Carolina Lopes Quina

Estudo da morte celular em queratinócitos de animais nocauteados para os genes BIM, PUMA e mutante para a molécula FAS tratados com quimioterápicos e indutores de carcinogênese

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2015

Carolina Lopes Quina

Estudo da morte celular em queratinócitos de animais nocauteados para os genes BIM, PUMA e mutante para a molécula FAS tratados com quimioterápicos e indutores de carcinogênese

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr(a). Jacqueline de Fátima Jacysyn

Versão Original.

São Paulo

2015

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Quina, Carolina Lopes.

Estudo da morte celular em queratinócitos de animais nocauteados para os genes BIM, PUMA e mutante para molécula Fas tratados com quimioterápicos e indutores de carcinogênese / Carolina Lopes Quina. - São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Morte celular.

Versão do título para o inglês: Study of cell death in inockout mice keratinocytes for BIM, PUMA and mutant Fas treated with chemotherapy and inducers of carcinogenesis.

1. Queratinócitos 2. Pele 3. Câncer 4. Apoptose 5. Não-melanoma 6. UVB I. Jacysyn, Profa. Dra. Jacqueline de Fátima II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB042/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carolina Lopes Quina.

Título da Dissertação: Estudo da morte celular em queratinocitos de animais nocauteados para os genes BIM, PUMA e mutante para molécula Fas tratados com quimioterápicos e indutores de carcinogênes.

Orientador(a): Profa. Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **035** nas fls. **04** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jacqueline F. Jacysyn**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel de moléculas pró-apoptóticas na carcinogênes química*" do qual participam o(s) aluno(s) **Carolina Lopes Quina, Paola Vendramini Ferreira Rosa**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **15.05.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 19 de maio de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 60 nas fls. 19 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jacqueline F. Jacysyn**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização de queratinócitos de animais nocauteados em moléculas pro-apoptóticas*" do qual participam o(s) aluno(s) **Carolina Lopes Quina**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **06.06.2014**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 09 de junho de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico esse mestrado ao meu
avô José Maria Alves de Quina (*in
memoriam*) com todo meu amor e
saudades. Pra sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo fim de mais essa etapa, pelos sonhos que se concretizam. Porque Dele, e por meio Dele são todas as coisas.

Agradeço aos meus pais Dirce Arena Lopes Quina e Antonio de Jesus Alves de Quina, meu abrigo seguro, pelo amor incondicional e pela paciência. Os primeiros a sonhar tudo isso, agradeço por acreditarem sempre no meu potencial. Por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar, longe deles, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grata. Meu amor por vocês é muito mais que incondicional.

A minha irmã Patricia Lopes Quina, que me incentivou, sendo além de irmãs amigas, a correr atrás dos meus objetivos. Minha inspiração, minha admiração e minha coragem.

A minha família que entendeu minha ausência, que me apoiaram. As minhas avós Maria e Darcy, que são um exemplo de luta e sucesso. Mesmo de longe sempre estiveram presentes ajudando e torcendo pela concretização deste curso.

Em especial, aos meus avôs Joaquim Pereira Lopes (*in memoriam*) e José Maria Alves de Quina (*in memoriam*) que foram um exemplo de luta e coragem e que devem estar honrados com essa conquista.

A minha orientadora Dr(a) Jacqueline de Fátima Jacysyn, pela paciência, credibilidade, amizade e confiança. Pela oportunidade de fazer parte de sua equipe. Obrigada por tudo. A toda equipe do LIM 62, em especial a minha colega de laboratório Nati, pela parceria.

A minha querida amiga-irmã uberabense-paulistana Paola Vendramini, pela luta diária sem perder o brilho do humor da vida, pela amizade, pela fidelidade, pela confiança, por estender a mão sempre que precisei, por nunca me faltar.

A minha querida Monique Fonseca, pela paciência, pela companhia e amizade. Por me ensinar que nem sempre a razão é melhor que a emoção. Obrigada!

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (244): Julia, Tiago, Luciana, Marcela, Narciso, Ba Saty, Ba Melo, Priscila, Maria Emilia, Sandy, Henry, Jennifer, Melanie, Giulia, Thalita, Daniel, que me incentivaram, pela amizade, dias e noites de alegria e colaboraram para a conclusão dessa jornada.

Ao professor Dr. João Gustavo P. Amarente-Mendes por abrir as portas do seu laboratório, pelo acolhimento, pela contribuição científica ao projeto e por todo aprendizado que me proporcionou.

A professora Dr(a). Ana Paula Lepique e todo o Laboratório de Imunomodulação (Simone, Renata, Karla e Sandra) por abrir as portas e me ceder espaço para realização dos meus experimentos e contribuições.

Ao professor Dr. Carlos Frederico Martins Menck por ter gentilmente cedido o equipamento de UVB para os meus experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a CAPES pelo apoio financeiro.

Aos demais funcionários da instituição, e outras pessoas que eu possa ter esquecido de citar aqui que, de alguma forma, ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, minha sincera gratidão.

Um agradecimento especial a minha querida amiga Julia Kameyama de Castro Leite e o meu querido Davi Leandro Ramos, de quem a distância e o tempo nunca vai me separar, pois fazem parte do meu coração.

Agradeço a todas as pessoas do meu convívio que acreditaram e contribuíram, mesmo que indiretamente, para a conclusão deste curso.

“Não importa quanto à vida possa ser ruim, sempre existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto há vida, há esperança.”

Stephen Hawking

RESUMO

QUINA, C. L. **Estudo da morte celular em queratinócitos de animais nocauteados para os genes BIM, PUMA e mutante para a molécula FAS tratados com quimioterápicos e indutores de carcinogênese.** 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O câncer de pele inclui três tipos: o Melanoma Maligno, o Carcinoma Espinocelular e o Carcinoma Basocelular, que diferem entre si tanto morfológicamente como biologicamente. No Brasil, o câncer de pele não-melanoma é o mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país e é caracterizado por uma neoplasia dos queratinócitos. O câncer representa o desequilíbrio na homeostasia do organismo e evidências demonstram que a resistência a apoptose ou morte celular programada é uma das características para o surgimento e evolução dos tumores malignos. Devido diversas drogas anti-tumorais atuarem induzindo a apoptose, mutação ou uma desregulação dessas proteínas pró- e anti-apoptóticas podem contribuir para a resistência a quimioterápicos.

Baseado na literatura, no papel fundamental da apoptose na progressão, controle e eliminação do tumor, a proposta deste trabalho foi estudar quais funções as moléculas BIM, PUMA e Fas desempenham nos queratinócitos quando submetidas à transformações celulares, como UVB e DMBA, e indução de morte por indutores de apoptose.

Para isso foi estabelecido cultura primária de queratinócitos da pele de neonatos das linhagens C57Bl/6 selvagem; C57Bl/6 PUMA KO; C57Bl/6 LPR. As células foram tratadas com 1µg/ml e 5 µg/ml de actinomicina D; 10µM e 50µM de Etoposídeo; 1mM e 2mM de Cicloheximida, no período de 18 horas. E submetidos a UV-B 100 J/m².s e 400 J/m² e analisados por 24h. Observamos a expressão de Bid, Bim, Bax no tratamento com UVB por 48h. Avaliamos o perfil de desenvolvimento do tumor nesses animais utilizando um modelo de tumorigenese química in vivo, que é equivalente ao processo de câncer de pele não melanoma.

Os experimentos realizados e dados da literatura mostram que queratinócitos deficientes em PUMA e LPR se comportam de maneira semelhante no tratamento com quimioterápicos, no entanto, no tratamento com carcinógenos, UVB e DMBA a molécula LPR desempenha um papel mais relevante na indução de morte celular e no desenvolvimento da carcinogênese. Estes resultados sugerem a importância dos receptores de morte no surgimento e na eliminação de células tumorais.

Palavras-Chave: Queratinócitos. Pele. Câncer de pele. Câncer não-melanoma.

ABSTRACT

QUINA C.L. **Study of cell death in knockout mice keratinocytes for BIM, PUMA and mutant FAS treated with chemotherapy and inducers of carcinogenesis.** 2015 (75) [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Skin cancer includes three types: Malignant Melanoma, Squamous Cell Carcinoma and Basal Cell Carcinoma, which differ both morphologically and biologically. In Brazil, the non-melanoma skin cancer is the most common and accounts for 25% of all malignant tumors registered in the country and is characterized by a malignancy of keratinocytes. The cancer is the imbalance in homeostasis and evidence shows that resistance to apoptosis or programmed cell death is one of the most striking features of most malignant tumors. Various anti-tumor drugs act by inducing apoptosis, mutation or desregulation of these pro-and anti-apoptotic proteins may contribute to the resistance to chemotherapeutics.

Based on the literature, the role of apoptosis in progression, control and elimination of the tumor, the aim of this study was to investigate what roles the BIM, PUMA and Fas molecules play in keratinocytes when subjected to cellular transformation, as UVB and DMBA, and induction of death by inducing apoptosis.

Therefore, it was established primary cultured keratinocytes of the skin of neonates C57BL/6 WT; C57BL/6 PUMA KO; C57BL/6 LPR. Cells were treated with 1mg / ml and 5 mg / ml of actinomycin D; 10 μ M and 50 μ M of Etoposide; 1mM and 2mM Cycloheximide, in the period of 18 hours. And subjected to UV-B 100 J / m².se 400 J / m² and analyzed for 24h. We observed the expression of Bid, Bim, Bax in treatment with UVB for 48 hours We evaluated the profile of tumor growth in these animals using a chemical model of tumorigenesis in vivo, which is equivalent to the non-melanoma skin cancer process.

The experiments and literature show that keratinocytes of C57BL / 6 LPR strain are more resistant to treatment with chemotherapy and suggest an important relationship between apoptosis and cancer, making it clear that death receptors pathway are important in the strategy to eliminate tumor cells.

Keywords: Skin. Cancer. Non-melanoma. Keratinocytes. Apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AD – Actinomicina D
AhR - Receptor hidrocarboneto de arila
Apaf-1- do inglês *Apoptotic protease activating factor 1*
ARA-9 - do inglês *AhR associated protein 9*
ARNT - Proteína translocadora do AhR
Bad – do inglês *Bcl-2-associated death promoter*
Bak – do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/kille*
Bax – do inglês *Bcl-2- associated x protein*
BCC - Carcinoma basocelular
Bcl-2 – do inglês *B-cell lymphoma protein 2*
Bcl-XL – do inglês *B-cell lymphoma-extra large*
Bcl-w – do inglês *Bcl-2-like protein 2*
BH3 – do inglês *Bcl-2 homology domain 3*
Bid – do inglês *BH3 interacting-domain death agonist*
BIM – do inglês *Bcl-2 interacting Mediator of cell death*
Bim KO – Nocauteado para o gene Bim
c-FLIP – do inglês *FLICE-inhibitory protein*
CHX - Cicloheximida
dATP – Desoxiadenosina trifosfato
DISC – do inglês *death-inducing signaling complex*
DMBA - Dimetilbenzenoantraceno
DNA- Ácido desoxirribonucleico
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FADD - Domínio de morte associado ao Fas
FAS – Receptor da via de morte da família TNF. Apoptosis antigen 1 (APO-1 or APT), cluster of differentiation 95 (CD95)
FASL - Ligante de FAS
Hh - Hedgehog
Hsp90 - do inglês *heat shock protein*
IAPs – do inglês *Inhibitor of apoptosis proteins*
INCA - Instituto Nacional do Câncer
KSFM - do inglês *Keratinocyte Serum Free Medium*
MEFs - Fibroblastos embrionários murinos
PBS – Tampão fosfato salino
PCR – Reação em cadeia da Polimerase
PI – Iodeto de propídeo
PUMA – do inglês *p53 up-regulated modulator of apoptosis*
PUMA KO – Nocauteado para o gene Puma
NOXA - do inglês *Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*
SCC - Carcinoma de células escamosas
Smac/DIABLO –do inglês *second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low*
TNF – Fator de necrose tumoral
TNFR1 – do inglês *tumor necrosis factor receptor 1*
TRAIL - Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand / Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
UV - Luz ultravioleta

UVA – Radiação ultravioleta-A

UVB - Radiação ultravioleta-B

VP-16 - Etoposídeo

WT – Wild-type/ camundongos selvagens

XAP-2 - do inglês *X-associated protein 2*

XREs – Xenobióticos

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1- Ilustração da pele de mamíferos.....	21
FIGURA 2- Gene p53.....	24
FIGURA 3- Ilustração do “Hallmarks of Câncer” proposto por Hanahan & Weinberg.....	25
FIGURA 4- Principais vias de Apoptose.....	26
FIGURA 5- Ilustração de eletroforese do gel de agarose da genotipagem Bim das amostras de casais formados de fêmea heterizigoto com macho homozigoto.....	34
FIGURA 6- Estratégia de análise da avaliação da morte celular através da análise da externalização de resíduos de fosfatidilserina.....	38
FIGURA 7- Cultura primária dos queratinócitos extraídos de pele de neonatos.....	41
FIGURA 8- Imunoflorescência dos queratinócitos nocauteados.....	43
FIGURA 9- Efeito da Actinomicina D na morte celular em queratinócitos WT, mutante para gene Fas e nocaute para o gene Puma.....	46
FIGURA 10- Efeito do Etoposídeo na morte celular em queratinócitos WT e nocauteados para o gene Puma e mutante para o gene Fas.....	49
FIGURA 11- Efeito da Cicloheximida na morte celular em queratinócitos WT e nocauteado para o gene Puma e mutante para gene Fas.....	51
FIGURA 12- Efeito da irradiação ultravioleta B na morte celular em queratinócitos WT e nocauteados.....	53
FIGURA 13- Efeito do agente químico carcinogênico DMBA na morte celular em queratinócitos WT, nocautes para Puma, Bim e mutante para Fas.....	55
FIGURA 14 - Expressão de proteínas pro-apoptóticas de queratinócitos nocauteados para Puma e mutante para Fas no tratamento com UVB.....	56
FIGURA 15 - Imagem representativa da pele dos animais após tratamento com DMBA.....	58
FIGURA 16- Imagem representativa da pele dos animais 200 dias após tratamento com DMBA/TPA.....	59

