

**ATIVAÇÃO DA VIA DE ESTRESSE DE RETÍCULO
ENDOPLASMÁTICO COMO POTENCIAL AGENTE
SENSIBILIZADOR DA MORTE CELULAR INDUZIDA
POR CISPLATINA – ESTUDO EXPERIMENTAL**

RENATA DE FREITAS SAITO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

Co-orientadora: Dra. Andréia Hanada Otake

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Saito, Renata de Freitas

Ativação da via de estresse de retículo endoplasmático como potencial agente sensibilizador da morte celular induzida por cisplatina: estudo experimental / Renata de Freitas Saito– São Paulo, 2009.

113p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Roger Chammas

Descritores: 1. RETICULO ENDOPLASMATICO. 2. ESTRESSE OXIDATIVO. 3. MELANOMA. 4. MORTE CELULAR. 5. CISPLATINA. 6. TUNICAMICINA. 7. CURCUMINA.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Akira e Selma**, pelo amor e dedicação e pelo exemplo de honestidade, dignidade e perseverança que desde cedo nortearam meu caminho.

À minha avó, **Egydia**, por seu carinho, cuidado e dedicação sempre presentes em minha vida e ao meu avô, **Jura** (*in memorian*), por ter feito parte de minha vida mesmo tão brevemente.

Aos meus avós paternos, **“Ditian e Batian”** (*in memorian*), pelo exemplo de simplicidade, trabalho e persistência.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Roger Chammas**, por seus valiosos ensinamentos e por partilhar sua “paixão” pela pesquisa, fundamentais para o meu aprimoramento profissional.

À minha co-orientadora, **Dra. Andréia Hanada Otake**, pela participação ativa na realização deste trabalho e pela amizade presente em todos os momentos deste aprendizado.

Ao meu namorado, **Celso**, por cuidar de mim desde o primeiro momento em que entrou em minha vida. Companheiro de todos os segundos, cujo amor e incentivo, me ajudaram a finalizar este trabalho e com quem ainda quero dividir muitas conquistas.

Aos integrantes do Grupo de Adesão Celular e Câncer, **Ana, Camila, Claudia, Gabriella, Guilherme, Helano, Lara, Luciana, Mara, Patrícia, Rafael, Raphael, Silvina, Tharcísio e Raimundo**, pela fantástica experiência de convivência e pelo apoio em todos os momentos vividos durante este trabalho.

Ao meu irmão, **Milton**, simplesmente pelo amor e carinho que existe entre nós dois.

À minha amiga, **Luciana**, por sua presença constante, amizade e carinho, sempre me apoiando nos momentos difíceis. E à minha amiga **Tamaya**, por sua amizade sincera, e por sempre me ajudar nos momentos de correria.

Ao patologista, **Dr. Raphael Sales**, pelas imagens do estudo imuno-histoquímico de casos de melanoma.

À **Dra. Camila M. Longo**, pela ajuda na captura das imagens obtidas em microscópio óptico.

À ***Dra. Denise de Castro Fernandes***, do Laboratório de Biologia Vascular – Incor/FMUSP, por ceder gentilmente o anticorpo anti-KDEL.

Aos ***funcionários do LIM24***, por todo suporte que possibilitou a realização deste trabalho.

Às secretárias da pós-graduação do Hospital AC Camargo, ***Luciana Pitombeira e Ana Maria Kuninari***, por toda assistência burocrática deste trabalho.

À ***FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e a CAPES/CNPq***, a qual disponibilizou recursos financeiros para a realização deste estudo.

E finalmente, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica, LIM24 – Oncologia Experimental, Departamento de Radiologia na Faculdade de Medicina da USP.

RESUMO

Saito RF. **Ativação da via de estresse de retículo endoplasmático como potencial agente sensibilizador da morte celular induzida por cisplatina: estudo experimental.** São Paulo; 2009 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O melanoma, câncer de pele que apresenta elevado poder metastático, é um dos poucos tumores que tem apresentado rápido aumento de incidência nos últimos 20 anos. Quando diagnosticado em estádios mais avançados, o melanoma apresenta-se refratário a tratamento quimioterápico. As bases moleculares da quimiorresistência em melanomas começam a ser entendidas, abrindo-se a perspectiva da utilização de moléculas que atuem como quimiossensibilizantes. O presente trabalho avaliou a relação do composto curcumina, um potencial quimiossensibilizante, com a resposta de células de melanoma a cisplatina. O mecanismo de ação de curcumina foi explorado, com ênfase na geração da resposta a estresse de retículo endoplasmático (RE), caracterizado pela ativação da via UPR (*Unfolded Protein Response*; resposta a proteínas mal-enoveladas), podendo culminar em morte das células tumorais. Dados obtidos neste trabalho mostram que a indução de estresse de RE através do tratamento com tunicamicina é capaz de sensibilizar células de melanoma metastático humano, LB373 e Skmel37, à morte induzida por cisplatina. No entanto, curcumina não apresentou capacidade de induzir estresse de RE neste modelo. Além de conferir resistência ao tratamento com cisplatina nas células LB373, a sensibilização conferida às células Skmel37 parece estar mais relacionada com indução de estresse oxidativo do que com estresse de RE; uma vez que, a morte induzida por curcumina é acompanhada pela liberação de ROS e despolarização da membrana mitocondrial, mas não do aumento da expressão protéica de GRP78. Portanto, a indução de estresse de RE é uma boa estratégia para sensibilização de melanomas à morte induzida por cisplatina. No entanto, curcumina não é uma alternativa viável para esta abordagem neste modelo.

SUMMARY

Saito RF. **[Evaluation of endoplasmic reticulum stress response induction as a strategy to sensitize melanoma cells to cisplatin induced cell death]**. São Paulo; 2009 [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Malignant melanoma is a potentially fatal skin cancer that is increasing in incidence at high rates. Although early-stage disease is often curable, the survival rate for advanced disease is low, and it is in part due to its poor response to different chemotherapeutic agents. The molecular basis of chemoresistance of melanoma has been studied, arising new insights in the utilization of molecules which act as chemosensitizers. This study aimed to elucidate the relation between the compound curcumin, a potential chemosensitizer, and cisplatin-induced cell death in melanoma cells. The ability of curcumin to induce an endoplasmic reticulum (ER) response dependent on the accumulation of unfolded proteins within ER lumen (*Unfolded Protein Response*. UPR) was studied. This study demonstrated that ER stress induced by tunicamycin can sensitize human metastatic melanoma cells, LB373 and Skmel37, to cisplatin induced cell death. However, curcumin did not demonstrate the same effect of ER stress induction in this model. Moreover curcumin treatment resulted in resistance to cisplatin in LB373 cells, but sensitized Skmel37 cells probably acting as an oxidative stress inducer rather than an ER stress inducer. Curcumin cell death was associated with ROS production and mitochondrial membrane depolarization but did not lead to an increase in GRP78. Therefore, while ER stress induction by tunicamycin was a good strategy to sensitize melanoma cells to cisplatin induced cell death, curcumin failed to do so.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Alterações moleculares associadas com a iniciação e progressão de Melanomas.....	4
Figura 2	Estudo imuno-histoquímico dos marcadores SOD-2, nucleofosmina, ATF-4/CREB-2, GADD153 e Proibitina em casos de melanoma utilizando TMA.....	7
Figura 3	Vias ativadas em UPR (<i>Unfolded Protein Response</i>).....	12
Figura 4	<i>Curcuma longa</i>	16
Figura 5	Representação dos alvos de curcumina nas vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas.....	17
Figura 6	Esquema representativo da análise de ciclo celular através de um histograma.....	28
Figura 7	Tratamento das células de melanoma humano Skmel37, LB373, Skmel28, Mewo e MZ2mel com tunicamincina.....	38
Figura 8	Tratamento das células de melanoma humano Skmel37 e LB373 com cisplatina.....	40
Figura 9	Esquema do tratamento prévio com tunicamicina e posterior Tratamento com cisplatina.....	41
Figura 10	Sensibilização das células LB373 (A) e Skmel37 (B) à morte induzida por cisplatina.....	42
Figura 11	Tratamento das células LB373 (A) e Skmel37 com taspargina. (B) Tratamento das células LB373 com tasparginae/ou cisplatina.....	44
Figura 12	Western blot para avaliar a expressão de GRP78 (A) e GADD153 (B) em extrato protéico de Skmel37 e LB373 tratadas com tunicamicina.....	46
Figura 13	A expressão de GRP78 e GADD153 em extrato celular de LB373(A) e Skmel37(B) quando tratadas com tunicamicina (1,25µg/ml) e/ou cisplatina (12,5µM).....	48
Figura 14	Tratamento das células LB373 e Skmel37 com diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de tratamento.....	50

Figura 15	Expressão de GRP78 e GADD153 em extratos celulares de Skmel37 (A) e LB373(B) tratadas com curcumina.....	52
Figura 16	Esquema do tratamento prévio com curcumina e posterior tratamento com cisplatina (24 horas).....	53
Figura 17	Esquema do tratamento prévio com curcumina e posterior tratamento com cisplatina (16 horas).....	54
Figura 18	As células LB373 foram tratadas com 10µM de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 µM) durante 24 horas.....	54
Figura 19	As células LB373 foram tratadas com 10µM de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 µM) durante 24 horas.....	55
Figura 20	Ensaio clonogênico com células Skmel37(A). LB373 (B e C).....	57
Figura 21	Avaliação da ativação de NFκB em resposta ao tratamento com curcumina e tunicamicina.....	59
Figura 22	Tratamento das células Skmel37, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases, SR-VAD-FMK.....	61
Figura 23	Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases SR-VAD-FMK (A). Tratamento com substratos de caspases 8 (B) e caspases 3/7(C).....	62
Figura 24	Detecção de ROS (H ₂ O ₂) por DHR.....	64
Figura 25	Avaliação do perfil de alteração do potencial de membrana mitocondrial (Δψ _m) nas células LB373(A) e Skmel37(B) tratadas com curcumina.....	66
Figura 26	Avaliação morfológica das células LB373 e Skmel37 ocasionada pelo tratamento com curcumina.....	68
Figura 27	Microscopia confocal com marcação para KDEL (verde), Faloidina (vermelho) e DAPI (azul) nas células LB373.....	71
Figura 28	Microscopia confocal com marcação para KDEL (verde), Faloidina (vermelho) e Dapi (azul) nas células Skmel37.....	73
Figura 29	Esquema representativo dos achados obtidos neste trabalho.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina do Soro Bovino, do inglês <i>Bovine Serum Albumine</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DAPI	Diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	Iodeto de propídeo
PVDF	Polivinil difluorido
RPMI	Meio de cultura <i>Rose Park Memorial Institute</i>
GADD153	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible gene 153</i>
GRP78	<i>Glucose-regulated protein 78</i>
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
RE	Retículo Endoplasmático
UV	Ultravioleta
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
PDI	Isomerase de dissulfetos protéicos
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
RGP	<i>Radial Growth Phase</i>
VGP	<i>Vertical Groth Phase</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
EOR	<i>ER overload response</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
CO2	Gás Carbônico
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
TUN	Tunicamicina
TAP	Tapsigargina
CTL	Controle
ETOH	Etanol

GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
RPM	Revoluções Por Minuto
OD₆₅₀	Densidade Óptica (650 nm)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Melanoma.....	2
1.2	Relação de Estresse Oxidativo com Melanoma.....	8
1.3	Estresse Oxidativo de Reticulo Endoplasmático.....	10
1.4	Curcumina.....	15
2	OBJETIVOS.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1	Cultivo de Células.....	23
3.2	Análise de expressão protéica por Westen Blot.....	23
3.2.1	Extrato Celular.....	23
3.2.2	Dosagem de Proteínas.....	24
3.2.3	Eletroforese do Gel de Poliacrilamida.....	24
3.2.4	Transferência das Amostras.....	25
3.2.5	Blotting.....	26
3.2.6	Revelação com Diaminobenzidino (DAB).....	27
3.3	Citometria de Fluxo para avaliar o ciclo celular.....	27
3.4	Ensaio de clonogenicidade.....	29
3.5	Ensaio de atividade de caspases.....	29
3.6	Deteção de glicanos.....	30
3.7	Deteção de espécies reativas de oxigênio.....	31
3.8	Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial.....	31
3.9	Microscopia confocal.....	32
3.10	Transfecção do plasmídeo pNF- κ B-hrGFP em células LB373.....	33
3.11	Análise Estatística.....	35
4	RESULTADOS	36

4.1	Resposta das células de melanoma humano à indução de estresse do retículo endoplasmático (RE)	37
4.2	Resposta das células de melanoma humano ao tratamento com cisplatina....	39
4.3	Sensibilização das células de melanoma humano à morte induzida por cisplatina através da indução de estresse do RE, pelo tratamento prévio com tunicamicina.....	40
4.4	Expressão de proteínas envolvidas na resposta ao estresse de RE induzida por tunicamicina.....	45
4.5	Avaliação da morte celular induzida por curcumina.....	49
4.6	Expressão de proteínas envolvidas na resposta ao estresse de RE induzida por curcumina.....	51
4.7	Sensibilização das células de melanoma humano, LB373 e Skmel37, à morte induzida por cisplatina através do tratamento com curcumina.....	53
4.8	Ensaio Clonogênico de células LB373 e Skmel37 tratadas com curcumina e/ou cisplatina.....	56
4.9	Avaliação da ativação de NFκB em resposta ao tratamento com curcumina.	58
4.10.	Atividade de caspases em células LB373 e Skmel37 tratadas com curcumina e/ou cisplatina	60
4.11	Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta ao tratamento com curcumina.....	63
4.12	Alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em resposta ao tratamento com curcumina.....	64
4.13	Alterações morfológicas após tratamento com curcumina.....	67
4.14	Avaliação de alterações no citoesqueleto e acúmulo de proteínas residentes no RE após tratamento com curcumina, através de microscopia confocal.....	69
5	DISCUSSÃO.....	75
5.1	Resposta das células de melanoma humano à indução de estresse do retículo endoplasmático (RE).....	76
5.2	Resposta das células de melanoma humano ao tratamento com cisplatina....	78
5.3	Sensibilização das células de melanoma humano à morte induzida por cisplatina através da indução de estresse do RE.....	79

5.4	Sensibilização das células de melanoma humano à morte induzida por cisplatina através do tratamento com curcumina.....	85
5.5	Avaliação da atividade de caspases nas células LB373 e Skmel37 tratadas com curcumina e/ou cisplatina.....	89
5.6	Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS- <i>Reactive Oxygen Species</i>) em resposta ao tratamento com curcumina.....	90
5.7	Alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em resposta ao tratamento com curcumina.....	93
5.8	Alterações morfológicas ocasionadas pelo tratamento com diferentes concentrações de curcumina.....	94
6	SUMÁRIO DE RESULTADOS.....	98
7	CONCLUSÃO.....	101
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

ANEXOS

Anexo 1 – Bloqueio da N-glicosilação por tunicamicina

Anexo 2 – Tratamento das células de melanoma humano Skmel37, LB373, Skmel28, Mewo e MZ2mel com tunicamincina

Anexo 3 - Tratamento das células de melanoma humano Skmel37 e LB373 com cisplatina

Anexo 4 - Sensibilização das células LB373 à morte induzida por cisplatina

Anexo 5 - Sensibilização das células Skmel37 à morte induzida por cisplatina

Anexo 6 - Tratamento das células LB373 com taspigargina e/ou cisplatina

Anexo 7 - Tratamento das células LB373 com diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de tratamento

Anexo 8 - Tratamento das células Skmel37 com diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de tratamento

Anexo 9 - Células Skmel37 tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 16 horas

Anexo 10 - Células Skmel37 tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 24 horas

Anexo 11 - As células LB373 foram tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 24 horas

Anexo 12 - Avaliação da ativação de NF κ B em resposta ao tratamento com curcumina e tunicamicina

Anexo 13 – Tratamento das células Skmel37, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases, SR-VAD-FMK

Anexo 14 – Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases SR-VAD-FMK

Anexo 15 – Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina com substratos de caspases 8

Anexo 16 - Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina com substratos de caspases 3 e 7

Anexo 17 - Avaliação do perfil de alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) nas células tratadas com curcumina

Anexo 18 - Avaliação do perfil de alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) nas células LB373(A) e Skmel37(B) tratadas com curcumina

Anexo 19 - Aprovação do Comitê de Ética

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

Em humanos, melanoma é um dos tipos mais graves de câncer, sendo responsável por aproximadamente 4% dos casos de câncer de pele. Embora apresente baixa incidência, a letalidade em melanomas é elevada, principalmente pela sua acentuada capacidade de desenvolver metástases. No entanto, aproximadamente 95% dos casos de melanoma seriam curáveis se diagnosticados precocemente. Embora muitos avanços na compreensão da biologia de melanomas tenham sido obtidos, ainda não há tratamento efetivo para melanoma metastático. A incidência de melanomas vem crescendo nas últimas décadas. No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer permitiram estimar uma incidência de cerca de 6000 novos casos em 2008, com taxas equivalentes em homens e mulheres (Ministério da Saúde 2007).

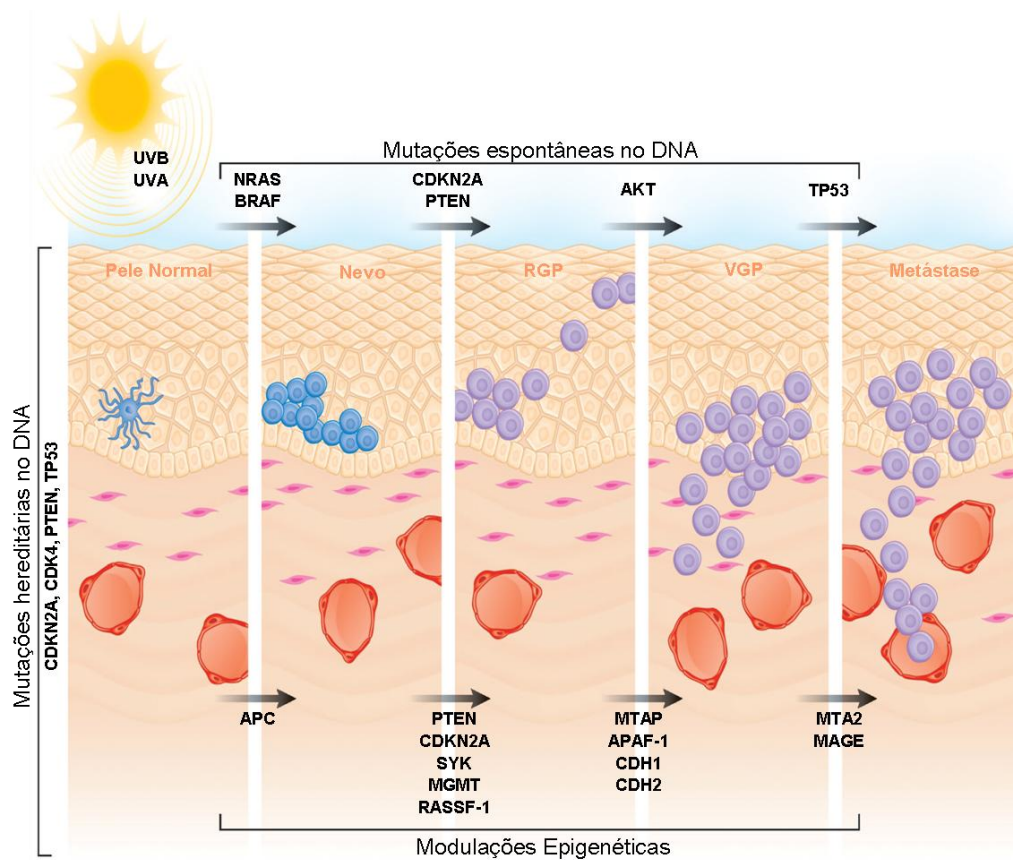
Melanomas são neoplasias malignas originárias da transformação de melanócitos, que são células responsáveis pela produção de melanina, pigmento citoprotetor que atua no bloqueio endógeno dos raios ultravioleta (UV) da luz solar. A exposição à radiação UV é benéfica para a saúde humana, já que em doses amenas é necessária para a síntese de vitamina D (CHEN et al. 2007). No entanto, a exposição excessiva a radiação UV solar é capaz de induzir danos a moléculas orgânicas como DNA e proteínas. Este efeito genotóxico da radiação UV é associado ao desenvolvimento de cânceres de pele (KADEKARO et al. 2003). A exposição crônica aos raios solares está associada ao desenvolvimento de cânceres de pele do

tipo não-melanoma, mas a relação entre a radiação UV e o desenvolvimento de melanomas ainda não está bem estabelecida e é um tanto controversa. Isso porque a melanina apresenta dupla função, como fotoprotetora ou fotossensibilizadora (BRENNER e HEARING 2008).

A biossíntese de melanina ocorre nos melanossomos e resulta na produção de eumelanina e feomelanina. A propriedade fotoprotetora desempenhada principalmente pela eumelanina consiste em sua capacidade de absorção da radiação UV e sua atividade antioxidante, que associadas ao mecanismo de reparo do DNA, previnem a transformação maligna de melanócitos (RASS e REICHRATH 2008). Ao mesmo tempo, a indução de produção de melanina pelos melanócitos em resposta a radiação UV é fotossensibilizadora, pois a biossíntese de melanina gera a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são capazes de interagir com o DNA e dar início ao processo de tumorigênese (KVAM e TYRRELL 1999). Portanto, o desenvolvimento do melanoma está intimamente relacionado com a exposição solar, onde a radiação UV excessiva pode ultrapassar a capacidade fotoprotetora da síntese de melanina e causar lesões no DNA e subseqüentes mutações, ou estes danos podem ser consequência direta da própria biossíntese de melanina (MADDODI e SETALURI 2008).

Portanto, alterações genéticas ocasionadas diretamente ou indiretamente pela UV solar têm como consequência múltiplas mutações ocasionadas em melanócitos que progressivamente levam a sua malignização. Entretanto, estas alterações gênicas não são exclusivamente decorrentes da exposição à UV e muitos genes estão envolvidos no desenvolvimento de melanomas malignos cutâneos esporádicos e também familiares. Dentre estes genes estão os genes supressores de tumor (*TP53* e

PTEN), reguladores de apoptose (*BCL-2*, *AKT* e *APAF-1*) e alvos das vias *CDKN2A*, *CDK4* e *MC1R* (*RAS* e *BRAF*) entre outros ilustrados na Figura 1 (ZAIDI 2008). Estas alterações genéticas acompanham as etapas de progressão de melanomas, desde nevos benignos a melanomas metastáticos, no entanto, melanócitos imaturos podem originar *ab initio* qualquer uma das formas tumorais propriamente ditas (IBRAHIM e HALUSKA 2009).



Fonte: Adaptado de ZAIDI et al. (2008).

Figura 1 - Alterações moleculares associadas com a iniciação e progressão de melanomas. A proliferação anormal de melanócitos normais em resposta à radiação UV resulta na formação de nevos benignos e displásicos. Melanoma de crescimento radial (RGP) apresenta proliferação somente intra-epitelial, enquanto melanoma de crescimento vertical (VGP) possui capacidade de invadir a derme, culminando com metástase. Todos estes estágios de desenvolvimento tumoral são acompanhados de alterações espontâneas e hereditárias no DNA, além de modulações epigenéticas.

Assim, além de fatores etiológicos como a UV ou fatores genéticos familiares, alterações no padrão de interação de melanócitos com as diferentes células presentes no microambiente tecidual da pele, como as células do estroma, também podem contribuir para o desenvolvimento de melanomas. O desenvolvimento tumoral não está baseado somente no acúmulo de mutações, portanto, o melanoma resulta do desbalanço da homeostasia presente na pele. A progressão tumoral também está relacionada com as interações celulares no microambiente tumoral. A partir destas interações com o estroma, as células metastáticas podem migrar e atingir órgãos distantes demonstrando que estas células são capazes de se adaptar a um microambiente não favorável ao seu desenvolvimento (ALBINI e SPORN 2007).

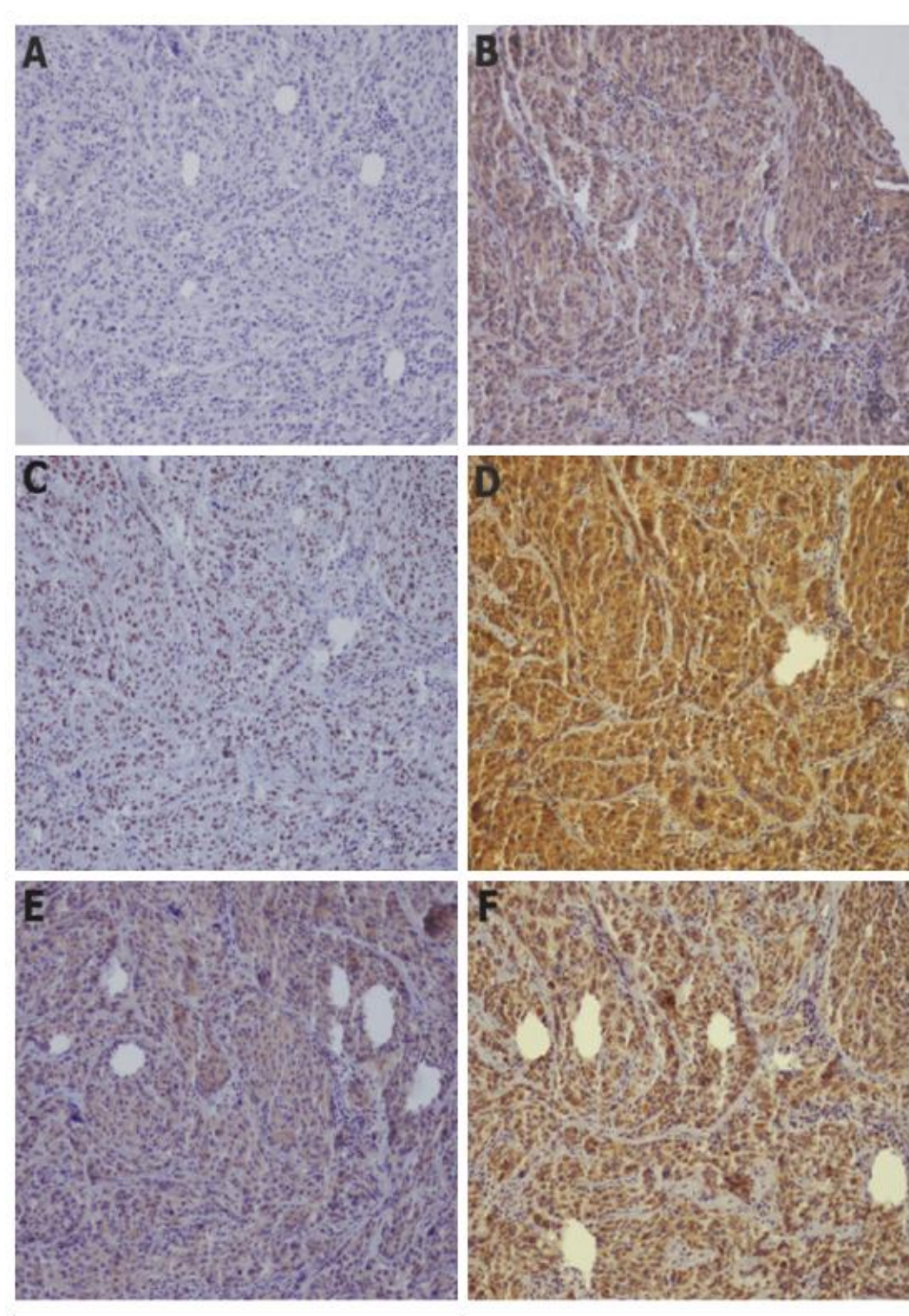
Apesar de possuir vias de apoptose aparentemente intactas, as células de melanoma são capazes de evadir a morte celular e sobreviver em condições desfavoráveis, como em hipóxia ou deprivação de glicose. Esta resistência à morte celular pode ser atribuída à intercomunicação entre os diversos tipos celulares que compõem o microambiente tumoral. Portanto, é fundamental compreender a relação entre as vias de sinalização intercelulares, para que intervenções terapêuticas mais eficientes e específicas possam ser delineadas para o tratamento de melanoma (SATYAMOORTHY e HERLYN 2002).

Neste contexto, em que o câncer é visto como uma doença de natureza multicelular ou tecidual acredita-se que a possibilidade de escape aos sinais de apoptose poderia estar relacionada com a expressão alterada de moléculas. Em nosso grupo, foram exploradas as alterações proteômicas e transcriptômicas de um modelo de melanoma murino isogênico (DE SOUZA et al. 2006). Este estudo demonstrou que em melanomas há diminuição nos níveis de proteínas envolvidas no processo de

degradação de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* – ROS). Portanto, este tipo tumoral parece estar adaptado a um microambiente tumoral pró-oxidativo.

Outro estudo realizado em colaboração com o nosso grupo mostrou que células de melanoma metastático humano (LB373) apresentam características bioquímicas da resposta a proteínas mal-enoveladas (UPR- *Unfolded Protein Response*). Estas células tumorais apresentaram acúmulo de chaperonas como PDI (Isomerase de dissulfetos protéicos) e GRP78 (*Glucose-Regulated Protein 78*), além de se mostrarem em contínuo estado pró-oxidativo (R. Chammas, comunicação pessoal). A sobrevivência destas células nestas condições sugeriu que as vias de indução de morte em resposta à UPR estivessem truncadas. De fato, avaliação dos transcritos presentes nas células de melanoma mostrou uma significativa redução dos níveis do fator transcricional ATF-4 (CREB2) (DE SOUZA et al. 2006). Em estudo cujo objetivo foi a validação e extensão destes achados, observamos que GADD153 aparece fracamente expressa em casos de melanoma humano, usando-se uma coleção de melanomas em *tissue microarray* (Figura 2). Estes dados são intrigantes, pois esta molécula induz apoptose em resposta a estresse oxidativo, condição em que normalmente se encontram as células tumorais. Sugere-se, portanto que a ausência desta proteína possa estar relacionada com a resistência destas células tumorais a sinalização de apoptose. A ausência de GADD153 parece estar relacionada com a localização celular de seu fator de transcrição ATF4. Neste mesmo estudo imuno-histoquímico, foi observado que embora melanomas apresentem-se em estado pró-oxidativo, como sugerido pela presença de marcação de moléculas envolvidas na resposta a estresse oxidativo como a enzima antioxidante SOD-2, nucleofosmina e

proibitina, o fator de transcrição ATF4 não se concentra no citoplasma (em preparação).



1.2 RELAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO COM MELANOMAS

A pele está situada na interface entre o meio ambiente e o corpo, atuando como uma barreira protetora contra injúrias como as causadas pela radiação UV ou agentes químicos, estando constantemente suscetível a exposição a estas múltiplas fontes exógenas geradoras de estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre com o desbalanço entre a produção e a eliminação de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), podendo ser resultado tanto do aumento da formação destas espécies quanto da diminuição da capacidade celular antioxidante e/ou ineficiência dos mecanismos de reparo celular (KLAUNIG e KAMENDULIS 2004). Além de fontes exógenas, a geração de RNS e ROS também ocorre endogenamente, como através da NO sintase (NOS) e NAD(P)H oxidase respectivamente. Estas espécies reativas em concentrações baixas ou moderadas estão envolvidas em respostas fisiológicas, como na defesa contra agentes infecciosos, em vias de sinalização celular, na indução de resposta mitogênica e na manutenção da homeostasia redox. Portanto, estas espécies reativas apresentam dupla função tanto desempenhando efeitos celulares benéficos quanto deletérios, pois o acúmulo de ROS resulta em estresse oxidativo (VALKO et al. 2007). Assim, o estresse oxidativo pode mediar danos às estruturas celulares como DNA, proteínas e lipídeos e em última análise levar a morte celular. O desbalanço redox decorrente do estresse oxidativo está presente em diversas doenças degenerativas, como doença de Parkinson, diabetes e câncer (VALKO et al. 2007).

A produção de ROS e o estresse oxidativo estão envolvidos no processo de tumorigênese. Em melanomas, a relação entre estresse oxidativo e o processo de

tumorigênese está relacionada com o envolvimento da geração de ROS em todos os estágios de progressão tumoral. O efeito pleiotrópico de ROS induz várias respostas celulares que contribuem para o desenvolvimento do melanoma. O maior fator etiológico do melanoma é a radiação UV, capaz de causar danos diretamente no DNA e induzir estresse oxidativo através da produção de ROS, que podem interagir com o DNA causando danos como quebras nas duplas-fitas e mutações, contribuindo para o processo de iniciação das células de melanócitos. A geração de ROS em melanomas pode estar relacionada com mecanismos celulares como: (1) resposta ao ambiente epidérmico hipóxico em que se encontram os melanócitos, (2) o elevado metabolismo das células tumorais, (3) resposta ao processo inflamatório crônico em melanomas, (4) decorrente da própria biossíntese de melanina e (5) em resultado do processo de metástase (WITTGEN e KEMPEN 2007).

A capacidade de sobrevivência a microambientes pró-oxidativos apresentada por melanomas (DE SOUZA et al. 2006) pode estar relacionada com sua célula de origem, os melanócitos. Como a biogênese de melanina é fonte expressiva de ROS, células de origem melanocítica, como as células de melanoma, devem ter adquirido um sistema antioxidante eficiente para garantir sua sobrevivência. As células de melanoma apresentam atividade antioxidante superior à encontrada em outros tipos de câncer de pele e em melanócitos (LINCOLN et al. 2003). Sugerindo que a aquisição de um sistema antioxidante é um fator crítico para o desenvolvimento de melanomas. Esta resistência a elevados níveis de estresse oxidativo resulta no comprometimento da eficácia de terapias baseadas em apoptose induzida por este tipo de estresse. Aumentos moderados na concentração de ROS ativam vias de sobrevivência e inibem a apoptose, no entanto, aumentos severos nos níveis de ROS

podem ultrapassar os níveis sustentados de ROS presentes nas células tumorais e culminar em apoptose destas células. Muitos reguladores redox encontram-se alterados em células tumorais resistentes a drogas, sugerindo que a alteração na homeostasia redox deva estar relacionada com a resistência celular, portanto, manipular o sistema redox pode ser uma terapia alternativa para induzir a morte celular de células tumorais resistentes (PELICANO et al. 2004). Esta abordagem terapêutica tem sido investigada recentemente. Estudo clínico fase II com elesclomol, agente indutor de ROS, em combinação com paclitaxel resultou em maior sobrevida de pacientes com melanoma metastático, comparado ao tratamento somente com paclitaxel. Este estudo sugere uma nova alternativa para avanço no tratamento de melanomas metastáticos (KIRSHNER et al. 2008).

