BRUNNO SANTOS DE FREITAS SILVA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS METALOTIONEÍNA,
NFkB, CICLINA D1 E CDK4 EM LINHAGENS CELULARES
DERIVADAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE HUMANO**

São Paulo

2008

BRUNNO SANTOS DE FREITAS SILVA

**Estudo da Expressão das Proteínas Metalotioneína, NFkB, Ciclina
D1 e Cdk4 em linhagens celulares derivadas de Carcinoma
Epidermóide Humano**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto
Júnior

São Paulo

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva BSF. Estudo da expressão das proteínas metalotioneína, NFkB, Ciclina D1 e Cdk4 em linhagens celulares derivadas de Carcinoma Epidermóide Humano [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo,/....../....

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a) _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz e Dayse.

Por me ensinarem a perseverar sempre!

Sem vocês nada disso seria possível.

Essa vitória é de vocês.

Fernanda, amiga, companheira e incentivadora.

Esse trabalho também é seu.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Décio, só gratidão é pouco! Obrigado por sempre dizer o que eu realmente precisava ouvir, mesmo que não fosse o que eu queria que você dissesse. Obrigado por acreditar em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesmo. Agradeço por você ter sido não somente um mestre, mas sim, um grande amigo, o qual sempre me orientou, desde os tempos de graduação, depois na especialização e finalmente no mestrado. Obrigado por sempre ser honesto comigo e sempre presente. O que tenho mais para dizer? Obrigado!

AGRADECIMENTOS

Prof^a. Dra. Suzana C.O.M. de Sousa agradeço por ter contribuído tanto para a minha formação. Exemplo de pesquisadora e professora. Seus ensinamentos me acompanharão por toda a vida.

Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes agradeço pela amizade e atenção sempre que sua ajuda era solicitada. Obrigado por ter participado do meu amadurecimento científico.

Prof^a. Dra. Marina H.C.G. de Magalhães agradeço os ensinamentos transmitidos. Sempre presente, professora e pesquisadora exemplar.

Prof^a Dra. Marília Trierveiler Martins por participar ativamente no aprofundamento do meu aprendizado da Patologia Bucal.

Às Professoras Doutoras Andrea Mantesso e Karem Lopez Ortega, desde a graduação serviram de exemplo e estímulo para o meu ingresso na carreira acadêmica.

Rhoner Gonçalves, professor que me incentivou e que se tornou meu amigo e colega de pós-graduação. Obrigado.

Aos meus grandes amigos Helder, Flávia e Cury agradeço o apoio nos momentos mais difíceis, mas principalmente por tornarem a pós-graduação uma passagem mais tranquila. Nunca me esquecerei desses momentos.

Fábio Coracin, Paulo Sérgio, Erika Pereira, Flávia Caló e Tessa cada um de vocês participaram de um estágio especial dessa minha jornada. Obrigado!

Aos meus colegas de pós-graduação, aos quais convivi durante esse tempo, e que com certeza, fizeram o ambiente de trabalho mais alegre: Alexandra, Alexandre, Aline, Aluana, Arthur, Camila Rodini, Camila Fragata, Cristiane Barbosa, Fabiana, Felipe, Fernanda Giudice, Juliana, Kivia, Vanesa Chacon, Luciana, Márcio, Marco Aurélio, Fátima, Marina, Patrícia, Paulo Braz, Renata, Roberto, Thaís, Valtuir e Yonara.

Elisa, Bia, Zilda, Neia e Nair, obrigado! Vocês tenham certeza que me ajudaram muito.

*"Nunca conseguiremos encontrar a verdade
se nos contentarmos com aquilo que já foi
encontrado"*

Gilbert Tornai

“A descoberta consiste em ver o que todo mundo viu e pensar o que ninguém pensou”

Albert Szent-Gyorgyi

Silva BSF. Estudo da expressão das proteínas metalotioneína, NFkB, Ciclina D1 e Cdk4 em linhagens celulares derivadas de Carcinoma Epidermóide Humano [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

O carcinoma epidermóide por se tratar de uma doença genética, apresenta dificuldades em relação ao seu tratamento. As vias de sinalização celular por controlarem os mecanismos responsáveis pela proliferação e sobrevivência da célula, são de extrema importância nos estudos da biologia do câncer e oncogênese. Aberrações cromossômicas que afetam a estrutura e a expressão de genes e proteínas que regulam componentes das vias de sinalização são diretamente correlacionadas com o desenvolvimento e progressão tumoral. Vários genes e proteínas vêm sendo avaliados na busca de um alvo terapêutico quimioterápico, algo pouco estudado em carcinomas epidermóides bucais. Este trabalho teve como objetivo analisar a influência do quimioterápico 17-AAG e do fator de crescimento epitelial (EGF) nos níveis das proteínas NFkB, Ciclina D1 e Cdk4 nas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (HN6 e HN31) e no queratinócito imortalizado (HaCat). Este trabalho destinou-se também a estudar uma possível inter-relação entre as proteínas Metalotioneína e NFkB e suas interações com as proteínas Ciclina D1 e Cdk4 nas linhagens celulares HN6 , HN31 e (HaCat, para uma maior compreensão de seus efeitos nas vias de sinalização celular e conseqüente progressão do câncer). Para análise a respeito da localização e os níveis das proteínas MT, NFkB, Ciclina D1 e Cdk4 foram utilizados

ensaios de imunofluorescência e western blot, respectivamente. Os resultados apontaram um melhor perfil apoptótico da linhagem HN31 frente ao tratamento com 17-AAG, apresentando diminuição significativa dos níveis de NFkB e Ciclina D1, além de exibir importante decréscimo nos níveis de Cdk4. A proteína MT parece não sofrer ação do NFkB. A indução de proliferação celular realizada por EGF exerceu um aumento dos níveis das proteínas NFkB e Ciclina D1, sugerindo um papel importante das vias de sinalização estimuladas por EGF (Akt, NFkB e Ciclina D1) na progressão tumoral dessas linhagens. Por fim, a ocorrência de estímulo nos níveis da proteína MT por parte do EGF, sugeriram um importante papel do EGF e da MT na resistência a apoptose nas linhagens estudadas.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide, metalotioneína, NFkB, Ciclina D1, Cdk4, EGF e 17-AAG.

Silva BSF. Study of expression of proteins Metalotioneína, NFkB, Ciclina D1 and Cdk4 in cell lines derived from human squamous cell carcinoma [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Squamous cell carcinomas as a genetic diseases, presents certain difficulties in relation to their treatment. The process of cell signaling for overseeing the mechanisms responsible for cellular proliferation and survival are very important in studies of the biology of cancer and development. Chromosomal alterations affecting the structure and expression of genes and proteins that regulate the process of signaling components are directly correlated with the development and tumor progression. Several genes and proteins are being evaluated in the search for a biological marker that could help in the understanding of cancer as well as in its prognosis, and mainly in search of therapeutic target chemotherapy, something little studied in oral squamous cell carcinoma. This study aimed to examine the influence of chemotherapy 17-AAG and the epithelial growth factor (EGF) in the levels of proteins NFkB, Cyclin D1 and Cdk4 in strains of squamous cell carcinoma of the head and neck (HN6 and HN31) and immortalized in keratinocytes(HaCat). This work is also intended to explore a possible inter-relationship between the Metallothionein and NFkB proteins and their interactions with the proteins Cyclin D1 and Cdk4 in cell lines HN6, HN31 and (HaCat, to a greater understanding of its effects on pathways of cellular signaling and consequent progression of cancer. For analysis regarding the location and levels of the protein MT, NFkB, Cyclin D1 and Cdk4 were used tests of immunofluorescence and western blot. Results showed a better apoptotic profile of

HN31 treated with 17-AAG, showing decrease levels of NFkB and Cyclin D1, with a important decrease in the levels of Cdk4. The metallothionin protein does not appear to suffer action of NFkB. The induction of cell proliferation conducted by EGF had increased levels of NFkB and Cyclin D1 proteins, suggesting an important role in the process of signaling stimulated by EGF (Akt, NFkB and Ciclina D1) in tumor progression of oral squamous cell carcinoma. The occurrence to stimulate the levels of metallothionein protein by the EGF, suggest an important role of EGF and MT in resistance to apoptosis in the studied cell lines.

Keywords: HNSCC, metallothionein, NFkB, Cyclin D1, Cdk4, EGF and 17-AAG.

LISTA DE QUADROS DE TABELAS

Quadro 2.1 - Estimativa de câncer na população brasileira em 2008.....	23
Quadro 4.1 - Origem das linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	48
Quadro 4.2 - Anticorpos, concentrações, procedência e tempo de incubações usadas no ensaio de imunofluorescência.....	52
Quadro 4.3 - Concentrações, procedência, tempo de incubação dos anticorpos usados no western blotting.....	56
Tabela 2.1 - Estimativa de novos casos de câncer para 2008 na população brasileira.....	23

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.2 -	Esquemática da atuação das vias Akt, NFkB na Ciclina D1....	37
Figura 2.3 -	Esquemática dos eventos que regem o ciclo celular.....	39
Figura 2.4 -	Esquemática dos eventos que regem o ciclo celular.....	39
Figura 4.1 -	SDS-PAGE. Separação das proteínas por eletroforese, onde as moléculas são carregadas de cargas negativas e atraídas ao pólo positivo da cuba de separação.....	54
Figura 4.2 -	Bloqueio dos sítios inespecíficos com leite em pó desnatado (NFDM- No Fat Dry Milk).....	55
Figura 5.1 -	Teste de viabilidade celular realizado na linhagem HaCat com o <i>Kit Cell Titer 96</i> (MTS) Promega. Observou-se a diminuição de células viáveis frente à ação de 17-AAG (2µM)(p < 0.05 teste t Student). Pode-se observar também, sob a ação do EGF (10ng/ml), aumento significativo do número de células viáveis (p < 0.05 teste t Student).....	57
Figura 5.2 -	Teste de viabilidade celular realizado na linhagem HN6 com o <i>Kit Cell Titer 96</i> (MTS) Promega. Observou-se a diminuição de células viáveis frente à ação de 17-AA (2µM) apenas nas primeiras 24 horas (p < 0.05 teste t Student). Pode-se observar também, sob a ação do EGF (10ng/ml), aumento do número células viáveis em 36 horas (p < 0.05 teste t Student).....	58
Figura 5.3 -	Teste de viabilidade celular realizado na linhagem HN31 com o <i>Kit Cell Titer 96</i> (MTS) Promega. Observou-se a diminuição de células viáveis frente à ação de 17-AA (2µM) (p < 0.05 teste t Student). Pode-se observar também, sob a ação do EGF (10ng/ml), aumento do número células viáveis em 60 horas (p < 0.05 teste t Student).....	58
Figura 5.4 –	Localização da proteína MT nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	63
Figura 5.5 –	Localização da proteína NFkB nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	64
Figura 5.6 –	Localização da proteína Ciclina D1 nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	65

Figura 5.7 –	Localização da proteína Cdk4 nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG.....	66
Figura 5.8 –	Expressão das proteínas NFkB, MT, Ciclina D1 e Cdk4 estudadas na linhagem HaCat por western blot.....	67
Figura 5.9 –	Expressão das proteínas NFkB, MT, Ciclina D1 e Cdk4 estudadas na linhagem HN6 por western blot.....	67
Figura 5.10-	Expressão das proteínas NFkB, MT, Ciclina 1 e Cdk4 estudadas na linhagem HN31 por western blot.....	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Carcinoma Epidermóide	22
2.1.1 Epidemiologia	22
2.1.2 Etiologia	24
2.1.3 Características clínicas e histológicas	26
2.2 Metalotioneína (MT)	26
2.2.1 Metalotioneína e o ciclo celular	31
2.2.2 Expressão da Metalotioneína em neoplasias malignas	32
2.3 NFkB	33
2.3.1 Interação das vias PI3K e AKT no NFkB	36
2.3.2 NFkB e o ciclo celular	37
2.4 Ciclina D1 e CDK4	38
2.5 Hsp90 e 17-AAG	41
2.6 EGF	45
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Cultivo celular	48
4.2 Bloqueio da proliferação celular	50
4.3 Indução da proliferação celular	50

4.4 Contagem e avaliação da viabilidade celular.....	50
4.5 Imunofluorescência.....	52
4.6 Extração e quantificação das proteínas.....	53
4.7 Western blotting.....	54
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Viabilidade celular.....	57
5.2 Detecção da apoptose.....	59
5.3 Imunofluorescência.....	59
5.3.1 MT.....	59
5.3.2 NFkB.....	60
5.3.3 Ciclina D1.....	60
5.3.4 Cdk4.....	60
5.4 Western blotting.....	61
5.4.1 MT.....	61
5.4.2 NFkB.....	62
5.4.3 Ciclina D1.....	62
5.4.4 CDK4.....	62
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS.....	89

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna com maior incidência na boca, representando cerca de 3 a 5% dos cânceres de cabeça e pescoço. No Brasil as neoplasias malignas ainda apresentam grandes taxas de mortalidade, e a despeito dos avanços dos tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, a cirurgia continua sendo a modalidade mais eficaz nas neoplasias de cabeça e pescoço, mas que por outro lado, traz um importante comprometimento estético e funcional para o paciente além de ser insuficiente nos casos de neoplasias extensas adjacentes a áreas vitais.

