

RESPOSTA DIFERENCIAL AO ESTRESSE DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM MODELO DE MELANOMA MURINO: IMPLICAÇÕES PARA QUIMIOSENSIBILIZAÇÃO

LUCIANA MARIA DORNELES DE OLIVEIRA

**Dissertação apresentada a Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Luciana Maria Dorneles de

Resposta diferencial ao estresse de reticulo endoplasmático em modelo de melanoma murino: implicações para quimiossensibilização / Luciana Maria Dorneles de Oliveira – São

Paulo, 2010.

73p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Roger Chammas

Descritores: 1. RETICULO ENDOPLASMATICO. 2. GLICOSILAÇÃO. 3. TUNICAMICINA/farmacologia. 4. MELANOMA EXPERIMENTAL. 5. RESPOSTA A PROTEINAS MAL-ENoveladas. 6. N-GLICOSILAÇÃO 7. PROGRESSÃO TUMORAL.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho Original."

Albert Einstein

"Cuide da paixão por descobrir".

Brigitte Autran(France)

"Eu não disse que seria fácil, mas que valeria a pena"

Chiara Lubich

DEDICATÓRIA

Ao meu Tudo: Deus

AGRADECIMENTOS

É difícil colocar em uma ou duas páginas, todos que quero agradecer. Mas primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Roger Chammas, que tem sido um verdadeiro mestre para a minha formação científica.

Gostaria de agradecer também a todos que estiveram presente no laboratório de Oncologia experimental durante estes anos: Ana, Andréia, Camila, Cláudia, Gabriella, Guilherme, Helano, Lara, Mara, Moacir, Patrícia, Rafael, Raimundo, Rodrigo Aguiar, Rodrigo Vieira, Silvina, Tharcisio e Renata. Com este grupo de trabalho, discuti o cotidiano do meu trabalho e tive o apoio em tantos momentos cruciais da minha dissertação. Em especial, um agradecimento a Renata, pelos trabalhos que temos feito juntas. Agradeço ainda a Maria José, Willame, Nazaré, Cristina, Ivonete e Jair; funcionários dedicados do lim 24. E por fim, agradeço ainda algumas pessoas com quem convivi mais no lim 24, a Júlia e Gustavo.

Agradeço especialmente a minha família que vem apoiando em cada etapa da minha vida. Esta é uma conquista também deles, pois estiveram comigo em todos os momentos, inclusive aqueles mais difíceis. Assim, obrigada pai, mãe, Paulo, Rafael, Marcos Filipe e Ana Marise. Igualmente, quero agradecer a todos os parentes que sempre estiveram perto; a família da minha mãe que sempre contagiou com a alegria e a batalha na vida de cada um; e a família do meu pai, pela unidade e a vontade de estarem sempre juntos. Obrigada!

Um GRANDE obrigado a todos do Movimento dos Focolares. Com certeza, esta é uma segunda grande família que tenho. Foram tantos que me apoiaram e rezaram por mim, e que estiveram ali mesmo quando eu achava que não conseguiria mais. Em especial, queria agradecer a Ana

Guerra, Ana Neri, Carol Muniz, Mariana Guimarães, Mariana Assis, Maísa, Luciana Collet, Glória, Tatiana e Theresa; que estiveram mais presentes na minha vida este período. Mas queria agradecer também a Valter Hugo, Iury, Gustavo, Carlos, Daniel de Oliveira, Eleusa, Felipe Silva, Valter pai, Mariana Rocha, Miriam Sebok, Erika, Mafalda, Rachel, Cleiton, Cristiane, Débora, Camila, Valéria, Rodrigo, Rafaela, André, Marilen, Fausto, Viviane, Maria Lúcia, Jany Lee, Josilene, Juliana e Heraldo; pela alegria de poder contar com verdadeiros amigos em todos os momentos.

Agradeço aos amigos que mesmo distantes fisicamente sempre estiveram muito próximos: Rhaul, Larissa, Adriane, Cristhian, Tatiana, Niara Talitha, Marina e José Maria. Em especial ao Rhaul e a Adriane pelo MTG.

Agradeço ainda aquelas que me agüentaram durante estes dois anos todos os dias em casa: Ana Emília, Beronalda, Mônica e Flávia. Obrigada por todas as conversas, discussões de cada dia e aventuras; com cada uma aprendi muito sobre a vida. Incluo também aqui a Silvina, grande amiga que está sempre presente. É muito bom chegar em casa e ter a alegria de poder dividir alegrias e tristezas com grandes amigas, irmãs.

E finalmente agradeço a Chiara Lubich, uma segunda mãe que me ensinou quase tudo nesta vida. E que me mostrou que acima de tudo o que vale é DEUS.

RESUMO

Oliveira LMD. **Resposta diferencial ao estresse de retículo endoplasmático em modelo de melanoma murino: implicações para quimiossensibilização.** São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

As glicoproteínas de células tumorais apresentam modificações estruturais em seus padrões de glicosilação. Um acúmulo de proteínas mal enoveladas no Retículo Endoplasmático gera um estresse que provoca um processo citoprotetivo denominado resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), este ativado constantemente pode desencadear apoptose. O nosso grupo trabalha com um modelo de progressão tumoral de melanoma murino, constituído pela linhagem celular não tumoral melan-a e pelas linhagens tumorigênicas geradas e selecionadas a partir de ciclos de perda de ancoragem de melan-a (TM1 e TM5). TM1 e TM5 estão em um estado mais pró-oxidativo e apresentam o padrão de glicosilação aberrante. Quando tratadas com baixa concentração de tunicamicina (inibidor da *N*-glicosilação), as células melan-a apresentaram maior resistência à morte quando comparada com as linhagens TM1 e TM5; evidenciado pelo número de células viáveis e por ensaio de MTT. O tratamento com tunicamicina aumentou o acúmulo de GRP78 e GADD153 e provocou uma parada celular em G0/G1. Nas linhagens tumorigênicas, o acúmulo de GADD153 e a parada celular foram mais evidentes. As três linhagens demonstraram ser sensíveis ao tratamento com cisplatina. Tratamento com tunicamicina 48 horas, adicionando cisplatina nas 24 horas finais demonstrou um efeito aditivo das drogas somente para melan-a. Já tratamento prévio por 24 horas com tunicamicina isolada e posterior 24 horas só com cisplatina, demonstrou um efeito aditivo discreto das duas drogas, sendo que para as linhagens tumorigênicas o efeito já pode ser observado em baixas concentrações de tunicamicina. Melan-a, TM1 e TM5 submetidos a tratamento com *N*-acetilcisteína, um antioxidante, demonstraram ter uma parada na proliferação celular. A sensibilidade diferencial das linhagens tumorigênicas à tunicamicina sugere que estas linhagens são dependentes de glicanos *N*-ligados, estando este fato correlacionado com UPR.

SUMMARY

Oliveira LMD. **[Differential response to endoplasmic reticulum stress in melanoma murine model: implications in chemosensitization]**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Tumor cells present certain structural modifications in their glycans. Accumulation of misfolded proteins in endoplasmic reticulum activates a cytoprotective process designated Unfolded protein response (UPR), that when activated continuously can activate apoptosis. Our group has worked with a syngeneic model of melanomagenesis comprised of a “normal” melanocyte cell line (melan-a) and two melanoma cell lines (TM1 and TM5) derived from sustained impediment of melan-a anchorage. TM1 e TM5 were characterized to have/present a more oxidant state and present an increase on aberrant glycans when compared to melan-a. In low doses, melan-a cells were more resistant to the treatment with tunicamycin (a *N*-glycosylation inhibitor), than tumorigenic cell lines; as showed by MTT and viable cells counted up. Tunicamycin treatment increased GRP78 and GADD153 protein content and induced G0/G1 arrest. In tumorigenic cell lines, tunicamycin effects were stronger than in melan-a. The three cell lines are sensible to cisplatin. An essay, cell lines were treated with just tunicamycin for 24 hours, and after cisplatin were added to treatment for 24 hours more. This experiment showed drugs additive effect only to melan-a. Another essay, cells were treated first with only tunicamycin, followed to just cisplatin for more 24 hours. This conduct experiment demonstrated discrete additive effect, and in tumorigenic cells lines this effect was already observed in tunicamycin low doses. When submitted to N-acetylcysteine treatment, melan-a, TM1 and TM5 showed discontinue in cell proliferation. This exquisite sensitivity of the tumorigenic cell lines to tunicamycin suggests that tumor cells are addicted to *N*-linked glycosylation, being this fact related with UPR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A molécula N-acetil cisteína e seu processo oxidativo.....	7
Figura 2	Formação do N-oligossacarídeo precursor	10
Figura 3	Controle de qualidade do enovelamento protéico no retículo endoplasmático.....	12
Figura 4	Cascatas de sinalização iniciadas pelas três vias de UPR.....	17
Figura 5	Histograma para determinação de etapa do ciclo celular.....	29
Figura 6	As linhagens tumorigênicas são mais sensíveis a tunicamicina do que melan-a.....	39
Figura 7	Melan-a apresentou uma maior resistência ao tratamento em baixa concentração de tunicamicina quando comparado com as linhagens tumorigênicas.....	40
Figura 8	Tratamento com tunicamicina diminuiu estruturas reconhecidas por L-PHA nas três linhagens.....	41
Figura 9	Tratamento com tunicamicina ocasiona o bloqueio da progressão do ciclo celular em G0/G1 principalmente nas linhagens tumorigênicas.....	42
Figura 10	Acúmulo de GRP-78 em células tratadas com tunicamicina.....	43
Figura 11	Acúmulo de GADD153 nas três linhagens quando tratadas com tunicamicina.....	44

Figura 12	Linhagens tumorigênicas e melan-a são sensíveis a cisplatina.....	46
Figura 13	Cisplatina e tunicamicina: efeito aditivo somente para melan-a.....	48
Figura 14	Tunicamicina e cisplatina: efeito aditivo discreto em baixa concentração sensibiliza as células a morte por cisplatina.....	50
Figura 15	N-acetilcisteína impede a proliferação celular nas três linhagens.....	52
Figura 16	Estresse oxidativo ativa vias da MAPK.....	60

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Classificação da progressão tumoral do melanoma.....	4
Tabela 1	Análise proteômica do precursor da proteína 78 Kda regulada por glicose e do precursor da calreticulina na linhagem de melanoma humano LB373 tratadas com cisplatina.....	22
Tabela 2	Análise transcricional de calnexina e do fator de ativação transcricional 4 nas linhagens celulares TM1 e TM5.....	22
Tabela 3	Tipos de análises estatísticas feitas para cada experimento, com seus respectivos controles.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

APB	Tampão de fosfatase alcalina
Asn	Asparagina
ARC	Proteína reguladora de atividade associada ao citoesqueleto
ATF-4	Fator de ativação transcricional 4
ATF6	Fator de ativação transcricional 6
Bap31	Receptor de célula B associado à proteína 31
BcL-2	Linfoma da célula B 2
BCA	Ácido bicinônico
BCIP	Sal de 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolifosfato toluidino
BIP	GRP78
BMAPK-1	Grande Proteína-quinase-1 ativada por mitógeno
CDK	Cinase dependente de ciclina
Co₂	Gás carbônico
CREB2	Cyclic AMP-response element binding protein 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
Drp1	Proteína relacionada a dinamina 1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido tetracético Etilenodiamino
eif2α	Fator de iniciação da tradução em eucariótico 2 subunidade α
ER	Retículo endoplasmático
ERKS	Quinase regulada por sinais extracelular
EUROSCAN	European Study on Chemoprevention with Vitamin A and N-acetylcystein
Exp	Experimental
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
GADD 153	Proteína homóloga - C/EBP

Glc	Glucose
Glcase	Glucosidase
GlcNac	N-acetilglucosamina
Glc-T	UDP-glucose:glucosiltransferase
GNT-III	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferase III
GNT-IV	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferase IV
GNT-V	<i>N</i> -acetilglucosaminiltransferase V
GRP78	Proteína-78 regulada por glucose
GRP94	Proteína-94 regulada por glucose
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSP70	Proteína de choque térmico 70
HCl	Ácido clorídrico
HMG	Grupo de proteínas com alta mobilidade
IRE1	Enzima dependente de inositol 1
JNKs	Quinase C-JUN-NH ₂ -terminal
KCl	Cloreto de potássio
L-PHA	Lectina Phaseolus Vulgaris
Ma	Melan-a – linhagem derivada de melanócitos murinos (imortalizada)
Man	Manose
MAPK	Proteína quinase dependente de mitógeno
MEK	Etil metal cetona
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NaHPO₄	Fosfato de sódio

Na₃VO₄	Ortovanadato de sódio
NBT	Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
pATF6(P)	Precursor do fator de ativação transcricional 6
PBS	Tampão de fosfato salino
PERK	Protein kinase-like ER kinase
PI	Iodeto de propídio
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PMA	Forbol miristato acetate
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
SP1	Protease do sítio 1
SP2	Protease do sítio 2
TBS	Solução salina Tris-fosfato
TEMED	Tetra-metil-etilenodiamina
Teor	Teórico
Thr	Treonina
TM1	Linhagem murina tumorigênica derivada de melan-a
TM5	Linhagem murina tumorigênica derivada de melan-a
UDP	Uridine diphosphate
UPR	Resposta a proteínas mal enoveladas
UV	Ultra Violeta
XBP1	X-box binding protein 1

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Célula tumoral e melanoma.....	1
1.2	Progressão tumoral do melanoma.....	3
1.3	Estresse oxidativo e <i>N</i> -Acetilcisteína.....	5
1.4	Glicosilação e controle de qualidade do enovelamento protéico no retículo.....	8
1.5	Glicosilação aberrante em células tumorais	12
1.6	Acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo	14
1.7	Controle de qualidade e UPR.....	18
1.8	UPR, controle de qualidade e apoptose	19
2	OBJETIVO	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos.....	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Cultivo de Células.....	24
3.2	Tratamentos	24
3.2.1	Tratamento com tunicamicina para análise por MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-YL)-2,5-Diphenyltetrazolium BROMIDE]	25
3.2.2	Tratamento com tunicamicina para contagem de células viáveis por exclusão de células marcadas com azul de Tripán	25
3.2.3	Tratamento com tunicamicina para extração protéica	25
3.2.4	Tratamento com cisplatina para contagem de número de células Viáveis	26
3.2.5	Tratamento com tunicamicina e cisplatina para contagem de número de células viáveis para analisar possível efeito aditivo das drogas	26
3.2.6	Tratamento com tunicamicina e cisplatina para analisar sensibilização a morte	27
3.2.7	Tratamento prolongado com NAC	27
3.3	Análise de proliferação e etapa do ciclo celular.....	28
3.4	Estabelecimento do perfil protéico.....	30

3.4.1	Extrato celular.....	30
3.4.2	Dosagem protéica	30
3.4.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	31
3.4.4	Transferência das Amostras para o PVDF	32
3.4.5	Imunodeteção	33
3.4.6	Coloração com coomassie blue.....	34
3.4.7	<i>Blotting</i> com Lectinas	34
3.5	Ensaio de MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-YL)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide	35
3.6	Análise Estatística	35
4	RESULTADOS	37
4.1	Tunicamicina é mais citotóxica e citostática para as linhagens tumorigênicas do que para melan-a	37
4.2	Tunicamicina induz estresse de retículo nas três linhagens.....	43
4.3	As três linhagens são sensíveis a cisplatina.....	45
4.4	Tunicamicina e cisplatina: efeito aditivo somente para melan-a.....	47
4.5	Efeito aditivo discreto de tunicamicina e cisplatina já pode ser observado em baixas concentrações de tunicamicina nas linhagens tumorigênicas.....	49
4.6	Tratamento com o Antioxidante <i>N</i> -Acetilcisteína Impediu a Proliferação Celular	51
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	62
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8	OBRA CONSULTADA	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULA TUMORAL E MELANOMA

Diversas evidências demonstram que a progressão tumoral é um processo com múltiplas etapas, sendo estas fases marcadas por um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que levam a transformação de célula normal à uma célula maligna. HANAHAN e WEINBERG (2000) propuseram seis características presentes em todas as células tumorais: auto-suficiência em sinais de proliferação, insensibilidade a sinais anti-proliferativos, evasão a morte celular programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual. Estas características permitem a formação de uma massa tumoral com capacidade metastática difícil de ser tratada clinicamente.

A resistência de células tumorais aos quimioterápicos antineoplásicos conhecidos destaca-se como um grande problema no tratamento do câncer. Esses além de eliminarem células tumorais, podem também selecionar algumas células cancerosas progressivamente mais agressivas (CAMARGO e COSTA 2003). Essas, não respondendo ao tratamento, proliferarão formando um tumor mais agressivo e tornando a cura da doença complexa. Esse cenário demonstra a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Entre os tumores mais refratários ao tratamento quimioterápico estão os melanomas.

O melanoma cutâneo é derivado das células pigmentares da pele, os melanócitos. Apesar da sua baixa incidência, a letalidade é elevada e sua incidência vem aumentando continuamente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou aproximadamente 132 mil casos novos no mundo, com uma sobrevida de 69% em cinco anos (Ministério da Saúde 2007). O Instituto Nacional de Câncer no Brasil (INCA) estimou para a população brasileira um total de 2960 casos novos entre homens e 2970 casos novos entre mulheres no ano de 2010. Esses valores correspondem a 3,04 casos em 100 mil homens e 2,92 casos em 100 mil mulheres (INCA 2009). As razões para o rápido crescimento da incidência da doença não são todas entendidas, mas especula-se que ocorram pela alta exposição aos raios ultravioletas (UV) e pela destruição da camada de ozônio (TUCKER e GOLDSTEIN 2003; MORTON et al. 2003).