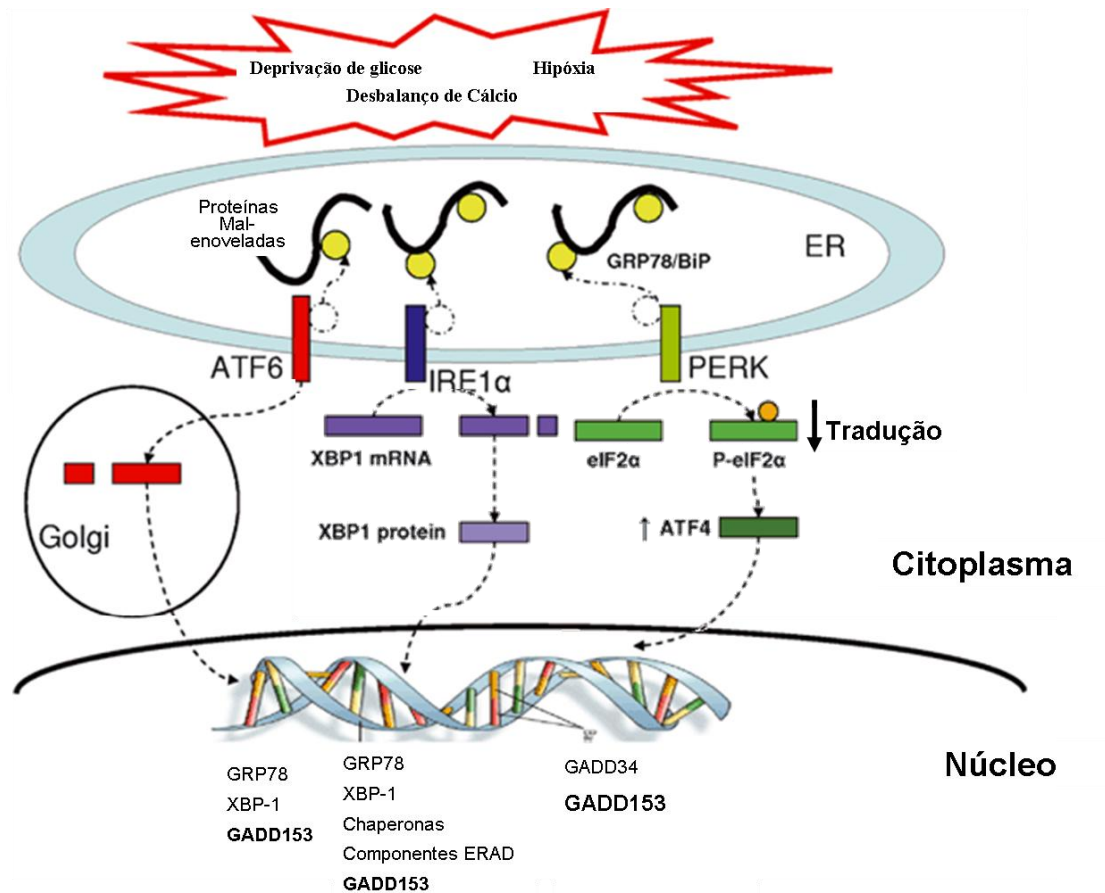
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O estresse oxidativo se relaciona com o estresse do retículo endoplasmático (RE), uma vez que os eventos de enovelamento protéico e produção de ROS podem ser correlacionados. Como discutido anteriormente, as ROS podem interagir não somente com DNA, mas também com proteínas e lipídeos. Como o enovelamento protéico ocorre no RE através de processos oxidativos, o acúmulo de ROS decorrente da indução de estresse oxidativo pela radiação UV, por exemplo, pode ocasionar alterações no processo de enovelamento protéico e levar ao acúmulo de proteínas mal enoveladas. Este acúmulo compromete a homeostasia do RE e caracteriza o estresse de RE (MALHOTRA e KAUFMAN 2007).

O lúmen do RE é constituído de microambiente oxidativo que favorece o enovelamento protéico através da formação de pontes dissulfeto. Esta organela possui proteínas chaperonas, que catalizam o enovelamento protéico, e *proteínas sensoras* capazes de detectar proteínas mal enoveladas ou não enoveladas (CSALA et al. 2006). A presença de um mecanismo de “controle de qualidade” garante que apenas proteínas enoveladas adequadamente saiam do RE (LEDERKREMER 2009). Além da alteração do estado redox causado por estresse oxidativo, outros fatores levam à ruptura da homeostasia do RE como alteração de níveis intraluminais de cálcio, alteração no perfil de glicosilação protéica, deprivação de nutrientes e infecção por patógenos (FAITOVA et al. 2006).

Em resposta ao estresse do RE é ativado o mecanismo conhecido como resposta a proteínas mal enoveladas - *Unfolded Protein Response* – UPR, na tentativa de restabelecer a homeostasia do RE (MA e HENDERSHOT 2004). A via de UPR é regulada por três proteínas sinalizadoras presentes na membrana do RE, IRE1, ATF6 e PERK. Estas proteínas encontram-se associadas à chaperona GRP78 (Bip) quando o RE se encontra em homeostasia. No entanto, em situações de estresse estas proteínas são ativadas através do desligamento de GRP78 que é recrutada para auxiliar no enovelamento protéico (KAUFMAN 1999). Estas proteínas uma vez ativadas respondem a situação de estresse induzindo vias que levam à diminuição da tradução protéica, aumento da expressão de proteínas responsáveis pelo enovelamento protéico e proteínas envolvidas no processo de degradação proteossomal de proteínas mal enoveladas, mecanismo denominado ERAD (do inglês: *ER-associated protein degradation*) (Figura 3) (MEUSSER et al. 2005). Outra via de resposta ao estresse do RE denominada EOR (do inglês: *ER overload*

response) está relacionada com a ativação da via de sobrevivência desempenhada por NF κ B a fim de induzir a resposta imune e efeitos antiapoptóticos (PAHL e BAEUERLE 1997). A ativação de NF κ B resulta da liberação de cálcio do RE que ocorre em resposta ao estresse do RE, o que leva à produção de ROS que degradam o inibidor de NF κ B, I κ B (KIM et al. 2006).



Fonte: Adaptado de HERSEY e ZHANG (2008).

Figura 3 - Vias ativadas em UPR (*Unfolded Protein Resposnse*). O mecanismo de resposta ao estresse de RE, UPR, e suas vias desencadeadas pela ativação das três proteínas sinalizadoras de estresse presentes no RE.

A persistência do estresse do RE leva a ativação de vias de morte celular a fim de eliminar as células com comprometimento severo do RE. As principais vias apoptóticas ativadas em resposta ao estresse do RE são a indução transcricional do gene GADD153/CHOP, a ativação da quinase JNK e a ativação de caspases (FAITOVA et al. 2006).

GADD153 (do inglês: *Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene 153*), membro da subfamília de fatores de transcrição C/EBPs (do inglês *CCAAT/Enhancer Binding Proteins*) está presente no citoplasma em condições de homeostasia celular, no entanto, situações de estresse induzem aumento de expressão e acúmulo GADD153 no núcleo. A indução de GADD153 está envolvida na resposta ao estresse do RE, onde o aumento da expressão desta proteína pode resultar em parada de ciclo celular e apoptose (OYADOMARI e MORI 2004).

As três proteínas sinalizadoras de estresse do RE podem induzir a transcrição de GADD153 (Figura 3), no entanto, a via de PERK/eIF2 α é dominante sobre as demais. A ativação de PERK leva à fosforilação do aminoácido serina 51 da subunidade α da proteína eIF2 (eIF2 α), fator de iniciação do processo de tradução protéica. A fosforilação do eIF2 α atenua a tradução global de mRNAs, mas permite que ocorra a tradução de mRNAs específicos, como ATF4, fator de transcrição de GADD153. GADD153 é um fator de transcrição nuclear que induz a morte celular em resposta ao estresse de RE. Esta molécula envolvida no processo de morte celular pode suprimir a ativação de BCL-2 (MCCULLOUGH et al. 2001) e NF κ B, podendo levar à sensibilização da mitocôndria aos efeitos pró-apoptóticos das proteínas BH3-only (OYADOMARI e MORI 2004). GADD153 também induz apoptose através de um mecanismo não transcricional, como a interação proteína-proteína. Por exemplo,

C/EBP α (do inglês: *CCAAT/enhancer binding protein alpha*), família de proteínas a qual GADD153 pertence, mostra efeito antiproliferativo através da interação com as quinases CDK2 e CDK4, causando parada no crescimento celular pela inativação destas quinases (WANG et al. 2001).

O mecanismo de estresse do RE pode ter relação direta com a progressão de melanomas através da adaptação e seleção de células de melanoma resistentes a este tipo de estresse. Este processo de adaptação está relacionado com a ausência de morte destas células tumorais, que mesmo em microambiente pró-oxidativo permanecem altamente proliferativas (HERSEY e ZHANG 2008). A repressão da ativação de GADD153 pode estar relacionada com a ausência de resposta apoptótica ao estresse do RE presente em células tumorais. Estudos demonstraram o envolvimento de NF κ B na inibição da ativação de GADD153 em células de câncer de mama submetidas à indução de estresse de RE (NOZAKI et al. 2001).

Induzir a expressão de GADD153 nas células tumorais pode ser uma estratégia para aumentar a eficiência terapêutica de quimioterápicos em melanomas metastáticos. A indução de estresse do RE pode ser uma boa estratégia para induzir a ativação de GADD153. Ainda, os quimioterápicos são capazes de induzir estresse, entretanto possuem a desvantagem de apresentarem elevada toxicidade. Uma alternativa a estas drogas, que vem sendo cada vez mais estudada e aceita, é o uso de compostos extraídos de plantas. Um dos compostos naturais que apresentam capacidade de induzir estresse e morte celular em células tumorais é a curcumina (LÓPEZ-LÁZARO 2008). A indução de GADD153, pela curcumina, poderia resultar em aumento da eficiência de quimioterápicos, permitindo a administração de menores doses e conseqüentemente, reduzindo os efeitos tóxicos apresentados pelos

quimioterápicos. A sensibilização prévia das células tumorais pela curcumina somada ao posterior efeito apoptótico dos quimioterápicos, resultaria em uma nova alternativa para terapia de melanoma metastático.

1.4 CURCUMINA

A curcumina, [1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione], é o principal componente ativo do pó derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*, nativa da Ásia. Este composto natural é utilizado milenarmente como condimento, corante e na medicina tradicional indiana. A curcumina possui muitas propriedades benéficas como atividade antiinflamatória, antioxidante, quimiopreventiva e quimioterapêutica. Seu efeito pleiotrópico está relacionado com sua capacidade de influenciar múltiplas vias de sinalização como: ciclo celular (ciclins D1 e E), apoptose (ativação de caspases e diminuição de produtos gênicos antiapoptóticos), proliferação (HER-2, EGFR, e AP-1), sobrevivência (via PI3K/AKT), invasão (moléculas de adesão e MMP-9), angiogênese (VEGF), metástase (CXCR-4) e inflamação (NFkB, TNF, IL-6, IL-1, COX-2, e 5-LOX). Além de interferir nestas diferentes vias de sinalização, curcumina apresenta atividade pró e antioxidante. (HATCHER et al. 2008).



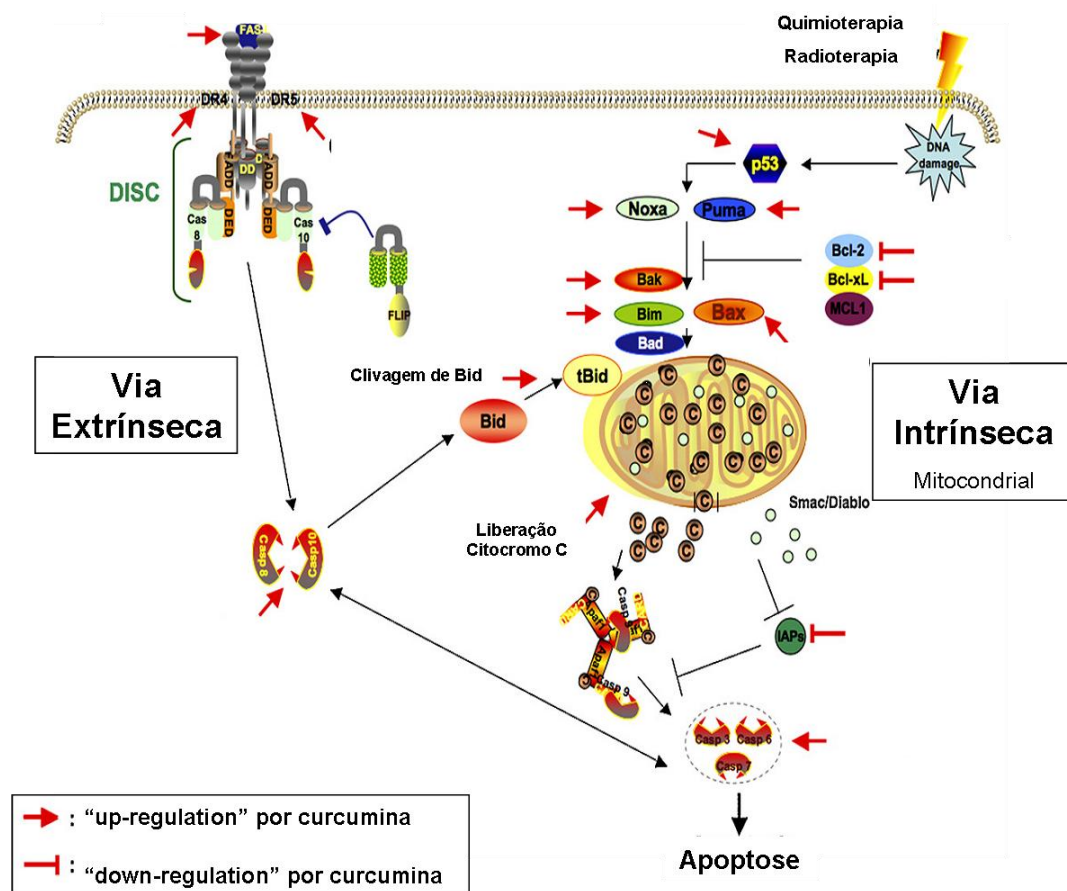
Fonte: Adaptado de HATCHER et al. (2008).

Figura 4 – *Curcuma longa*. O extrato do rizoma da planta *Curcuma longa* apresenta coloração amarelo-alaranjada e um dos componentes deste extrato é a curcumina.

A curcumina apresenta atividade antitumoral inibindo tanto o início do desenvolvimento quanto a progressão tumoral. Estudos *in vivo* demonstraram que curcumina é capaz de proteger o DNA de danos induzidos por diferentes carcinógenos, indicando a atividade quimioprotetora apresentada por este composto (LÓPEZ-LÁZARO 2008). O potencial quimioterapêutico de curcumina também foi estudado em diversos tipos tumorais (ANAND et al. 2008).

O mecanismo de indução de morte celular por curcumina está relacionado com a indução de vias apoptóticas intrínsecas e extrínsecas, e a inibição de vias de sobrevivência mediadas por NFkB e PI3K/Akt. Curcumina regula várias proteínas envolvidas em ambas as vias de apoptose, aumentando ou diminuindo a expressão

destas (Figura 5). Na via apoptótica intrínseca, o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e a produção de ROS estão envolvidos na morte celular induzida por curcumina. No entanto a via de sinalização extrínseca mediada pelo receptor Fas também é induzida pela curcumina em alguns tipos tumorais (REUTER et al. 2008).



Fonte: Adaptado de REUTER et al. (2008)

Figura 5 - Representação dos alvos de curcumina nas vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas.

A morte celular induzida por curcumina também pode estar relacionada com sua capacidade de induzir estresse do RE. Curcumina é capaz de induzir estresse do

RE através da inibição da atividade proteassomal, da indução de acúmulo de cálcio citoplasmático e inibição da formação de pontes dissulfeto (REUTER et al. 2008). A morte induzida por estresse do RE através do tratamento com curcumina foi observada em estudos com células de leucemia humana (HL-60) (PAE et al. 2007), células de câncer de cólon (SCOTT e LOO 2007) e células de melanoma murino (BAKSHI et al. 2008). Nestes estudos, foi observado aumento de proteínas envolvidas com resposta ao estresse do RE, como GRP78 e GADD153.

Através da sua atividade pró-oxidativa, este composto poderia ser capaz de sensibilizar as células tumorais ao tratamento com agentes quimioterápicos. Além do efeito antitumoral direto, a curcumina também pode ser utilizada como adjuvante no tratamento de tumores. A curcumina é capaz de sensibilizar células tumorais a apoptose induzida pelo ligante relacionado a TNF (TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) em células de câncer de ovário (WAHL et al. 2007) e câncer de próstata (DEEB et al. 2003). A quimioterapia combinada de curcumina com outros compostos naturais como chá verde (LI et al. 2002) e taxol (BAVA et al. 2005), resulta em aumento de apoptose das células tumorais com diminuição da dose administrada e consequente redução de efeitos adversos. Estudos com células tumorais de pulmão mostraram que o pré-tratamento com curcumina resultou no aumento do efeito apoptótico da droga Vinorelbine (SEN et al. 2005).

Em células de melanoma humano, curcumina apresenta potente efeito anti-proliferativo e apoptótico, relacionados com a supressão do fator de transcrição NFkB e da quinase Ikb (SIWAK et al. 2005). ODOT et al. (2004) verificou a atividade *in vitro* e *in vivo* da curcumina na indução de apoptose em células de melanoma B16-R resistentes a doxorrubicina. Este grupo mostrou que a combinação

dos tratamentos de curcumina com meio condicionado de células B16-R, resultou em maior porcentagem de morte celular e inibição do crescimento tumoral, quando comparado a cada tratamento independente. Os dados obtidos neste estudo favorecem a possibilidade de desenvolvimento de terapia mais eficaz para melanoma metastático altamente resistente, sugerindo curcumina para o auxílio do restabelecimento da resposta antitumoral. Uma vez estabelecida esta relação de sensibilização da célula tumoral pela curcumina, torna-se importante descobrir quais moléculas poderiam estar envolvidas na indução de apoptose.

OBJETIVO

2 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral verificar a sensibilização de células de melanoma humano através da indução do estresse do retículo endoplasmático.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Comparar a expressão de GADD153 em células tratadas com curcumina e células tratadas com droga indutora de estresse do retículo endoplasmático, tunicamicina;
- 2 Verificar se há sensibilização das células de melanoma a morte induzida por cisplatina através do tratamento prévio com curcumina;
- 3 Avaliar possíveis mecanismos da ação de curcumina, de maneira comparativa à ação de tunicamicina, como moduladores da resposta de indução de morte celular por cisplatina.

MATERIAIS E MÉTODOS



3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto (nº0975/07) foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Anexo 19)

3.1 CULTIVO DE CÉLULAS

As linhagens celulares de melanoma humano utilizadas foram LB373, SKmel37 e 28, Mel85, MeWO, MZ2. As linhagens LB373, MEWO, MEL85, SKmel28 e MZ2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (CultiLab[®]); e a linhagem SKmel37 em meio *Minimum Essential Medium Eagle*-MEM (Gibco[®]). Todas as células foram cultivadas em meio suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (CultiLab[®]). As linhagens foram mantidas em estufa úmida a 37 °C e em atmosfera contendo 5% de CO₂. O descolamento das células para posterior contagem e subcultivo foi realizado através de duas lavagens com PBS-EDTA, seguida de curta exposição à tripsina (CultiLab[®]).

3.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTEN BLOT

3.2.1 Extrato Celular

Foram realizadas duas lavagens com PBS/EDTA e em seguida adicionou-se tripsina para descolar as células da garrafa. A suspensão de células foi centrifugada

por 3 minutos a 2000 rpm e o *pellet* foi ressuspendido em tampão de lise celular da fração solúvel (50mM Tris (pH 7.5), 150mM NaCl, 5mM EDTA (pH 8.0), 1% Triton X-100, 1mM Na_3VO_4 (1:100), 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 1 mM PMSF). A solução ressuspendida foi incubada a 4°C por 15 minutos. Após este período, foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, obtendo-se a fração solúvel. Os mesmos procedimentos foram realizados com o tampão de lise da fração nuclear (20mM Hepes, 630mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% Glicerol, 1 mM Na_3VO_4 , 2 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina, 1 mM PMSF). Uma vez obtida a fração nuclear, esta foi adicionada à fração solúvel a fim de se obter o lisado proteico total, e este foi armazenado a -20°C (WAJIH et al. 2004 (modificado)).

3.3.2 Dosagem de Proteínas

Foi feita a dosagem de proteínas obtidas com o lisado protéico total, de acordo com protocolo modificado do Método de Lowry (LOWRY et al. 1951). A dosagem foi realizada pelo kit Ensaio de Proteína BCA, da BioAgency[®], conforme descreve o fabricante, utilizando BSA como padrão protéico. A solução de reagentes A e B foram preparadas na proporção de 50:1 (A: B). Esta solução foi adicionada a cada poço, numa proporção de 8:1 (reagente: amostra). A placa ficou a 37°C por 30 minutos protegida da luz. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Rad[®]), utilizando-se filtros de 592nm.

3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Foram realizadas análises de proteínas separadas de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE). As amostras de extratos protéicos foram separadas

em gel de poliacrilamida de concentração 10%. Primeiro foi feito o gel de corrida (4,2 ml H₂O, 2,5 ml Lower Buffer (4x), 3,3 ml 30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida, 33µl de Persulfato de Amônio 10% (APS), 17 µl TEMED). Depois de polimerizado o gel Lower, adicionou-se o gel de empilhamento (1140 µl H₂O, 500 µl Upper Buffer (4x), 340 µl 30% acrilamida / 0,8%bisacrilamida, 20 µl APS 10%, 2,7 µl Temed). Neste gel foi colocado o pente para criação dos canais de aplicação das amostras. Polimerizado o gel, o pente foi retirado e os poços foram lavados, mergulhando o gel no tampão de corrida (1x) (250 mM Tris base, 1,9 M glicina, 1% SDS). Foram separadas 30 µg de proteína e o mesmo volume de tampão de amostra redutor (2x) (120 mM Tris 4x, 4% SDS, 0,01% bromophenol blue, 2 ml glicerol e 0,1M DTT). Também foram separados 6 µl de marcador de peso. As amostras e o marcador foram deixados no banho seco a 100°C por 5 minutos. As amostras foram aplicadas no gel e corridas a 80 V por 3 a 3,5 horas (LAEMMLI et al. 1970).

Um dos géis foi corado com Coomassie Blue para controle de massa. O gel de poliacrilamida foi colocado em recipiente coberto pela solução de comassie blue (50% metanol, 40% água, 10% ácido acético, 0,05% comassie blue). Depois de corado foi descorado com a solução descorante A (37,5 ml ácido acético, 227ml metanol, 235,5 ml água) e depois com a solução B (36,5 ml ácido acético, 25 ml metanol, 437,5 ml água). O gel depois de descorado foi fotografado e seco por 45 minutos a 80 °C (LAEMMLI et al. 1970).

3.2.4 Transferência das Amostras

Um segundo gel foi utilizado para transferir as proteínas presentes nele para uma membrana de PVDF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, Amershan®). A

membrana foi primeiramente ativada mergulhando-a em metanol e em seguida em água. O aparato de transferência foi montado e o “sanduíche” contendo esponja, papel filtro, gel e membrana, foi colocado neste aparato. Utilizou-se o tampão de transferência (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol, em água), que deve cobrir completamente o aparato, mantendo a membrana sempre embebida neste. Corrido a 80 V e 4°C por uma hora. A membrana transferida pode ser armazenada à temperatura ambiente e posteriormente ativada novamente (BURNETTE 1981).

3.2.5 Blotting

Com a membrana ativada, foi realizado bloqueio de sítios inespecíficos pela lavagem com 5% de leite em PBS-Tween 0,5% em agitação a temperatura ambiente por uma hora. Após bloqueio a membrana foi incubada com os anticorpos primários policlonais: anti-GRP78 feito em coelho (ab53068, Abcam[®]) na concentração de 1mg/ml, anti-GADD153 feito coelho (SC-575, Santa Cruz[®]) na concentração de 2 µg/ml e anti-β-Tubulina III feito em coelho (Sigma[®]) na concentração de 0,3 µg/ml. Os anticorpos primários foram incubados em agitação a 4°C *overnight*. Em seguida, após três lavagens de 10 minutos cada com 5% de leite em PBS-Tween 0,5%, foi incubada com o anticorpo secundário, anti-coelho conjugado à peroxidase (Sigma[®]), na concentração de 9,5 µg/ml, em agitação por uma hora a temperatura ambiente. Efetuadas novamente três lavagens de 10 minutos cada com 5% de leite em PBS-Tween 0,5%, e lavagens rápidas com PBS, as membranas foram reveladas por DAB. (BURNETTE 1981).

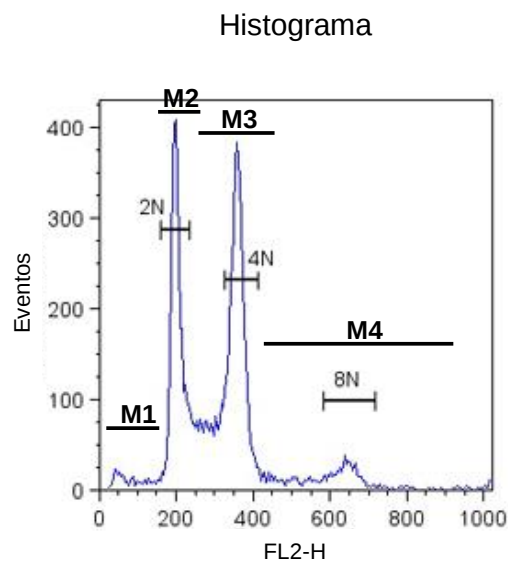
3.2.6 Revelação com Diaminobenzidina (DAB)

Retirado o excesso de PBS da membrana, esta foi colocada com as proteínas voltadas para cima em uma placa seca e limpa. A solução preparada contendo 7,5 ml de PBS, 25 μ l H_2O_2 e 7,5mg de DAB (Sigma[®]) foi adicionada sobre a membrana e após agitação manual até a visualização das bandas, a membrana foi lavada rapidamente com água para parar a reação com DAB.

3.3 CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAR O CICLO CELULAR

A avaliação de ciclo e morte celular foi realizada através da marcação com iodeto de propídio (PI, do inglês *propidium iodide*). O PI incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA. Para tal, as células de melanoma foram plaqueadas, cerca de $0,5 \cdot 10^5$ células por poço (placa de 12 poços), e após submetidas aos diferentes tratamentos, estas foram colhidas por tripsinização. O protocolo seguido foi adaptado do *Short Protocols in Molecular Biology*, 3th edition, 1995. As células tripsinizadas foram fixadas em etanol 70%, e mantidas congeladas até o momento da análise por citometria de fluxo (citômetro FACScalibur Becton & Dickson[®]). As células fixadas foram centrifugadas por 5 minutos a 300g, após descartado o etanol vertendo os tubos, o pellet foi lavado em PBS, centrifugando-o a 300g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi ressuspendido em 200 μ l de solução de PI (20 ml PBS, 20 μ l Triton (0,1%), 200 μ g/ml RNase, 20 μ g/ml PI) transferindo as amostras para tubos de FACS. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente,

protegendo da luz, foi feita captação das células marcadas pelo citômetro. A análise da citometria de fluxo foi realizada usando-se o programa *Cell Quest Pro* da *Becton & Dickson*[®]. A porcentagem das células nas diferentes fases do ciclo celular foi quantificada e os dados foram expressos em gráficos de histogramas. Como ilustrado na figura 6, a porcentagem de células encontrada no primeiro segmento (M1) foi considerada representativa das células em morte celular, pois este segmento contém células com conteúdo de DNA abaixo de 2n (hipodiplóides). O segundo segmento (M2) foi definido pelo primeiro pico de eventos, onde havia células com conteúdo de DNA compatível com a fase G0/G1 do ciclo celular. O terceiro segmento (M3) apresentava células que caracterizam as fases S/G2/M do ciclo celular. O quarto segmento (M4) representa agregados celulares.



Fonte: Adaptado de www.dundee.ac.uk/lifesciences/FACS/cell_cycle.htm.

Figura 6 - Esquema representativo da análise de ciclo celular através de um histograma.

3.4 ENSAIO DE CLONOGENICIDADE

Para avaliar a capacidade de sobrevivência de células resistentes ao tratamento com curcumina, foi feito ensaio de clonogenicidade. Neste ensaio as células de melanoma após os tratamentos prévios, foram semeadas numa concentração celular baixa a fim de que clones individuais crescessem e fossem posteriormente contados. Após contagem das células viáveis através da coloração com *Tripan Blue*, foram plaqueadas 600 células em placa 60 mm de diâmetro contendo meio de cultura enriquecido com 10% de SFB. As placas foram incubadas a 37 °C, na presença de 5% de CO₂, por cerca de 12-14 dias. Depois foram fixadas com 1% de paraformaldeído por 15 minutos e corados com 0,1% de cristal de violeta. O número de colônias foi quantificado a olho nu em cada condição. (DEPEILLE et al. 2004).

3.5 ENSAIO DE ATIVIDADE DE CASPASES

A verificação da ativação de caspases foi realizada de acordo com o protocolo descrito no Kit utilizado para a detecção de multicaspases Guava[®]. As células não aderentes foram coletadas e juntadas às células aderentes após seu descolamento com tripsina, pois, o tratamento com curcumina, tunicamicina ou cisplatina levam à morte celular acompanhada pelo descolamento de células. Foram contadas 10⁵ células, adicionado meio de cultura e centrifugadas a 200g por 2 min. Depois de descartado o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em 100µl de *wash buffer* e 5µl do inibidor de multi caspases SR-VAD-FMR (20x) ou 5µl de FLICA (10X), substrato de

caspases 8 ou caspases 3/7. Em seguida foi incubado por 1 hora a 37°C, homogenizando duas vezes durante este período. Duas lavagens com a adição de 150µl de *wash buffer*, centrifugando a 200g por 2 minutos. Após as duas lavagens foi adicionado 200µl de *wash buffer* e foi feita leitura no citômetro no canal de fluorescência FL2-H.

3.6 DETECÇÃO DE GLICANOS

O protocolo seguido foi modificado a partir da bula do Kit de diferenciação DIG Glycan (catalog nº 11210238001). Este protocolo utiliza lectinas para o reconhecimento de diferentes ligações glicosídicas das proteínas em membrana de PVDF. A membrana foi incubada com 5 ml de solução de bloqueio *overnight* em câmara fria sob agitação (4,5ml Buffer1 + 0,5ml reagente bloqueio-Frasco12). Após duas lavagens com 5ml de TBS e 1 vez com buffer1 por 10 minutos cada lavagem, foi adicionada 5µl da lectina DSA em 5ml de buffer1 e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. A lectina DSA (do inglês: *Datura stramonium agglutinin*) reconhece resíduos de galactose- $\beta(1-4)$ -N-acetilglucosamina (Gal- $\beta(1-4)$ -GlcNAc). Após o período de incubação a membrana foi lavada 3 vezes com 5 ml de TBS por 10 minutos cada lavagem. Em seguida a membrana foi incubada com digoxigenina-AP por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes com 5 ml de TBS por 10 minutos cada lavagem. Para revelar a membrana foi preparada solução contendo 5 ml de buffer 2 e 100µl de reagente 7, a qual a membrana foi imersa e agitada até o aparecimento de coloração escura no local em que a lectina se ligou. A reação é parada por lavagens sucessivas com água.

3.7 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As células foram incubadas nas condições descritas anteriormente e foram tratadas com curcumina nas concentrações de 2; 10; 25 e 50 μM ; e 0,1% de ETOH (diluyente da curcumina) por 24 horas. Após este período, os níveis de ROS foram determinados através da incubação com 15 μM de dihidrorrodamina 123 (DHR 123) por 30 minutos a 37 °C e protegidos da luz. Após este período de incubação as células foram soltas por tripsinização, ressuspendidas em 200 μL de PBS e analisadas por citometria de fluxo. (Adaptado do Manual do Kit *Multidrug Resistance Direct DyeEfflux Assay* da Chemicon).

3.8 AVALIAÇÃO DA ALTERAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

As células foram incubadas nas condições descritas anteriormente e foram tratadas com curcumina nas concentrações de 2; 10; 25 e 50 μM ; e 0,1% de ETOH (diluyente da curcumina) por 24 horas. O controle sem tratamento e com cisplatina (controle positivo para $\Delta\psi\text{m}$) também foram realizados. Após tratamento as células foram soltas por tripsinização e centrifugadas a 2000rpm por 3 minutos. O pellet foi ressuspendido em meio de cultura com JC-1 (2nM) e agitado intensamente por 20 segundos. Após duas lavagens com PBS, as células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após período de incubação os monômeros e agregados JC-1 foram medidos por citometria de fluxo, avaliando a fluorescência

verde e vermelha, respectivamente. (Adaptado do Manual da Molecular Probes – *JC1 and JC9 Mitochondrial Potencial Sensors*) (WERNER e WERB 2002).

3.9 MICROSCOPIA CONFOCAL

Foram cultivadas cerca de $2,0 \cdot 10^4$ células por poço, em placas de 24 poços contendo uma lamínula em cada poço. As células foram cultivadas sobre condições de cultura com diferentes concentrações de curcumina (2,10,25 e $50 \mu\text{M}$) e de tunicamicina (0,5; 1,25 e $2,5 \mu\text{g/ml}$) por 24 horas. Após o tratamento as células foram fixadas gradualmente com 2% de formaldeído em PBS por 15 minutos, seguidos de mais 15 minutos de fixação com formaldeído 4%. Após 3 lavagens com PBS, as células foram permeabilizadas com Triton X-100/PBS 0.2% por 5 minutos. O bloqueio por sítios inespecíficos foi feito com PBS/BSA 5% por 1 hora. Depois de realizado bloqueio foi incubado anticorpo primário monoclonal anti-KDEL feito em camundongo (Stressgen[®]) ($10 \mu\text{g/ml}$), gentilmente cedido pelo Laboratório de Biologia Vascular–Incor/FMUSP. Este anticorpo foi diluído em PBS/BSA 5% e incubado *overnight* (O.N.) a 4°C . Após 3 lavagens com PBS/BSA 1%, foi adicionado anticorpo secundário feito em camundongo Alexa Flúor 488 e incubado em câmara escura/úmida por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS/BSA 0,5% de 10 minutos cada. Após as lavagens foi adicionado DAPI ($0,3 \text{ mg/ml}$) diluído em PBS/BSA 5% por 15 minutos no escuro. Foram realizadas mais três lavagens com PBS/BSA 0,5% de 10 minutos cada e após lavagem foi adicionado Faloidina conjugado à TRITC (Sigma[®]) ($0,2 \mu\text{g/ml}$) diluído em PBS/BSA 5% por 15 minutos no escuro. Por último, foram montadas as

lâminas (RASTOGI et al. 2006). A análise foi realizada em microscópio confocal ZEISS LSM 510 Meta/UV.

3.10 TRANSFEÇÃO DO PLASMÍDEO pNF- κ B-HRGFP EM CÉLULAS LB373

Foi realizada a transformação de bactérias *E.coli* competentes (MARANHÃO 2003) para que fosse possível a incorporação do plasmídeo contendo a região promotora de NF κ B modulada por GFP (pNF- κ B-hrGFP Plasmid - Stratagene® #240051). Inicialmente bactérias *E.coli* foram estriadas em placas de meio LB sólido (LB Ágar) e incubadas O.N. a 37°C. Após a formação de colônias, uma única colônia foi inoculada em meio LB líquido contendo MgCl₂ (10mM) e MgSO₄ (10mM) e incubada em agitação (200rpm) a 37°C. Quando o crescimento atingiu uma OD₆₅₀ = 0,3, 10ml da suspensão foi centrifugada por 15 minutos a 40000 rpm e 4°C. O *pellet* obtido foi ressuspenso em 1 ml de tampão de transformação (Tris-HCl pH 8,0 (10mM), CaCl₂ (50mM), MgCl₂ (10mM) e MgSO₄ (10mM)) e dividido em alíquotas de 200 μ l. A cada alíquota foi adicionado 5 μ l de DNA (50-250ng de DNA), em seguida foi incubada em banho de gelo por 30 minutos, deixada em banho seco a 42°C por 90 segundos e colocada em banho de gelo novamente. Consecutivamente, foi adicionado 600 μ l de meio LB e incubado a 37°C por 60 minutos. Cerca de 150 μ l desta suspensão foi plaqueada em placas com meio LB sólido contendo ou não Ampicilina (100 μ g/ml) (MANDEL e HIGA 1970).