Por se tratar de uma doença genética, apresenta certas dificuldades em relação aos tratamentos supracitados, principalmente por esta neoplasia ser diagnosticada em grande parte tardiamente. As vias de sinalização celular por controlarem os mecanismos responsáveis pela proliferação e sobrevivência celular, são de extrema importância nos estudos da biologia do câncer e oncogênese.

Vários genes e proteínas vêm sendo avaliados na busca de um marcador biológico que pudesse auxiliar na compreensão dessa neoplasia, e principalmente na busca de um alvo terapêutico quimioterápico, algo pouco estudado em carcinomas epidermóides bucais.

Entre essas proteínas, o fator de transcrição NFkB apresenta um papel importante em diversos eventos celulares, sendo responsável pelo controle da proliferação celular, angiogênese e metástase. Pesquisas indicam que o NFkB age no aumento dos níveis nucleares da proteína Ciclina D1, através da transcrição do

gene da referida proteína, o que resulta em uma proliferação celular aumentada e conseqüente progressão neoplásica.

Existem evidências que a desregulação dos níveis nucleares da ciclina D1 estão relacionadas à gênese tumoral, principalmente pela formação dos carcinomas de esôfago e do linfoma de células do manto. Progressos marcantes têm sido realizados para compreensão das alterações envolvidas nos eventos da sinalização celular e suas vias, sendo essas, relacionados à aquisição do fenótipo maligno.

Estudos prévios conduzidos na disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, mostraram que as células metastáticas do carcinoma epidermóide bucal (HN31), sob o tratamento com 17-AAG apresentavam respostas antiproliferativas mediante a diminuição dos níveis de AKT, e aumento na expressão das proteínas P53 e PTEN. A linhagem celular HN6 (carcinoma epidermóide de língua) continuou apresentando níveis significativos de AKT, o que sugere um potencial mais agressivo dessa linhagem devido à manutenção do comportamento proliferativo dessas células.

Tais resultados nos impulsionaram a investigar os efeitos do fármaco 17-AAG nos níveis das proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular (NFkB, Ciclina D1 e Cdk4), e por tal, apresentam-se como responsáveis no controle da progressão neoplásica.

Recentes estudos apontaram a ligação entre as proteínas MT e NFkB nos eventos regulatórios da inflamação, mas apesar de suas similaridades nas funções patofisiológicas, não se observam estudos que comprovem a inter-relação dessas proteínas em células neoplásicas derivadas carcinomas epidermóides.

Devido a essas semelhanças, torna-se plausível a análise de uma possível inter-relação entre as proteínas Metalotioneína e NFkB e suas interações com as proteínas Ciclina D1 e Cdk4 em culturas de linhagens celulares neoplásicas (HN6 e

HN31) e queratinócitos imortalizados (HaCat), para uma maior compreensão de seus efeitos nas vias de sinalização celular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermóide

2.1.1 Epidemiologia

Em países desenvolvidos o câncer de cabeça e pescoço representa sexta neoplasia mais comum, apresentando em média 13.000 óbitos por ano somente nos Estados Unidos, totalizando 5% dos tumores malignos diagnosticados na Europa (JEON et al., 2004). O carcinoma epidermóide corresponde a 90% desses tumores de cabeça e pescoço, apresentando aproximadamente 500.000 novos casos por ano no mundo (CHEN et al., 2006).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 segundo o INCA, válidas também para o ano de 2009, apontam 466.730 novos casos de câncer. Os cânceres da cavidade oral, representados pelos carcinomas epidermóides de lábio e orofaringe, corresponderão a 3% de todos os novos casos, totalizando 14.160. O carcinoma epidermóide bucal acomete principalmente pacientes acima dos 40 anos, e a incidência aumenta concomitantemente com a idade (NEVILLE et al., 1995). Estudos apontam (INCA, 2008) um aumento no número de mulheres acometidas, mesmo assim, ainda há predileção pelo gênero masculino (10.380 casos) na proporção de 3:1 (Tabela 2.1 e Quadro 2.1).

Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma.

Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer - INCA

Quadro 2.1- Estimativa de câncer na população brasileira em 2008 (www.inca.gov.br)

Estimativas, para o ano 2008, de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.*

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Tabela 2.1- Estimativa de novos casos de câncer para 2008 na população brasileira (www.inca.gov.br)

Esta neoplasia pode acometer qualquer região da boca. Os sítios mais acometidos podem variar de um país para outro, num reflexo à exposição a diferentes fatores de risco. Em levantamentos recentes, a língua mostra-se mais comumente afetada seguida pelo assoalho bucal (WHO, 2005).

2.1.2 Etiologia

O carcinoma epidermóide bucal é uma doença genética de patogênese multifatorial. Sua causa envolve fatores intrínsecos relacionados a alterações moleculares e celulares, e fatores extrínsecos iniciadores ou promotores como o tabaco e o álcool (SILVERMAN, 1998; WHO, 2005).

O tabaco possui um papel bem estabelecido na etiologia do carcinoma epidermóide bucal, sendo responsável tanto pelo processo de iniciação como de promoção (KARI et al., 1997). O tabaco chega a aumentar em cinco vezes o risco de desenvolvimento de carcinoma epidermóide e quando o álcool está associado ao tabaco o risco de desenvolver a malignidade pode chegar a 15 vezes (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASSURIYA, 2004; VARGAS et al., 2000). Jaber et al. (1999) afirmou que o risco de desenvolvimento de atipia epitelial na mucosa bucal diminui consideravelmente em pacientes que param de fumar por um período maior de 10 anos. Adicionalmente, o hábito de mascar betel é considerado como um dos maiores fatores de risco para o carcinoma de epidermóide bucal em alguns países asiáticos como Índia, Paquistão e Sri-Lanka.

A nicotina é o maior constituinte do tabaco, sendo responsável por causar sua dependência. As nitroaminas derivadas da nicotina, especialmente a nitrosamina N-nitrosonornicotina (NNN) e a 4- (metilnitrosamina -1-(3-piridil) -1- butanona (NNK) são sugeridas como participantes da carcinogênese do tabaco. A nicotina atua inibindo a apoptose, ao controlar a ação de enzimas proteína kinase C e a proteína nitrogênica ativadora de kinase. Ao lado desses efeitos, a nicotina modula os fatores de crescimento TNF- α (fator de necrose tumoral α), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- β (fator de crescimento transformante β) que em conjunto estimulam a proliferação celular (PRADO; TAVEIRA, 2003).

Ao consumo de álcool é atribuído um papel de promotor nos carcinomas epidermóides bucais promovendo um efeito sinérgico com o tabagismo (VENESS, 2003). O exato mecanismo como o consumo de álcool resulta na elevação do risco de desenvolvimento de carcinoma bucal permanece obscuro, pois os consumos de fumo e álcool em geral coexistem nos indivíduos (WIGHT; OGDEN, 1997). Alguns mecanismos têm sido propostos: o álcool pode atuar como solvente, facilitando a passagem dos carcinógenos através da membrana celular; o etanol pode alterar enzimas microssomais envolvidas no metabolismo dos carcinógenos no fígado, podem ativar substâncias carcinógenas; ou ainda ocasionam uma alteração do metabolismo intracelular das células epiteliais, que pode ser agravado por deficiências nutricionais. Entretanto, o etanol puro por si só não foi provado ser carcinogênico para a mucosa bucal (VENESS et al., 2003).

2.1.3 Características clínicas e histológicas

O carcinoma epidermóide bucal possui características clínicas variadas, que por vezes se apresentam na forma de lesões brancas, eritroplásicas ou manifestam-se como úlceras indolores nos tecidos bucais (NEVILLE et al., 1995).

Histologicamente o carcinoma epidermóide apresenta um padrão sólido de crescimento caracterizado pela proliferação de células epiteliais morfológicamente alteradas que possuem um potencial altamente invasivo.

2.2 Metalotioneína (MT)

Metalotioneínas são proteínas ubíquas presentes abundantemente nas células, de baixo peso molecular (6000-7000 Da), ricas em cisteína (aproximadamente 20 cisteínas). Essas proteínas possuem uma alta capacidade de se ligarem a uma variedade de átomos bivalentes, principalmente metais e outras substâncias como os radicais livres (CARDOSO et al., 2002; KAGI; SCHAFFER, 1988). Essas ligações ocorrem nos resíduos “sulfur” das cisteínas, sendo controladas dinamicamente pelo ambiente oxido redutivo da célula (CARDOSO et al., 2002; FISHER; DAVIE, 1998).

MTs não são encontradas somente no reino animal, mas também em microorganismos procariotas, assim como em plantas (ROMERO-ISART; VASAK, 2002; VASAK; HASLER, 2000; HAQ; MAHONEY; KOROPATINICK, 2003).

A proteína não ligada a metais é denominada de tioneína é expressa transitoriamente em células não neoplásicas em condições de deficiência de Zinco (Zn). Há quatro tipos de metalotioneínas em mamíferos, chamadas 1, 2, 3 e 4 isoformas. As posições das cisteínas são as mesmas nessas isoformas. MT-1 e MT-2 são expressas em quase todos os órgãos do corpo, células em cultura, e são induzidas por uma grande variedade de agentes indutores de estresse, como metais pesados e agentes oxidativos. MT-1 e MT-2 apresentam maior expressão no fígado, estando envolvidas na manutenção da homeostasia do Zn. MT-3 é expressa no cérebro e sua ação é de inibição da proliferação neuronal. MT-4 é expressa especificamente em células epiteliais da língua e da pele e possui a função relacionada à diferenciação de células epiteliais escamosas de epitélios estratificados (SATO; KONDOH, 2002; THEOCHARIS et al., 2004; VASAK; HASLER, 2000).

Apesar de muitas décadas de intensas pesquisas, as precisas ações fisiológicas das MTs não têm sido totalmente identificadas. A Metalotioneína aparece ligando-se a metais essenciais (como cobre e zinco) e tóxicos (como mercúrio e cádmio), levando a crer que têm grande importância na manutenção da homeostase de metais essenciais e na desintoxicação (NORDBERG; NORDBERG, 2000). Outro modelo sugerido de função das metalotioneínas prega que essas proteínas serviriam de doadoras de Zn para proteínas, afetando suas funções, como por exemplo, modulando a ligação do DNA a fatores de transcrição que apresentem estruturas ditas de dedos de zinco, como Sp1, TFIIA (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; THEOCHARIS et al., 2004; VASAK; HASLER, 2000). Às proteínas MT-1 e MT-2 têm sido sugerido um papel de chaperonas, fornecendo zinco e cobre, após injúria tecidual, a vários fatores de transcrição, metaloenzimas e fatores de crescimento

requeridos para o reparo e rápido crescimento celular. Por outro lado, apo-MT é capaz de inativar, ao remover Zn, a ligação ao DNA de fatores de transcrição com apresentem dedos de Zn (CHERIAN; KANG, 2006; ROMERO-ISART; VASAK, 2002; SATO; KONDOH, 2002; VASAK; HASLER, 2000).

Outro interessante aspecto da reatividade da família das MTs é sua habilidade em reagir com alguns radicais livres. Nesse sentido, tem sido mostrado que MTs, em função de seu alto teor de cisteína, são eficientes captadoras de espécies reativas do oxigênio, como peróxido de oxigênio (H_2O_2), hidroxilas (OH), superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), dessa forma protegendo os tecidos contra injúrias oxidativas, incluindo radiação, peroxidação lipídica, estresse oxidativo causado por drogas anticancer e condições de hiperoxidação (SATO; KONDOH, 2002; THEOCARIS et al., 2004).

Outras adicionais funções sugeridas incluem adaptação de estresse, regulação do crescimento neural e efeitos antiapoptóticos (ROMERO-ISART; VASAK, 2002; SATO; KONDOH, 2002).

