a via p53/p21 na regulação da senescência. Em células de fibroblastos humanos MRC-5 com danos do DNA, Klotho pode reduzir o fenótipo senescente, enquanto que a perda da atividade de Klotho pode induzir a entrada prematura no estado senescente e a consequente ativação de p21 (DE OLIVEIRA, 2006; WANG *et al.*, 2009). Além disso, Klotho é um importante inibidor do SASP através de sua interação com RIG-I. Este gene é induzido por ATM em fibroblastos (WI-38) senescentes e correlaciona-se com a expressão de interleucinas IL-6 e IL-8, de modo que a inibição de RIG-I ocorre através de uma interação direta entre RIG-I e Klotho (LIU *et al.*, 2011). As interleucinas IL-6 e IL-8 exercem diferentes funções dependentes do contexto biológico que acabam influenciando de forma positiva para garantir a homeostase do organismo, incluindo reforçar o estado senescente de forma autócrina, atrair células do sistema imune para a remoção de células senescentes e também estimular a regeneração e reparo de tecidos. Por outro lado, podem ser prejudiciais por promover a proliferação de células adjacentes e a progressão tumoral através de células senescentes do estroma que estimulam células malignas do tecido epitelial a invadir a membrana basal, além de promover a

transição de células entre tecidos para dar origem à carcinomas invasivos (DAVALOS *et al.*, 2010; CAMPISI *et al.*, 2011; RODIER *et al.*, 2011; CHIEN *et al.*, 2011). O fenótipo secretor senescente é dependente da atividade transcricional de NF-kB para promover a inflamação nos tecidos *in vivo* (SALMINEN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011), contudo outros mecanismos parecem colaborar com NF-kB para promover a inflamação de uma forma dependente de IL-6 e IL-8. A família de fatores de transcrição C/EBP participam na regulação do ciclo celular, hematopoiese, desenvolvimento do esqueleto, resposta imune e respostas à danos no DNA (RANJAN *et al.*, 2009; TSUKADA *et al.*, 2011), além disso, é importante na regulação da senescência em fibroblastos humanos juntamente com NF-kB, sendo um dos responsáveis pelo aumento da expressão de IL-6 (REN *et al.*, 2009; HARDY *et al.*, 2005). Na família C/EBP, C/EBP $\beta$  participa da regulação do SASP de forma direta na expressão de IL-6 através de uma regulação recíproca, enquanto que a atividade transcricional de C/EBP $\beta$  é responsável pelo aumento da expressão de IL-6, a atividade de C/EBP $\beta$  também depende do aumento da expressão desta interleucina (REN *et al.*, 2009; SALMINEN *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2009). Em células HeLa a expressão de C/EBP $\beta$  induz a ativação de NF-kB por meio da inibição da expressão de I $\kappa$ B- $\alpha$  para liberar a atividade transcricional de NF-KB e aumenta o nível de atividade de p65 (CAPPELLO *et al.*, 2009), o que sugere um mecanismo redundante na regulação do SASP através de C/EBP $\beta$  e NF-kB para garantir o fenótipo secretor, além da regulação direta de IL-6 por C/EBP $\beta$  para complementar a indução de interleucinas. Apesar de toda a regulação e complexidade envolvendo NF-kB e C/EBP $\beta$  em células senescentes, a atividade transcricional deste dois fatores de transcrição e a indução de IL-6 e IL-8 é dependente de IL-1 $\alpha$  cuja expressão é aumentada em fibroblastos senescente humanos com exaustão na replicação (ORJALO *et al.*, 2009), o que torna a interleucina IL-1 $\alpha$  essencial para reforçar o estado senescente em lesões benignas e evitar a progressão tumoral, mas dispensável em lesões malignas considerando-se a importância de IL-8 na regulação da angiogênese, promoção da proliferação celular e indução de resistência a tratamentos quimioterápicos (VERBEKE *et al.*, 2011). Outro importante articulador de inflamação através da regulação de NF-KB é fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é uma citocina reguladora de diversos processos biológicos incluindo morfogênese, desenvolvimento embrionário, diferenciação de célula tronco adultas, regulação do sistema imune, cicatrização de