As bactérias de fato transfectadas, expressam gene de resistência à ampicilina. Portanto, foram selecionadas as bactérias que cresceram na presença

deste antibiótico e inoculadas em meio LB líquido com ampicilina O.N. para a proliferação das mesmas. Em seguida foi retirado 1,5ml desta suspensão e sentrifugada a 3000g por 2 minutos. Foi adicionado ao *pellet* mais 1,5ml e centrifugado novamente. As células foram ressuspensas em 200µl de solução I (Tris-HCl pH8,0 (25mM), EDTA pH8,0 (10mM) e glicose (50mM)) e incubadas no gelo por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 400µl de solução II (NaOH(0,2M) e SDS 1%) e incubado por mais 5 minutos no gelo, consecutivamente, foi adicionado 300µl de solução III e incubado no gelo por mais 10 minutos (Acetato de potássio (5M), Ácido Acético Glacial e H₂O(q.s.p.)). Após as incubações, foi realizada a centrifugação desta suspensão a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, a este foi adicionado 10µl de RNaseA (10mg/ml) e incubado a 37°C por 30 segundos em banho seco. Após a incubação, foi adicionado 300µl de solução fenol/clorofórmio (v:v) e agitado intensamente com auxílio do vórtex. A solução foi centrifugada a 5000g por 15 minutos, a fase aquosa foi coletada e foi adicionado 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após incubação O.N. a -20°C, foi realizada centrifugação a 14000rpm, por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 70%, sem ressuspende-lo, e foi repetida a centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco com ar quente. Após secagem, o *pellet* foi ressuspendido em 100 a 200 µl de tampão TE (Tris-HCl (10mM) e EDTA (10mM)) e armazenados a -20°C (MARANHÃO 2003).

A transfecção deste plasmídeo em células LB373 foi realizada através da formação de complexos DNA-lipossomos. Para tal, foi realizado plaqueamento de cerca de $1,5 \cdot 10^5$ células por poço em placas de 35mm. Para cada poço foram preparadas as soluções A (1µg de DNA em 100µl de meio OPTI-MEM (Gibco®)

sem soro) e B (6µl de lipofectamina (Invitrogen®) em 100µl de meio RPMI (pH 7.2) sem soro) que foram misturadas gentilmente e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos para a formação do complexo DNA-lipossomo. Durante a incubação os poços foram lavados com meio RPMI sem soro e em seguida foi adicionado 800µl deste meio de cultivo em cada poço. Após os 30 minutos de incubação, 200 µl da mistura de soluções A e B foram adicionadas a cada poço. O controle com apenas o veículo de transfecção, a lipofectamina, também foi realizado. As células foram incubadas com o complexo DNA-lipossomo e apenas com lipofectamina por 5 horas a 37°C, após este período foi adicionado 1ml de meio contendo o dobro de SFB. No dia seguinte as células foram repicadas para garrafas (75cm). Após 72h de transfecção, cerca de $0,5 \cdot 10^5$ células por poço foram plaqueadas em placas de 12 poços. Após aderirem, as células foram tratadas com tunicamicina, curcumina e seus respectivos diluentes, DMSO e ETOH, por 24 horas. Após o tratamento as células foram descoladas por tripsinização, recolhendo-se o sobrenadante. A suspensão de células foi centrifugada a 2000 rpm por 2 minutos e as células foram ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *GraphPad Prism* versão 4.0 para o Windows, *GraphPad Software, San Diego California USA*. Os dados foram comparados e analisados com o auxílio de testes paramétricos (One-way ANOVA/Bonferroni). Foram consideradas como estatisticamente significantes as comparações cujo valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO À INDUÇÃO DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE)

Foi avaliada a capacidade de tunicamicina em levar linhagens de melanoma metastático humano à morte celular. A indução de estresse do retículo endoplasmático foi obtida pelo tratamento com tunicamicina, antibiótico que inibe a enzima GlcNAc fosfotransferase (GPT). A GPT catalisa a transferência de N-acetilglucosamina-1-fosfato de UDP-N-acetilglucosamina, a primeira etapa do processo de glicosilação. Através do bloqueio da síntese do oligossacarídeo precursor, tunicamicina bloqueia a N-glicosilação cotraducional (Anexo 1). Portanto, proteínas mal ou não enoveladas acumulam no retículo endoplasmático, induzindo estresse do RE.

As linhagens celulares estudadas Skmel37, LB373, Mewo, Skmel28 e MZ2 foram submetidas ao tratamento com 0,5µg/ml e 1,25µg/ml de tunicamicina por 24 horas. Os respectivos controles, sem tratamento e com o diluente de tunicamicina (0,1% DMSO), foram realizados. A morte celular foi analisada pela marcação com iodeto de propídio (PI) por citometria de fluxo, através da avaliação da marcação presente no segmento M1 do histograma, que representa as células hipodiplóides. Após a citometria, foi realizada análise estatística dos valores obtidos nos histogramas, com a comparação da quantidade de eventos presentes em M1 em cada

linhagem celular submetidas às duas concentrações de tunicamicina decrescidas dos respectivos valores encontrados em M1 nos controles (DMSO) (Anexo 2).

A Figura 7 mostra que as cinco linhagens apresentaram diferentes perfis de morte em resposta ao tratamento com ambas as concentrações de tunicamicina. Sendo a linhagem Skmel37 mais sensível a morte induzida por estresse do RE já que esta apresentou aproximadamente 25% de células em morte celular.

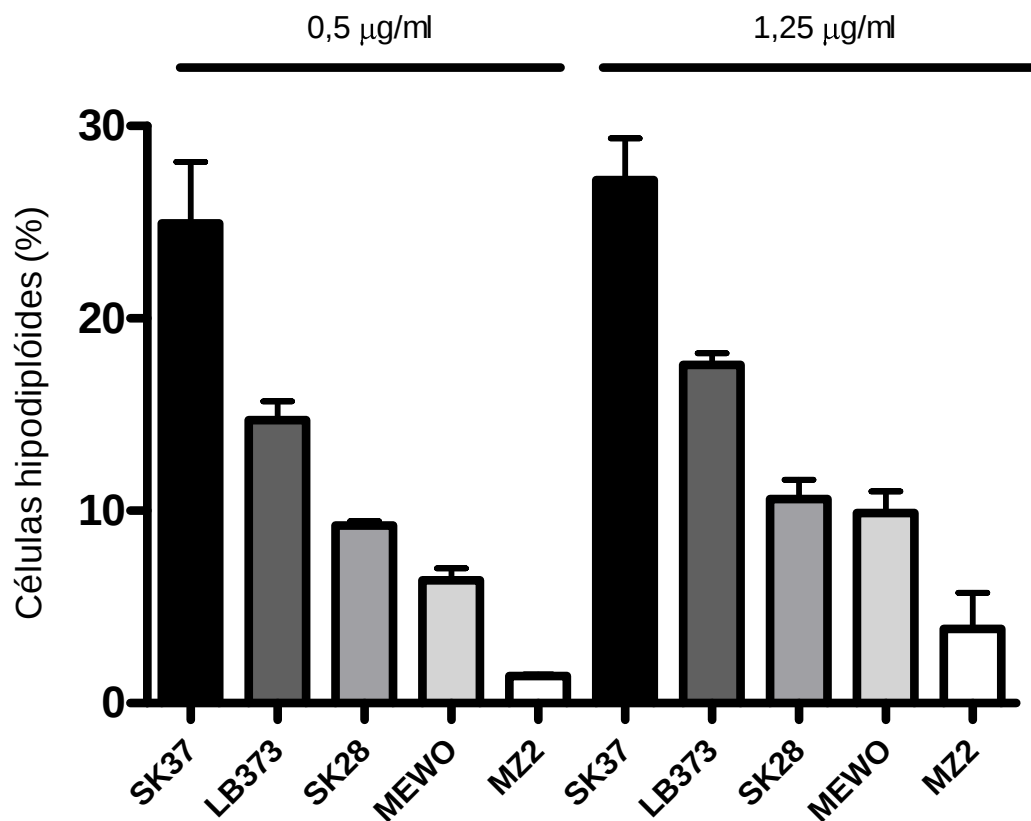


Figura 7 - Tratamento das células de melanoma humano Skmel37, LB373, Skmel28, Mewo e MZ2mel com tunicamincina. As células foram tratadas com 5µg/ml e 1,25µg/ml de tunicamicina por 24 horas. A quantificação das células em processo de morte celular foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e obtida por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (ANOVA/Bonferroni).

4.2 RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO AO TRATAMENTO COM CISPLATINA

A fim de sensibilizar as células de melanoma através da indução de estresse do RE ao tratamento com cisplatina, foi observado inicialmente o padrão de morte em resposta ao tratamento apenas com cisplatina.

A partir dos dados ilustrados anteriormente (Figura 7), foram escolhidas as linhagens que apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com tunicamicina, Skmel37 e LB373. As demais células que se apresentaram mais resistentes a indução de estresse de RE não favoreceriam a hipótese elaborada neste estudo de sensibilização.

Ambas as linhagens celulares foram submetidas ao tratamento com 2,5 e 25 μ M de cisplatina por 24 horas e os respectivos controles sem tratamento também foram realizados. Através de citometria de fluxo e marcação com PI, foi avaliada a morte celular induzida por cisplatina nestas linhagens. A Figura 8 mostra que cisplatina (25 μ M) induz morte celular em ambas as linhagens quando comparadas a seus respectivos controles ($p < 0,001$). No entanto, a porcentagem de células hipodiplóides presentes em Skmel37 (40%) é superior a encontrada em LB373 (12%) (Anexo 3).

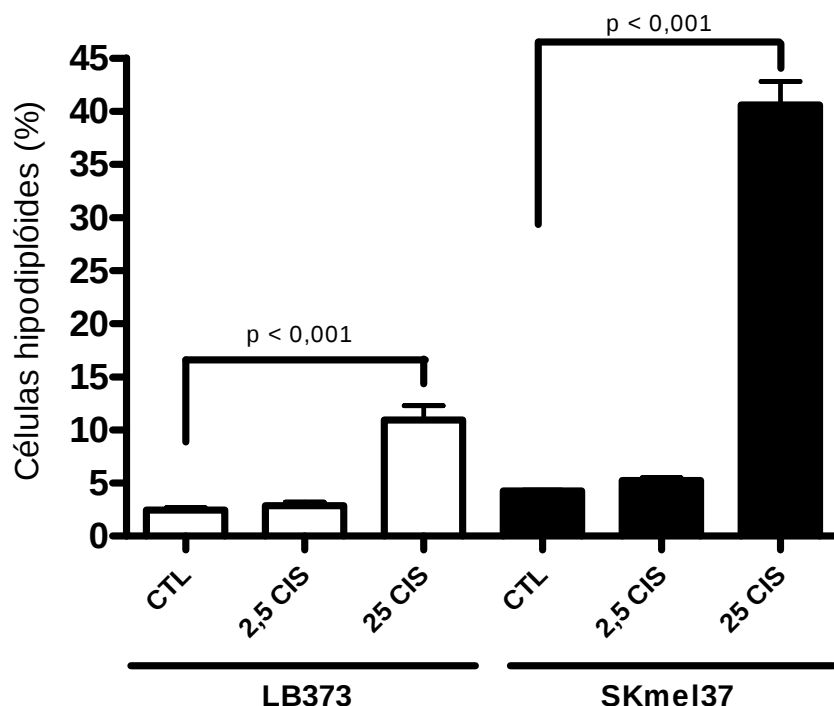


Figura 8 - Tratamento das células de melanoma humano Skmel37 e LB373 com cisplatina. As células foram tratadas com 2,5 e 25 μ M de cisplatina por 24 horas. O controle sem tratamento com cisplatina também foi realizado em ambas as células. A quantificação das células hipodiploides foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. CTL: controle; 2.5 CIS: 2,5 μ M cisplatina; 25 CIS: 25 μ M cisplatina. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata, contendo a média das triplicatas e o desvio padrão. (ANOVA/Bonferroni).

4.3 SENSIBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO À MORTE INDUZIDA POR CISPLATINA ATRAVÉS DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DO RE, PELO TRATAMENTO PRÉVIO COM TUNICAMICINA

Para verificar se a indução de estresse do RE seria capaz de sensibilizar as células de melanoma à morte induzida por cisplatina, foi realizado o tratamento das células LB373 e Skmel37 de acordo com a Figura 9 abaixo.

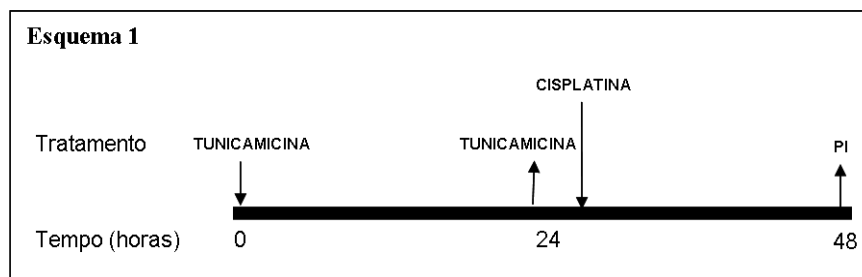


Figura 9 – Esquema do tratamento prévio com tunicamicina e posterior tratamento com cisplatina.

As células foram tratadas com 0,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina por 24 horas. Após retirado o meio de tratamento com tunicamicina, foi adicionado meio de cultivo contendo 12,5 μM de cisplatina, e as células foram incubadas por mais 24 horas. A concentração de 12,5 μM de cisplatina foi escolhida por ser intermediária as concentrações apresentadas anteriormente (Figura 8), pois a maior concentração é citotóxica para as células Skmel37. O tratamento com apenas cada uma das concentrações de ambas as drogas, com o diluente da tunicamicina (0,1% de DMSO) e a ausência de tratamento, foram realizados como controles do experimento. A quantificação das células em morte também foi realizada por marcação com PI e análise por citometria de fluxo.

O tratamento prévio com tunicamicina foi capaz de sensibilizar ambas as linhagens a morte induzida por cisplatina (Figura 10). A linhagem LB373 apresentou maior porcentagem de células hipodiplóides com a associação de tunicamicina (1,25 $\mu\text{g/ml}$) e cisplatina quando comparado a apenas o tratamento com cisplatina ($p < 0,01$) (Figura 10A) (Anexo 4). Já a linhagem Skmel37 também apresentou o mesmo perfil de sensibilização, porém, pode-se observar aumento na porcentagem de células hipodiploides com ambas as concentrações de tunicamicina ($p < 0,001$) (Figura 10B) (Anexo 5).

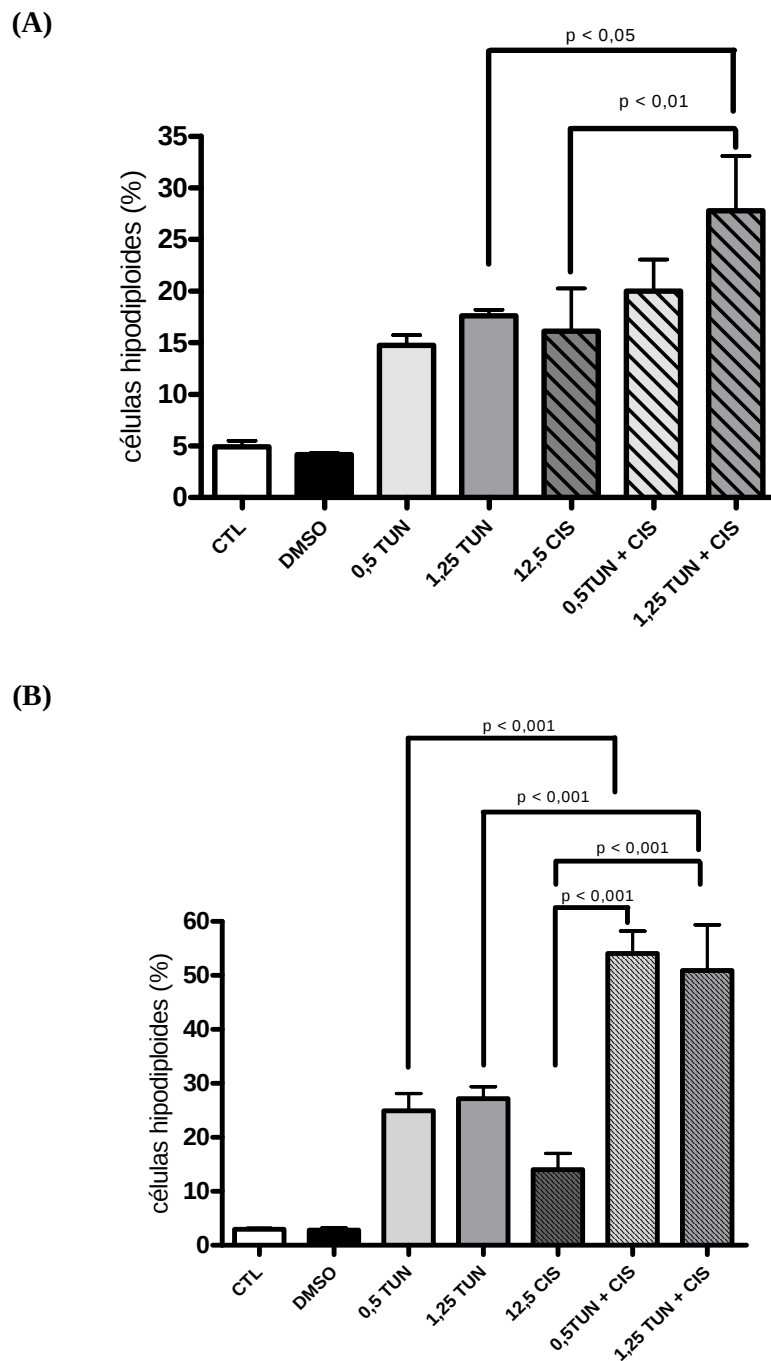
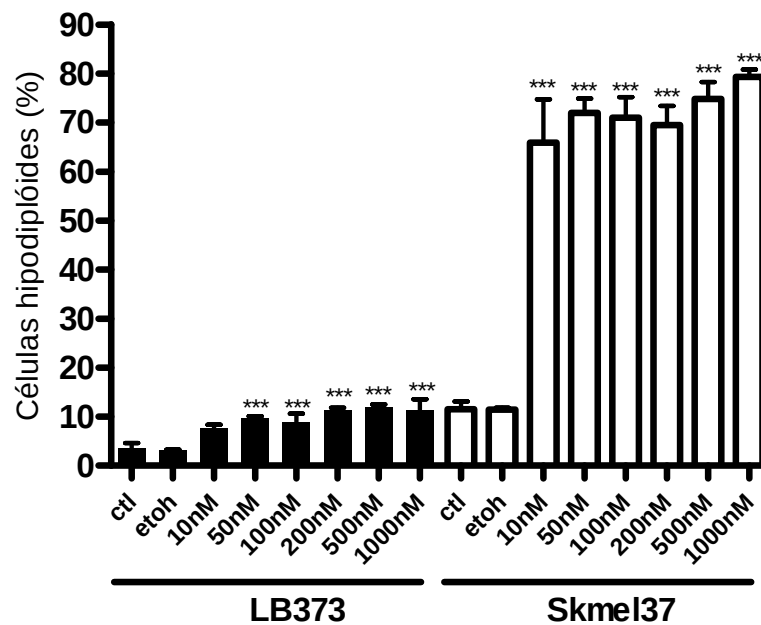


Figura 10 - Sensibilização das células LB373 (A) e Skmel37 (B) à morte induzida por cisplatina. As células foram tratadas com tunicamicina (0,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (12,5 μM por 24 horas). A quantificação das células hipodiploides foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. CTL: controle; 0,5 TUN / 1,25 TUN: 0,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ tunicamicina; 12,5 CIS: 12,5 μM cisplatina. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata, contendo a média das triplicatas e o desvio padrão. (ANOVA/Bonferroni).

Outro indutor de estresse de RE, tansigargina, foi avaliado a fim de confirmar a sensibilização das células de melanoma através da indução deste estresse. A figura 11A, mostra a elevada citotoxicidade apresentada pelas células Skmel37 ao tratamento com tansigargina, impossibilitando a avaliação de sensibilização através do tratamento com tansigargina nestas células. No entanto, as células LB373 (Figura 11B) apresentaram o mesmo efeito aditivo de morte celular com o tratamento prévio com tansigargina, reforçando o envolvimento de estresse do RE neste processo de sensibilização (Anexo 6).

(A)



(B)

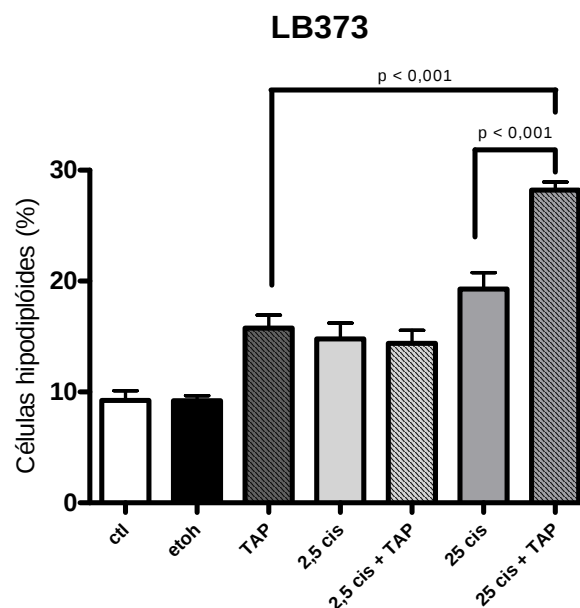


Figura 11 - A: Tratamento das células LB373 e Skmel37 com taspargina. As células foram tratadas com 10, 50, 100, 200, 500 e 1000 nM de taspargina por 24 horas. **B: Tratamento das células LB373 com taspargina e/ou cisplatina.** As células LB373 foram tratadas com taspargina (50 nM por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M por 24 horas). A quantificação das células hipodiplóides foi realizada através da incorporação de iodo de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. CTL: controle; TAP:taspargina; 2,5 e 25 CIS: 2,5 μ M e 25 μ M cisplatina. (***) $p < 0,001$. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (ANOVA/Bonferroni).

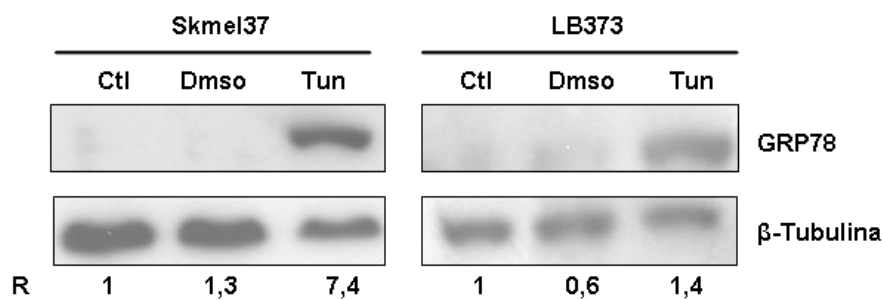
4.4 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO ESTRESSE DE RE INDUZIDA POR TUNICAMICINA

Extratos protéicos totais das linhagens Skmel37 e LB373 foram feitos para avaliar a expressão de GRP78 e GADD153 após tratamento com 5µg/ml de tunicamicina por 24 horas. O Western blot foi ilustrado na Figura 12. Mediu-se o valor relativo (R) da variação do nível de expressão de GRP78 após tratamento com tunicamicina em relação ao seu controle.

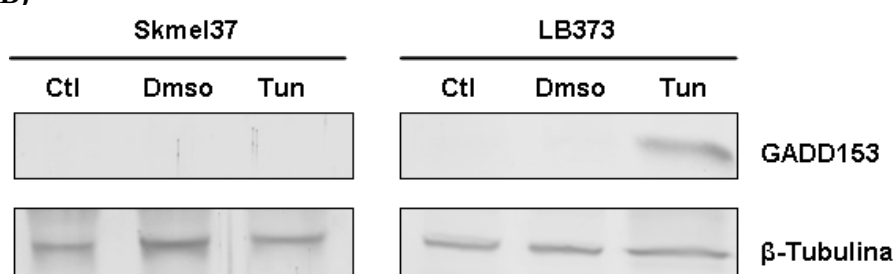
A Figura 12A mostra que houve aumento da expressão da chaperona GRP78 após o tratamento com tunicamicina em ambas as linhagens. As células Skmel37 (7,4 fold) apresentaram aumento da expressão de GRP78 superior ao observado nas células LB373 (1,4 fold), quando comparado aos respectivos controles. A Figura 12B mostra que a expressão da proteína efetora de morte em resposta ao estresse do RE, GADD153, só é induzida por tunicamicina nas células LB373.

Na Figura 12C pode-se observar a eficácia da indução de estresse do RE através do tratamento com tunicamicina. Foram realizados blots para lectinas de extratos protéicos (7,5µg) das células Skmel37 e LB373 tratadas com 5µg/ml de tunicamicina por 24 horas. As glicoproteínas foram marcadas pela lectina DSA que reconhece Galβ-(1,4)GlcNAc. Comparando com os respectivos controles, tanto as células Skmel37 quanto LB373 demonstraram diminuição no conteúdo de glicoproteínas contendo lactosamina em resposta ao tratamento com tunicamicina, comprovando o efeito deste antibiótico que atua como inibidor de N-glicosilação.

(A)



(B)



(C)

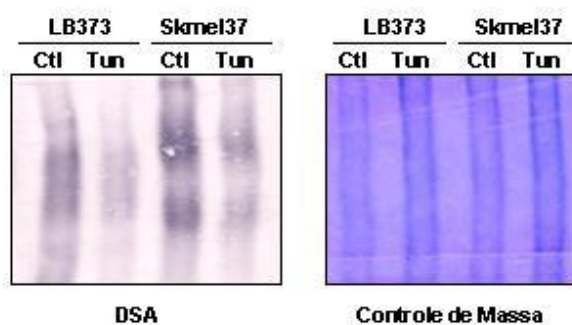


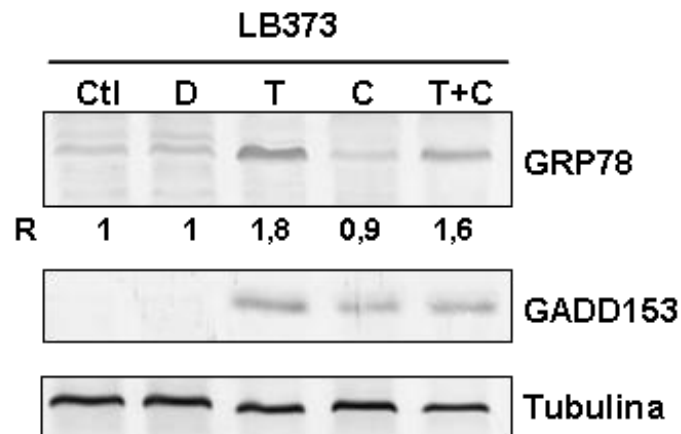
Figura 12 – Western blot para avaliar a expressão de GRP78 (A) e GADD153 (B) em extrato protéico de Skmel37 e LB373 tratadas com tunicamicina. As células foram tratadas com 5µg/ml de tunicamicina por 24 horas e com 0,1% de DMSO. O controle sem tratamento também foi realizado. C: Perfil de marcação ao DSA, reconhece Galβ-(1,4) GlcNAc, de extratos protéicos de células Skmel37 e LB373 tratadas com tunicamicina (5µg/ml por 24 horas). R: valor relativo da expressão de GRP78 comparada ao controle de massa, β-Tubulina. Western blot representativo de três experimentos independentes.

A expressão destas proteínas, GRP78 e GADD153, também foi avaliada nas células LB373 (Figura 13A) e Skmel37 (Figura 13B) quando submetidas ao tratamento prévio com tunicamicina (1,25µg/ml) por 24 horas e posterior tratamento com cisplatina 12,5µM, por mais 24 horas.

Em ambas as linhagens houve aumento da expressão de GRP78 nas células submetidas ao tratamento com tunicamicina. A associação dos tratamentos de tunicamicina e cisplatina parece não resultar em aumento de GRP78. O incremento de morte presente na associação dos tratamentos pode estar relacionado com a indução prévia de estresse do RE, pois apenas o tratamento com cisplatina não demonstra aumento significativo de GRP78.

A expressão de GADD153 pode ser observada tanto no tratamento apenas com cisplatina, quanto com a associação dos tratamentos nas células LB373. Diferente das células Skmel37 que não apresentaram expressão desta proteína em nenhum dos tratamentos, reforçando os dados demonstrados anteriormente (Figura 11B) de que GADD153 parece não estar envolvido com a morte celular induzida por estresse do RE nesta linhagem.

(A)



(B)

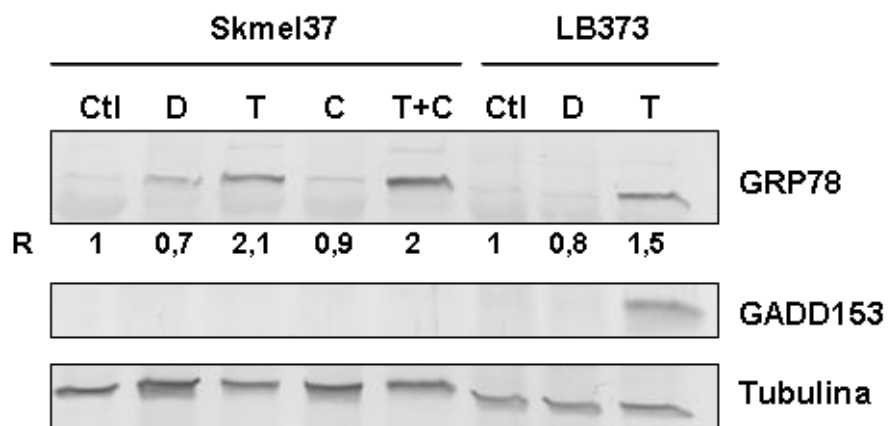


Figura 13 - A expressão de GRP78 e GADD153 em extrato celular de LB373(A) e Skme137(B) quando tratadas com tunicamicina (1,25 μ g/ml) e/ou cisplatina (12,5 μ M). As células foram tratadas com 1,25 μ g/ml de tunicamicina por 24 horas e em seguida com 12,5 μ M de cisplatina por mais 24 horas. Legenda: Ctl: Controle; D: DMSO; T: tunicamicina; C: cisplatina. R: valor relativo da expressão de GRP78 comparada ao controle de massa, β -Tubulina. Western blot representativo de dois experimentos independentes.

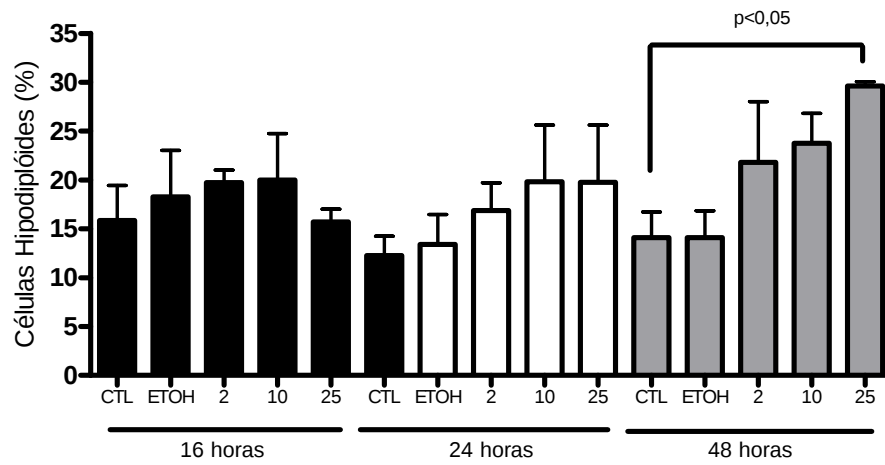
4.5 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR INDUZIDA POR CURCUMINA

Inicialmente foi determinado tempo de tratamento e concentração de curcumina mais adequados para avaliar a sensibilização das células de melanoma em estudo. Para tal, foi realizado ensaio com diferentes concentrações de curcumina (2; 10 e 25 μM) durante diferentes períodos de tempo (16, 24 e 48 horas) (Figura 14).

As duas linhagens estudadas, LB373 (Anexo 7) e Skmel37 (Anexo 8), apresentaram acentuada morte celular na maior concentração de curcumina (25 μM) com tratamento por 48 horas ($p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente). A célula Skmel37 por possuir perfil de maior sensibilidade apresentou aumento de morte celular na maior concentração de curcumina também nos menores períodos de incubação, 16 e 24 horas ($p < 0,001$). Como se pretendia sensibilizar as células à morte, a concentração de 25 μM não pareceu ser adequada devido a sua elevada toxicidade. Nesta concentração, a elevada toxicidade do tratamento com curcumina pode ser evidenciada pela presença de alterações morfológicas (Figura 26) presentes nas maiores concentrações de curcumina (25 e 50 μM) e ausente nas menores concentrações (2 e 10 μM). Portanto, a concentração de 10 μM e o tempo de 24 horas de tratamento, pareceram mais apropriados para a sensibilização destas células.

Análises de ciclo celular também foram realizadas em cada experimento avaliando as fases G0/G1 e S/G2M, no entanto, curcumina não apresentou indução de parada de ciclo celular de maneira consistente. Assim, não foi possível determinar acúmulo de células em determinada fase do ciclo celular em resposta ao tratamento com curcumina.

(A)



(B)

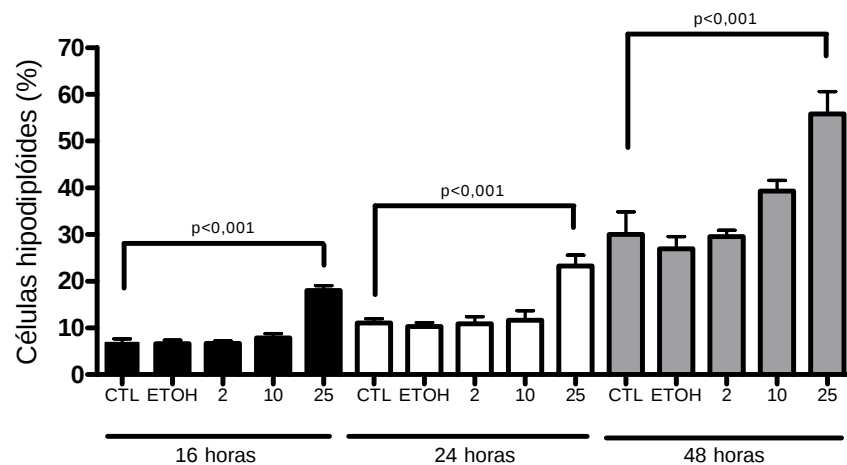


Figura 14 - Tratamento das células LB373 e Skmel37 com diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de tratamento. As células LB373 (A) e Skmel37 (B) foram tratadas com curcumina (2; 10; 25 e 50 μ M) e 0,1% de ETOH (diluyente da curcumina) por 16, 24 e 48 horas. O controle sem tratamento também foi realizado. A quantificação das células hipodiplóides foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata, contendo a média das triplicatas e o desvio padrão. (ANOVA/Bonferroni).

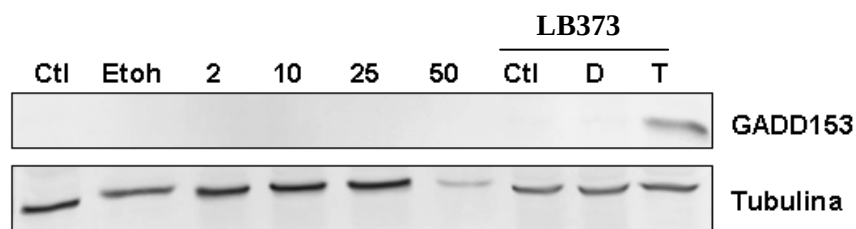
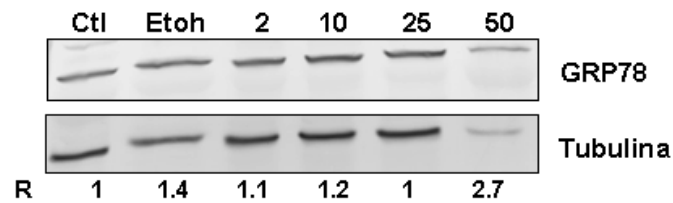
4.6 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA AO ESTRESSE DE RE INDUZIDA POR CURCUMINA

A Figura 15 mostra o western blot de extratos protéicos totais (50µg) das linhagens Skmel37 (A) e LB373 (B) realizados para avaliar a expressão de GRP78 e GADD153 após tratamento com diferentes concentrações de curcumina (2, 10, 25 e 50µM) por 24 horas. Em ambas as linhagens não houve aumento dose-dependente da expressão de GRP78 após tratamento com curcumina.