Os tratamentos contra o melanoma são variados podendo compreender cirurgia, imunoterapia intralesional, quimioterapia regional ou sistêmica, bioterapia, radioterapia ou imunoterapia (THOMPSON et al. 2005). A escolha do tratamento depende do estágio em que o melanoma se encontra e da caracterização do mesmo. A descoberta da doença no início do seu processo, sem a ocorrência de metástase, pode ser totalmente resolvida cirurgicamente (MORTON et al. 2003).

A cisplatina está entre os quimioterápicos antineoplásicos mais utilizados; frequentemente, a sua utilização no tratamento ocorre em associação com outras drogas (ROSENBERG 1999). Entretanto, a eficiência da droga tem-se demonstrado ser reduzida. Neste contexto, estratégias que

sensibilizem células tumorais à morte induzida por cisplatina teriam um grande impacto fármaco-econômico.

A atuação da cisplatina está relacionada com a alta concentração de cloreto no plasma ($\sim 100\text{mM}$); e baixa, no meio intracelular ($\sim 4\text{mM}$). Sendo aplicada por via intravenosa; na corrente sanguínea, suas moléculas ligam-se às de cloreto; entretanto, esta ligação é substituída por moléculas de água no meio intracelular, originando moléculas carregadas positivamente e, portanto reativas. Esta carga positiva permite a ligação da cisplatina a sítios nucleofílicos intracelulares, formando adutos de RNA, de proteínas e principalmente de DNA (KARTALOU e ESSIGMANN 2001). A formação destes adutos pode desencadear na ativação de moléculas relacionadas ao processo apoptótico.

1.2 PROGRESSÃO TUMORAL DO MELANOMA

A progressão do melanoma metastático pode ser classificada em quatro fases: nevos comuns, nevos atípicos displásicos, melanoma de crescimento radial e melanoma de crescimento vertical (Quadro 1) (CLARK et al 1984; MELNIKOVA e BAR-ELI 2008). No entanto, estima-se que somente alguns dos casos de melanoma metastático apresentam todas as etapas na sua progressão.

Quadro 1 - Classificação da progressão tumoral do melanoma

	Origem	Características específicas
Nevos Comuns	A partir de melanócitos em proliferação	Tempo de vida finito
Nevos atípicos ou displásicos	A partir de nevos comuns ou como uma nova lesão	Formação de lesões assimétricas com bordas irregulares, com aumento progressivo de tamanho e cor.
Melanoma de crescimento radial	Pode originar-se como uma lesão nova ou a partir de uma pré-existente	Tendência do tumor em crescer horizontalmente na epiderme e superficialmente na camada da derme
Melanoma de crescimento vertical		A massa tumoral tem uma alta capacidade infiltrativa, constituindo uma massa tumoral expansiva. O tumor pode alcançar a camada da derme e atingir vasos linfáticos e sanguíneos; tendo assim a capacidade de estabelecer focos metastáticos. As células apresentam uma ausência de maturação.

Nosso grupo de pesquisa trabalha com um modelo de progressão tumoral constituído pela linhagem melanocítica murina melan-a e pelas linhagens tumorais TM1 e TM5. As linhagens tumorigênicas foram estabelecidas a partir de ciclos seqüenciais de bloqueio de ancoragem da linhagem celular não tumoral melan-a (OBA-SHINJO et al. 2006). Esse modelo permite a realização de estudos comparativos visando a determinação de características importantes que diferenciem as linhagens tumorigênicas da linhagem melanocítica.

Análise proteômica e transcricional do modelo de progressão tumoral, representados por melan-a e pelas linhagens tumorais TM1 e TM5,

demonstraram que as linhagens tumorigênicas apresentavam redução nas enzimas relacionadas à degradação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Adicionalmente, TM1 e TM5 tinham menor capacidade de degradar H_2O_2 adicionado exogenamente, quando comparados com melan-a; e menor glutationilação de suas proteínas (DE SOUZA et al. 2006). Todos esses dados corroboram com a idéia de que as linhagens tumorigênicas estão em um estado mais pró-oxidativo do que a linhagem melanocítica melan-a.

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E N-ACETILCISTEÍNA

O estresse oxidativo pode ser definido como uma situação dinâmica em que o fenótipo da célula pode ser influenciado pelo balanço entre componentes oxidantes e antioxidantes. Esse fenótipo pode ser alterado através do efeito em componentes celulares sensíveis ao estado oxidativo, especialmente grupos de proteínas funcionais sensíveis ao efeito redox. Entre as modificações pós traducionais que podem ocorrer, têm-se interações reversíveis de glutathione com cisteínas de proteínas celulares críticas (COTGREAVE e GERDES 1998). O ciclo redox da glutathione é importante também para a eliminação de H_2O_2 na célula. Glutathione reduzida (GSH) é oxidada para GSSG, eliminando H_2O_2 . Glutathione redutase regenera GSH a partir de GSSG, com $NADPH^+$ sendo o redutor (GILLISSEN e NOWAK 1998).

Diversos estudos vêm demonstrando a importância do estresse oxidativo na carcinogênese (KLAUNIG e KAMENDULIS 2004; VALKO et al.

2006). Espécies reativas de oxigênio podem produzir diretamente diversos danos ao DNA, como, por exemplo, quebras simples ou duplas de fitas de DNA; esses danos, se persistentes, podem resultar em parada ou indução de transcrição, indução de vias de transdução de sinal, erros de replicação. Esses eventos podem desencadear na carcinogênese (DE FLORA et al. 2001).

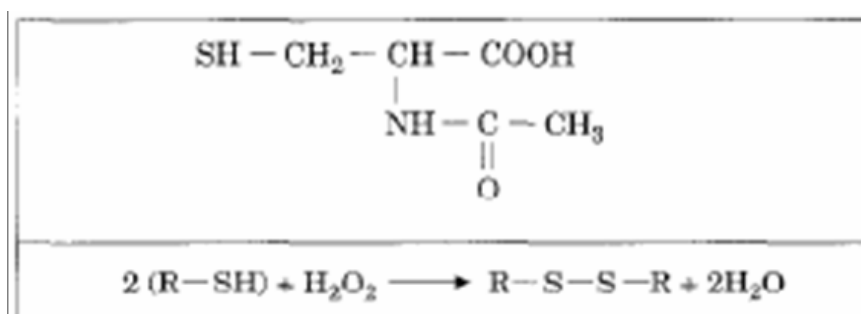
CAMPOS et al. (2007) demonstraram que o bloqueio de ancoragem de melan-a induz estresse oxidativo e nitrosativo nas células não aderidas; demonstrados pelo aumento do anion superóxido e do óxido nítrico nas células em suspensão. Os autores também observaram que, após 24 horas, há um aumento significativo de GSH, uma diminuição do precursor de glutathiona homocisteína e um aumento de malondialdeído (um dos principais produtos da peroxidação lipídica) demonstrando uma resposta antioxidante. Estes dados sustentam a hipótese de que o estresse oxidativo é fundamental para a transformação maligna de melan-a submetida a bloqueio de ancoragem. Nesta dissertação, pretende-se avaliar a importância do estresse oxidativo para as células já pré-estabelecidas.

A molécula *N*-acetilcisteína (NAC) deriva-se da *N*-acetilação do aminoácido *L*-cisteína. O efeito antioxidante de NAC ocorre através da interação do seu grupo SH com grupos oxidantes, como H_2O_2 (Figura 1). Nessa reação, duas moléculas de NAC são oxidadas e forma-se ponte dissulfeto entre elas. Além disso, alguns dados evidenciam que, além de eliminar oxidantes, NAC promove a produção intracelular de glutathiona (GILLISSEN e NOWAK 1998).

CAMPOS et al. (2007) demonstraram que, ao submeter a linhagem melanocítica melan-a a bloqueio de ancoragem em diferentes horas até 24 horas na presença de NAC, há inibição na produção do anion superóxido nas células não aderidas.

NAC, com sua capacidade de seqüestrar espécies reativas de oxigênio, tem mostrado importância na prevenção do câncer, atuando, por exemplo, na correção da hipometilação do DNA, inibição de carcinogênese química, na proteção contra efeitos citotóxicos, restabelecimento dos estoques de GSH da célula (DE FLORA et al. 2001). Legitimando o efeito da carcinogênese por NAC, RELIENE e SCHIESTL demonstraram que o tratamento com NAC suprime o aparecimento de linfoma e aumenta a longevidade em camundongos deficientes no gene *Atm* (esses altamente sucessíveis a linfomas).

Neste contexto, faz-se necessário a avaliação da importância do ambiente pró-oxidativo para as linhagens tumorigênicas TM1 e TM5 quando comparadas com melan-a.



Fonte: Adaptado de GILLISSEN e NOWAK (1998)

Figura 1 - A molécula N-acetil cisteína e seu processo oxidativo. A molécula N-acetilcisteína possui o grupo SH. Duas moléculas de NAC podem ser oxidadas por oxidantes levando à formação da ponte dissulfeto entre elas.

1.4 GLICOSILAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO ENOVELAMENTO PROTÉICO NO RETÍCULO

A membrana plasmática, com a sua bicamada lipídica e proteínas integrais ou periféricas, expõe diversas moléculas com funções variadas: os glicoconjugados. Elas são formadas por carboidratos ligados a proteínas ou a lipídios, formando as glicoproteínas ou glicolipídios. Os carboidratos possuem uma maior variação em suas ligações quando comparados com aminoácidos e nucleotídeos, com isto há uma maior diversidade estrutural dos glicoconjugados (VARKI e SHARON 2009).

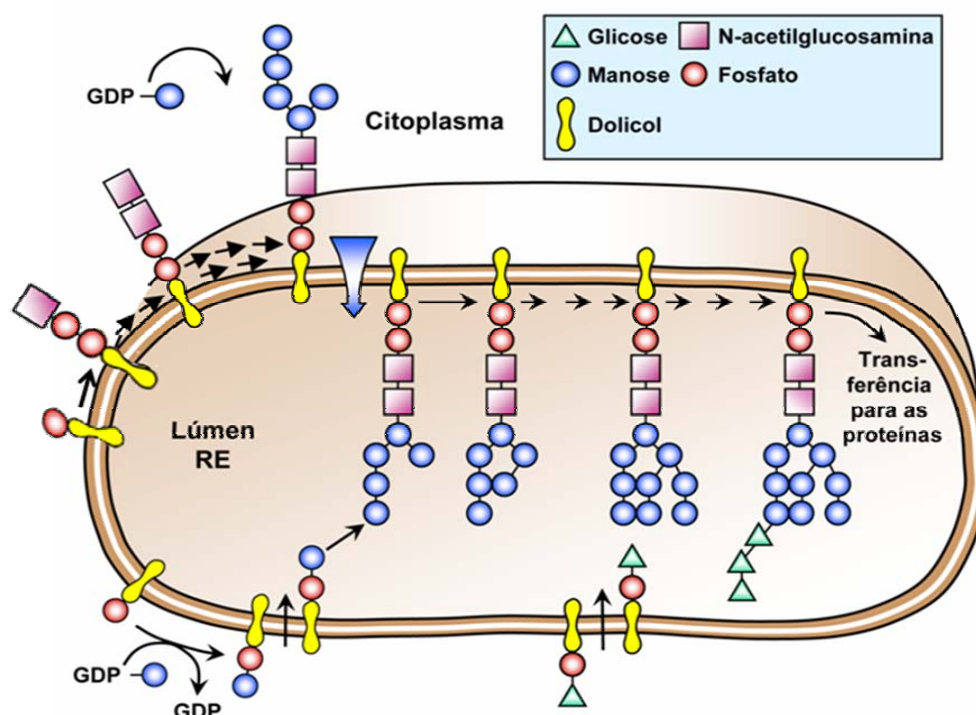
Diferentemente das proteínas, a diversidade estrutural dos oligossacarídeos não é codificada diretamente do genoma. Ela é determinada por um número variável de glucosiltransferase e glucosidases, pela disponibilidade de monossacarídeos doadores; e pela subcompartimentalização de cada um destes componentes.

As enzimas que atuam na síntese e processamento dos oligossacarídeos determinam estruturalmente o padrão de glicosilação; fazendo com que ocorram classes comuns de oligossacarídeos entre os seres vivos. Em células eucarióticas, estas classes são definidas de acordo com a natureza da ligação ao aglicano, podendo ser *N*-glicanos e *O*-glicanos. A *N*-glicosilação envolve a ligação covalente de um oligossacarídeo a asparagina da sequência Asn-X-Thr/Ser, sendo X qualquer aminoácido exceto prolina e asparagina. Já na *O*-glicosilação, a

ligação ocorre entre o monossacarídeo *N*-acetilgalactosamina e o grupo hidroxila secundário da serina ou treonina (STANLEY et al. 2009).

Em o-glicanos, após a ligação da *N*-acetilgalactosamina em treonina ou serina, a formação posterior dos oligossacarídeos envolve diversas enzimas presentes no complexo de Golgi. Essas enzimas se distribuem em grupos nos diferentes compartimentos: as que atuam no início da formação do oligossacarídeo estão no cis-golgi; as que atuam em fase intermediária, no golgi medial; e as que finalizam o processo de formação dos O-glicanos, no trans golgi.

A *N*-glicosilação protéica inicia-se no retículo endoplasmático (ER) com a síntese do oligossacarídeo precursor, composto por 14 carboidratos, ligado ao dolicol. A formação deste complexo ocorre em múltiplas etapas. Primeiramente, no lado citosólico do ER, ligam-se ao dolicol duas *N*-acetilglucosaminas seguidas por cinco moléculas de manose. Segue-se um processo de *flip* do precursor, que muda sua orientação para o lúmen. Seqüencialmente, quatro moléculas de manose são adicionadas e mais três moléculas de glicose. A oligossacaril transferase transfere o oligossacarídeo sintetizado ligado ao dolicol para uma proteína recém sintetizada no receptor Asn-X-Thr/Ser (JONES et al. 2005) (Figura 2).



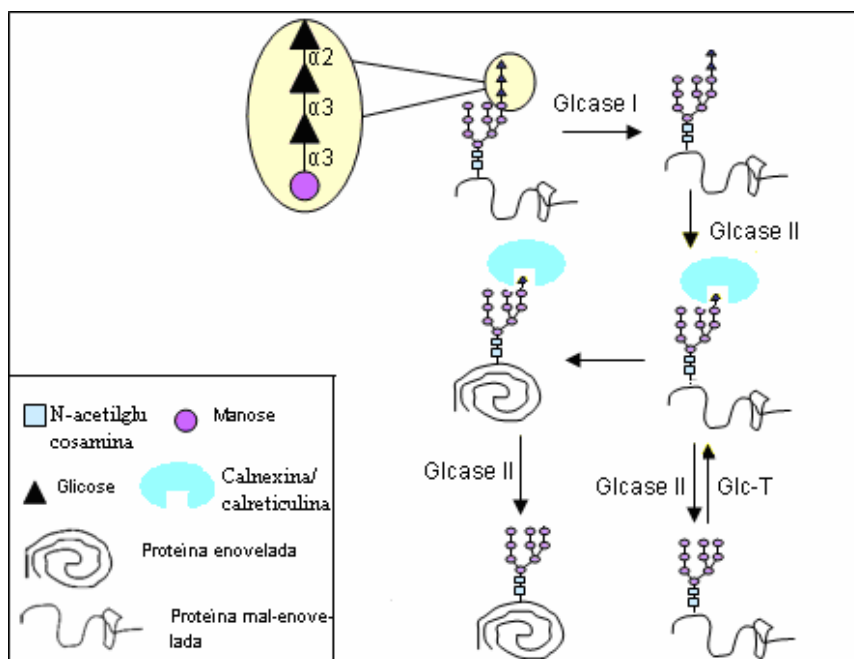
Fonte: Adaptado de PARODI 2002

Figura 2 - Formação do N-oligossacarídeo precursor. Inicialmente, voltado para o lado citosólico, ligam-se duas N-acetilglucosaminas ao monofosfato dolicol, seguido por cinco moléculas de manose. Em seguida, há um processo de *flip* para o lúmen do retículo, e em sequência, adiciona-se ao oligossacarídeo quatro moléculas de manose e três moléculas de glicose. Finalmente, este oligossacarídeo é transferido para proteínas que estão sendo cotraduzidas.

Já associados à proteína, os N-glicanos sofrem a ação das glucosidases I e II que atuam no oligossacarídeo retirando as três moléculas de glicose, sendo que a glucosidase I quebra somente a ligação simples $\alpha 1-2$ da glicose terminal. A perda das duas primeiras moléculas de glicose ocorre rapidamente, enquanto a terceira molécula, antes de ser retirada, entra no controle de qualidade do enovelamento protéico no ER (GROENENDYK e MICHALAK 2005; OTSU e SITIA 2007).

O controle de qualidade é formado principalmente por duas chaperonas (calnexina e calreticulina) e a enzima UDP-glucose: glucosiltransferase (Glc-T). O ciclo inicia-se com o reconhecimento por calnexina ou calreticulina da ligação de glicose α 1-3 do Glc₁-Man₈GlcNac₂-Asn em equilíbrio dinâmico. Se a proteína sofre a ação da glucosidade II prematuramente, ou seja, antes de completar seu enovelamento, entra em ação a Glc-T que fornece uma molécula de glucose permitindo novo reconhecimento por calnexina e calreticulina (MA e HENDERSHORT 2004a) (Figura 3). Após a passagem pelo controle de qualidade, o oligossacarídeo N-ligado continua a ser processado por diversas enzimas presentes no ER e, posteriormente, no Golgi. O processamento pode ser influenciado pela conformação protéica, que pode alterar a disponibilidade do substrato as enzimas (VARKI e SHARON 2009).