feridas, inflamação, apoptose e senescência entre outros (ZHANG, 2009; SANTIBAÑES *et al.*, 2011; KUILMAN *et al.*, 2009). TGF- $\beta$  consiste numa grande família de modo que somente TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3 são expressos em humanos, particularmente TGF- $\beta$ 1 é expresso em fibroblastos humanos diplóides (HDF) e participa da indução de vários marcadores de senescência replicativa incluindo inflamação (CAINO, 2009; SANTIBAÑES *et al.*, 2011; ROBERTS *et al.*, 2003). Nesse sentido, as funções de TGF- $\beta$  estão relacionadas com a regulação de supressão tumoral, considerando o seu envolvimento de forma direta ou indireta, mas dependente, com reguladores do ciclo celular, regulação da telomerase e inflamação através da ativação de NF- $\kappa$ B. A regulação da expressão de TGF- $\beta$  não está clara pelo menos em senescência, contudo C/EBP $\beta$  está diretamente envolvido na expressão de TGF- $\beta$  através da regulação de seu promotor (ABRAHAM *et al.*, 2009). Um importante regulador do ciclo celular e promotor de proliferação é o fator de transcrição MYC que está diretamente relacionado com o controle de CDK2 e CDC25A no ponto de checagem G1/S (BARTEK *et al.*, 2001), além de atuar na repressão de p16 e p21, dois importantes marcadores de senescência replicativa. Fibroblastos humanos imortalizados através da ação do oncogene Myc demonstram uma falha em responder a estímulos inibitórios do crescimento a partir de TGF- $\beta$  (WANG *et al.*, 2011). A dependência de Myc em relação a TGF- $\beta$  também poder considerada visto que o tratamento de TGF- $\beta$  em queratinócitos humanos inibe a progressão do ciclo celular, impede a ativação de Myc e regula o aumento da expressão de p21 (CLAASSEN *et al.*, 2000), o que demonstra que a senescência replicativa é dependente da inibição de Myc por TGF- $\beta$ . Myc participa também da ativação de hTERT (telomerase transcriptase reversa humana) em fibroblastos humanos (HYDBRING *et al.*, 2010), contudo a regulação de hTERT depende também de TGF- $\beta$  e TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1), uma quinase diretamente envolvida na indução do estado senescente em células humanas diplóides através da repressão da transcrição de hTERT (FUJIKI *et al.*, 2007). A ativação de TAK1 por TGF- $\beta$  é dependente de TRAF6 (Fator Receptor de TNF 6) (ZHANG, 2009; MU *et al.*, 2012). Além de participar do ciclo celular e regular a telomerase, TAK1 participa também da ativação de NF- $\kappa$ B e p38 (ZHANG, 2009; MU *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2011).

Enquanto a ativação de p38 por TAK1 depende de MKK3/6 (MU *et al.*, 2012; GIL *et al.*, 2006), a ativação de NF- $\kappa$ B por TAK1 pode ocorrer também a partir de

TGF- $\beta$  (SHIM *et al.*, 2005). Diversas evidências apontam para a ativação de NF-KB por TAK1 em fibroblastos dependente da direta ativação de IKK $\beta$  por TAK1, pelo menos a partir da sinalização de danos no DNA (WAGNER *et al.*, 2009; MCCOOL *et al.*, 2012; SHIM *et al.*, 2005; SCHMID *et al.*, 2008; SILVERMAN *et al.*, 2003). O fenótipo secretor senescente dependente da interação entre IL-1 $\alpha$  e NF-KB expressas em fibroblastos senescente (COPPÉ *et al.*, 2010) e ambos dependem de TAK1 para o controle da expressão de IL-6 e IL-8 (BERTELSEN *et al.*, 2007; TAKAESU *et al.*, 2003).

Senescência replicativa tem como principais marcadores mudanças na morfologia celular, mudança de expressão gênica e organização da cromatina, de modo que a metilação do DNA é essencial para todas as mudanças caracterizadas pelo estado senescente. A metilação do DNA ocorre a partir das enzimas DNA metiltransferase (DNMT), classificadas como metilases de manutenção incluindo DNMT1 e metilases responsáveis pela metilação em locais ainda não metilados incluindo DNMT2, DNMT3A e DNMT3B (ZHANG *et al.*, 2008; CARNERO *et al.*, 2011). Enquanto que DNMT1 tem expressão diminuída em senescência replicativa, a expressão de DNMT3B aparece aumentada em fibroblastos senescentes, indicando uma diminuição na metilase de manutenção e um aumento de locais ainda não metilados (ZHANG *et al.*, 2008; DIMAURO *et al.*, 2009). Alterações das metilases são importantes para o fenótipo secretor senescente, resultados recentes indicam que DNMT1 é importante para a regulação do SASP, visto que a diminuição da expressão de DNMT1 através de p21 (TAN *et al.*, 2009), é responsável por danos no DNA e a manutenção de um persistente DDR (OHTANI *et al.*, 2012; TAKAHASHI *et al.*, 2012), necessário para a formação do SASP. Além disso, como DNMT3B e DNMT1 cooperam para silenciar genes em células tumorais humanas (RHEE *et al.*, 2002) e que o nível de expressão de DNMT1 é aumentado em CAC e pode ser estabilizado por IL-6 em células epiteliais de câncer de cólon (HARTNETT *et al.*, 2012), podemos considerar uma certa dependência do SASP em relação a DNMT3B. A expressão de DNMT3B é dependente do fator de transcrição SP1 (Proteína Específica 1) e todos os promotores de DNMT3B contém SP1 ligantes, pelo menos em células HEK-293T (Células do rim embrionário humano 293T) (CUI *et al.*, 2009), contudo considerando que SP1 essencialmente regula a expressão de p16<sup>INK4a</sup> em fibroblastos humanos durante a senescência, podemos supor que a regulação de DNMT3B é dependente de SP1 também em fibroblastos. O nível de

atividade de SP1 é contraditório, resultados indicam que a atividade e nível de proteína de SP1 diminui durante a senescência replicativa em fibroblastos (OH *et al.*, 2007), além disso, em células humanas HT1080, p21 é o principal responsável pela expressão de p21 e ao mesmo tempo diminui os nível da proteína SP1 devido à ativação da sua degradação (TAPIAS *et al.*, 2008). De um modo geral, considerando os diversos resultados envolvendo SP1 com senescência, podemos assumir que o nível da proteína SP1 é controlado principalmente por p21 devido ao envolvimento desta proteína com o controle da expressão de SP1.