Em humanos os genes das MTs estão agrupados na região q13 do cromossomo 16 e incluem pelo menos 11 genes MT-1 alguns dos quais podem codificar RNAs não funcionais. Os genes MT-1 e MT-2 contêm regiões TATA boxes e iniciadoras, necessárias para recrutar o fator de transcrição IID (TFIID), além de uma região contendo uma série de elementos regulatórios de metal, chamada MREs (do inglês metal regulatory elements) que são requeridos para indução de metais. Importante salientar que MREs atuam em conjunção com fatores de transcrição dependentes de Zn, ditos MTF-1 (do inglês zinc-responsive transcription factor). Após estresse (hipóxia ou condições oxidativas) ou exposição a metais, MTF-1

transloca-se do citoplasma para o núcleo, onde se liga a MREs. As MT-3 e MT-4 são induzidas por mecanismos diferentes das MT-1 e MT-2, ainda não completamente elucidados. As expressões das MT-1 e MT-2 são induzidas por estresse químico promovido por metais (Zn; Cd, Hg, Cu, Bi e Ni), por citocinas (IL-6, IL-1 α , IL-1 β ; TNF- α), por espécies reativas do oxigênio, glicocorticóides, por estresse físico via fatores de transcrição, como por alterações estruturais na cromatina (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; SATO; KONDOH, 2002, VASAK; HASLER, 2000;). Metilação do DNA pode reprimir a transcrição das MTs de alguns modos: inibindo a ligação de fatores aos promotores, recrutando co-repressores transcricionais e alterando a estrutura da cromatina (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003).

O aspecto característico de todas as metalotioneínas é a ocorrência da sequência tripeptídica Cys-Xaa-Cys, onde Xaa representa um resíduo de aminoácido diferente de Cys (ROMERO-ISART; VASAK, 2002). Cada molécula de MT pode ligar-se a sete moléculas de Zn e Cd em dois domínios distintos, um domínio amino-terminal (grupo α) e outro domínio carboxi-terminal (grupo β). Após quatro moléculas terem sido ligadas por 11 cisteínas no grupo α , três moléculas de metal são capturadas por nove cisteínas no grupo β . Essas observações sugerem diferenças nas funções fisiológicas entre os dois grupos. Os estudos indicam que Zn no grupo β está envolvido na regulação da respiração mitocondrial promovida pela MT (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; MARET, 2000; SATO; KONDOH, 2002; VASAK; HASLER, 2000).

As MTs contêm de 60 a 68 aminoácidos, dos quais 20 são cisteínas altamente conservadas. A estrutura primária da MT-3 (68 aminoácidos) mostra um novo motif Cys(7)-Pro-Cys(8)-Pro e duas inserções: uma treonina na posição 5 e um ácido hexapeptídeo na posição 53, quando comparada com as clássicas sequências

das MT-1/MT-2 de 61 e 62 aminoácidos respectivamente. A presença dos dois novos e conservados resíduos Pro tem sido mostrado ser importante para a atividade dessa MT-3. Na estrutura primária da MT-4 epitelial, uma inserção Glu também na posição 5 foi encontrada. Já a MT-3 exibe 70% de identidade seqüencial com as isoformas MT1/MT-2 (ROMERO-ISART; VASAK, 2002). A estrutura tridimensional da Cd_5 , Zn_2 -MT-2 mostra uma proteína monomérica em forma de halteres com sete íons metálicos localizados em dois grupos distintos de metal-tiolato: uma distorcida cadeia com um grupo com três metais, $M3^{II}Cys_9$, localizado no domínio- β N-terminal um grupo com quatro metais, $M4^{II}Cys_{11}$ no domínio- α C-terminal. Os íons metálicos encontrados são Zn (II) ou Cd (II). Cd_7 -MT-1 mostra alta similaridade com Cd_7 -MT-2. A outra metalotioneína que possui a forma estrutural conhecida é a MT-3. Embora a localização dos grupos que contêm os íons metálicos seja desconhecida, sugere-se que o grupo Cu_4 é mais provavelmente localizado no domínio- β N-terminal da proteína, enquanto no domínio- α possua três íons zinco. Enfim, as propriedades estruturais gerais que caracterizam todas as metalotioneínas são a formação de grupos metal-tiolato ligando os grupos cisteinil tiolato (ROMERO-ISART; VASAK, 2002; MARET, 2000; HAQ; MAHONEY; KOROPATNIK, 2003).

A composição de metal das proteínas nativas depende da origem natural e prévia exposição aos metais. As induzíveis formas MT-1 e MT-2 isoladas de um fígado de um adulto e de um feto humano contêm principalmente zinco, já aquelas isoladas de rins de adulto contêm principalmente cádmio, com algum cobre e zinco. No fígado e rins de mamíferos as isoformas MT-3 e MT-4 contêm zinco e cobre. Enquanto nos mamíferos as metalotioneínas ligam-se simultaneamente ao zinco, cádmio ou cobre, MTs de leveduras e fungos contêm exclusivamente cobre (ROMERO-ISART; VASAK, 2002).

2.2.1 Metalotioneína e o ciclo celular

A localização da MT na célula é importante para o entendimento de suas funções fisiológicas. MT é normalmente encontrada no citoplasma, podendo usualmente ser transferida para o núcleo, sugerindo que essas alterações em sua localização possam ser dependentes do ciclo celular. A localização nuclear de MT em células na transição da fase G1 para a fase S, em células que estão experimentando rápida proliferação ou após injúria celular, indica que alta demanda de zinco para o reparo de DNA e síntese coincide com a indução da síntese de MT e seqüestro de Zn, e posterior transferência de Zn para as enzimas (BEYERSMANN; HAASE, 2001; CHERIAN; KANG, 2006; SATO; KONDOH, 2002).

Em pré-adipócitos e em miofibroblastos a quantidade de MT no núcleo aumenta durante o processo de diferenciação celular. Três diferentes proteínas quinases possuem capacidade de translocar MT do citoplasma para o núcleo durante a diferenciação celular: MAP quinase, PI3- quinase e P70S6-quinase. Como MT não é fosforilada por proteínas quinases, parece lícito afirmar que mediadores não conhecidos são necessários para translocação nuclear de MT. Altos níveis de Zn nuclear são necessários para as funções nucleares durante as etapas precoces e diferenciação celular (BEYERSMANN; HAASE, 2001).

MT localizada no citoplasma tem um efeito supressor dos danos oxidativos causados por ter-butilhidroperóxido e da citotoxicidade dos metais pesados, já MT localizada no núcleo não mostrou tais efeitos supressores de danos. MT nuclear também mostrou efeito protetor contra danos no DNA causado por radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio, por outro lado evidências recentes apontam

efeitos antiapoptóticos da MT quando localizada no núcleo (ABDEL-MAGEED; AGRAWAL, 1998). Há uma correlação entre a malignidade do câncer e a quantidade de MT expressa em células neoplásicas, assim como a supressão da apoptose se relaciona com aumento da expressão da MT (BEYERSMANN; HAASE, 2001; SATO; KONDOH, 2002).

2.2.2 Expressão da Metalotioneína em neoplasias malignas

A MT vem sendo apontada como responsável pela resistência das células neoplásicas aos agentes quimioterápicos. Em diversos tumores há relatos de alta expressão de MT relacionada à inibição da apoptose, progressão tumoral (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003), e a propriedades associadas ao desenvolvimento, resistência ao tratamento e no prognóstico de várias neoplasias malignas.

Em 1998, Abdel-Mageed e Agrawall correlacionaram a superexpressão da MT em células de carcinoma com um efeito antiapoptótico provindo da ativação do NFkB. Os efeitos antiapoptóticos mostram-se relacionados a uma interação específica com a subunidade p50 de NFkB, sendo que MT pode ser requerida para estabilizar a ligação de NFkB ao DNA e desse modo realizar seus efeitos antiapoptóticos (VASAK; HASLER, 2000).

Kim et al. (2003) verificaram um aumento na expressão da MT relacionada à diminuição do efeito inibitório do Zn na atividade do NFkB.

Estudos mostram também uma relação entre alta expressão de metalotioneína em tumores e presença do supressor de tumor p53 mutado (SATO; KONDOH, 2002; THEOCHARIS et al., 2004), resultados que sugerem um verdadeiro papel na avaliação do caráter agressivo dessas neoplasias.

2.3 NFkB

Em 1986 Baltimore¹ e colaboradores descreveram o fator nuclear kB (NFkB) sendo um fator de transcrição nuclear em células B, e o relacionaram com o aumento de produção da cadeia kappa de imunoglobulina (AGGARWAL, 2004).

NFkB compreende um conjunto de fatores de transcrição envolvido na promoção da expressão de mais de 150 genes envolvidos em uma ampla variedade de processos biológicos: resposta imune, inflamação, reabsorção óssea, AIDS, oncogênese; diabetes; doenças do coração e doença de Alzheimer.

A ativação de NFkB não está relacionada somente a eventos da progressão neoplásica, mas está associado também a um mecanismo de resistência das células neoplásicas aos agentes quimioterápicos anti-neoplásicos. NFkB não se apresenta constitutivamente ativado em células normais, exceto em células T proliferantes, células B, monócitos e astrócitos (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; KUMAR et al., 2004; MOYNAGH, 2005; PERKINS, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

¹ Baltimore D, Sen R. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by posttranslational mechanism. Cell 1986;47(1):921-8.

A família de proteínas NFκB consiste de cinco proteínas estruturalmente relacionadas e funcionalmente conservadas: Rel A (p65), Rel B, c-Rel, NF-κB1 (p50/p105) e NF-κB2 (p52/p100) (CAO; KARIN, 2003; SUH; RABSON, 2004). As proteínas NFκB podem ser agrupadas em dois grandes grupos: o primeiro grupo composto pelas proteínas p105 e p100. Ambas possuem um domínio C-terminal que contém múltiplas cópias repetidas de anquirinas, o qual atua reprimindo a atividade dessas moléculas. Membros desse grupo não funcionam como fatores de transcrição, sendo sintetizadas na forma de precursores inativos (CAO; KARIN, 2003; LI; STARK, 2002; SUH; RABSON, 2004). Quando os segmentos contendo anquirinas são alvo de proteólise dependente de ubiquitinização no proteossomo ocorre a remoção do domínio C-terminal e a transformação da proteína p105 em p50 e da proteína p100 em p52, gerando proteínas maduras, o que equivale dizer com capacidade transcricional (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HACKER; KARIN, 2002; MOYNAGH, 2005; PERKINS, 2004; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001).

O segundo grupo de proteínas NFκB inclui p65 (Rel A), Rel (c-Rel), Rel B. As proteínas do segundo grupo NFκB, diferente das proteínas do primeiro grupo, além do domínio RH, possuem um ou mais domínios TAD (do inglês transcricional activation domains) na região C terminal. Os domínios TAD promovem transcrição por facilitar o recrutamento de co-ativadores e deslocamento de repressores (HACKER; KARIN, 2002; HAYDEN; GOSH, 2004; LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001).

As proteínas da família NFκB formam homo e heterodímeros, nos quais as formas ativas mais comuns são p50/Rel A ou p52/Rel A. Outros exemplos de homo e heterodímeros possíveis incluem: A proteína p65/p50, RelB/p100, p52/p50, c-Rel

com p50 e p65, p65/p65, p65/p50, p65/p52, p52/c-Rel, p50/c-Rel, p65/c-rel, RelB/p50, RelB/p52, c-rel/c-rel (HAYDEN; GOSH, 2004; LI; STARK, 2002).

Em células não estimuladas, proteínas da família NF κ B existem como heterodímeros ou homodímeros seqüestradas no citoplasma em função da associação não covalente com membros a família de proteínas inibitórias I κ B (DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; LI; STARK, 2002; MOYNAGH, 2005; SCHUCHMANN; GALLE; 2002; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001). A família I κ B apresenta sete membros: I κ B α , I κ B β , Bcl-3, I κ B ϵ , I κ B γ e as proteínas precursoras NF- κ B1/p105 NF- κ B2/p100 que possuem de cinco a sete anquirinas nos domínios C-terminal que se ligam ao domínio RH das proteínas NF κ B, retraindo, dessa maneira, a proteína NF κ B no citoplasma (AGGARWAL, 2004; CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HACKER; KARIN, 2002; HAYDEN; GOSH, 2004; MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2004).

I κ B α liga-se ao dímero p65/p50 mascarando somente a seqüência de localização nuclear (NSL) de p65, permanecendo a seqüência de localização nuclear de p50 acessível. A presença acessível tanto de NSL em p50 como da seqüência de exportação nuclear em I κ B α , permite uma constante movimentação do complexo I κ B α /NF κ B entre o núcleo e o citoplasma, embora a localização predominante seja citoplasmática (HAYDEN; GOSH, 2004; SUH et al., 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001).

I κ B α também regula a atividade NF κ B ao entrar no núcleo onde se liga a subunidade p65 e a conduz para o citoplasma, desse modo reduzindo os níveis de p65 no núcleo e a atividade de NF κ B.