A função dos oligossacarídeos é geralmente variada, podendo estar relacionada com o auxílio na conformação e estabilização protéica; com o fornecimento de alvos para microorganismos, toxinas e anticorpos; em “mascarar” determinados compostos; no controle da meia vida das células e das proteínas; na modulação da função das proteínas; no fornecimento de ligantes para eventos de ligações específicas envolvendo alvos protéicos, interações matriz-célula ou célula-célula (VARKI 1993). Estes fatores podem estar envolvidos em processos como a fertilização, imunidade, replicação viral, interação parasita-hospedeiro, crescimento celular, adesão celular, fibrinólise, e inflamação (DWEK 1996)



Fonte: Adaptado de STANLEY et al. (2009)

Figura 3 - Controle de qualidade do enovelamento protéico no retículo endoplasmático. A retirada das moléculas de glicose pelas glucosidases (Glcase) I e II permite o reconhecimento da N-glicosilação pela calnexina e/ou calreticulina, assegurando assim o completo enovelamento protéico. A ação da glucosidase II previamente clivando a ligação α 1-3 antes do enovelamento completo da proteína desencadeia a atuação da UDP-glucose:glucosiltransferase (Glc-T) que fornece uma nova molécula de glicose e permite o reconhecimento novamente das chaperonas.

1.5 GLICOSILAÇÃO ABERRANTE EM CÉLULAS TUMORAIS

As glicoproteínas de células tumorais apresentam modificações estruturais em seus glicanos, que têm sido associadas com os processos de metástase, invasão e progressão tumoral. Esses glicanos são denominados aberrantes. A relação entre a resistência de células tumorais a quimioterápicos e a glicosilação aberrante ainda é pouco compreendida, relata-se que pode estar relacionada às alterações na expressão de diversas

enzimas da síntese e processamento da glicosilação (KOBATA e AMANO 2005).

A *N*-glicosilação aberrante mais estudada é a adição de cadeias β 1-6-GlcNAc a *N*-glicanos, processo catalisado pela *N*-acetilglucosaminiltransferase V (GnT-V) (IHARA et al. 2004; ZHAO et al. 2006; KUDO et al. 2007; WANG et al. 2007; VARKI et al. 2009). Esta modificação estrutural está associada com uma ligação mais fraca da célula maligna a matriz extracelular, com o aumento da migração e invasão celular e conseqüentemente com a metástase dos tumores (GUO et al. 2000). Além da GnT-V, duas *N*-acetilglucosaminiltransferases têm apresentado expressão diferencial em tumores: GnT-III e GnT-IV. A GnT-III tem sido associada com supressão tumoral, sendo considerada um antagonista de GnT-V, pois as duas enzimas competem entre si pelo mesmo alvo, como por exemplo a integrina α 3 β 1 (ZHAO et al. 2006). Há dois tipo de GnT-IV: GnT-IVa e GnT-IVb. Essas são codificadas por genes localizados em dois cromossomos diferentes. Estudos vêm demonstrando que há um aumento de expressão de GnT-IVb e uma diminuição de GnT-IVa em células tumorais (KOBATA e AMANO 2005; IDE et al. 2006).

Um estudo do nosso grupo demonstrou que as linhagens tumorigênicas TM1 e TM5 apresentavam um aumento de tri- e tetra-cadeias de *N*-glicanos, achado altamente sugestivo de aumento da atividade de GnT-V (OBA-SHINJO et al. 2006). Esse fato ilustra a associação de glicosilação aberrante à transformação maligna no nosso modelo de progressão tumoral.

1.6 ACÚMULO DE PROTEÍNAS MAL ENOVELADAS NO RETÍCULO

Tratamentos interferentes na *N*-glicosilação podem desencadear acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo, gerando assim um estresse nesta organela denominado resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) (LIN et al. 2008). Essa resposta consiste em uma cascata de sinalização que inicialmente provoca aumento na capacidade de enovelamento protéico, redução seletiva de tradução no retículo e aumento da degradação de proteínas mal enoveladas. Assim, primeiramente há um processo citoprotetor. O estímulo prolongado da UPR em condições de estresse pode resultar em apoptose (BERNALES et al. 2006).

O balanço entre os efeitos citoprotetores e citotóxicos de UPR para os tumores ainda é indeterminado. Sabe-se que parte dessa cascata de sinalização super regula as chaperonas do retículo endoplasmático, sendo esse um efeito protetor durante o desenvolvimento do tumor. A ativação da UPR *in vitro* altera a sensibilidade de células tumorais a agentes quimioterápicos (MA e HENDERSHORT 2004b).

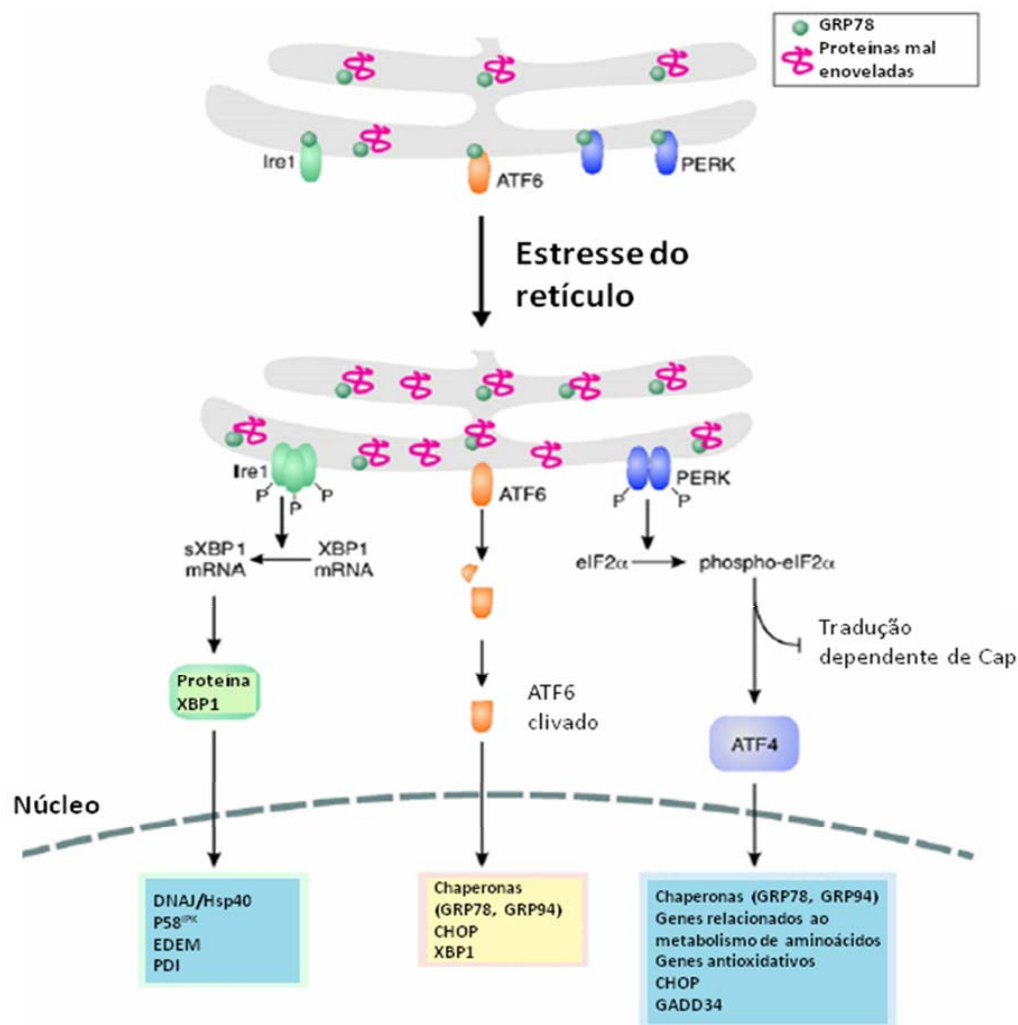
A UPR tem como principal molécula sensora a proteína-78 regulada por glucose (GRP78) ou BiP, que é uma chaperona da família HSP70. As proteínas enoveladas incorretamente ou cujas subunidades não estão totalmente agregadas expõem seqüências de aminoácidos normalmente não expostas, reconhecidas por BiP. O reconhecimento auxilia no deslocamento de polipeptídios recém sintetizados pela membrana do retículo

endoplasmático e no enovelamento e maturação das proteínas (CHEVALIER et al. 2000). Em condições fisiológicas normais, BiP encontra-se também ligado ao domínio luminal de IRE1, fator de ativação transcricional 6 (ATF6) e PERK (do inglês protein kinase-like ER kinase). Entretanto, com o acúmulo de proteínas mal enoveladas no retículo, BiP ligar-se-á preferencialmente a essas proteínas mal enoveladas, desencadeando liberação de BiP e provocando a dimerização de IRE α/β e sua fosforilação em trans; o deslocamento de ATF6 do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi; e a ativação de PERK (BERNALES et al. 2006) (Figura 4).

A dimerização de IRE α/β ativa o seu domínio citosólico RNase que cliva uma sequência de nucleotídeos do intron do mRNA do *x-box DNA binding protein* (XBP1). Esse, uma vez ativado, migra para o núcleo e induz genes envolvidos na UPR, como *p58^{1pk}*, *ERdj4*, *HEDJ* e *EDEM* (LEE et al. 2003). Adicionalmente JNK é ativado e pode estar envolvido em apoptose, proliferação inflamatória; podendo ainda contribuir para a transformação e resistência a apoptose, como observado em modelos *in vitro* e em tumores primários (MA e HENDERSHORT 2004b).

O deslocamento de ATF6 do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi; expõe-no à clivagem por SP2 e SP1, ativando o fator de transcrição citosólico pATF6(P). Esse, por sua vez, ativa genes envolvidos na transcrição das chaperonas residentes no retículo e enzimas que auxiliam no dobramento protéico e transativa o promotor de XBP1 (MA e HENDERSHORT 2004b; NADANAKA et al. 2007).

A ativação de PERK provoca a fosforilação da subunidade α de eIF2 α (KONDRATYEV et al. 2007), acarretando em bloqueio do transporte do iniciador de met-tRNA para a subunidade ribossomal 40S; na perda de expressão de ciclina D, ocasionando um aumento no tempo em G1; além de síntese de ATF4. Esse, por sua vez, ativa genes envolvidos no transporte e metabolismo de aminoácidos, redução de reações oxidativas, apoptose induzida por estresse prolongado; síntese de CREB-2; e finalmente ativação de NF- κ B, esse regula positivamente moléculas do sistema imune e fatores de sobrevivência (MA e HENDERSHORT 2004b).



Fonte: Adaptado de HEALY et al. (2009)

Figura 4 - Cascatas de sinalização iniciadas pelas três vias de UPR. Em condições fisiológicas normais, GRP78 encontra-se ligado a IRE1, ATF6 e PERK. Com o acúmulo de proteínas mal enoveladas, GRP78 ligar-se-á preferencialmente às proteínas mal enoveladas; liberando IRE1, ATF6 e PERK, e consequentemente ativando estas três macromoléculas. A liberação de ATF6 permite o seu deslocamento para o Golgi e posterior clivagem, este então induzirá no núcleo a expressão de genes relacionados à UPR, como XBP1, chaperonas e CHOP. O desprendimento de PERK permite que este se dimerize e ocorra sua autofosforilação; podendo assim fosforilar eIF2α, inativando-a, e consequentemente inibindo a tradução dependente de cap, mas possibilitando a tradução de transcritos que apresentam sítio interno de entrada no ribossomo (IRES). A dissociação de IRE1, permite a sua oligomerização e autofosforilação, este ativo cliva o mRNA de XBP1, ativando-o e permitindo a atuação na indução de genes relacionados com estresse, nos processos de enovelamento e degradação protéicos.

1.7 CONTROLE DE QUALIDADE E UPR

A inter-relação de UPR e o controle de qualidade do retículo têm sido esclarecidos; sendo demonstradas as conseqüências, as causas e as funções em que ambos estão envolvidos. Sabe-se que a estabilização protéica, por exemplo, envolve as chaperonas de ambos, permitindo a retenção das proteínas no retículo, aumentando a meia vida das mesmas e não as destinando diretamente a via ubiquitina-proteossoma (DE VIRGILIO et al. 1999; HEBERT e MOLINARI 2007).

Como citado anteriormente, tratamentos interferentes na *N*-glicosilação induzem a ativação de UPR. Por exemplo, a 1-deoximanojirimicina, inibidora da manosidase α 1, 2, induz UPR em células 771 de hepatocarcinoma (LU et al. 2006); ou ainda a tunicamicina, inibidora da UDP-GlcNAc:dolichol-PGlcNAC-1-P, é uma potente indutora da UPR (LECCA et al. 2005). A análise genômica de fibroblastos de pacientes que apresentavam distúrbios de glicosilação tipo I demonstrou haver aumento moderado de transcritos de moléculas envolvidas na UPR, como ATF6, XBPI, GRP94; aumento moderado da calreticulina tanto em transcritos como em proteínas; e acúmulo protéico de calnexina (SHANG et al 2002).

A castanospermina, inibidora das glucosidases I e II, impede a entrada das proteínas recém-sintetizadas no controle de qualidade do enovelamento protéico. Esta tem demonstrado ser também uma indutora de UPR; a mesma desencadeia um aumento de GRP78 e de oligossacarídeos

ligados a lipídios (Precusores da *N*-glicosilação), ativando assim a UPR em fibroblastos dérmicos (BRECKENRIDGE et al. 2003).

1.8 UPR, CONTROLE DE QUALIDADE E APOPTOSE

Apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre através de uma cascata de sinalização de maneira geneticamente controlada e organizada. O estresse prolongado no retículo pode desencadear apoptose por uma via dependente da mitocôndria e outra independente.

A via independente inicia-se com a caspase-12, mas a indução desta via por UPR é relativamente pouco eficiente. Caspase 12 encontra-se na membrana do retículo e sua clivagem e ativação pela protease m-calpaina (protease cálcio-dependente) faz com que a mesma clive a caspase 9 e em cadeia, a caspase 3 (GROENENDYK e MICHALAK 2005).

Há duas possibilidades de vias dependentes da mitocôndria, uma inicia-se com a ativação da caspase 8 que cliva o receptor de célula B associado a proteína (Bap31) retendo a porção p20 n-terminal no retículo. Essa interage com drp1 na mitocôndria através de um mecanismo de ação envolvendo liberação de cálcio do retículo e simultâneo resgate na mitocôndria (WANG et al. 1996).

A outra via envolve o gene induzido por dano no DNA ou por parada celular, *GADD153*. O produto desse gene apresenta-se em concentrações baixas no citoplasma, mas em condições de estresse ele é induzido e acumulado no núcleo. A ativação de *GADD153* está relacionada com as três

cascatas de sinalização ativadas por UPR, sendo a via induzida por PERK a principal ativadora de *GADD153*, através de ATF4. As cascatas induzidas por ATF6 e IRE 1 ativam através da ação das mesmas em XBP1 (OYADOMARI e MORI 2004; PYRKO et al. 2007).

A ação apoptótica de *GADD153* envolve uma diminuição protéica de Bcl-2 (Linfoma de célula B 2); fator que contribui para a liberação de citocromo c da mitocôndria (ZUPPINI et al. 2002; MA e HENDERSHORT 2004b).

Células deficientes em calnexina são resistentes a apoptose induzida por UPR, não apresentando uma mudança na liberação de citocromo c e na clivagem da caspase 3 e 8. Isto se deve, possivelmente, ao fato de Bap31 formar um complexo com a calnexina, e a instabilidade deste complexo impedir a ativação da via apoptótica (ZUPPINI et al. 2002).

Outro fator importante na análise de fatores apoptóticos em uma célula é a concentração de cálcio no retículo e no citosol. O retículo endoplasmático funciona também como um lugar de estocagem de cálcio, e quando esse é liberado para o citosol, há ativação da via apoptótica dependente da mitocôndria, modulando a transcrição gênica e nucleases relacionadas com vias apoptóticas. As chaperonas presentes no retículo, como a calreticulina, participam da estocagem de cálcio. Isso foi verificado em células de HeLa superexpressando calreticulina submetidas a tratamento com taspigargina e estaurosporina, que apresentaram aumento da sensibilidade às drogas. Adicionalmente, células deficientes em calreticulina

apresentaram diminuição da atividade de caspase 3, e conseqüentemente, da sensibilidade para apoptose (NAKAMURA et al. 2000).

Análise proteômica da linhagem de melanoma humano LB373 tratadas com cisplatina, demonstrou haver ativação de fatores envolvidos com UPR, como GRP78 e GRP94, possivelmente devido ao caráter citoprotetor. Adicionalmente, observou-se diminuição da calreticulina, provavelmente implicada na redução da estocagem de cálcio no retículo e conseqüentemente proteção das células contra apoptose (Tabela 1) (GODOY 2004). MANDIC et al. (2003) também observaram aumento de GPR78 em células de melanoma da linhagem 224 tratadas com cisplatina.

DE SOUZA et al. (2006) demonstraram que as linhagens tumorigênicas TM1 e TM5 apresentam uma diminuição da expressão de ATF4 e um aumento da expressão gênica de calnexina quando comparadas com melan-a (Tabela 2). A diminuição de ATF4 pode estar relacionada a um possível mecanismo de evitar apoptose, enquanto a diminuição de calnexina associa-se a um aumento da vida média das proteínas no retículo endoplasmático.

A maioria dos melanomas é resistente a apoptose induzida por estresse do retículo. Diversos mecanismos têm sido avaliados para aumentar a sensibilidade, como a utilização da proteína reguladora de atividade citoesqueleto associada (ARC) e a inibição de MEK (JIANG et al. 2007; CHEN et al. 2008). Entretanto, há um grande interesse no desenvolvimento de novas alternativas que aumentem a sensibilidade do melanoma à apoptose por estresse no retículo.