FIGURA 17- Multiplicidade e incidência de papilomas na pele dos animais das linhagens C57BL/6 WT, C57BL/6 Lpr, C57BL/6 Bim KO e C57BL/6 Puma KO tratados com DMBA.....60

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para genotipar os animais C57Bl/6 Bim através de reações de PCR de DNA genômico.....	33
TABELA 2 - Descrição dos reagentes e quantidades utilizadas para reação de PCR para o gene Bim.....	33
TABELA 3 - Reação de PCR utilizada para genotipagem dos camundongos C57Bl/6 Bim KO.....	33
TABELA 4 - Morte celular de queratinócitos tratados com Actinomicina D.....	45
TABELA 5 - Morte celular de queratinócitos tratados com Etoposídeo	48
TABELA 6 - Morte Celular dos queratinócitos tratados com Cicloheximida.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivos específicos.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais.....	31
3.1.1 Geração de camundongos C57Bl/6 Bim KO.....	31
3.1.2 Genotipagem dos animais C57Bl/6 Bim KO.....	31
3.2 Cultura Primária de Queratinócitos.....	34
3.3 Imunofluorescência anti-citoqueratina.....	35
3.4 Tratamento para indução de morte.....	36
3.4.1 Tratamento com quimioterápicos.....	36
3.4.2 Tratamentos com UVB.....	36
3.4.3 Tratamento com DMBA.....	36
3.4.4 Quantificação de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídio.....	37
3.5 Extração e quantificação de proteína.....	38
3.6 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e “Western-blot”.....	38
3.7 Indução da Tumorigenese cutânea in vivo.....	40
3.8 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Cultura primária dos queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para a proteína Fas.....	41
4.2 Imunoflorescência dos queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para a proteína Fas.....	42
4.3 Análise da morte celular da cultura primária de queratinócitos de camundongos selvagens e nocauteados tratados com quimioterápicos indutores de morte.....	44
4.3.1 Tratamento com Actinomicina D.....	44
4.3.2 Tratamento com Etoposídeo.....	47

4.3.3 Tratamento com Cicloheximida.....	50
4.4 Análise da morte celular da cultura primária de queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para o gene Fas tratada com luz Ultravioleta B.....	52
4.5 Análise da morte celular da cultura primária de queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para o gene Fas tratada com o carcinógeno DMBA.....	54
4.6 Análise da expressão de proteínas pro-apotóticas nos queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene PUMA e mutado para o gene Fas tratada com UVB.....	56
4.7 Indução da Tumorigênese cutânea in vivo.....	57
5 DISCUSSÃO.....	60
6 CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

A superfície do corpo é envolvida por um órgão complexo, a pele, que representa mais de 15% do peso corpóreo. Dentre suas principais funções destacam-se a importante barreira de proteção contra agressões e agentes externos, além de absorção e secreção de fluidos, termorregulação, metabolismo de vitaminas, absorção de luz ultravioleta, funções sensoriais, ação de hormônios e estética (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A pele é constituída de uma camada epitelial, a epiderme, e uma camada de tecido conjuntivo, a derme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A epiderme e os anexos cutâneos se originam da ectoderme na vida embrionária, enquanto a derme se origina da mesoderme, assim como os vasos sanguíneos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A derme é a camada média da pele formada por tecido conjuntivo e possui como uma das suas principais funções servir como tecido de sustentação para epiderme. Nela são encontrados vasos sanguíneos e linfáticos, inúmeras terminações nervosas, macrófagos, linfócitos, granulocitos e fibroblastos. Os fibroblastos são as principais células residentes da derme e são responsáveis pela síntese de matriz extracelular, como a produção de colágeno e elastina, e possui uma intensa atividade no processo de cicatrização da pele (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; PEYREFITE, 1998).

Abaixo da derme encontra-se a hipoderme que é constituída de tecido adiposo limitado por fibras de colágeno provenientes da derme. Esse formato limita a mobilidade da pele. As principais funções que a hipoderme exerce são o armazenamento e reserva de lipídios na forma de triglicerídeos, protege o organismo de ações mecânicas, como compressão, e regula temperatura corpórea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; PEYREFITE, 1998).

A epiderme é uma fina camada de epitélio escamoso estratificado, com espessura de 0,07 a 0,12mm, que se regenera constantemente. É localizada em cima da membrana basal que a separa da derme e os seus apêndices, como os folículos capilares e glândulas sudoríparas (Figura 1) (FUNCHS; RAGHAVAN, 2002; SILVER et al, 2001).

É constituído de múltiplas camadas de queratinócitos, representando cerca de 90% das células totais. Também abriga os melanócitos, que são responsáveis pela produção de melanina, as células de Langerhans, responsáveis pela apresentação de antígenos ao sistema imunológico, e as células de Merckel, responsáveis pela sensibilidade tátil (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MCLAFFERTY et al., 2012). Pode ser dividida em cinco camadas, de acordo com o grau de maturação e diferenciação dos queratinócitos: camada basal, espinhosa, granulosa, lucida e córnea (Figura 1). A camada basal localiza sobre a membrana basal que separa a derme da epiderme, é o local de proliferação dos queratinócitos, além de abrigar os melanócitos e células de Merckel. A camada espinhosa possui queratinócitos em proliferação e abriga células de Langerhans. A camada granulosa é constituída de camadas de queratinócitos que não possuem capacidade de divisão e são quase que exclusivamente promotores de queratina. O estrato lúcido é constituído por uma delgada camada de células pavimentosas, presente em regiões de pele espessa como a palma das mãos e pés. E a camada mais superficial, conhecida como camada córnea, os queratinócitos são pavimentosos e queratinizados, não apresentam núcleo e organelas citoplasmáticas, seu maior constituinte é a queratina. Essa camada funciona como uma barreira contra desidratação, invasão de microorganismos e agressões do meio externo (GARTNER; HIATT, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MCLAFFERTY et al., 2012.).

Figura 1 - Ilustração da pele de mamíferos. Consiste da epiderme e da derme separadas por uma membrana basal. A epiderme é um epitélio escamoso estratificado, que é composta de várias camadas de células. Repousando sobre a membrana basal é a camada basal (CB); seguida por camada espinhosa (CE), uma camada granulosa (CG) e o estrato córneo (CC). Observa-se também a presença da glândula sebácea, glândula sudorípara e folículo capilar, que compõe a derme. (Adaptado de Fuchs; Raghavan, 2004).

Os queratinócitos são o principal tipo celular da epiderme e, portanto, o principal alvo das alterações mediadas pelos diferentes tipos de estresse, modula vias de sinalização que pode levar a diferenciação celular, sobrevivência, senescência, apoptose e possui um papel importante na manutenção da epiderme. O nome queratinócito deriva da queratina, que compreendem mais da metade da massa proteica celular. A função principal da queratina é conferir resistência física para epiderme e uma falha ocorrida nessa rede resulta em fragilidade da pele (DENNING, 2004; NATARAJAN et al, 2014).

O queratinócito vai adquirindo quantidades crescentes de queratina e sua morfologia muda conforme migra da camada basal até a camada córnea. O epitélio formado é composto por uma rede altamente dinâmica que confere resistência e rigidez física, pela presença de desmossomos e hemidesmossomos, zônulas de

oclusão, zônulas de aderência e junções comunicantes nas bordas da membrana do queratinócito (Figura 1). À medida que os queratinócitos se aproximam da superfície da pele, transformam-se em células achatadas e anucleadas com grande quantidade de filamentos queratinizados (DENNING, 2004).

Embora a epiderme apresente como característica ser um epitélio estratificado e com capacidade de auto renovação, também predispõe os queratinócitos a ser o tipo celular de maior incidência de câncer em humanos (ERB et al, 2008), além de contribuir para outros tipos de doenças dermatológicas (CANTISANI et al, 2013; TSCHACHLER, 2007).

No Brasil e no mundo, o câncer de pele é o tipo mais comum encontrado. É classificado em dois tipos: câncer de pele não melanoma e melanoma. O grupo não melanoma é a grande maioria, correspondendo 95% de todos os tipos de câncer de pele e 25% de todo tipo de tumor maligno no Brasil (INCA, 2014).

O câncer não- melanoma pode ser dividido em dois principais grupos: Carcinoma Espinocelular e Carcinoma Basocelular. Ambos possuem maior incidência neoplasia maligna dos queratinócitos da camada basal da epiderme. Estas lesões podem ser restritas a epiderme, pode estender-se para além da membrana basal ate a derme, e em pequena escala, capacidade de metástase (DUBAS e INGRAFFEA, 2013). A sua incidência tem aumentado, sendo registrados novos casos por ano, com frequência maior pelo sexo masculino, caucasiano e em idade avançada (INCA, 2014)

Um dos fatores etiológicos mais importantes no desenvolvimento do câncer de pele é a exposição à radiação ultravioleta (UV), sobretudo a radiação ultravioleta-B (UVB), que desencadeia mutações no ácido desoxirribonucleico (DNA) das células epidérmicas, sendo o agente mutagênico mais popular estudado em queratinócitos (KRUTMANN, 2006). As radiações solares podem gerar radicais livres na pele, os quais podem desencadear uma série de reações dermatológicas com consequências irreversíveis, como a diminuição das células de Langerhans, responsáveis pela apresentação de antígeno da pele, degeneração da elastina (elastose), destruição das fibras de colágeno e até o desenvolvimento de câncer de pele (KRUTMANN, 2006; VELÁSQUEZ, 2005; WEBBER; RIBEIRO).

Os raios ultravioletas são suficientemente energéticos para causar reações fotoquímicas, resultando em efeitos que podem afetar a pele de forma aguda ou

crônica (MASSON; SCOTTI, 2003). A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e ânion superóxido, possui papel central em iniciar e dirigir eventos de sinalização que medeiam a resposta celular à irradiação UVA (ultravioleta de comprimento de onda entre 400 e 320 nm, também conhecido como onda longa) e UVB (ultravioleta de comprimento de onda entre 320 e 280 nm, também conhecido como onda média). Em doses fisiologicamente relevantes, a geração de EROs pela radiação UV, ativa inúmeras vias de sinalização, induz dano oxidativo ao DNA e proteínas celulares (KRUTMANN, 2006; MERK et al., 2006; WANG et al., 1998). Os queratinócitos que são severamente danificados e impossibilitados de reparar o DNA induzem apoptose como um mecanismo de escape, causando sua própria eliminação em benefício do organismo, e quando isto não acontece predispõe ao câncer.

Diversos estudos demonstram que o gene supressor de tumor p53 é um dos alvos principais das mutações induzidas pela radiação ultravioleta. Esse gene está envolvido em processos celulares fundamentais como o controle do ciclo celular, apoptose, replicação e reparo de DNA, estabilidade genômica e envelhecimento (Figura 2). Sua função básica é manter a célula homeostasia. A perda desse gene ou o de seu funcionamento aumenta a possibilidade de desenvolvimento de neoplasias. Já foi demonstrado que a proteína p53 não atua corretamente na maioria dos tipos de câncer humanos (VOGELSTEIN et al., 2000).

Figura 2 – Gene p53. Papel do gene supressor de tumor p53 na manutenção do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (Adaptado de MATSUMURA e ANANTHASWAMY, 2002).

Em 2011, Hanahan e Weinberg apresentaram os Hallmarks of Cancer (Figura 3), que são características que o ambiente tumoral desenvolve e que uma vez elucidadas podem gerar novos caminhos para tratamento, sendo a resistência a apoptose um deles.

A apoptose, ou morte celular programada, é a morte controlada das células durante o desenvolvimento normal. As células apoptóticas sofrem alterações caracterizadas morfologicamente pela compactação da cromatina nuclear, contração do citoplasma e produção de corpúsculos apoptóticos nos limites da membrana (HENGARTNER, 2000) que são rapidamente fagocitados por células vizinhas,

incluindo macrófagos e células parenquimatosas (KERR et al., 1994).

Figura 3- Ilustração do “Hallmarks of Câncer” proposto por Hanahan & Weinberg. As principais características que o ambiente tumoral apresenta, sendo resistência a apoptose uma delas. (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

Há duas vias principais de regulação da apoptose: a apoptose mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e de Fas) presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e a apoptose mediada pela mitocôndria denominada via intrínseca (Figura 4) (HAIL et al., 2006; TAIT; GREEN, 2010). Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras com finalidade de executar eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (TAIT; GREEN, 2010; ZHANG et al., 2004).