Sinais extracelulares, incluindo citocinas (TNF α e IL-1), CD40 ligand (CD40L), bactérias (lipopolissacárides-LPS), vírus e agentes que promovam estresse, permitem ativação de quinases inibidoras de I κ B (IKK), que são capazes de fosforilar dois resíduos específicos de serina (Ser 32 e Ser36) de I κ B α e nos resíduos Ser19 e Ser23 em I κ B β . Uma vez fosforiladas as proteínas I κ B são reconhecidas por um complexo de ubiquitina ligase SCF contendo β -TrCP ou complexo E3^{I κ B} ubiquitina ligase, permitindo suas ubiquitinações e degradação no proteossomo 26 (CAO; KARIN, 2003; KUMAR et al., 2004; MOYNAGH, 2005; RAVI; BEDI, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001). A destruição de I κ B permite a translocação para o núcleo dos dímeros de NF κ B e sua posterior ligação ao promotor de genes alvos (CAO; KARIN, 2003; DOLCET et al., 2005; HAYDEN; GHOSH, 2004; LI; STARK, 2002; SCHUCHMANN; GALLE; 2002).

2.3.1 Interação das vias PI3K e AKT no NF κ B

As proteínas PI3K e Akt têm sido requeridas para ativação de NF κ B, induzida por TNF α e Interleucina 1 (IL-1), através da fosforilação e ativação da subunidade p65. A proteína Akt tem sido implicada, também, na ativação de NF κ B induzida pela proteína Ras através da fosforilação e ativação de IKK β (Figura 2.2) (LI; STARK, 2002; RAVI; BEDI, 2004).

2.3.2 NFkB e o ciclo celular

Uma vez liberada, NFkB transloca-se para o núcleo e promove a progressão do ciclo celular por regular a expressão de vários genes envolvidos na maquinaria do ciclo celular como as ciclinas D1, D2, D3 e E, além de c-myc e c-mycb. Expressão de ciclina D1 induzida por NFkB parece ser o elemento chave no desenvolvimento de glândulas mamárias e carcinogênese de mama (AGGARWAL, 2004; DOLCET et al., 2005; KUMAR et al., 2004; RAVI; BEDI, 2004; SUH; RABSON, 2004; YAMAMOTO; GAYNOR, 2001).

Por causa de seu papel no controle de genes responsáveis pela sobrevivência celular, adesão celular, inflamação, diferenciação, e crescimento celular, o NFkB aparece isoladamente implicado no processo de formação de diversas neoplasias.

Figura 2.2 - Esquemática da atuação das vias Akt, NFkB na Ciclina D1 (www.calbiochem.com)

2.4 Ciclina D1 e CDK4

O ciclo celular é mecanismo altamente regulado devido a sua divisão em fases 4 distintas: Duas fases *gap* G1 e G2, separando a (S) de síntese de DNA da fase (M) de mitose. A progressão através de cada fase do ciclo celular é regida por complexos formados entre as Ciclinas, e as subunidades catalíticas CDKs. A passagem através da fase G1 é iniciada por um estímulo mitogênico, o qual inicia a expressão e união das Ciclinas D (D1, D2 e D3) com as suas respectivas subunidades catalíticas: CDK4/CDK6 (BENZENO et al., 2006).

Em células de mamíferos, os complexos formados entre as Ciclinas D e as subunidades CDKs, principalmente CDK4 e CDK6, induzem a fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma), realizando a liberação de uma cascata de fatores de transcrição e formação de novos complexos relacionados com o controle e progressão do ciclo celular (KOTELNIKOV et al., 1997).

Entre os três tipos de Ciclinas D, a Ciclina D1 têm sido caracterizada como um verdadeiro oncogene. Essa proteína é codificada pelo gene CCND1 localizado no cromossomo 11q13 (SHUURING et al., 1992). A Ciclina D1 apresenta-se superexpressa em uma grande variedade de neoplasias (BARTKOVA et al., 1995). A superexpressão da Ciclina D1 pode ser resultante de um re-arranjo gênico por translocação. Esse mecanismo foi descrito em alguns tumores de glândula paratireóide, nos quais o gene CCND1 aparece regulando os genes promotores do parato-hormônio (MOTOKURA et al., 1991).

O complexo formado entre a Ciclina D1 e Cdk4 leva a progressão da fase G1 do ciclo celular via mecanismos quinase-dependentes e quinase-independentes. A inativação da Rb requer fosforilação direta das Cdk's. Adicionalmente, o complexo Ciclina D1/Cdk4 age como um atrativo para as proteínas inibidoras de Cdk's p21 e p27 (CIP1 e KIP1), promovendo a estabilização do complexo Ciclina D1/Cdk4 (Figura 2.3) e levando a liberação de Cdk2 da ação inibitória do p21 e p27 (Figura 2.4) (CHENG et al., 1999).

Figura 2.3 – Esquemática dos eventos que regem o ciclo celular (TODD et al., 2002)

Figura 2.4 – Esquemática dos eventos que regem o ciclo celular (TODD et al., 2002)

Em muitos tumores de origem epitelial, a Ciclina D1 mostra-se superexpressa em consequência à amplificação da região 11q13 (SHUURING et al., 1992). A literatura relata que a Ciclina D1 apresenta-se desregulada em 30 a 65% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e em 15 a 40% dos carcinomas de mama (BARTKOVA et al., 1995; BERENSON; YANG; MICKEL, 1989; GILLET et al., 1994; MICHALIDES et al., 1995; ZUKERBERG et al., 1995).

Até o final da década de 90, muitos estudos relacionavam somente a superexpressão da Ciclina D1 com a transformação neoplásica (BARTKOVA, 1995; BERENSON, 1989; GILLET et al., 1994; MICHALIDES et al., 1995; ZUKERBERG, 1995). Quelle et al.(1993) e Resnitzky et al.(1994) demonstraram que somente o aumento dos níveis de Ciclina D1 não eram suficientes para induzir a transformação celular. Trabalhos mais recentes sugerem que desregulação da localização da Ciclina D1 na célula pode ser a real contribuinte para a transformação neoplásica (LU; GLADDEN; DIEHL, 2003; SOLOMON et al., 2003).

Lu, Gladden e Diehl (2003) em um estudo imunoistoquímico em espécimes de carcinomas primários, revelaram marcações predominantemente nucleares, provendo assim, evidências do papel da localização nuclear da Ciclina D1 nos cânceres humanos.

Lovec et al. (1994) sugeriram a ação direta da Ciclina D1 na transformação neoplásica, provavelmente via ras. Em outro trabalho demonstraram uma possível cooperação da Ciclina D1 com Myc na formação de linfomas.

Cheng et al. (1998) verificaram que a expressão da Ciclina D1 depende da ativação da cascata Raf-Mek-Erk Kinases via ras. Estudos adicionais constataram que o máximo acúmulo de Ciclina D1 depende da ativação do Akt via

phosphatidylinositol 3'-Kinase-dependent (PI3K) e concomitante inativação de *glycogen synthase kinase-e beta* (GSK-3 β) (KAUFFMAN-ZEH et al., 1997; RODRIGUEZ-VICIANA et al., 1994). A fosforilação da Ciclina D1 por GSK-3 β na treonina 286 (Thr-286) desencadeia a exportação nuclear e proteólise citoplasmática da Ciclina D1 via 26S *proteosome* (GLADDEN; DIEHL, 2005), confirmando a importância do GSK-3 β no controle dos níveis nucleares de Ciclina D1. A perda da exportação nuclear da Ciclina D1 pode ser resultante de mutações diretas no gene CCND1, ou mutações específicas em genes que regulam as vias de sinalização *upstream* a Ciclina D1 (GLADDEN; DIEHL, 2005).

Atualmente as questões giram em torno da Ciclina D1 de localização nuclear, e seu papel no desenvolvimento de neoplasias. Essas observações acima descritas nos dão bases significantes para condução de estudos acerca da prevalência da Ciclina D1 no núcleo e seu verdadeiro papel no desenvolvimento de neoplasias.

2.5 Hsp90 e 17-AAG

As *heat-shock proteins* (Hsp) foram descritas primeiramente em 1962 através de pesquisas realizadas em *Drosófilas*, onde foi identificado um aumento dos níveis de algumas proteínas quando submetidas a altas temperaturas (GOETZ et al., 2003). Essas Hsps mostraram-se responsáveis pela facilitação do transporte de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular e apoptose, além de estabilizarem a dobra de políptídeos que agiriam em colaboração aos eventos de sobrevivência celular.

Por tal, a Hsps tem sido alvo de estudos nos tratamentos quimioterápicos (GEORGAKIS et al., 2006).

A expressão das Hsps encontra-se aumentada em células sob estresse, elevando a síntese dessas chaperonas que exercem uma proteção às proteínas mais sensíveis, como também, agem na lise de proteínas danificadas. Esses eventos foram relacionados a um aumento na sobrevivência celular frente à exposição de agentes agressores como: radiações ionizantes e agentes tóxicos (TOKALOV; PIECK; GUREIT, 2007).

As Hsps, na ausência do estresse atuam em muitas funções, como ativação de fatores de transcrição, ativação de proteínas regulatórias, e nos eventos da sinalização celular. Essas proteínas agem como chaperonas formando complexos moleculares que se ligam a *client proteins*, complexos estes, responsáveis por desempenhar um papel regulatório da função dessas proteínas em diferentes locais, como: proteínas no citosol, retículo endoplasmático e mitocôndria (GOETZ et al., 2003).

A expressão de Hsps em neoplasias tem se mostrado variável, mas em sua totalidade apresentam-se marcadamente atípicas, levando a alusão de que as Hsps podem ser usadas como marcadores prognósticos em diversos tumores, como nos pacientes com câncer de mama ou câncer gástrico que tem a superexpressão dessas proteínas conexas a um pior prognóstico (JOLLY; MORIMOTO, 2000).

As proteínas Hsps são denominadas de acordo com os seus pesos moleculares, sendo a 90kDa Hsp denominada Hsp90, uma das Hsps mais abundantes nas células. A Hsp90 é encontrada em células neoplásicas e não-neoplásicas, embora apenas nas células neoplásicas esta chaperona se encontra

na forma ativa, e comprovadamente mais sensíveis ao bloqueio farmacológico (GEORGAKIS et al., 2006).

Hsp90 é um homodímeros fosforilado constituído por ligações covalentes (duas ou três) em cada monômero. Na sua porção N-terminal esta chaperona possui um domínio ATP conservado, sendo necessária para sua ativação a hidrólise de ATP (GOETZ et al., 2003).

Esta chaperona molecular tem grande importância devido à variedade de *client proteins*, em parte, proteínas que exibem superexpressão e mutações associadas à transformação neoplásica, como também, por grande parte delas estarem relacionadas a eventos da sinalização celular, proliferação e sobrevivência (GOETZ et al., 2003).

As Hsps mostram-se superexpressas em diversas neoplasias, desde as de origem epitelial (carcinoma epidermóide bucal e carcinoma de mama) até as neoplasias de origem mielóide (leucemias) e linfóide (linfoma de Hodgkin) (GEORGAKIS et al., 2006).

Algumas proteínas relacionadas com o desenvolvimento e a progressão do carcinoma epidermóide bucal são alvos da Hsp90. Akt, p53 mutante e CDK4 são *client proteins* da Hsp90 (BASSO et al., 2002; CALDERWOOD et al., 2006; GOETZ et al., 2003), sendo a desestabilização dessas proteínas alvos importantes para terapia antitumoral.

Basso et al. (2002) relataram que a inibição da Hsp90, resultou em uma diminuição significativa de Akt e Ciclina D1 em células derivadas de câncer de mama. Esses autores relacionaram a diminuição de Akt à desestabilização desta proteína pela perda da Hsp90. Já a diminuição da Ciclina D1 foi associada a uma

conseqüente queda dos níveis de Akt resultando numa hipofosforilação da proteína Retinoblastoma (Rb) por parte do complexo Ciclina D1/ CDK4.

Um estudo de 1996 mostrou que maturação da CDK4 é dependente da Hsp90, por esse motivo essa proteína quinase também se tornou um alvo direto dos inibidores da referida chaperona (STEPANOVA et al., 1996).

Em aproximadamente metade dos cânceres humanos o p53 encontra-se mutado ou por vezes ausente. Este gene possui o papel de proteção das células contra danos genéticos, exibindo um importante controle no processo pró-apoptótico (BROOKS; GU, 2004). Pesquisas demonstram que p53 mutante, para adquirir sua nova conformação, necessita de interação transitória com Hsp90. As terapias anti-câncer que apresentam como alvo a proteína Hsp90 proporcionam a desestabilização de p53 mutante e aumento dos níveis de p53 selvagem (BLAGOSKLONNY et al., 1996; GOETZ et al., 2003; SHINTANI et al., 2006).

Pelo processo de carcinogênese envolver um grande número de vias de sinalização celular, e por essas vias freqüente apresentarem interações umas com as outras, torna-se muito difícil a atuação em um alvo específico. 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) é um derivado das geldamicinas capaz de interagir com uma série de alvos presentes nos processos da carcinogênese. Este medicamento é caracterizado por sua interação com nucleotídeos em Hsp90 afetando a estrutura e desestabilizando essa chaperona. Ao contrário da geldamicinas, 17-AAG têm demonstrado além de uma grande atividade antitumoral, boa tolerância biológica e menor toxicidade, tanto que este fármaco encontra-se em fase I de experimentação clínica (SHARP et al., 2007).

