

Universidade de São Paulo (USP)  
Processo 2007/05000-8  
Vigência: 1/9/2008 a 31/8/2012

Quinases dependentes de ciclinas (CDKs) compreendem uma família de proteínas que podem ser subdivididas em dois grupos funcionais majoritários baseados na sua função no ciclo celular e/ou controle transcricional. Já foram identificadas 13 CDKs humanas (CDK1-CDK13). A CDK2 é o membro mais bem caracterizado, funcional e estruturalmente. As CDKs 7, 8, 9, 10 e 11 são importantes reguladores transcricionais. O fator geral de transcrição TFIID contém a CDK7-ciclina H e o complexo de proteínas associadas aos hormônios da tireoide contém a CDK8-ciclina C. A CDK9-ciclina T1 pertence ao fator de alongação da transcrição P-TEFb, conhecidos por fosforilar o CTD da subunidade maior da RNAP II, tão bem quanto os passos subsequentes da expressão gênica. Os complexos da CDK10 se associam com o fator de transcrição Ets2, e a CDK11 associa-se com a CK2, e está envolvida com “splicing” de RNA, além de ser um regulador transcricional. A CDK9 foi recentemente clonada e expressa em *E. coli*, mas há poucos estudos funcionais e estruturais relacionados a ela. As referidas CDKs serão clonadas, expressas e purificadas seguindo o protocolo estabelecido para a CDK9 e, de posse dessas proteínas, estudos estruturais e funcionais serão realizados. Essas proteínas serão bioquimicamente caracterizadas e serão efetuados ensaios da atividade enzimática na presença de inibidores. Serão realizados ainda estudos das estruturas secundárias por técnicas de dicróismo circular e das estruturas terciárias, pela cristalização das referidas CDKs, e consequente resolução das estruturas. O estudo das CDKs envolvidas na regulação transcricional irá contribuir para o entendimento da relação estrutura-função dessas CDKs e sua relação com oncogenes e supressores de tumor. O estudo estrutural irá contribuir para o desenvolvimento de inibidores químicos de baixo peso molecular que possam inibir especificamente essas CDKs.

### 119 Clonagem, expressão e estudo de especificidade das calicreínas teciduais humanas hK5 e hK7

Luciano Puzer  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)  
Processo 2006/53607-6  
Vigência: 1/1/2007 a 31/12/2010

As calicreínas humanas hK5 e hK7 fazem parte de uma família de 15 serino-peptidases (hK1-hK15) que, à exceção de hK1, hK2 e hK3, foram recentemente identificadas e caracterizadas como calicreínas. Pouco se conhece sobre a especificidade dessas enzimas, mas alguns dados

experimentais sugerem que hK5 e hK7 podem estar participando ativamente de processos fisiopatológicos relacionados à descamação da pele. Portanto, a caracterização de suas especificidades é crucial, não apenas para mapear os sítios de interação enzima/substrato, como também para o desenvolvimento de substratos e/ou inibidores específicos e/ou seletivos para ambas as enzimas. Pretende-se clonar e expressar hK5 e hK7 usando dois vetores de expressão, pET-28a(+) e pPIC9K. O primeiro vetor será usado para produzir as enzimas em células de *E. coli*, visando à produção de anticorpos monoclonais. As enzimas usadas no estudo de especificidade serão produzidas com o vetor pPIC9K em células de *P. pastoris*. A caracterização da especificidade das hK5 e hK7 será feita com o uso de peptídeos com supressão intramolecular de fluorescência, baseados na sequência de referência Abz-KLRSSKQ-EDDnp, que tem se mostrado eficiente no estudo de outras peptidases. Com os dados cinéticos obtidos a partir do estudo de especificidade, a pesquisa se empenhará no desenvolvimento de substratos fluorescentes seletivos e/ou específicos para as hK5 e hK7. Além disso, usando bibliotecas de inibidores de serino-peptidases, pretende-se buscar inibidores seletivos e/ou específicos para essas enzimas.

### 120 Estudo molecular e funcional da oncoproteína SET

Andréia Machado Leopoldino  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo (USP)  
Processo 2006/06334-4  
Vigência: 1/4/2007 a 31/3/2011

A abordagem deste projeto é aquela utilizada durante o pós-doutorado (PD) no National Institute of Health (NIH, EUA) (Processo FAPESP 05/03380-2) e constitui uma nova linha de pesquisa a ser implantada e estabelecida na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP. O objetivo central é o estudo de proteínas (marcadores) selecionadas como marcadores tumorais usando estudos funcionais baseados principalmente em RNA de interferência. Recentemente, validamos em amostras de tumores de cabeça e pescoço um novo marcador tumoral, a proteína SET (resultados obtidos durante o PD no exterior), que havia sido identificada também pelo grupo do dr. Silvio Gutkind durante um *screening* usando microarranjos de RNA em tumores de cavidade oral. Na presente proposta, será dada continuidade ao estudo desse marcador tumoral para aumentar o conhecimento sobre sua função e verificar seu potencial como alvo terapêutico. Importantes resultados foram obtidos nessa primeira avaliação da SET, que mostraram sua participação em uma das vias mais importantes para a tumorigênese, a via PTEN/AKT (artigo