Figura 4- Principais vias de Apoptose. A via extrínseca é ativada por ligantes do meio extracelular com os receptores de morte, como o Fas, que ativam as caspases iniciadoras –8 e –10. A via intrínseca é ativada por estímulos intracelulares, como dano ao DNA, que levam um sinal à mitocôndria que aumenta a permeabilidade da sua membrana externa e leva a liberação de proteínas pró-apoptóticas com posterior ativação da caspase-9. Essas duas vias são capazes de ativar caspases efetoras, como a caspase-3, que culminam a apoptose.

A via extrínseca é iniciada pela trimerização de receptores de morte na membrana plasmática e promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras (COHEN, 1997; HAIL et al., 2006). Dentre os receptores na membrana plasmática temos o receptor Fas/CD95, que uma vez associados aos seus ligantes, recruta FADD (domínio de morte associado ao Fas) e a procaspase 8 e/ou procaspase 10. A elevação nos níveis de procaspases próxima a membrana garante interação dessas caspases inativadas com proteínas adaptadoras associadas a Fas/CD95, formando complexo DISC (death-inducing signaling complex). A interação desse complexo proteico promove a autocatálise das procaspases que se tornam, nesse momento, caspases iniciadoras ativadas. A ativação proteolítica sequencial de

outras caspases culmina na ativação de caspases efetoras 3, 6 e 7 que estão no citoplasma (HAJRA; LIU, 2004).

A ação das caspases também é regulada através do bloqueio do complexo DISC por uma proteína inibidora dos receptores de morte, a c-FLIP (“FLICE-inhibitory protein”) que inibe a apoptose através da sua ligação ao FADD, prevenindo a ativação da caspase-8 (HENGARTNER, 2000).

O Fas é a principal proteína pro-apoptótica estudada da via extrínseca da apoptose e pertence a superfamília do receptor do TNF (Tumor Necrosis Factor). O gene APO1/CD95 (10q2.3) transcreve um receptor transmembrânico composto de 319 aminoácidos e peso molecular 40 a 50KDa, e induz apoptose por meio do domínio citoplasmático quando se liga ao seu ligante, Fas ligante-FasL (Ju et al., 1995). Tanto o Fas como o FasL são expressos na membrana do queratinócito, principalmente os que constituem a membrana basal da epiderme, e são importantes para manutenção da homeostasia e interação com células do sistema imunológico. No melanoma e no câncer de pele não melanoma é observado um aumento da expressão de FasL na superfície das células e dessa forma permite que as células tumorais escape do ataque de células do sistema imunológico via Fas-FasL, por exemplo (ERB et al, 2008).

Na via de morte mitocondrial, denominada via intrínseca, diversos sinais atuam modulando a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. A via mitocondrial pode ser ativada por estresse extracelular e/ou intracelular, incluindo hipóxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta, e indução de oncone, que vai resultar na ativação de proteínas pró-apoptóticas. Estas proteínas induzem a permeabilidade da membrana externa mitocondrial através da formação de canais que causa a liberação e redistribuição de pequenos íons, solutos, metabólitos e citocromo c (ANTONSSON et al., 2004; BELIZÁRIO et al., 2007). O citocromo c liberado no citosol é necessário como cofator para formação do apoptossomo. Uma vez liberado, se associa com uma proteína adaptadora (Apaf-1) que facilita a ligação ao dATP e pro-caspase 9 formando complexo apoptossomo, que ativa a caspase 9 e esta, subsequentemente ativa outras caspases (GREEN; KROMER, 1998; THORBERRY; LAZEBNIK, 1998).

Outro fator mitocondrial pró-apoptótico é o Smac/DIABLO (“second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI), liberado no citoplasma juntamente com o citocromo c (FAN et al., 2005).

Esta proteína atua inibindo as IAPs (“Inhibitor of apoptosis proteins”) que tem o papel anti-apoptótico e bloqueia a atividade das caspases. Enquanto o citocromo c liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases (TAIT; GREEN, 2010).

A permeabilidade de membrana mitocondrial depende da modulação de proteínas anti e pró-apoptóticas da família bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2). A família da proteína Bcl-2 compõe um grupo de proteínas que regula o processo de apoptose tanto na forma positiva como negativa e compreende pelo menos vinte proteínas homologas que atuam dimerizando-se entre si e podem ser classificadas em três subgrupos: anti-apoptóticas, fatores de sobrevivência semelhantes a Bcl-2 (como as proteínas bcl-2, bcl-XL, bcl-w, mcl-1), pró-apoptóticas(bax, bak, bcl-Xs, bok, bad, bid), fatores de morte semelhantes a bax, e fatores de morte BH3 (Bim, Puma e Noxa) (CHIPUK et al, 2010; TAIT; GREEN, 2008; TJALMA et al., 1998).

É conhecido que, durante a apoptose, membros da família Bcl-2 podem ser fosforilados (bcl-2 e bad), clivados (bid) e podem ter mudanças de conformação e oligomerização (bax e bak). Dentro da célula os sinais mitocondriais anti- ou pró-apoptóticos estão em equilíbrio e a predominância de um desses sinais, conduz a sobrevida ou apoptose (CHAN; YU, 2004). A interação de proteínas anti- e pró-apoptóticas, ocorre por domínio hidrofóbicos gerados por hélices de BH1 a BH4 dos membros anti-apoptóticos que interage com domínio BH3 de proteínas pró-apoptóticas (BRAS et al., 2005). Proteínas BH3, como Puma e Bim, interagem com proteínas pró-apoptóticas da família bcl-2, como Bak e Bax e essa interação induz a ativação (KUTUK & BASAGA, 2006). Assim, o equilíbrio anti- e pró-apoptótico são modulados por vias que se complementam, nas quais ocorre a associação das proteínas Bcl-2/Bax e Bcl-xL/Bak. Se o estímulo for anti-apoptótico, a ligação de Bcl-2/Bax e Bcl-xL/Bak é mantida, impedindo a formação do poro na membrana mitocondrial e liberação de citocromo-c e das IAPs (BRAS et al., 2005; KUTUK; BASAGA, 2006; PETROS et al., 2004).

Bim (Bcl-2 interacting Mediator of cell death) é uma proteína pró-apoptótica que pertence ao grupo “BH3-only” da família das proteínas Bcl-2. Possui uma região C-terminal hidrofóbica que lhe permite ligação intra-citoplasmática e é considerado um potente indutor de apoptose por ser a única do grupo que tem o potencial de se ligar a todas as proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (CHAN e YU, 2004). É expressa em vários tipos celulares e possui 3 isoformas mais comuns que são a

BimEL (Extras-Large). BimL (Large) e BimS(Smal), sendo que esta ultima tem um maior potencial apoptótico (Piñon, 2008). Em estudos utilizando camundongos nude foi demonstrado que a deficiência de Bim dá suporte para a formação e crescimento de tumores epitelial. (TAN et al., 2005).

Outra proteína do grupo BH3-only é Puma (p53 up-regulated modulator of apoptosis), Localizada na mitocôndria, é um alvo principal de p53 e desempenha um papel chave na apoptose, com capacidade para ligar e inibir as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 (YU et al., 2001). A importância dessa proteína na apoptose mediada por p53 sugere que os mecanismos para induzir ou imitar sua função pode ter um potencial terapêutico significativo em células tumorais com p53 mutante (VOUSDEN, 2008). Outra característica dessa proteína que a permite separar de outros genes alvos do p53 é que sua expressão é regulada não somente pelos elementos responsivos do p53, mas também como, por exemplo, por glicocorticóides (JEFFERS et al., 2003).

Portanto, baseado no fato de que o câncer de pele não melanoma tem como principal alvo o queratinócito e que a resistência a apoptose é uma das características apresentadas pelo tumor, o objetivo deste trabalho foi observar o comportamento das vias apoptóticas em queratinócitos mutantes para FAS e nocauteados para as proteínas Bim e Puma sob o tratamento com indutores de carcinogenês, UVB e DMBA, e quimioterápicos.

2 OBJETIVOS

Avaliação da morte celular de queratinócitos de animais nocauteados para os genes BIM, PUMA e mutante para a molécula FAS tratados com quimioterápicos e indutores de carcinogênese.

2.1 Objetivos específicos:

- estabelecimento de cultura primária de queratinócitos;
- avaliação de morte celular dos queratinócitos tratados com quimioterápicos;
- avaliação da morte celular dos queratinócitos tratados com indutores de carcinogênese, UVB e DMBA;
- avaliação das moléculas BH3-only e família BCL-2 nos queratinócitos tratados com UVB;
- indução de carcinogênese química nos animais nocauteados BIM, PUMA e mutante FAS utilizando DMBA;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para os experimentos realizados foram utilizados camundongos das linhagens C57Bl/6, C57Bl/6 nocauteado para Bim (Bim KO), C57Bl/6 nocauteado para Puma (Puma KO) e o mutante C57Bl/6 ^{lpr/lpr}, (mutante para a proteína Fas) (www.jax.org), com idade de 2 a 3 dias, procedentes do biotério de animais do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas IV da USP e mantidos em condições *germfree*.

Os procedimentos experimentais foram avaliados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do ICB-USP e cuja aprovação está registrada como protocolo nº35 nas fls 04 do livro 3 e nº60 nas fls 19 do livro 3.

3.1.1 Geração de camundongos C57Bl/6 Bim KO

Os camundongos C57Bl/6 Bim KO foram, gentilmente, cedidos pelo Dr. Douglas Green do St. Jude Children's Research Hospital. Para obtenção dos neonatos fizemos o cruzamento utilizamos fêmea em heterozigose (Segundo dados não publicados, relatados sobre cruzamentos da linhagem C57Bl/6 Bim KO, algumas fêmeas homozigotas nascem com desenvolvimento incompleto da vagina por motivo, ainda, desconhecido) e macho em homozigose para o gene Bim. Após o nascimento dos animais, uma amostra da cauda foi reservada para genotipagem e os animais utilizados para experimentação com idade de 2-3 dias.

3.1.2 Genotipagem dos animais C57Bl/6 Bim KO

Para genotipagem dos animais nocauteados para o gene Bim, as gerações filhas foram genotipadas através de reações de PCR de DNA genômico, utilizando-se *primers* (Invitrogen) específicos para as regiões alvo, cujas sequências estão descritas na Tabela 1. Para isso utilizamos fragmentos de cauda, coletados durante o desmame, ou seja, aos dias 2-3 de idade, e mantidos em nitrogênio líquido e ou gelo seco para serem extração no dia da coleta, ou, armazenadas em freezer -80 °C para posterior utilização. Os fragmentos de cauda foram macerados, para facilitar a exposição à proteína K, e o tecido foi transferido para um tubo plástico com tampa

(Eppendorf) de 1,5 ml contendo 200 µl de tampão de lise pH 8,0, acrescido de proteinase K, na proporção de 1,5 mg/ml (Life Technologies). O tampão de lise é composto por: Tris HCl 50 mM pH8,0; EDTA 10 mM pH 8,0; SDS 0,5%; água Mili-Q.

Para otimizar a lise celular, o macerado foi mantido a 65 °C durante 2 h, no Thermomix (Thermo). Após o período de incubação adicionou-se 200 µl do tampão de lise, pH 8,0, sem o acréscimo de proteinase K. Em seguida, centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos, em temperatura ambiente. Para precipitação de DNA, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 840µl de etanol absoluto com acetato de sódio (800 µl de etanol absoluto + 40 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, por amostra). Após isso, os tubos foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. No pellet foi adicionado 500 µl de etanol 70% e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspendido em 50 µl de TE (400 µl Tris 1M; 80 µ EDTA 0,5 M ; água Mili-Q). A solubilidade do DNA foi realizada a 65 °C por 30 minutos ou overnight a temperatura ambiente.

A quantificação do DNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) e as amostras foram diluídas de maneira a ficarem na concentração de 50 ng DNA/µl.

Cada reação, para determinação do gene Bim, foi realizada como descrito na Tabela 2 e Tabela 3. O Tamanho esperado de amplificação dos camundongos selvagens foi 400 bp, para camundongos mutantes 540 bp e ambos amplificados para o camundongo heterozigoto (Figura 5).

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para genotipar os animais C57Bl/6 Bim através de reações de PCR de DNA genômico.

Sequência dos primers	
PB20	CAT TCT CGT AAG TCC AGA TCT
PB65	CTC AGT CCA TTC ATC AAC AG
PB335	GTG CTA ACT GAA ACC AGA TTA G

Tabela 2. Descrição dos reagentes e quantidades utilizadas para reação de PCR para o gene Bim.

Reagente	μL
10X PCR Buffer	1,08
50mM MgCl ₂	0,32
Primer PB20 10μM	0,22
Primer PB65 10μM	0,22
Primer PB335 10μM	0,22
10mM dNTPs	0,11
Taq	0,43
dH ₂ O	7,4
	10
gDNA (50μg/mL)	2
	12

Tabela 3. Reação de PCR utilizada para genotipagem dos camundongos C57Bl/6 Bim KO.

Temperatura (°C)	Tempo	
94	4 min	
94	30 seg	
50	30 seg	30 cycles
72	1 min	
72	5 min	
4	hold

Figura 5- Eletroforese do gel de agarose da genotipagem Bim das amostras de casais formados de fêmea heterozigoto com macho homozigoto. O Tamanho esperado de amplificação dos camundongos selvagens foi 400bp, para camundongos mutantes 540 bp (seta vermelha) e ambos amplificados para o camundongo heterozigoto (seta preta). Pode-se observar o controle positivo (seta branca) e o controle negativo (seta amarela).