Na Figura 15A, observa-se que as células Skmel37 apresentaram discreta tendência de aumento da expressão de GRP78 com as diferentes concentrações de curcumina. Na maior concentração (50µM), há degradação protéica devido à elevada citotoxicidade de curcumina nesta concentração. Nesta mesma figura observamos que o tratamento com curcumina não é capaz de induzir a expressão de GADD153 nestas células.

A Figura 15B, mostra que as células LB373 apresentam expressão de GRP78 aproximadamente constante nas diferentes concentrações de curcumina. E nesta linhagem, curcumina também não é capaz de induzir a expressão de GADD153.

(A)



(B)

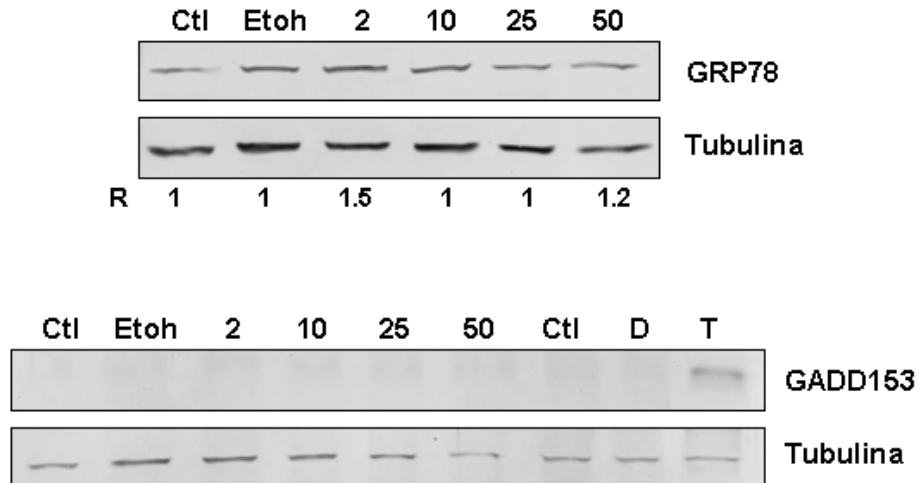


Figura 15 - Expressão de GRP78 e GADD153 em extratos celulares de Skmel37 (A) e LB373(B) tratadas com curcumina (2, 10, 25 e 50 μ M). As células foram tratadas com curcumina e seu diluente, 0,1% ETOH, por 24 horas. O controle sem tratamento também foi realizado. Legenda: Ctl: Controle; D: Dms; T: tunicamicina. R: valor relativo da expressão de GRP78 comparada ao controle de massa, β -Tubulina. Western blot representativo de três experimentos independentes.

4.7 SENSIBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO, LB373 E SKMEL37, A MORTE INDUZIDA POR CISPLATINA ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM CURCUMINA

O tratamento prévio das células Skmel37 e LB373 com curcumina, a fim de sensibilizá-las ao posterior tratamento com cisplatina, foi realizado através do esquema 2 ilustrado na Figura 16 abaixo.

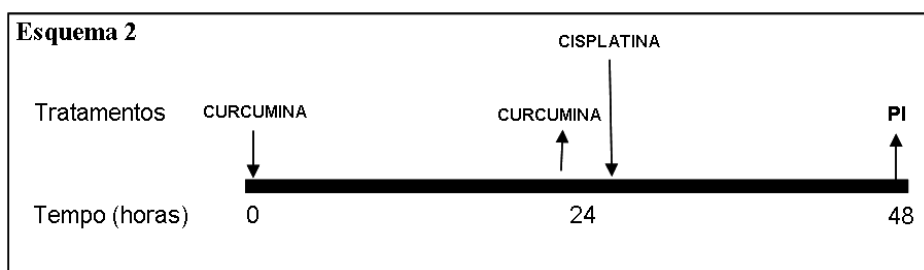


Figura 16 - Esquema do tratamento prévio com curcumina e posterior tratamento com cisplatina (24 horas).

Ambas as células foram tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas e posteriormente com 2,5 e 25 μ M de cisplatina também por 24 horas.

A Figura 18A mostra que o tratamento prévio com curcumina não resultou em maior porcentagem de células hipodiplóides com a posterior associação com cisplatina. Como esta linhagem vinha apresentando acentuada sensibilidade, o tempo de 24 horas de tratamento com cisplatina poderia estar ocasionando uma saturação de morte celular, comprometendo a visualização do efeito aditivo de morte celular em resposta à associação dos tratamentos (Anexo 9). A fim de tentar verificar de maneira mais adequada este efeito aditivo de morte celular, foi delineado um novo esquema de tratamento, com a redução de 24 para 16 horas de tratamento com cisplatina (Figura 17).

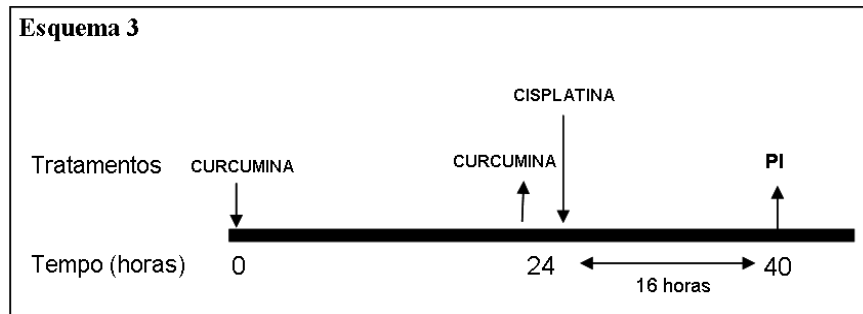


Figura 17 - Esquema do tratamento prévio com curcumina e posterior tratamento com cisplatina (16 horas).

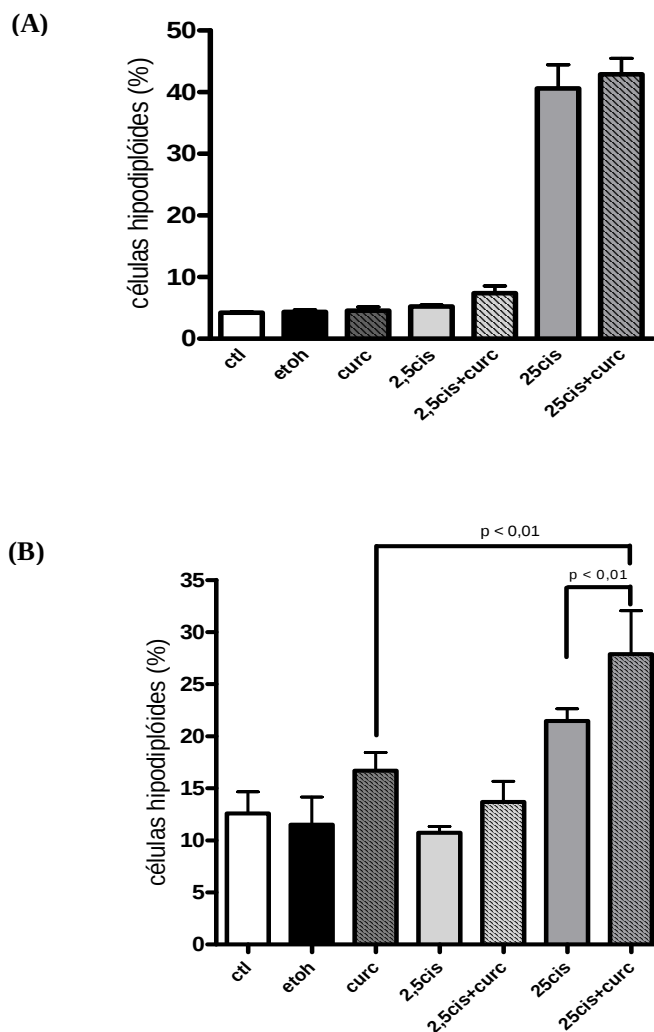


Figura 18 – Células Skmel37 tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 24 horas (A) e 16 horas (B). Ctl: controle; Curc: curcumina; Cis: cisplatina. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata, contendo a média das triplicatas e o desvio padrão. (ANOVA/Bonferroni).

A Figura 18B mostra que a redução do período de tratamento com cisplatina para 16 horas permitiu identificar a sensibilização destas células através do tratamento prévio com curcumina ($p < 0,01$) (Anexo 10).

A Figura 19 mostra a resposta das células LB373 ao esquema 2 (Figura 16) de tratamento com curcumina e cisplatina. Surpreendentemente, estas células apresentaram redução na porcentagem de células hipodiplóides com a associação dos tratamentos ($p < 0,01$). Ao invés de sensibilizar, neste contexto, o tratamento com curcumina parece conferir proteção para estas células (Anexo 11).

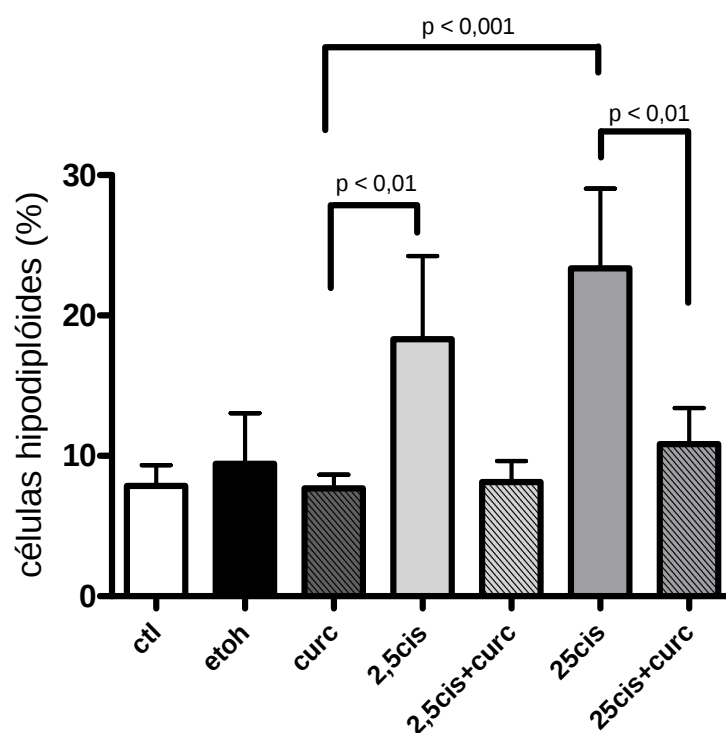


Figura 19 - As células LB373 foram tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 24 horas. Ctl: controle; Curc: curcumina; Cis: cisplatina. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata, contendo a média das triplicatas e o desvio padrão.(ANOVA/Bonferroni).

4.8 ENSAIO CLONOGÊNICO DE CÉLULAS LB373 E SKMEL37 TRATADAS COM CURCUMINA E/OU CISPLATINA

A fim de avaliar a capacidade de sobrevivência celular após o tratamento com curcumina, foi realizado ensaio de clonogenicidade com as células Skmel37 e LB373 (Figura 20). As células foram tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas e em seguida com 0,5; 1; 2,5 e 5 μ M de cisplatina também por 24 horas. Após este período de tratamento, foram plaqueadas 600 células viáveis de cada tratamento e do controle com 0,1% de etanol, em placas de 60mm. Após 12 dias de incubação os clones formados foram fixados com paraformaldeído (1%) e corados com cristal de violeta (0,1%). Após corados, foi realizada contagem do número de clones formados em cada condição de tratamento.

O tratamento prévio com curcumina conferiu proteção para as células LB373 (Figura 20B e C) na concentração de 1 μ M, com aumento do número de clones formados após o tratamento associado de curcumina e cisplatina, quando comparado ao tratamento apenas com cisplatina.

Nas células Skmel37 (Figura 20A) não se pôde observar diferença no número de clones formados com o tratamento com curcumina, pois a elevada sensibilidade desta linhagem pode impedir que se observe alteração no número de clones formados devido à elevada morte celular, principalmente com o tratamento de 24 horas.

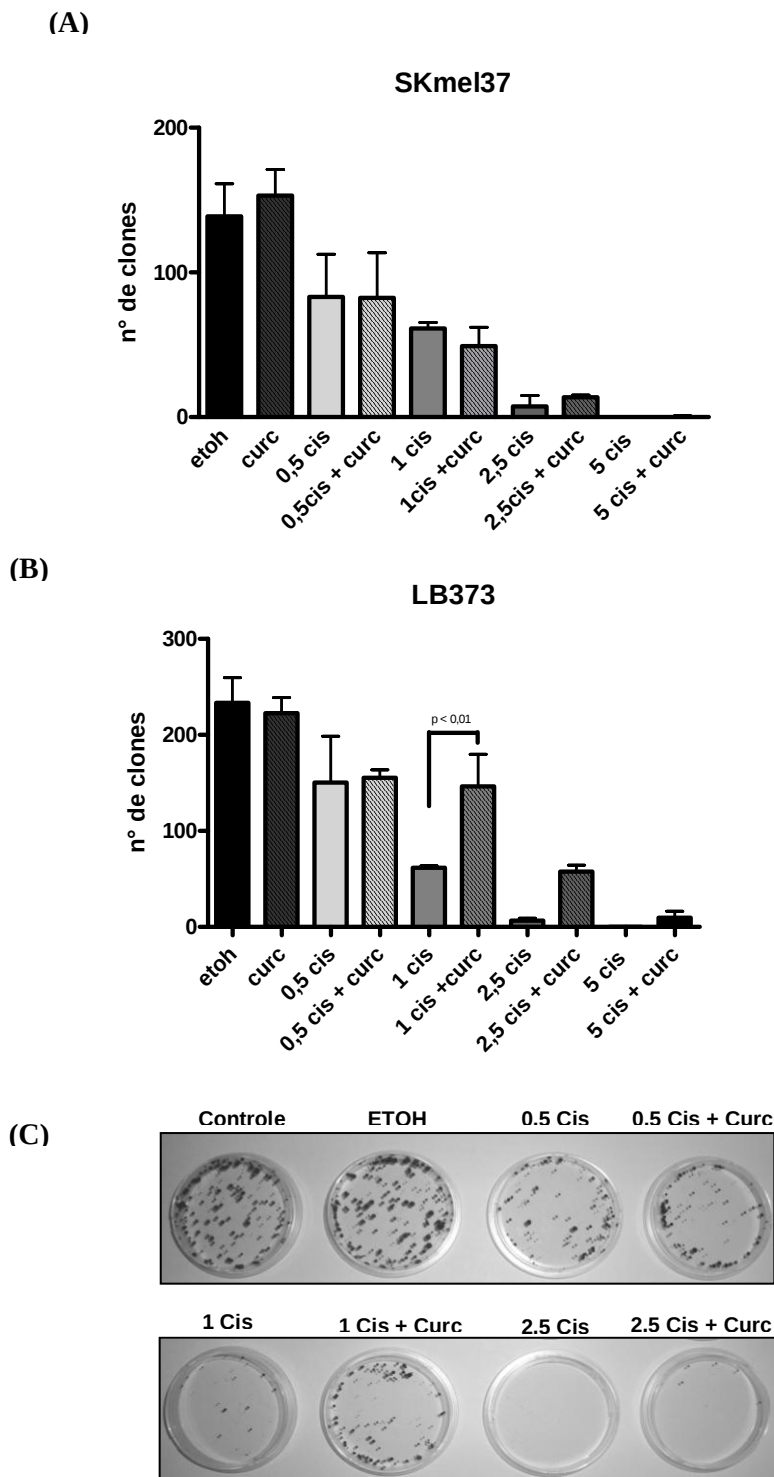


Figura 20 - Ensaio clonogênico com células Skmel37(A). LB373 (B e C). As células foram tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas e após este período foram tratadas com as seguintes concentrações de cisplatina: 0,5; 1; 2,5 e 5 μ M, por 24 horas. Cerca de 600 células de cada tipo de tratamento foram plaqueadas (placas de 60mm) e após 12 dias foram contadas as colônias formadas. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (ANOVA/Bonferroni).

4.9 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NFκB EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM CURCUMINA

A fim de avaliar se a ativação da via de NFκB estaria envolvida na resposta ao tratamento com curcumina nas células LB373, foi realizado ensaio de transfecção do plasmídeo pNF-κB-hrGFP, contendo a região promotora de NFκB conjugada à GFP, nestas células.

As células transfectadas foram tratadas com curcumina e também com tunicamicina. O tratamento com curcumina resultou em aumento de fluorescência emitida por GFP tanto nas células controle, tratadas apenas com lipofectamina, quanto nas células transfectadas. Diferente do observado com o tratamento com tunicamicina, onde as células controle não mostraram aumento de fluorescência (Figura 21A). O aumento de fluorescência, ocasionado por curcumina pode estar associado ao fato deste composto apresentar atividade de oxidação lipídica, portanto, o sinal captado nas células controle pode ser resultado da oxidação de lipofectamina. Para avaliar o sinal de GFP nos diferentes tratamentos, foi feita a razão e a subtração entre a fluorescência emitida pelas células transfectadas e pelas células controle (Figura 21B).

O tratamento com curcumina, principalmente na concentração de 10μM, parece induzir a ativação de NFκB ($p < 0.001$). Diferente do observado no tratamento com tunicamicina, onde não há a ativação de NFκB, e a diminuição de fluorescência apresentada por este tratamento, pode estar relacionado com a degradação protéica em decorrência da resposta ao estresse de RE induzido por este antibiótico (Anexo 12).

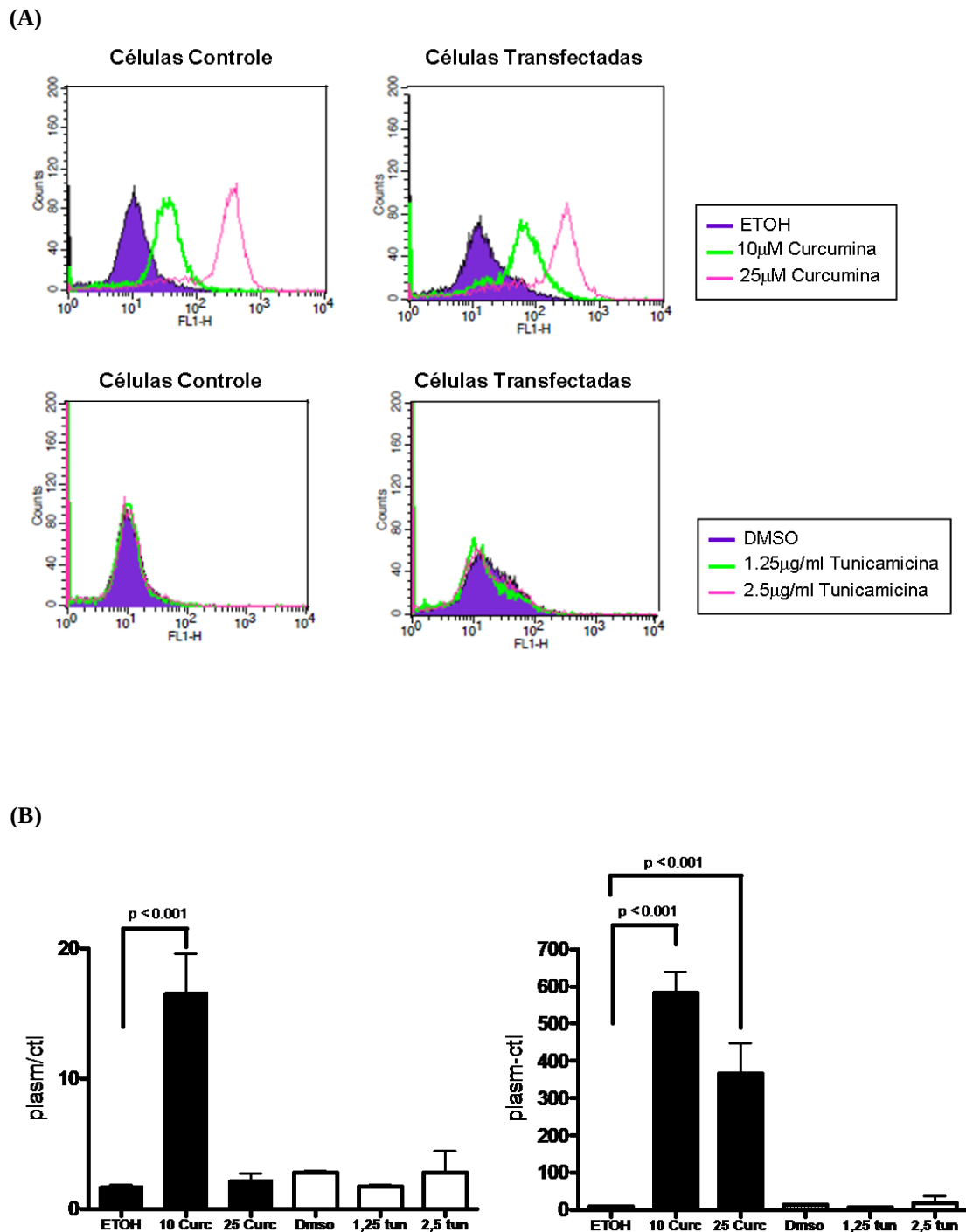


Figura 21 – Avaliação da ativação de NF κ B em resposta ao tratamento com curcumina e tunicamicina. As células LB373 foram transfectadas com o plasmídeo pNF- κ B-hrGFP (plasm) ou apenas com Lipofectamina (ctl). (A) Fluorescência emitida por GFP nas células controle e transfectadas nos diferentes tratamentos. (B) A razão e a subtração da fluorescência obtida nas células transfectadas e nas células controle. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. O gráfico mostra a razão e a subtração das médias obtidas com as triplicatas em cada condição, o desvio padrão representado foi devidamente calculado em ambas as operações.

4.10 ATIVIDADE DE CASPASES EM CÉLULAS LB373 E SKMEL37 TRATADAS COM CURCUMINA E/OU CISPLATINA

Foi realizada a verificação da ativação de caspases, enzimas essenciais no processo de morte celular por apoptose, para determinar se este processo de morte estaria envolvido na resposta ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina.

Inicialmente foi verificada a ativação de caspases múltiplas nas células Skmel37 e LB373 tratadas com curcumina e/ou cisplatina, através do kit de detecção de apoptose *Guava MultiCaspase*. Este kit baseia-se na utilização de um inibidor de caspases denominado sulforodamina-valil-alanil-aspartil-fluorometilcetona (SR-VAD-FMK), conjugado a um fluorocromo. Este inibidor é permeável e não tóxico à célula. Uma vez interiorizado na célula, este se liga covalentemente a multi caspases ativadas por apoptose. A Figura 22 mostra que o aumento de morte celular pelo prévio tratamento com curcumina não está relacionado com maior ativação de caspases nas células Skmel37 (Anexo 13).

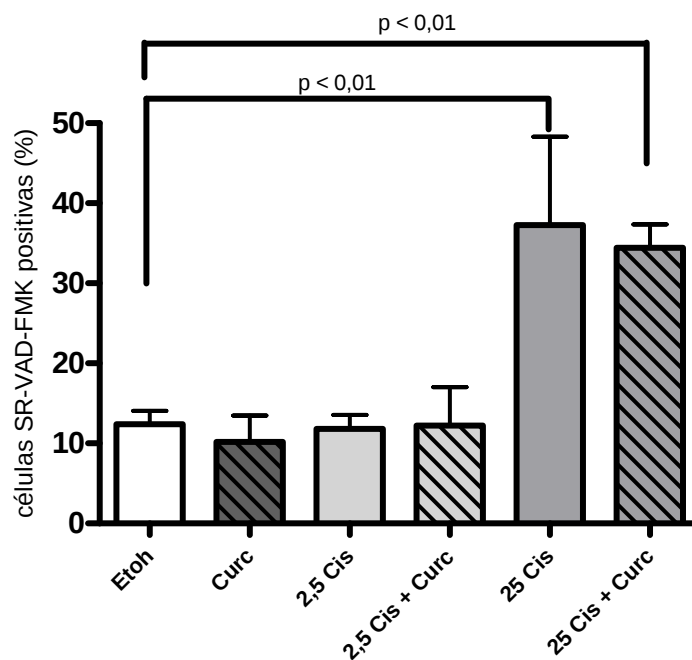


Figura 22 – Tratamento das células Skmel37, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases, SR-VAD-FMK, que se liga irreversivelmente a múltiplos membros da família de caspases ativados durante o processo de apoptose. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. O gráfico mostra a média das triplicatas e o desvio padrão.

Diferente do observado na Figura 23A, que mostra aumento na ativação de caspases quando há a associação dos tratamentos de curcumina e cisplatina ($p < 0,001$ (Anexo 14)). E este aumento parece estar relacionado particularmente com a ativação das caspases efetoras 3 e 7 tanto na menor quanto na maior concentração de cisplatina ($p < 0,01$; $p < 0,05$) (Figura 23C) (Anexo 16). Enquanto, a ativação de caspases 8 não está envolvida na resposta a associação dos tratamentos (Figura 23B) (Anexo 15).

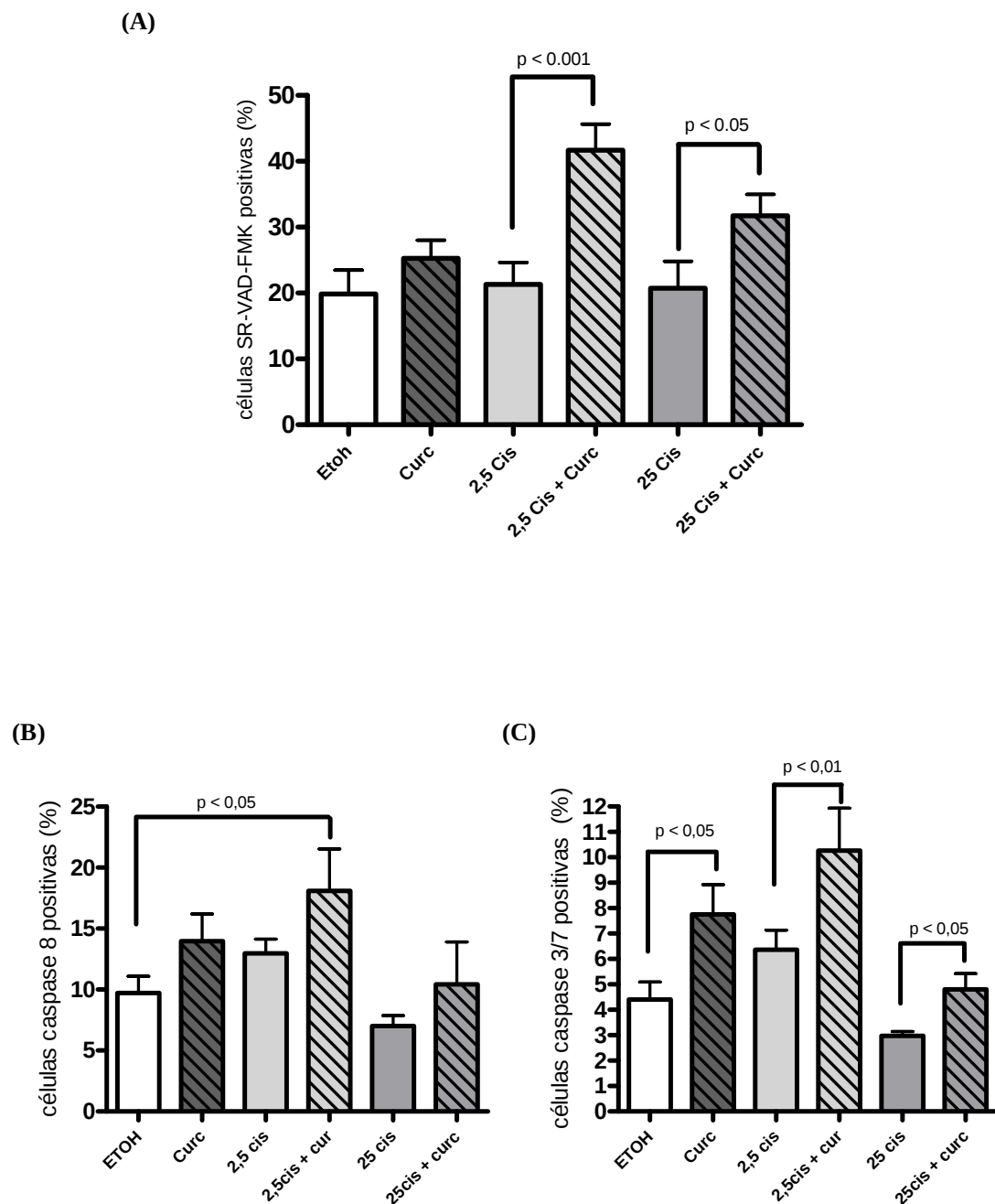


Figura 23 - Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases SR-VAD-FMK (A), que se liga irreversivelmente a múltiplos membros da família de caspases ativados durante o processo de apoptose. Tratamento com substratos de caspases 8 (B) e caspases 3/7(C). Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os gráficos mostram a média das triplicatas e o desvio padrão.

4.11 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM CURCUMINA

Foi investigado se curcumina era capaz de induzir a produção de ROS. A detecção da produção de ROS foi realizada através da oxidação intracelular de Dihidrorodamina 123 (DHR 123). A molécula DHR 123 não é fluorescente e sua oxidação na presença de ROS resulta em um composto fluorescente, rodamina 123 (Rho 123), permitindo avaliar através de citometria de fluxo o perfil de oxidação presente nas células em decorrência do acúmulo de ROS.

As células Skmel37 e LB373 foram tratadas com as concentrações de 2, 10, 25 e 50 μM de curcumina por 24 horas. A detecção da produção de ROS foi realizada através da oxidação intracelular de Dihidrorodamina 123 (DHR 123), que foi adicionado na concentração de 15 μM a 37°C por 24 horas a cada condição de tratamento e linhagem celular. A fluorescência emitida pelo produto oxidado de DHR, rodamina 123 (Rho 123), foi captada por citometria de fluxo.

A Figura 24 mostra que em ambas as linhagens houve aumento dose-dependente da produção de ROS após o tratamento com curcumina. O aumento da produção de ROS é observado em concentrações superiores a 25 μM de curcumina nas células LB373. Enquanto nas células Skmel37 este aumento pode ser observado já na concentração de 10 μM de curcumina. A diminuição de fluorescência presente na maior concentração (50 μM) de curcumina nas células Skmel37 deve-se à elevada citotoxicidade apresentada por esta concentração nessa linhagem.

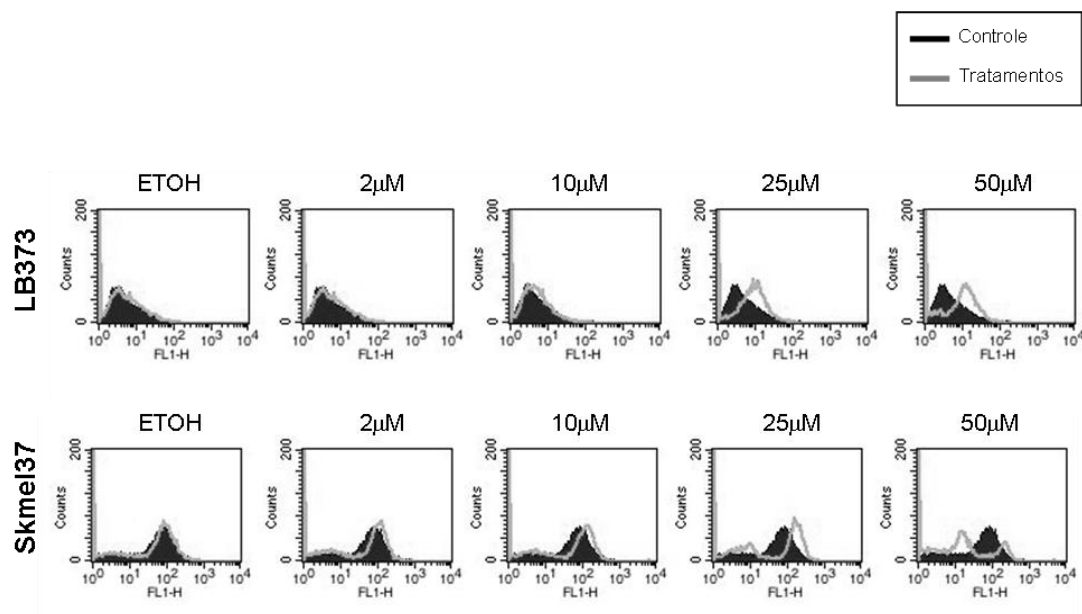


Figura 24 - Detecção de ROS (H₂O₂) por DHR. Células LB373(A) e Skmel37(B) foram tratadas com curcumina (2; 10; 25 e 50 μM) e 0,1% de ETOH (dilúente da curcumina) por 24 horas. Após este período, os níveis de ROS foram determinados através da incubação com 15 μM de Dihidrorodamina 123 (DHR 123) por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação as células foram analisadas por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.12 ALTERAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM CURCUMINA

Foi avaliada a relação de curcumina com outro mecanismo envolvido no processo de apoptose, a perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). A avaliação de perda do $\Delta\psi_m$ foi realizada através do marcador JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3' iodeto tetraetilbenzimidazolilcarbocianine). Este marcador emite fluorescência vermelha quando dimerizado e verde quando se apresenta em monômeros. Uma vez internalizado nas mitocôndrias, JC-1 se dimeriza e se a membrana mitocondrial estiver íntegra, haverá predominantemente emissão de

fluorescência vermelha. No entanto, se a membrana mitocondrial apresentar perda de potencial e consequente permeabilização da membrana, JC-1 se difundirá em monômeros e passará a ser emitida fluorescência verde. A razão entre vermelho e verde permite, portanto avaliar a integridade da membrana mitocondrial e sugerir a presença de morte celular por apoptose. A fluorescência emitida pelo JC-1 foi adquirida através de citometria de fluxo. As células Skmel37 e LB373 foram tratadas com as concentrações de 2, 10, 25 e 50 μM de curcumina por 24 horas. Após este período foi realizada a marcação com JC-1 e leitura no FACs. A alteração do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada através da perda da formação de agregados de JC-1. (Anexo 17 e 18).

A Figura 25 mostra um aumento dose-dependente da porcentagem de células que apresentam perda do potencial de membrana mitocondrial após tratamento com curcumina em ambas as linhagens.