Tabela 1 - Análise proteômica do precursor da proteína 78 Kda regulada por glicose e do precursor da calreticulina na linhagem de melanoma humano LB373 tratadas com cisplatina por 8, 16 e 24 horas de tratamentos. spot(proteína), variação (razão entre a média do volume normalizado do “spot” no grupo tratado pela média do volume normalizado do “spot” correspondente ao grupo controle), p/(ponto isoelétrico), Mw(massa molecular), teor(valor teórico), exp(valor experimental)

Identificação	Spot	Variação			p/		Mw	
		8h	16h	24h	Exp	Teor	Exp	Teor
Precursor da proteína	39	2,00	1,40	4,60	5,26	5,10	66,75	72,33
78KDa regulada por	156	0,40	1,40	4,00	4,84	5,10	52,46	72,33
Glucose (GRP78)	317	2,00	2,40	5,80	6,52	5,10	35,9	72,33
	361	0,60	0,90	2,00	5,13	5,10	33,77	72,33
	T18	*	*	*	5,27	5,10	71,88	72,33
Precursor da	120	0,90	1,40	0,30	4,22	4,30	55,93	48,14
Calreticulina	479	0,40	0,40	0,80	6,16	4,30	18,84	48,14

Fonte: GODOY (2004)

Tabela 2 - Análise transcricional de calnexina e do fator de ativação transcricional 4 nas linhagens celulares TM1 e TM5.

Nome	Linhagem	Regulação	Diferença de	
			expressão	TAG
Calnexina	TM1	<i>Upregulated</i>	2,29	TAACAGTTGT
	TM5	<i>Upregulated</i>	4,97	TAACAGTTGT
ATF-4				
(Fator de ativação transcricional 4)	TM1	<i>Downregulated</i>	3,72	TGTAAAGGAG
	TM5	<i>Downregulated</i>	2,25	TGTAAAGGAG

Fonte: DE SOUZA et al. (2006)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a relação de *N*-glicosilação co-traducional com a quimioresistência de tumores, associando tal relação à indução de estresse no retículo e ao processo apoptótico. Adicionalmente, avaliar a importância do estado pró-oxidativo para a sobrevivência das células.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Avaliar se há resposta diferencial de melan-a e as linhagens tumorigênicas TM1 e TM5 ao tratamento com tunicamicina, analisando o efeito do tratamento no acúmulo de *N*-glicanos aberrantes, na ativação de UPR e na sensibilização à morte induzida pela droga;
 - 2 Avaliar se a perturbação da resposta adaptativa à UPR por tunicamicina sensibiliza as células à morte induzida por cisplatina e se há um efeito aditivo no tratamento simultâneo das duas drogas;
 - 3 Determinar se a perturbação do estado pró-oxidativo da célula induzida por N-acetilcisteína perturba a proliferação celular.
-

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTIVO DE CÉLULAS

Neste trabalho, foram utilizadas células das linhagens melan-a (BENNET 1987), TM1 e TM5. Estas foram mantidas em estufa à temperatura de 37°C contendo 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 da Sigma-Aldrich, pH 6,9, com 5% de soro fetal bovino (SFB) da cultilab e 200nM de forbol miristato acetato (PMA) da Sigma Aldrich, na ausência de antibióticos. Para o subcultivo, as células foram repicadas previamente com tripsina-EDTA 1x (GIBCO® Invitrogen Cell Culture). Essas condições foram mantidas durante TODOS os tratamentos com a diferença da adição das drogas no meio. Neste trabalho, utilizaram-se três drogas: tunicamicina da Sigma Aldrich, cisplatina (cis-diammineplatinum(II) dicloride) da Sigma Aldrich e N-acetilcisteína.

3.2 TRATAMENTOS

A N-acetilcisteína e a cisplatina foram dissolvidas em PBS pH 7.4 ; a Tunicamicina, em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril da Sigma Aldrich. Após a dissolução de cisplatina e N-acetilcisteína, filtraram-se as soluções em filtro de 0,2um para esterilização das drogas. Aos controles, adicionavam-se os seus veículos esterilizados.

3.2.1 Tratamento com Tunicamicina para análise por MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-YL)-2,5-Diphenyltetrazolium BROMIDE]

Plaquearam-se 10^4 células por poço de placas de noventa e seis poços. Assim, cada linhagem foi submetida a tratamento com tunicamicina nas seguintes concentrações: 0µg/mL; 0,0625µg/mL; 0,125µg/mL; 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1µg/mL; 2,5µg/mL; 5µg/mL. Os tempos de tratamentos foram: 24 e 48 horas. Posteriormente procedeu-se o ensaio de MTT. O experimento foi realizado três vezes.

3.2.2 Tratamento com Tunicamicina para contagem de células viáveis por exclusão de Células marcadas com Azul de Tripan

Plaquearam-se 10^5 células por poço de placas de seis poços. Assim, para cada linhagem, submeteram-se por 48 horas as seguintes condições: somente DMSO, tunicamicina 0,2µg/mL e tunicamicina 1µg/mL. O experimento foi realizado em triplicata para cada condição. Posteriormente, contou-se o número de células por Azul de Tripan; e, procedeu-se análise de etapa do ciclo celular. O experimento foi repetido três vezes.

3.2.3 Tratamento com Tunicamicina para Extração Protéica

Em garrafa média, foram plaqueadas $1,6 \cdot 10^6$ células e as condições do tratamento 3.2.2 foram repetidas; no entanto o tratamento foi apenas por 24 horas. Após este tempo, realizou-se a extração protéica.

3.2.4 Tratamento com Cisplatina para Contagem de Número de Células Viáveis

Plaquearam-se 2.10^5 células por poço de placas de seis poços. Submeteram-se as células a tratamento com cisplatina nas concentrações finais de: 0; 12,5 μ M e 25 μ M, por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata para cada condição. Após o tratamento contou-se o número de células viáveis por exclusão de células marcadas com Azul de Tripan. O experimento foi repetido três vezes.

3.2.5 Tratamento com Tunicamicina e Cisplatina para Contagem de número de Células Viáveis para analisar possível efeito aditivo das Drogas

Plaquearam-se 2.10^5 células por poço de placas de seis poços. Assim, primeiramente por 24 horas submeteram-se as células às seguintes concentrações de tunicamicina: 0; 0,2 μ g/mL e 1 μ g/mL. Posteriormente, adicionou-se cisplatina ou DMSO em cada poço de modo que a concentração final nos poços fossem 0; 12,5 μ M e 25 μ M, e submeteu-se o tratamento por mais 24 horas, ainda na presença de tunicamicina. O experimento foi realizado em triplicata para cada condição. Após o tratamento, contou-se o número de células viáveis por exclusão de células marcadas com azul de Tripan. O experimento foi repetido três vezes.

3.2.6 Tratamento com Tunicamicina e Cisplatina para analisar sensibilização a morte

Foram plaqueadas 10^4 células por poço em placas de noventa e seis poços. Estas foram submetidas primeiramente a oito condições de tunicamicina por 24 horas: 0; 0,0625µg/mL; 0,125µg/mL; 0,25µg/mL; 0,5µg/mL; 1 µg/ mL; 2,5µg/mL; 5µg/mL. Após o tratamento, trocou-se o meio, retirando a tunicamicina e submetendo as células à terapêutica com cisplatina por mais 24 horas nas concentrações finais de: 0 e 25µM. E finalmente, analisou-se a viabilidade por ensaio de MTT. O experimento foi repetido três vezes.

3.2.7 Tratamento Prolongado com NAC

Melan-a, TM1 e TM5 foram plaqueadas cada uma na quantidade de 5.10^4 células por poço em quatro placas de seis poços. Assim, para cada linhagem submeteu-se em condições de tratamento 5mM de NAC e outras sem tratamento. O experimento foi realizado em triplicata. Mantendo-se as condições de ausência e presença da droga, trocou-se o meio de cada condição primeiramente após 48 horas e depois a cada 24 horas. Assim retirou-se uma placa para contagem de cada linhagem após 48, 72, 96, 120 horas; e contou-se o número de células por exclusão de células marcadas com Azul de Tripán. O experimento foi repetido três vezes.

3.3 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO E ETAPA DO CICLO CELULAR

A análise em relação à taxa de proliferação celular foi realizada pela contagem de células viáveis em Câmara de Neubauer com a utilização da solução de Azul de Tripán 0,2%, corante de células em morte celular. A solução de Azul de Tripán (0,2%) foi preparada diluindo 10 mL de Azul de Tripán 0,4% da Sigma em 10mL de PBS e adicionou-se azida sódica da Merck (Concentração final: 3,85mM) a solução.

A etapa do ciclo celular foi analisada por citometria (citômetro FACScalibur Becton Dickson). Esse parâmetro foi determinado de acordo com a incorporação de iodeto de propídio (PI), composto fluorescente que tem sua intensidade aumentada em pelo menos cem vezes quando incorporado ao RNA dupla fita ou DNA. Sendo assim sua intensidade difere de acordo com a quantidade de DNA. A etapa do ciclo celular foi determinada de acordo com os picos representados na figura 5, correspondendo M1 a G1/G0 e M2 a S/G2/M.

O preparo das amostras para contagem por exclusão de células marcadas com tripan blue ocorreu da seguinte maneira: após a finalização de cada tratamento retirou-se o meio de cada condição amostral, lavou-se duas vezes com PBS, jogou-se um volume determinado de 0,25% tripsina-EDTA 1x até o descolamento das células, e neutralizou-se com o dobro de volume com meio RPMI 1640 com 5% SFB, transferindo tudo para um eppendorf. De cada amostra, retirou-se uma alíquota para contagem.

Misturaram-se dez microlitros da amostra com dez de solução de tripan blue 0,2%.

Para o experimento 3.2.2, após contagem, centrifugou-se as amostras a 2800 rpm por 5 minutos e ressuspendeu-se em etanol 70%, estocando-nas a -20°C por no máximo 20 dias para posterior análise de ciclo celular. Ao retirarem as amostras do -20°C, centrifugaram-nas a 2800rpm por 5min, descartando-se o etanol e ressuspendendo o pellet em PBS. Em seguida, centrifugou-se novamente a 2800rpm por 5min, eliminou-se os sobrenadantes, ressuspendendo-os em 200 µl de solução de PI (20 ml PBS, 20µl Triton (0,1%), 200µg/ml RNase, 20µg/ml PI) e, finalmente, transferiu-se as amostras para os tubos de FACS. Manteve-se as amostras a temperatura ambiente por 30 minutos antes das células serem analisadas no citômetro.

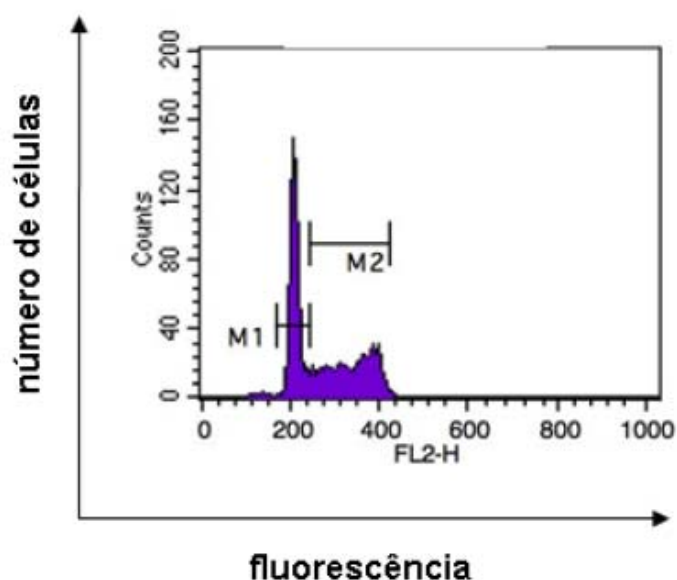


Figura 5 - Histograma para determinação de etapa do ciclo celular. Histograma de representação dos picos relativos a etapa do ciclo celular, sendo que M1 corresponde a G1/G0 e M2, a S/G2/M.

3.4 ESTABELECIMENTO DO PERFIL PROTÉICO

3.4.1 Extrato Celular

As células foram lavadas duas vezes com solução PBS e posteriormente desprendidas da garrafa com tripsina, centrifugadas a 2000rpm/3min, descartando-se o sobrenadante. Adicionou-se ao pellet o tampão de lise celular (50mM TRIS, 150mM NaCl, 5mM EDTA pH 8, 0,1%TRITON, 1mM Na₃VO₄, 2µg/ml aprotinina (1:1000), 1 mM PMSF (1:100), água miliQ), ressuspensando o pellet e incubando a 4°C por 15 minutos. Posteriormente, centrifugou-se a 13000rpm/15min, transferindo o sobrenadante para outro tubo. A extração de proteínas nucleares foi realizada com o mesmo procedimento, porém utilizando-se o tampão de lise da fração nuclear (20 mM Hepes, 630mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH 8, 25% de glicerol, 1 mM Na₃VO₄, 2µg/ml aprotinina (1:1000), 1 mM PMSF (1:100), água miliQ). No final, as duas frações foram juntadas, constituindo uma fração total.

3.4.2 Dosagem Protéica

As frações foram dosadas utilizando-se o kit de ensaio protéico do ácido bicíntrico (BCA) da Bio-rad. Esta técnica consiste na adição de um corante ácido bicíntrico à solução protéica, e a subsequente leitura no leitor de Elisa. A coloração do corante varia de acordo com a concentração protéica, tendo sido determinada pela comparação com a curva padrão. O kit inclui 250mL do reagente A, 2000mL do reagente B. A solução a ser

adicionada na amostra segue a proporção de 50 vezes o reagente A e uma vez o reagente B. Esta solução foi adicionada na proporção 8:1 (reagente:amostra). Incubou-se por 30 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, leu-se a 655nm (catálogo 500-0116N).

3.4.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Primeiramente, se preparou 10 mL de gel separador 7,5%, este contendo 4 mL de água; 2,5 mL de solução acrilamida 30% (29,2% acrilamida(w/v):0,8% de N'-metilenobisacrilamida(w/v),pH 7; sendo a acrilamida da Luc biotechnology e a N'-metilenobisacrilamida da Sigma); 2,5 mL de 4xLower Buffer pH 8.8 (1,5M de Tris Base da Gibco BRL, H₂O miliQ, SDS 0,4% da USB corporation); 17µL de TEMED da invitrogen, 33µL de persulfato de amônia 10% da Gibco BRL. Após a polimerização do gel separador, adicionou-se gel concentrador 5%, este contendo 1,140 mL de água, 0,34mL de solução acrilamida 30% (29,2% acrilamida(w/v): 0,8% de N'-metilenobisacrilamida(w/v),pH 7), 0,5mL de 4Xupper buffer pH6,8 (0,5M de Tris Base, H₂O miliQ, SDS 0,4%), 2,7µL de TEMED, 20µL de persulfato de amônia 10%. Estando polimerizado o gel, aplicou-se as amostras deixando migrar por tempo variável com voltagem inicial de 60V aumentando com o tempo para GRP78 e GADD153. Para a visualização de N-glicanos correu-se inicialmente a 40V e após as amostras entrarem no gel separador a corrida ocorreu a 50V. Para a análise de GADD153, fez-se um gel separador 12%, contendo os mesmos conteúdos.

As amostras foram diluídas no mesmo volume de tampão de amostra 2x (Tris HCl 200 mM, pH 6,8; 4% de SDS(v/v) da USB corporation; 0,01% de azul de bromofenol(p/v); 20% de glicerina da MERCK(v/v); 4% de β -mercaptoetanol da MERCK schuchardt). Preparou-se uma amostra com o marcador de massa molecular de proteínas *Multicolor Broad Range Protein Ladder* da Fermentas. As amostras foram incubadas a 100°C por cinco minutos para desnaturação completa.

3.4.4 Transferência das Amostras para o PVDF

Primeiramente, encharcou-se doze pedaços de filtro Watman e um pedaço do filtro de PVDF no tampão de transferência (3,02 g de TRIS base, 14,40 g de glicina da Luc Biotecnologia, 200mL de metanol e 800mL de água) com pH 8,3. Depois, montou-se o “sanduíche de transferência” com a seguinte ordem: eletrodo positivo, seis pedaços de filtro Whatmann, membrana de PVDF, gel, seis pedaços de filtro Whatmann, eletrodo negativo. Manteve-se a cuba a uma corrente constante de 0,8 mA por cm² de gel por 90 minutos na geladeira. E, finalmente, removeu-se a membrana de membrana de PVDF, colocando-a em cima de um papel de filtro seco e limpo.

Após a transferência do gel, as membranas foram bloqueadas com solução de bloqueio, esta constituída por 5g de leite desnatado molico e 100mL de PBS-T 1X (137mM de NaCl da Luc Biotechnology, 2,7mM de KCl da Merck, 10 mM de Na₂HPO₄ da Vetec, 2mM de KH₂PO₄, 0,5% Tween

20 da Amershan Bioscience). Incubou-se o sistema durante uma hora sob agitação lenta à temperatura ambiente.

3.4.5 Imunodeteção

Incubou-se com anticorpos específicos (anticorpo policlonal de cabra anti-GRP78, santa cruz; anticorpo policlonal de coelho Gadd153, santa cruz; anticorpo policlonal de camundongo β -actina, sigma) na diluição específica de cada anticorpo em PBS/tween 0.5%/molico 5% sob agitação lenta overnight. Após isto, lavou-se a membrana três vezes por 20 minutos cada lavagem e posteriormente, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado a peroxidase por uma hora e finalmente, lavaram-se as membranas novamente.

Posteriormente, para a revelação, utilizou-se kit de reagentes de detecção Amersham ECL Plus™ da GE healthcare. Inicialmente, colocou-se a membrana dentro de uma capa plástica em um cassete de revelação e adicionaram-se sobre a membrana os reagentes de detecção do kit, em uma proporção de 40 vezes o reagente A para uma do reagente B. Dentro de uma câmara escura, colocou-se um filme de autoradiograma da GE healthcare em cima da membrana. Fechou-se o cassete, deixando o filme expondo. Posteriormente, removeu-se o filme, colocou-o na solução reveladora (390mL de água com 110 mL do revelador e reforçador da Kodak GBX) até o aparecimento das bandas, depois lavou-se em água e colocou-se na solução fixadora (390mL de água com 110 mL do revelador e reforçador da Kodak GBX).