3.2 Cultura Primária de Queratinócitos

Os queratinócitos foram extraídos da pele de camundongos neonatos com idade de 2-3 dias. Para este procedimento, os animais foram sacrificados por decaptação e em seguida mergulhados em antisséptico (Iodopolividona, Rioquímica) por dois minutos e por duas vezes. Após isso, o excesso de iodo foi removido com água destilada e autoclavada. Os animais foram novamente imersos em etanol 70% por dois minutos e por duas vezes.

Para facilitar a remoção da pele foram feitos cortes na porção anterior das patas e da cauda. A pele retirada foi colocada numa placa de 90x15 mm de diâmetro com a derme virada para baixo e esticada. Em seguida essas placas foram incubadas a 4 °C por duas horas. Após o tempo de incubação foram adicionados as placas 10 ml de 0,25% tripsina gelada sem ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) e novamente as placas foram incubadas a 4 °C *overnight*.

Após 12 horas, a pele foi retirada da tripsina e transferida para outra placa com a derme voltada para cima, e com auxílio do Cell lifter Polyethylene (Corning incorporated) a derme foi separada da epiderme. Neste procedimento, a derme foi

descartada e sobre a epiderme foram adicionados 200 µl do meio Keratinocyte Serum Free Medium (Gibco), em seguida foi triturada com o auxílio de um bisturi até que ficasse no tamanho suficiente para ser pipetado e transferido para um tubo 1,5 ml (Eppendorf). Foi adicionado Colagenase do Tipo I (Gibco) diluída em meio KSFM (1 mg/mL, cada miligrama contém 316 unidades) para completar um volume final de 1 mL. Os tubos foram incubados por uma hora no Thermomix a 37 °C e 1200 rpm. Após incubação, foi feita uma centrifugação de 5 min a 12.000 rpm, descartado o sobrenadante e ressuspensionado em 1 mL de meio KSFM para contagem de células. A contagem de células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer e a viabilidade foi verificada por exclusão com azul de Tripan 0,2% (SIGMA).

Os queratinócitos foram plaqueados na concentração 1×10^6 células por poço em placa de 6 poços, em co-cultura com fibroblastos embrionários murinos (MEFs) irradiados na proporção 1:50. Estes fibroblastos foram utilizados como auxílio na produção de matriz extracelular e produção de citocinas, para facilitar a aderência e sobrevivência dos queratinócitos na cultura.

Os fibroblastos foram irradiados na Base da Câmara do Irradiador, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas IV da USP, com irradiação de 30.0 Grays (Gy) por minuto. Para isso, as células foram colocadas em 1mL de meio DMEM 10% de soro fetal bovino em tubo de plástico de 1,5 mL.

3.3 Imunofluorescência anti-citoqueratina

Para marcação da citoqueratina, foram fixadas 1×10^4 células, de cada extração de queratinócitos realizada, em lamínulas redondas, ou por centrífuga de células (Cytospin), com formalina 2% por 15 minutos em temperatura ambiente. Após 3 ciclos de lavagem com PBS 1x, as lamínulas foram incubadas por 30 min com uma solução de bloqueio 0,5% Tween, 5% soro fetal bovino e PBS 1x. Após isso, foi incubado com o anticorpo anti-pan-cyto-keratin-FITC (Sigma Aldrich) diluído (1:150) na solução de bloqueio por 30 minutos, na temperatura ambiente e as lamínulas lavadas, 3x em PBS 1x, por 2 minutos cada vez. Para marcação do núcleo foi incubado por 5 minutos com Hoechst (1:1000) e lavado com PBS 1x. As lâminas foram montadas com solução Mowiol (Sigma Aldrich), para prolongar fluorescência, e permaneceram por 18 horas em temperatura ambiente.

3.4 Tratamento para indução de morte

3.4.1 Tratamento com quimioterápicos

Para os ensaios de indução de morte, os queratinócitos provenientes dos animais neonatos selvagens C57Bl/6 WT e nocauteados, C57Bl/6 Puma KO, C57Bl/6 Bim KO e C57Bl/6 ^{lpr/lpr} foram plaqueados na concentração de 1×10^5 células por poço em placa de 96 poços, cultivadas em 200 μ L de meio KSFM completo na presença ou ausência das drogas com Actinomicina D (AD) nas concentrações de 1 μ g/ml e 5 μ g/ml, Etoposídeo (VP-16) nas concentrações 10 μ M e 50 μ M, e Cicloheximida (CHX) nas concentrações 1 mM e 2 mM. As células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 18 horas. Após tratamento as células foram coletadas, processadas e submetidas a marcações específicas para quantificação da apoptose.

3.4.2 Tratamentos com UVB

Para o ensaio de indução de morte com UVB foram plaqueadas 1×10^6 queratinócitos de pele de neonatos de C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Puma KO, C57Bl/6 Bim KO e C57Bl/6 ^{lpr/lpr} em placas de 35 mm em 1,5 ml de KSFM, em triplicata. As placas foram exposta a doses de UVB 100 J/m² e 400 J/m² em equipamento gentilmente cedido pelo Prof Dr Carlos Frederico Menck, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, e mantidas em estufa umidificada à 37 °C com 5% de CO₂. Após o período de 24 hs, as células foram coletadas e submetidas a marcações específicas para quantificação de apoptose.

3.4.3 Tratamento com DMBA

Os queratinócitos provenientes dos animais selvagens e nocauteados, foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células por poço em placa de 6 poços, cultivadas em 1,5 mL de meio KSFM na presença ou ausência de DMBA (Sigma Aldrich) na concentrações de 7,8 μ g/ml diluído em 0,1% de DMSO. (Das et al.,

1989). As células foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 5 dias. Após tratamento as células foram coletadas, processadas e submetidas a marcações específicas para quantificação da apoptose.

3.4.4 Quantificação de apoptose por Anexina V e Iodeto de Propídio

Após os tratamentos com indutores de morte, DMBA e exposição à UVB, as células foram marcadas pela incubação com Anexina V acoplada a FITC e com PI (*propidium iodide*), células em fase precoce de apoptose são positivas para Anexina V e negativas para PI, indicando a externalização de fosfatidilserina e a integridade das membranas, ao contrário de células necróticas e em fase tardia do processo apoptótico, as quais são positivas para os dois marcadores. As células após tratamento foram coletadas e centrifugadas a 300 g por 5 minutos a uma temperatura de 4°C e lavadas uma vez em tampão de ligação (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂). Em seguida, foram incubadas com Anexina V em 100µL de tampão de ligação (1:1000) por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após incubação foi acrescentado 100 µL de tampão de ligação e 100 µg/mL de PI. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o *software* FlowJo (Three Star) de acordo com a figura 6.

Figura 6- Estratégia de análise da avaliação da morte celular através da análise da externalização de resíduos de fosfatidilserina: A figura mostra porcentagem de células viáveis (quadrante inferior esquerdo), células em fase precoce de apoptose (quadrante inferior direito) e células em fase tardia de apoptose ou em necrose (quadrante superior direito).

3.5 Extração e quantificação de proteína

Foram coletados 1×10^7 células da cultura de queratinócitos, do C57Bl/6 selvagem e dos nocautes e ressuspensos em 20 μL de tampão RIPA (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Sodium Deoxycholate, 0,1% SDS) contendo inibidor de protease (Complete mini EDTA-free, Roche) em seguida, foram centrifugadas a 12.000 g por 3 minutos a uma temperatura de 4 °C e após centrifugação o sobrenadante foi coletado e quantificado.

Após extração proteica, as amostras foram quantificadas seguindo o protocolo do kit *BCA protein assay*, Pierce Thermo. Foi realizada medida de absorbância das amostras em espectrofotômetro (Versa MAX) em um comprimento de onda de 562 nm. A análise das amostras foi realizada pelo *software* SOFTmax PRO 40, Molecular devices. As amostras foram mantidas a -80 °C.

3.6 Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) e “Western-blot”

Este método foi utilizado para detectar a expressão de proteínas nas amostras. Assim sendo, foram utilizadas 20 μg de proteína dos grupos tratados ou

não, acrescido de tampão de amostra contendo betamercapto e aquecidas a 100 °C. As proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS PAGE – “*Sodium dodecyl sulphate gel eletrophoresis*”), seguida de “Western-Blot”.

Após a preparação do gel de corrida na percentagem adequada entre 10-15%, para viabilizar a detecção de cada proteína estudada, 20 µL de cada amostra contendo 20 µg de proteína foram aplicadas em cada poço e a eletroforese conduzida a 100V.

Após a eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas através de um sistema semi-seco (*Semi-Dry transfer cell* – BIO-RAD) para uma membrana de 0,22 mm de PVDF durante 1 hora a 15V . Após transferência, as membranas foram deixadas na solução de bloqueio contendo 5% leite em pó desnatado em TBS-Tween (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 0,05% Tween 20) acrescido de 0,1% azida por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, incubadas *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário. Após a marcação as membranas foram lavadas três vezes em tampão TBS-Tween e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário apropriado conjugado a peroxidase. Após este período as membranas são submetidas à lavagem por três vezes consecutivas e a detecção dos imunocomplexos foi feita pelo método de quimiluminescência, ECL (*enhanced chemiluminescence*) preparado em nosso laboratório [Solução A: 9 mL H₂O, 1 mL Tris/HCl 1M pH 8,5, 22 µL p-Coumaric acid 90 mM, 50 µL Luminol 250 mM e Solução B: 450 µL H₂O e 50 µL H₂O₂ 30%]. Após esse procedimento as membranas são expostas a um filme de autoradiografia (Kodak) e as bandas analisadas quanto ao peso molecular das proteínas investigadas. O tempo de exposição das membranas ao filme foi de acordo com a intensidade de marcação e variou de 5 minutos à 30 minutos.

Os anticorpos primários utilizados foram: BAX, BIM, Bid (Cell Signaling, Danver, MA, USA) Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-rabbit e anti-mouse (Cell Signaling, Danver, MA, USA).

3.7 Indução da Tumorigênese Cutânea *in vivo*

Para a indução de tumorigênese cutânea, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 selvagem, C57BL/6 Puma KO, C57BL/6 BIM KO e o C57BL/6^{lpr/lpr}, com idade entre 6-8 semanas, pesando 25 à 30 g (www.jax.org). Cada animal recebeu 50ug de DMBA (7,12-Dimetilbenzenoantraceno) (Sigma Aldrich), dissolvido em 0,1 ml de acetona (agente iniciador) no dorso previamente depilado durante cinco dias consecutivos. Os animais foram acompanhados por 200 dias. Durante este período os diferentes grupos de animais foram observados e o número de papilomas contados. A contagem do número de papilomas foi realizada mensalmente através de análise macroscópica no dorso dos animais tratados com DMBA até atingir os 200 dias. A avaliação de tumores e metástases nos grupos de animais, também foi feita macroscopicamente em órgãos internos no dia 200. A pele foi retirada e armazenada em paraformaldeído 10% para posterior avaliação histológica.

3.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um *software* computacional *Graphpad Prism*, da companhia *Graphpad Software Incorporation*, versão 5. O teste usado foi o TWO- AWAY ANOVA, seguido pelo teste Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Cultura primária dos queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para a proteína Fas.

Pele de camundongos neonatos das linhagens C57Bl/6 (WT), C57Bl/6 nocauteado para Bim (Bim KO), C57Bl/6 nocauteado para Puma (PUMA KO) e o mutante para a proteína Fas, C57Bl/6 ^{lpr/lpr}, com idade de 2 a 3 dias, foram retiradas e processadas para obtenção de queratinócitos (figura 7).

Figura 7– Cultura primária dos queratinócitos extraídos de pele de neonatos. Ilustração de cultura de queratinócitos extraídos de pele de neonatos nocauteados, mantidos em KSFM a 37 °C, 5% de CO₂. (a) aumento de 20x; (b) aumento de 40x.

4.2 Imunofluorescência dos queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para a proteína Fas.

Após obtenção das culturas de queratinócitos nosso primeiro passo foi caracterizar estas através do ensaio de Imunofluorescência utilizando anticorpo conjugado anti-citoqueratina (Figura 8). As citoqueratinas são proteínas sintetizadas pelos queratinócitos essenciais na formação do citoesqueleto. Neste ensaio, foram fixadas 1×10^4 células de cada extração em lamínulas redondas e em seguidas marcadas com o anticorpo conjugado anti-citoqueratina e com Hoechst, um corante fluorescente de marcação de núcleo que emite fluorescência azul quando se liga ao DNA (KIECHLER e ZHANG 2003). Podemos observar na figura 8, que os queratinócitos emitem uma fluorescência verde com o núcleo em azul.

Figura 8 – Imunofluorescência dos queratinócitos nocauteados. Ilustração de queratinócitos extraídos de pele de neonatos nocauteados marcados com anticorpo conjugado anti-citoqueratina (fluorescência verde) e núcleo (fluorescência azul): (a) Queratinócitos Bim KO, aumento de 20x; (b) Queratinócitos Bim KO, aumento de 63x.

4.3 Análise da morte celular da cultura primária de queratinócitos de camundongos selvagens e nocauteados tratados com quimioterápicos indutores de morte.

Para melhor entender como os mecanismos de apoptose se comportam nos queratinócitos provenientes de animais selvagens e nocauteados para Puma e Fas, estas células foram tratadas com quimioterápicos e marcadas para quantificação de morte celular. As culturas de queratinócitos foram tratadas com Actinomicina D (AD) nas concentrações de 1 µg/ml e 5 µg/ml (Figura 9), Etoposídeo (VP-16) nas concentrações 10 µM e 50 µM (Figura 10), e Cicloheximida (CHX) nas concentrações 1 mM e 2 mM (Figura 11), administrados isoladamente por um período de 18 horas.