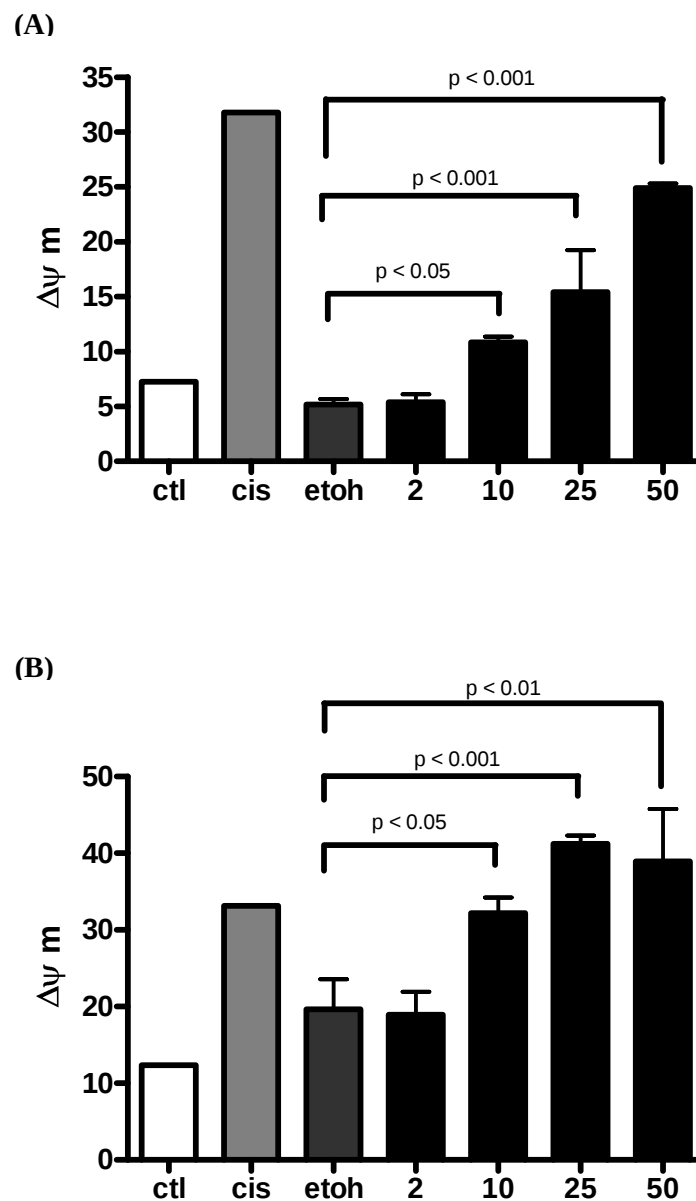


Figura 25 - Avaliação do perfil de alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi m$) nas células LB373(A) e Skmel37(B) tratadas com curcumina. As células foram tratadas com 2; 10; 25 e 50 μM de curcumina e 0,1% de ETOH (diluyente da curcumina) por 24 horas. O controle sem tratamento e com cisplatina (controle positivo para $\Delta\psi m$) também foi realizado. Após tratamento com curcumina as células foram incubadas com JC-1 (2nM), marcador lipofílico catiônico, e os agregados e monômeros de JC-1 foram medidos por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. O gráfico mostra a média das triplicatas e o desvio padrão, exceto os controles que foram feitos em monoplicata.

4.13 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS APÓS TRATAMENTO COM CURCUMINA

A Figura 26 mostra que o aumento da concentração de curcumina é acompanhado pelo aumento de alterações morfológicas, com a presença de morte e descolamento celular. Em ambas as linhagens na maior concentração, 50 μ M (Figura 26F), a maioria das células apresenta-se descoladas e muitas células em processo de morte celular podem ser observadas quando comparadas as células controle sem tratamento (Figura 26A) e tratadas com o diluente de curcumina, ETOH (Figura 26B). As setas nas figuras apontam prováveis corpos apoptóticos resultantes do tratamento com curcumina. No entanto, mesmo em concentrações mais baixas pode ser observada a presença de morte celular (setas nas Figuras 26 C e D) em ambas as linhagens, porém em menor proporção indicando que nas concentrações mais baixas já há indução de morte celular.

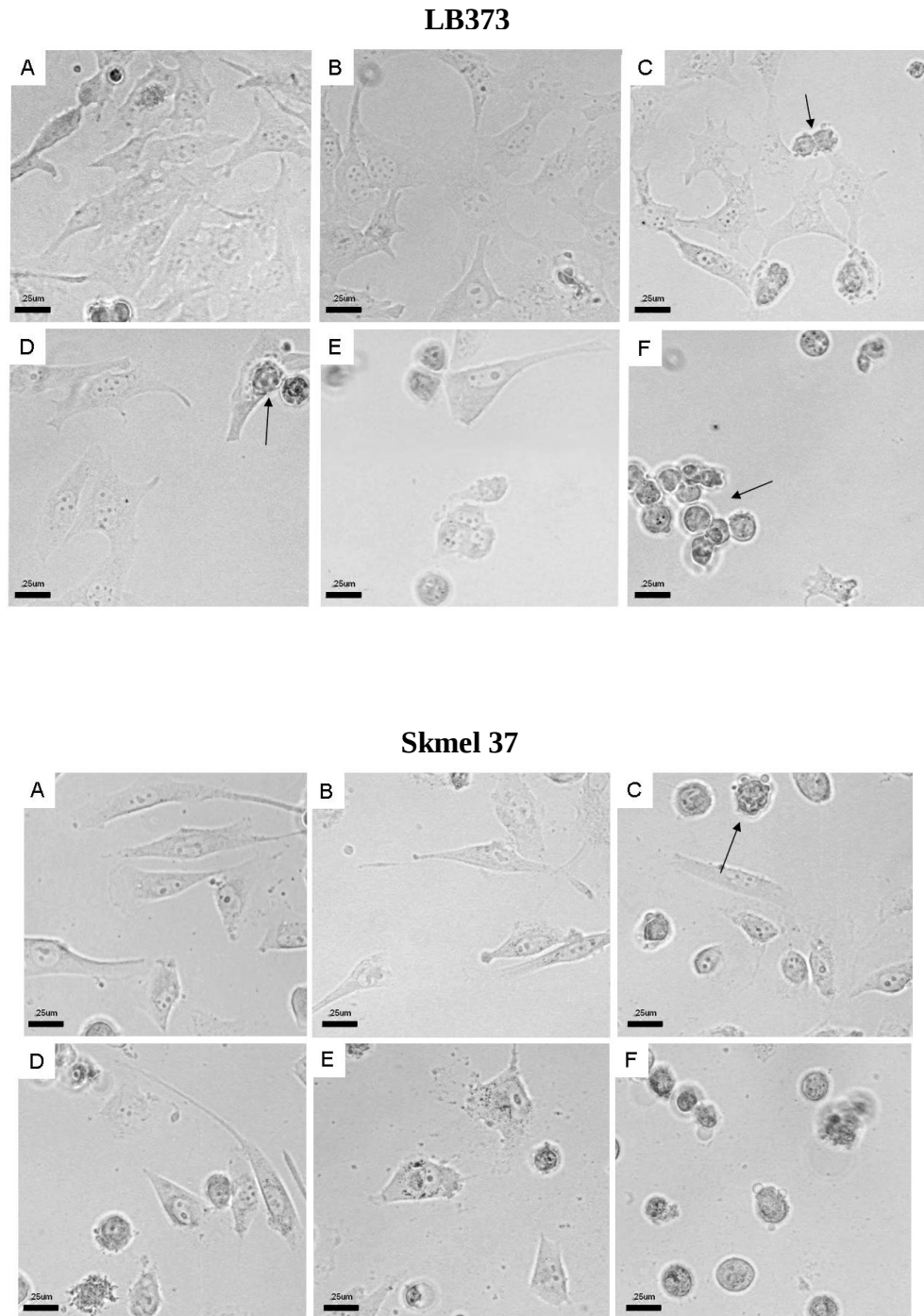


Figura 26 - Avaliação morfológica das células LB373 e Skmel37 ocasionada pelo tratamento com curcumina. As células foram tratadas com 2, 10, 25 e 50 μ M de curcumina (C, D, E e F respectivamente). O controle sem tratamento (A) e com o diluente de curcumina, 0,15 ETOH (B) também foram realizados. Imagens obtidas em microscópio óptico comum e capturadas com auxílio do software Eclipse Net Software (Nikon). Setas indicam células com morfologia apoptótica.

4.14 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO CITOESQUELETO E ACÚMULO DE PROTEÍNAS RESIDENTES NO RE APÓS TRATAMENTO COM CURCUMINA, ATRAVÉS DE MICROSCOPIA CONFOCAL

Foram realizados ensaios de microscopia confocal utilizando Faloidina para marcação dos filamentos de actina e anticorpo contra a sequência de aminoácidos KDEL encontrada na extremidade carboxi terminal de proteínas residentes no RE. Pretendia-se verificar se as alterações morfológicas após tratamento com curcumina estavam relacionadas com a desestruturação dos microfilamentos do citoesqueleto e com acúmulo de proteínas no RE.

As células Skmel37 e LB373 foram plaqueadas e submetidas ao tratamento com as concentrações de 2, 10, 25 e 50 μ M de curcumina por 24 horas, ou com seu diluente ETOH. Os filamentos de actina e as sequencias KDEL foram marcadas utilizando Faloidina e o anticorpo anti-KDEL, respectivamente. A marcação para o núcleo foi feita por DAPI.

A marcação com Faloidina mostra que tanto nas células LB373 (Figura 27) quanto nas células Skmel37 (Figura 28) há desorganização do citoesqueleto após o tratamento com curcumina. Esta desorganização está associada à desestruturação dos filamentos de F-actina, com a fragmentação das fibras de estresse em ambas as linhagens. Diferente do observado nas células tratadas apenas com ETOH, onde se pode observar os filamentos de actina íntegros, e estas fibras íntegras tipo “fibras de estresse” comunicando um ponto ao outro da célula. Esta mesma desorganização

pode ser observada quando as células foram submetidas ao tratamento com tunicamicina.

Nestas mesmas Figuras 27 e 28 observamos que o aumento da concentração de curcumina é acompanhado pelo aumento de marcação do anticorpo anti-KDEL, sugerindo a dilatação do RE com acúmulo de proteínas. Este aumento de marcação é discreto na concentração de 10 μM e evidente nas maiores concentrações (25 e 50 μM) de curcumina. A dilatação do RE também ocorre em resposta ao tratamento com tunicamicina.

(A)

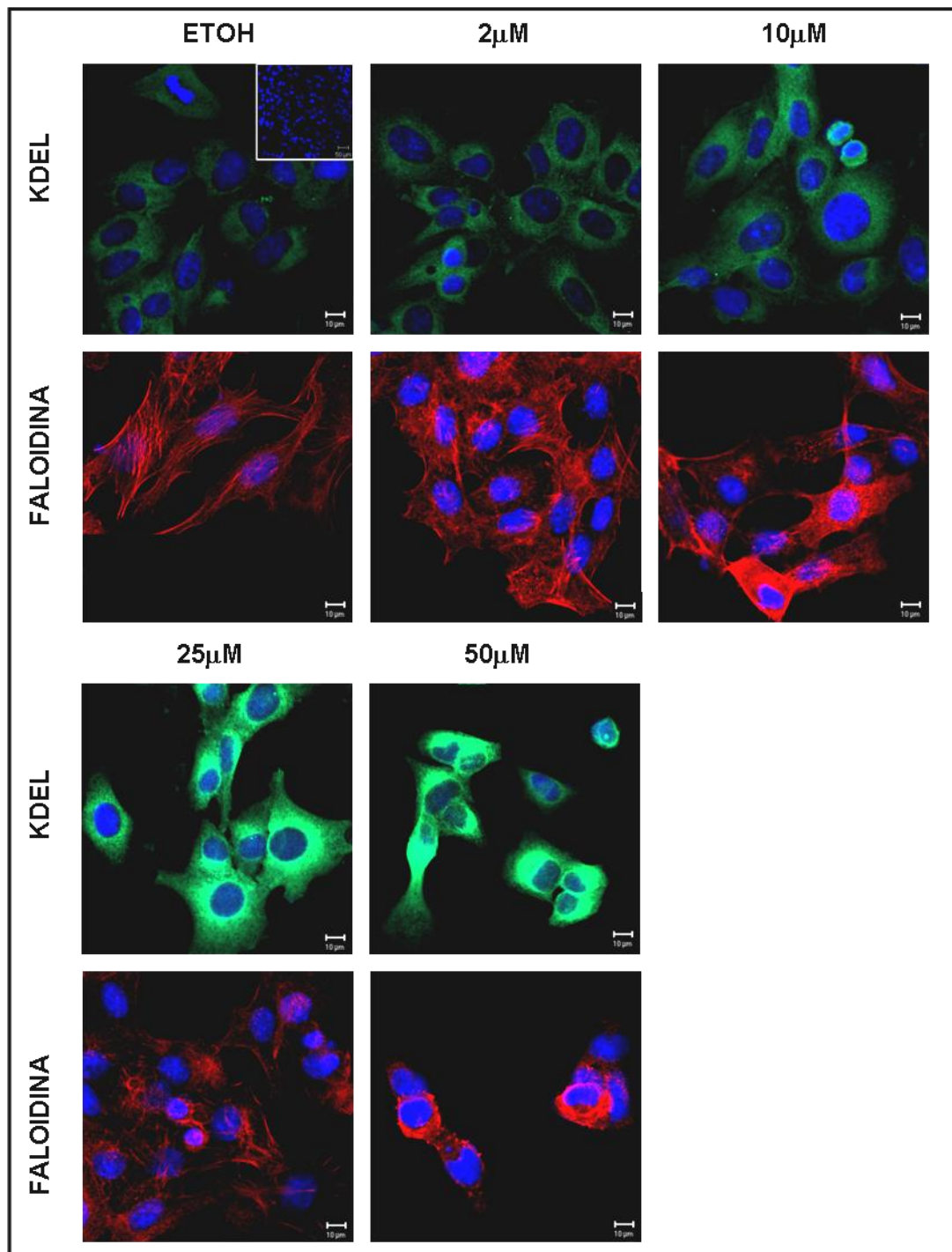


Figura 27 - Microscopia confocal com marcação para KDEL (verde), Faloidina (vermelho) e DAPI (azul) nas células LB373 (A) submetidas ao tratamento com curcumina (2; 10; 25 e 50 μ M) por 24 horas. Em detalhe o tratamento apenas com o secundário (Alexa488).

(B)

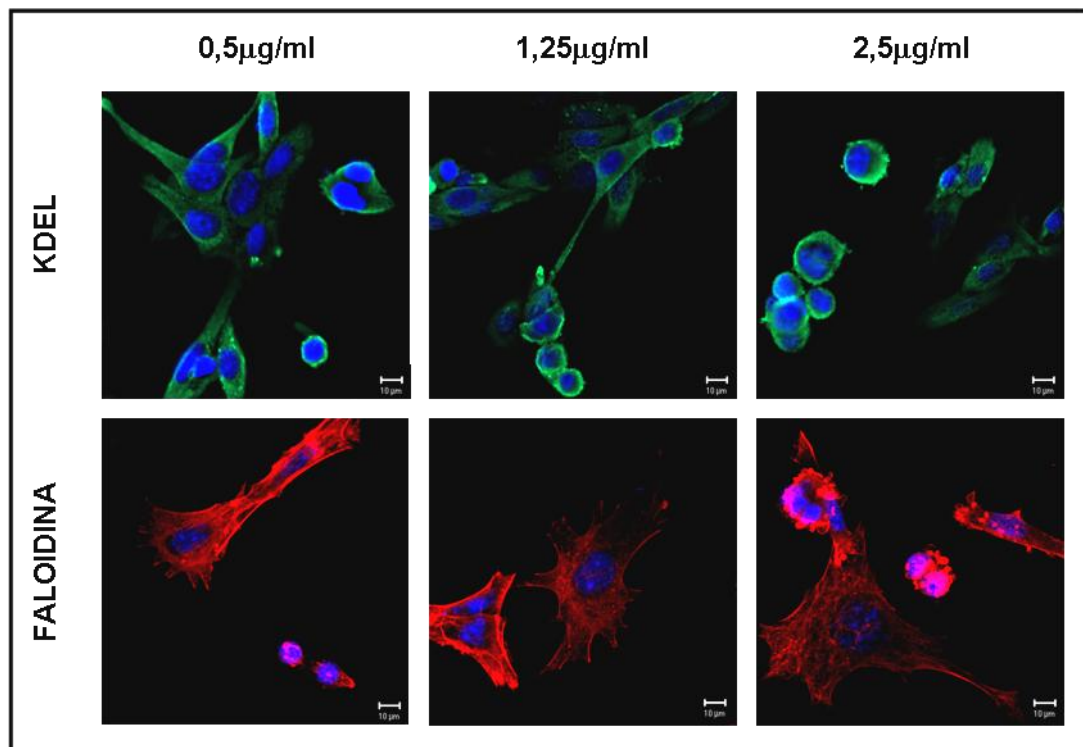


Figura 27 - Microscopia confocal com marcação para KDEL (verde), Faloidina (vermelho) e DAPI (azul) nas células LB373 (B) submetidas ao tratamento com tunicamicina (0,5; 1,25 e 2,5 µg/ml) por 24 horas.

(A)

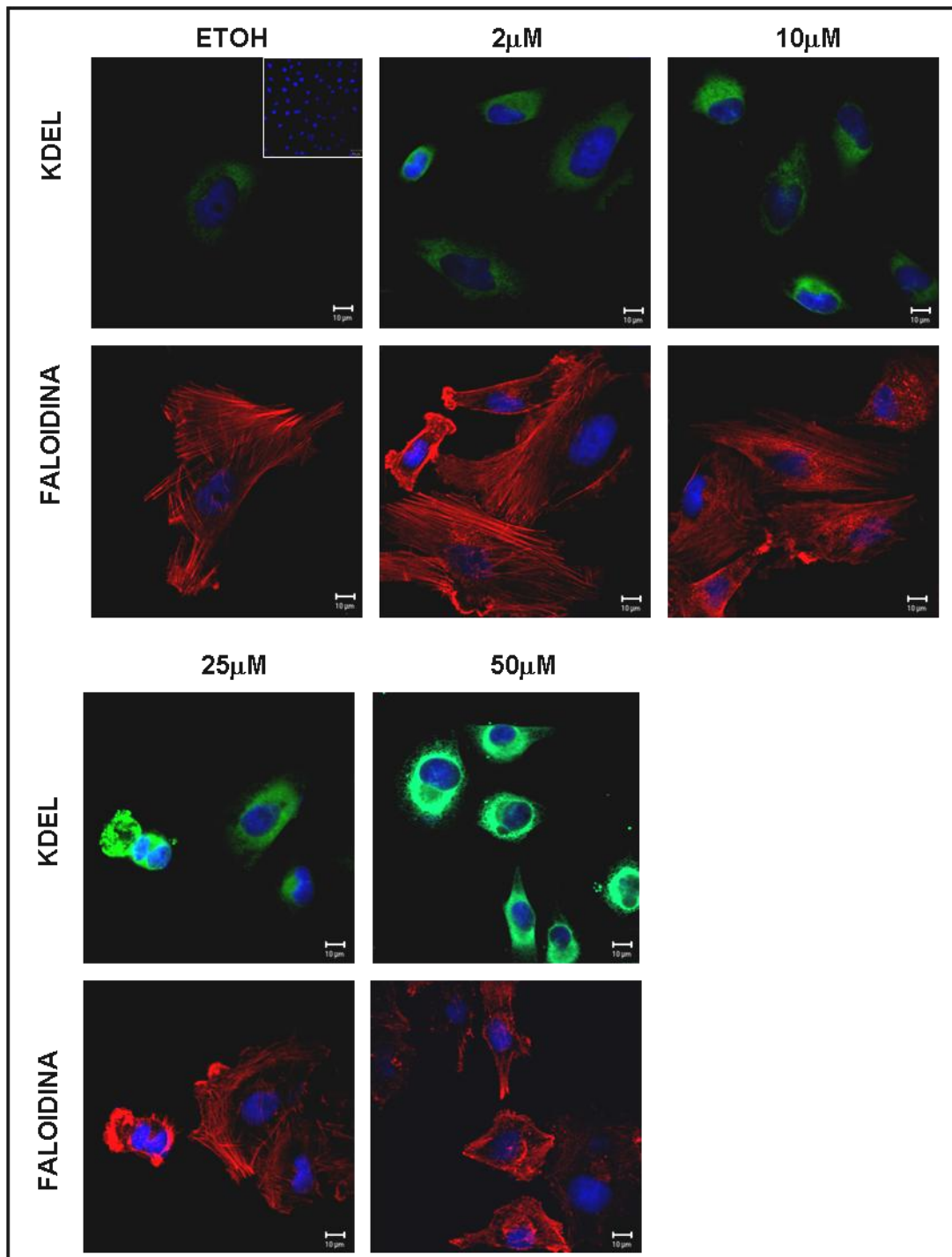


Figura 28 - Microscopia confocal com marcação para KDEL (verde), Faloidina (vermelho) e Dapi (azul) nas células Skmel37(A) submetidas ao tratamento com curcumina (2; 10; 25 e 50µM) por 24 horas. Em detalhe o tratamento apenas com o secundário (Alexa488).

(B)

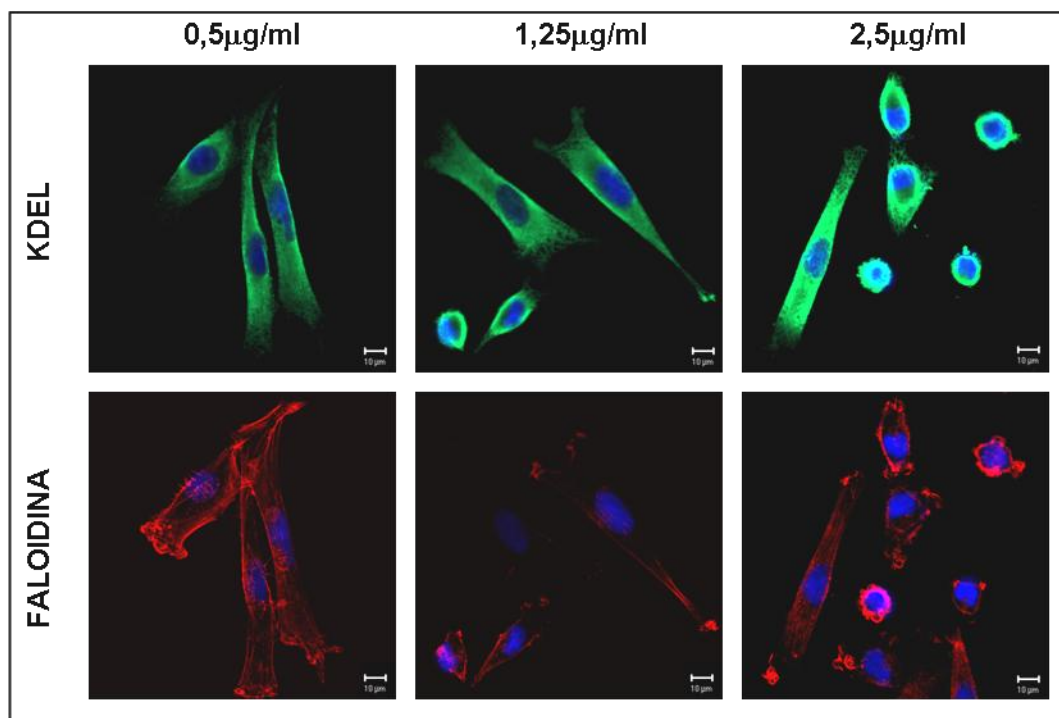


Figura 28 - Microscopia confocal com marcação para KDEL (verde), Faloidina (vermelho) e Dapi (azul) nas células Skmel37(B) submetidas ao tratamento com tunicamicina (0,5; 1,25 e 2,5 µg/ml) por 24 horas.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O melanoma em estágios avançados apresenta-se refratário a tratamento quimioterápico. A perspectiva da utilização de moléculas que atuem como quimiossensibilizantes é uma das estratégias para aumentar a morte celular e diminuir a resistência presente em tumores. O presente trabalho pretendeu avaliar a relação dos compostos curcumina e tunicamicina, potenciais quimiossensibilizantes, com a resposta de células de melanoma à morte induzida por cisplatina. O mecanismo de ação de curcumina foi explorado, com ênfase na geração da resposta a estresse de retículo endoplasmático, caracterizado pela ativação da via UPR, que pode culminar em apoptose em células tumorais.

5.1 RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO À INDUÇÃO DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE)

Tunicamicina é um antibiótico que através do bloqueio de N-glicosilação é capaz de induzir estresse de RE (ELBEIN 1987). A partir do tratamento com tunicamicina foi possível avaliar o comportamento das células de melanoma em estudo na vigência de estresse de RE.

Esta varredura inicial mostrou que as cinco linhagens (Skmel37, LB373, Skmel28, Mewo e MZ2) apresentam diferentes perfis de morte em resposta ao estresse de RE induzido por tunicamicina (Figura 7). Como o objetivo do trabalho é sensibilizar as células de melanoma através da indução de estresse de RE, as células

que se apresentaram mais resistentes ao tratamento com tunicamicina (MZ2, Mewo e SKmel28) não foram selecionadas para o estudo desta abordagem. No entanto, as células Skmel37 e LB373 apresentaram-se mais sensíveis ao tratamento com tunicamicina, favorecendo a escolha destas linhagens para o estudo de sensibilização das mesmas. Estudo anterior (dados ainda não publicados) realizado em colaboração com o nosso grupo demonstrou que as células LB373 estão adaptadas a microambiente pró-oxidativo e a resistência destas células à cisplatina é acompanhada pelo acúmulo de proteínas relacionadas com estresse de RE como as chaperonas PDI (do inglês: *Protein Disulfide Isomerase*) e GRP78 (do inglês: *Glucose Regulated Protein 78*). Assim, foi possível estudar o comportamento das células LB373, as quais apresentam acentuado perfil de adaptação à presença de estresse, e das células Skmel37, que se apresentaram mais sensíveis à indução de estresse de RE.

As diferenças de sensibilidade à tunicamicina encontradas entre as linhagens de melanoma sugerem que cada linhagem provavelmente apresente mecanismos biológicos mais ou menos eficientes de resistência. No entanto, estudos mostram que em um contexto geral, as células de melanoma apresentam-se adaptadas a situações de estresse de RE (JIANG et al. 2007). A insensibilidade ao estresse de RE em melanomas está relacionada com a elevada expressão da proteína repressora de apoptose com domínio de recrutamento de caspases (ARC) (CHEN et al. 2008), ativação da via MEK/ERK e aumento do membro Bcl2 antiapoptótico, Mcl-1 (JIANG et al. 2008). A adaptação das células de melanoma ao estresse de RE através do envolvimento de GRP78 é um importante mecanismo de resistência a certas terapias, além de contribuir para o desenvolvimento e crescimento tumoral (LEE

2007) (MA e HENDERSHOT 2004). JIANG et al. (2009b) demonstrou que XBP-1, fator de transcrição ativado por UPR, é responsável pelos níveis basais de ativação de Akt em células de melanoma, o que resulta em resistência à morte induzida por estresse de RE e a drogas como doxetacel e vincristina.

5.2 RESPOSTA DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO AO TRATAMENTO COM CISPLATINA

Para tentar sensibilizar as células de melanoma através da indução de estresse de RE ao tratamento com cisplatina, foi observado inicialmente o perfil de morte celular em resposta ao tratamento apenas com cisplatina. Houve evidente variação na intensidade de resposta a morte celular induzida por cisplatina apresentada pela maior concentração da droga (25 μ M). As células Skmel37 (40% de células hipodiplóides) apresentaram-se mais sensíveis ao tratamento com cisplatina quando comparadas as células LB373 (12% de células hipodiplóides) (Figura 8).

Cisplatina (CDDP - *cis*-diamminedichloroplatinum(II)) é um quimioterápico baseado em platina capaz de induzir morte celular através da interação do complexo platina com a molécula de DNA, o que causa a formação de “*crosslinks*” no DNA. Este composto de platina é utilizado no tratamento de vários tipos de tumores sólidos humanos (ALI e AL MOUNDHRI 2006). A principal limitação na utilização clínica de cisplatina consiste nos efeitos adversos, principalmente nefrotoxicidade, apresentados por esta droga antineoplásica (BALIGA et al. 1998). Além de interagir com o DNA, cisplatina é capaz de gerar estresse oxidativo através de disfunção mitocondrial e consequente aumento da produção de ROS (MARTINS et al. 2008).

Desta maneira, os dados obtidos mostram que as células LB373 apresentam maior resistência à morte induzida tanto por tunicamicina quanto por cisplatina, e esta resistência pode estar relacionada com sua maior capacidade de adaptação a situações de estresse. Diferente do observado com a linhagem Skmel37 que se apresentou mais sensível a ambos os tratamentos, sugerindo que estas células possam ser menos adaptadas a situações de estresse.

5.3 SENSIBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO À MORTE INDUZIDA POR CISPLATINA ATRAVÉS DA INDUÇÃO DE ESTRESSE DO RE

O estudo de sensibilização das células de melanoma através da indução de estresse de RE à morte induzida por cisplatina teve início com o uso de tunicamicina como indutor de estresse de RE (Figura 9).

Nas células Skmel37, o tratamento prévio com tunicamicina e posterior tratamento com cisplatina resultou em maior número de células em morte celular quando comparado ao tratamento com apenas cisplatina ou tunicamicina (Figura 9B). Já nas células LB373, este aumento do número de células em morte celular em resposta a combinação dos tratamentos pode ser observado somente com a maior concentração de tunicamicina (1,25 µg/ml) (Figura 9A). Estes achados corroboram os dados iniciais obtidos neste trabalho, em que a linhagem Skmel37 apresenta maior sensibilidade à morte induzida por estresse de RE. Portanto, o tratamento prévio com tunicamicina, mesmo em baixas concentrações, permitiu que estas células fossem sensibilizadas à morte induzida por cisplatina. No entanto, a sensibilização das

células LB373 só ocorreu com a maior concentração de tunicamicina. O que pode ser relacionado aos dados que mostram que esta linhagem apresenta maior capacidade de adaptação a condições de estresse (dados ainda não publicados). Portanto, as células LB373 necessitam de uma maior indução de estresse de RE para ultrapassar os níveis sustentados de estresse ao qual está adaptada, para que sejam sensibilizadas à cisplatina.

A intenção de ultrapassar os níveis sustentados de estresse presentes em células tumorais, através da indução de estresse de RE, como alternativa para aumentar a resposta terapêutica a quimioterápicos tem sido abordada recentemente. Estudo com células de câncer de pulmão mostrou que a indução de estresse de RE por tunicamicina, é capaz de sensibilizar estas células a morte induzida pelo quimioterápico erlotinib (LIANG et al. 2009). No nosso modelo com células de melanoma metastático humano, a indução de estresse de RE parece ser capaz de sensibilizar estas células à morte induzida por cisplatina. No entanto, para avaliar se o efeito aditivo de morte observado nas linhagens estaria de fato relacionado com a prévia indução de estresse do RE e não com o antibiótico tunicamicina, foi utilizado outro indutor de estresse de RE, tapsigargina.

A indução de estresse de RE por tapsigargina ocorre através da redução de estoques intracelulares de cálcio, como o RE apresenta entre suas principais funções o armazenamento de íons cálcio, a redução destes níveis causa ruptura da homeostasia presente nesta organela e resulta em estresse de RE. A varredura com diferentes concentrações de tapsigargina realizada em ambas as linhagens celulares, mostrou que as células Skmel37 apresentam sensibilidade extrema ao tratamento com tapsigargina (Figura 11A). Na concentração mais baixa estudada (10nM), a

linhagem celular Skmel37 apresentou elevada porcentagem de células em morte celular (70%). Assim, esta linhagem apresenta sensibilidade extrema à taspigargina, pois a literatura indica dose citotóxica de taspigargina cerca de 100 vezes superior àquela utilizada neste estudo (JIANG et al. 2009a). Portanto, esta sensibilidade apresentada por Skmel37 impossibilita observar qualquer incremento de morte celular através da associação de taspigargina e cisplatina. As células LB373 não se apresentaram sensíveis ao tratamento com taspigargina, pois a maior concentração utilizada (1000nM) não resultou em expressiva porcentagem de células em morte celular (10%). Novamente, estes dados reforçam a idéia de que as células LB373 apresentam acentuada capacidade de adaptação a situações de estresse. Nesta linhagem, pode-se observar o mesmo efeito aditivo de morte celular com o tratamento prévio com taspigargina (Figura 11B), sugerindo o envolvimento de estresse do RE neste processo de sensibilização.

Uma vez observado o efeito de morte celular em resposta ao tratamento com tunicamicina, foi avaliada a expressão de proteínas envolvidas na via de UPR. Como descrito anteriormente, em resposta ao estresse de RE é ativada a via de UPR, responsável por tentar restabelecer a homeostasia no RE e garantir a sobrevivência celular. Entre os mecanismos desencadeados por UPR está o aumento de chaperonas, principalmente a chaperona GRP78. Portanto, o aumento da expressão desta molécula sugere a presença de estresse de RE. Foi verificada a expressão de GRP78 através de Western blot, nas linhagens Skmel37 e LB373 quando submetidas ao tratamento com tunicamicina.

O aumento da expressão de GRP78 pode ser observado em ambas linhagens quando tratadas com tunicamicina (Figura 12A). Portanto, a indução de estresse do

RE induzida pelo tratamento com tunicamicina neste modelo, é acompanhada pelo aumento da expressão de GRP78. As células Skmel37 (7.4 *fold*) apresentaram aumento da expressão de GRP78 superior ao aumento observado nas células LB373 (1.4 *fold*), quando comparadas aos respectivos controles. Estes achados reforçam os dados obtidos anteriormente que mostram que a linhagem Skmel37 é mais susceptível à indução de estresse de RE quando comparada a linhagem LB373.

A progressão de melanomas é acompanhada pelo aumento da expressão de GRP78 (ZHUANG et al. 2009), que está relacionado com o processo de adaptação e sobrevivência destas células tumorais a microambientes pró-oxidativos. No desenvolvimento tumoral, GRP78 é um fator de sobrevivência celular, pois é capaz de promover proliferação, metástase e resistência a vários quimioterápicos (LEE 2007). Em melanomas, GRP78 está relacionado com a resistência aos tratamentos com cisplatina e adriamicina, através da inibição da ativação de caspase 4 e 7 (JIANG et al. 2009a). Estes estudos mostram que as células de melanoma apresentam acentuado processo de adaptação a situações de estresse, onde as vias de morte celular induzidas por este estresse encontram-se truncadas. No entanto, ultrapassar os níveis sustentáveis de estresse e levar à ativação das vias indutoras de morte celular é uma alternativa terapêutica para melanomas. Esta abordagem foi alvo deste estudo, onde observamos que a indução de estresse de RE através do tratamento com tunicamicina é capaz de sensibilizar células de melanoma metastático humano à cisplatina.

Uma das vias de morte celular ativadas em resposta a indução de estresse de RE é a via de GADD153. Dados citados acima mostram que a sensibilização das células de melanoma, Skmel37 e LB373, através da indução de estresse de RE é

acompanhada pelo aumento da expressão da chaperona GRP78. Verificamos se esta sensibilização estaria relacionada com a ativação da via de morte desencadeada por GADD153, para tal, avaliamos a expressão desta proteína por Western blot nas células de melamona em estudo após tratamento com tunicamicina. Nas células LB373 houve indução de GADD153 após o tratamento com tunicamicina (Figura 12B). No entanto, nas células Skmel37 o tratamento com tunicamicina não resultou na indução desta proteína (Figura 12B).

Estudo imuno-histoquímico em casos de melanoma utilizando TMA (Figura 2), citado anteriormente, mostrou que GADD153 encontra-se fracamente expressa em melanomas, o que poderia ser um mecanismo de evasão a apoptose neste tipo tumoral. Assim, a indução de estresse de RE nas células LB373 pode ter sido capaz de induzir a expressão desta proteína nestas células, levando estas à morte. O mesmo não ocorreu nas células Skmel37, estas devem possuir outro mecanismo de morte celular envolvido na resposta a indução de estresse de RE. Uma via alternativa de morte celular que poderia estar relacionada com a morte celular nas células Skmel37, seria a via autofágica. Além da via apoptótica mediada principalmente por GADD153, o estresse de RE pode induzir a via autofágica (YORIMITSU et al. 2006). Quando a quantidade de proteínas mal enoveladas excede a capacidade de degradação do sistema ERAD, estas proteínas se agregam no RE. Neste contexto, a ativação de um sistema alternativo de degradação como a autofagia é uma alternativa para garantir a sobrevivência celular (KOUROKU et al. 2007). Assim, o estresse de RE é um importante mediador destas duas vias de morte celular, e as circunstâncias que determinam a ativação preferencial de uma ou outra via ainda são estudadas. A indução de autofagia em resposta ao estresse de RE é dependente do tipo de indutor

de estresse e apresenta o envolvimento das vias de IRE1, PERK e ATF6 (MORETTI et al. 2007).

A expressão destas proteínas, GRP78 e GADD153, também foi avaliada nas células LB373 (Figura 13A) e Skmel37 (Figura 13B) quando submetidas ao tratamento prévio com tunicamicina e posterior tratamento com cisplatina.

Em ambas as linhagens houve aumento da expressão de GRP78 com o tratamento apenas com tunicamicina. O aumento de GRP78 observado quando houve a combinação de tunicamicina e cisplatina não foi superior ao observado apenas com tunicamicina, mas foi superior ao observado somente com cisplatina. Portanto, o incremento de morte em resposta a associação dos tratamentos, pode estar relacionado com a indução prévia de estresse do RE, pois apenas o tratamento com cisplatina não demonstra aumento significativo de GRP78.

A expressão de GADD153 pode ser observada tanto no tratamento apenas com cisplatina ou tunicamicina, quanto com a associação destes tratamentos nas células LB373. Enquanto as células Skmel37 não apresentaram expressão desta proteína em nenhum dos tratamentos. Estes dados reforçam os achados demonstrados anteriormente (Figura 12B) em que GADD153 parece não estar envolvida com a morte celular induzida por estresse do RE nesta linhagem. Para confirmar o envolvimento de GADD153 no processo de morte nas células LB373, está sendo realizado experimento com RNA de interferência (RNAi) para GADD153, a fim de verificar o comportamento destas células na ausência desta proteína. A diminuição de morte celular com a inibição desta proteína por Rnai confirmaria o envolvimento de GADD153 no processo de morte induzida por tunicamicina neste modelo.

5.4 SENSIBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO À MORTE INDUZIDA POR CISPLATINA ATRAVÉS DO TRATAMENTO COM CURCUMINA

Uma varredura inicial com diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de tratamento mostrou que curcumina é citotóxica em concentrações elevadas (25 μ M) e em maior duração do tratamento (48 horas). Como o intuito era sensibilizar as células tumorais, a concentração de 10 μ M e o tempo de tratamento de 24 horas pareceram mais apropriados. Uma vez avaliada a capacidade de induzir morte celular, foi investigado se o tratamento com curcumina seria capaz de induzir estresse de RE nestas células. Assim, foi avaliada a expressão de GRP78 e GADD153, após o tratamento das células LB373 e Skme37 com diferentes concentrações de curcumina por 24 horas.

Não houve aumento dose-dependente da expressão de GRP78 com o tratamento com curcumina em ambas linhagens. A expressão de GRP78 permaneceu aproximadamente constante nas diferentes concentrações de curcumina. É possível observar a presença de degradação proteica na maior concentração (50 μ M) de curcumina, devido à elevada citotoxicidade apresentada por esta concentração. Assim, o tratamento com curcumina não foi suficiente para ultrapassar os níveis basais de estresse presentes nestas linhagens.

Diferente do observado no tratamento com tunicamicina, o tratamento com curcumina não induziu a expressão de GADD153 tanto nas células Skmel37 quanto nas células LB373. Estes dados se correlacionam com o padrão de expressão de GRP78 encontrado nestas células, sugerindo, portanto que, neste modelo, o

tratamento com curcumina não é capaz de induzir estresse de RE suficiente para ativar a via de UPR, e consequentemente a via de morte celular de GADD153.

No entanto, embora curcumina não seja capaz de induzir importante estresse de RE nestas células, o tratamento prévio com curcumina foi capaz de sensibilizar as células Skmel37 à cisplatina. Em um primeiro desenho experimental (Figura 16), não foi possível observar aumento de morte celular decorrente da associação dos tratamentos, pois por estas células se apresentarem mais sensíveis, o tratamento de cisplatina por 24 horas poderia levar a uma saturação de morte celular (Figura 18A) e impossibilitar a visualização de incremento de morte celular com a associação dos tratamentos. Um novo desenho experimental (Figura 17), com a redução para 16 horas de tratamento com cisplatina, permitiu observar que o tratamento prévio com curcumina era capaz de sensibilizar estas células à morte induzida por cisplatina (Figura 18B). A sensibilização observada nas células Skmel37 pode estar associada à outra via de morte celular que não apoptose, pois, como observado anteriormente, a via de morte celular nesta linhagem independe de GADD153. Como discutido anteriormente, a via autofágica pode ser ativada em resposta ao estresse de RE, no entanto, também pode haver o envolvimento de outro processo de morte celular, a mitose catastrófica, em resposta ao tratamento com curcumina. Estudos demonstraram que a morte induzida por curcumina em células de leucemia humana, HCW-2, está relacionada com a indução de mitose catastrófica (MAGALSKA et al. 2006), enquanto em células de glioma maligno há o envolvimento da via autofágica (AOKI et al. 2007).

De maneira surpreendente, as células LB373 apresentaram redução na porcentagem de células em morte celular com a associação dos tratamentos (Figura

19). Portanto, ao invés de sensibilizar, neste contexto o tratamento com curcumina conferiu proteção para estas células. A capacidade de sobrevivência celular apresentada pelas células LB373 em resposta ao tratamento com curcumina, também foi avaliada pelo ensaio clonogênico. O tratamento prévio com curcumina conferiu proteção para as células LB373 (Figura 20 B e C) na concentração de 1 μ M, com aumento do número de clones formados após o tratamento associado de curcumina e cisplatina, quando comparado ao tratamento apenas com cisplatina. Estes achados reforçam a hipótese de que curcumina é capaz de conferir resistência à morte celular ou vantagem de sobrevivência nestas células.

Neste contexto, o tratamento com curcumina ao invés de suprimir vias envolvidas na sobrevivência celular, como observado em estudos com vários tipos tumorais, nas células LB373, curcumina poderia estar levando à ativação de alguma destas vias. Em melanomas, o fator de transcrição NF κ B regula genes envolvidos em vias de crescimento celular, sobrevivência, angiogênese e metástase (HUANG et al. 2000). A curcumina, em células de melanoma, inibe a ativação da via de NF κ B, resultando em parada de ciclo celular (G2/M) e apoptose nestas células (ZHENG et al. 2004). A inibição da ativação e modulação da expressão gênica de NF κ B por curcumina ocorre através da inibição de IKK (I κ B α quinase) e da ativação de Akt (AGGARWAL et al. 2006). A transfecção das células LB373 com plasmídeo contendo a região promotora de NF κ B conjugada à GFP, permitiu avaliar a ativação de NF κ B na vigência do tratamento com curcumina. Assim, o tratamento com curcumina induz a ativação de NF κ B nestas células, diferente do observado no tratamento com tunicamicina onde não ocorre esta ativação (Figura 21).

Ao mesmo tempo, por esta linhagem se apresentar mais adaptada a situações de estresse de RE, curcumina ao invés de ultrapassar os níveis sustentados de estresse presente nestas células, poderia estar favorecendo a sobrevivência celular através da indução de níveis de estresse mais amenos. Como citado anteriormente, a presença de estresse de RE em níveis basais confere vantagens adaptativas às células tumorais como as desempenhadas por GRP78 em melanomas (LEE 2007). Os ensaios de Western blot mostram que curcumina não é capaz de alterar de maneira importante a expressão de GRP78, que permanece em níveis próximos dos basais, e também não é capaz de induzir a expressão de GADD153. RUTKOWSKI et al. (2006), mostrou que a resposta adaptativa a estresse de RE crônico não é consequência da ativação seletiva dos sensores de estresse do RE, mas sim da instabilidade de mRNAs e proteínas que facilitam a adaptação, como GRP78, versus aquelas que levam à morte celular, GADD153.

Neste contexto, o processo de adaptação ao estresse de RE é favorecido pela indução de ameno estresse de RE, podendo favorecer a sobrevivência celular através da indução de adaptação ao mesmo. A ativação de propriedades celulares protetoras e reparativas induzida por baixos níveis de estresse, processo denominado *hormese*, também pode ser observada na resposta celular a outro composto natural, o resveratrol (SCHWARTZ E SACK 2008). Este composto presente principalmente em vinho tinto e na casca ou semente da uva, apresenta atividade antioxidante e moduladora da biogênese mitocondrial (BAUR e SINCLAIR 2006). Assim, seu efeito pleiotrópico, apresenta atividade mitohormética capaz de induzir proteção à lesão cardíaca de isquemia-reperfusão (GOH et al. 2007). É tentador especular que um fenômeno semelhante esteja ocorrendo no modelo aqui estudado.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE CASPASES NAS CÉLULAS LB373 E SKMEL37 TRATADAS COM CURCUMINA E/OU CISPLATINA

Caspases (*cysteine-aspartic-acid-proteases*) são proteases com específica atividade de clivar outras proteínas após um resíduo de ácido aspártico. Estas enzimas são essenciais no processo de morte celular por apoptose. A verificação da atividade de caspases é importante para sugerir a ativação deste tipo de morte celular.

As células Skmel37 não apresentaram aumento de caspases ativadas com a associação dos tratamentos (Figura 22). Assim, a sensibilização destas células não está relacionada com morte celular por apoptose, provavelmente outra via de morte independente de caspases está sendo ativada. O que corrobora com os resultados de ausência de expressão de GADD153 nesta linhagem quando submetida ao tratamento com tunicamicina, cisplatina e curcumina. Estes dados também reforçam a sugestão de que esta linhagem celular possui outro mecanismo de morte celular, que não apoptose, ativado prontamente em resposta aos diferentes tratamentos estudados.

No entanto, as células LB373 apresentaram aumento de caspases ativadas com a associação dos tratamentos (Figura 23A), mais especificamente a ativação das caspases efetoras 3 e 7 (Figura 23C). A avaliação da ativação de caspases iniciadoras, caspases 8, também foi realizada, mas estas parecem que não estão envolvidas neste contexto (Figura 23B). Estudos têm mostrado que a ativação de caspases em resposta ao estresse do RE possui o envolvimento de uma caspase presente na membrana do RE, a caspase 12 em murinos e a caspases 4 em humanos. Uma das vias envolvidas na resposta a UPR é a clivagem da procaspase 12/4

presente na membrana no RE, que uma vez ativa leva a ativação da cascata de caspases efetoras (FAITOVA et al. 2006). Ou embora as células estejam sendo induzidas à morte celular com a ativação de caspase 3 e 7, a fragmentação de DNA possa não estar sendo a maneira mais adequada para analisar esta indução. Curcumina poderia estar interferindo na dissociação de CAD (*caspase-activated DNase*)/ICAD (inibidor de CAD) resultante da clivagem de ICAD pela caspase-3, impedindo portanto, que CAD alcance o núcleo para realizar a clivagem do DNA. A sobrevivência das células LB373 pode estar relacionada com a eficiência da maquinaria de reparo de DNA que pode favorecer que as células reconheçam o erro de DNA causado pela cisplatina, permitindo que a célula sobreviva nestas condições.

5.6 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS- REACTIVE OXYGEN SPECIES) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM CURCUMINA

Uma vez que os resultados obtidos sugeriam que curcumina neste modelo experimental, não foi capaz de induzir estresse de RE, verificamos se havia o envolvimento de estresse oxidativo em resposta ao tratamento com curcumina. Como citado anteriormente, curcumina possui propriedades tanto antioxidantes quanto pró-oxidantes. Como antioxidante curcumina atua como “*scavenger*” de ROS inibindo peroxidação lipídica e danos oxidativos no DNA. No entanto, estudos mostraram que a apoptose induzida por curcumina está associada com a produção de ROS e estresse oxidativo em diversos tipos tumorais, inclusive em células de câncer de pele (REUTER et al. 2008).

Além de induzir apoptose através da produção de ROS, curcumina é capaz de sensibilizar células tumorais a apoptose induzida por drogas. O efeito terapêutico de radioterapias e algumas quimioterapias, como cisplatina, é resultado do aumento de níveis celulares de ROS. Assim a indução de ROS por curcumina associada ao aumento dos níveis de ROS em resposta a quimioterápicos, pode resultar em aumento do efeito terapêutico antitumoral por ultrapassar os níveis de adaptação a estresse oxidativo presente nas células tumorais. No entanto, há determinados trabalhos em que curcumina aumenta efeitos terapêuticos de radioterapia e quimioterapia e em outros reduz estes mesmos efeitos. Estes dados aparentemente controversos podem ser explicados através da dualidade apresentada por curcumina. Em baixas concentrações curcumina parece desempenhar propriedade antioxidante, reduzindo ou mantendo os níveis celulares de ROS em níveis fisiológicos. A atividade antioxidante, portanto, também reduz os níveis de ROS induzidos por radioterapia e quimioterapias, reduzindo a atividade e citotoxicidade destas terapias. No entanto, em concentrações elevadas, curcumina desempenha atividade pró-oxidativa, aumentando os níveis de ROS e podendo produzir efeitos carcinogênicos. O aumento dos níveis de ROS em resposta ao tratamento com curcumina pode contribuir para morte celular induzida por radioterapias e quimioterapias (LÓPEZ-LÁZARO 2008). BAVA et al. (2005), mostraram que o tratamento combinado de curcumina e Taxol resultou em aumento dos efeitos antitumorais quando comparado ao tratamento apenas com Taxol.

A avaliação da produção de ROS em resposta ao tratamento com curcumina, neste modelo, mostrou que o aumento da produção de ROS ocorre de maneira dose-dependente em ambas as linhagens. As células LB373 (Figura 24) apresentaram

aumento da produção de ROS nas maiores concentrações de curcumina (25 e 50 μ M), sugerindo que a citotoxicidade presente nestas concentrações é acompanhada pelo acúmulo de ROS e provavelmente com o envolvimento de mecanismos de morte celular ativados por estresse oxidativo. No entanto, na concentração de 10 μ M é possível observar apenas um aumento discreto dos níveis de ROS. O tratamento prévio com 10 μ M de curcumina não resultou na sensibilização destas células à cisplatina, provavelmente porque nesta concentração os níveis de ROS permanecem próximos dos níveis fisiológicos e, portanto, não foi suficiente para ultrapassar os níveis sustentáveis de ROS apresentados por estas células. Ao contrário, a sobrevivência celular conferida por curcumina nestas células pode estar associada à atividade antioxidante apresentada por este composto quando em baixas concentrações.

Diferente do observado nas células LB373, as células Skmel37 (Figura 24) apresentaram discreta indução de ROS já na concentração mais baixa de curcumina (2 μ M). Na maior concentração (50 μ M) observamos a perda de fluorescência devido ao acentuado efeito citotóxico. Na concentração de 10 μ M de curcumina é possível observar um importante aumento de ROS, sugerindo que esta concentração escolhida para sensibilizar as células Skmel37 foi suficiente para que a atividade pró-oxidativa de curcumina fosse desempenhada. Esta atividade de curcumina associada ao efeito oxidativo de cisplatina, resultou em aumento de morte celular (Figura 18).

5.7 ALTERAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$) EM RESPOSTA AO TRATAMENTO COM CURCUMINA

LIGERET et al. (2004) sugerem que na morte celular de células tumorais induzida por curcumina, há o envolvimento do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial com abertura dos poros transientes de permeabilidade mitocondrial (PTP). A mitocôndria é uma importante fonte de ROS em células de mamíferos, principalmente através do escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons. A produção de ROS pela mitocôndria ocasiona a abertura dos PTP, resultando no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (KOWALTOWSKI AJ, CASTILHO RF e VERCESI AE 1996). A perda do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) é um dos principais mecanismos envolvidos no processo de apoptose. É um evento que antecede a externalização de fosfatidilserina e coincide com a ativação de caspases. Portanto, a avaliação da perda do potencial de membrana mitocondrial é uma estratégia para avaliar o processo de morte celular e sugerir apoptose.

A avaliação do perfil de $\Delta\psi_m$ em resposta ao tratamento com curcumina mostrou que as células LB373 (Figura 25A) e Skmel37 (Figura 25B) apresentam aumento de alteração do $\Delta\psi_m$ dependente do aumento da concentração de curcumina, a partir da concentração de 10 μ M. Portanto, o tratamento com curcumina induz a produção de ROS, podendo induzir a abertura dos PTP e despolarização da membrana mitocondrial, e resultar na liberação de citocromo c e ativação da cascata de caspases.

5.8 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OCASIONADAS PELO TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CURCUMINA

Devido os experimentos com curcumina mostrarem constantemente que o aumento da concentração da droga era acompanhado pelo aumento de alterações morfológicas, foram realizadas capturas de imagens para ilustrar estes eventos (Figura 26). Como demonstrado pelos achados descritos neste trabalho, elevadas concentrações de curcumina são citotóxicas para as células LB373 e Skmel37. Esta citotoxicidade pode ser observada principalmente na maior concentração (50 μ M) (Figura 26 F), onde a maioria das células apresenta-se descoladas e pode ser observado maior número de células em morte celular quando comparado ao observado no controle sem tratamento (Figura 26 A) e tratadas com o diluente de curcumina (ETOH) (Figura 26 B). A partir da concentração de 10 μ M é possível observar a presença de indução de morte celular em resposta ao tratamento com curcumina. Sugerimos morte celular pela presença de células descoladas e com morfologia apoptótica, indicadas pelas setas nas figuras.

A desorganização celular observada principalmente nas maiores concentrações de curcumina (25 e 50 μ M) pode estar relacionada com a desestruturação de microtúbulos. Estudo demonstrou que curcumina em concentrações superiores a 10 μ M se liga à tubulina ocasionando a desestruturação de microtúbulos e alterações conformacionais. Em concentrações menores, curcumina possui mínimos efeitos nos microtúbulos, porém induz a agregação de tubulina

(GUPTA et al. 2006). Para verificar se as alterações morfológicas observadas com o tratamento com curcumina nas células de melanoma em estudo (Figura 26) estariam associadas com a desestruturação dos microfilamentos do citoesqueleto, foi realizado marcação com Faloidina e as células foram observadas em microscópio confocal. A marcação com Faloidina permitiu observar os filamentos de F-actina, e em ambas as linhagens (Figura 27 e 28) pode-se observar a desorganização dos filamentos de actina a partir da concentração de 10 μM , culminando em completa ausência de estrutura do citoesqueleto na maior concentração (50 μM). Diferente da integridade dos filamentos de actina presentes nas células tratadas apenas com ETOH, onde é possível observar as fibras íntegras, tipo fibras de estresse, que comunicam um ponto ao outro da célula. A citotoxicidade produzida pela curcumina é acompanhada pela desestruturação do citoesqueleto e mais especificamente da desorganização dos filamentos de F-actina, com a fragmentação das fibras de estresse. Assim, a morte induzida por curcumina pode estar relacionada com o processo de morte celular por “mitose catastrófica”. Estudos mostram que curcumina é capaz de induzir mitose catastrófica em células tumorais humanas (DEMPRE et al. 2008) (MAGALSKA et al. 2006).

A fim de identificar de outra maneira alterações no RE decorrentes do tratamento com curcumina, foi avaliada através de microscopia confocal a marcação da sequência de aminoácidos carboxi terminal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) responsável pela retenção de proteínas no retículo endoplasmático. A marcação de KDEL permite avaliar a quantidade de proteínas, que possuem o peptídeo KDEL, acumuladas no RE. Em situações de estresse há um acúmulo de proteínas no RE, levando à dilatação desta organela e conseqüentemente marcação de KDEL mais

intensa. Nas maiores concentrações de curcumina (25 e 50 μ M), tanto nas células LB373 (Figura 27) quanto nas células Skmel37 (Figura 28) o RE encontra-se bastante dilatado. A dilatação do RE é acompanhada pela desestruturação das fibras de actina, demonstrando a elevada toxicidade apresentada por essas concentrações. Na concentração de 10 μ M pode-se observar um discreto aumento de marcação, o que condiz com os dados obtidos anteriormente de que nesta concentração possa haver menor indução de estresse do RE e respostas iniciais de morte celular. No entanto, a indução de estresse não é suficiente para ultrapassar os níveis de adaptação ao mesmo apresentado por estas células. A acentuada indução de estresse de RE por curcumina que poderia ultrapassar estes níveis sustentados de estresse, só ocorre em concentrações elevadas que são extremamente citotóxicas neste modelo.

Mediante os resultados demonstrados anteriormente em que curcumina não é capaz de induzir aumento da expressão protéica de GRP78, observamos que, neste modelo, curcumina não é um bom indutor de estresse de RE. A marcação com KDEL sugere que exista um acúmulo de proteínas no RE em resposta ao tratamento com curcumina. Este acúmulo de proteínas provavelmente resulte na disfunção desta organela, podendo levar à morte celular diretamente por autofagia, por exemplo, sem que ocorra envolvimento direto da via de UPR nestas células.

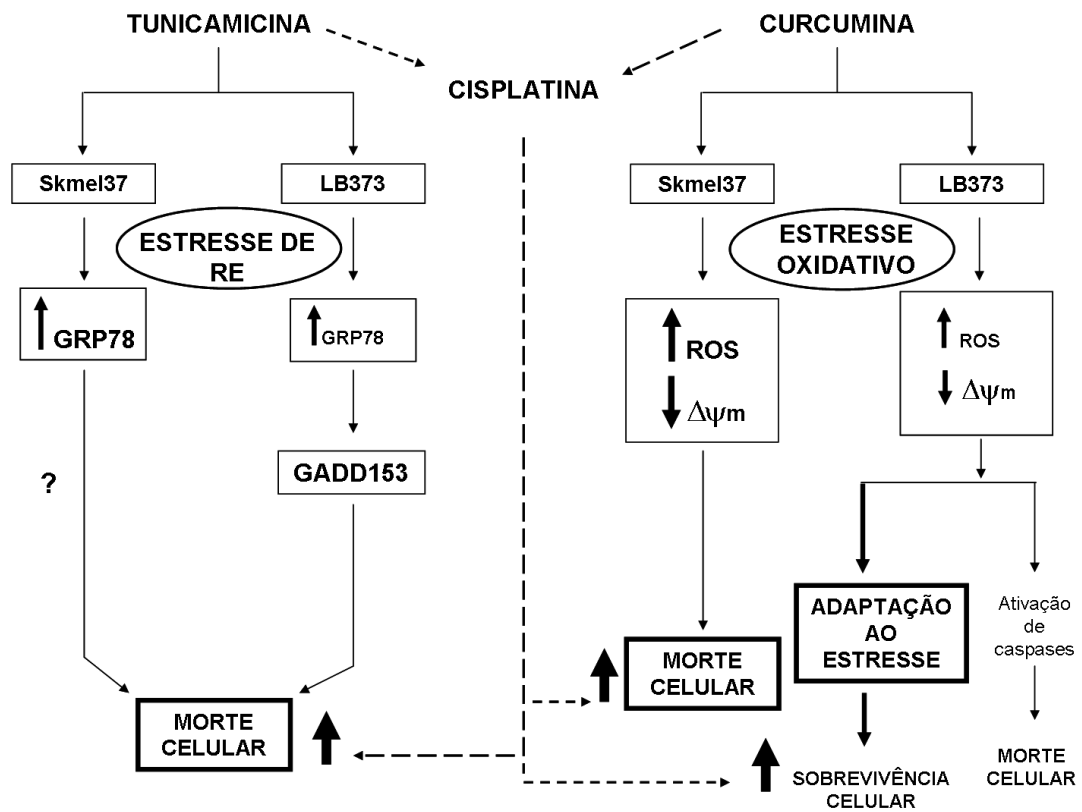


Figura 29 - Esquema representativo dos achados obtidos neste trabalho

SUMÁRIO DE RESULTADOS



6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- 1.1) As células de melanoma humano em estudo, apresentaram diferentes perfis de sensibilidade à morte induzida tanto por tunicamicina quanto por cisplatina. Sendo as células Skmel37 mais sensíveis que as células LB373 nos dois tratamentos.
- 1.2) O tratamento com tunicamicina induz aumento da expressão protéica de GRP78, molécula sinalizadora de estresse do RE, em ambas as linhagens. No entanto, a indução de GADD153, molécula efetora de morte celular em resposta ao estresse do RE, só ocorre nas células LB373.
- 1.3) Curcumina parece induzir aumento da expressão de GRP78 apenas em concentrações citotóxicas em ambas as linhagens. Entretanto, não foi observada expressão protéica de GADD153 em nenhuma das células submetidas ao tratamento com curcumina. A morte induzida por curcumina parece ser independente da via de morte induzida por GADD153.
- 2) As células de melanoma metastático humano, LB373 e Skmel37 foram sensibilizadas, através do tratamento prévio com tunicamicina, à morte induzida por cisplatina. Sugerindo o envolvimento da indução de estresse do RE neste contexto de sensibilização. Curcumina também é capaz de sensibilizar as células Skmel37. No entanto, o tratamento prévio com

curcumina, confere resistência à morte celular induzida por cisplatina nas células LB373.

- 3.1) Curcumina induz a produção de ROS e despolarização da membrana mitocondrial em ambas as linhagens, indicando a presença de indução de estresse oxidativo. A ativação de caspases foi observada somente nas células LB373, especificamente caspases 3/7. Sugerindo que a morte celular nas células LB373 deva ocorrer por apoptose. Diferentemente das células Skmel37 que parecem estar envolvidas com outra via de morte celular como autofagia, pois estas apresentam morte celular independente de GADD153 e ativação de caspases.
- 3.2) Curcumina com o aumento de sua concentração tende a induzir a desorganização do citoesqueleto celular com a ruptura dos filamentos de actina. O tratamento com curcumina induz acúmulo de proteínas no RE, que possuem a sequencia KDEL responsável pela retenção de proteínas no RE. Este acúmulo de proteínas provavelmente resulte na disfunção desta organela, podendo levar à morte celular diretamente por autofagia, por exemplo, sem que ocorra envolvimento direto da via UPR.

CONCLUSÃO



7 CONCLUSÃO

A indução de estresse do RE através do tratamento com tunicamicina demonstrou ser uma estratégia de sensibilização das células de melanoma, LB373 e Skmel37, à morte induzida por cisplatina. No entanto, curcumina não se demonstrou como um bom indutor de estresse do RE neste modelo. Pois, além de induzir resistência nas células LB373 ao tratamento com cisplatina, a sensibilização conferida às células Skmel37 parece estar mais relacionada com indução de estresse oxidativo do que com estresse do RE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. **Mol Pharmacol** 2006; 69:195-206.

Albini A, Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:139-47.

Ali BH, Al Moundhri MS. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. **Food Chem. Toxicol** 2006; 44:1173-83.

Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. **Cancer Lett** 2008; 267:133-64.

Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. **Mol Pharmacol** 2007; 72:29-39.

Bakshi J, Weinstein L, Poksay KS, Nishinaga B, Bredesen DE, Rao RV. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program in mouse melanoma cells: effect of curcumin. **Apoptosis** 2008; 13:904-14.

Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. *In vitro* and *in vivo* evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Kidney Int** 1998; 53:394-401.

Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nat Rev Drug Discov** 2006; 5:493-506.

Bava SV, Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunagaran D, Anto RJ. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor-kappaB and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. **J Biol Chem** 2005; 8:6301-8.

Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochem Photobiol** 2008; 84:539-49.

Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Anal Biochem** 1981; 112:195-203.

Chen LH, Jiang CC, Watts R, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of melanoma cells by the ARC protein. **Cancer Res** 2008; 68:834-42.

Chen TC, Chimeh F, Lu Z, et al. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. **Arch Biochem Biophys** 2007; 460:213-7.

Csala M, Bánhegyi G, Benedetti A. Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. **FEBS Lett** 2006; 580:2160-5.

de Souza GA, Godoy LMF, Teixeira VR, et al. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. **Proteomics** 2006; 6:1460-70.

Deeb D, Xu YX, Jiang H, Gao X, Janakiraman N, Chapman RA, et al. Curcumin (diferuloyl-methane) enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing

ligand-induced apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. **Mol Cancer Ther** 2003; 2:95-103.

Dempre JS, Pfeiffer E, Grimm AS, Metzler M. Metabolism of curcumin and induction of mitotic catastrophe in human cancer cells. **Mol Nutr Food Res** 2008; 52:1074-81.

Denecke J, Marquardt T. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. **Eur J Pediatr** 2003; 162:359-79.

Depeille P, Vian L. Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. **Mol Pharmacol** 2004; 65:897-905.

Elbein AD. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. **Annu Rev Biochem** 1987; 56:497-534.

Faitova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **Cell Mol Biol Lett** 2006; 11:488-505.

Goh SS, Woodman OL, Pepe S, Cao AH, Qin C, Ritchie RH. The red wine antioxidant resveratrol prevents cardiomyocyte injury following ischemia-reperfusion via multiple sites and mechanisms. **Antioxid Redox Signal** 2007; 9:101-13.

Gupta KK, Bharne SS, Rathinasamy K, Naik NR, Panda D. Dietary antioxidant curcumin inhibits microtubule assembly through tubulin binding. **FEBS J** 2006; 273:5320-32.

Hatcher H, Planalp R, Chob J, Tortia FM, Tortic SV. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. **Cell Mol Life Sci** 2008; 65:1631-52.

Hersey P, Zhang XD. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 2008; 21:358-67.

Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2573-81.

Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:551-79.

Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, et al. Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **Cancer Res** 2007; 67:9750-61.

Jiang CC, Lucas K, Avery-Kiejda KA, et al. Up-regulation of Mcl-1 is critical for survival of human melanoma cells upon endoplasmic reticulum stress. **Cancer Res** 2008; 68:6708-17.

Jiang CC, Mao ZG, Avery-Kiejda KA, Wade M, Hersey P, Zhang XD. Glucose-regulated protein 78 antagonizes cisplatin and adriamycin in human melanoma cells **Carcinogenesis** 2009a; 30:197-204.

Jiang CC, Yang F, Thorne RF, Zhu BK, Hersey P, Zhang XD. Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress acquire resistance to microtubule-targeting drugs through XBP-1-mediated activation of Akt. **Neoplasia** 2009b; 11:436-47.

Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, Abdel-Malek ZA. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? **Pigment Cell Res** 2003; 16:434-47.

Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. **Genes Dev** 1999; 13:1211-33.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. **Apoptosis** 2006; 11:5-13.

Kirshner JR, He S, Balasubramanyam V, Kepros J, et al. Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress. **Mol Cancer Ther** 2008; 8:2319-27.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2004; 44:239-67.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, et al. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. **Cell Death Differ** 2007; 14:230-9.

Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Lett**. 1996; 378:150-2.

Kvam E, Tyrrell RM. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet a irradiation of DNA or melanoma cells. **J Invest Dermatol** 1999; 113:209-13.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227:680-5.

Lederkremer GZ. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. **Curr Opin Struct Biol** 2009; 19:1-9.

Lee AS. GRP78 Induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. **Cancer Res** 2007; 67:3496-9.

Li N, Chen X, Liao J, et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. **Carcinogenesis** 2002; 23:1307-13.

Liang YH, LI T, Perez-Soler R, Haigentz M Jr. Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib. **Cancer Chemother Pharmacol** 2009; 3:539-48.

Ligeret H, Barthelemy S, Zini R, Tillement JP, Labidalle S, Morin D. Effects of curcumin and curcumin derivatives on mitochondrial permeability transition pore. **Free Radic Biol Med** 2004; 36:919-29.

Lincoln DT, Ali Emadi EM, Tonissen KF, Clarke FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. **Anticancer Res** 2003; 23:2425-33.

López-Lázaro M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. **Mol Nutr Food Res** 2008; 52 Suppl 1:S103-27.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951; 193:265-75.

Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? **Nat Rev Cancer** 2004; 4:966-77.

Maddodi N, Setaluri V. Role of UV in cutaneous melanoma. **Photochem Photobiol** 2008; 84:528-36.

Magalska A, Sliwinska M, Szczepanowska J, Salvioli S, Franceschi C, Sikora E. Resistance to apoptosis of HCW-2 cells can be overcome by curcumin- or vincristine-induced mitotic catastrophe. **Int J Cancer** 2006; 119:1811-8.

Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? **Antioxid Redox Signal** 2007; 9:2277-93.

Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. **J Mol Biol** 1970; 53:159-62.

Maranhão AQ. Transformação bacteriana. In: Azevedo MO, Felipe MSS, Brígido MM, Maranhão AQ, de Spouza MT, editores. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: UNB; 2003. p.129-41.

Martins NM, Santos NA, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin induces mitochondrial oxidative stress with resultant energetic metabolism impairment, membrane rigidification and apoptosis in rat liver. **J Appl Toxicol** 2008; 28:337-44.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Mol Cell Biol** 2001; 21:1249-59.

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction. **Nat Cell Biol** 2005; 7:766-72.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2008 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Moretti L, Cha YI, Niermann KJ, Lu B. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress? **Cell Cycle** 2007; 7:793-8.

Nozaki S, Sledge GW Jr, Nakshatri H. Repression of GADD153/CHOP by NF-kappaB: A possible cellular defense against endoplasmic reticulum stress-induced cell death. **Oncogene** 2001; 20:2178-85.

Odot J, Albert P, Carlier A, Tarpin M, Madoulet C. In vitro and *in vivo* anti-tumoral effect of curcumin against melanoma cells. **Int J Cancer** 2004; 111:381-7.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Differ** 2004; 11:381-9.

Pae HO, Jeong SO, Jeong GS, et al. Curcumin induces pro-apoptotic endoplasmic reticulum stress in human leukemia HL-60 cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 353:1040-5.

Pahl HL, Baeuerle PA. The ER-overload response: activation of NF-kappa B. **Trends Biochem Sci** 1997; 22:63-7.

Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. **Drug Resist Updat** 2004; 2:97-110.

Rass K, Reichrath J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Adv Exp Med Biol** 2008; 624:162-78.

Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochem Pharmacol** 2008; 76:1340-51.

Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, et al. Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. **PLoS Biology** 2006; 4:2024-41.

Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. **Cancer Biol Ther** 2002; 1:14-7.

Schwartz DR, Sack MN. Targeting the mitochondria to augment myocardial protection. **Curr Opin Pharmacol** 2008; 8:160-5.

Scott DW, Loo G. Curcumin-induced GADD153 gene upregulation in human colon cancer cells. **Carcinogenesis** 2002; 25:2155-64.

Sen S, Sharma H, Singh N. Curcumin enhances Vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 331:1245-52.

Siwak DR, Shishodia S, Aggarwal BB, Kurzrock R. Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of IkappaB kinase and nuclear factor kappaB activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. **Cancer** 2005; 104:879-90.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39:44-84.

Wahl H, Tan L, Griffith K, Choi M, Liu JR. Curcumin enhances Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in chemoresistant ovarian cancer cells. **Gynecol Oncol** 2007; 105:104-12.

Wajih N, Borrás T, Xue W, Hutson SM, Wallin R. Processing and transport of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein and bone morphogenetic protein-2 in cultured human vascular smooth muscle cells: evidence for an uptake mechanism for serum fetuin. **J Biol Chem** 2004; 279:43052-60.

Wang H, Iakova P, Wild M, et al. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. **Mol Cell** 2001; 8:817-28.

Werner E, Werb Z. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. **J Cell Biol** 2002; 158:357-68.

Wittgen HG, van Kempen LC. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. **Melanoma Res** 2007; 17:400-9.

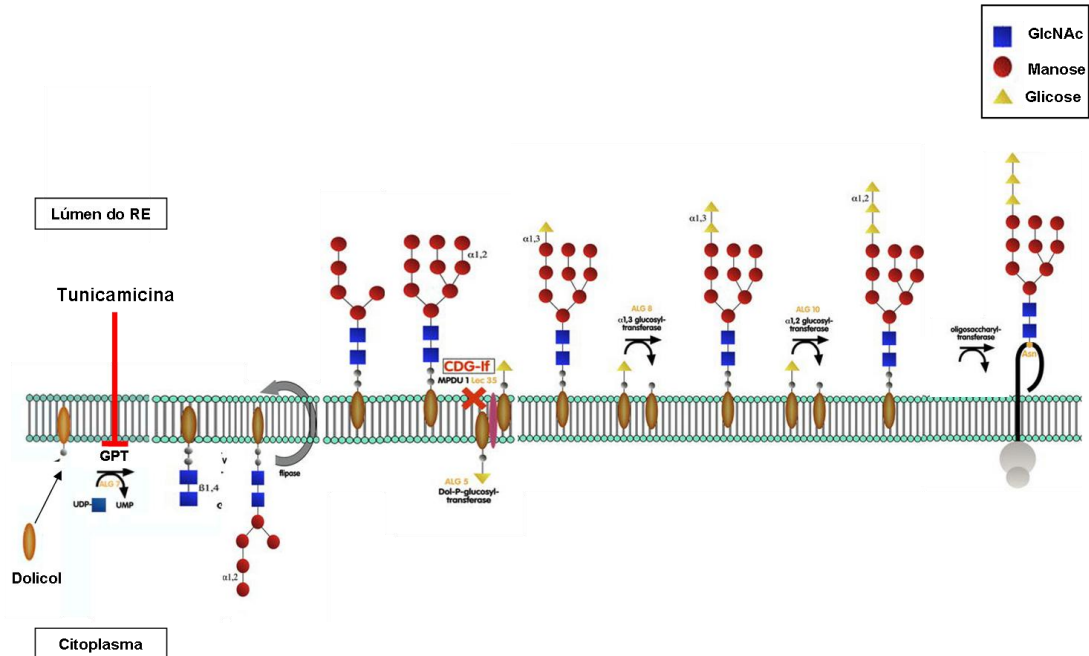
Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem** 2006; 281:30299-304.

Zaidi MR, Day CP, Merlino G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **J Invest Dermatol** 2008; 128:2381-91

Zheng M, Ekmekcioglu S, Walch ET, Tang CH, Grimm EA. Inhibition of nuclear factor-kappaB and nitric oxide by curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human melanoma cells. **Melanoma Res** 2004; 14:165-71.

Zhuang L, Scolyer RA, Lee CS, McCarthy SW, Cooper WA, Zhang XD, Thompson JF, Hersey P. Expression of glucose-regulated stress protein GRP78 is related to progression of melanoma. **Histopathology** 2009; 54:462-70.

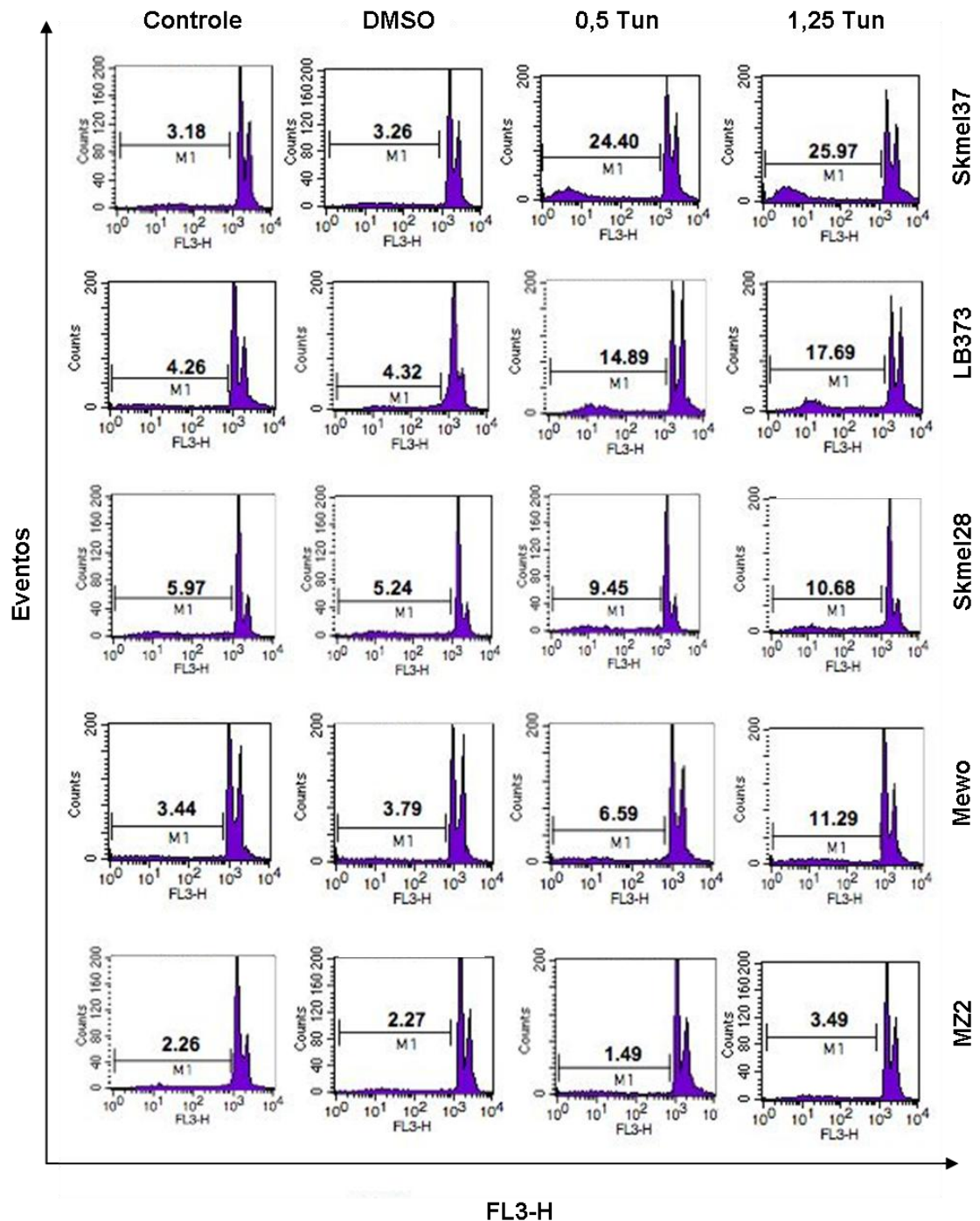
Anexo 1 – Bloqueio da N-glicosilação por tunicamicina.



Fonte: Adaptado de denecke e MARQUARDT (2003).

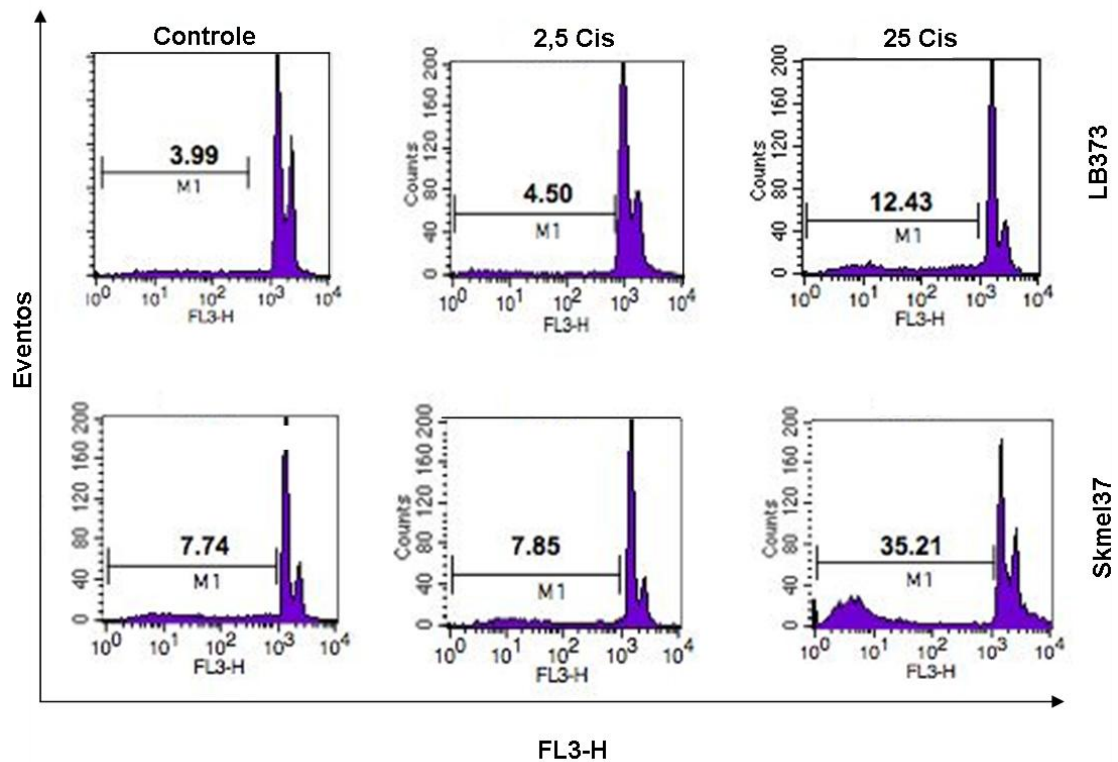
No processo de N-glicosilação, fundamental para o enovelamento protéico, é sintetizado oligossacarídeo que será adicionado à proteína nascente. Este oligossacarídeo é formado a partir da adição de moléculas de glicose, manose e N-acetil glucosamina (GlcNAc) à molécula carreadora Dolicol fosfato. A primeira etapa desta sequência de reações é catalizada pela enzima GlcNAc fosfotransferase (GPT), molécula alvo de tunicamicina.

Anexo 2 – Tratamento das células de melanoma humano Skmel37, LB373, Skmel28, Mewo e MZ2mel com tunicamicina.



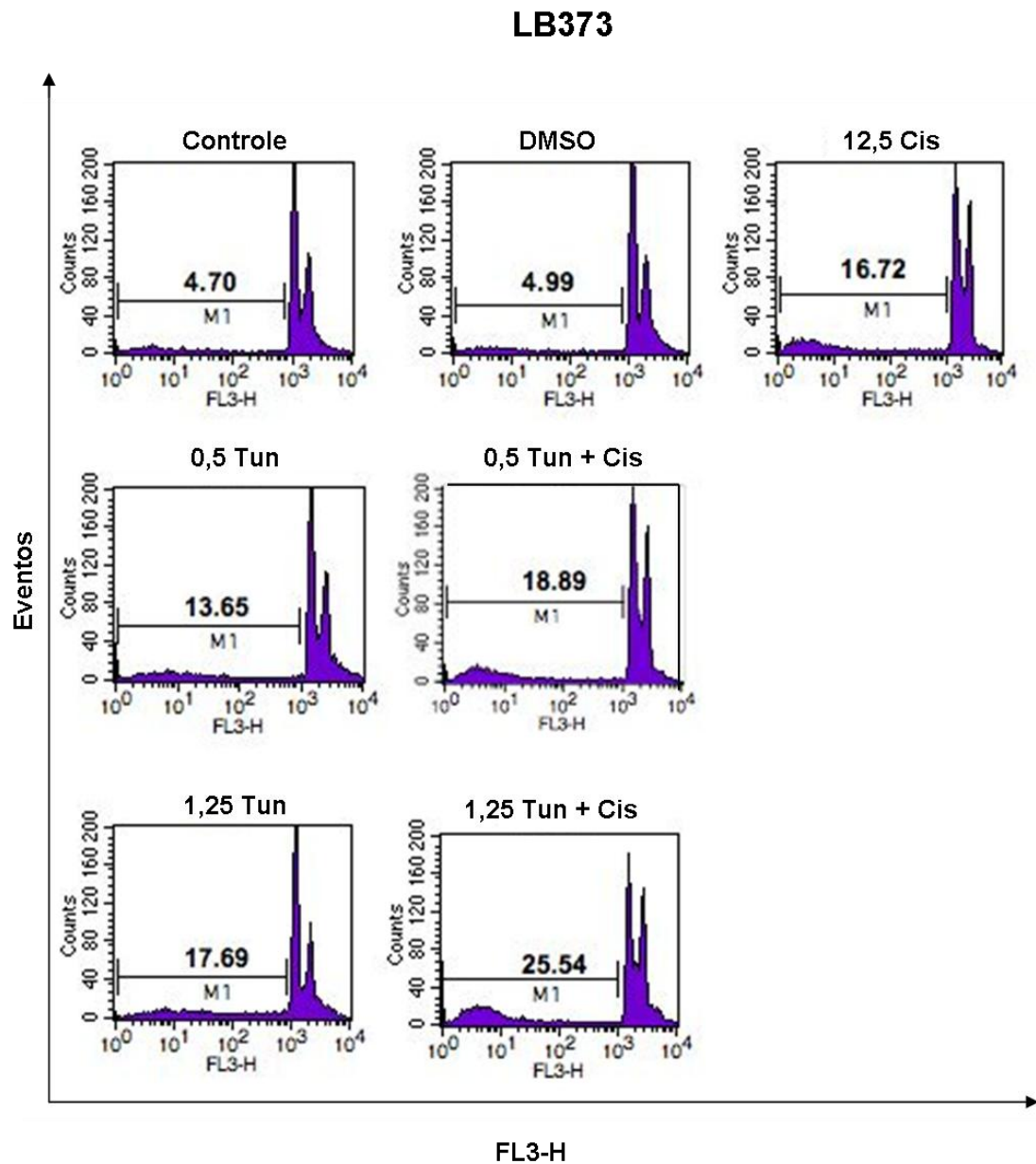
As células foram tratadas com 5µg/ml e 1,25µg/ml de tunicamicina por 24 horas. A quantificação das células em processo de morte celular foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e obtida por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos com a quantificação das células hipodiplóides (M1).

Anexo 3 - Tratamento das células de melanoma humano Skmel37 e LB373 com cisplatina.



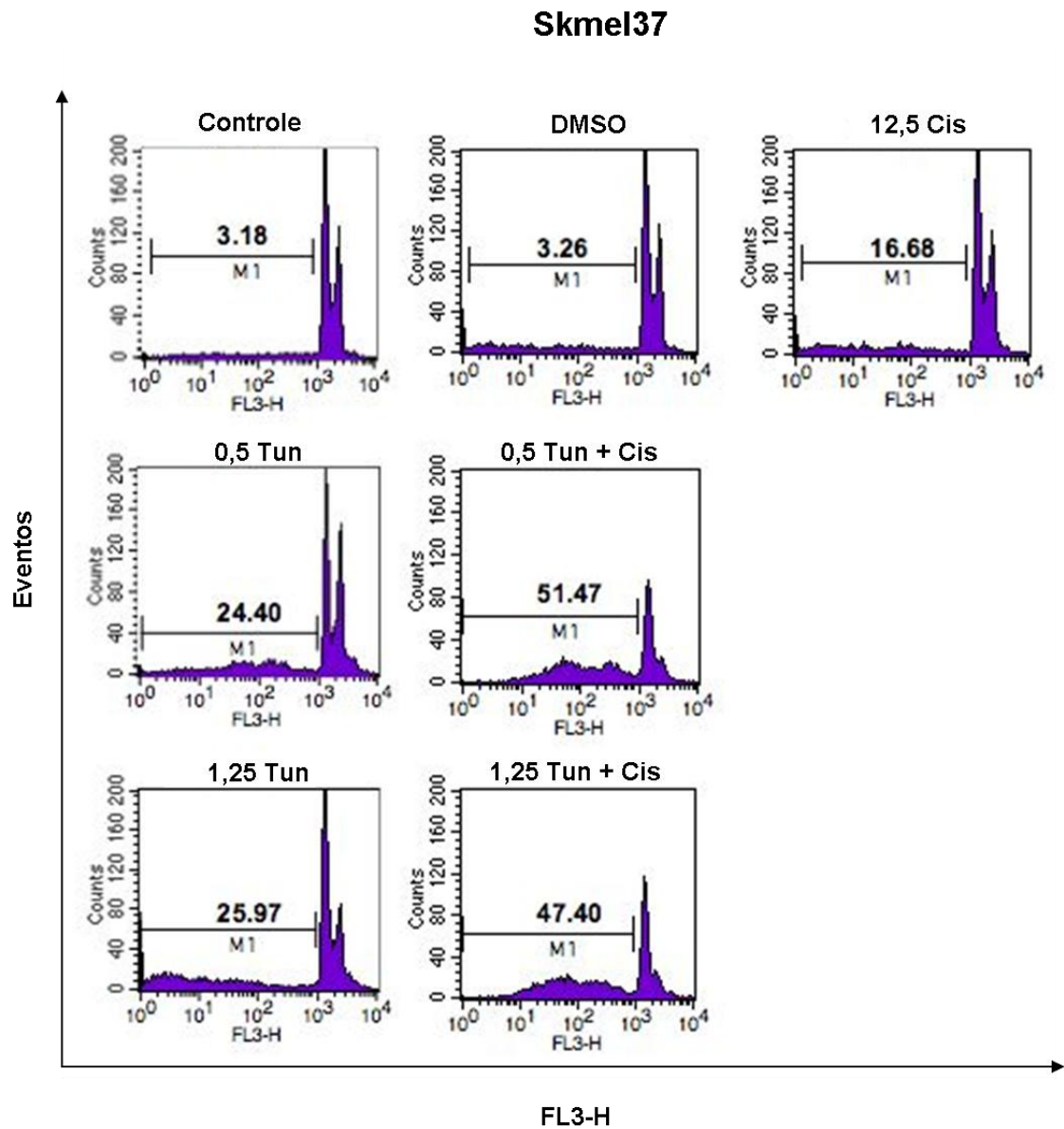
As células foram tratadas com 2,5 e 25 μ M de cisplatina por 24 horas. O controle sem tratamento com cisplatina também foi realizado em ambas as células. A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos. CTL: controle; 2.5 CIS: 2,5 μ M cisplatina; 25 CIS: 25 μ M cisplatina.

Anexo 4 - Sensibilização das células LB373 à morte induzida por cisplatina.



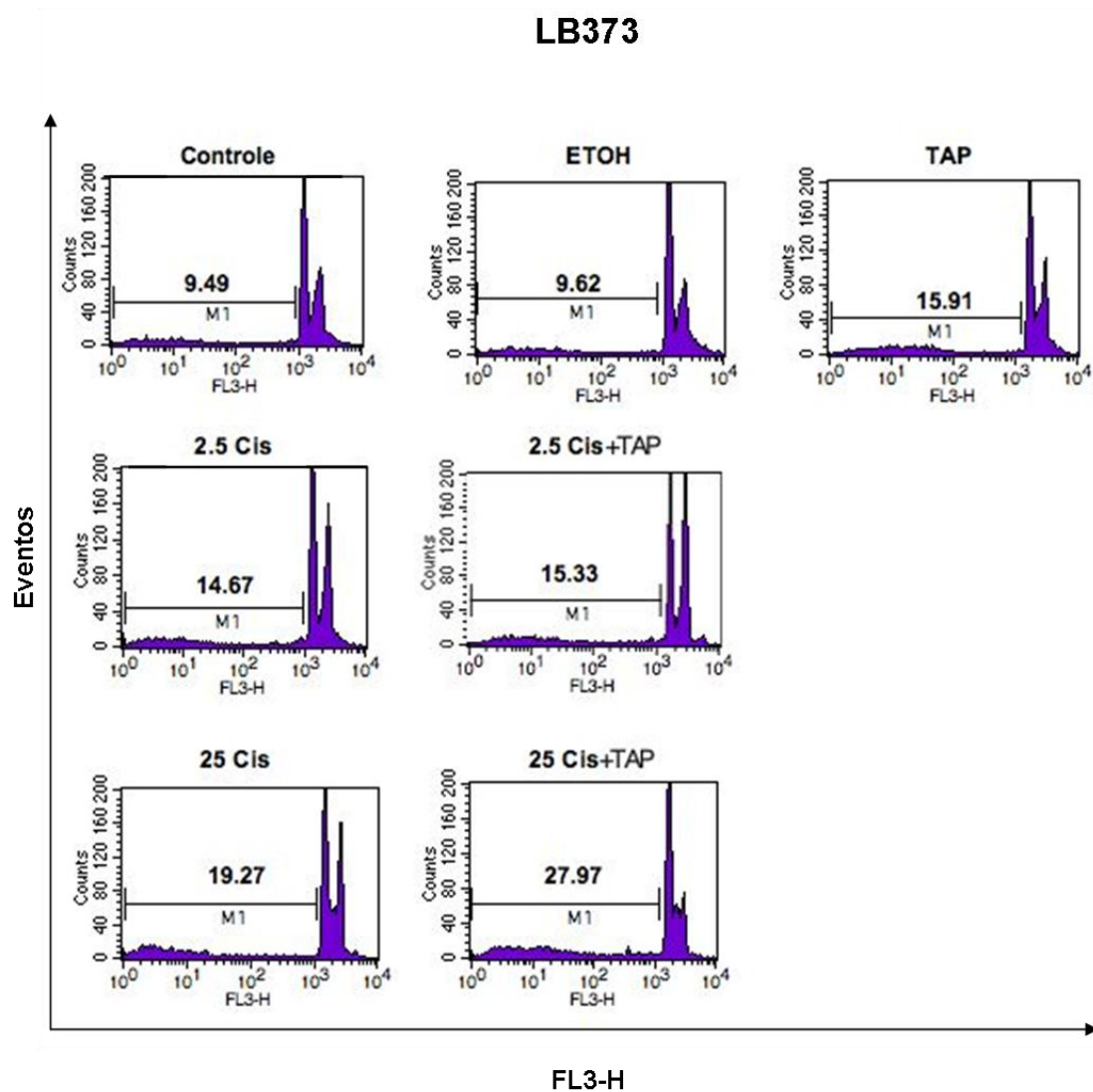
As células foram tratadas com tunicamicina (0,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (12,5 μM por 24 horas). A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos. CTL: controle; 0,5 TUN / 1,25 TUN: 0,5 e 1,25 $\mu\text{g/ml}$ tunicamicina; 12,5 CIS: 12,5 μM cisplatina.

Anexo 5 - Sensibilização das células Skmel37 à morte induzida por cisplatina.



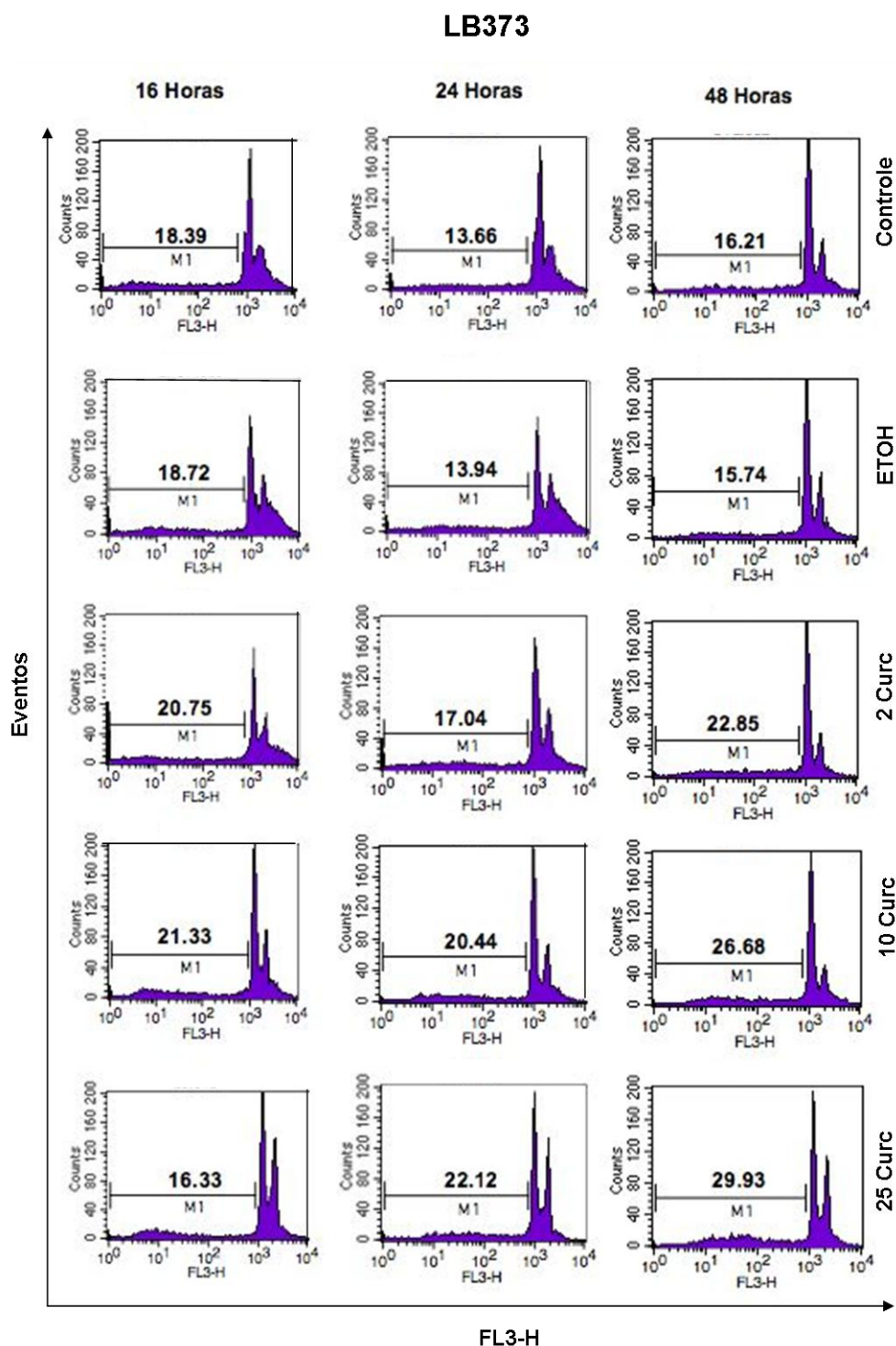
As células foram tratadas com tunicamicina (0,5 e 1,25 µg/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (12,5 µM por 24 horas). A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos. CTL: controle; 0,5 TUN / 1,25 TUN: 0,5 e 1,25 µg/ml tunicamicina; 12,5 CIS: 12,5 µM cisplatina.

Anexo 6 - Tratamento das células LB373 com tapsigargina e/ou cisplatina.



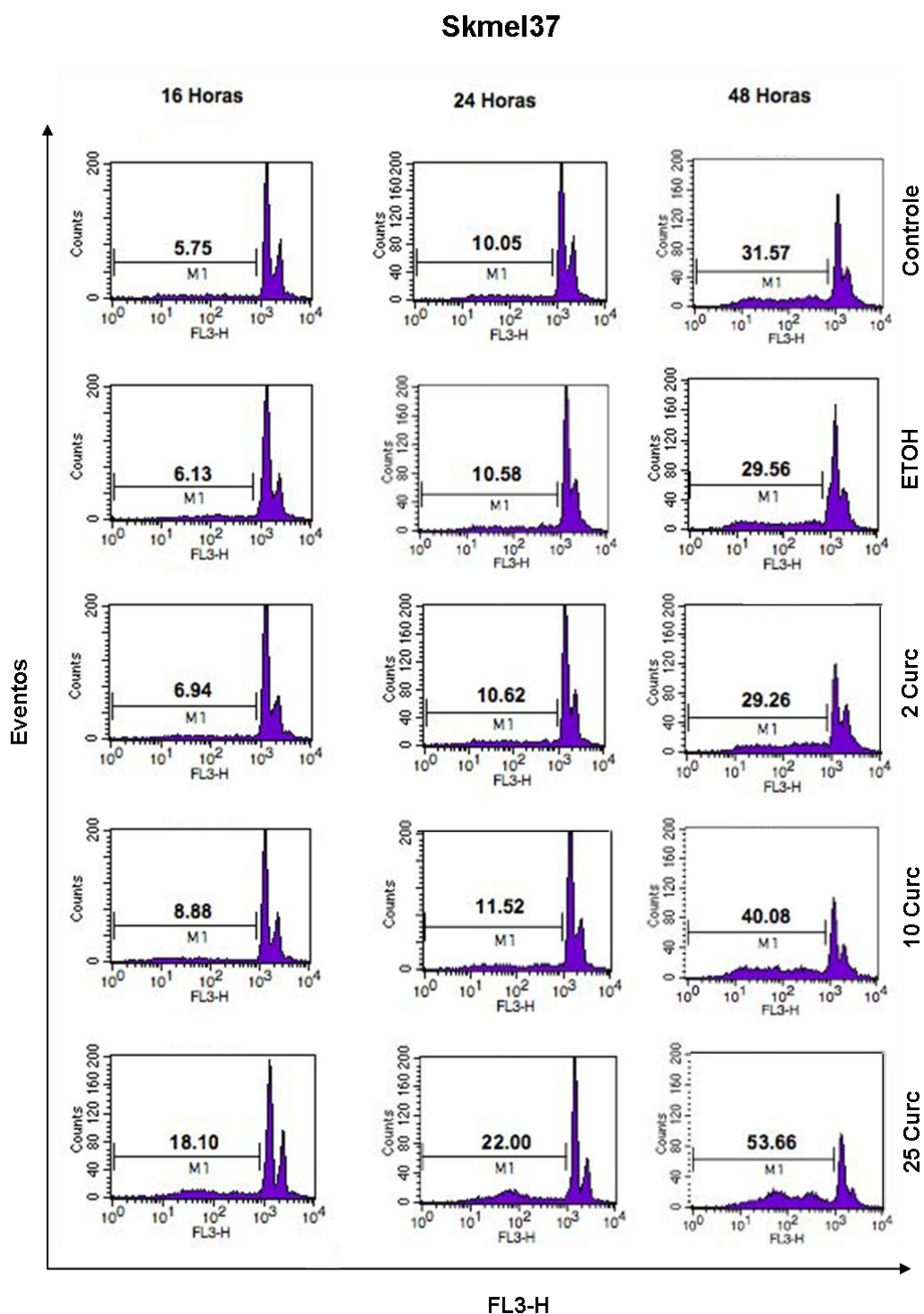
As células LB373 foram tratadas com tapsigargina (50 nM por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M por 24 horas). A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos. CTL: controle; TAP: tapsigargina; 2,5 e 25 CIS: 2,5 μ M e 25 μ M cisplatina.

Anexo 7 - Tratamento das células LB373 com diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de tratamento.



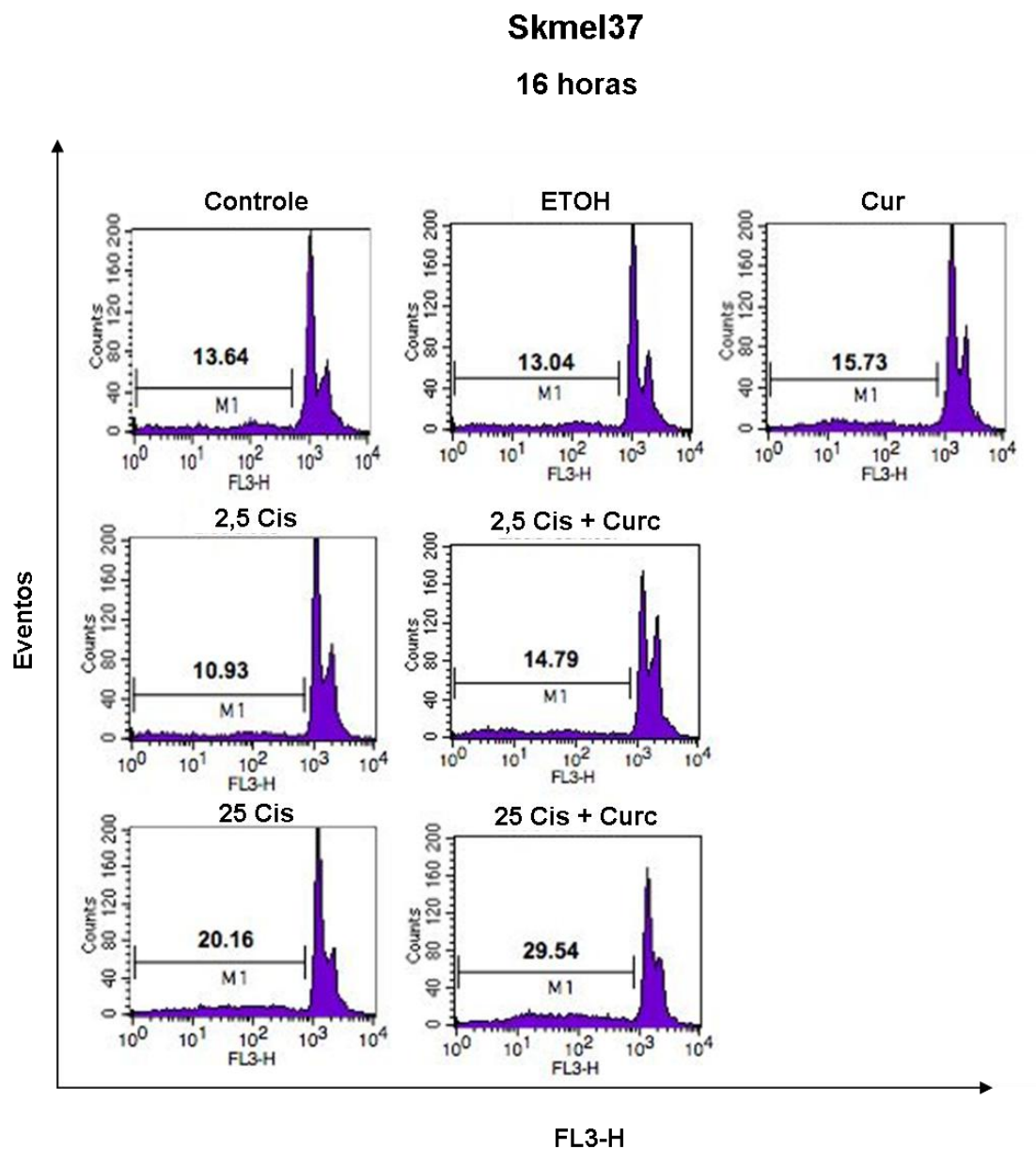
As células LB373 (A) e Skmel37 (B) foram tratadas com curcumina (2; 10; 25 e 50 μ M) e 0,1% de ETOH (diluente da curcumina) por 16, 24 e 48 horas. O controle sem tratamento também foi realizado. A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodoeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos.

Anexo 8 - Tratamento das células Skmel37 com diferentes concentrações de curcumina e diferentes tempos de tratamento.



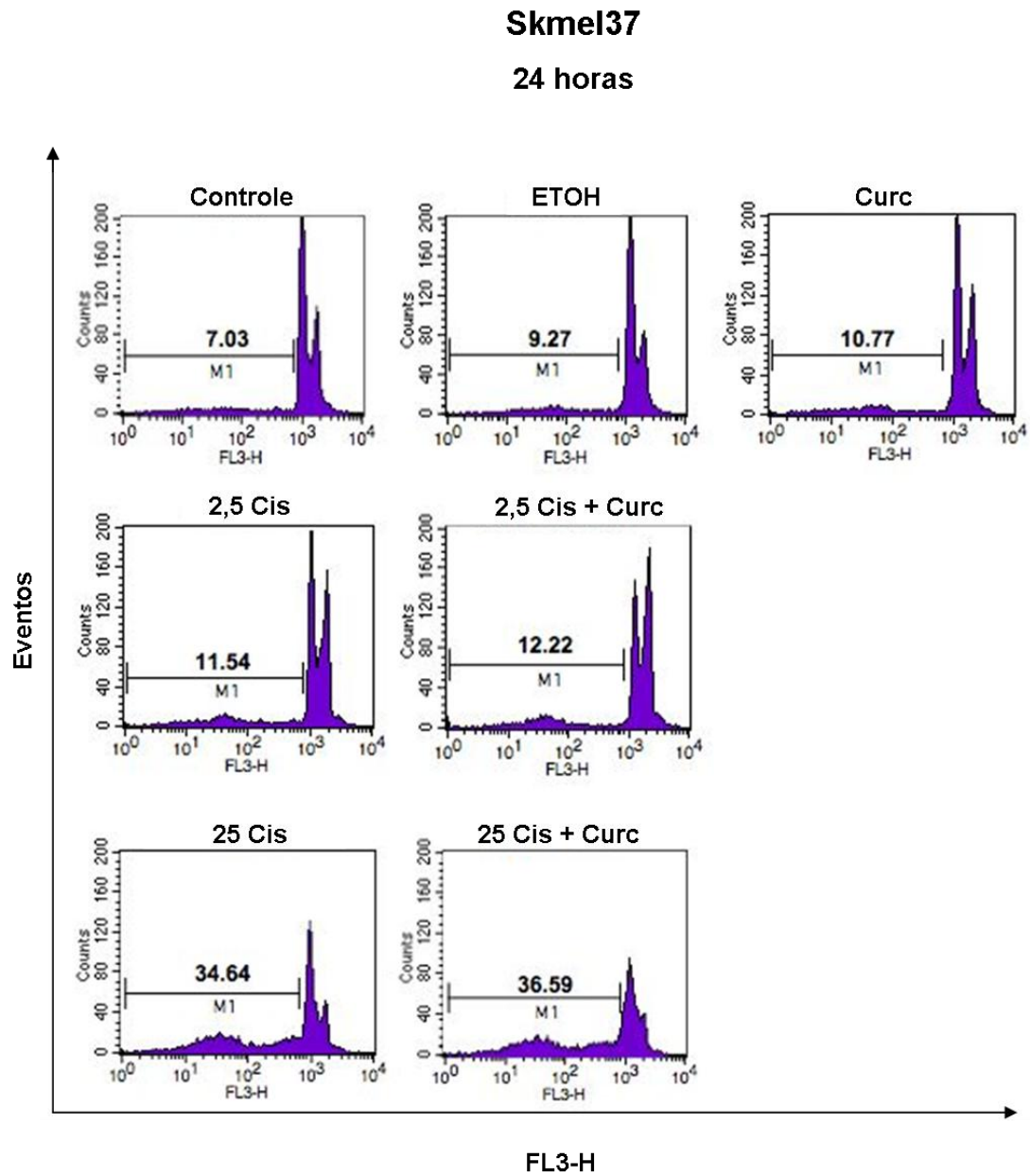
As células LB373 (A) e Skmel37 (B) foram tratadas com curcumina (2; 10; 25 e 50 μ M) e 0,1% de ETOH (diluente da curcumina) por 16, 24 e 48 horas. O controle sem tratamento também foi realizado. A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodoeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos.

Anexo 9 - Células Skmel37 tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 16 horas.



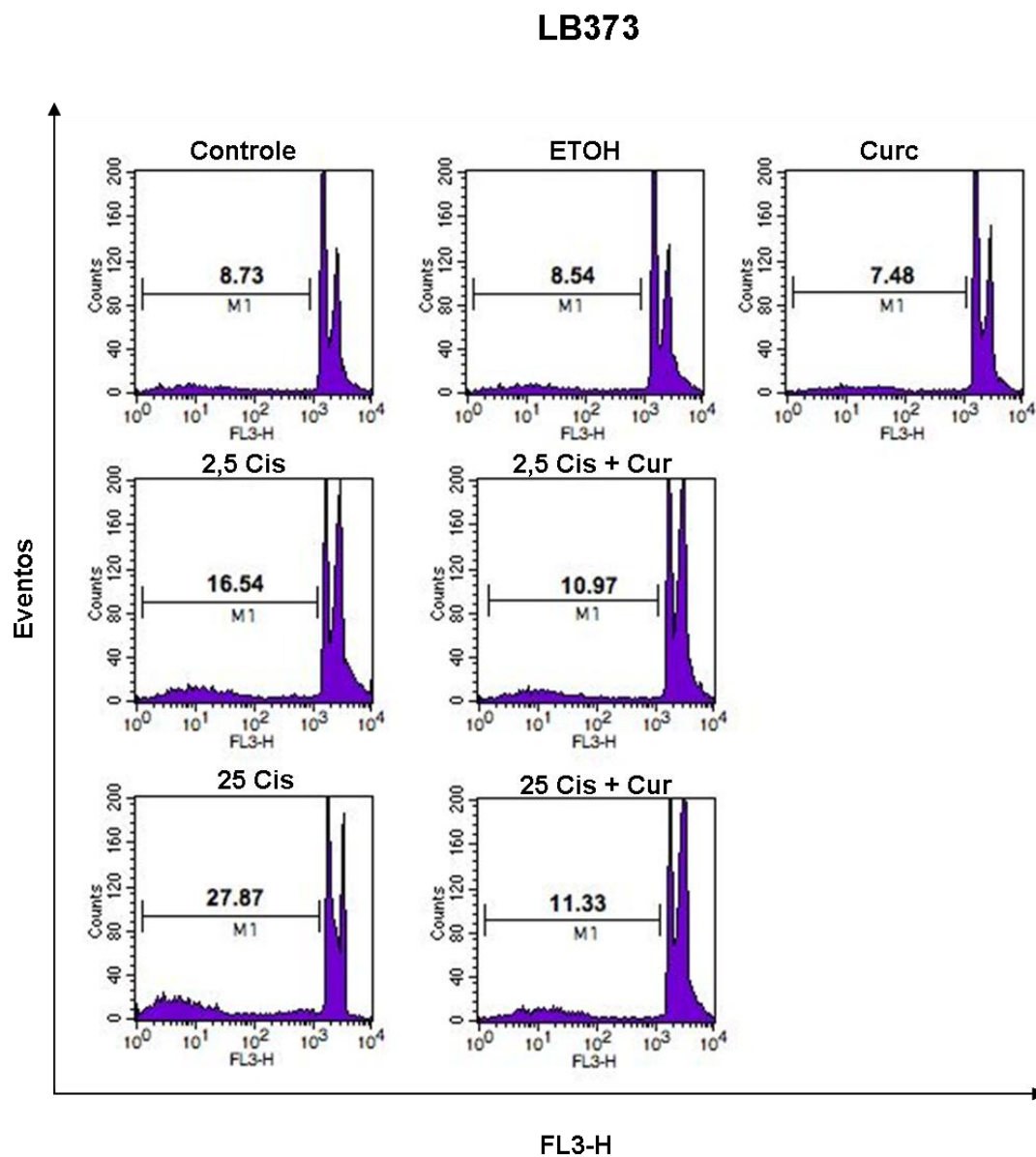
A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos. Ctl: controle; Curc: curcumina; Cis: cisplatina.

Anexo 10 - Células Skmel37 tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 24 horas.



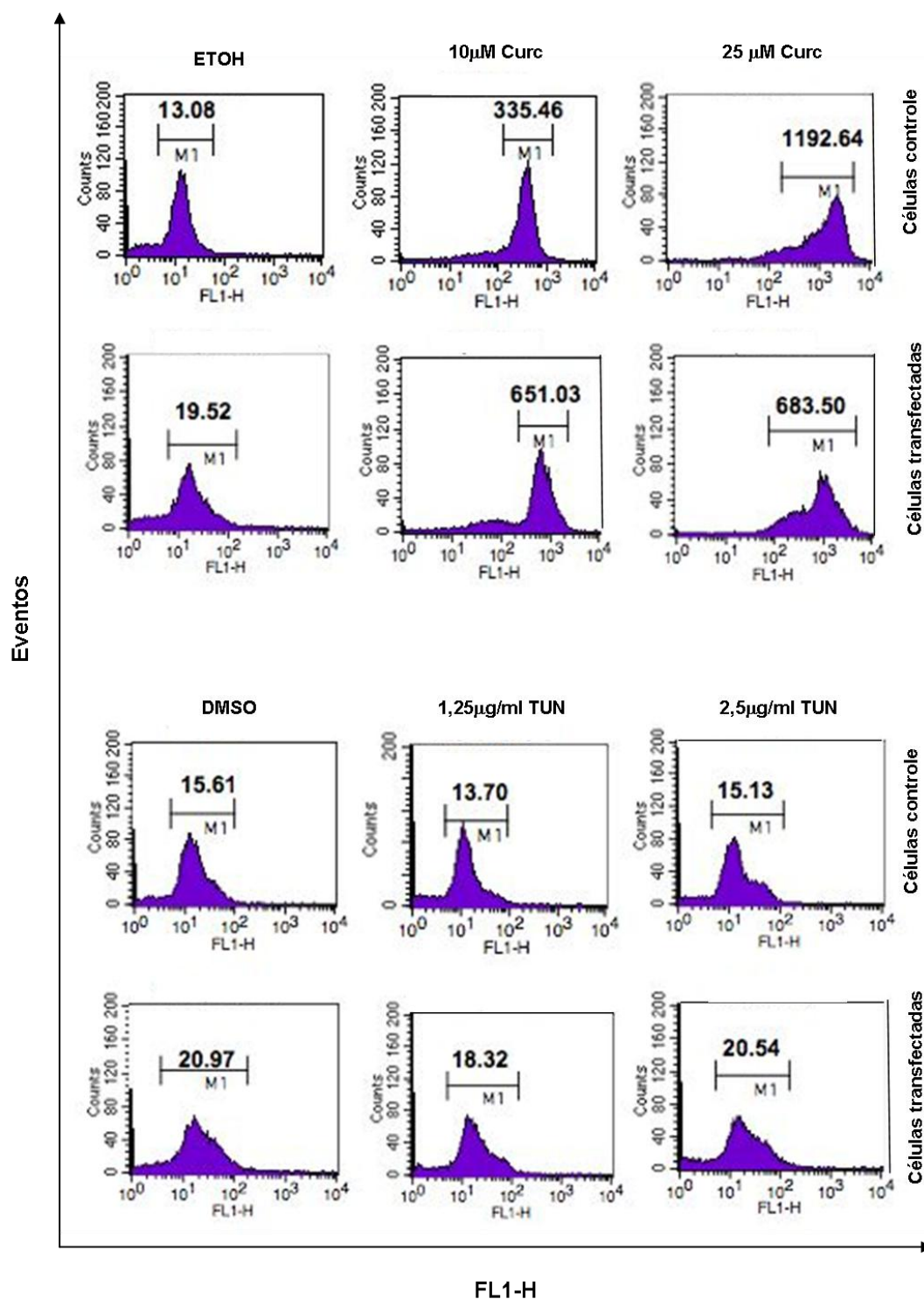
A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos. Ctl: controle; Curc: curcumina; Cis: cisplatina.

Anexo 11 - As células LB373 foram tratadas com 10 μ M de curcumina por 24 horas previamente ao tratamento com cisplatina (2,5 e 25 μ M) durante 24 horas.



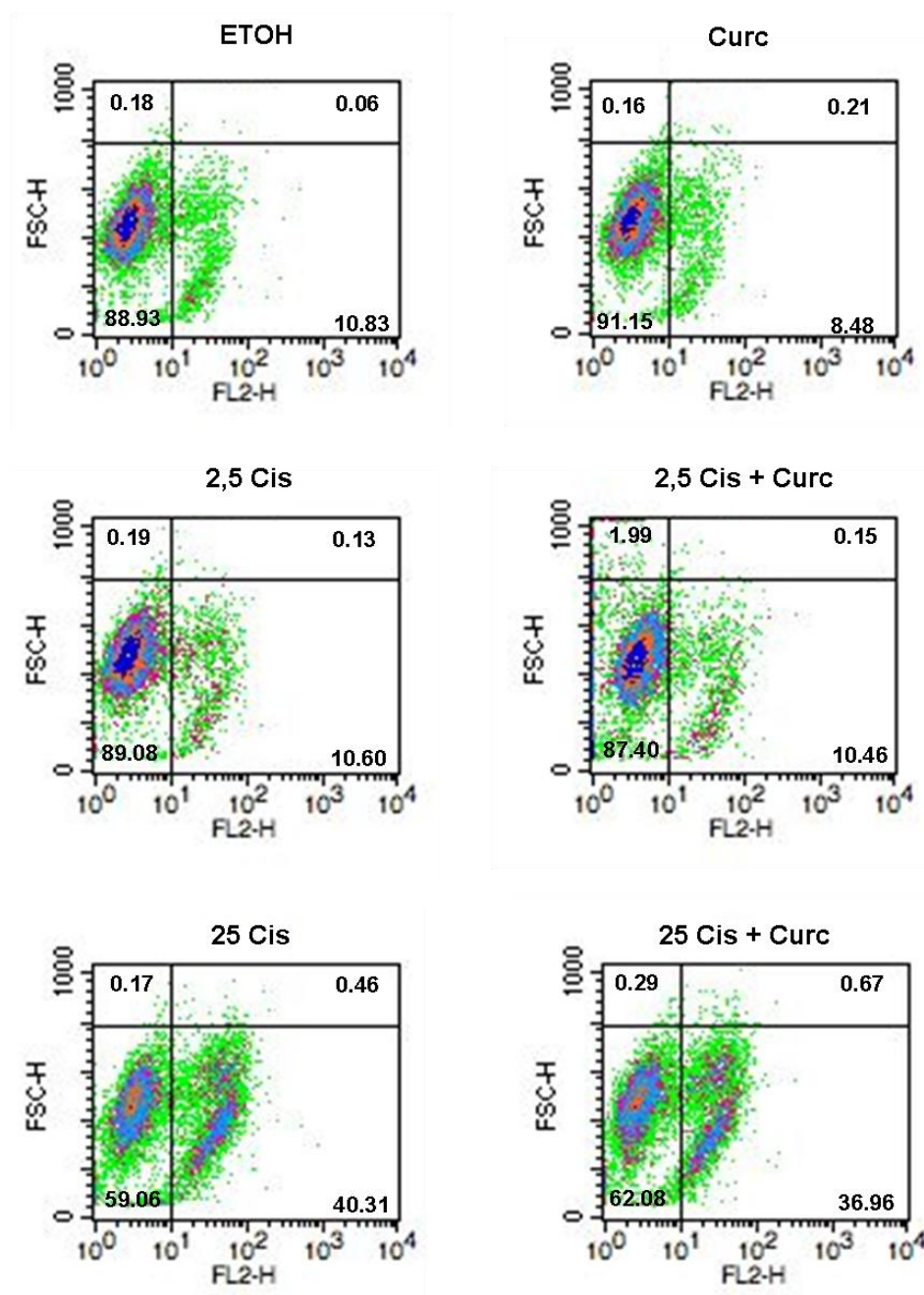
A quantificação das células hipodiplóides (M1) foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Foram analisados 10000 eventos. Ctl: controle; Curc: curcumina; Cis: cisplatina.

Anexo 12 - Avaliação da ativação de NF κ B em resposta ao tratamento com curcumina e tunicamicina.



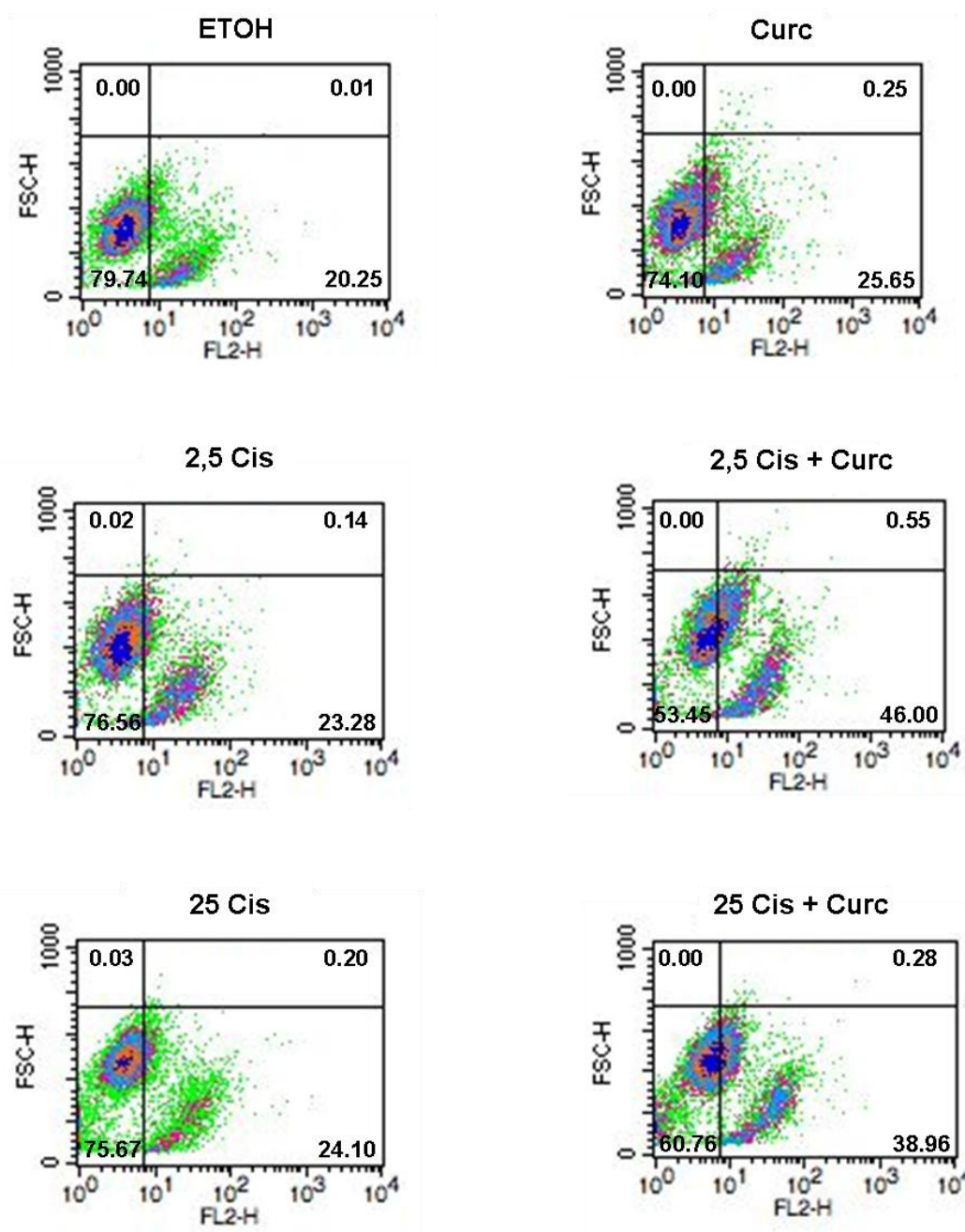
As células LB373 foram transfectadas com o plasmídeo pNF- κ B-hrGFP (células transfectadas) ou apenas com Lipofectamina (células controle). Os valores de M1 representam a média geométrica obtida em cada tratamento. Foi realizada a razão e a subtração dos valores de M1 obtidas nas células transfectadas e células controle.

Anexo 13 – Tratamento das células Skmel37, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases.



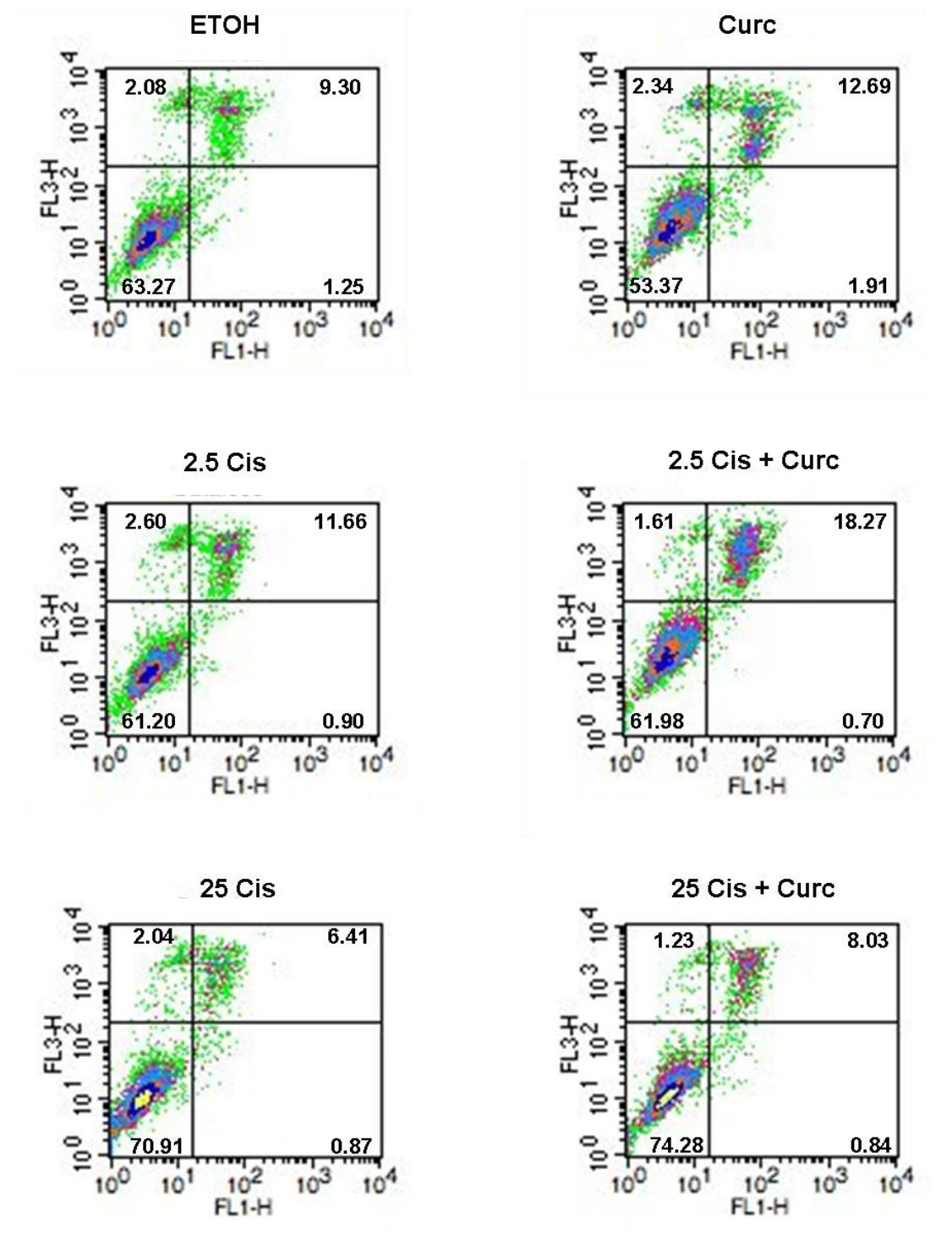
O inibidor de multicaspases SR-VAD-FMK, que se liga irreversivelmente a múltiplos membros da família de caspases ativados durante o processo de apoptose. A quantificação de caspases ativas foi realizada através da soma dos quadrantes direitos superiores e inferiores.

Anexo 14 – Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina, com inibidor de multicaspases.



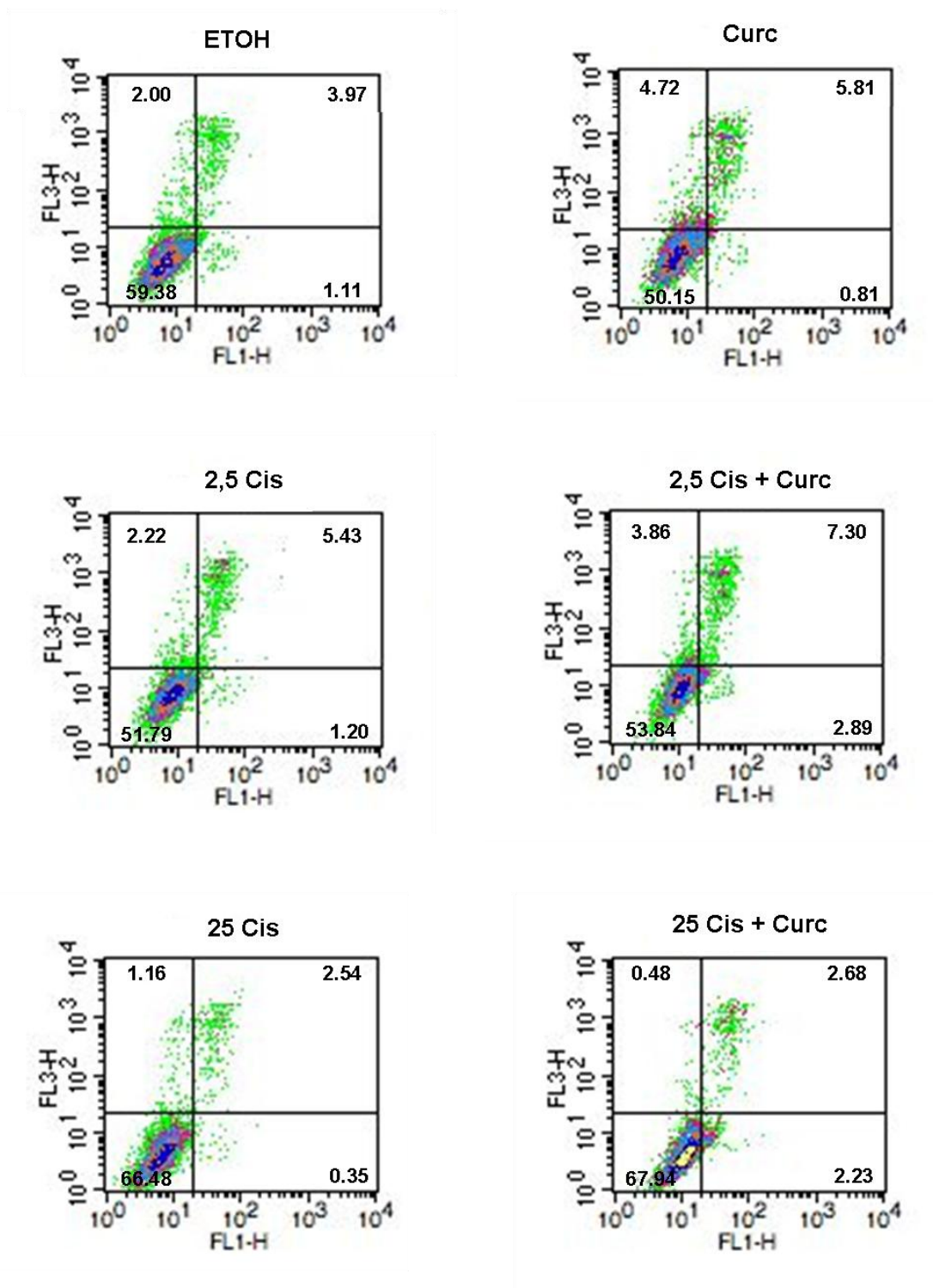
O inibidor de multicaspases SR-VAD-FMK (A), que se liga irreversivelmente a múltiplos membros da família de caspases ativados durante o processo de apoptose. A quantificação de caspases ativas foi realizada através da soma dos quadrantes direitos superiores e inferiores.

Anexo 15 – Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina com substratos de caspases 8.



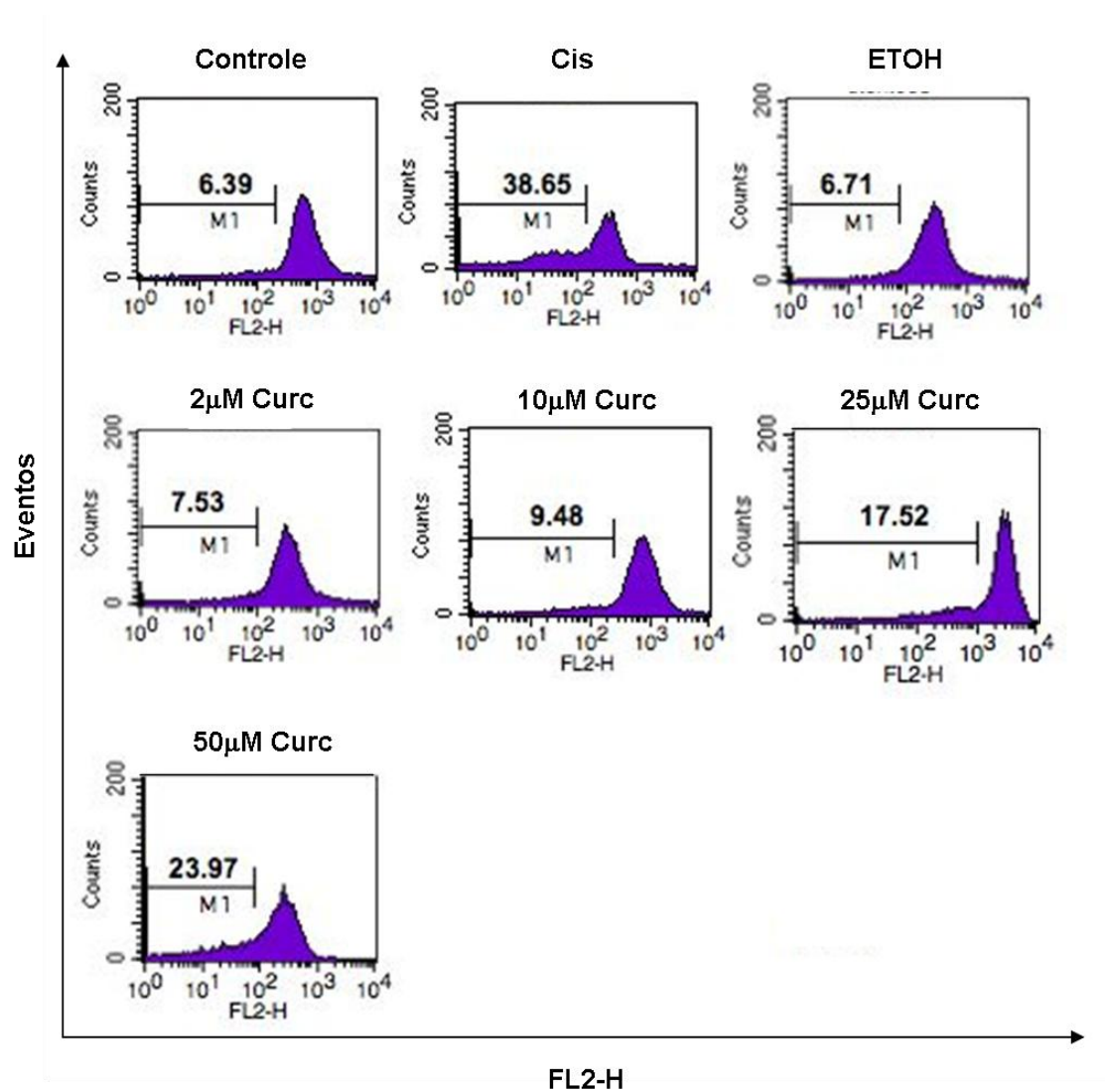
A quantificação de caspases 8 ativas foi realizada através da soma dos quadrantes direitos superiores e inferiores.

Anexo 16 - Tratamento das células LB373, submetidas ao tratamento com curcumina e/ou cisplatina com substratos de caspases 3 e 7.



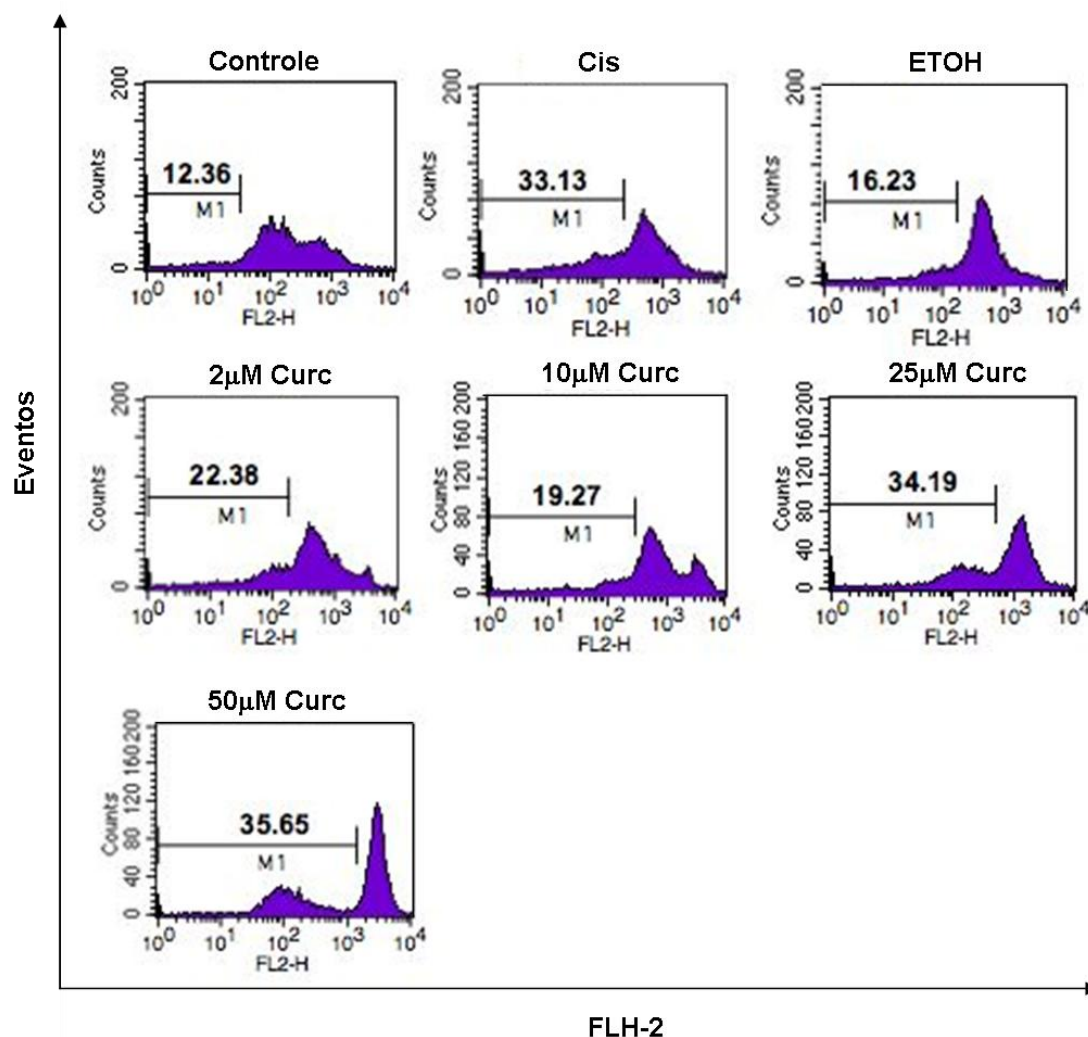
A quantificação de caspases 3 e 7 ativas foi realizada através da soma dos quadrantes direitos superiores e inferiores.

Anexo 17 - Avaliação do perfil de alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) nas células tratadas com curcumina.



As células foram tratadas com 2; 10; 25 e 50 μM de curcumina e 0,1% de ETOH (dilúente da curcumina) por 24 horas. O controle sem tratamento e com cisplatina (controle positivo para $\Delta\psi_m$) também foi realizado. Após tratamento com curcumina as células foram incubadas com JC-1 (2nM), marcador lipofílico catiônico, e os agregados e monômeros de JC-1 foram medidos por citometria de fluxo. A alteração do $\Delta\psi_m$ foi quantificado através da perda da formação de agregados de JC-1 (vermelho) mensurados com M1 em FL2-H.

Anexo 18 - Avaliação do perfil de alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) nas células LB373(A) e Skmel37(B) tratadas com curcumina.



As células foram tratadas com 2; 10; 25 e 50 μ M de curcumina e 0,1% de ETOH (dilúente da curcumina) por 24 horas. O controle sem tratamento e com cisplatina (controle positivo para $\Delta\psi_m$) também foi realizado. Após tratamento com curcumina as células foram incubadas com JC-1 (2nM), marcador lipofílico catiônico, e os agregados e monômeros de JC-1 foram medidos por citometria de fluxo. A alteração do $\Delta\psi_m$ foi quantificado através da perda da formação de agregados de JC-1 (vermelho) mensurados com M1 em FL2-H.

Anexo 19 – Aprovação do Comitê de Ética.



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14/11/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0975/07**, intitulado: **"ATIVAÇÃO DA VIA DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO COMO POTENCIAL AGENTE SENSIBILIZADOR DA MORTE CELULAR INDUZIDA POR CISPLATINA- ESTUDO EXPERIMENTAL."** apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Roger Chammas**

Pesquisador (a) Executante: **Renata de Freitas Saito**

CAPPesq, 21 de Novembro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**