3.4.6 Coloração com coomassie blue

Para a coloração com coomassie blue, inicialmente colocou-se o gel de poliacrilamida em um recipiente contendo solução de coomassie blue (50% de metanol, 40% de água, 10% de ácido acético e 0,05% de coomassie blue) suficiente para cobrir o gel, deixando agitar por 30 minutos a temperatura ambiente. Retirou-se a solução de coomassie blue e adicionou-se a solução descorante A (37,5mL de ácido acético, 227mL de metanol e 235,5 mL de água) por uma hora. Trocou-se pela solução B (36,5mL de ácido acético, 25mL de metanol e 437,5 mL de água) até a nitidez das bandas. Retirou-se a solução descorante e deixou o gel overnight em água miliQ.

3.4.7 *Blotting* com Lectinas

No *blotting* com lectinas, procedeu-se como descrito de 3.4.1 a 3.4.4 e depois se bloqueou a membrana com a solução bloqueadora do KIT DIG GLYCAN overnight e incubou-se com L-PHA biotinilada 10ug/mL em TBS/TWEEN 0,1% overnight. Posteriormente, procedeu-se a três lavagens de 10 minutos cada em TBS/TWEEN 0,1%, incubou-se posteriormente com estreptavidina-AP(1:1000) em TBS/TWEEN 0,1% por 1h. Finalmente, revelou-se com NBT (35mg/mL), sal de 5-Bromo-4-Cloro-3'-Indolifosfato p-toluidino (BCIP)(50mg/mL) diluído em Tampão de Fosfatase Alcalina (APB)(tris 100mM pH 9,5; NaCl 100mM ; MgCl₂ 5mM).

3.5 ENSAIO DE MTT [3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIUM BROMIDE]

Primeiramente prepararam-se as soluções. O tampão de solubilização foi feito de forma que a constituição fosse de 10% SDS e 10mM HCl. O MTT foi preparado dissolvendo o sal *Thiazolyl Blue Tetrazilium Bromide* em PBS na concentração de 5mg/mL e depois se filtrou em filtro 0,22µm e protegido da luz.

Após os tratamentos, em condições ainda estéreis, adicionou-se 10µL/poço de solução MTT 5mg/mL para cada 100µL meio (cf:0,5mg/mL). Incubaram-se as placas por quatro horas em atmosfera umedecida (37°C, 5% CO₂). Em seguida, adicionou-se 100µL de tampão de solubilização para dissolver os cristais e incubaram-se as placas *overnight* em atmosfera umedecida (37°C, 5% CO₂). Posteriormente, verificou-se a completa solubilização dos cristais e fez-se a leitura em leitor de Elisa no filtro 3 (595nm).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram comparados estatisticamente com testes paramétricos, com o programa estatístico GraphPad Prism 4 versão 4.0 para Windows. O teste utilizado para analisar os experimentos foi o One-way ANOVA com o pós teste Bonferroni, comparando-se todas as condições de maneira pareada. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para $p < 0,05$. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes para a validação dos dados. No experimento 3.2.6 além

de utilizar One way ANOVA, utilizou-se o Twoway ANOVA com pós teste Bonferroni. Na tabela 3 há descrito o tipo de análise estatística utilizado para cada experimento.

Tabela 3 - Tipos de análises estatísticas feitas para cada experimento, com seus respectivos controles.

Experimento	Teste utilizado	Controle
3.2.1, 3.2.2, 3.2.3	One-way ANOVA	A análise foi feita separadamente para cada linhagem sempre comparando cada ponto em relação a condição em que não havia a presença de tunicamicina.
3.2.4	One-way ANOVA	Comparou-se em relação à condição em que não havia cisplatina. Tendo sido feita uma análise para cada linhagem celular.
3.3.5	One-way ANOVA	Compararam-se cada condição em relação aquela, em que não havia a presença de tunicamicina e cisplatina. Avaliou-se cada linhagem separadamente.
3.3.6	One-way ANOVA e Two-way ANOVA	As condições em que havia a presença das duas drogas foram comparadas em relação as condições em que não havia a presença das drogas isoladas na mesma concentração.
3.3.7	Two-way ANOVA	Cada condição em que havia a presença de NAC foi comparada com àquela que não apresentava a droga em um mesmo horário de tratamento em um mesmo tempo de tratamento.

4 RESULTADOS

4.1 TUNICAMICINA É MAIS CITOTÓXICA E CITOSTÁTICA PARA AS LINHAGENS TUMORIGÊNICAS DO QUE PARA MELAN-A

Como dito anteriormente, as linhagens tumorigênicas apresentam um aumento de cadeias β -1,6 nos seus glicanos, ou seja, um aumento de *N*-glicanos aberrantes. Sabendo que tunicamicina atua inibindo a formação de *N*-glicanos; pensou-se que células das três linhagens poderiam apresentar graus de sensibilidade diferente à droga. Com isto, procedeu-se a um ensaio de MTT com concentração seriada de tunicamicina por 24 horas. Tunicamicina foi citotóxica significativamente em concentrações de pelo menos 2,5 $\mu\text{g/mL}$ para melan-a, enquanto que as linhagens tumorigênicas (Tm1 e TM5) foram sensíveis a concentrações vinte vezes menores da droga; ou seja, as linhagens tumorigênicas são mais sensíveis a tunicamicina do que melan-a (Figura 6A). Estes dados demonstram uma maior sensibilidade das linhagens tumorigênicas à inibição da *N*-glicosilação protéica, ou seja, uma maior dependência destas linhagens a *N*-glicosilação quando comparados com a linhagem melanocítica.

No tratamento por 24 horas não se atingiu um IC 50%, com isso procedeu-se ao tratamento prolongado por 48 horas no intuito de verificar uma maior diminuição da absorbância. Em tais condições, houve uma redução significativa da porcentagem de células viáveis em todas as

linhagens, mantendo-se a diferença de resposta entre as linhagens tumorigênicas e a linhagem melanocítica (Figura 6B).

Após este experimento, realizou-se contagem do número de células viáveis por exclusão de azul de tripan das três linhagens submetidas ao tratamento com quatro diferentes concentrações de tunicamicina por 48 horas: 0; 0,2µg/mL; 1,0µg/mL e 2,5 µg/mL. TM1 e TM5 apresentaram diminuição similar do número de células viáveis frente às diferentes concentrações de tunicamicina; enquanto melan-a apresentou-se mais resistente ao tratamento (Figura 7). Isto pode ser verificado principalmente pelo fato de que 0,2 µg/mL tunicamicina é citotóxico apenas para as linhagens tumorigênicas. Esse resultado confirma o achado anterior demonstrando uma maior suscetibilidade das linhagens tumorigênicas a tunicamicina. A contagem do número de células viáveis, entretanto, definiu melhor o efeito citotóxico de tunicamicina do que o MTT; pois, a redução do número de células viáveis aproximou-se de 50% em melan-a e foi maior do que 70% nas linhagens tumorigênicas.

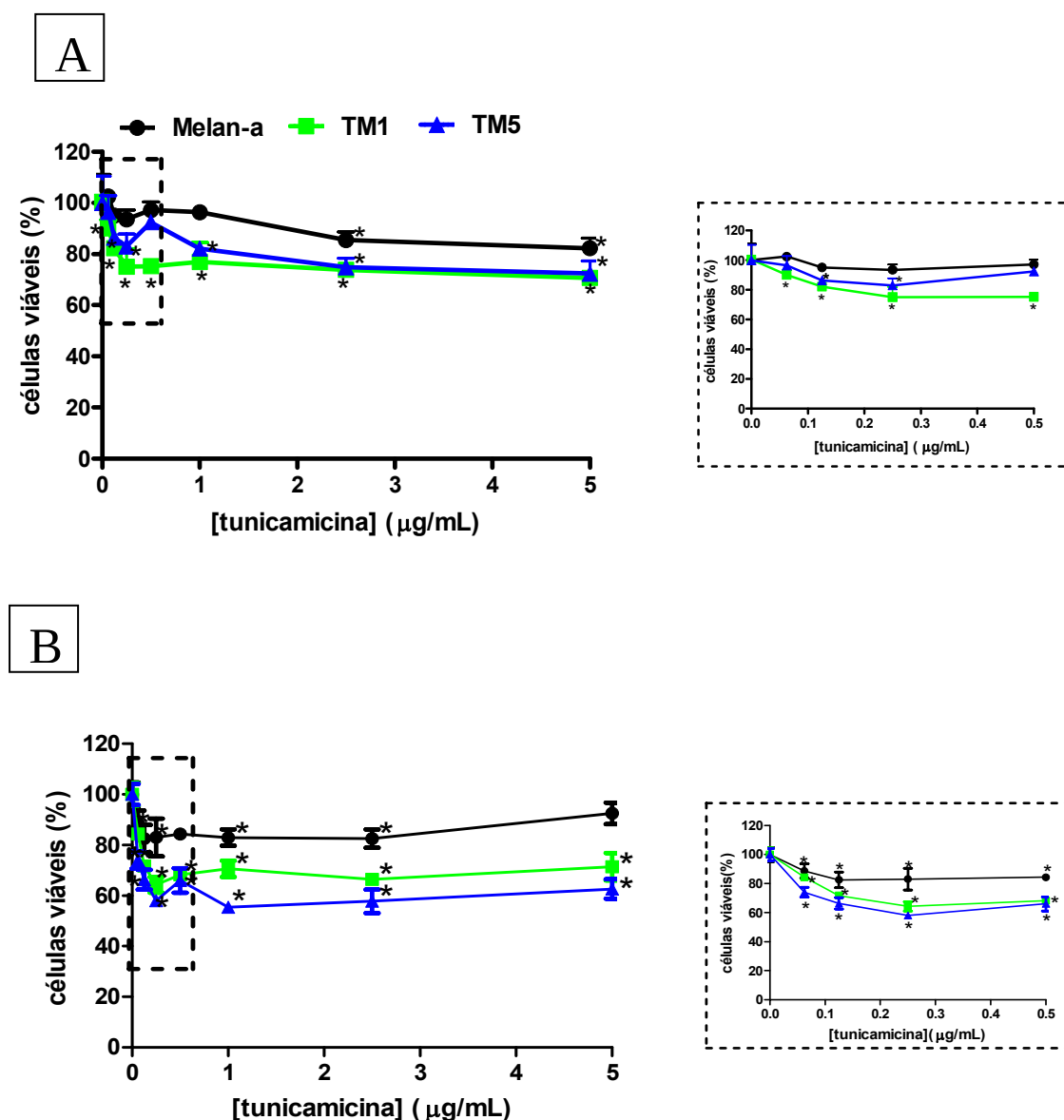


Figura 6 - As linhagens tumorigênicas são mais sensíveis a tunicamicina do que melan-a. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos a tratamento por 24 (6A) e 48 horas (6B) com tunicamicina nas seguintes concentrações: 0μg/mL; 0,0625 μg/mL; 0,125 μg/mL; 0,25μg/mL; 0,5μg/mL; 1 μg/mL; 2,5 μg/mL e 5 μg/mL; sendo o meio de veiculo DMSO. Posteriormente, analisou-se a citotoxicidade por MTT. Para melan-a, tunicamicina foi citotóxica apenas em altas concentrações de tunicamicina; enquanto para TM1 e TM5 a redução de número de células viáveis torna-se significativa a partir de baixas concentrações. O prolongamento do tratamento por maior tempo aumentou a citotoxicidade da droga para as três linhagens mantendo a resposta diferencial entre melan-a e as linhagens tumorigênicas *(one way a nova, $p < 0.05$; análise feita em relação ao controle, condição que não apresenta tunicamicina em seu tratamento)

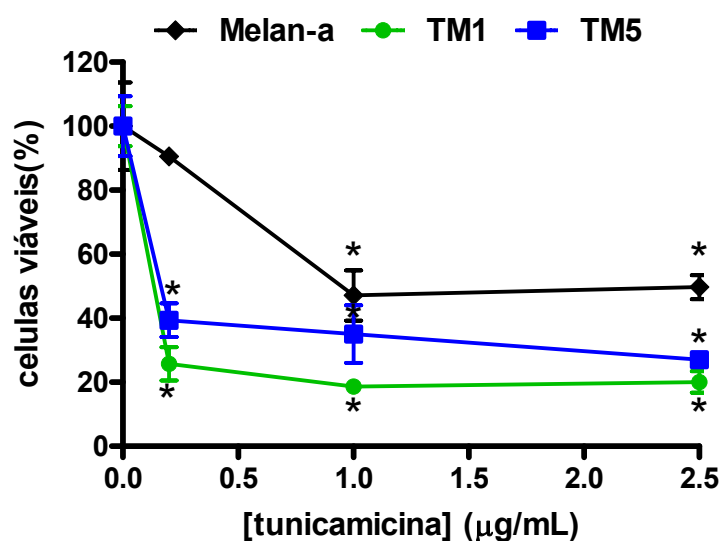


Figura 7 - Melan-a apresentou uma maior resistência ao tratamento em baixa concentração de tunicamicina quando comparado com as linhagens tumorigênicas. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos a tratamento com tunicamicina em quatro diferentes concentrações 0 µg/mL, 0,2µg/mL; 1,0µg/mL e 2,5ug/mL por 48 horas, sendo o meio de veículo DMSO. Análise do número de células viáveis por exclusão de células marcadas por azul de Tripán demonstrou que TM1 e TM5 são mais sensíveis a 0,2µg/mL de tunicamicina do que melan-a. *(one way a nova, $p < 0.05$; análise feita em relação ao controle: condição que não apresenta tunicamicina em seu tratamento)

Extratos obtidos de células de cada uma das linhagens tratadas com tunicamicina (0; 0,2 µg/mL e 1µg/mL) foram submetidas a eletroforese e *blot*. Posteriormente, procedeu-se a análise desses extratos com a lectina *Phaseolus vulgaris* que reconhece cadeias tri e tetra antenares, com o intuito de confirmar se a citotoxicidade da droga estava relacionada a uma diminuição de *N*-glicanos. E, como demonstrado na Figura 8, tunicamicina reduziu o número de glicoconjugados reconhecidos por L-PHA nas três linhagens.

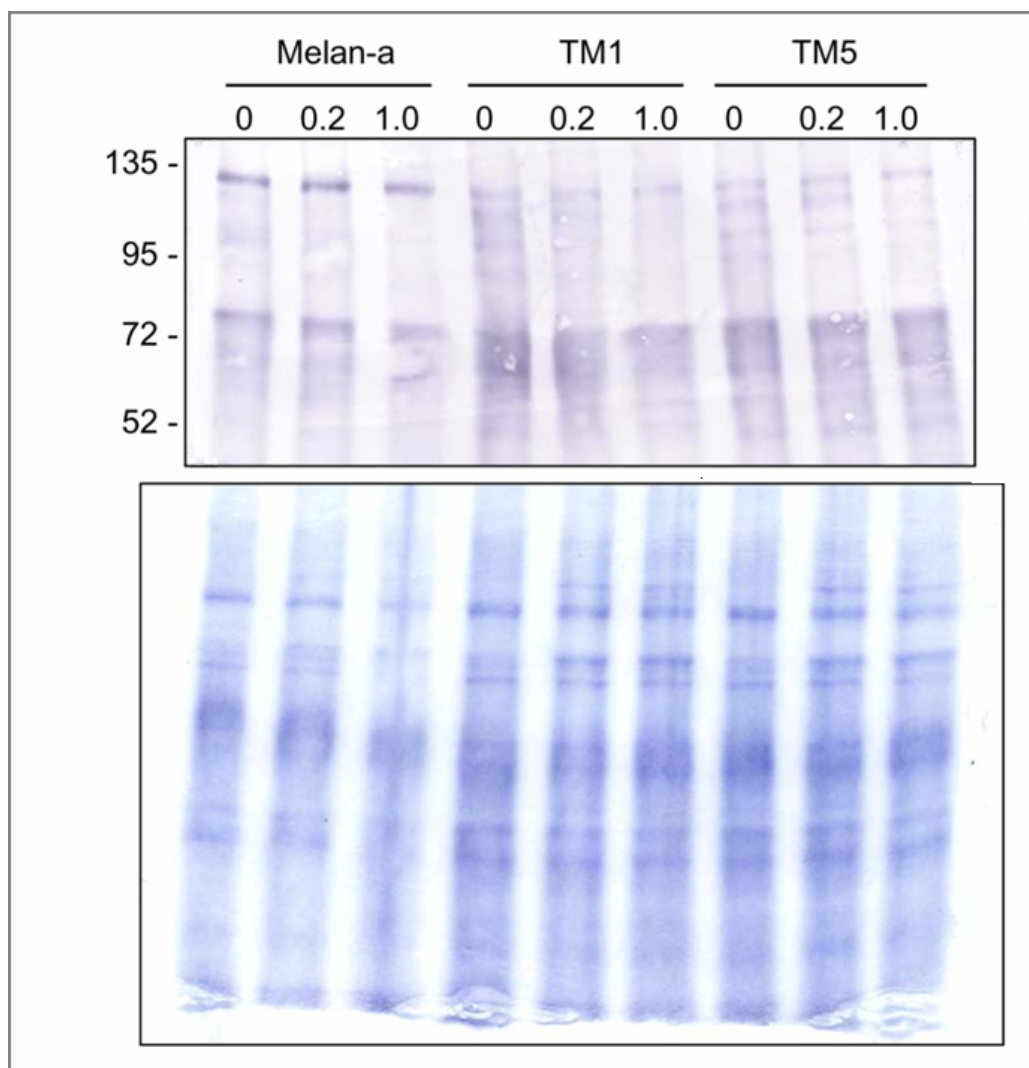


Figura 8 - Tratamento com tunicamicina diminuiu estruturas reconhecidas por L-PHA nas três linhagens. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos por 24 horas a três concentrações de tratamento com tunicamicina 0 µg/mL; 0,2 µg/mL e 1 µg/mL. Após o tratamento, os extratos protéicos foram submetidos à eletroforese. A revelação dos extratos protéicos com L-PHA demonstrou que houve perda de estruturas reconhecidas por L-PHA no tratamento com tunicamicina para as três linhagens (número de repetições igual a 2).