Apesar da Hsp90 estar presente tanto em células normais como em celular neoplásicas, 17-AAG apresenta mais afinidade por Hsp90 de células neoplásicas, sendo mais eficiente numa atividade anti-proliferativa nestas células (GEORGAKIS et al., 2006).

2.6 EGF

Os receptores tirosino-quinases do Fator de Crescimento Epidérmico (*Epidermal Growth Factor* – EGF) são conhecidos por controlarem funções celulares importantes, que incluem: proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração. Conseqüentemente, defeitos nestas moléculas são provavelmente as causas do desenvolvimento e progressão de tumores (GRANDIS; SOK, 2004).

A superexpressão do EGF tem sido detectada em uma variedade de tumores malignos, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, onde o aumento nos níveis de EGF é associado a um fenótipo agressivo (PATEL et al., 2005), com um pior prognóstico devido à diminuição da sobrevida dos pacientes (GRANDIS et al., 1998).

A via do EGF compreende muitos alvos moleculares, afetando diretamente proteínas e eventos *downstream* em diversas vias de sinalização celular relacionadas à carcinogênese. Ras, Raf, MAPK e NFkB são vias que recebem estímulos diretos do EGF, com suas expressões aumentadas em células estimuladas pela ação do referido fator (PATEL et al., 2005). As vias PI3K, Akt e STAT3 também se apresentam dependentes dos níveis de EGF, sendo estas,

importantes vias relacionadas ao desenvolvimento tumoral (ALBANELL; CODONY-SERVAT; ROJO, 2001).

O EGF exerce um aumento nos estímulos mitogênicos, contribuindo diretamente para desregulação de proteínas controladoras da fase G1 do ciclo celular, afetando expressivamente os níveis de Ciclina D1 (LUKAS; BARTKOVA; BARTEK, 1996).

Ramljak et al. (1998) analisaram a expressão das proteínas Ciclina D1 e CDK4 em espécimes de fígado durante inflamação em comparação a espécimes de tumores hepáticos. Os autores analisaram essas lesões através de imunistoquímica, onde relataram uma predominância de marcação nuclear das proteínas Ciclina D1 e CDK4 nas amostras tumorais. Através do Western Blotting, verificaram um aumento considerável destas proteínas juntamente a superexpressão do EGF, portanto concluíram que as proteínas Ciclina D1 e CDK4 mostravam-se estimuladas pelo EGF e superexpressas em tumores relacionados com esse fator.

Um estudo conduzido por Moffat, Plaa e Denizeau (1995) através da análise dos níveis de mRNA (Ácido ribonucléico - mensageiro) da proteína MT (metalotioneína), demonstrou uma possível indução dos níveis de MT pelo EGF em linhagens celulares de hepatócitos, onde os autores sugeriram que há possibilidade desse aumento na expressão se dar via estimulação da c-fos.

Não se tem relatos da ação de EGF nos níveis de MT em carcinomas de cabeça e pescoço. Apesar do EGF e da MT apresentarem-se superexpressas em diversas neoplasias, e o aumento da expressão de ambos estarem associados a um pior prognóstico e maior resistência aos tratamentos, não se observam pesquisas a respeito de uma possível estimulação da MT por EGF.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo destina-se a:

1. Avaliar após o uso de EGF, a expressão das proteínas Metalotioneína, NFkB, Ciclina D1 e Cdk4 em duas linhagens celulares de carcinomas epidermóides de cabeça de pescoço (HN6 e HN31) e em uma linhagem de queratinócito imortalizado (HaCat) como controle.
2. Avaliar a expressão das proteínas Metalotioneína, NFkB, Ciclina D1 e Cdk4 após o uso do quimioterápico 17-AAG em duas linhagens de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (HN6 e HN31) e na linhagem de queratinócito imortalizado (HaCat).
3. Comparar a expressão das proteínas Metalotioneína, NFkB, Ciclina D1 e Cdk4 entre as linhagens celulares neoplásicas submetidas aos efeitos do EGF e do 17-AAG.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (Anexo A).

4.1 Cultivo celular

Foram utilizadas duas linhagens celulares de carcinoma epidermóide: HN6 e HN31 originadas das regiões descritas no Quadro 4.1 e o queratinócito imortalizado HaCat (PATEL et. al., 2005).

	HN6	HN31
Origem	Base de língua	Linfonodo

Quadro 4.1- Origem das linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

As células foram plaqueadas em frascos de 25cm² contendo 5 ml de DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO – USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, BR) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Sigma) e mantidas em incubadora (Precision Scientific) à temperatura controlada de 37⁰C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Todos os procedimentos do cultivo se realizaram em capela de fluxo laminar

seguindo os protocolos para a manutenção da esterilidade dos materiais, suplementos e meio de cultura a serem utilizados. O crescimento celular foi monitorado diariamente em microscópio invertido de fase (Zeiss-Axiovert 25 - Carl Zeiss, Oberköchen, Alemanha) e o meio de cultura trocado sempre que o metabolismo celular necessitasse.

Após ocuparem 70% do frasco, o que se denomina subconfluência, as células foram subcultivadas. O meio de cultura do frasco removido e separado em tubo de centrifugação e a monocamada celular lavada uma vez com solução fosfato-salina, sem cálcio e magnésio (PBS A), pH 7,2. Em seguida, as células separadas com 2 ml de solução de tripsina (Sigma) a 0,25% com EDTA 1mM (Sigma) durante 5 minutos, a 37°C. A tripsina foi inativada com o soro fetal bovino contido no meio de cultura reservado anteriormente, e as células em suspensão transferidas para um tubo de centrifugação e centrifugadas a 300g por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após aspiração do sobrenadante, o precipitado de células foi ressuspensionado em 1 ml de meio de cultura. Alíquotas da suspensão distribuídas em frascos de cultivo de 25 cm² contendo 6 ml de meio de cultura, e novamente levadas de volta à estufa, onde este procedimento deu origem a uma nova passagem de linhagem celular.

Para os experimentos aqui realizados, as células foram divididas em três grupos experimentais:

1. Controle, sem aplicação de quaisquer substâncias estimulantes ou inibidoras do crescimento celular com utilização de meio sem soro por 24 horas;
2. Com aplicação da substância inibitória 2 μ M de 17-AAG com utilização de meio sem soro por 24 horas;
3. Com aplicação da substância estimulante 10 nM de EGF com utilização de

meio sem soro por 24 horas.

4.2 Bloqueio da proliferação celular

Para um efeito anti-proliferativo, foi utilizado o 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), inibidor específico da proteína HSP90, sendo esta, conhecida como uma chaperona que regula o crescimento e a sobrevivência celular que regula os níveis da proteína AKT (GEORGAKIS et. al., 2006). Depois de cultivadas sobre placas de vidro, as células sofreram deprivação de soro e depois foram tratadas com ou sem 17-AAG (2 μ M) por 24hs.

4.3 Indução da proliferação celular

Uma metodologia semelhante à descrita anteriormente foi aplicada, utilizando o Fator de crescimento Epidérmico (EGF), na concentração de 10 μ m. As células sofreram deprivação de soro e posterior tratamento com EGF por 24 horas.

4.4 Contagem e avaliação da viabilidade celular:

O efeito anti-proliferativo do 17-AAG foi avaliado através da comparação entre dois grupos experimentais, um grupo controle e outro grupo no qual foi aplicado o

medicamento 17-AAG em uma concentração de 2 μ M. Foi feita contagem prévia do número de células cultivadas em meio DMEM, utilizando-se a câmara de Neubauer. Os frascos foram plaqueados com 10⁴ células e o medicamento, 17-AAG 2 μ M, foi aplicado em um dos frascos, sendo então realizadas contagens do número de células viáveis e posteriormente confecção de curvas de crescimento celular como forma de comparação dos níveis de proliferação celular entre o grupo controle e o grupo tratado. As contagens foram realizadas em três momentos: 24h, 48h e 72h e todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Da mesma forma foram efetuadas as contagens das células sob a indução de EGF na concentração de 10 μ m.

A viabilidade celular foi obtida através ensaio com a solução [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) (Promega corp. USA), que determina o número de células viáveis através do método colorimétrico que avalia os índices de proliferação. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, com a densidade pré-definida em 110 células por mm³ (3,5 x 10³). Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e adicionamos 20 μ l da substancia MTS. O próximo passo foi incubar essas células com a solução de MTS de 1-4 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, para uma posterior leitura por ELISA. O comprimento de onda usado para aferir o grau de absorbância foi de 490nm, sendo o grau de absorbância diretamente relacionado com a concentração e o crescimento celular, pois este material reage apenas a células com a mitocôndria ativa.

4.5 Imunofluorescência

Cultivadas sobre as lamínulas de vidro, as células dos três grupos experimentais foram lavadas em solução tampão fosfato-salina livre de Ca^{+2} e Mg^{+2} (PBS), pH 7,2 e fixadas em metanol por 6 min a -20°C . As amostras passaram por 4 lavagens com PBS durante 5 minutos e então incubadas com BSA 1% por 30 minutos, seguido da incubação dos anticorpos primários, anti-mouse Ciclina D1 (Santa Cruz), anti-mouse Cdk4 (Santa Cruz), anti-rabbit MT (Santa Cruz) e anti-rabbit NFkB (Zymed) por 60 minutos (Tabela 4.2).

Após nova lavagem, foi realizada incubação com anticorpo secundário anti-mouse conjugado à fluoresceína com diluição de 1:100 por 45 minutos (Amershan), ou então anti-rabbit 1:50 (Amershan) por 45 minutos.

Anticorpo	Tipo	Concentração	Procedência	Incubação
NFkB	Policlonal	1:50	ZYMED	60 minutos
Metalotioneína	Policlonal	1:50	SANTA CRUZ	60 minutos
Ciclina D1	Monoclonal	1:100	SANTA CRUZ	60 minutos
Cdk4	Monoclonal	1:25	SANTA CRUZ	60 minutos

Quadro 4.2- Anticorpos, concentrações, procedência e tempo de incubações usadas no ensaio de imunofluorescência

As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro com meio de montagem (Vectashild, Vector Lab, CA, USA), analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

4.6 Extração e quantificação das proteínas

Após a subconfluência (70% da área cultivável), foi realizado o tratamento com 17-AAG e EGF individualmente. O meio foi removido, as células lavadas 2X com PBSA a frio e colocadas sobre o gelo (4 °C). Foram adicionados 0,5 ml/placa de tampão RIPA+ (10 mM Tris HCl pH 7,5; 10mM desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS, 2µg/ml aprotinina, 2µg/ml pepstatina, 1Mm PMSF) e as células incubadas por 10 minutos nesta temperatura sob agitação. O lisado centrifugado a 15000 RPM por 10 min. e o sobrenadante aliqotado e estocado a – 80 °C. As proteínas do lisado foram quantificadas utilizando o método do ácido biocinconinico com o kit BCA Protein Assay Kit da Pierce (Reagente B + Reagente A 1:50 + 2-20µl de amostra, analisados em espectrofotômetro). Esse método tem por princípio a reação de peptídeos das amostras com o cobre (Cu^{2+}) resultando na redução do mesmo, formando um complexo de peptídeos com o cátion cuproso (Cu^{+}). Por sua vez o ácido biocinconinico reage com o cátion cuproso, formando o complexo BCA- Cu^{+} , produzindo uma cor púrpura que é lida no espectrofotômetro (aparelho de ELISA-ELX 800 Bio-Tek Instruments, Inc.), no comprimento de onda de

562nm. Ou seja, quanto mais intensa for a cor púrpura, ocorrerá mais absorção de luz, significando maior quantidade de proteína.

Obtida a quantificação das amostras, foi utilizada a mesma quantidade de proteínas totais nos grupos do estudo, onde posteriormente feita à análise da porcentagem em que cada proteína de interesse se apresenta dentro dessas proteínas totais.

4.7 Western blotting

As alíquotas do lisado foram misturadas contendo 30µg de proteína total, com tampão de amostra para concentração final de 1X. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 minutos e então submetidas à SDS-PAGE (Figura 4.1), sendo feita eletroforese a 120 v por 180 minutos, em gel de acrilamida a 10% e 12%. O padrão de peso molecular utilizado foi o Kaleidoscope Prestained Standards (BioRad).

Figura 4.1- SDS-PAGE. Separação das proteínas por eletroforese, onde as moléculas são carregadas de cargas negativas e atraídas ao pólo positivo da cuba de separação (www.westernblotting.org)

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi feita por eletrotransferência em aparelho especial (Amersham mini VE). Com o tampão de transferência (48mM Tris-Base; 39mM Glicina, 20% Metanol; pH 8,3) utilizado como recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita com 60 v por 180min. Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio ou lavada e seca para posterior reação.