4.3.1 Tratamento com Actinomicina D.

A Tabela 4 apresenta os valores em porcentagem de morte celular por Anexina V e PI no tratamento com Actinomicina D. O grupo sem tratamento dos queratinócitos C57Bl/6 Lpr teve uma morte basal de 21,9% dentre esses valores, 6,86% positivo para Anexina V, indicando que as células estão em fase inicial da apoptose e 15,04% positivo tanto para Anexina V quanto para PI, indicando processo tardio da apoptose. Perfil semelhante foi encontrado para as células sem tratamento do grupo Puma KO, que teve uma morte basal de 27,81% onde 9,51% foram positivas somente para Anexina V e 18,3% tanto Anexina V quanto PI. Quando comparados com os queratinócitos WT, que tiveram 10,72% de morte basal, sendo 2,7% positivo para Anexina V e 8,02% positivo para Anexina V e PI. Entretanto, quando tratados com AD 1µg/ml o grupo Puma KO apresentou maior sensibilidade com 72,55% de morte celular (57,3% positivas para Anexina V e PI e 15,25% positivas somente para Anexina V) em relação as células WT e Lpr, que tiveram 33,7% (23,55% duplo positivo e 10,15% Anexina V) e 58,7% de morte (9,5% Anexina V e 49,2% duplo positivo), respectivamente. No tratamento com a concentração de 5µg/ml de AD o grupo Puma KO se mostrou mais sensível, novamente, à morte celular do que o grupo WT e Lpr. O grupo Puma KO apresentou um perfil de 69,9% de morte (7,79% Anexina V e 61,3% duplo positivo), o grupo Lpr

59,14% (21,74% Anexina V e 37,4% duplo positivo), enquanto o grupo WT 36,96% (4,98% Anexina V e 31,95% duplo positivo).

Na figura 9a mostra os gráficos representativos das aquisições dos queratinócitos dos diferentes grupos marcados com Anexina V (FITC) e PI (PE) no tratamento com AD nas doses referidas.

Na análise das células positivas para a marcação com Anexina V (Figura 9b) os resultados obtidos foram semelhantes a análise anterior. O grupo Puma KO no tratamento com AD 1 µg/ml e 5 µg/ml apresentou uma morte de 38,83% ($p<0,05$) e 37,16% ($p<0,05$) de diferença, respectivamente, em relação ao WT. Entre os grupos WT e Lpr não houve diferença significativa

Tabela 4..Morte celular de queratinócitos tratados com Actinomicina D

		Anexina -/ PI-	Anexina V+	Anexina+/ PI+	PI+
C57bL/6 WT	ST	83,3±10,18	2,7±2,02	8,02±7,31	5,99±0,87
	AD 1µg/ml	61,65±4,45	10,15±3,88	23,55±1,34	4,4±0,45
	AD 5µg/ml	54,35±5,02	4,98±0,56	31,95±3,6	8,74±1,92
C57bL/6 Lpr	ST	74,4±9,89	6,86±2,37	15,04±8,57	3,67±1,06
	AD 1µg/ml	37,3±6,5	9,5±0,03	49,2±6,5	4,06±0,07
	AD 5µg/ml	33±25,03	21,74±19,17	37,4±4,24	7,78±1,56
C57bL/6 Puma	ST	66,7±9,75	9,51±3,37	18,3±4,1	5,49±2,3
	AD 1µg/ml	21,65±2,05	15,25±7	57,3±3,39	5,54±1,23
	AD 5µg/ml	19,3±4,45	7,79±0,83	61,3±11,59	6,48±0,77

Apresentação dos valores em porcentagem de morte adquiridos por marcação de Anexina V e PI no tratamento com Actinomicina D, por 18 horas, em queratinócitos selvagens, nocauteado para a proteína Puma e mutantes para a proteína Fas

Figura 9. Efeito da AD na morte celular em queratinócitos WT, mutante para gene Fas e nocaute para o gene Puma. Os queratinócitos foram extraídos de pele de neonato das linhagens C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Puma KO e C57Bl/6 Lpr e tratados com AD nas concentrações 1μg/ml e 5μg/ml, no período de 18 horas e depois marcadas para quantificação de apoptose. A morte celular foi analisada através da marcação com Anexina V (FITC) e PI (PE), sendo considerados em morte celular somente as células marcadas positivamente com Anexina V e duplo positivo Anexina e PI; (a) Queratinócitos WT, queratinócitos LprKO e queratinócitos Puma KO e (b) gráfico representativo da análise das populações celulares por tamanho (FSC) x Anexina V. Os resultados representam dois experimentos independentes, ST, sem tratamento. *p<0,05.

4.3.2 Tratamento com Etoposídeo.

As culturas de queratinócitos provenientes de animais nocauteados para o gene Puma e mutante para o gene do Fas, assim como WT, foram tratadas com Etoposídeo (VP-16) nas concentrações 10 μ M e 50 μ M (Figura 10), por 18 horas, e marcadas para quantificação de apoptose. Quando tratados com VP-16 10 μ M, grupo Lpr apresentou 36,93% de morte celular (27,7% positivas para Anexina V e PI e 9,23% positivas somente para Anexina V), enquanto células WT e Puma KO, tiveram 40,17% (33,4% duplo positivo e 6,77% Anexina V) e 41,78% de morte (7,08% Anexina V e 34,7% duplo positivo), respectivamente. No tratamento com a concentração 50 μ M os grupos também não apresentaram diferença significativa entre eles. O grupo Puma KO apresentou um perfil de 50,41% de morte (7,36% Anexina V e 43,05% duplo positivo), o grupo WT 50,16% (4,36% Anexina V e 45,8% duplo positivo), enquanto o grupo Lpr 39,25% (4,5% Anexina V e 34,75% duplo positivo). Podemos observar na figura 8a, a representação gráfica das aquisições dos queratinócitos marcados com Anexina V e PI no tratamento com VP-16 nas doses citadas.

Tabela 5. Morte celular de queratinócitos tratados com Etoposídeo.

		Anexina -/ PI-	Anexina V+	Anexina+/ PI+	PI+
C57bL/6 WT	ST	83,3±10,18	2,7±2,02	8,02±7,31	5,99±0,87
	VP-16 10µM	52,3±1,41	6,77±0,35	33,4±5,93	7,5±4,1
	VP-16 50µM	42,95±6,43	4,36±1,1	45,8±10,04	9,9±0,42
C57bL/6 Lpr	ST	74,4±9,89	6,86±2,37	15,04±8,57	3,67±1,06
	VP-16 10µM	58,95±2,47	9,23±1,05	27,7±2,82	4,13±0,7
	VP-16 50µM	53,45±7,7	4,5±1,13	34,75±8,98	7,37±2,42
C57bL/6 Puma	ST	66,7±9,75	9,51±3,37	18,3±4,1	5,49±2,3
	VP-16 10µM	48,85 ±9,54	7,08±2,59	34,7±5,23	9,365±1,23
	VP-16 50µM	37,9±2,4	7,36±5,99	43,05±1,48	22,45±8,27

Apresentação dos valores em porcentagem de morte adquiridos por marcação de Anexina V e PI no tratamento com Etoposídeo, por 18 horas, em queratinócitos selvagens, nocauteados para a proteína Puma e mutantes para a proteína Fas.

Ao avaliarmos apenas as marcações dos queratinócitos tratados com Etoposídeo, positivos para a marcação com Anexina V (Figura 10b) observamos que os resultados obtidos foram semelhantes a análise anterior. Verificamos que no tratamento com VP-16 10 µM e 50 µM não houve diferença significativa entre os grupos WT, Lpr e Puma KO.

Figura 10. Efeito do Etoposídeo na morte celular em queratinócitos WT e nocauteados para o gene Puma e mutante para o gene Fas. Os queratinócitos foram extraídos de pele de neonato das linhagens C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Puma KO e C57Bl/6 Lpr e tratados com VP-16 nas concentrações 10 μ M e 50 μ M, no período de 18 horas e depois marcadas para quantificação de apoptose. A morte celular foi analisada através da marcação com Anexina V e PI, sendo considerados em apoptose somente as células marcadas positivamente com Anexina V e duplo positivo Anexina e PI; (a) Queratinócitos WT, queratinócitos mutantes para o gene Fas e queratinócitos nocauteados para o gene Puma e (b) gráfico representativo da análise das populações celulares por tamanho (FSC) x Anexina V. Os resultados representam dois experimentos independentes. ST, sem tratamento.

4.3.3 Tratamento com Cicloheximida.

Para o tratamento com Cicloheximida (CHX) foram usadas as concentrações 1mM e 2mM, por 18 horas, e marcadas para quantificação de apoptose, sendo considerados Anexina V positivo e Anexina V e PI positivo (Tabela 6). Quando tratados com 1mM, os grupos não apresentaram diferença significativa entre eles. O grupo LPRKO apresentou 57,45% de morte celular (5,3% positivas para Anexina V e PI e 52,15% positivas somente para Anexina V), e os grupos WT e Puma KO, tiveram 61,01% (49,2% duplo positivo e 11,81% Anexina V) e 56,8% de morte (13,25% Anexina V e 43,55% duplo positivo), respectivamente. No tratamento com a concentração de 2mM o grupo LprKO mostrou ser mais sensíveis a morte celular do que os grupo WT e Puma KO. Os resultados mostram, no grupo Puma KO uma porcentagem de 42,92% de morte (5,62% Anexina V e 37,3% duplo positivo), no grupo WT 42,6% (13,95% Anexina V e 28,65% duplo positivo), enquanto no grupo LprKo foi de 73,53% (5,03% Anexina V e 52,15% duplo positivo). A figura 11a mostra a representação gráfica da aquisição por Anexina V e PI no tratamento com CHX nas doses referidas.

Tabela 6..Morte Celular dos queratinócitos tratados com Cicloheximida

		Anexina -/ PI-	Anexina V+	Anexina+/ PI+	PI+
C57bL/6 WT	ST	83,3±10,18	2,7±2,02	8,02±7,31	5,99±0,87
	CHX 1mM	33±2,12	11,81±5,92	49,2±4,38	5,99±3,66
	CHX 2mM	50,4±9,61	13,95±1,2	28,65±6,57	7,06±4,29
C57bL/6 Lpr	ST	74,4±3,74	6,86±2,37	15,04±8,57	3,67±1,06
	CHX 1mM	36,05±7,56	5,3±0,92	52,15±6,01	6,53±2,5
	CHX 2mM	21,04±22,99	5,03±1,58	68,5±24,32	5,45±0,28
C57bL/6 Puma	ST	66,7±9,75	9,51±3,37	18,3±4,1	5,49±2,3
	CHX 1mM	38,3±0,28	13,25±0,21	43,55±4,52	4,88±0,52
	CHX 2mM	47,8±6,08	5,62±0,6	37,3±4,52	9,28±0,94

Apresentação dos valores em porcentagem de morte adquiridos por marcação de Anexina V e PI no tratamento com Cicloheximida, por 18 horas, em queratinócitos selvagens, nocauteados para a proteína Puma e mutantes para a proteína Fas

Ao observarmos os dados analisados das células com marcação positiva para Anexina V (Figura 11b) os resultados obtidos mostraram-se semelhantes à análise

anterior. O grupo Lpr no tratamento com CHX 2mM apresentou uma morte de 30,93% ($p<0,05$) de diferença em relação ao WT e 30,61% ($p<0,05$) de diferença em relação ao grupo Puma KO. Não houve diferença significativa entre os grupos Puma KO e WT.

Figura 11 - Efeito da Cicloheximida na morte celular em queratinócitos WT e nocauteado para o gene Puma e mutante para gene Fas. Os queratinócitos foram extraídos de pele de neonato das linhagens C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Puma KO e C57Bl/6 Lpr e tratados com CHX nas concentrações 1 mM e 2 mM, no período de 12 horas e depois marcadas para quantificação de apoptose. A morte celular foi analisada através da marcação com Anexina V e PI, sendo considerados em apoptose somente as células marcadas positivamente com Anexina V e duplo positivo Anexina e PI; (a) Queratinócitos WT, queratinócitos LPR e queratinócitos Puma KO e (b) gráfico representativo da análise das populações celulares por tamanho (FSC) x Anexina V. Os resultados

representam dois experimentos independentes, cada um foi realizado em duplicata. ST, sem tratamento.* $P < 0,05$.

4.4 Análise da morte celular da cultura primária de queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para o gene Fas tratada com luz Ultravioleta B.

Após avaliarmos a resposta dos queratinócitos de animais selvagens (C57BL/6) e nocauteados para genes relacionados à apoptose quanto à resistência e ou sensibilidade à morte celular tratadas com quimioterápicos, nosso próximo objetivo foi avaliar a morte celular induzida por irradiação ultravioleta B (UVB). Para essa nova etapa foram usados queratinócitos extraídos de pele de neonato das Linhagens C57BL/6 WT, C57BL/6 Puma KO, C57BL/6 Lpr e C57BL/6 Bim KO. As células foram submetidas a irradiação de 100J/m^2 e 400J/m^2 e mantidas em incubação por 24h à 37°C e após este período coletadas, marcadas para avaliação de morte celular com Anexina V e PI e avaliadas em citometro de fluxo (Figura 12).