em preparação). A análise usando *tissue array* mostrou que esta proteína apresenta-se superexpressa em cerca de 80% dos tumores, o que lhe confere um papel oncogênico. Pretende-se estudar também outras proteínas já selecionadas no PD no Brasil (Processo FAPESP 02/09388-7). Durante o PD no exterior foram utilizadas diversas metodologias de estudo (RNA de interferência, *short hairpin* RNA, superexpressão de proteína em linhagens celulares, Western blotting, FACS *analysis*, *tissue arrays*) para estudar o papel da proteína SET na tumorigênese de cabeça e pescoço. Quando fizemos o *knockdown* dessa proteína em linhagens tumorais HNSCC, as células morreram. Isso coloca a proteína como um potencial alvo terapêutico ou um auxiliar nas terapias existentes. Entretanto, para a aplicação desta proteína como alvo terapêutico, mais estudos funcionais serão necessários. Sendo assim, propõe-se neste projeto a continuidade do estudo funcional da oncoproteína SET e também a investigação da participação na tumorigênese de outros marcadores já selecionados. Este projeto contará com a colaboração do dr. J. Silvio Gutkind (NIH) na continuidade dos estudos funcionais da SET.

### 121 Estudo de variações bioquímicas em tilápias, como biomarcadores de contaminação ambiental

Eduardo Alves de Almeida  
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas  
de São José do Rio Preto  
Universidade Estadual Paulista (Unesp)  
Processo 2006/03873-1  
Vigência: 1/2/2007 a 31/1/2011

Animais expostos a contaminantes ambientais podem apresentar uma produção exacerbada das espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a um aumento da atividade dos sistemas de biotransformação de xenobióticos, ou devido ao envolvimento dos contaminantes em reações ciclo-redox. Caso não sejam inativadas por sistemas de defesa antioxidante, essas EROs podem oxidar as biomoléculas levando o organismo a uma situação denominada de estresse oxidativo. Dessa forma, a avaliação de sistemas bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo tem sido recomendada em programas de biomonitoramento ambiental, como biomarcadores de contaminação. Outros sistemas, como a inibição de diferentes esterases por pesticidas, ou a indução de metalotioneínas (MTs) após exposição a metais pesados, são também comumente utilizados como biomarcadores de contaminação ambiental. Neste projeto, pretende-se estudar uma série de respostas bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo, assim como níveis de MTs e inibição de esterases, em diferentes tecidos de duas espécies de peixes, com hábitos distintos: uma tipicamente nec-

tônica (tilápia, *Oreochromis niloticus*) e outra de fundo (cascudo marrom, *Pterygoplichthys anisitsi*), após exposição a diferentes classes de contaminantes em separado ou combinados. Com isso, pretende-se obter parâmetros que possam indicar a sensibilidade dos sistemas analisados como potenciais biomarcadores de contaminação ambiental em futuros programas de biomonitoramento aquático no Brasil, utilizando essas espécies de peixe como organismos sentinelas. Pretende-se também estudar possíveis diferenças entre as respostas bioquímicas de peixes jovens e adultos.

### 122 Planejamento racional de candidatos a fármacos anticancerosos

Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo (USP)  
Processo 2005/58174-8  
Vigência: 1/10/2006 a 30/4/2009

O Projeto Genoma Humano do Câncer (PGHC), financiado pela FAPESP e pelo Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, buscou identificar os genes expressos nos tipos de câncer mais comuns no Brasil. Uma das iniciativas mais recentes e estimuladas pelo Projeto Genoma Humano do Câncer é o projeto Genoma Clínico, o qual visa desenvolver novas formas de diagnóstico e tratamento do câncer a partir do estudo de genes expressos. Suas metas incluem a análise da expressão gênica em neoplasias humanas e a identificação de marcadores relacionados com as fases iniciais da transformação maligna, bem como de marcadores de prognóstico que aumentam as chances de previsão da evolução do tumor. A informação estrutural dos marcadores proteicos permite a descoberta e síntese de ligantes que podem vir a se tornar potentes fármacos. Essa abordagem, em sua essência, caracteriza o planejamento racional de fármacos baseado em estrutura. Os objetivos deste projeto compreendem a aplicação de técnicas de bioinformática e modelagem molecular no planejamento de candidatos a fármacos anticancerosos, sobretudo para tumores de cabeça e pescoço, utilizando como alvos quatro marcadores proteicos com atividade em câncer de cabeça e pescoço, recém-expressos e purificados, e outros que advenham do genoma clínico, ao longo deste projeto.

### 123 Estudos sobre a importância dos *lipid rafts* e os mecanismos de sinalização celular na adesão e invasão de fungos patogênicos em células de mamíferos

Erika Suzuki de Toledo  
Escola Paulista de Medicina  
Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)