Para a imunoreação, foi feito bloqueio dos sítios inespecíficos com 5% de leite em pó desnatado em TBST por 1-2h em temperatura ambiente, sob agitação (Figura 4.2).

Figura 4.2- Bloqueio dos sítios inespecíficos com leite em pó desnatado (NFDM - No Fat Dry Milk) www.westernblotting.org

Em seguida, a solução de bloqueio foi removida lavando-se a membrana com TBST. Os anticorpos de interesse anti-rabbit MT 1:50 (Santa Cruz), anti-rabbit NFkB (Zimed), anti-mouse Cyclin D1(Santa Cruz) e anti-mouse Cdk4 (Santa Cruz) foram diluídos em solução de bloqueio e aplicados nas concentrações e tempos descritos no Quadro 4.3, e mantidos à temperatura ambiente sob agitação. Seguiram três lavagens para remoção do anticorpo não-absorvido com TBST sob agitação e à temperatura ambiente. O anticorpo secundário foi então aplicado por 1 hora, diluído

em solução de bloqueio e depois lavado em TBST 2X por cinco minutos cada.

Anticorpo	Tipo	Concentração	Procedência	Incubação
NFkB	Policlonal	1:100	ZYMED	120 minutos
Metalotioneína	Policlonal	1:200	SANTA CRUZ	120 minutos
Ciclina D1	Monoclonal	1:200	SANTA CRUZ	120 minutos
Cdk4	Monoclonal	1:200	SANTA CRUZ	120 minutos

Quadro 4.3- Concentrações, procedência, tempo de incubação dos anticorpos usados no western

A detecção colorimétrica foi realizada através do Kit Bio-Rad. Uma parte do diluente concentrado Opti-4CN foi adicionada a nove partes de água deionizada. Foram utilizados 0,25ml para cada cm^2 da membrana. Para cada 10 ml do diluente preparado foi adicionado 0,2ml de substrato Opti-4CN, misturando-se bem e os colocando sobre a membrana. A membrana foi incubada no substrato por até 30min, depois lavada em água deionizada por 15 minutos.

Após a secagem das membranas, as bandas foram analisadas pelo *software ImageJ* e os gráficos confeccionados pelo *software Microsoft Excel*.

5 RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular

Este ensaio teve como objetivo verificar a viabilidade das células em 24, 48 e 72 horas após o tratamento. O índice de proliferação destas células foi averiguado frente aos tratamentos, devido à relação direta do grau de absorvância com o número de células vivas em cultura. Os resultados apontaram uma diminuição do número de células viáveis pela ação do 17-AAG (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3). As linhagens HN31 e HaCat apresentaram índices maiores de inibição (Figuras 5.1 e 5.3). Foi observada a eficácia da estimulação por EGF devido a um aumento no número de células viáveis (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3). A análise estatística foi efetuada separadamente nos grupos tratados com EGF dos tratados com 17-AAG ($p \leq 0.05$ teste t Student).

Figura 5.1- Teste de viabilidade celular realizado na linhagem HaCat com o *Kit Cell Titer 96* (MTS) Promega. Observou-se a diminuição de células viáveis frente à ação de 17-AAG (2 μ M) ($p \leq 0.05$ teste t Student). Pode-se observar também, sob a ação do EGF (10ng/ml), Aumento significativo do número de células viáveis ($p \leq 0.05$ teste t Student)

Figura 5.2- Teste de viabilidade celular realizado na linhagem HN6 com o Kit Cell Titer 96 (MTS) Promega. Observou-se a diminuição de células viáveis frente à ação de 17-AA ($2\mu\text{M}$) apenas nas primeiras 24 horas ($p \leq 0.05$ teste t Student). Pode-se observar também, sob ação do EGF (10ng/ml), aumento do número células viáveis em 36 horas ($p \leq 0.05$ teste t Student)

Figura 5.3- Teste de viabilidade celular realizado na linhagem HN31 com o Kit Cell Titer 96 (MTS) Promega. Observou-se a diminuição de células viáveis frente a ação de 17-AA ($2\mu\text{M}$) ($p \leq 0.05$ teste t Student). Pode-se observar também, sob a ação do EGF (10ng/ml), aumento do número células viáveis em 60 horas ($p \leq 0.05$ teste t Student)

5.2 Detecção da apoptose

O Kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection* foi utilizado para comprovar se a diminuição de células viáveis pela ação de 17-AAG se dava por indução a apoptose ou necrose. Após 24 horas de tratamento das células por 17-AAG, foi realizado o protocolo de detecção de células apoptóticas (Annexin) através de imunofluorescência. Houve um grande aumento nos índices de apoptose nas linhagens (HN31 e HaCat) tratadas com 17-AAG em relação ao grupo controle, sendo que apenas HN6 apresentou um índice de apoptose um pouco menor.

5.3 Imunofluorescência

5.3.1 MT

Ensaio de imunofluorescência revelaram marcações citoplasmáticas nos grupos controle das linhagens HaCat e HN31. HN6 controle apresentou marcação partilhada entre citoplasma e núcleo. Todas as células submetidas a tratamento com EGF exibiram marcações intensas predominantemente nucleares, enquanto as células tratadas com 17-AAG mostraram imunomarcação citoplasmática, com exceção da linhagem HN6, que além de apresentar marcações citoplasmáticas, exibiu uma discreta marcação nucleolar (Figura 5.4).

5.3.2 NFkB

No grupo controle, o NFkB apresentou marcações citoplasmáticas. Todas as linhagens tratadas com EGF por 24 horas exibiram marcações tanto em núcleo quanto em citoplasma. Já as linhagens tratadas com 17-AAG revelaram intensas imunomarcações citoplasmáticas (Figura 5.5).

5.3.3 Ciclina D1

A localização nuclear da ciclina D1 foi confirmada em todos os ensaios de imunofluorescência nas duas linhagens neoplásicas e no queratinócito imortalizado, tanto nos grupos controle quanto nos grupos tratados por EGF e 17-AAG. Nas linhagens neoplásicas HN6 e HN31 houve um discreto aumento na intensidade da marcação nas células tratadas com EGF. Notou-se nas linhagens celulares com aplicação de 17-AAG ausência de marcação em certo número de células, sendo esse achado, observado em todos os campos (Figura 5.6).

5.3.4 Cdk4

Nas células da linhagem HaCat tanto nos grupos tratadas quanto no grupo controle observaram-se marcações nucleares e tênues imunomarcações citoplasmáticas. Já as linhagens neoplásicas HN6 e HN31 a localização das

marcações apresentaram-se exclusivamente nucleares no grupo controle e no grupo sob a ação de EGF. Essas linhagens quando submetidas a tratamento com 17-AAG apresentaram marcações tanto nucleares quanto citoplasmáticas (Figura 5.7).

5.4 Western blot

A análise da expressão das proteínas utilizadas neste estudo foi realizada pelo ensaio de Western blot utilizando-se lisados celulares previamente quantificados. As amostras de cada linhagem celular foram padronizadas em uma quantidade de 20µg cada.

5.4.1 MT

Quando submetidas à ação do EGF, HaCat e HN6 exibiram aumento dos seus níveis de expressão em comparação ao grupo controle, sendo este aumento ainda mais significativo na linhagem metastática HN31. As células tratadas com 17-AAG não apresentaram alterações nos níveis desta proteína (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10).

5.4.2 NFkB

Os resultados do Western blot indicaram aumento significativo nos níveis da proteína NFkB nas três linhagens estudadas quando tratadas com EGF. HN6 e HN31 exibiram decréscimo na expressão do NFkB quando submetidas à ação de 17-AAG, o que não ocorreu com HaCat que manteve seus níveis inalterados (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10).

5.4.3 Ciclina D1

Nas linhagens HN6 e HN31 houve perceptível aumento da Ciclina D1 quando tratada com EGF, já HaCat não exibiu variações significativas nos níveis da referida proteína. Nas linhagens HaCat e HN31 sob a ação de 17-AAG observou-se diminuição dos níveis desta proteína. HN6 quando submetida ao 17-AAG não apresentou variações consideráveis (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10).

5.4.4 CDK4

Não houve, nas três linhagens estudadas, alterações significativas dos níveis da proteína CDK4 após o tratamento com EGF. Quando tratadas com 17-AAG, as linhagens HaCat e HN31 apresentaram diminuição da expressão de CDK4, fato observado mais intensamente na linhagem HN6 (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10).

Figura 5.4 - Localização da proteína MT nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG

Figura 5.5 - Localização da proteína NFκB nas células dos grupos controle, EGF e 17-AAG

Figura 5.6 - Localização da proteína Ciclina D1 nas linhagens dos grupos controle, EGF e 17-AAG

Figura 5.7- Localização da proteína CDK4 nas celuals dos grupos controle, EGF e 17-AAG

Figura 5.8 – Expressão das proteínas NFkB, MT, Ciclina D1 e Cdk4 estudadas na linhagem HaCat por western blot

Figura 5.9 – Expressão das proteínas NFkB, MT, Ciclina D1 e Cdk4 estudadas na linhagem HN6 por western blot

Figura 5.10 – Expressão das proteínas NFkB, MT, Ciclina D1 e Cdk4 estudadas na linhagem HN31 por western blot

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide constitui um problema de saúde de âmbito mundial, devido a sua alta incidência e seu curso clínico freqüentemente desfavorável. Das modalidades terapêuticas utilizadas no câncer, apenas a quimioterapia apresenta verdadeiro potencial no que tange a individualização do tratamento, mas poucos estudos foram conduzidos a respeito de seus efeitos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

A diversidade de eventos moleculares e celulares envolvidos na patogênese do carcinoma epidermóide representam grande obstáculo para estabelecimento de terapias efetivas (SILVERMAN, 1998). Isto posto, torna-se importante maior compreensão dos eventos envolvidos na progressão tumoral e o efeito de agentes quimioterápicos nessa neoplasia.

O presente estudo buscou analisar não somente a interação das vias de sinalização envolvidas na formação e progressão do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, mas também, observar o efeito do 17-AAG (agente quimioterápico considerado promissor no tratamento de diversas neoplasias) nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: HN6 (Base de língua) e HN31 (Metástase – linfonodo).

Pesquisa recente, realizada no Laboratório de Biologia Celular da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, avaliou os efeitos do 17-AAG nas linhagens celulares derivadas do carcinoma epidermóide bucal, e verificou seus efeitos na via de sinalização celular do Akt (PONTES, 2007). Para tal, foram realizadas curvas de

crescimento no intuito de ponderar a respeito de possíveis variações dose/tempo no uso do fármaco, e assim, otimizar e obter o efeito desejado da droga.

Em busca da padronização dos dados obtidos por Pontes (2007) e os realizados neste estudo, curvas de crescimento e viabilidade celular (obtidas através dos ensaios de MTS), nas mesmas condições e concentrações, foram realizadas, com o objetivo de alcançar resultados criteriosos acerca do efeito anti-proliferativo do fármaco 17-AAG e suas interações com as vias de sinalização das linhagens estudadas. Secundariamente, a metodologia citada acima, foi utilizada para constatação da estimulação da proliferação celular por EGF das linhagens celulares. Os resultados demonstraram que houve inibição da proliferação celular e diminuição das células viáveis nas linhagens HaCat e HN31 progressivamente após 24, 48 e 72 horas da aplicação de 17-AAG, e um efeito anti-proliferativo na linhagem HN6 apenas nas primeiras 24 horas do tratamento. As células tratadas com EGF apresentaram aumento nos índices proliferativos, variando apenas o tempo de duração deste efeito, de 36 horas na linhagem HN6, 60 horas na HN31 e 72 horas no queratinócito imortalizado HaCat.

Os agentes quimioterápicos têm como função controlar o crescimento das células tumorais e destruí-las, sem que esse processo traga malefícios ao paciente. Para tal, espera-se que tais fármacos atuem na indução dessas células a apoptose e não as levem a necrose primária, que levaria o paciente a óbito, inviabilizando o uso destes agentes.

Objetivando avaliar se o efeito anti-proliferativo de 17-AAG encontrado nos ensaios de MTS, se dava por necrose ou apoptose, utilizou-se o Kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection*. Os resultados mostraram que 17-AAG na concentração de 2 μ M

possui efeito anti-proliferativo verdadeiro, causando apoptose celular nas três linhagens avaliadas.

Após a avaliação dos efeitos do 17-AAG nas três linhagens celulares estudadas, deu-se continuidade aos experimentos averiguando os efeitos desse fármaco nas proteínas *downstream* à via do Akt, onde esta última, em pesquisas prévias apresentou diminuição dos seus níveis quando submetida à ação de 17-AAG. (BASSO et al., 2002; GEORGAKIS, LI; YOUNES, 2006; PONTES, 2007; SCHNEIDER et al., 1996).