Na figura 9 mostra o perfil de morte basal entre os grupos que se mostraram semelhante. O grupo WT (figura 12a) teve uma morte basal de 11,86%, sendo 11,6% positivas para marcação anexina V e 0,261% positivas tanto pra marcação com anexina quanto PI. O grupo Lpr KO teve um morte basal de 3,09% (2,13% Anexina V positivas e 0,96% duplo positiva para Anexina V e PI), o grupo Puma KO 20,7% (4,7% Anexina positiva e 16% duplo positivo para anexina e PI) e o grupo Bim KO 13,82% (3,02% Anexina V positiva e 10,8% duplo positivo pra Anexina e PI).

Quando os grupos foram expostos a 100J/m^2 o grupo Bim KO apresentou maior sensibilidade com 48,67% de morte celular (43% positivas para Anexina V e PI e 5,67% positivas somente para Anexina V) em relação as células WT, Lpr e Puma KO, que tiveram 11,37% (0,261% duplo positivo e 11,6% Anexina V), 11,27% de morte (10,6% Anexina V e 0,674% duplo positivo) e 21,12% (16% duplo positivo para anexina e PI e 4,7% positivo para Anexina V), respectivamente. Mas não apresentaram diferenças estatísticas significantes.

Na exposição a 400J/m^2 houve uma maior sensibilidade dos grupos a morte celular, porém também não ocorreu diferença estatística entre os grupos. Avaliando as células pelo seu tamanho e positividade para Anexina V (Figura 12b) os resultados obtidos foram semelhantes a análise anterior.

Figura 12. Efeito da irradiação ultravioleta B na morte celular em queratinócitos WT e nocauteados para o gene Puma e Bim, e mutantes para o gene Fas. Os queratinócitos foram extraídos de pele de neonato das linhagens C57BL/6 WT, C57BL/6 Puma KO, C57BL/6 Lpr e C57BL/6 Bim KO e expostos a irradiação ultravioleta B nas intensidades 100J/m² e 400J/m². Foram incubadas a 37°C e depois marcadas para quantificação de apoptose. A morte celular foi analisada através da marcação com Anexina V e PI, sendo considerados em apoptose somente as células marcadas positivamente com Anexina V e duplo positivo Anexina e PI; (a) Queratinócitos WT, queratinócitos Lpr, queratinócitos Puma KO e queratinócitos Bim KO e (b) gráfico

representativo da análise das populações celulares por tamanho (FSC) x Anexina V.

4.5 Análise da morte celular da cultura primária de queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene BIM, PUMA e mutado para o gene Fas tratada com o carcinógeno DMBA

Para uma melhor caracterização dos queratinócitos de pele de neonatos de C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Lpr, C57Bl/6 Puma KO e C57Bl/6 Bim KO, utilizamos um outro agente químico carcinogênico, o DMBA (7,12-dimethylbenz(a)anthracene). Para isso utilizamos a dose de 7,8 µg/ml diluído em 0,1% de DMSO, esta droga foi acrescentada na cultura por 5 dias (Figura 13). Após este período, as células foram coletadas e submetidas à marcação com Anexina V e PI para quantificação de apoptose. A leitura foi realizada em citometro de fluxo.

Podemos observar que o grupo Bim KO (Figura 13a) mostrou uma maior sensibilidade a morte celular com o tratamento em relação ao grupo WT e Lpr, mostrando uma morte de 31,28%, sendo que 0,883% das células eram positivas para Anexina V e 30,4% duplo positivas para Anexina V e PI, indicando processo tardio da apoptose, enquanto o grupo WT apresentou 4,77% (1,85% Anexina positiva e 2,92% Anexina e PI positivos) e o grupo Lpr 5,65% (0,51% Anexina positiva e 5,14 duplo positivo).

O grupo Puma KO não apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos, obteve uma morte de 4,31% (0,18% Anexina positiva e 4,13% duplo positivo). Entretanto, as células Puma KO não tratadas apresentaram uma maior sensibilidade em relação ao grupo tratado com DMBA, com uma morte de 9,71%, sendo 15,9% positivo para Anexina V e PI e 0,9% positivo para Anexina V.

No gráfico da figura 13b, avaliando as células pelo tamanho e positividade para Anexina V, os resultados obtidos foram semelhantes a análise anterior. O grupo Bim KO no tratamento com DMBA apresentou uma morte de 29,83% ($p < 0,01$) de diferença em relação ao grupo Lpr e 33,27% ($p < 0,001$) de diferença em relação ao grupo WT. Não houve diferença significativa entre os grupos Puma KO, Lpr e WT.

Figura 13. Efeito do agente químico carcinogênico DMBA na morte celular em queratinócitos WT, nocautes para Puma, Bim e mutante para Fas. Os queratinócitos foram extraídos de pele de neonato das linhagens C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Puma KO, C57Bl/6 Lpr e C57Bl/6 Bim KO e tratados com ou sem 7,8 µg/ml DMBA em 0,1% DMSO. Foram incubadas a 37°C, por 5 dias e depois marcadas para quantificação de apoptose. A morte celular foi analisada através da marcação com Anexina V e PI, sendo considerados em apoptose somente as células marcadas positivamente com Anexina V e duplo positivo Anexina e PI; (a) Queratinócitos Bim KO, (b) queratinócitos Lpr e (c) queratinócitos Puma KO, (d) queratinócitos WT e (e) gráfico representativo da análise das populações celulares por tamanho (FSC) x Anexina V. Os resultados representam dois experimentos independentes, cada um foi realizado em duplicata. ST, sem tratamento. **p<0,01.

4.6 Análise da expressão de proteínas pro-apotóticas nos queratinócitos extraídos da pele de neonatos selvagens e nocauteados para o gene PUMA e mutado para o gene Fas tratada com UVB.

Para determinar quais proteínas da família BCL-2 estão envolvidas na indução de morte dos queratinócitos no tratamento com UVB, fomos investigar algumas proteínas envolvidas na morte celular por apoptose. Os queratinócitos foram expostos a UVB com a intensidade de 400 J/m² e após tratamento foram mantidos por 48 horas, em seguida coletados e adicionados em um tampão de lise para extração de proteínas.

Figura 14. Expressão de proteínas pro-apoptóticas de queratinócitos nocauteados para Puma e mutante para Fas no tratamento com UVB. Os queratinócitos foram tratados com 400J/m² de UVB e os lisados celulares foram coletados. A expressão proteica de BAX (20kDa), Bim EL (23kDa), Bim L (15kDa) e Bid truncado (14kDa) foram detectadas por Western blot em diferentes tempos.

Ao observarmos a expressão das proteínas Bax, Bid e Bim (EL e L) nas amostras de queratinócitos tratados ou não com UVB verificamos que, no caso da proteína Bax, os grupos de animais WT e Puma KO não apresentaram alteração, no entanto, os animais do grupo Lpr que receberam UVB tiveram a expressão de Bax diminuída quando comparados ao seu grupo não tratado.

A expressão de Bid truncado foi observada apenas nos grupos WT e Puma KO sem tratamento, nos demais grupos não foi possível detectar esta proteína nas condições por nós utilizada.

Já a proteína pro-apoptótica Bim, na sua isoforma EL, foi detectada apenas no grupo Puma KO. No caso da isoforma L, foi detectada nos grupos WT, tratados ou não com UVB, no grupo Lpr não tratado e no grupo Puma tratado com UVB. A figura ainda sugere, que a expressão de BimL é menor no grupo WT, tratado ou não com UVB, e no grupo Lpr não tratado quando comparado ao Puma tratado.

4.7 Indução da Tumorigênese cutânea in vivo

Após caracterizar o perfil de morte dos queratinócitos de pele de neonato de C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Puma KO, C57Bl/6 Lpr e C57Bl/6 Bim KO *in vitro* com o uso de quimioterápicos e indutores de carcinogênese, resolvemos avaliar estes animais em uma abordagem *in vivo*, utilizando um modelo de tumorigênese cutânea através do uso do agente químico carcinogênico DMBA. Neste modelo avaliamos a resposta quanto ao desenvolvimento e crescimento de papiloma nos diferentes grupos de animais. Para isso utilizamos animais C57Bl/6 WT, C57Bl/6 Lpr, C57Bl/6 Puma KO e C57Bl/6 Bim KO, que foram tratados com DMBA, iniciador do tumor, por cinco dias consecutivos na dose de 50 ug/0,1 mL diluído em acetona. Os animais foram observados por 200 dias após o término de aplicação do DMBA.

Como demonstrado na Figura 15 os grupos de camundongos apresentaram reação inflamatória no dorso após aplicação epicutânea das 5 doses consecutivas do carcinógeno DMBA, sendo que todos os grupos apresentaram resolução da inflamação no decorrer de 15 a 20 dias.

Figura 15 - Imagem representativa da pele dos animais após tratamento com DMBA. (a) C57BL/6 WT, (b) C57BL/6 Lpr, (c) C57BL/6 Puma KO e (d) C57BL/6 Bim KO. Imagem representativa dos grupos de animais após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA diluído em acetona.

Os grupos de animais C57BL/6 WT, C57BL/6 Lpr, C57BL/6 Bim KO e C57BL/6 Puma KO que foram submetidos ao protocolo de tumorigênese, foram acompanhados mensalmente até o dia 200. Como podemos observar a Figura 16, notamos que houve crescimento de papiloma em todos os grupos, com exceção do grupo Bim KO. No entanto, foi observado em alguns animais da linhagem C57BL/6 WT, que os papilomas apresentavam um crescimento maior que os demais (Figura 16a). Por outro lado, o aparecimento do papiloma é mais tardio em relação ao C57BL/6 Lpr (Figura 17b) que tinha o surgimento com 30 dias.

Figura 16. Imagem representativa da pele dos animais 200 dias após tratamento com DMBA/TPA. (a) C57BL/6 WT, (b) C57BL/6 Lpr e (c) C57BL/6 Puma KO, (d) C57BL/6 Bim KO. Imagem representativa dos grupos de animais 200 dias após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA, diluído em acetona.

A multiplicidade (Figura 17a) e incidência (Figura 17b) foram avaliadas nos grupos de animais C57BL/6 WT, C57BL/6 Lpr, C57BL/6 Bim KO e C57BL/6 Puma KO. A multiplicidade não mostrou diferença entre os grupos de animais. No entanto, a incidência mostrou um aumento significativo nos animais C57BL/6 Lpr quando comparados com os demais grupos. O Grupo C57BL/6 Lpr apresentou papiloma com 30 dias de protocolo enquanto o C57BL/6 WT, C57BL/6 Puma KO, o aparecimento foi por volta do dia 100. O grupo Bim KO e Bim heterozigoto não apresentaram papiloma durante os 200 dias de tratamento.

Figura 17. Multiplicidade e incidência de papilomas na pele dos animais das linhagens C57BL/6 WT, C57BL/6 Lpr, C57BL/6 Bim KO e C57BL/6 Puma KO tratados com DMBA. Animais (n=6 para cada grupo) foram tratados com DMBA e observados por 200 dias. O gráfico de multiplicidade (a) mostra os resultados expressos que representam a média dos papilomas em cada grupo e em cada período de observação e o gráfico de incidência (b) os resultados expressos em porcentagem de animais positivos para o papiloma na observação macroscópica. Análise estatística da multiplicidade feita por One-way ANOVA seguido por Bonferroni, e a análise estatística da incidência feita pelo teste Exato de Fisher.

5 DISCUSSÃO

Os tumores de pele melanoma e não melanoma constituem o grupo de neoplasias mais comuns nos humanos. Segundo dados do INCA, em 2014, no Brasil, estima-se mais de 90 mil casos novos de câncer não melanoma nos homens e mais de 80 mil nas mulheres. Quanto ao melanoma a incidência é mais baixa quando comparada com o não melanoma, em torno de 3.000 novos casos para ambos os sexos, porém sua letalidade é mais elevada. A pele é um órgão heterogêneo e, portanto, esse tipo de câncer pode apresentar neoplasias de diferentes origens. Os mais freqüentes são: carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele, o carcinoma espinocelular ou epidermóide com 25% dos casos e o melanoma, detectado em 4% dos pacientes. O carcinoma basocelular, mais freqüente, é também o menos agressivo, e, juntamente com o carcinoma espinocelular, são também chamados de câncer de pele não melanoma, enquanto o melanoma e outros tipos, com origem nos melanócitos, são denominados de câncer de pele melanoma.

Uma das características do desenvolvimento do câncer é a resistência intrínseca ou adquirida à apoptose, que pode contribuir para a carcinogênese, a progressão do tumor, e também a resistência ao tratamento. Assim, uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares em relação aos estímulos de estresse celular e às alterações celulares e bioquímicas da célula, bem como os mecanismos pró- e anti-apoptóticos que contribuem para a resposta de resistência ou susceptibilidade de morte da célula tumoral é essencial para elucidar novas abordagens terapêuticas.

Neste trabalho utilizamos queratinócitos extraídos da pele de animais neonatos nocauteados para proteínas “BH3-only”, Puma e Bim, que interagem com proteínas pró-apoptóticas, animais neonatos mutante para Fas e selvagem. Os queratinócitos receberam tratamento com quimioterápicos, e indutores de carcinogênese, a UVB e o DMBA. Como quimioterápicos utilizamos a Actinomicina D, Etoposídeo e Cicloheximida, que são já bastante utilizados em tratamentos de câncer, e tem como atividade biológica a inibição da síntese proteica ou síntese de RNA. Desta forma, foi possível avaliarmos o perfil de morte celular e indução carcinogênica desenvolvido por estes tipos de células e verificar o papel exercido por tais moléculas durante o tratamento.

Em outra abordagem, avaliamos o desenvolvimento do tumor nesses animais, já na fase adulta, utilizando um modelo de tumorigênese química induzida pelo DMBA, com o intuito de avaliar a participação das moléculas Puma, Bim e Fas no processo de indução, desenvolvimento e eliminação em resposta à formação de tumor, já que este protocolo mimetiza o câncer de pele não melanoma (ABEL et al., 2009)

A indução de morte de células tumorais pela via de receptores de morte tem sido relatada em diversos estudos como o principal mecanismo de combate ao tumor e um bloqueio do receptor Lpr/CD95 tem gerado aumento na tumorigênese e na resistência aos tratamentos (FUDA et al, 2010; FRENCH; TSCHOPP, 1999). Como descrito na literatura, Fas é uma molécula pro apoptótica da via extrínica da apoptose, constitui a família TNF de receptores. Os animais C57Bl/6 Lpr (*Lymphoproliferation*) são caracterizados por ter uma mutação no gene da proteína Fas, que provoca uma terminação prematura na leitura no gene (PETER et al., 2007). Quando os queratinócitos provenientes desses animais foram tratados com AD, nas doses 1µg/ml e 5 µg/ml e VP-16, nas doses 10 µM e 50 µM, por 18h não apresentaram uma maior sensibilidade a apoptose quando comparados com os queratinócitos do grupo WT e com o grupo Puma KO. Tratamento com inibidores de síntese proteica, como CHX , ou inibidores de síntese de RNA, como AD, geralmente provoca um aumento na sensibilidade a apoptose de vários tipos celulares para a via de receptores de morte (FUDA et al, 2000), portanto um defeito nessa via, como nos animais C57Bl/6 Lpr, não apresentaria uma maior sensibilidade, assim como demonstra nossos resultados.

Utilizando cicloheximida na dose 1mM não houve diferença significativa em relação ao grupo WT, já na dose 2 mM houve um perfil de maior sensibilidade a apoptose mesmo com um defeito de morte na via Fas, porém outros receptores de morte como TRAIL são descritos como importantes no controle do crescimento tumoral. Estudos já demonstraram que em células tumorais há maior preferência pela ativação de morte via TRAIL do que em células não tumorais (ASHKENAZI, 2008; SAVERS, 2011). Outros estudos relacionados com a via de receptores de morte demonstraram que inibidores de síntese proteica, como cicloheximida e actinomicina D reduzem a expressão da molécula anti-apoptótica c-FLIP, sendo capazes de sensibilizar células à indução da apoptose via Fas e TRAIL (ERB et al, 2008; FULDA et al., 2000; SANTIAGO et al., 2004).

Os queratinócitos extraídos do grupo Puma KO apresentaram uma maior sensibilidade a apoptose quando tratados com AD 5µg/ml em relação ao grupo WT. Esses dados dão suporte a importância da via de receptores de morte na indução de apoptose das células tumorais, já que nesses animais, mesmo com defeito na via intrínseca da apoptose tiveram uma sensibilidade a morte aumentada. Na literatura, camundongos sem o gene Puma tem praticamente toda a apoptose mediada pela p53 ausente (JEFFERS et al. 2003). Em carcinoma colorretal, Puma foi expresso em todos os casos e em suas respectivas mucosas (KIM et al. 2007). Em tumores gástricos, PUMA foi positivo em 73% dos casos, mas não havia alterações no gene PUMA (YOO et al. 2007).

Quanto à proteína Bim, estudos observados em outras neoplasias apresentaram interessantes resultados. Em experimentos com culturas celulares de carcinomas de pulmão, Bim apresentou papel fundamental na indução de apoptose em culturas submetidas à inibição de EGFR por Erlotinib (GONG et al. 2007). Em estudos utilizando cultura de células de carcinoma de células renais, a perda de expressão de Bim estava associada com a resistência à apoptose (ZANTL et al. 2007).

A etiologia do câncer não melanoma pode ser explicado pela interação de diferentes fatores como a irradiação solar, carcinógenos químicos, fatores genéticos, vírus oncogênicos e imunossupressão. Dentre eles, o fator mais comum envolvido nesses tipos de tumores de pele é a exposição luz ultravioleta ao longo da vida, que provoca danos no DNA, especialmente em genes supressores de tumor ou oncogenes, como na p53 que é um gene supressor de tumor envolvido na regulação do ciclo celular. Mutações causadas nesse gene pela irradiação UV, arrasta a célula para fase G1 do ciclo celular, prevenindo a morte celular e subsequente proporcionando proliferação e formação do câncer de pele (MASSARI et al, 2007). Sabendo disso, observamos também o perfil de morte dos queratinócitos nocauteados para Puma e Bim e mutante para Fas na exposição a radiação ultravioleta B e comparamos com os extraídos de animais selvagens. Os grupos não apresentaram diferença significativa de morte celular entre si. No entanto, em todos os grupos observamos uma morte dose-dependente, ou seja ocorreram indução de morte celular com 100 J/m² e estas foram maiores com a dose de 400 J/m² (figura 12). Em relação à indução com o DMBA, apenas os queratinócitos dos

animais Bim KO apresentaram morte quando tratados com esse indutor de carcinogênese (Figura 13).

Em ambos os casos, com UVB e DMBA, apesar da investigação quanto à morte celular inicial, nosso principal objetivo é investigar como ocorre a modulação de moléculas pró- e anti-apoptóticas nestes animais deficientes em componentes da morte celular e na ativação de caspases, o que culminaria na morte efetiva da célula, no caso o queratinócito, característico do tumor de pele não-melanoma.

Dados da literatura mostram que tanto a UVB como o DMBA modulam a ativação de Bax, Bid e caspase 3 (AGCA et al, 2012; CHA et al, 2014; GARG & MARU 2008; KARABULUT et al, 2014; MILIARAS et al, 2011; NYS, 2014; PARK et al, 2014).

Bid é expresso em queratinócitos e não apresenta papel significativo na diferenciação destas células, uma vez que, camundongos são capazes de diferenciar normalmente queratinócitos e epiderme na ausência desta molécula (KRAJEWSKA, et. al, 2002; ZINKEL, et. al, 2003). A UVR leva a alterações morfológicas e funcionais nas células da epiderme principalmente devido a mutações ocasionadas no gene da p53 (JIANG, et. al, 1999; ZIEGLER, et. al, 1994), mesmo gene responsável por regular a transcrição do gene Bid. Sax e colaboradores (2002) demonstraram que o gene pró-apoptótico Bid tem os níveis de RNAm aumentados em resposta ao aumento da expressão de p53, tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, quando observamos os dados por nós obtidos, não evidenciamos essas alterações à nível proteico. A ausência da expressão de Bid truncado observado nos grupos WT e Puma KO tratados com UVB (figura 14) pode ser resultada dose de radiação aplicada, que pode ter alterado a modulação de expressão de Bid nessas células. Por outro lado, estudos em culturas primárias de queratinócitos tratados com doses baixas de UVB (100 mJ/cm²) mostram a expressão de bid truncado, principalmente por uma ativação da via extrínseca via TRAIL (KULMS, et al, 2002; QIN, et al, 2004). E estudos *in vivo* mostraram que a molécula Bid tem um papel proeminente na indução da apoptose por UVR e esse processo Bid-dependente tem uma relação com imunossupressão e indução de tolerância (PRADHAN, et al, 2008).

A UVR induz a multimerização do receptor de Fas (CD95) que resulta na ativação da via extrínseca e culminando a morte celular (BANG et al, 2003). Em linhagem de queratinócitos humanos mais comum utilizada, HaCat, a via extrínseca

parece exercer um papel importante na apoptose quando a função da p53 é bloqueada (ARAGANE et al, 1998). No nosso estudo, observamos na figura 12b que a sensibilidade a morte celular dos queratinócitos deficientes de Fas funcional, no tratamento com UVB, é inferior aos grupos WT, Bim KO e Puma KO, corroborando com a importância da ativação desse receptor. Entretanto, a apoptose não pode ser somente atribuída à essa via, pois já foi demonstrado que utilizando anticorpos anti-CD95 em células HaCat não ocorreu uma prevenção da apoptose pela indução da UVB (ARAGANE, et al, 1998), como podemos notar no nosso estudo (figura 12b), que houve uma sensibilidade a apoptose dos queratinócitos Lpr, apesar de ser menor quando comparada aos outros grupos.

A radiação ultravioleta produz um tipo de célula específica denominada “sunburn cells”, que são queratinócitos em apoptose desencadeada por danos no DNA (OLSON, et al, 1974; TAKAHASHI et al, 2001). Estudos em queratinócitos primários mostraram que a apoptose induzida por UVB é por supressão da expressão de proteínas da família Bcl-2 do grupo das anti-apoptóticas e por ativação de caspase 8 (LEE et al, 2004). E que o efeito da Bcl-2 contra a apoptose é influenciado pela expressão de Bax, o balanço entre elas vai determinar a sobrevivência ou a morte das células (TAKAHASHI et al, 2001). Já foi demonstrado que a UVB promove uma diminuição da expressão de Bcl-2 sem alterar a expressão de Bax. CHO et al, mostrou que em queratinócitos de camundongos nocautes para Bax apresentaram um aumento da resistência da apoptose induzida pela UVB, evidenciando um papel importante de Bax nesse processo. No nosso estudo podemos observar a expressão de Bax em todos os grupos com e sem tratamento com UVB (Figura 14).

Paralelamente a estes experimentos, utilizamos uma outra abordagem para verificarmos a importância destas moléculas, Bim, Puma e Fas, no contexto da tumorigênese. Para isso, submetemos os animais C57Bl/6, C57Bl/6 Lpr, C57Bl/6 Puma KO e C57Bl/6 Bim KO ao protocolo de indução com um agente químico carcinógeno, DMBA, na dose de 50ug/0,1mL em acetona por animal durante cinco dias consecutivos e depois acompanhamos por 200 dias. Este modelo de tumorigênese cutânea já estava estabelecido em nosso grupo de pesquisa (VENDRAMINI, 2013).

A tumorigênese se caracteriza por mutações genéticas herdadas ou adquiridas pela ação de agentes ambientais, hormonais, radioativos, virais ou químicos, denominados carcinógenos, como o hidrocarboneto poliaromático dimetilbenzenoantraceno (DMBA) (COTRAN et al., 2000; DIGIOVANNI, 1992). Compreende três estágios: a iniciação, que se caracteriza pela exposição das células aos carcinógenos com consequente mutação e formação de clones celulares atípicos e pela multiplicação desses clones celulares; o segundo estágio é a progressão e por fim, a conversão maligna das células. A partir disto as células transformadas apresentam autonomia para proliferar e, pela perda da coesão e obtenção da mobilidade, tornam-se invasivas (MAREEL e LEROY, 2003).

O DMBA é responsável por mutações no gene *HRas*, resultando na indução da tumorigênese (TO et al., 2013), se liga ao receptor Hidrocarboneto de arila (AhR), normalmente encontrado no citoplasma e está acoplado por proteínas chaperonas (Hsp90, p23, XAP-2) as quais ajudam a manter a sua estrutura conformacional, evitando sua translocação para o núcleo. Uma vez que o ligante, como o DMBA, se liga ao AhR, forma-se o complexo AhR-chaperonas-DMBA que migra para o núcleo. Ocorre dissociação das proteínas chaperonas do AhR, e se liga a regiões específicas do DNA, localizadas na região promotora de genes alvos que vão levar a transcrição de enzimas do citocromo P450, como Cyp1a1 e Cyp1b1, os quais são responsáveis por causar a biotransformação (DENISON; NAGY, 2003; HAO & WHITELAW, 2013; YUSUF et al., 2007).

Ao avaliarmos as respostas dos grupos de animais induzidos com DMBA, observamos que a multiplicidade de tumores (Figura 17a) não foi diferente nos grupos C57Bl/6, C57Bl/6 Lpr, C57Bl/6 Bim KO e C57Bl/6 Puma KO no entanto, mostraram diferença significativa na incidência de tumores quando comparados os grupos (Figura 17b). Os animais C57Bl/6 Lpr apresentaram aparecimento de papiloma com 30 dias de protocolo enquanto os demais grupos tiveram em média pelo dia 100 de protocolo, com exceção do grupo Bim KO que não apresentou papiloma ao longo dos 200 dias de tratamento. Esses dados mostram a importância da via Fas/FasL no combate as células tumorais. Além disso, já foi descrito que no câncer não melanoma e no melanoma há um aumento na expressão de Fas Ligante como mecanismo de evasão ao sistema imunológico, bloqueia o ataque de células efetoras pela interação via Fas-FasL (ERB et al, 2008).

6 Conclusões

As conclusões que podemos ter em relação aos experimentos realizados são:

- 1- Queratinócitos deficientes em PUMA e FAS se comportam de maneira semelhante no tratamento com quimioterápicos;
- 2- No tratamento com carcinógenos, UVB e DMBA, *in vitro*, os queratinócitos deficientes para a molécula FAS são mais resistentes à morte celular;
- 3- No tratamento com o carcinógeno DMBA, *in vivo*, os animais deficientes para a molécula FAS são mais susceptíveis à formação de papilomas.