Sabendo do potencial de tunicamicina de induzir uma parada celular em G1, avaliou-se a etapa do ciclo celular nas três linhagens. TM1 e TM5 apresentaram um aumento significativo de células em G1, enquanto melan-a apresentou pequeno aumento significativo apenas com 0,2 µg/mL de

tunicamicina(Figura 9). Constatou-se que tunicamicina desencadeia uma parada em G1 principalmente nas linhagens tumorigênicas, o que revela seu efeito citostático sobre as mesmas

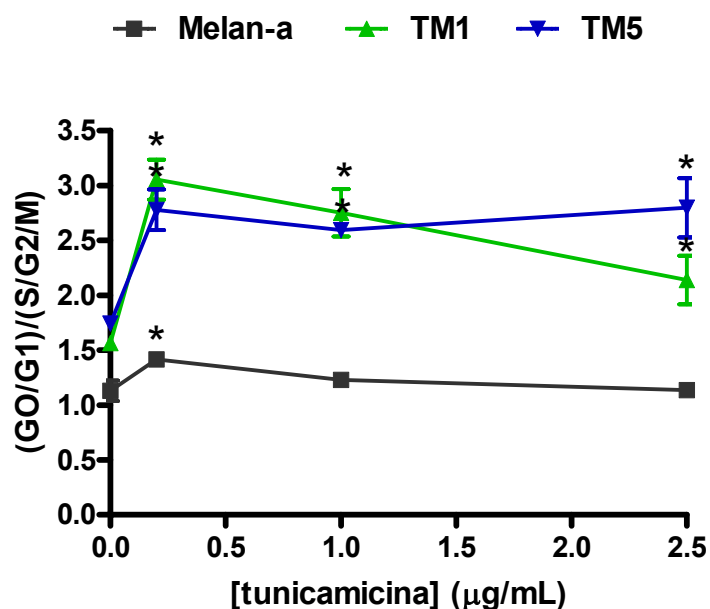


Figura 9 - Tratamento com tunicamicina ocasiona o bloqueio da progressão do ciclo celular em G0/G1 principalmente nas linhagens tumorigênicas. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos por 48 horas a quatro concentrações de tratamento com tunicamicina (0; 0,2µg/mL; 1µg/mL e 2,5ug/mL) e após o tratamento, as células foram incorporadas com iodeto de propídeo. Demonstrou-se que as linhagens tumorigênicas apresentam um grande aumento de células em GO/G1, ou seja, apresentam uma parada no ciclo celular em G0/G1; já a linhagem melanocítica apresentou apenas um aumento discreto com 0,2µg/mL. *(one way a nova, $p < 0.05$; análise feita em relação ao controle, condição que não apresenta tunicamicina em seu tratamento)

4.2 TUNICAMICINA INDUZ ESTRESSE DE RETÍCULO NAS TRÊS LINHAGENS

Considerando que tunicamicina é um potente ativador de UPR, é válido supor que a resposta diferencial de melan-a, TM1 e TM5 decorra de alterações nessa cascata de sinalização que possui o potencial de ativar tanto fatores citostáticos como pró-apoptóticos. Neste contexto, avaliou-se primeiramente se há um acúmulo protéico do sensor de UPR, GRP78. Observou-se haver aumento de GRP78 nas três linhagens, o que demonstra que a cascata de sinalização estava ativada (Figura 10).

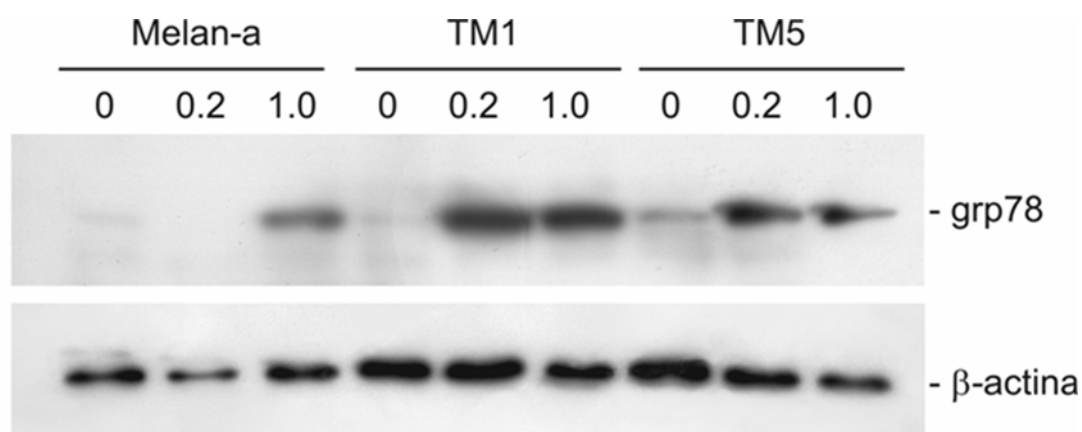


Figura 10 - Acúmulo de GRP-78 em células tratadas com tunicamicina. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos a tratamento com tunicamicina (0; 0,2μg/mL e 1 μg/mL) por 24 horas. Após o tratamento, submeteram-se os extratos protéicos a eletroforese e a revelação dos extratos protéicos com α-grp78. β-actina: controle de massa. Em alta concentração de tunicamicina, as três linhagens aumentam o acúmulo de GRP78; já com baixa concentração de tunicamicina, as linhagens tumorigênicas apresentam esse acúmulo, enquanto o mesmo fato não ocorre para melan-a (o experimento foi repetido três vezes).

Com o aumento deste sensor de UPR, procedeu-se a análise para caracterizar se a cascata estava induzindo apoptose. Avaliou-se assim, se o tratamento com tunicamicina acarretava acúmulo de *GADD 153*. Interessantemente, a presença do produto do gene de *GADD153* só ocorria na vigência de tunicamicina, nas três linhagens. Dentre elas, melan-a apresentou menor acúmulo do que as linhagens tumorigênicas (Figura 11).

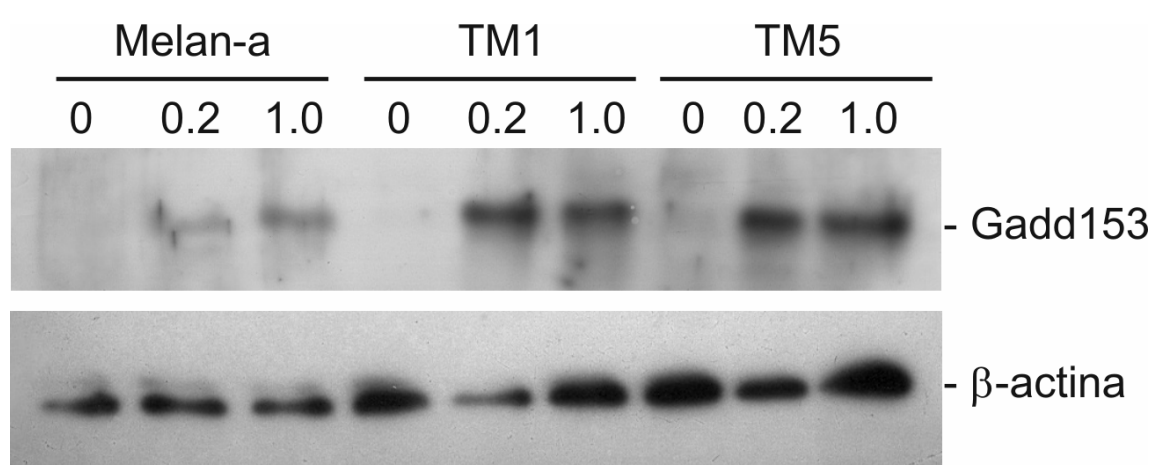


Figura 11 - Acúmulo de GADD153 nas três linhagens quando tratadas com tunicamicina. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos a tratamento com tunicamicina 0; 0,2µg/mL e 1 µg/mL por 24 horas. Após o tratamento, submeteram-se os extratos protéicos a eletroforese e a revelação dos extratos protéicos com α -GADD153. β -actina: controle de massa. Nas três linhagens houve um acúmulo de GADD153 na presença de tunicamicina, sendo este acúmulo maior nas linhagens tumorigênicas quando comparadas com a linhagem melanocítica. (O experimento foi realizado três vezes)

4.3 AS TRÊS LINHAGENS SÃO SENSÍVEIS A CISPLATINA

Como discutido anteriormente, cisplatina é um medicamento amplamente utilizada na clínica e que possui baixa eficiência no tratamento. Neste contexto, procedeu-se a um conjunto de experimentos a fim de verificar se tunicaminina poderia aumentar a resposta das células à morte por cisplatina. Assim, primeiramente verificou a sensibilidade das três linhagens à cisplatina. O tratamento demonstrou que o tratamento reduziu significativamente o número de células viáveis em melan-a e TM5. O mesmo efeito parece ocorrer para TM1, entretanto o resultado não teve diferença significativa para esta linhagem (Figura 12).

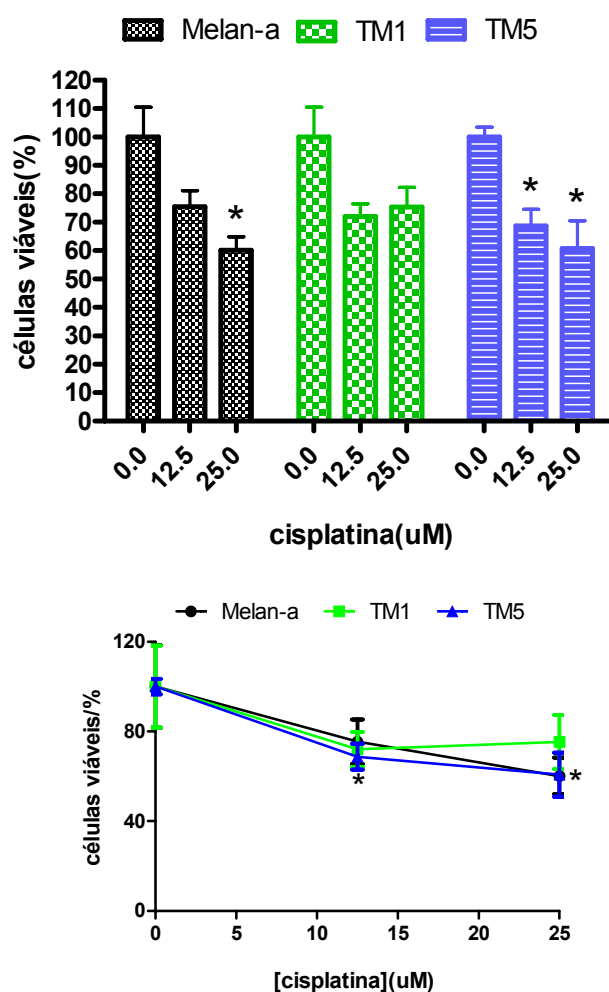


Figura 12 - Linhagens tumorigênicas e melan-a são sensíveis a cisplatina. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos às seguintes concentrações de cisplatina de forma que a concentração final fosse: 0; 12,5µM e 25µM por 24 horas. **A** Análise do número de células viáveis de células por exclusão de células marcadas com azul de TRIPAN demonstrou que a droga tem ação nas três linhagens celulares, entretanto TM1 não demonstrou ser sensível significativamente à droga **B** Curva de tendência demonstrou que quanto maior a concentração de cisplatina maior a redução de células viáveis *(one way a nova, $p < 0.05$; análise feita em relação ao controle, condição que não apresenta cisplatina em seu tratamento)

4.4 TUNICAMICINA E CISPLATINA: EFEITO ADITIVO SOMENTE PARA MELAN-A

Sendo cisplatina e tunicamicina citotóxicas para as células, seguiu-se a um conjunto de experimentos a fim de verificar se a adição das duas drogas conjuntamente exerceria um efeito citotóxico maior. As linhagens já em tratamento com tunicamicina por 24 horas, adicionou-se cisplatina. Depois de mais um período de 24 horas o efeito citotóxico aditivo das duas drogas foi analisado pela contagem do número de células viáveis.

Na linhagem melanocítica observou-se um efeito aditivo das duas drogas, pois há uma diminuição significativa do número de células viáveis na presença das duas comparadas ao controle em que há ausência de tratamentos, este fato pode ser melhor analisado com cisplatina 12,5 μ M e tunicamicina 0,2 μ g/mL, pois quando há a presença de apenas uma das drogas no tratamento de melan-a, a redução não é significativa em relação ao controle, enquanto quando há a presença das duas drogas, a redução torna-se significativa em relação ao controle, ou seja, a condição que não foi tratadas com nenhuma das drogas (Figura 13a e 13b). Já para as linhagens tumorigênicas, a redução do número de células viáveis por tunicamicina é tão grande que provavelmente “mascara” o efeito de cisplatina (13c-f). Estes dados sugerem que exista uma interferência nas vias de mortes desencadeadas pelas duas drogas, possivelmente por estresse no retículo.

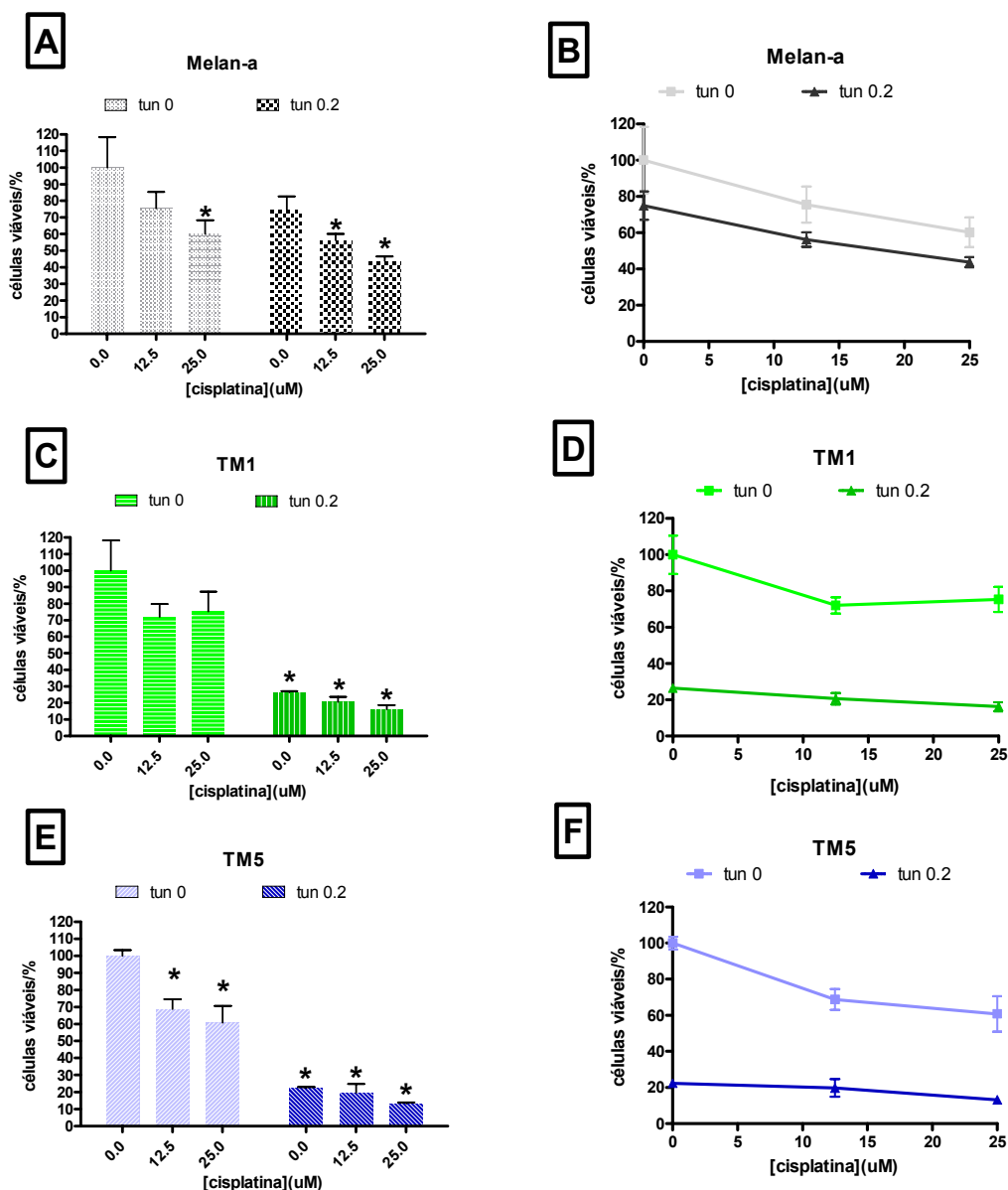


Figura 13 - Cisplatina e tunicamicina: efeito aditivo somente para melan-a.

Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos às seguintes concentrações de tunicamicina: 0 (tun0) e 0,2µg/mL(tun0.2). Após 24 horas, adicionou-se cisplatina ao meio de forma que a concentração final fosse: 0; 12,5µM e 25µM. Análise do número de células viáveis de células por azul de Tripán demonstrou que para melan-a houve um efeito aditivo das drogas, ou seja, a ação das duas drogas conjuntas foi maior do que na presença de apenas uma delas (13a e 13b); já para as linhagens tumorigênicas, o efeito isolado de tunicamicina já é tão grande que a adição de cisplatina não faz diferença ao tratamento (13c-f). ($p < 0.05$ e

n=3) *(one way a nova, $p<0.05$; análise feita em relação ao controle, condição em que não há nenhuma das drogas no tratamento)

4.5 EFEITO ADITIVO DISCRETO DE TUNICAMICINA E CISPLATINA JÁ PODE SER OBSERVADO EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE TUNICAMICINA NAS LINHAGENS TUMORIGÊNICAS

No segundo conjunto de experimentos, relacionando tunicamicina e cisplatina, o objetivo foi de constatar se tunicamicina sensibilizava as células a morte por cisplatina. Neste contexto, trataram-se as linhagens somente com tunicamicina, primeiramente por 24 horas e em seguida trocou-se o meio, retirando tunicamicina e submeteram-se as células por 24 horas a mais de tratamento somente com cisplatina.

Neste ensaio todas as células demonstraram ser sensíveis a morte por cisplatina e tunicamicina isoladas e em todas há um efeito aditivo discreto das duas droga (Figura 14). No entanto, algo notável é que quando se observa baixas concentrações de tunicamicina, o efeito aditivo de citotoxicidade só pode ser observado nas linhagens tumorigênicas. Enquanto, para melan-a, o efeito só pode ser observado a partir de $2,5\mu\text{g/mL}$. Estes dados sugerem que para uma resposta diferencial das três linhagens no tratamento conjunto de cisplatina com tunicamicina é necessário utilizar baixa concentração de tunicamicina.

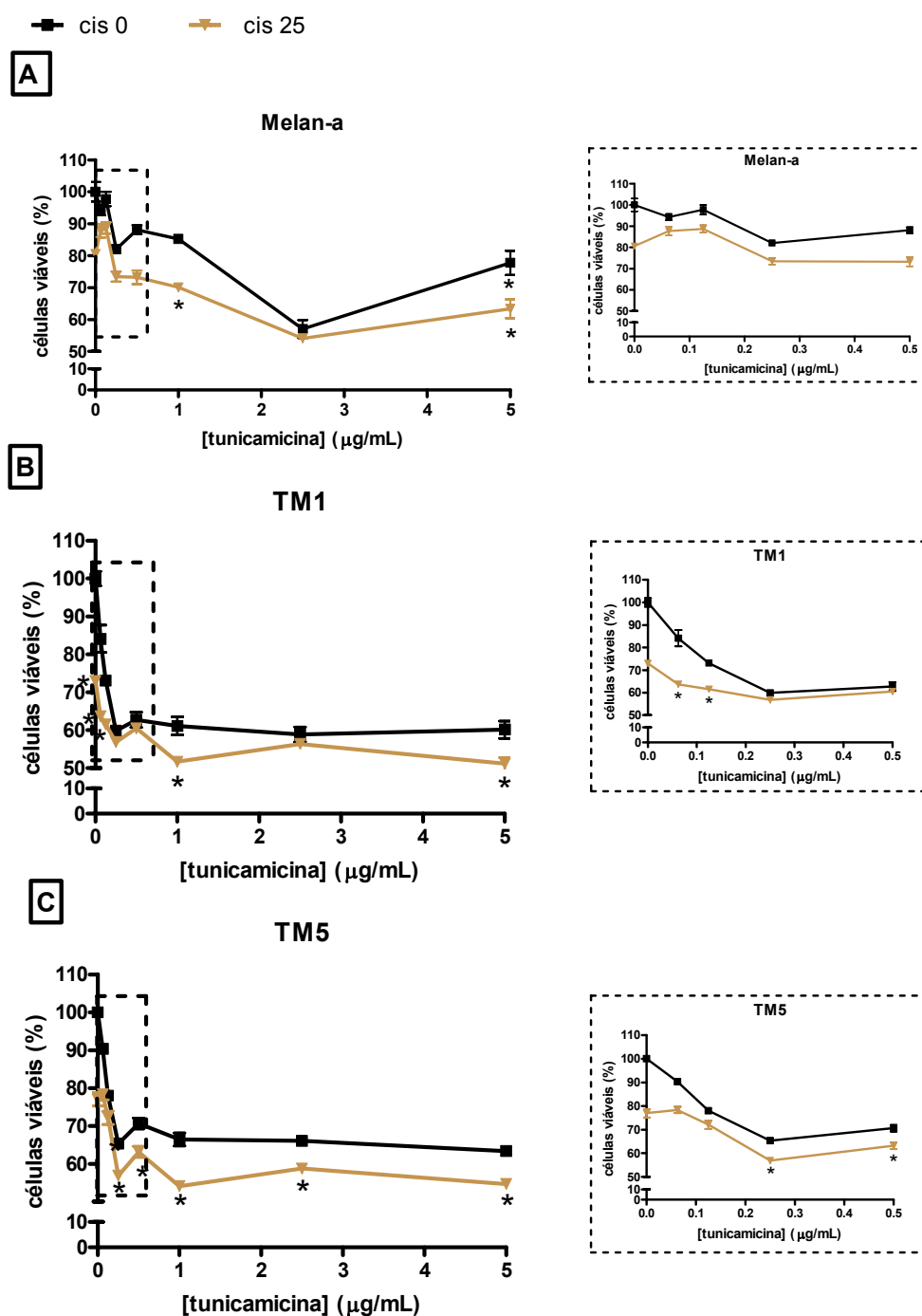


Figura 14 – Tunicamicina e cisplatina: efeito aditivo discreto em baixa concentração sensibiliza as células a morte por cisplatina. Melan-a, TM1 e TM5 foram primeiramente submetidos por 24 horas às seguintes concentrações de tunicamicina: 0; 0,0625 $\mu\text{g/mL}$; 0,1250 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 horas, trocou-se o meio e submeteram-se ao tratamento com cisplatina por mais 24 horas nas seguintes concentrações: 0 (cis 0) e 25 μM (cis 25). Analisaram-se os ensaios por

MTT. Nos gráficos, demonstrou-se que há um efeito aditivo discreto na presença das duas drogas. Os gráficos pontilhados evidenciam tunicamicina em baixas concentrações e demonstram que as linhagens tumorigênicas já apresentam este efeito aditivo em baixas concentrações, enquanto o mesmo fato não ocorre para melan-a ^{*}($p < 0.05$, two way anova e one way a nova, análise feita em relação quando há presença de apenas uma das drogas isoladamente).

4.6 TRATAMENTO COM O ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEÍNA IMPEDIU A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Recentemente, vem sendo descrita a interface entre estresse oxidativo e UPR, demonstrando uma interrelação em que o estresse oxidativo tanto pode estar *upstream* UPR como *downstream*. Sabendo-se do estado constitutivo pró-oxidativo das linhagens tumorigênicas, iniciou-se experimento com NAC afim de estudar esta interface. O ensaio com N-acetilcisteína (NAC) consistiu em analisar o efeito antioxidante desta molécula nestas linhagens comparando-as com a linhagem melanocítica melan-a. Com isto, plaquearam-se as três linhagens na ausência (controle) ou na presença de NAC e trocando-se o meio a cada 24 horas a partir de 48 horas, com isso esperava-se poder analisar o efeito antioxidante de NAC ao longo do tempo. Os resultados demonstraram que NAC desencadeia uma parada na proliferação celular nas três linhagens, ou seja, enquanto o controle apresentou uma proliferação continuada, o tratamento com NAC impediu o aumento no número de células (Figura 15). Isto pode ser observado durante todo o período, principalmente a partir de 96 horas, onde a diferença tornou-se maior nas três linhagens.

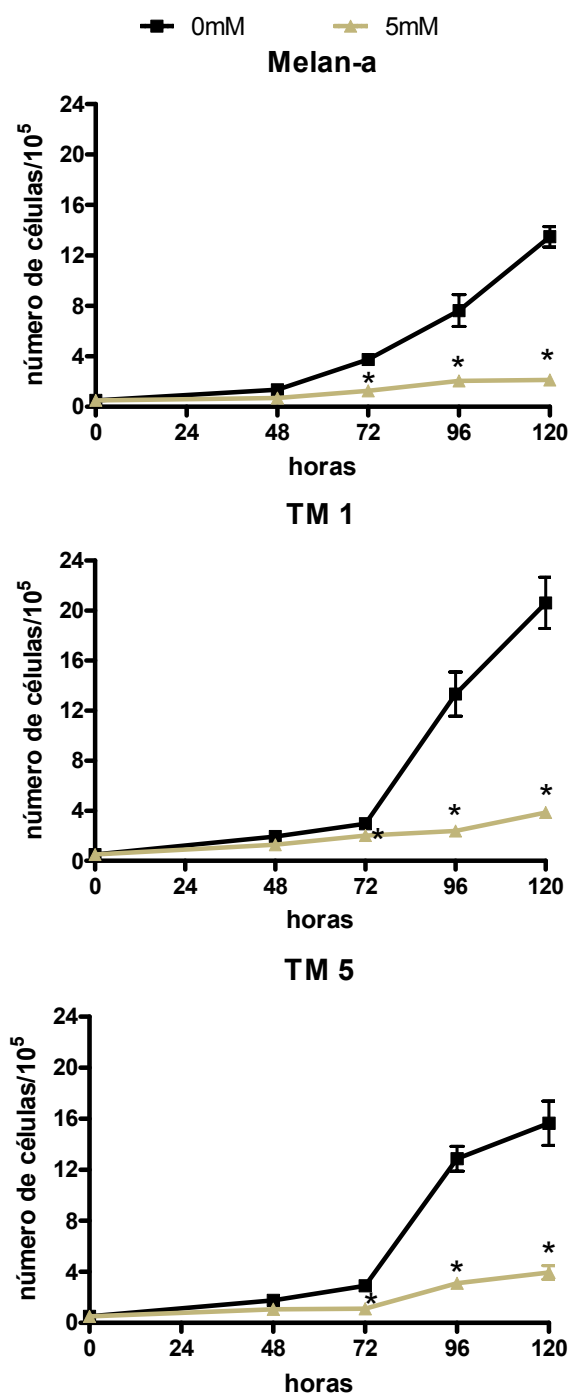


Figura 15 - N-acetilcisteína impede a proliferação celular nas três linhagens. Melan-a, TM1 e TM5 foram submetidos a condições sem adição de NAC e a tratamento com NAC 5mM. Contou-se o número de células após 48, 72, 96 e 120 horas de tratamento e fizeram-se as curvas de proliferação para cada condição. Para todas as linhagens, as células submetidas a tratamento com NAC sofreram uma parada na proliferação celular *($p < 0.05$, two way anova, em relação a condição sem a presença da droga no mesmo horário analisado).

5 DISCUSSÃO

A alta sensibilidade de TM1 e TM5 a tunicamicina demonstra que estas são mais vulneráveis a perda da *N*-glicosilação co-traducional, uma forma de indução de estresse de retículo endoplasmático.

Como observado anteriormente, as linhagens tumorigênicas apresentam um aumento de cadeias β -1,6-*N*-acetilglucosamina em relação à melan-a. A inibição da presença destas cadeias já demonstrou ser um fator de aumento de apoptose, como no trabalho de GUO et al. (1999), em que células de Lewis transfectadas com cDNA antisense *N*-acetylglucosaminiltransferase V (enzima fundamental para a formação de cadeias β -1,6-*N*-acetilglucosamina) apresentaram um aumento na susceptibilidade a apoptose. A perda destas cadeias pode ser um dos fatores da maior vulnerabilidade destas linhagens a morte. Não fica claro porém se nestas condições houve indução de estresse de retículo associado à modificação do padrão de glicosilação das glicoproteínas do modelo celular estudado.

Assim, por exemplo, perda destas cadeias pode estar relacionada a alterações no padrão de transdução de sinais proliferativos. LAU et al. (2007) demonstrou que o aumento do número de *N*-glicanos complexos e do grau de dobramento, através do fluxo de hexosamina, estão relacionados com a regulação da proliferação celular e da diferenciação. Glicoproteínas altamente glicosiladas apresentam uma resposta hiperbólica ao aumento de

hexosamina, enquanto as proteínas poucos glicosiladas apresentam uma resposta com um maior limiar de ativação, que pode ser quebrado pelo aumento do número de cadeias de oligossacarídeos *N*-ligados presentes nessas macromoléculas, conforme modelo proposto. Glicoproteínas com poucos sítios de *N*-glicanos estariam antes envolvidas com parada no ciclo e aquelas com um número maior de sítios estariam relacionadas com proliferação. A transição de proliferação para parada é estabelecida através do aumento da presença de receptores de parada do ciclo celular. Se verdadeiro, este modelo permitiria estabelecer uma relação diretamente proporcional entre complexidade de *N*-glicanos e sinais proliferativos (LAU et al 2007). Sendo assim, a perda das cadeias β -1,6 pode desencadear em uma parada do ciclo celular.

O efeito de tunicamicina nas linhagens tumorigênicas demonstra uma maior sensibilidade destas linhagens tumorigênicas a *N*-glicosilação em relação a melan-a. Este fato ilustra o conceito de dependência, que vem sendo explorado na literatura mais recentemente. A dependência a vias oncogênicas, como vem sendo chamado (do inglês, *oncogene addiction*), ocorre do fato de que apesar das células tumorigênicas apresentarem diversas anormalidades genômicas e epigenéticas, a inibição de apenas uma anormalidade molecular pode resultar em parada na proliferação ou morte celular (ou sensibilidade aumentada à morte celular); e o mesmo fenômeno não ocorre em células normais (WEINSTEIN e JOE 2006; MELNIKOVA e BAR-ELI 2008). Algumas hipóteses têm sido formuladas para esclarecer esta dependência.

Uma teoria é de que para manter a homeostasia, o efeito proliferativo de um oncogene pode ser parcialmente inibido por um “feedback” negativo, por exemplo, por fatores inibidores da proliferação. Sendo assim, a inativação deste oncogene irá desencadear em um excesso do efeito inibitório, e em cadeia a morte celular (WEINSTEIN e JOE 2006).

Dois genes são letais se a inatividade de um é compatível com a sobrevivência, mas a inativação de ambos desencadeia a morte celular. Algumas células tumorais são dependentes de um oncogene porque durante a sua progressão inativaram algum outro gene que realizava a mesma função. Sendo assim, uma droga que inative este oncogene, irá matar as células tumorais e selecionar as células não tumorigênicas (WEINSTEIN e JOE 2006).

Finalmente, uma terceira explicação seria por “oncogenic shock”. Uma oncoproteína libera tanto sinais proapoptóticos, como sinais pró-sobrevivência e as diferenças nas taxas de decaimento dos dois sinais, faz com que a inativação do oncogene desencadeie a morte celular (SHARMA et al. 2006; SHARMA e SETTLEMAN 2007).

Aqui observamos que todas as linhagens apresentaram um aumento de GRP78 quando as células são expostas à tunicamicina, o que indica que há estresse de retículo nas três linhagens (SHARMA e SETTLEMAN 2007). Aparentemente, o acúmulo parece ser maior nas linhagens tumorigênicas do que na linhagem não-tumorigênica. Ao mesmo tempo, verificou-se um acúmulo de GADD 153, sendo maior nas linhagens tumorigênicas quando comparadas com melan-a. Esses dados evidenciam a integridade da via de

UPR em todas as células e sugerem que a diferença na sensibilização à morte entre as linhagens tumorigênicas e a linhagem melanocítica pode estar relacionada com estresse no retículo.

Tunicamicina desencadeou parada no ciclo celular nas linhagens tumorigênicas, o mesmo efeito não foi observado na linhagem melanocítica. Tunicamicina já é conhecida por desencadear parada em G0/G1 em células tumorais (HSU et al. 2009). O ciclo celular é uma seqüência de eventos altamente regulada pelas ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDK). MADHAVAN et al. (2000) demonstrou um acúmulo de ciclina E; uma diminuição protéica de ciclinas D1 e D3, assim como uma diminuição nas cdk4 em células de fibroblasto murinas NIH 3T3. A diminuição do complexo cdk4/ciclina D está altamente relacionada com parada celular em G0/G1.

Como demonstrado neste trabalho, cisplatina desencadeia redução do número de células viáveis. Os mecanismos mais conhecidos de ativação de morte de cisplatina ocorrem pelo fato desta molécula interagir com o DNA, podendo formar monoadutos, ligar-se com uma das fitas (intrastrand crosslink) ou fazer uma ligação entre as duas fitas de DNA (interstrand crosslink). Estas ligações desencadeiam em distorções no DNA, sendo estes citotóxicos. No entanto, a citotoxicidade de cisplatina é aumentada principalmente pelos “intrastrand crosslink” que podem ser reconhecidos pelo grupo de proteínas com alta mobilidade (HMG), sendo este complexo relacionado com um bloqueio do reparo por excisão do nucleotídeo e formador de uma curvatura no DNA que desencadeia na parada da

transcrição e replicação. Todos estes danos no DNA ativam a cascata de sinalização apoptótica (RABIK e DOLAN 2006).

MANDIC et al. (2003) introduziu uma segunda forma de ativação de apoptose por cisplatina: através de UPR. Utilizando células enucleadas de células de melanoma humano 224 e de câncer de colon humano HCT 116, ele demonstrou que havia indução de apoptose independente de dano no DNA; que há ativação de caspase 3 e 12 e um acúmulo de GRP78 nessas células. Demonstrando assim uma ativação da cascata apoptótica dependente de estresse no reticulo por cisplatina. No entanto, dados do nosso grupo de pesquisa não publicados evidenciam que o tratamento de células de melanoma humano tratadas com cisplatina não apresentam um aumento de Grp78.