Estudos demonstraram que a proteína Akt aparece estabilizada pela chaperona Hsp90, e que esta chaperona mostra-se sensível aos efeitos de 17-AAG (BASSO et al., 2002; SCHNEIDER et al., 1996).

Uma das formas nas quais Akt age na progressão tumoral, é através da estimulação de eventos do ciclo celular. Tais eventos recebem estímulos de Akt via fosforilação da proteína I κ B, que uma vez fosforilada, para de exercer um efeito inibitório no fator de transcrição NF κ B (OUYANG et al., 2006). NF κ B induz a expressão de fatores de crescimento, citocinas e outros fatores envolvidos com a proliferação celular e a progressão do ciclo celular (GHOSH; MAY; KOPP, 1998; PAHL, 1999). Um dos meios que NF κ B participa de eventos regulatórios do ciclo celular é através da transcrição da Ciclina D1, que por meio do complexo formado com Cdk4 irá agir na progressão da fase G1/S do ciclo celular.

Pela ação que a via do Akt exerce nos eventos acima descritos, eventos esses, responsáveis pela manutenção do crescimento e da viabilidade das células neoplásicas, tornou-se pertinente uma investigação da ação de 17-AAG nas proteínas NF κ B, Ciclina D1 e Cdk4.

A linhagem de queratinócito imortalizado (HaCat) sob o efeito de 17-AAG não exibiu alterações significantes nos níveis da proteína NFkB, fato demonstrado também pela imunomarcação citoplasmática dessa proteína nestas células quando tratadas ou não por 17-AAG. Esse achado demonstrou que a diminuição da expressão de Akt (PONTES, 2007) não influenciou os níveis de NFkB. A expressão de Ciclina D1 apresentou um decréscimo significativo nesta linhagem, sendo este resultado confirmado pela ausência de marcação desta proteína em significativa quantidade de células. Esses dados vão de encontro com os encontrados por Pontes (2007), que constatou diminuição nos níveis de Mdm2, proteína responsável pelo bloqueio das funções apoptóticas do p53. p53 provavelmente exerceu efeito inibitório na proteína Ciclina D1, apesar de p53 apresentar-se mutado nesta linhagem. A eficácia deste quimioterápico na linhagem HaCat, pode ser explicada mais plausivelmente pela marcante diminuição da expressão da proteína Cdk4 nos ensaios de western blot e pela marcação partilhada entre núcleo e citoplasma nas reações de imunofluorescência. A diminuição da expressão de Cdk4, sob a ação do 17-AAG, se deu provavelmente pela inibição da chaperona Hsp90, proteína apontada por Stepanova et al. (1996) como responsável pela maturação e estabilidade desta Cdk, sendo que esse achado ainda não havia sido constatado em linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Após o uso de EGF, a linhagem HaCat mostrou significativo estímulo proliferativo, constatado pelo aumento da proteína NFkB. Mesmo com o aumento de p53 demonstrado previamente (PONTES, 2007) nesta linhagem, houve acréscimo marcante nos níveis de ciclina D1. Desta forma, estes resultados, juntamente com os da literatura confirmaram o estímulo do EGF nas vias PI3K, Akt, NFkB e Ciclina D1

(BHARTI; AGGARWAL, 2002; OUYANG et al., 2006; PATEL et al., 2005). Sob a ação de EGF, HaCat não apresentou aumento na quantidade da proteína Cdk4.

Os resultados, mostraram que a linhagem neoplásica HN6 (carcinoma epidermóide de língua) exibiu maior resistência ao tratamento com 17-AAG, devido a variações não significantes nos níveis das proteínas NFkB e Ciclina D1, e somente uma diminuição marcante na expressão de Cdk4, o provável motivo pelo efeito anti-proliferativo nesta linhagem apenas nas primeiras 24 horas do tratamento com o referido fármaco.

Pontes (2007), ao investigar o efeito de 17-AAG na linhagem HN6, constatou pequeno decréscimo não significativo nos níveis de Akt, concomitantemente a um bloqueio total da expressão das proteínas PTEN e p53, sendo estes últimos, importantes supressores tumorais descritos amplamente na literatura (PANIGRAHI et al., 2004; OKI et al., 2005; KOHN; POMMIER, 2005), por tal, sugeriu-se um potencial mais agressivo da linhagem HN6, devido à manutenção do potencial proliferativo e um perfil anti-apoptótico desta linhagem frente ao tratamento quimioterápico.

Quando estimulada por EGF, a linhagem HN6 apresentou superexpressão das proteínas NFkB e Ciclina D1. Os níveis da proteína Cdk4 se mantiveram inalterados, resultado esse, dentro do esperado, pois a literatura em geral não aponta superexpressão dessa proteína na maioria das neoplasias, e nem mesmo demonstra algum estímulo por parte do EGF agindo diretamente nesta ciclina-quinase-dependente (CHEN et al., 2003; PATEL et al., 2005; YEUDALL et al., 2005).

Ramljak et al. (1998), em um estudo conduzido em amostras de tecidos de tumores hepáticos e em linhagens celulares derivadas dos referidos tumores,

verificaram aumento da expressão de Cdk4, provavelmente, segundo os autores, estimulados por EGF. Com esses achados, foi sugerido um papel importante do Cdk4 no desenvolvimento dessas neoplasias, com a ressalva de que maiores estudos tinham que ser conduzidos, para que então, fosse avaliado o verdadeiro papel do Cdk4 na gênese desses tumores. Ainda neste estudo, os autores citaram pesquisa anteriormente realizada que apontava apenas aumento da formação de complexos Ciclina D1/Cdk4 relacionadas à superexpressão de EGF e Ciclina D1 não acompanhadas pela expressão elevada do Cdk4 (RAMLJAK et al., 1998).

A linhagem metastática HN31 (provinda de linfonodo), após o tratamento com 17-AAG exibiu importante redução nos níveis das proteínas NFkB, Ciclina D1 e CDK4. HN31 foi a linhagem que melhor respondeu ao tratamento quimioterápico com 17-AAG, sendo importante frisar, que mesmo com a pequena redução dos níveis de Akt apontados por estudo prévio (PONTES, 2007), o bloqueio *downstream* dessa via mostrou-se bastante eficaz.

As células HN31 após sofrerem estimulação por EGF apresentaram aumento na expressão das proteínas NFkB e ciclina D1 em semelhante proporção, associados provavelmente a um aumento nos níveis de Akt, encontrados nesta linhagem anteriormente por Pontes (2007). Esses resultados comprovaram o estímulo proliferativo de HN31 regido possivelmente pelas vias do Akt, NFkB e Ciclina D1 impulsionadas por EGF.

A ação inibitória exercida por 17-AAG nas linhagens HaCat e HN31 sugeriram que a ação anti-proliferativa deste quimioterápico se dá em grande parte, pela inibição de Akt e Cdk4, sendo a inibição de Akt responsável pelo decréscimo nos níveis de NFkB e Ciclina D1. HN6 foi a única linhagem que apresentou maior

resistência a apoptose e manutenção do potencial proliferativo frente ao 17-AAG, sendo importante ressaltar que a inibição da proliferação nas primeiras 24 horas do tratamento com o referido fármaco, nesta linhagem, provavelmente foi conseguida através da diminuição da expressão de Cdk4, juntamente com a inibição de outras vias de sinalização não averiguadas neste estudo.

Apesar de Pontes ter concluído que HN31 apresentava resistência aos efeitos inibitórios de 17-AAG por não ter atingido a depleção total desta proteína, o que foi constatado na linhagem HN30, sugerimos que 17-AAG atingiu uma ação inibitória satisfatória nesta linhagem frente à significativa diminuição dos níveis de NFkB e ciclina D1, e que ainda o decréscimo dos níveis de Cdk4 exerceu importante papel no controle da proliferação celular. Provavelmente a diminuição de NFkB e Ciclina D1 se deu em consequência a diminuição dos níveis de Akt constatadas previamente em 2007 (PONTES, 2007), tais afirmações são amplamente respaldadas pela literatura atual, que já estabeleceu a interação da chaperona Hsp90 com a estabilidade de Akt (GEORGAKIS et al., 2006; TOKALOV; PIECK; GUTZEIT, 2007), sendo importante salientar que esta mesma literatura aponta a diminuição dos níveis de Akt em uma variedade de neoplasias.

Os resultados desta pesquisa conseguiram traçar um interessante perfil na estimulação de EGF nas proteínas NFkB e Ciclina D1 nas três linhagens estudadas, corroborando com estudos prévios conduzidos em nosso laboratório, que afirmaram a relevância da estimulação de Akt e Ciclina D1 pelo EGF nas linhagens de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (SALLES, 2005; PONTES, 2007). Frente a esses dados, torna-se pertinente sugerir o papel importante das vias de sinalização do EGF, Akt, NFkB e Ciclina D1 na progressão dessas linhagens.

Resultados obtidos nas linhagens HaCat, HN6 e HN31 revelaram significativo estímulo da proteína MT (metalotioneína) por parte do EGF, sendo esses achados confirmados pela forte translocação da marcação da referida proteína do citoplasma para o núcleo, todos esses averiguados em ensaios de imunofluorescência. Baseados em dados da literatura, que demonstraram que o potencial proliferativo e antiapoptótico da MT estavam associado à translocação dessa proteína para o núcleo (ABDEL-MAGEED; AGRAWAL, 1998; TSUJIKAWA et al., 1994), torna-se lícito afirmar que essa proteína juntamente com EGF apresenta um importante papel na resistência a apoptose nas linhagens por nós estudada.

As células quando submetidas a 17-AAG não exibiram alterações nos níveis da MT, o que aparentemente nos deu indícios de afirmar que essa proteína possivelmente não está envolvida com as proteínas estabilizadas pela chaperona Hsp90, como por exemplo, o Akt, e conseqüentemente não parece relacionada com o alvo *downstream* do Akt a proteína NFkB nas linhagens estudadas.

As atividades antiapoptóticas, e de estímulo da proliferação celular relacionadas à superexpressão da MT em células neoplásicas, têm sido amplamente relatadas (ROMERO-ISART; VASAK, 2002; SATO; KONDOH, 2002). Recentes pesquisas apontaram a ligação entre as proteínas MT e NFkB nos eventos regulatórios da inflamação. Mas apesar de fortes similaridades em suas funções patofisiológicas (como os efeitos antiapoptóticos em células neoplásicas), não se observam estudos que comprovem a inter-relação dessas proteínas em células neoplásicas (YAMAMOTO; GAYNOR, 2001; ZANGER et al., 2001; COYLE et al., 2002).

Abdel-Mageed e Agrawal (1998) investigaram a possível relação das proteínas MT e NFkB em células derivadas de adenocarcinoma de mama. Os autores encontraram um possível controle dos efeitos antiapoptóticos da MT por NFkB através da interação da MT com a subunidade p50 do NFkB. Esses estudos foram realizados a partir da análise dos transcritos dos genes das supracitadas proteínas por RT-PCR.

7 CONCLUSÕES

Os resultados permitiram concluir:

1. A linhagem metastática HN31 exibe um melhor perfil frente ao tratamento com 17-AAG. HN31 apresentou a diminuição significativa dos níveis de NFkB e Ciclina D1, além de exibir importante decréscimo nos níveis de Cdk4.
2. A proteína MT parece não sofrer ação do NFkB. É importante frisar que a MT não sofreu alterações nos seus níveis frente ao tratamento com o quimioterápico 17-AAG em nenhuma das linhagens estudadas.
3. A indução de proliferação celular realizada por EGF exerceu um aumento dos níveis das proteínas NFkB e Ciclina D1, sugerindo um papel importante das vias de sinalização estimuladas por EGF (Akt, NFkB e Ciclina D1 na progressão tumoral dessas linhagens.
4. Resultados obtidos nas linhagens HaCat, HN6 e HN31 revelaram significativo estímulo da proteína MT por parte do EGF, por tal, torna-se lícito afirmar que essa proteína juntamente com EGF apresentam um importante papel na resistência a apoptose nas linhagens estudadas.

REFERÊNCIAS¹

Abdel-Maggeed AB, Agrawal KC. Activation of nuclear factor κ B : Potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res* 1998;58(11): 2335-8.

Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: The enemy within. *Cancer Cell* 2004;6(3):203-8.

Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F. Activates extracellular signal-regulated kinase: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor α expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 2001;61(17):6500-10.

Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 onco-protein aberrantly accumulates in malignancies of diverse histogenesis. *Oncogene* 1995;10(6):775-8.

Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N. Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 2002;21(8):1159-66.

Benzeno S, Lu F, Guo M, Barbash O, Zhang F, Herman JG, Klein OS, Rutgi A, Diehl JA. Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. *Oncogene* 2006;25(47):6291-303.