REFERÊNCIAS*

ABEL EL, ANGEL JM, KIGUCHI K, DIGIOVANNI J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. **Nat. Protoc.**, v. 4, n.9, p.1350-1362, 2009

AGCA CA, TUZCU M, GENCOGLU H, AKDEMIR F, ALI S, SAHIN K, KUCUK O. Lycopene counteracts the hepatic response to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by altering the expression of Bax, Bcl-2, caspases, and oxidative stress biomarkers. **Pharm. Biol.**, v. 50, n.12, p.1513-1518, 2012

ANTONSSON, B. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 256/257, p. 141-155, 2004.

ARAGANE Y, KULMS D, METZE D, WILKES G, PÖPPELMANN B, LUGER TA, SCHWARZ T. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. **J. Cell. Biol.**, v.12, n.144, p.171-182, 1998

BALAKRISHNAN S, MANOHARAN S, ALIAS LM, NIRMAL MR. Effect of curcumin and ferulic acid on modulation of expression pattern of p53 and bcl-2 proteins in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 2, n. 47, p. 7-12, 2010

BANG B, GNIADECKI R, LARSEN JK, BAADSGAARD O, SKOV L. *In vivo* UVB irradiation induces clustering of Fas (Cd95) on human epidermal cells. **Exp. Dermatol.** v. 12, n. 6, p. 791-798, 2003

BELIZÁRIO, J. E.; ALVES, J.; OCCHIUCCI, J. M.; GARAY-MALPARTIDA, M.; SESSO, A. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 1011-1024, 2007

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Mosc)**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005

CANTISANI C, DE GADO F, ULRICH M, BOTTONI U, IACOBELLIS F, RICHETTA AG, CALVIERI S. Actinic keratosis: review of the literature and new patents. **Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.**, v. 7, n.2, p. 168-175, 2013

CHA JW, PIAO MJ, KIM KC, ZHENG J, YAO CW, HYUN CL, KANG HK, YOO ES, KOH YS, LEE NH, KO MH, HYUN JW. Protective effect of 3,4-dihydroxybenzoic acid isolated from *Cladophora wrightiana* Harvey against ultraviolet B radiation-induced cell damage in human HaCaT keratinocytes. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.3, n. 172, p. 2582-2592, 2014

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

CHAN, S. L.; YU, V. C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 31, p.119-128, 2004.

CHIPUK, J.E., MOLDOVEANU, T., LIAMBI, F., PARSONS, M.J., GREEN, D.R. The bcl-2 family reunion. **Mol. Cell.**, v. 37, p. 299-310, (2010).

COHEN, G. M. Caspases: The executioners of apoptosis. **Biochem. J.**, v.326, p. 1–16, 1997

COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patologia celular I: lesão e morte da célula. In: COTRAN,R.S.; VINAY KUMAR, M.V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural da célula e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 1-26

DAS SK, DELP CR, BANDYOPADHYAY AM, MATHIESEN M, BAIRD WM, BANERJEE MR. Fate of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in the mouse mammary gland during initiation and promotion stages of carcinogenesis in vitro. **Cancer Res.**, v.49, n.4, p. 920-924, 1989

DENISON MS, NAGY SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology.**, v.43, p. 309-334, 2003

DENNING MF. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.36, n.7, p. 1141-1146, 2004

DIGIOVANNI J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. **Pharmacol. Therapeut.**, v.1, n.54, p. 63-128, 1992

DUBAS LE, INGRAFFEA A. Nonmelanoma skin cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America.**, v.1, n.21, p. 43-53, 2013

ERB, P., JI, J., KUMP, K., MIELGO, A., WERNII, M. Apoptosis and Pathogenesis of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.1, n.624, p. 283-295, 2008

FAN, T-J.; HAN, L.H.; CONG, R.S.; LIANG, J. Caspase family proteases and apoptosis. **Acta Bioch. Bioph. Sin.**, v. 37, p. 719-727, 2005

FULDA, S., MEYER, E., DEBATIN, K.M. Metabolic inhibitors sensitize for CD95 (APO-1/FAS)- induced apoptosis by down-regulating Fas-associated death domain-like interleukin 1-converting enzyme inhibitory protein expression. **Cancer. Res.**, v.1, n.60, p. 3947-3956, 2000

FULDA S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. **Int. J. Cell Biol.**, v. 2010, p. 1-6, 2010

FULDA S. Targeting apoptosis for anticancer therapy. **Semin. Cancer Biol.**, v. 5, p.84-88, 2014

FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nat. Rev. Genet.**, v.3, p.199-209, 2002

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends Cell. Biol.**, v. 8, p. 267–271, 1998

GONG, Y., SOMWAR, R. POLITI, K., et al. Induction of BIM is essential for apoptosis triggered by EGFR kinase inhibitors in mutant EGFR-dependent lung adenocarcinomas. **PLoS Med** 2007; 4:e294

HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 2011;144(5):646-74.

HAIL J. R, N.; CARTER B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11 p. 889–904, 2006.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 685-687, 2000.

HAO N, WHITELAW ML. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. **Bioch. Pharmac.**, v. 5, n.86, p. 561-570, 2013

GARG R, INGLE A, MARU G. Dietary turmeric modulates DMBA-induced p21ras, MAP kinases and AP-1/NF-kappaB pathway to alter cellular responses during hamster buccal pouch carcinogenesis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.3, n.232, p. 428-239, 2008

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tegumento. In: _____(eds). **Tratado de histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. cap 14, p. 253-266

JEFFERS, J. R., et al. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. **Cancer Cell**, v. 4, n. 4, p. 321-328, 2003

JIANG W, ANANTHASWAMY HN, MULLER HK, KRIPKE ML. P 53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. **Oncog.**, v.18, n.29, p. 4247-4253, 1999

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488 p.

KARABULUT AB, KARADAG N, GUROCAK S, KIRAN T, TUZCU M, SAHIN K. Apricot attenuates oxidative stress and modulates of Bax, Bcl-2, caspases, NFκ-B, AP-1, CREB expression of rats bearing DMBA-induced liver damage and treated with a combination of radiotherapy. **Food Chem. Toxicol.**, v.8, n.70, p. 128-133, 2014

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Method. Cell. Biol.**, v. 46, p. 1–27, 1995

KIM, M.R., JEONG, E.G., CHAE, B. et al. Pro-apoptotic PUMA and anti-apoptotic phosphor-BAD are highly expressed in colorectal carcinomas. **Dig. Dis. Sci.**, n.52, p. 2751-2756, 2007

KRAJEWSKA M, ZAPATA JM, MEINHOLD-HEERLEIN I, HEDAYAT H, MONKS A, BETTENDORF H, SHABAIK A, BUBENDORF L, KALLIONIEMI OP, KIM H, REIFENBERGER G, REED JC, KRAJEWSKI S. Expression of bcl-2 family member bid in normal and malignant tissues. **Neoplas.**, v.4, n. 2, p. 129-140, 2002

KRUTMANN J. The interaction of UVA and UVB wavebands with particular emphasis on signaling. **Prog. Bioph. Molec. Biol.**, n. 92, p.105-107, 2006

KULMS D, ZEISE E, PÖPPELMANN B, SCHWARZ T. DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultravioleta radiation-induced apoptosis in na essential and independente way. **Oncogene**, v. 21, n.38, p. 5844-5851, 2002

KUTUK, O.; BASAGA, H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. **Apoptosis**, v. 11, p. 1661–1675, 2006

LEE CH, WU SB, HONG CH, YU HS, WEI YH. Molecular mechanisms of UV-Induced apoptosis and itls effects on skin residential cells: the implication in UV-Based phototherapy. **Int . J. Mol. Sci.**, v.3, n. 14, p. 6414-6435, 2013

MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol. Rev.**, v.83, p.337-376, 2003

MASSARI LP, KASTELAN M, GRUBER F. Epidermal malignant tumors: pathogenesis, influence of UV light and apoptosis. **Coll. Antropol.**, n.1, p. 83-85, 2007

MCLAFFERTY E, HENDRY C, ALISTAIR F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nurs. Stand.**, v.3, n.27, p. 35-42, 2002

MERK HF, BARON JM, HEISE R, FRITSCH E, SCHROEDER P, ABEL J, KRUTMANN J. Concepts in molecular dermatotoxicology. **Exp. Dermat.**, n. 15, p. 692-704, 2006

MILIARAS S, ANOGEIANAKI A, KEFALA V, MILIARAS D, KOKARAKI G, KOUTSONIKOLAS D, LIANGOURIS J, ANOGIANAKIS G. The role of P53 and Bcl-2 proteins in 7, 12-dimethylbenz-(a)-anthracene-induced tumor growth. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents.**, v.3, n.25, p. 359-364, 2011

NATARAJAN VT, GANJU P, RAMKUMAR A, GROVER R, GOKHALE RS. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nat. Chem. Biol.**, v.7, n.10, p. 542-551, 2014

NYS K, AGOSTINIS P. Bcl-2 family members: essential players in skin cancer. **Cancer Lett.** v.7, n.320, p. 1-13, 2012

PARK G, KIM HG, HONG SP, KIM SY, OH MS. Walnuts (seeds of *Juglandis sinensis* L.) protect human epidermal keratinocytes against UVB-induced mitochondria-mediated apoptosis through upregulation of ROS elimination pathways. **Skin Pharmacol. Physiol.**, v.3, n.27, p.132-140, 2014

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W.; Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Bioch. Bioph. Acta.**, v.1644, p. 83– 94, 2004.

PIÑON JD, LABI V, EGLE A, VILLUNGER A. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. **Oncog.**, v.12, n.27, p. 41-52, 2008

PRADHAN S, KIM HK, THRASH CJ, COX MA, MANTENA SK, WU JH, ATHAR M, KATIYAR SK, ELMETS CA, TIMARES L. A critical role for proapoptotic protein bid in UV-induced immune suppression and cutaneous apoptosis. **J. Immunol.** v.5, n.181, p. 3077-3088, 2008

QIN JZ, BACON P, PANELLA J, SITAILO LA, DENNING MF, NICKOLOFF BJ. Low-dose UV-radiation sensitizes keratinocytes to TRAIL-induced apoptosis. **J. Cell Physiol.**, v.1, n.200, p.155-166, 2004

SAX JK, FEI P, MURPHY ME, BERNHARD E, KORSMEYER SJ, EL-DEIRY WS. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. **Nat. Cell Biol.**, v.11, n.4, p. 842-849, 2002

SILVER, F.H.; FREEMAN, J.W.; DEVORE, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin. Res. Technol.**, v.1, n.7, p.18-23, 2001

TAIT, S.W.G.; GREEN, D.R. Mitochondrial and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.9, n.11, p. 621-632, 2010

TAIT, S.W.G.; GREEN, D.R. Caspase-independent cell death, leaving the set without the final cut. **Oncog.**, v.50, n.27, .6452-6461, 2008

THORBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. **Scie.**, v. 281. p.1312-1316, 1998

TJALMA, W.; DE CUYPER, E.; WEYLER, J.; VAN MARCK, E.; DE POOTER, C.; ALBERTYN, G.; VAN DAM, P. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 178, n. 1, p.113-117, 1998

TO MD, ROSARIO RD, WESTCOTT PM, BANTA KL, BALMAIN A. Interactions between wild-type and mutant Ras genes in lung and skin carcinogenesis. **Oncog.**, v.34, n.32, p. 4028-4033, 2013

TSCHACHLER, E. Psoriasis: the epidermal component. **Clin. Dermat.**, v.6, n. 25, p. 589-595, 2007

VENDRAMINI P. F. R. **Caracterização da resposta inflamatória na tumorigênese cutânea induzida quimicamente em camundongos selvagens e deficientes para componentes da resposta imune adaptativa.** 2013. 81p. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, ICB IV, Universidade de São Paulo, São Paulo.

YOO, N.J., LEE, J.W., JEONG, E.G., LEE, S.H. Immunohistochemical analysis of pro-apoptotic PUMA protein and mutation analysis of PUMA gene in gastric carcinomas. **Dig. Liver Dis.**, v. 3, n.39, p. 22-227, 2007

YU, J., et al. Puma induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. **Mol. Cell**, v. 7, n. 3, p. 673-682, 2001.

YUSUF N, NASTI TH, KATIYAR SK, JACOBS MK, SEIBERT MD, GINSBURG AC, et al. Antagonistic roles of CD4+ and CD8+ T-cells in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene cutaneous carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.10, n.68, p. 3924-3930, 2008

WANG X, MARTINDALE JL, LIU Y, HOLBROOK NJ. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. **Biochem. J.**, n. 333, p. 291-300, 1998

ZANTL, N. WEIRICH, G. ZALL, H., et al. Frequent loss of expression of the pro-apoptotic protein Bim in renal cell carcinoma: evidence for contribution to apoptosis resistance. **Oncogene.**, v.49, n.26, p. 7038-7048, 2007

ZHANG, Y.; ONG, C. N; SHEN, H. M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Lett.**, v. 211, n. 2, p.175-188, 2004.

ZIEGLER A, JONASON AS, LEFFELL DJ, SIMON JA, SHARMA HW, KIMMELMAN J, REMINGTON L, JACKS T, BRASH DE. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. **Nat.**, v.6508, n. 372, p. 773-776, 1994

ZINKEL SS, ONG CC, FERGUSON DO, IWASAKI H, AKASHI K, BRONSON RT, KUTOK JL, ALT FW, KORSMEYER SJ. Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression. **Genes Dev.**, v.2, n.17, p. 229-239, 2003