O tratamento aditivo de cisplatina e tunicamicina na linhagem melanocítica sugeriu efeito aditivo das drogas para melan-a. Entretanto, para as linhagens tumorigênicas, o efeito de tunicamicina presente por 48 horas “mascarou” o efeito de cisplatina. O fato de estas linhagens serem sensíveis quando cisplatina é presente isoladamente e o efeito citotóxico não ser relevante quando há a presença de tunicamicina, sugere que ou tunicamicina impede a morte provocada por cisplatina ou há uma interferência nas vias de morte modificadas pelas duas drogas. Considerando que o mecanismo de morte mais bem estabelecido de cisplatina é formando adutos no DNA e essa citotoxicidade é amplificada na duplicação da célula; talvez o fato de tunicamicina desencadear parada em

G0/G1, reduz a sensibilidade das células aos efeitos citotóxicos de cisplatina.

Em um segundo delineamento experimental, expusemos as células a tunicamicina previamente ao tratamento com cisplatina. Desta forma, as células já em condição de estresse de retículo seriam expostas a um segundo agente estressor na ausência do primeiro agente. Este protocolo nos permitiria avaliar a efetiva sensibilização de agentes como tunicamicina. Com este protocolo, observamos um efeito aditivo discreto na presença das duas drogas no tratamento; e, este efeito já pôde ser observado em baixas concentrações de tunicamicina nas linhagens tumorigênicas; demonstrando novamente esta maior sensibilidade das linhagens tumorigênicas a tunicamicina.

O retículo endoplasmático é um dos compartimentos intracelulares mais oxidativos, com um razão GSH/GSSG de 1:1 a 3:1, muito abaixo da razão citosólica de 30 a 100:1. Esse ambiente pró-oxidativo é importante na formação de pontes dissulfeto. Dados recentes vêm evidenciado que além de ROS e estresse oxidativo poderem ativar vias de UPR, eles podem estar também *downstream* nas vias de UPR, estando relacionados tanto com a resposta pró-adaptativa como na ativação da cascata apoptótica do estresse no retículo. A super expressão da catalase, antioxidante, demonstrou diminuir o acúmulo de GRP78 nas células.

Estando às linhagens tumorigênicas em um estado mais pró oxidativo, é possível que o limiar de ativação de morte por UPR seja menor para as

linhagens tumorigênicas em relação à melan-a por este ambiente pró-oxidativo constitutivo.

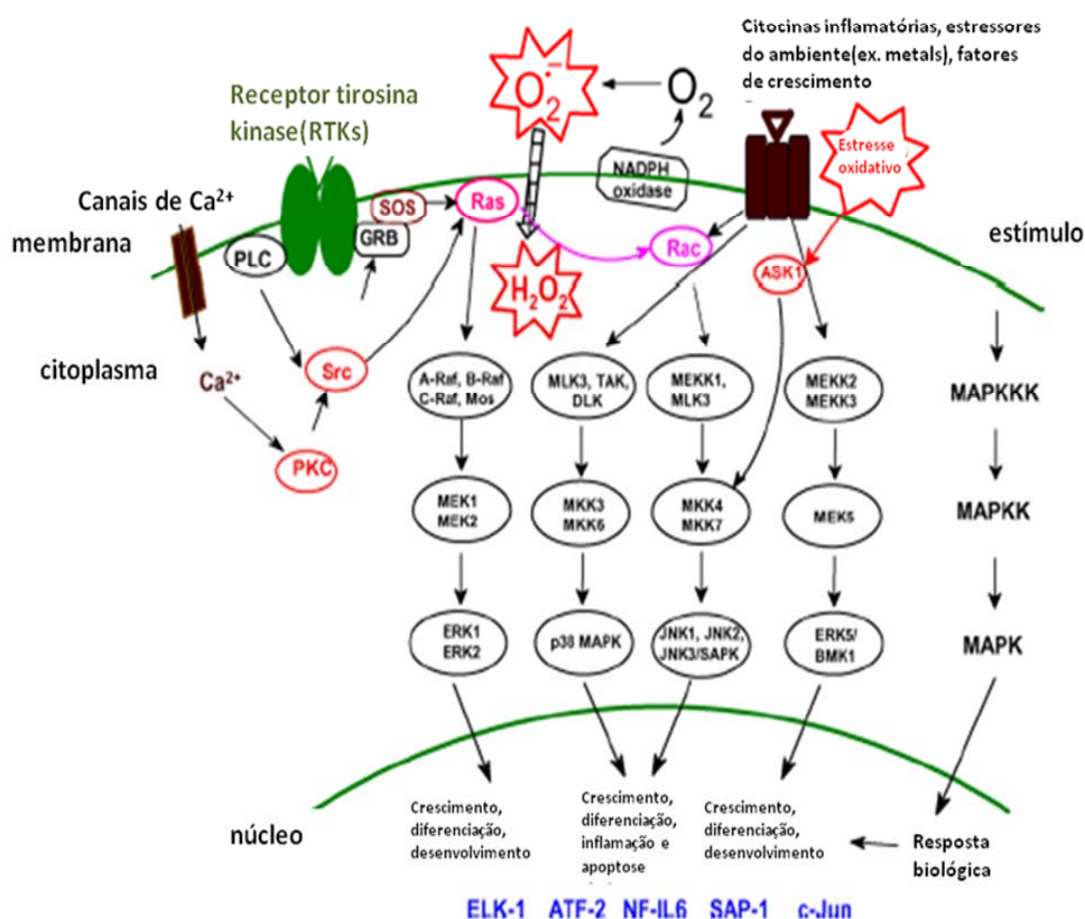
Para entender também a importância do ambiente oxidativo para a sobrevivência das células, procedeu-se a o tratamento com N-acetilcisteína. O tratamento com o antioxidante N-acetilcisteína demonstrou interferir na curva de proliferação das três linhagens ocasionando uma parada no crescimento do número de células, ou seja, o ambiente oxidativo é importante para os sinais proliferativos nas células.

O estresse oxidativo além de estar intrinsecamente relacionado com danos no DNA, está correlacionado também com vias de transdução de sinal; que agem em vias de crescimento celular, na diferenciação e na inflamação; podendo o estresse estar regulando estes fenótipos, ou até mesmo ROS atuando como mensageiro secundário. Neste trabalho, a curva proliferativa de células tratadas com o antioxidante NAC apresentou uma parada no crescimento celular, o que sugere uma importância do ambiente oxidativo das células para a proliferação celular. Descreve-se na literatura, que NAC pode atuar na inibição de quinase C-JUN-NH₂-terminal (JNKs), p38 MAPK, proteína ativadora sensível a redox-1(REF-1) e nas atividades do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-Kb); ou seja, em vias relacionadas com aumento da proliferação celular; e que são descritas serem reguladas ou ativadas por ROS (VALKO et al. 2007). Sendo assim, o efeito encontrado neste trabalho, pode estar relacionado com uma inibição nestas vias..

A atuação de NAC nas vias da proteíno-quinase ativada por mitógeno (MAPK) pode inibir as quatro famílias de MAPK: reguladas extracelularmente

(ERKS); quinase C-JUN-NH₂-terminal (JNKs), p38 MAPK e a grande MAPK-1 (BMAPK-1). As ativações destas vias podem desencadear em um aumento proliferativo, diferenciação e crescimento (VALKO et al. 2007) (Figura 16).

ROS têm demonstrado serem também segundos mensageiros do fator de ativação nuclear NF- κ B. A expressão deste fator está relacionado com a proliferação celular; enquanto a inibição, com o bloqueio proliferativo. Diferentes estudos vêm documentando a expressão ativada de NF- κ B em células tumorais de cólon, mama e pâncreas. A ativação deste fator é bloqueada por NAC (VALKO et al. 2007).



Fonte: Adaptado de VALKO et al. (2007)

Figura 16 - Estresse oxidativo ativa vias da MAPK.

Experimentos de fase clínica com NAC têm demonstrado diferentes resultados. O estudo *European Study on Chemoprevention with Vitamin A and N-acetylcystein* (EUROSCAN) foi realizado para compreender como vitamina A e N-acetilcisteína poderiam melhorar o prognóstico de pacientes tratados para câncer de cabeça e pescoço ou para câncer de pulmão. Ele demonstrou que após dois anos de suplementação alimentar com NAC 600mg/dia não houve benefício em relação à sobrevivência, a sobrevivência livre de eventos, ou ao aparecimento de tumores secundários (VAN ZANDWIJK et al. 2000). Já um estudo de um grupo italiano demonstrou o tratamento de câncer combinando diversas drogas incluindo NAC 1800mg por dia, apresentou efeitos positivos no estresse oxidativo e na elevação de marcadores inflamatórios em pacientes com câncer avançado (MANTOVANI et al. 2003). GOODSON et al. (2009) demonstrou que o uso oral de NAC diminui o efeito de UV na depleção de glutathiona reduzida, prevenindo assim o estresse oxidativo pró-oncogênico.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstrou-se que as células tumorigênicas (TM1 e TM5) são mais sensíveis ao estresse do retículo do que a linhagem não tumorigênica, melan-a. Este fato está correlacionado com uma redução de *N*-glicanos, uma parada no ciclo celular, ativação da via apoptótica de UPR (determinado pelo acúmulo de GRP78 e GADD153). Estes dados sugerem-nos que as células tumorigênicas dependem mais dos *N*-glicanos, constituindo uma possível resposta adaptativa (“addiction”). Adicionalmente, sugere que a perturbação da cascata de sinalização por UPR desempenha um papel na resposta citotóxica diferencial entre as células.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bennett DC, Cooper PJ, Hart IR. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **Int J Cancer** 1987; 39(3):414-8.

Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2006; 22:487-508.

Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. **J Cell Biol** 2003; 160:1115-27.

Camargo AA, Costa FF. Oncogenes e genes supressores de tumor. In: Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP, editores. **Bases da oncologia**. São Paulo: Tecmedd; 2003. p.71-73.

Campos AC, Molognoni F, Melo FH, Galdieri LC, Carneiro CR, D'Almeida V, Correa M, Jasiulionis MG. Oxidative stress modulates DNA methylation during melanocyte anchorage blockade associated with malignant transformation. **Neoplasia** 2007; 9:1111-21.

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.

Chevalier M, Rhee H, Elguindi EC, Blond SY. Interaction of murine BiP/GRP78 with the DnaJ homologue MTJ1. **J Biol Chem** 2000; 275:19620-7.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, 4th, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Hum Pathol** 1984; 12:1147-165.

Cotgreave IA, Gerdes RG. Recent trends in glutathione biochemistry--glutathione-protein interactions: a molecular link between oxidative stress and cell proliferation? **Biochem Biophys Res Commun** 1998; 242:1-9.

De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, Balansky RM. Mechanisms of N-acetylcysteine in the prevention of DNA damage and cancer, with special reference to smoking-related end-points review. **Carcinogenesis** 2001; 22:999-1013.

de Souza GA, Godoy LM, 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.

de Virgilio M, Kitzmüller C, Schwaiger E, Klein M, Kreibich G, Ivessa NE. Degradation of a short-lived glycoprotein from the lumen of the endoplasmic reticulum: the role of N-linked glycans and the unfolded protein response. **Mol Biol Cell** 1999; 10:4059-73.

Dwek RA. Glycobiology: toward understanding the function of sugars. **Chem Rev** 1996; 96:683-720.

Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: **INCA** 2009.

Gillissen A, Nowak D. Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy review. **Respir Med** 1998; 92:609-23.

Godoy LMF. **Análise proteômica da resposta de células de melanoma metastático humano ao tratamento com cisplatina**. Ribeirão Preto; 2004. [Tese de doutorado-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto].

Goodson AG, Cotter MA, Cassidy P, et al. Use of oral N-acetylcysteine for protection of melanocytic nevi against UV-induced oxidative stress: towards a novel paradigm for melanoma chemoprevention. **Clin Cancer Res**. 2009;15:7434-40.

Groenendyk J, Michalack M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. **Acta Biochimica Polonica** 2005; 52:381-95.

Guo HB, Liu F, Chen HL. Increased susceptibility to apoptosis of human hepatocarcinoma cells transfected with antisense N-acetylglucosaminyltransferase VcDNA. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 264:509-17. Erratum in: **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 266:615.

Guo HB, Liu F, Zhao JH, Chen HL. Down-Regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by tumorigenesis- or metastasis-suppressor genes and its relation to metastatic potential of human hepatocarcinoma cells. **J Cell Biochemistry** 2000; 79:370-85.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. **Physiol Rev** 2007; 87:1377-408.

Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. **Eur J Pharmacol** 2009; 625:234-46.

Hsu JL, Chiang PC, Guh JH. Tunicamycin induces resistance to camptothecin and etoposide in human hepatocellular carcinoma cells: role of cell-cycle arrest and GRP78. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 2009; 380:373-82.

Ide Y, Miyoshi E, Nakagawa T, et al. Aberrant expression of N-acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 341:478-82.

Ihara S, Miyoshi E, Nakahara S, et al. Addition of beta1-6 GlcNAc branching to the oligosaccharide attached to Asn 772 in the serine protease domain of matriptase plays a pivotal role in its stability and resistance against trypsin. **Glycobiology** 2004; 14:139-46.

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.

Jones J, Krag SS, Betenbaugh MJ. Controlling N-linked glycan site occupancy. **Biochim Biophys Acta** 2005; 1726:121-37.

Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res** 2001; 478:23-43.

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

Kobata A, Amano J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumours. **Immunol Cell Biol** 2005; 83:429-39.

Kondratyev M, Avezov E, Shenkman M, Groisman B, Lederkremer GZ. PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress. **Exp Cell Res** 2007; 313:3395-407

Kudo T, Nakagawa H, Takahashi M, et al. N-glycan alterations are associated with drug resistance in human hepatocellular carcinoma. **Mol Cancer** 2007; 6:32

Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, et al. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. **Cell** 2007; 129:123-34.

Lecca MR, Wagner U, Patrignani A, Berger EG, Hennot T. Genome-wide analysis of the unfolded protein response in fibroblasts from congenital disorders of glycosylation type-I patients. **FASEB J** 2005; 19:240-2.

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. **Mol Cell Biol** 2003; 23:7448-59.

Lin JH, Walter P, Yen TS. Endoplasmic Reticulum stress in disease pathogenesis. **Annu Rev Pathol Mech Dis** 2008; 3:399-425.

Lu Y, Xu YY, Fan KY, Shen ZH. 1-Deoxymannojirimycin, the alpha1,2-mannosidase inhibitor, induced cellular endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma cell 7721. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 344:221-5.

Ma Y, Hendershort LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **J Chem Neuroanatomy** 2004a; 28:51-65.

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

Madhavan S, Singh AK, Maheshawari RK. Tunicamycin enhances the anticellular activity of interferon by inhibiting G1/S phase progression in 3T3 cells. **J Interferon Cytokine Res** 2000; 20:281-90.

Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. **J Biol Chem** 2003; 278:9100-6.

Mantovani G, Macciò A, Madeddu C, et al. Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. **J Mol Med** 2003; 81:664-73.

Melnikova VO, Bar-Eli M. Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:997-1003.

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

Morton DL, Essner R, Kirkwood JM., Wollman RC. Malignant melanoma. In: Holland JF, Frei E, Bast RC Jr, Pollock RE, Kufe DW, Weichselbaum RR, editors. **Cancer medicine**. 6th ed. Ontário: Decker Inc; 2003. p.2467-99.

Nadanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K. Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. **Mol Cell Biol** 2007; 27:1027-43.

Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. **J Cell Biol** 2000; 150:731-40.

Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia** 2006; 8:231-41.

Otsu M, Sitia R. Diseases originating from altered protein quality control in the endoplasmic reticulum. **Curr Med Chem** 2007; 14:103-12.

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

Parodi AJ. Protein sweetener. **Nature** 2002; 415(6870):382-3.

Pyrko P, Schönthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. **Cancer Res** 2007; 67:9809-16.

Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat Rev** 2007; 33:9-23.

Reliene R, Schiestl RH. Antioxidant N-acetyl cysteine reduces incidence and multiplicity of lymphoma in *Atm* deficient mice. **DNA Repair (Amst)** 2006; 5:852-9.

Rosenberg B. Platinum complexes for the treatment of cancer: why the search goes on. In: Lippert B, editor. **Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug**. Zürich: Wiley-VCH; 1999. p.3-29.

Shang J, Körner C, Freeze H, Lehrman MA. Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. **Glycobiology** 2002; 12:307-17.

Sharma SV, Fischbach MA, Haber DA, Settleman J. "Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. **Clin Cancer Res** 2006; 12:4392s-4395s.

Sharma SV, Settleman J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. **Genes Dev** 2007; 21:3214-31.

Stanley P, Schachter H, Naoyuki Taniguchi N. N-Glycans. In: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, editors. **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p.85-100.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. **Lancet** 2005; 365:687-701.

Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we?. **Oncogene** 2003; 22:3042-52.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact** 2006; 160:1-40.

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

Van Zandwijk N, Dalesio O, Pastorino U, de Vries N, Van Tinteren H. EUROSCAN, a randomized trial of vitamin A and N-acetylcysteine in patients with head and neck cancer or lung cancer. For the european organization for research and treatment of cancer head and neck and Lung cancer cooperative groups. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:977-86.

Varki A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology** 1993; 3: 97-130.

Varki A, Sharon N. Historical background and overview. In: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, editors. **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p.1-15.

Varki A, Kannagi R, Toole BP. Glycosylation changes in cancer. In: Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J, editors. **Essentials of glycobiology**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009. p.537-50.

Wang L, Liang Y, Li Z, et al. Increase in beta1-6 GlcNAc branching caused by N-acetylglucosaminyltransferase V directs integrin beta1 stability in human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. **J Cell Biochem** 2007; 100:230-41.

Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, et al. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). **Mol Cell Biol** 1996; 16:4273-80.

Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. **Nat Clin Pract Oncol** 2006; 3:448-57.

Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, et al. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. **J Biol Chem** 2006; 281:32122-30.

Zuppini A, Groenendyk J, Cormack LA, et al. Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. **Biochemistry** 2002; 41:2850-8.

8 OBRA CONSULTADA

Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. **Guia de apresentação de teses**. São Paulo: A Biblioteca; 1998.