Berenson JR, Yang J, Mickel RA. Frequent amplification of bcl-1 locus in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene* 1989;4(9):1111-6.

Beyersmann D, Haase H. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *BioMetals* 2001;14(3-4):331-41.

Bharti AC, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy. *Biochem Pharmacol* 2002;64(5-6):883-8.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo a base de dados MEDLINE.

Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohen S, Neckers L. Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(16):8379-83.

Brooks CL, Gu W. Dynamics in the p53- Mdm2 ubiquitination pathway. *Cell cycle* 2004;3(7):895-9.

Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006;31(3):164-72.

Cao Y, Karin M. NF κ B in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8(2):215- 23.

Cardoso SV, Barbosa HM, Candellori IM, Loyolo AM, Aguiar MCF. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2002;441(2):174-8.

Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodriguez J, Chu TS, Lopez JP, Aguilera J. EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116(3):401-6.

Chen Z, Zhang K, Zhang X, Xiao H, Yuan L, Yuan Z, et al. Comparison of gene expression between metastatic derivatives and their poorly metastatic parental cells implicates crucial tumor-environment interaction in metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 2003;20(4):335-42.

Cheng M, Oliver P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM, et al. The p21 and p27 CDK inhibitors are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 1999;18(6):1571-83.

Cheng M, Sexl V, Sherr CJ, Roussel MF. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(3):1091-6.

Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533(1-2):201-9.

Cherian MG, Kang YJ. Metallothionein and Liver Cell Regeneration. *Experimental Biology and Medicine* 2006;231(2):138-44.

Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(4):627-47.

Dolcet X, Ll'obet D, Pallares J, Matias-Guin X. NF κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005;446(4):475-82.

Fisher EH, Davie EW. Recent excitement regarding metallothionein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(7):3333-4.

Georgakis GV, Li Y, Younes A. The heat shock protein 90 inhibitor 17-AAG induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cell lines by depleting cyclin D1, Akt, Bid and activating caspase 9. *Br J Hematol* 2006;135(1):68-71.

Georgakis GV, Li Y, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Younes A. The HSP90 inhibitor 17-AAG synergizes with doxorubicin and U0126 in anaplastic cell lymphoma irrespective of ALK expression. *Experimental Hematology* 2006;34(12):1670-9.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.

Gillet C, Fantl V, Smith R, Fisher C, Bartek J, Dickson C, et al. Amplification and overexpression of cyclin D1 breast cancer detected by immunohistochemical staining. *Cancer Res* 1994;54(7):1812-7.

Gladden AB, Diehl JA. Localization, localization, localization: The role of cyclin D1 nuclear localization in cancer. *J Cell Biochem* 2005;96(5):906-13.

Goetz MP, Toft DO, Ames MM, Erlichman C. The Hsp90 chaperone complex as a novel target for cancer therapy. *Ann Oncol* 2003;14(8):1169-76.

Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. Requirement of stat3 but not stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *J Clin Invest* 1998;102(7):1385-92.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during development of malignancy. *Pharmacol Ther* 2004;102(1):37-46.

Hacker H, Karin M. Is NF κ B2/p100 a direct activator of programmed cell death? *Cancer Cell* 2002; 33(6):431-3.

Haq F, Mahoney M, Koropatnick L. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 2003;533(1-2):211-26.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF κ B. *Genes Dev* 2004;18(18):2195-224.

INCA (Instituto Nacional do Cancer). www.inca.gov.br [09 março 2008].

Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully C. Risk factors for oral epithelial dysplasia – the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol* 1999;35:151-6.

Jeon GA, Lee JS, Patel V, Gutkind JS, Thorgeirsson SS, Kim EC, et al. Global gene expression profiles of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2004;112(2):249-58.

Jolly C, Morimoto RI. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(19):1562-72.

Kagi JH, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochem* 1988;27(23):8509-15.

Kari S, Alho OP, Jokinen HK, Laara E. Carcinoma of the oral tongue in the northern finland: trends in overall incidence and patient and tumour characteristics. *J Oral Pathol Med* 1997;26(10):480-3.

KauffmanN-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J. et al. Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signaling through PI(3)K and PKB. *Nature* 1997;386(6616):544-8.

Kim CH, Kim JH, Lee J, Ahn YS. Zinc-induced NF κ B inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 190(2):189-96.

Kohn KW, Pommier Y. Molecular interaction map of the p53 and Mdm2 logic elements, which control the off-on switch of p53 in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331(3):816-27.

Kotelnikov VM, Coon IV JS, Mundle S, Kelanic S, LaFollet S, Taylor IV S, et al. Cyclin D1 expression in squamous cell carcinoma of the head and neck and in oral mucosa in relation to proliferation and apoptosis. *Clin Cancer Res* 1997;3(1):95-01.

Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor- κ B: its role in health and disease. *Journal of Molecular Medicine* 2004;82(7):434-48.

Li X, Stark GR. NF κ B-dependent signaling pathways. *Experimental Hematology* 2002;30(2):285-296.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulassuriya KAAS. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in southern England. *J Oral Pathol Med* 2004;33(9):525-32.

Lovec H, Grzeschiczek A, Kowalski MB, Moroy T. Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J* 1994; 13:3487-95.

Lu F, Gladden AB, Diehl JA. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. *Cancer Res* 2003;63(21):7056-61.

Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G₁ checkpoint. *Mol Cell Biol* 1996;16(12):6917-25.

Maret W. The function of Zinc Metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* 2000;130(5):1455-58.

Michalides R, Van Veelen L, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of Cyclin D1 correlates in recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995;5(9):975-8.

Moffat P, Plaa GL, Denizeau F. Induction of metallothionein gene expression by epidermal growth factor and its inhibition by transforming growth factor-beta and dexamethasone in rat hepatocytes. *Hepatology* 1995;21(4):1038-44.

Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, et al. A novel cyclin encoded by a bcl-linked candidate oncogene. *Nature* 1991;350(6318):512-5.

Moynagh PN. The NFkB pathway. *J Cell Sci* 2005;118(3):4389-4392.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot J. Oral and maxillofacial pathology. Philadelphia: WB Saunders; 1995.

Nordberg M, Nordberg GF. Noisy-le-grand. *Cell Mol Biol* 2000;46(2):451-63.

Oki E, Tokunaga E, Nakamura T, Ueda N, Futatsugi M, Mashino K. Genetic mutual relationship between PTEN and p53 in gastric cancer. *Cancer Letters* 2005;227(1):33-8.

Ouyang W, Li J, Ma Q, Huang C. Essential roles of PI-3K/ Akt / IKK / IKK β /NFkB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 C141 cells. *Carcinogenesis* 2006; 27(4):864-73.

Pahl HL. Activators and target genes of NFkB transcription factors. *Oncogene* 1999;18(49):6853-66.

Panagahi AR, Pinder SE, Chan SY, Paish EC, Robertson JFR, Ellis IO. The role of PTEN and its signaling pathways, including Akt, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome. *J Pathol* 2004;204(1):93-00.

Patel V, Ramesh A, Traicoff JL, Baibakov G, Emmert-Buck MR, Gutking JS, et al. Profiling EGFR activity in head and neck squamous cell carcinoma by using a novel layered membrane western blot technology. *Oral Oncol* 2005;41(5):503-8.

Perkins ND. NF κ B: tumor promoter or suppressor? *Trends in Cell Biology* 2004; 14(2):64-9.

Pontes FSC. Avaliação in vitro da expressão das proteínas PTEN, Akt, Mdm2 e p53 em células de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço submetidas a ação de EGF e 17-AAG [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

Prado RF, Taveira LAA. Nicotina na carcinogênese química bucal. *Rev Bras Patol Oral* 2003;2(2):24-7.

Quelle DE, Ashmun RA, Shortle SA, Kato JY, Bar-Sagi D, Roussel MF, et al. Overexpression of mouse D-type cyclin accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* 1993;7(3):1559-607.

Ramljak D, Jones AB, Diwan BA, Perantoni AO, Hochadel JF, Anderson LM. Epidermal growth factor and transforming growth factor-A-associated overexpression of cyclin D1, Cdk4, and c-Myc during hepatocarcinogenesis in helicobacter hepaticusinfected A/JCr mice¹. *Cancer Res* 1998;58(16):3590-7.

Ravi R, Bedi A. NF κ B in cancer- a friend turned foe. *Drug Resist Updates* 2004;7(1):53-67.

Resnitzky D, Gossen M, Buard H, Reed SI. Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol Cell Biol* 1994; 14(6):1669-79.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994; 370(6490):527-32.

Romero-Isart N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem* 2002; 88(3-4):388-96.

Salles FT. Análise da expressão e mecanismos de ação da proteína Akt em células cultivadas de carcinoma epidermóide bucal humano [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2005.

Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Expen Med* 2002;196(1):9-22.

Schneider C, Sepp-Lorenzo L, Nimmesgen E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N, et al. Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(25):14536-41.

Schuchmann M, Galle PR. Dead or alive- NFkB, the guardian which tips the balance. *J Hepatol* 2002;36(6):827-8.

Schuuring E, Verhoeven E, Mooi WJ, Michalides RJ. Identification and cloning of two overexpressed genes, U21B31/PRAD1 and EMS1, within the amplified chromosome 11q13 region in human carcinomas. *Oncogene* 1992;7(2):355-61.

Sharp SY, Prodromou C, Boxall K, Powers MV, Holmes JL, Box G, et al. Inhibition of the heat shock protein 90 molecular chaperone in vitro and in vivo by novel, synthetic, potent resorcinylic pyrazole/isoxazole amide analogues. *Mol Cancer Ther* 2007;6(4):1198-11.

Shintani S, Zhang T, Aslam A, Sebastian K, Yoshimura T, Hamakawa H. P53-dependent radiosensitizing effects of Hsp90 inhibitor 17-AAG on human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2006;29(5):1111-7.

Silverman SJ. Oral cancer. London: BC Decker Inc; 1998.

Solomon DA, Wang Y, Fox SR, Lambeck TC, Giesting S, Lan Z, et al. Cyclin D1 splice variants variants. Differential effects on localization, Rb phosphorylation, and cellular transformation. *J Biol Chem* 2003;278(32):30339-47.

Stepanova L, Leng X, Parker SB, Harper JW. Mammalian p50Cdc37 is a protein Kinase targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilize Cdk4. *Genes Dev* 1996; 10(12):1491-2.

Suh J, Rabson AB. NFkB Activation in Human Prostate Cancer: Important Mediator or Epiphenomenon? *J Cell Biochem* 2004;91(1):100-17.

Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology* 2004;45(2):103-18.

Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(1):51-61.

Tokalov SV, Pieck S, Gutzeit HO. Varying responses of human cells with discrepant p53 activity to ionizing radiation and heat shock exposure. *Cell Prolif* 2007;40(1):24-37.

Tsujikawa K, Suzuki N, Sagawa K, Itoh M, Sugiyama T, Koham Y, Otaki N, Kimura M, Mimura T. Induction and subcellular localization of metallothionein in regenerating rat liver. *Eur J Cell Biol* 1994; 63(2):240-6.

Vargas H, Pitman KT, Johnson JT, Galati LT. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. *Laryngoscope* 2000; 110(10):1623-26.

Vasak M, Hasler DW. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol* 2000;4(2):177-83.

Veness MJ, Morgan GJ, Sathiyaseelan Y, Gebisky V. Anterior tongue cancer: age is not a predictor or outcome and should not alter treatment. *ANZ J Surg* 2003;73(3):899-904.

Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanism by which alcohol may influence the development of oral cancer: a review. *Oral Oncol* 1998;34(6):441-7.

WHO - World Health Organization. Classification of Tumours: Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential if inhibition of the NFkB pathway in the treatment of inflammation and cancer. J Clin Invest 2001;107(2):135-42.

Yeudall WA, Miyazaki H, Ensley JF, Cardinali M, Gutking JS, Patel V. Uncoupling of epidermal growth factor-dependent proliferation and invasion in a model of squamous carcinoma progression. Oral Oncol 2005; 41(7):698-708.

Zanger K, Haslinger E, Kunert O, Armitage IM. Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites. FASEB J 2001;15(2):1303-5.

Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M, Thor AD, Koerner FC, Schmidt EV, et al. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. Mod Pathol 1995 8(5):560-7.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 124/07

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**ESTUDO DA EXPRESSÃO E DOS MECANISMOS DE AÇÃO DAS PROTEÍNAS METALOTIONEÍNA, NFK-B, CICLINA D1 E Cdk4 EM LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE HUMANO**", de responsabilidade do Pesquisador **BRUNNO SANTOS DE FREITAS SILVA**, sob orientação do Professor Doutor **DÉCIO DOS SANTOS PINTO JÚNIOR**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 04 de outubro de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP