Andréia Hanada Otake

**Papel de dissialogangliosídeos na proliferação
e morte celular induzida de melanócitos e
melanomas *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia
Orientador: Dr. Roger Chammas

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Otake, Andréia Hanada

Papel de dissialogangliosídeos na proliferação e morte celular induzida de melanócitos e melanomas *in vitro* / Andréia Hanada Otake. -- São Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.MELANOMA 2.GANGLIOSÍDEOS 3.DIVISÃO CELULAR
4.MORTE CELULAR 5.FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS
6.QUIMIOTERAPIA

USP/FM/SBD-373/05

*Choose a job you love, and
you will never have to
work a day in your life.*

-Confucius-

DEDICATÓRIA

*À minha mãe,
por todo amor
e todo apoio*

*Ao meu pai,
que mesmo tão distante
sempre confiou em mim*

*Ao Di
minha grande paixão*

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Roger Chammas pela serenidade com que transmite seus conhecimentos científicos, e por toda dedicação à pesquisa, pela qual eu me inspiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roger Chammas por ter tido a oportunidade de ter realizado esse trabalho e por toda confiança em mim depositada. Agradeço também a sua grande e dedicada orientação, não só nesse trabalho, mas em todos os outros. Obrigada Roger!

Às pessoas do grupo de Adesão Celular e Câncer, (Fabiana, Guilherme, Luciana, Mara, Mônica, Patrícia Luiza, Verônica) e aqueles que um dia fizeram parte desse grupo (Estevão, Ana Paula, Marilena, Patricia Braga). Em especial às pessoas que contribuíram diretamente na realização desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Oncologia Experimental (LIM24), professores, funcionários e alunos, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha amada mãe, que eu tanto amo, por toda dedicação e paciência por cuidar sempre de mim....Obrigada mãe, te amo!!!!

Ao meu pai, por toda confiança e orgulho que tem de mim. Seu apoio, de tão, tão longe, mas sempre presente. Te amo pai!

Aos meus queridos irmãos, Daniel, André, Carlos e Marcos, por serem sempre os irmãos maravilhosos que são!

Ao meu grande amor Edson, que sempre me apoiou e me ajudou tanto com a sua sempre companhia e seu enorme amor. Você tem sido essencial na minha vida! Obrigada por me fazer feliz por todos esses anos. Di, te adoro demais!!!

Às minhas queridas amigas que encontrei no laboratório:

à ímpar Luciana, amiga, admiro a sua dedicação e paixão pela pesquisa, e a profissional a qual você tem se tornado, obrigada por toda sua ajuda, pelo seu bom grande humor.

à dedicada Verônica, por sua companhia agradável, mesmo doente, sempre disposta a ajudar. Sua ajuda foi muito importante, obrigada amiga!

à companheira Mônica, que mesmo com o pequeno “ervilho”, está sempre preocupada em ajudar;

ao sempre Giovani (opa, esse é amigoo), pelo seu bom humor e suas histórias engraçadas.

À sempre Izabel, que mesmo distante sempre foi minha grande amiga. Saudades Iza, você é uma grande companheira, para todos os momentos! Sempre conte comigo.

À especial Crica, que sempre distante (ou em Campinas, ou em Bristol) nunca deixa de ser minha grande amiga! Saudades querida amiga!

Aos colegas do grupo da mama (à sdimpática Cíntia, M. Lúcia, Patrícia), aos colegas do grupo do pescoço (à alegre Flávia), ao sempre bom humorados Jair e Willame (né Ui?) que entregam nosso material limpinho, (espero que sim) e à tão prestativa Maria José.

À coordenação e à secretária do programa de pós-graduação em Oncologia do departamento de Radiologia – FMUSP.

À Dra. Maria Mitzi Brentani pela oportunidade de realizar o trabalho no LIM24.

A FAPESP, e à Fundação da Faculdade de Medicina pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico e incidência do melanoma cutâneo	1
1.2. Etapas da progressão do melanoma	3
1.3. Biologia molecular e celular do melanoma	4
1.4. Alterações moleculares do melanoma	6
1.4.1. Vias de proliferação celular	6
1.4.2. Vias de morte celular	8
1.4.3. Mecanismos de resistência	11
1.5. Gangliosídeos	13
1.5.1. Gangliosídeos como marcadores tumorais	17
1.5.2. G _{D3} e o estudo da progressão do melanoma	19
1.5.3. Gangliosídeos e o envolvimento com vias de proliferação	20
1.5.4. Outras funções de gangliosídeos	22
1.7. Mecanismos de ação de drogas citotóxicas	25
1.7.1. Cisplatina	26
1.7.2. Temozolamida	28
1.7.3. Vimblastina	29
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos:	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Linhagens celulares	33
3.2. Transfecção de ST8Sial	34
3.2.1. Avaliação da expressão de ST8Sial por citometria de fluxo	35
3.3. Cultura de células	35
3.4. Proliferação celular	36
3.4.1. Ciclo Celular	37
3.4.2. MTT	38
3.5. Ensaio de morte celular	39
3.5.1 Avaliação por JC ₁	40
3.5.2. Avaliação por incorporação de iodeto de propídio	41
3.5.3. Avaliação por exclusão com azul Tripan	41
3.5.4. Ensaio de clonogenicidade	42
3.5.5 Exposição de Fosfatidilserina (PS) na Superfície Celular	42

3.6. Tratamento com inibidores da glucosilceramida sintase	43
3.6.1. PPPP	43
3.7. Migração celular	44
3.8. Ensaio de proteção a ribonuclease	45
3.8.1. Extração de RNA	45
3.8.2. Quantificação e integridade do RNA	45
3.8.3. Metodologia de RPA	46
3.8.4. Síntese das sondas	47
3.8.5. Preparação do RNA e hibridização	48
3.8.6. Tratamentos com RNase	49
3.8.7. Resolução em gel das sondas protegidas	50
4. RESULTADOS	53
4.1. Avaliação da proliferação de linhagens não-tumorigênica, melan-a, e tumorigênica, Tm1	53
4.1.1 Resposta mitogênica a fatores de crescimento	53
4.1.2. Avaliação da expressão de ciclinas	55
4.2. Avaliação de dissialogangliosídios na proliferação celular de melanócitos murinos	59
4.2.1 Expressão de gangliosídios em linhagem celular de melanócito murino	59
4.2.2. Proliferação das células transfectadas	62
4.2.3. Proliferação celular é dependente de PMA	62
4.2.4. Proliferação estimulada por fatores de crescimento	66
4.2.5. Inibição da expressão de gangliosídios	67
4.2.5.1. Tratamento com PPPP	68
4.2.6. Proliferação de células depletadas de glicosfingolipídios	70
4.2.6.1. Proliferação e resposta a fatores de crescimento	70
4.2.7. Avaliação dos níveis de ciclinas	71
4.2.8 Migração celular	72
4.3. Morte celular	75
4.3.1. Sensibilidade à morte induzida por cisplatina em linhagens não-tumorigênicas e tumorigênicas	75
4.3.2. G_{D3} modula morte celular induzida por diferentes quimioterápicos	76
4.3.2.1. Sensibilidade a estaurosporina	76
4.3.2.2. Sensibilidade à cisplatina	77
4.3.2.3. Sensibilidade a temozolamida	80
4.3.2.4. Sensibilidade a vimblastina	83
4.3.3. Avaliação da morte induzida por cisplatina em linhagem de melanoma humano	85
5. DISCUSSÃO	91
6. CONCLUSÕES	108
7. REFERÊNCIAS	110
8. ANEXOS	127

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\psi_m$ - diferença do potencial transmitocondrial

BSA – albumina de soro bovino

CIS - cisplatina

ctl - controle

DEPC – dietilpirocarbonato

DMSO – dimetil sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DTIC – (5-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide = dacarbazina

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etileno diamino tetraacético

EGF – fator de crescimento epidermal

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FGF-1 – fator de crescimento de fibroblasto ácido

FGF-2 – fator de crescimento de fibroblasto básico

FSC – forward scatter, dispersão frontal da luz

G₁ – fase de pré-síntese de DNA

G₂ – fase de pós-síntese de DNA

G418 – geneticina

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

G_{M3} - monossialogangliosídeo G_{M3}

G_{D3} - dissialogangliosídeo G_{D3}

JC₁ - iodeto de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1',3,3'-

tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

mAc – anticorpo monoclonal

MTIC – 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazole-4-carboxamide

PBS – tampão fosfato com salina

p - passagem

d-PDMP - d-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol

l-PDMP - l-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol

PMA – forbol-miristato-acetato

POPOP – 1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]benzeno

PPO – 2,5-difeniloxazol

PPPP – d-treo-fenil-2-hexadecanoilamino-3-pirrolidino-1-propanol

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

RPA – ensaio de proteção à ribonuclease

RPMI – meio de cultura Roswell Park Memorial Institute

SFB – soro fetal bovino

SSC – Side scatter, dispersão lateral da luz

tmz – temozolamida

TBE – tampão de eletroforese Tris -ácido bórico -EDTA

UTP, CTP, GTP e ATP – uracila, citosina, guanosina e adenosina trifosfato, respectivamente

VIN – vimblastina

RESUMO

A progressão de melanomas é freqüentemente associada a alteração nas vias de sinalização dependente de FGF-2 e ao acúmulo de dissialogangliosídios. Gangliosídios estão envolvidos em vários processos biológicos, como moduladores das interações célula-matriz extracelular e proliferação celular. As funções precisas destas moléculas ao longo da progressão tumoral ainda não foram esclarecidas. Aqui, analisamos os efeitos de FGF-2 na proliferação celular e migração de uma linhagem celular derivada de melanócitos e como o dissialogangliosídio G_{D3} interfere nestas respostas e na indução de morte celular por diferentes agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de melanomas. A linhagem de melanócitos murinos melan-a foi utilizada como modelo. Enquanto melan-a se mostrou responsiva aos fatores de crescimento FGF-1 e FGF-2, a proliferação de sua contraparte tumorigênica, representada pelas linhagens Tm1 e Tm5, mostrou-se independente destes fatores, indicando que na progressão tumoral, as vias dependentes destes fatores estão ativadas constitutivamente. A linhagem “normal” foi então utilizada em ensaios visando a super-expressão do gangliosídio G_{D3} , através da transfecção do gene da sialiltransferase ST8Sial (G_{D3} -sintase), que converte G_{M3} em G_{D3} . O acúmulo dos dissialogangliosídios não interferiu com a proliferação celular ou com a resposta mitogênica a FGF-2. Contudo, células expressando G_{D3} mostraram-se mais resistentes à deprivação de fatores de proliferação,

como o éster de forbol. Portanto, a expressão de G_{D3} mostrou-se associada à sobrevivência celular. G_{D3} também mostrou-se um modulador positivo da migração celular. Depleção metabólica de glicosfingolipídios, usando o inibidor da glucosilceramida-sintase, fenil-palmitoilamino-pirrolidino-propanol (PPPP), inibiu a resposta migratória induzida por FGF-2. Também avaliamos se G_{D3} poderia modular o processo de morte celular induzido por estaurosporina e por quimioterápicos. Células G_{D3}^{+} mostraram-se até 3,8 vezes mais sensíveis à morte celular induzida por estaurosporina do que as células controle ($p < 0,001$). Resultados semelhantes foram observados em relação à morte induzida por cisplatina. De outro lado, células G_{D3}^{+} mostraram-se mais resistentes à morte induzida por temozolamida. Por fim, a expressão de G_{D3} sensibilizou as células derivadas de melan-a ao processo de morte induzido por vimblastina ($45,83 \pm 1,4\%$), quando comparadas ao seu controle ($34,8 \pm 1,4\%$). Depleção de glicosfingolipídios com PPPP reverteu a sensibilidade a vimblastina, mas não à cisplatina, nem a resistência à temozolamida, sugerindo que G_{D3} *per se* e outros glicosfingolipídios podem ser efetores do programa de morte celular desencadeado por vimblastina. Extensão destas observações a um modelo de melanoma humano mostrou que a depleção de glicosfingolipídios pode levar à sensibilização à morte induzida por cisplatina. Estes dados sugerem que G_{D3} interfere com vias específicas de processos envolvidos na progressão tumoral. Ainda, estes efeitos podem ser dependentes das vias de transformação celular, que podem variar entre diferentes sistemas, e posterior seleção, como aqueles usados neste estudo.

SUMMARY

Melanoma tumor progression is often associated with altered FGF-2 signalling and accumulation of gangliosides. Gangliosides are involved in many biological processes as modulators of cell-matrix interactions and cell growth. The precise function of these molecules in tumor progression remains elusive. Here we have analyzed the effects of FGF-2 in cell growth and motility of a melanocyte-derived cell line overexpressing the tumor-associated ganglioside G_{D3} and how this molecule could interfere with cell death induced by chemotherapeutic agents used in melanoma treatment. The murine melanocyte cell line, melan-a, was used as a model. While melan-a cells were responsive to both FGF-1 and FGF-2, their tumorigenic counterparts (Tm1 and Tm5) grew independently of exogenous growth factors. The “normal” cell line was then used for the expression of the G_{D3} synthase gene, which converts G_{M3} into the tumor associated ganglioside G_{D3} . Disialogangliosides did not interfere with cell growth and the mitogenic response to FGF. However, G_{D3} -expressing melan-a cells were more resistant to deprivation of proliferating factors, such as phorbol esters. Therefore, expression of G_{D3} was associated with cell survival. G_{D3} also modulated melanocyte cell migration. Depletion of glycosphingolipids, using phenyl-palmitoylamino-pirrolidino-propanol (PPPP), inhibited the migratory response of transfected melan-a cells to FGF-2. We next examined whether G_{D3} could modulate drug-induced cell death. G_{D3}^+ cells were 3.8-fold more

sensitive to staurosporine-induced cell death than control cells ($p < 0.001$) and to cisplatin-induced cell death. On the other hand, G_{D3}^{+} cells were more resistant to temozolomide-induced cell death. Finally, G_{D3} sensitized melan-a derived cells to vinblastin-induced cell death ($45.83 \pm 1.4\%$) when compared to its control ($34.8 \pm 1.4\%$). Depletion of glycosphingolipids with PPPP reverted the sensitivity to vinblastin, but not to cisplatin or the resistance to temozolomide, suggesting that G_{D3} *per se* and other glycosphingolipids may be effectors of the cell death program triggered by vinblastin. Extension of these observations to a human melanoma model showed that glycosphingolipid depletion may sensitize cells to cisplatin-induced cell death. These data suggest that G_{D3} interferes with specific pathways involved in tumor progression, as cell migration and chemosensitivity/chemoresistance to commonly used chemotherapeutic agents. Moreover, these effects may be dependent on the transformation pathways and further selection occurring along tumor progression. Controlling G_{D3} expression may be a useful strategy in the management of patients with advanced stage melanomas.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e incidência do melanoma cutâneo

Descrições de “tumores pretos com metástases” datam da época de Hipócrates (460 a.C.) Paleopatologistas encontraram metástases ósseas e massas melanóticas na pele de múmias do Peru datadas de mais de 2500 anos atrás. Entretanto, somente em 1806 que René Laennec descreveu o termo melanoma, definindo a doença e nomeando-a. Em 1820, William Norris sugeriu que o melanoma poderia ser hereditário, após descrever uma família com várias pessoas com lesões melanóticas ¹.

Melanomas são neoplasias malignas de melanócitos, células produtoras de pigmentos que se localizam principalmente na camada basal da epiderme da pele humana. Apesar de baixa, a incidência do melanoma cutâneo tem aumentado em mais de 15 vezes nos Estados Unidos nos últimos 40 anos. O aumento de sua incidência só perde para aquele observado em tumores pulmonares em mulheres, associado ao seu crescente hábito de fumar observado nos últimos 20 anos ^{2,3}. Estima-se que 4% dos casos incidentes de todos os tipos de câncer nos Estados Unidos em 2005 sejam melanomas. No Brasil, prevêem-se 2.755 casos novos em homens e 3.065 casos novos em mulheres, para 2005. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se no Sul do país, com

incidências mais altas em Santa Catarina (http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335). Apesar de relativamente pouco freqüente, a letalidade da doença é elevada. A cada hora, um americano morre devido ao melanoma. A taxa de mortalidade do melanoma em indivíduos com mais de 65 anos, especialmente em homens, é a segunda maior entre os cânceres ¹.

O melanoma cutâneo é um câncer de detecção simples, pelo fato da sua localização de fácil visualização. Quando o melanoma é detectado em estágios iniciais da sua progressão, ele apresenta um bom prognóstico. Contudo, uma vez que o melanoma progride, gerando metástases, ele se torna um tumor de difícil tratamento. A expectativa de sobrevida superior a 5 anos em pacientes com metástases linfonodais varia de 13 a 69% dos casos, dependendo do número de linfonodos afetados. Se houver metástases para outros órgãos, a taxa de sobrevida superior a 5 anos é de apenas 6% dos pacientes, que apresentam uma sobrevida média de cerca de 7,5 meses ¹.

A alta mortalidade de melanomas, quando diagnosticados tardiamente, e a noção de que existam lesões precursoras desta neoplasia têm estimulado a busca de marcadores de progressão destes tumores. Objetiva-se assim diagnosticar a lesão o mais precocemente possível, quando tratamentos cirúrgicos ainda podem ser curativos. Além disso, grande campo de pesquisa tem surgido em busca de abordagens terapêuticas efetivas contra melanomas em estádios mais avançados, quando seu comportamento biológico é mais agressivo e as lesões são mais

resistentes aos tratamentos convencionais. Assim, a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na sua progressão se torna necessária para o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes contra esse tipo de tumor.

1.2. Etapas da progressão do melanoma

A progressão do melanoma pode ser dividida em algumas etapas, segundo modelo proposto por Clark e colaboradores, cuja utilização é amplamente aceita ^{4,5}. A primeira etapa corresponde à geração de uma lesão hiperplásica, a lesão névica ou nevo maduro caracterizado pela proliferação aumentada de melanócitos. Esta lesão é comumente considerada um marcador de exposição a agentes com potencial carcinogênico, como por exemplo, luz ultravioleta. Alguns indivíduos apresentam lesões névicas com atipias arquiteturais importantes, sendo denominados de nevus displásicos. Há evidências do potencial de malignização destes nevus displásicos. O melanoma de crescimento radial (invasivo *in situ*) caracteriza-se por apresentar células neoplásicas com capacidade de proliferação limitada à epiderme; embora células tumorais possam ser encontradas na derme nestas lesões, mas não há evidência de que estas células proliferem ativamente neste compartimento. No melanoma de crescimento vertical, encontram-se melanócitos transformados na derme, com ativa capacidade de proliferação. Por fim, no melanoma metastático, as células neoplásicas apresentam a capacidade de invasão, proliferação e

sobrevivência em microambientes à distância do seu local de origem. Como em todos os modelos de progressão, melanócitos imaturos podem originar diretamente qualquer uma das formas tumorais propriamente ditas.

Estima-se que cerca de 6% dos melanomas de crescimento radial progridam para melanomas metastáticos, enquanto que cerca de 20% dos nevos displásicos (nevos com atipias arquiteturais) originam melanomas de crescimento vertical. A existência de uma lesão pré-maligna que se converta (em cerca de 20% dos casos) em maligna tem justificado a busca de elementos fenotípicos com potencial valor preditivo para o fenômeno de progressão⁶⁻⁹.

1.3. Biologia molecular e celular do melanoma

Na pele, melanócitos e queratinócitos formam a unidade de pigmentação: cerca de 5 a 8 queratinócitos basais interagem com cada melanócito, também residente na camada basal da epiderme. Cada melanócito, através de expansões de seu citoplasma, pode interagir com até 35 queratinócitos, das camadas basais e suprabasais. É através dessas expansões que os melanossomos, organela especializada que sintetiza o pigmento melanina, são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos das camadas suprabasais, no processo de pigmentação da epiderme¹⁰.

A progressão de melanócitos normais para melanócitos névicos pode ser iniciada pela perda de contato de melanócitos e queratinócitos. Na epiderme, queratinócitos e melanócitos formam junções aderentes

(mediadas por E-caderina) e junções comunicantes (mediadas por conexina 43). Estas moléculas parecem ter sua expressão diminuída em lesões névicas^{10,11}. A perda de interações mediadas por E-caderina está associada à translocação de β -catenina para o núcleo, com conseqüente transcrição de genes associados à duplicação celular. Frequentemente, melanócitos não tumorais são encontrados na junção dermo-epidérmica, onde passam a interagir com fibroblastos estromais.

A lesão névica é caracterizada pela proliferação de melanócitos (inicialmente, uma hiperplasia). A progressão tumoral parece estar associada à manutenção das células névicas em estado proliferativo, ou, alternativamente, progressivamente mais resistentes à morte celular por desalojamento (*anoikis*)¹². Estes eventos podem ser observados quer na epiderme quanto na derme. Na derme, a interação entre células de melanoma e fibroblastos dérmicos parece estar associada não só à persistência da lesão, mas também a sua progressão para metástase. Estes eventos celulares estão associados à flutuação na expressão de um grande número de moléculas de adesão que foram inicialmente caracterizadas por métodos imuno-histoquímicos: E-caderina é substituída por N-caderina¹¹; acumulam-se glicoconjugados como MUC18¹³, condroitim-sulfato proteoglicano¹⁴ e dissialogangliosídeos^{12,15,16}. Embora seja descrita a associação entre a expressão destas moléculas e o fenômeno de progressão tumoral em melanomas, a função precisa destes glicoconjugados na aquisição do fenótipo transformado ainda é

desconhecida. Neste trabalho nosso foco recairá sobre os dissialogangliosídeos.

1.4. Alterações moleculares do melanoma

1.4.1. Vias de proliferação celular

Melanomas, como todos os cânceres, surgem devido ao acúmulo de mutações que levam ao descontrole de transcrição ou função dos produtos de genes críticos para a proliferação, diferenciação e morte celular. Células de cânceres proliferam de maneira descontrolada, além de perderem a dependência de estímulos externos para proliferarem ¹⁷. Moléculas que regulam a proliferação encontram-se alteradas, ora em níveis aumentados, ou constitutivamente ativadas, ora em níveis diminuídos, no caso de moléculas inibitórias do ciclo celular. Elementos que controlam a transição entre as fases G₁ e S do ciclo celular estão freqüentemente desregulados em melanomas ^{18,19}. Elementos-chave para o controle do ciclo celular de melanócitos são os produtos do gene *CDKN2a*. Este gene codifica duas proteínas distintas, ambas com funções no controle do ciclo celular. A primeira corresponde a p16, um inibidor de quinases dependentes de ciclina da transição entre G₁ e S; a segunda é p19^{ARF}, associada à via de p53, produto de um gene supressor de tumor que controla parada ao longo das fases do ciclo celular e o processo de morte celular.

As ciclinas da transição da fase G₁ e S são as ciclinas D (D1, D2, e D3) e E. Estas moléculas são subunidades regulatórias de quinases (cdk, *cyclin dependent kinases*) que controlam a função das proteínas da família Retinoblastoma (p.e.: Rb, p107 e p130). As ciclinas D e E controlam as atividades de cdk2, cdk4 e cdk6. A atividade de cdk4, por exemplo, é inibida por p16²⁰. Síndromes de predisposição genética ao melanoma têm nos ensinado a importância destas vias de controle do ciclo para o desenvolvimento da neoplasia. É freqüente a perda de expressão de p16 em melanomas. Com isto, libera-se uma alça inibitória de controle de cdk4, que ativo fosforilaria Rb, levando a sua inibição e conseqüente transição da fase G₁ para S.

Esta transição entre fases do ciclo celular está também sob estrito controle de fatores externos, como uma série de fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal (EGF) e membros da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), onde destacamos FGF-1 (também chamado de aFGF, ou acídico) e FGF-2 (bFGF, ou básico)²¹. Estes fatores de crescimento apresentam características interessantes. A efetiva transdução de sinal depende da aproximação física de duas ou mais moléculas dos receptores dos fatores de crescimento, que são receptores com atividade de tirosino-quinases ativada na dependência da presença do fator de crescimento, em condições normais. A aproximação entre as unidades de receptores é seguida de transfosforilação, que desencadeia uma cascata de sinalização que inclui a ativação de pequenas GTPases da família de Ras, ativação de Raf e outras quinases que induzem a transcrição

de ciclinas da transição G₁/S. Uma alteração freqüente em lesões melanocítica é a mutação em um dos membros da família Raf, b-Raf, que o mantém constitutivamente ativado ^{1,22}. Assim, pode-se entender a autonomia de proliferação de melanomas, que em alguns casos independem da estimulação de fatores exógenos ou extracelulares para crescimento.

A aproximação física dos receptores dos fatores de crescimento e a ativação de Ras ocorrem ao nível da membrana plasmática. Há evidências crescentes que os glicoconjugados e lipídios presentes na membrana plasmática podem interferir positiva ou negativamente nestes fenômenos. Os fatores de crescimento não atuam somente no controle da proliferação celular. FGFs estão associados à sobrevivência celular; EGF e FGFs podem atuar estimulando a migração celular, por ativação de integrinas, mediadores das interações entre células e matriz extracelular ²³.

1.4.2. Vias de morte celular

O processo de morte celular é complexo, e inúmeros eventos e diversas moléculas encontram-se envolvidos. Quando a célula sofre um agravo que não pode ser reparado, ela ativa vias de sinalização que podem culminar com a morte. Quando esse evento é programado, ele pode ser então chamado de morte celular programada. Existem alguns tipos de morte desse tipo ²⁴. A mais estudada é a apoptose, atualmente definida como morte celular dependente de ativação de caspases, cisteíno-proteases com especificidade para substratos contendo um resíduo de ácido aspártico.

Dentre as alterações morfológicas mais importantes estão: arredondamento da célula, com perda de adesão, condensação da cromatina e extrusão de água, alterações na membrana (*blebs*) e formação de corpos apoptóticos. É freqüente o envolvimento das mitocôndrias neste processo de morte celular²⁵. Observa-se a alteração do potencial da membrana da mitocôndria, que leva à liberação de citocromo c, que junto com outras moléculas, ativam vias de morte. A fragmentação do DNA ocorre através da ação de enzimas como a CAD (*caspase-activated Dnase*, Dnase ativada por caspase) após a degradação de sua proteína inibitória, o ICAD, que é substrato de caspase-3. Outros eventos podem ocorrer, dependendo do tipo celular. Um evento que tem sido útil para detecção do processo de apoptose é a perda de assimetria de lipídios da membrana, especificamente a exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática. A exposição de fosfatidilserina pode ser determinada usando-se anexina V, uma molécula ligante de fosfatidilserina. Numa perspectiva biológica, a perda da simetria dos fosfolipídios da membrana é reconhecida como um sinal de opsonização e induz a fagocitose dos corpos apoptóticos (*eat me signal*). Este processo biológico evoluiu com uma resposta de supressão à resposta inflamatória, o que contribuiu para a remoção de células mortas dos tecidos sem que haja importantes alterações na arquitetura tecidual, fundamental para o processo de regeneração tecidual.

Células tumorais, no entanto, são selecionadas pela capacidade progressiva de evasão à morte, ou evasão à apoptose. Como se pôde depreender do parágrafo anterior, o processo de morte celular é complexo e

regulado por diferentes vias de sinalização. O escape à morte é decorrente de alterações nos controles destas vias. Em melanomas, a sobrevivência celular depende freqüentemente da ativação de uma serina/treonina-quinase, Akt (ou PKB). Akt é funcional quando ativada, por exemplo por PI3K (fosfoinosítídeo-3 quinase). A função de PI3K por sua vez é controlada negativamente por PTEN, uma fosfatase. Assim, a atividade de PTEN desativa a via de PI3K e Akt, levando a célula à morte celular. A expressão de PTEN é perdida em alguns tumores humanos, inclusive em melanomas (30-50% dos casos) levando a ativação constitutiva de PI3K ^{26,27}.

Um dos fenômenos que ocorrem quando a célula ativa vias de morte é a liberação de citocromo c, antes contido no espaço intermembranas da mitocôndria. Uma vez liberado, citocromo c se liga a Apaf-1, formando um complexo conhecido como o apoptossomo, que ativa caspase-9, desencadeando o processo de morte. Há relatos de que melanomas metastáticos perderiam a expressão de Apaf-1 ²⁸. A via de morte também pode ser ativada de modo independente da ativação de componentes presentes na mitocôndria (via intrínseca). A ativação de receptores, como por exemplo FAS (CD95), pelo seu ligante induz o processo de morte (via extrínseca). Em melanomas, e também em outros tumores como o carcinoma hepatocelular, a expressão de CD95 encontra-se reduzida ²⁵. Uma vez ativados, os receptores enviam sinais intracelulares que ativam moléculas pró-apoptóticas, como a caspase-8. Inibidores da ativação dessa molécula, como FLIP (*Fas-Ligand inhibiting protein*), encontram-se em níveis aumentados em melanomas.

1.4.3. Mecanismos de resistência

Atualmente, os tratamentos convencionais quando o melanoma se encontra em estádios avançados são, além da remoção cirúrgica do tumor, o tratamento com diversas drogas, a quimioterapia. O índice de resposta dos pacientes a estes tratamentos é muito baixo, não ultrapassando a faixa dos 30% a fração de pacientes com respostas objetivas. Melanomas figuram assim entre os cânceres humanos mais resistentes a diferentes tratamentos. Essa má resposta é devida em parte ao fato das células tumorais adquirirem resistência a diferentes indutores de morte celular. Os regimes quimioterápicos para o tratamento de melanoma incluem o uso de drogas como cisplatina, dacarbazina e temozolamida, e eventualmente alcalóides da vinca, como vimblastina. O mecanismo de ação destas drogas será discutido na seção 1.7 desta Introdução. Além disso, muitos desses tratamentos não são isentos de efeitos secundários, como o desenvolvimento de vitiligo²⁹.

Têm sido descritos diversos mecanismos de aquisição de resistência a quimioterapia no melanoma. Um deles é a capacidade das células de manter baixas concentrações intracelulares das drogas. A extrusão das drogas é mediada por membros da família da glicoproteína P (Pgp) e MDR (multidrug resistance). Melanomas acumulam altos níveis destas proteínas na sua membrana plasmática, que atuam como bombas reversas de drogas para o meio extracelular.

Os glicoconjugados, entre eles os glicoesfingolipídios, também estão envolvidos na resistência adquirida dos tumores. Estudos têm mostrado que a superexpressão da enzima glucosilceramida-sintase, que atua sobre moléculas de ceramida, convertendo-a em glucosilceramida, contribui para a resistência de tumores a drogas ³⁰. Evidências da literatura sugerem que a inibição da glucosilceramida-sintase diminui a expressão de Pgp, levando assim ao aumento da sensibilidade das células a drogas ³⁰. Também se especula que esta ação deva-se ao controle dos níveis intracelulares de ceramida, uma molécula associada à indução da morte celular. De acordo com esta noção, linhagens de carcinoma epidermóide que são resistentes a algumas drogas como vimblastina acumulam glucosilceramida, sugerindo que a atividade da glucosilceramida-sintase esteja alta nestas células ³¹. Em melanomas, o acúmulo de glucosilceramida é acompanhado pela sua subsequente modificação em glicoesfingolipídios mais complexos, com acúmulo de diversas formas de gangliosídios (vide seção 1.5.1).

Outros mecanismos de resistência a drogas que tumores freqüentemente apresentam é o escape das vias de indução a morte. Um dos principais genes envolvidos com a indução de vias de morte celular é o gene p53. Esse gene encontra-se mutado em cerca de 50% dos tumores humanos. Contudo, em melanomas, raramente p53 está mutado ^{32,33}. Em trabalho relacionado ao modelo explorado nesta tese, mostramos que a progressão para melanomas de crescimento vertical é acompanhada por acúmulo de uma molécula chamada nucleofosmina ^{34,35} (em anexo C). Esta proteína, identificada em outros estudos de comparação sistemática entre

linhagens e espécimes tumorais ³⁵ (em anexo C) é um potencial inibidor da função de p53. Assim, apesar de p53 não se encontrar freqüentemente mutado em melanomas, sua função não está necessariamente preservada nestes tumores. Ainda, outras moléculas envolvidas com o processo de morte encontram-se alteradas, como as anteriormente citadas.

1.5. Gangliosídios

Gangliosídios são glicoesfingolipídios contendo pelo menos um resíduo de ácido siálico. Glicoesfingolipídios são uma classe de lipídios que fazem parte da estrutura da membrana celular. São formados por uma molécula de ceramida, a qual é constituída por uma cauda de ácido graxo e uma molécula de esfingosina. A ceramida é sintetizada no retículo endoplasmático através da hidrólise de esfingomielina por esfingomielinases, ou através da síntese de novo pela ceramida sintase ³⁶. A ceramida é então transportada para o complexo de Golgi, onde enzimas conhecidas como glicosiltransferases adicionam diferentes carboidratos a sua estrutura ³⁷. Inicialmente, uma glucose ou uma galactose é adicionada, dando origem à glucosilceramida ou galactosilceramida. Estas reações se dão na face citossólica da membrana do complexo de Golgi. A biossíntese de gangliosídios se inicia a partir da formação da glucosilceramida, após ação da enzima glucosilceramida-sintase.

A glucosilceramida é então transferida para a porção luminal do Golgi, onde é modificada pela adição de um resíduo de galactose dando origem à

lactosilceramida ($\text{Gal}\beta 1\text{-4Glc}\beta 1\text{-Cer}$). A adição de um resíduo de ácido siálico à lactosilceramida dá origem ao gangliosídeo mais simples de nossas células, o monossialogangliosídeo G_{M3} (de acordo com a nomenclatura dada por Svennerholm ³⁸). Esta adição é catalisada pela ação da enzima G_{M3} -sintase, que faz parte de uma família de enzimas, conhecidas como sialiltransferases ³⁹⁻⁴¹. A ação de outras sialiltransferases e outras glicosiltransferases torna os gangliosídeos mais complexos. Estas enzimas foram clonadas nos últimos anos, mostrando-se bastante específicas. Assim, a enzima responsável pela conversão de G_{M3} em G_{D3} , denominada G_{D3} -sintase, e renomeada para ST8Sial ⁴⁰, adiciona um resíduo de ácido siálico somente a G_{M3} fazendo uma ligação entre dois resíduos de ácido siálico (figura 1). Sua função parece estar relacionada à maturação de linfócitos e em tumores sua atividade se encontra bastante aumentada ⁴².

Os gangliosídeos são então caracterizados por apresentarem pelo menos um resíduo de ácido siálico em sua composição. Ácidos siálicos pertencem a uma família de açúcares (monossacarídeos) aniônicos, derivados da condensação de ácido pirúvico (C1-C3) e N-acetil-manosamina (C4-C9). Estes açúcares são encontrados na posição terminal das cadeias de glicoproteínas e glicolipídios, sendo responsáveis em parte pelo caráter eletronegativo da superfície de células de mamíferos. Devido a sua posição terminal e a sua carga negativa, os oligossacarídeos sialilados se tornaram de grande importância no processo de reconhecimento célula-célula ⁴³. Ácidos siálicos podem estar envolvidos na inibição de interações moleculares, por efeito eletrostático por exemplo, bloqueando adesão

celular; ou, ainda serem receptores específicos de lectinas animais (selectinas ou sialoadesinas) ou adesinas, mediando assim interações celulares ⁴⁴. De fato, membros de uma família crescente de sialoadesinas (Siglecs, da qual fazem parte a glicoproteína associada à mielina, MAG) são ligantes específicos de gangliosídeos ⁴⁵.

Glicoesfingolipídios foram classicamente descritos como moléculas receptoras envolvidas no reconhecimento de antígenos e toxinas de microorganismos. Outras funções para essa classe de moléculas têm sido bastante exploradas, como o seu envolvimento em processos de reconhecimento e de adesão célula à célula, além de moduladores de vias de sinalização ⁴⁶. Entre as vias de sinalização, estão envolvidas as de muitos processos celulares como diferenciação ⁴⁷⁻⁴⁹, proliferação ^{50,51} e morte celular ^{36,52}. Além disso, enzimas que participam da regulação da biossíntese de glicoesfingolipídios, como a glucosilceramida-sintase, encontram-se alteradas no processo de transformação celular ³⁰. Estes estudos freqüentemente utilizam inibidores da enzima glucosilceramida-sintase como ferramenta para avaliação da modulação por glicoesfingolipídios. Dentre eles, existem basicamente dois grupos de inibidores de glucosilceramida-sintase: (a) inibidores que levam a um aumento dos níveis intracelulares de ceramida; (b) inibidores que não estão associados a um aumento nos níveis intracelulares de ceramida. Entre os inibidores deste último grupo está o PPPP (dL-treo-fenil-2-hexadecanoilamino-3-pirrolidino-1-propanol) ⁵³. Ao grupo de inibidores que elevam o conteúdo de ceramida pertencem moléculas como o PDMP (d-

treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol) e o imino-açúcar n-butil-deoxinojirimicina (NB-DNJ) ⁵⁴. O PDMP apresenta dois estereoisômeros, o levógero (l-PDMP) e o dextrógero (d-PDMP), só este último é ativo inibidor da glucosilceramida-sintase. NB-DNJ mostrou-se eficaz na inibição do crescimento de tumores cerebrais de camundongo ^{55,56}. O efeito de inibidores de glucosilceramida-sintase é pleiotrópico, podendo em parte ser devido ao aumento de ceramida, que como foi mencionado acima, tem sido amplamente estudada como indutora de morte e moduladora da expressão de moléculas associadas à resistência a múltiplas drogas. Inibidores como PPPP são úteis para o estudo da função dos glicosfingolipídios propriamente ditos, uma vez que não interfeririam com o acúmulo de ceramida intracelular.

Gangliosídios estão associados a diferentes funções. Como mencionado anteriormente, alguns gangliosídios têm sua expressão associada à progressão de tumores. Apesar de descritos há vários anos como moléculas associadas a tumor, ainda não se sabe ao certo se essas moléculas estão envolvidas positivamente com progressão tumoral ou se são consequência deste processo. Por exemplo, a inibição da expressão de G_{D3} diminui o crescimento de tumores experimentais. Entre os possíveis mecanismos para o fenômeno está a modulação da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A), e consequente inibição do processo de angiogênese ⁵⁷. Ainda, uma consequência desta inibição é a modulação negativa do processo de migração celular, envolvida no processo de aparecimento de metástases ⁵⁸. Outras funções também são atribuídas a

esses glicosíngolípídios, como moduladores da morte celular⁵⁹⁻⁶¹ ou indutores da proliferação^{62,63}.

Figura 1. Biossíntese de gangliosídeos. A glucosilceramida-sintase é uma enzima que adiciona um resíduo de glucose a uma ceramida, dando origem à glucosilceramida. Após adição de um resíduo de galactose a glucosilceramida-sintase, forma-se a lactosilceramida, base para a formação do gangliosídeo menos complexo, o G_{M3} . A partir desse gangliosídeo, que se caracteriza pela presença de um resíduo de ácido siálico, originam-se os outros gangliosídeos.

1.5.1. Gangliosídeos como marcadores tumorais

Os gangliosídeos estão geralmente localizados no folheto extracelular das membranas plasmáticas de células de vertebrados. São comumente encontrados na membrana de células do sistema nervoso, onde gangliosídeos fazem parte de cerca de 5-10% dos lipídios totais da membrana. Contudo, também são encontrados em menor extensão em outros tipos celulares.

Apesar de ser o G_{M3} ($\text{Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}\beta 1\text{-Cer}$) o gangliosídeo mais freqüentemente encontrado em diversos tumores, gangliosídeos mais complexos como os dissialogangliosídeos G_{D3} ($\text{Sia}\alpha 2\text{-8Sia}\alpha 2\text{-3Gal}\beta 1\text{-4Glc}\beta 1\text{-Cer}$) e G_{D2} ($\text{Sia}\alpha 2\text{-8Sia}\alpha 2\text{-3[GalNAc}\beta 1\text{-4]Gal}\beta 1\text{-4Glc}\beta 1\text{-Cer}$), são considerados marcadores tumorais para vários tipos de neoplasias da crista neural, como por exemplo, melanomas. Estes marcadores tumorais são expressos de maneira alterada, ora apresentando maiores níveis ou sofrendo alterações de acetilação. Assim, estes dissialogangliosídeos podem ser modificados apresentando substituições nos resíduos de ácido siálico, gerando por exemplo 9-O-acetil- G_{D3} ou de-N-acetil- G_{D3} ^{64,65}.

G_{D3} é considerado um marcador tumoral, apesar de ser encontrado em várias células normais, porém, em níveis mais baixos. Assim G_{D3} é encontrado na medula adrenal, nas ilhotas de Langerhans e também em melanócitos normais^{12,15,16}. Portanto, como em praticamente todos os exemplos de marcadores tumorais até agora definidos, os gangliosídeos são marcadores associados a tumor, e não tumor-específicos. Apesar das modificações encontradas na expressão dos dissialogangliosídeos serem mais freqüentemente detectadas em lesões metastáticas, quando comparadas aos tumores primários, seu papel ao longo da progressão tumoral ainda é desconhecido. Também não é conhecido se a expressão de dissialogangliosídeos varia ao longo da progressão tumoral como consequência da interação do melanócito ou da célula de melanoma com células de diferentes microambientes, por exemplo, epiderme, derme e eventualmente no parênquima do órgão sede da metástase³⁹.

1.5.2. G_{D3} e o estudo da progressão do melanoma

Antes da clonagem da G_{D3}-sintase, diferentes abordagens para se estabelecer o papel biológico de gangliosídeos foram avaliadas. De maneira geral, estes experimentos foram feitos adicionando-se gangliosídeos exógenos ao meio de cultura de diferentes tipos celulares. No entanto, gangliosídeos são moléculas anfipáticas que em solução apresentam-se na forma de micelas ou vesículas que podem sofrer partição, incorporando-se às membranas celulares e então se redistribuindo na superfície celular. Ainda, gangliosídeos exógenos podem agir como detergentes e quelantes. Assim questiona-se se a adição de gangliosídeos exógenos às células em cultura reflita a função verdadeiramente biológica dos gangliosídeos produzidos endogenamente⁶⁶⁻⁶⁸.

De outro lado, estudos abordando a expressão de gangliosídeos endógenos sugerem algumas funções biológicas relevantes. Estudos de distribuição de gangliosídeos sintetizados endogenamente (como o G_{D3} e G_{D2}, em linhagens de melanomas humanos) demonstraram que estes se localizam preferencialmente nas placas de adesão, microdomínios especializados da membrana plasmática^{69,70}. O papel de gangliosídeos na estabilidade ou função de proteínas presentes na placa de adesão (por exemplo, integrinas) ainda não está completamente esclarecido. Dados de Hakomori e colaboradores sugerem que o monossialogangliosídeo G_{M3} atue como modulador negativo da resposta migratória, através de sua interação

com CD9 ⁷¹. Dados de nosso laboratório corroboram esta noção e sugerem que a expressão de G_{D3} e derivados em melanócitos estimulam diretamente a resposta haptotática de melanócitos murinos frente a laminina-1 (Duarte, Otake e Chammas, manuscrito em preparação). Em linhagens estabelecidas de neoplasias pulmonares do tipo pequenas células, a expressão de dissialogangliosídios como G_{D2} induziu simultaneamente aumento da capacidade invasiva das células em matrizes complexas, aumento de proliferação e inibição da apoptose das células G_{D2} positivas ⁶³.

1.5.3. Gangliosídios e o envolvimento com vias de proliferação

Alguns trabalhos sugerem que gangliosídios poderiam modular a resposta de alguns tipos celulares a fatores de crescimento como EGF e PDGF ⁷². Sugere-se que estes gangliosídios modulem a atividade quinase destes receptores de fatores de crescimento. O mecanismo deste fenômeno ainda não está esclarecido. Não se sabe ainda ao certo se este fenômeno depende de uma interação específica entre gangliosídios e receptores para fatores de crescimento ou se este é dependente das características físicas de membranas ricas em gangliosídios.

Estudos mais recentes sugerem que gangliosídios G_{M3} e G_{D3} distribuem-se em microdomínios da membrana plasmática, co-localizando com quinases como c-Src, Rho A e Lyn ^{46,73,74}, sugerindo um papel destes gangliosídios como moduladores de quinases que não só as associadas a receptores de fatores de crescimento. Estes estudos mostraram que os

gangliosídeos co-particionam com estas quinases quando extratos celulares são feitos usando-se detergentes não iônicos. Apesar das evidências bioquímicas ainda não há evidência citoquímica de que isto de fato ocorra. Uma abordagem que tem se mostrado útil consiste na desestruturação destes microdomínios com compostos que têm afinidade por colesterol, como β -ciclodextrina, por exemplo ⁷⁵.

Lloyd e colaboradores avaliaram o potencial tumorigênico de sublinhagens celulares deficientes em G_{D3} , derivadas de uma linhagem celular rica em G_{D3} . Nestes estudos, foi demonstrado que aquelas células são menos tumorigênicas que as células parentais ⁷⁶. A relação entre a expressão de G_{D3} e atividade de quinases associadas à proliferação celular neste modelo não foi determinada. Ainda mais recentemente, Yu e colaboradores ⁷⁷ modificaram geneticamente células de melanomas de hamster (que expressam tanto G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3}), de maneira a diminuir a expressão dos dissialogangliosídeos (abordagem anti-senso). Neste trabalho, mostrou-se que células dissialogangliosídeos negativas proliferam menos que as células parentais.

O desenvolvimento de inibidores de glucosilceramida-sintase progressivamente mais específicos, como PPPP ⁵³ vem permitindo a reavaliação do papel de glicosfingolipídios. A depleção de glicosfingolipídios de linhagens estabelecidas de fibroblastos tornou-os menos sensíveis à ação do fator de crescimento PDGF ⁷⁸. Células de melanoma murino são potencialmente menos tumorigênicas e metastáticas quando depletadas de glicosfingolipídios ⁷⁹. Embora o mecanismo deste

fenômeno ainda não tenha sido avaliado, há evidência de que glicosfingolipídios estão associados à proteção a morte celular induzida por quimioterápicos como vincristina, por exemplo ⁸⁰. Um mecanismo alternativo residiria na influência que gangliosídeos exerceriam sobre o microambiente tumoral, como vem sendo discutido mais recentemente ^{17,81}. Há evidências de que gangliosídeos podem influenciar o processo de angiogênese, favorecendo a sobrevivência e manutenção da massa de células tumorais ^{82,83}. Além disto, alguns gangliosídeos são potencialmente imunossupressores, o que poderia atuar como elemento facilitador da manutenção da viabilidade da célula tumoral em seu microambiente ^{apud 79}.

1.5.4. Outras funções de gangliosídeos

Além de marcador tumoral, G_{D3} também é um marcador de atividade linfocitária. Por muito tempo assumiu-se que a expressão de G_{D3} estaria associada ao estado de proliferação celular de linfócitos ativados. Contudo, De Maria e colaboradores propuseram que a relação entre G_{D3} e ativação linfocitária não seja tão simples como se imaginava. Estes autores mostraram que a indução de morte celular (apoptose) induzida por Fas-Fas ligante é acompanhada da expressão aumentada da G_{D3} -sintase e conseqüente acúmulo de G_{D3} . O bloqueio da indução de G_{D3} sintase usando-se oligonucleotídeos anti-senso é acompanhado de resistência a apoptose induzida pelo engajamento de Fas-Fas ligante. Esses resultados sugerem que G_{D3} seja um elemento *downstream* no processo de morte

celular induzida por Fas-Fas ligante ⁸⁴. Além disso, células de carcinoma renal expressando outros gangliosídios, como G_{M1} , G_{D1a} e de G_{M2} , induzem a morte de linfócitos T. quando cultivados no mesmo ambiente ⁸⁵. Isso sugere algum papel de gangliosídios como possíveis moduladores da resposta imune. De fato, células tumorais liberam fatores para o meio extracelular, dentre eles, gangliosídios comumente expressos em tumores. G_{M3} e G_{D3} adicionados em culturas de monócitos inibem sua diferenciação em células dendríticas ⁴⁸, o que poderia estar relacionado ao estado de imunossupressão observado em pacientes com tumores avançados. Contudo, não são somente células do sistema imune que seriam alvo da modulação da morte celular por gangliosídios. Diversos trabalhos têm mostrado a atividade de G_{D3} e seu papel na progressão do tumor. Pequenas células do pulmão que expressam o dissialogangliosídio G_{D2} apresentaram taxa de proliferação aumentada, além de capacidade de invasão maior. Quando foram tratadas com anticorpo monoclonal anti- G_{D2} , tiveram supressão da proliferação e ativação de morte celular, sugerindo um papel importante na modulação da resposta proliferativa e/ou morte mediada por esse dissialogangliosídio ⁶³.

A função pró-apoptótica de G_{D3} foi confirmada independentemente por diferentes grupos. O mecanismo pelo qual G_{D3} levaria as células à morte é bastante estudado. Muitos grupos especulam que G_{D3} , de forma ainda não muito bem esclarecida, seria translocado para a mitocôndria e ativaria a morte celular mediada por liberação de citocromo c para o citoplasma ⁸⁶. Estudos *in vitro* mostram que o dissialogangliosídio G_{D3} induz diretamente a

alteração de permeabilidade de mitocôndrias, associadas ao escape de citocromo c, que no citoplasma, induziria a ativação de caspase ^{87,88}. Esta interação parece ser dependente de bcl-2 ⁸⁶. O ponto pendente quanto à relevância fisiológica desta interação recai sobre a distribuição topográfica de G_{D3}, freqüentemente associada a membranas plasmáticas e lisossomos (quando do processo de sua degradação). É possível que gangliosídeos derivados de G_{D3} (por exemplo, de-N-acetil-G_{D3}, que parece ser preferencialmente intracelular ¹²) exerçam estas funções. García-Ruiz e col. (2000) ⁸⁹ mostraram que lactosilceramida, um precursor dos gangliosídeos, de distribuição sabidamente intracelular, exerceria o mesmo efeito que G_{D3} ⁸⁹.

Além de induzir a morte em alguns tipos celulares, gangliosídeos e outros glicoesfingolipídios podem também facilitar a morte induzida por diferentes tratamentos antitumorais. A presença de G_{D3} em linhagem de hepatoma humano sensibilizou esta a diferentes doses de radiação. Além disso, esse evento ativou moléculas anti-apoptóticas, como NFκB, e não induziu a ativação de proteínas de sobrevivência, como Akt ⁹⁰. Nessa linha de sensibilização à morte induzida por quimioterápicos ou radiação ionizante, vários grupos têm pesquisado a ação de alguns quimioterápicos comumente usados no tratamento de melanomas e a possível modulação por glicoesfingolipídios. Drogas como fenretinida induz a morte de uma linhagem celular de neuroepitelioma contudo, a inibição de glucosilceramida-sintase diminuiu a morte celular ⁹¹, sugerindo um possível envolvimento de alguns glicoesfingolipídios na resistência à morte celular. Nessa mesma

linha, a citotoxicidade induzida por vincristina aumenta quando células de leucemia são tratadas com inibidores dessa mesma enzima⁸⁰. É importante ressaltar que melanomas acumulam gangliosídeos como G_{D3}, o que sugere que estas células foram selecionadas pela capacidade de evasão à morte modulada pelo gangliosídeo. Identificar as vias ou mecanismos de evasão poderia levar ao desenho de novas estratégias de quimiossensibilização.

Os mecanismos pelos quais gangliosídeos poderiam estar interferindo com a resposta à morte pode variar. Como citado anteriormente, moléculas de sobrevivência, como Akt, podem modular ou não essa resposta⁸⁵. Isso parece variar de acordo com o tipo celular e o mecanismo de ação da droga utilizada. No momento, as informações da literatura não permitem prever qual, ou quais vias de morte celular seriam potencialmente moduladas por glicosfingolipídios e gangliosídeos. Estudos de exploração deste fenômeno são necessários para se obter informações quanto às vias de potencial utilização para quimiossensibilização de tumores.

1.7. Mecanismos de ação de drogas citotóxicas

Serão descritos abaixo os mecanismos de ação de algumas substâncias que serão usadas neste estudo e que são exemplos de drogas usadas na clínica para o tratamento do melanoma. Além destas drogas, usamos também estaurosporina (indolo[2,3- α]carbazole), um potente inibidor de PKC (proteína quinase C) e que atua como indutor não seletivo de morte celular por interferir na mobilização de estoques intracelulares de cálcio^{92,93}.

1.7.1. Cisplatina

Cisplatina (cis-diaminodicloroplatinum) é uma droga amplamente utilizada no tratamento de tumores descoberta por B. Rosenberg, na década de 60, que mostrou que a cisplatina inibia a proliferação de bactérias *E. coli*⁹⁴. Não se sabe ao certo como cisplatina entra nas células, seja por difusão passiva ou mediada por algum facilitador. A baixa concentração de cloro intracelular facilita esse processo. Uma vez no espaço intracelular, os ligantes de cloro são trocados por moléculas de água⁹⁵, gerando formas altamente reativas: $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Essas moléculas reagem com diversos alvos intracelulares, entre eles, o DNA, levando as células à morte⁹⁶. Cisplatina se liga preferencialmente no átomo N⁷ da guanina, especialmente em regiões com duas ou mais guaninas consecutivas. As ligações são principalmente intrafitas, ou seja, entre nucleotídeos presentes na mesma fita do DNA (Fig. 2a). As reações ocorrem preferencialmente entre o dinucleotídeos GG e AG, que são os principais alvos de citotoxicidade da cisplatina⁹⁷.

No passado se achava que a citotoxicidade da cisplatina era devida à inibição da síntese do DNA. Contudo, células com deficiência no sistema de reparo expostas a concentrações de cisplatina não foram induzidas à parada da síntese de DNA⁹⁸. As modificações por cisplatina na fita de DNA distorcem a estrutura da dupla fita, expondo a superfície da menor curvatura, onde se ligam diferentes classes de proteínas, como proteínas de reparo,

fatores de transcrição, proteínas do grupo de alta mobilidade (HMG) ou histonas H1 ⁹⁹. Além disso, como a cisplatina é uma droga não específica, que reage tanto com DNA mas também com proteínas, não se descarta a possibilidade da cisplatina ser um facilitador do processo de iniciação da apoptose ⁹⁶. Proteínas HMG são uma família multifuncional de pequenas proteínas não histonas associadas à cromatina ¹⁰⁰. Essas proteínas estão envolvidas na regulação gênica e manutenção da estrutura da cromatina. Proteínas da família HMG reconhecem algumas distorções no DNA e suas interações com o DNA distorcido regulam diretamente a transcrição ou facilitam a interação com outros fatores de transcrição ⁹⁶. Por exemplo, o HMGB1 interage diretamente com p53 *in vitro* e aumenta a atividade de ligação ao DNA de p53. Linhagens de células tumorais que desenvolvem resistência cisplatina freqüentemente têm elevados níveis de HMGB1 ⁹⁹. Cisplatina induz apoptose em células expressando p53 normal ou não funcional ¹⁰¹. O principal mecanismo de reparo envolvido na resposta celular à cisplatina é o reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*, NER) ¹⁰², que envolve a participação de uma série de proteínas nucleares associadas ao quadro do *Xeroderma pigmentosum* (XPA a G). Indivíduos com variantes polimórficas destes genes têm risco elevado para o desenvolvimento de melanoma. Assim, parte da base da resistência à cisplatina pode ser uma disfunção do sistema de reparo que aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento da própria doença.

Um dos mecanismos de resistência à cisplatina pode ser sua inativação citosólica. Glutathione (GSH) e metalotioneína, que possuem

resíduos sulfidríla livres atuam dessa maneira. GSH se liga covalentemente à cisplatina em concentrações fisiológicas e pode inibir a conversão dos adutos de DNA. Conjugados de GSH com cisplatina são exportadas das células por uma bomba dependente de ATP. Metalotioneína é uma metaloproteína rica em cisteína de baixa massa molecular que reage diretamente com cisplatina ⁹⁶.

1.7.2. Temozolamida

Temozolamida (TMZ) é uma droga alquilante citostática pertencente a uma classe de pró-droga imidazotetrazina de segunda geração. TMZ decompõe-se espontaneamente, independente de ativação enzimática. Seu produto de hidrólise é o 5-(3-metiltriazeno-1-il)imidazole-4-carboxamide (MTIC) ^{94,103}. MTIC metila o DNA em alvos nucleofílicos (Fig. 2b) como $N^7-G \geq N^3-A > N^1-A = N^3-G = O^6-G$, de acordo com sua reatividade ¹⁰³. Sua ação assim é equivalente à da dacarbazina (5-(3,3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide = DTIC). Contudo, dacarbazina necessita ser ativada metabolicamente no fígado para formar a droga ativa MTIC ¹⁰⁴.

A alquilação O^6-G é revertida pela enzima O^6 -metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT), uma enzima que é destruída após a catálise. Superexpressão da metiltransferase está associada à resistência à dacarbazina ou temozolamida ¹⁰⁵.

1.7.3. Vimblastina

Vimblastina, assim como vincristina, são drogas naturais originadas de alcalóides da vinca, isoladas das folhas de *Catharathus roseus*. Suas folhas têm sido usadas devido as suas propriedades medicinais desde o século XVII. Somente no final da década de 50 descobriu-se sua atividade antimitótica e foi assim melhor aplicada para fins terapêuticos, especialmente em tratamento contra o câncer. Alcalóides da vinca têm sido usados na clínica há mais de 40 anos ¹⁰⁶.

Proteínas dos microtúbulos são os principais alvos de alcalóides da vinca. Microtúbulos são polímeros de proteínas que formam um tubo filamentoso e longo; componentes essenciais do citoesqueleto de todas as células eucarióticas são essenciais no desenvolvimento e manutenção da estrutura celular, no transporte de vesículas e na divisão celular. Microtúbulos são constituídos por heterodímeros de α - e β -tubulinas. Sua polimerização é um processo dinâmico. Por interagirem com as subunidades β de tubulina no pólo de extensão do microtúbulo (*plus end*), vimblastina interfere na dinâmica da formação dos fusos mitóticos das células (Fig. 2c), levando-as à morte. Em concentrações baixas, a vimblastina não despolimeriza microtúbulos, mas bloqueia a mitose e leva as células à morte.

Figura 2. Alvos das drogas citotóxicas. As drogas cisplatina, temozolamida (tmz) e vimblastina possuem mecanismos de ação distintos. **(A)** A cisplatina reage com suas moléculas de platina (Pt) em macromoléculas alvos como o DNA; **(B)** A tmz gera espécies reativas que alquilam ou o nucleotídeo adenina ou guanina; **(C)** A vimblastina se liga a subunidades β da tubulina impedindo a polimerização dos microtúbulos na sua extremidade *plus end*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o papel de dissialogangliosídeos, com ênfase em G_{D3} e derivados, no controle de proliferação e morte celular induzida em melanócitos e em células de melanoma.

2.2. Objetivos específicos:

1. Comparar as linhagens celulares melan-a, linhagem não tumorigênica, com as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5, derivadas da primeira, com o objetivo de avaliar as vias de proliferação e morte celular envolvidas na progressão tumoral deste modelo.

2. Avaliar o impacto da expressão da G_{D3} -sintase, a sialiltransferase ST8Sial, em parâmetros da proliferação e morte celular da linhagem não tumorigênica melan-a. Para tanto, os transfectantes G_{D3}^+ foram comparados com as células parentais e transfectante controle.

3. Avaliar o efeito da expressão de ST8Sial na resposta dos transfectantes a diferentes fatores de crescimento, associados à progressão

tumoral de melanomas, como EGF, FGF-1 e FGF-2, de maneira comparativa ao transfectante controle, células G_{D3}^- .

4. Avaliar se a expressão dos dissialogangliosídeos está associada positiva ou negativamente à resposta a indutores de apoptose como estaurosporina e os quimioterápicos cisplatina, temozolamida e vimblastina, usados no tratamento de melanomas.

5. Avaliar o impacto da inibição da glucosilceramida-sintase nos fenômenos associados à proliferação e morte celular. Para se evitar que parte dos resultados sejam devidos ao acúmulo de ceramida intracelular, optou-se por utilizar o inibidor PPPP. Estender a análise para linhagem de melanoma humano, não geneticamente modificada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Linhagens celulares*

A linhagem celular de melanócito murino, melan-a, foi cedida por S. Hearing, via Prof. Michael Rabinovich. Esta linhagem deriva de melanócitos de camundongo C57bl/6¹⁰⁷ e é mantida em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO) em pH 6,9 suplementado com 5% de SBF (Gibco BRL, Argentina) e 200nM de PMA (Sigma, St. Louis).

As linhagens tumorigênicas, Tm1 e Tm5 foram obtidas submetendo-se as células melan-a a ciclos de crescimento em agarose sólida com impedimento de adesão celular. As células assim selecionadas foram clonadas, dando origem aos clones Tm1 e Tm5, que se mostraram tumorigênicos¹⁰⁸. A linhagem Tm1 é um clone tumorigênico amelanótico, e a Tm5, um clone melanótico, que são mantidas nas mesmas condições de sua célula parental, melan-a, inclusive na presença de PMA.

A LB373Mel é uma linhagem de melanoma humano que foi cultivada em meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) em pH 7,4 suplementado com 10% de SBF, 219µg/mL de L-glutamina, 10nM de hidrocortisona, 100µM de aminoácidos não essenciais, 5µg/mL de insulina e 10µg/mL de transferrina. Opcionalmente, 100µg/mL de estreptomicina e 100U/µL de penicilina.

Todas as linhagens utilizadas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

3.2. Transfecção de ST8Sial

Melan-a, que não expressa G_{D3} endógeno, foi transfectada com o gene da enzima ST8Sial. Esta enzima é uma sialiltransferase responsável pela conversão de G_{M3} em G_{D3}. A melan-a também foi transfectada com o plasmídeo vazio (pcDNA3) para avaliação do controle. As transfecções foram realizadas usando LipofectAMINE, de acordo com as instruções do fabricante, e os transfectantes gerados foram selecionados com 1,6 mg/mL de G418 e mantidos com 800 µg/mL. A eficiência da transfecção (expressão do transgene) foi avaliada por citometria de fluxo usando-se anticorpos específicos. Os clones obtidos foram mantidos na ausência de pressão seletiva por até 4 semanas, mantendo-se o fenótipo, o que sugere a possível integração do transgene. Os clones Me-pcDNA3 (G_{M3}⁺G_{D3}⁻) e Me-ST8Sial (G_{M3}⁺G_{D3}⁺) representam respectivamente células transfectadas com o plasmídeo vazio e o contendo o gene ST8Sial. A partir do clone Me-ST8Sial, por plaqueamento em baixa densidade, isolaram-se os clones Me-ST8D4 (G_{M3}⁺G_{D3}⁺) e Me-ST8D16 (G_{M3}⁺G_{D3}⁺). Em outra transfecção independente foram gerados os clones PC.C1 e PC.C3 (G_{M3}⁺G_{D3}⁻), ST8.C11 e ST8.C17 (G_{M3}⁺G_{D3}⁺).

3.2.1. Avaliação da expressão de ST8Sial por citometria de fluxo

A expressão dos gangliosídeos na superfície celular foi avaliada nos diferentes transfectantes por imunofluorescência (dados do nosso laboratório) ou por citometria de fluxo nos diferentes clones gerados. O anticorpo anti- G_{M3} , GMR6 (Dr. Tadashi, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Japão) foi usado a 0,125 μ g/mL; ou o sobrenadante com o anti- G_{M3} , DH2, foi usado na proporção de 1:4. O anticorpo anti-9-O-acetil- G_{D3} , conhecido como Jones (Sigma), foi usado na proporção de 1:150. O hibridoma que secreta o anticorpo anti- G_{D3} , R24 (American Tissue Culture Collection) foi cultivado em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF em condições de cultura. O anticorpo R24 foi usado a 0,125 μ g/mL. As células foram lavadas com 1% de BSA/PBS e incubadas por 1 hora com anticorpos monoclonais. Após a incubação, as células foram lavadas 3x com 1% de BSA/PBS e incubadas por 1 hora com IgG anti-camundongo conjugado a FITC (Pharmingen, San Diego CA), na proporção de 1:150, no escuro. As células foram lavadas 3x com 1% de BSA/PBS. A expressão de G_{M3} , G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} na superfície celular foi avaliada em citômetro de fluxo (FACScalibur, Beckton Dickson) após aquisição de 10000 eventos.

3.3. Cultura de células

Os repiques foram feitos sistematicamente quando as células atingiam a subconfluência (cerca de 90%) e então plaqueadas em densidade

inicial de 30% da confluência, a cada 3 dias. As células eram lavadas 3x com PBSA/EDTA e soltas das garrafas pelo método enzimático, com 0,2% de tripsina (Instituto Adolfo Lutz) a 25°C por 2 minutos, e então a ação proteolítica da tripsina era bloqueada pela adição de meio de cultura suplementado com 5% de SBF, v:v. O número de células foi estimado por contagem direta em hemocítômetro (câmara de Neubauer) avaliando-se a viabilidade celular pelo método de exclusão por azul Tripan.

Quando os repiques não eram necessários, o meio de cultura das células era trocado sistematicamente a cada 3 dias, devido à degradação que o PMA sofre em soluções aquosas. As células eram lavadas 3x com PBSA e então novo meio de cultura era adicionado.

Para serem congeladas, as células foram centrifugadas, ressuspensas em solução de congelamento com SBF e 10% de DMSO (Sigma, St Louis, MO), e estocadas em ampolas de congelamento a -70°C e após um mês, em nitrogênio líquido por tempo indeterminado.

3.4. Proliferação celular

As células foram mantidas em condições de cultura na presença ou ausência de PMA por 15 horas ou 3 dias, como indicado nos experimentos. O meio das células foi renovado, na presença ou ausência de fatores de crescimento. Foram utilizados 2,5 ou 5 ng/mL de EGF, 5 ng/mL de FGF-1 ou de FGF-2 por 24 horas. Após o tempo determinado, avaliou-se a proliferação celular por contagem direta em câmara de Neubauer, número de células

metabolicamente ativas usando-se MTT ou ainda a distribuição das células em diferentes fases do ciclo celular, usando-se iodeto de propídio.

3.4.1. Ciclo Celular

De acordo com a quantidade de DNA celular, avaliamos a distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular. A primeira fase é conhecida como G_1 (gap 1), em que a célula passa por modificações para se preparar para entrar na fase S, na qual o DNA é sintetizado. Na fase S ocorre gradativamente a cópia do material genético. A seguir, na fase G_2 (gap 2), a célula se prepara para entrar na fase M (mitose). Nessa fase o DNA replicado é organizado para a divisão entre as células-filhas. Após a divisão completa das células, cada uma entra na fase G_0 , ou então células proliferativas entram em G_1 para a preparação para uma próxima replicação.

A avaliação da distribuição das fases das células ao longo ciclo foi feita através da incorporação de iodeto de propídio (PI), um fluorocromo que se intercala estequiometricamente a cada 4 pares de bases do DNA. Foi utilizada uma solução contendo iodeto de propídio e RNase, necessária para a degradação do RNA presente.

Foram plaqueadas 10^4 células em placas de $9,6\text{cm}^2$ ($\sim 10^3$ células/ cm^2). As células foram mantidas sob condições de cultura, e após o tratamento indicado, foram recolhidos o sobrenadante e as células aderidas, que foram soltas por ação proteolítica. Foram então suspensas em 1mL de etanol a 70% para permeabilização celular por pelo menos 2 horas ou por

até 20 dias a -20°C . As células foram lavadas 2x com PBS e ressuspensas em 200 μL de uma solução de iodeto de propídio, como segue: 200 $\mu\text{g/mL}$ RNase A, 20 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio, 0,1% v:v de Triton X-100 (Sigma), em PBS 1x. Em seguida foram incubadas por 30 minutos, protegidas da luz, e as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo. Após a calibração, foram analisadas 10000 partículas por amostra, em fluxo de cerca de 300 eventos/segundo. O conteúdo de DNA foi avaliado pela fluorescência vermelha, captada como fluorescência 2 (FL2), analisado em histograma representativo.

A análise de porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo foi realizada utilizando-se o software Cell Quest ou ModFitLT v2.0 (PMac), e os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA.

3.4.2. MTT

MTT é um método de determinação *in vitro* do número de células metabolicamente ativas. É um ensaio quantitativo colorimétrico que mede a proliferação, a viabilidade e toxicidade celular. MTT é um sal de tetrazolium amarelo. Oxirredução de MTT leva à formação de cristais de formazan insolúveis em água e de coloração azul escura. Esta reação ocorre apenas em células viáveis, através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Os cristais formados são solubilizados e a absorbância da solução é medida em espectrofotômetro, e a absorbância medida é convertida e

correlacionada diretamente com o número de células metabolicamente ativas.

Para os ensaios de proliferação, as células foram plaqueadas em densidades iniciais de 10^3 células em placas de 96 poços ($3,1 \times 10^3$ células/cm²) e mantidas em condições de cultura.

Após o tratamento indicado, foi adicionado ao meio de cultura 0,5 mg/mL de MTT. As células foram incubadas em estufa de CO₂, com atmosfera úmida e a 37°C por 4 horas, e após esse período foi adicionado tampão de solubilização e as placas foram incubadas por 15 horas em atmosfera umedecida a 37°C. Após esse período, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595nm com filtro de referência em 655nm. Curvas de calibração com número conhecido de células foram feitas, permitindo assim a posterior conversão da absorbância da solução em número de células.

3.5. Ensaios de morte celular

Foram semeadas 10^6 células em placas de 9,6cm² ($\sim 10^5$ células/cm²) em meio em condições de cultura e, após as células aderirem (cerca de 2 horas), foram incubadas com diferentes tratamentos.

O sobrenadante foi separado e as células foram retiradas por digestão enzimática com tripsina a 0,2%.

3.5.1 Avaliação por JC₁

O sobrenadante e as células aderidas foram ressuspensas em meio de cultura suplementado com 10% de SBF. Adicionou-se 200nM de JC₁ e em seguida agitou-se intensamente por 20 segundos, e então as células foram lavadas 2x com PBS. Elas foram incubadas por 15 minutos em PBS e depois a morte celular foi avaliada no citômetro de fluxo.

A avaliação da morte celular foi feita através da incorporação de JC₁, que é um fluorocromo catiônico que se difunde livremente para o interior da célula e se acumula dentro da mitocôndria, dependendo de seu potencial de membrana. Sua concentração no interior da mitocôndria está associada à formação de agregados de JC₁. Enquanto monômero, JC₁ emite fluorescência verde (525nm). Agregados de JC₁ emitem fluorescência vermelha (590nm). Esta propriedade permite estimar a frequência de células cujo potencial transmitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi dissipado¹⁰⁹⁻¹¹¹. A despolarização da membrana da mitocôndria é um dos eventos iniciais da apoptose. A despolarização da mitocôndria é indicada pela diminuição da razão da intensidade da fluorescência vermelha/verde após a aquisição em citômetro de fluxo. Após a aquisição das amostras procedeu-se à análise usando softwares apropriados (Cell QuestTM, Becton&Dickinson; WinMDI 2.8, <http://facs.scripps.edu/software.html>). A análise foi feita em gráfico de dispersão dos pontos (dot plot), avaliando-se tamanho (FSC) vs. intensidade de fluorescência vermelha (FL2), ou intensidade de fluorescência verde (FL1) vs. intensidade de fluorescência vermelha (FL2), dependendo da incorporação de JC₁ pelas células, de acordo com o experimento realizado.

Avaliaram-se as células que tinham diminuído FL2 e/ou FSC, já que a diminuição do volume celular é um evento que acompanha a morte celular. Os dados percentuais foram colocados em gráfico após serem normalizados com os respectivos controles.

3.5.2. Avaliação por incorporação de iodeto de propídio

Após os tratamentos indicados, a morte celular foi avaliada através de incorporação de iodeto de propídio (PI) no DNA de acordo com o item 3.4.1, e células apresentando quantidade de DNA inferior a $2n$ (hipodiplóides= H_0) foram consideradas em morte celular, já que a fragmentação do DNA é um evento que acompanha o processo de morte celular.

3.5.3. Avaliação por exclusão com azul Tripan

A morte celular também foi avaliada em alguns casos contando-se células em hemocítômetro, usando o método de exclusão por azul Tripan. Células viáveis não são permeáveis ao azul Tripan, excluindo-o. Células coradas em azul são inviáveis.

3.5.4. Ensaio de clonogenicidade

As células foram plaqueadas em condições de cultura em placas de 60mm. Foram semeadas cerca de 600 células (21 células/cm^2) e mantidas em condições de cultura na ausência de PMA por 14 dias. Após esse período, as placas foram lavadas 2x com PBS e as células foram fixadas com 3,7% de formaldeído por 15 minutos. As placas foram então lavadas 2x com PBS e coradas com 0,1% de violeta de cristal. O excesso de corante foi retirado por lavagem e o número de clones contados.

3.5.5 Exposição de Fosfatidilserina (PS) na Superfície Celular

Em células normais viáveis, a fosfatidilserina está localizada na face citoplasmática da membrana celular. Entretanto, em células apoptóticas, a fosfatidilserina é translocada da face interna para a face externa da membrana plasmática, passando a ficar exposta na superfície celular. A anexina V é uma proteína de 35-36kDa ligante de fosfolipídios na presença de Ca^{+2} , e que apresenta alta afinidade por fosfatidilserina. Assim, a marcação da superfície celular com anexina V funciona como um indicador de que as células encontram-se em apoptose.

Foram semeadas em placas de cultura de 6 poços, 3×10^5 células LB373Mel ($\sim 3 \times 10^4 \text{ células/cm}^2$), e mantidas sob condições de cultura durante 24 horas antes da realização dos experimentos. O meio de cultura foi então retirado, sendo as células lavadas com PBS e incubadas durante

24 horas com meio de cultura contendo ou não 25 μ M de cisplatina. Após o tempo de tratamento, as células foram coletadas por digestão enzimática junto com as células do sobrenadante. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS através de centrifugação a 250xg durante 5 minutos, ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação (HEPES 10mM, NaCl 140mM e CaCl₂ 2,2mM, pH 7.4) e incubadas com 5 μ L de anexina V conjugada com FITC (Molecular Probes) por 15 minutos no escuro em 100 μ L de solução. Depois de decorrido o tempo de incubação da anexina V, as células foram marcadas com PI (4 μ g/mL, Sigma), para exclusão de células em processo de morte tardia ou oncose. As células foram submetidas à análise no citômetro de fluxo (FACScalibur, Beckton Dickson) e a porcentagem de células marcadas com anexina V e/ou PI foi determinada dentre um total de 10.000 eventos adquiridos para cada amostra.

3.6. Tratamento com inibidores da glucosilceramida sintase

3.6.1. PPPP

As células foram plaqueadas, e após a adesão foi adicionado ao meio de cultura 250nM de PPPP, e o controle foi mantido na presença de 0,1% de etanol. Após 3 dias, em subconfluência, as células foram retiradas por ação

enzimática e incubadas com anticorpos específicos, sendo avaliadas em citometria de fluxo, de acordo com o item 3.2.1.

3.7. Migração celular

A migração das células em resposta à laminina foi quantificada em “Transwells” (Costar), que são insertos contendo membranas porosas de polycarbonato que separam dois compartimentos. As membranas de polycarbonato foram sensibilizadas com 10 µg/mL de laminina por 2 horas a 37°C em meio de cultura sem SFB, e em seguida bloqueadas com uma solução de 1% de BSA em meio com SFB por 1 hora a temperatura ambiente. As células migraram por 2 horas a 37°C. Após esse período, as membranas foram fixadas em 3,7% de formaldeído em PBS. Em seguida, as membranas foram coradas com 1% de azul de toluidina em 1% de borax. As células que permaneceram na face superior da membrana foram retiradas mecanicamente. Os ensaios foram feitos em triplicatas e para a quantificação, 10 campos diferentes para cada replicata foram contados. A análise estatística utilizada foi ANOVA.

3.8. Ensaio de proteção a ribonuclease

3.8.1. Extração de RNA

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² até cerca de 80% de confluência, quando foram lavadas 2x com PBSA e incubadas com 1 mL de Trizol[®] (Life Technologies, USA). O material foi então transferido para um tubo de 1,6 mL e processadas como indicado abaixo ou opcionalmente estocado a -70°C. O homogeneizado foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol inicial. A mistura foi então homogenizada por inversão por 15 segundos e incubada a temperatura ambiente por 2,5 minutos. A mistura então foi centrifugada a 22000 g por 15 minutos, recolhendo-se o sobrenadante. Adicionou-se a este 500 µL de álcool isopropílico e incubou-se por pelo menos 2 horas a -70°C. O pellet foi lavado com 1 mL de etanol a 85% e a amostra foi agitada e centrifugada a 15000 g por 5 minutos. O pellet foi dissolvido em água tratada com DEPC (inibidor de RNase), de acordo com o tamanho da amostra e armazenado a -70°C.

3.8.2. Quantificação e integridade do RNA

A quantificação do RNA foi feita através da leitura por espectrofotômetro, a 260 nm, e a sua pureza foi estimada através da relação entre as leituras de 260 nm por 280 nm, devendo esta razão ser igual ou

superior a 1,7. A integridade do RNA total foi confirmada após a eletroforese em mini-gel analítico de agarose a 0,8% (Sigma), na qual as amostras apresentavam os RNAs ribossômicos 28S e 18S preservados.

3.8.3. Metodologia de RPA

O ensaio de proteção a ribonuclease consiste em sintetizar RNAm antisense marcado com UTP[$\alpha^{32}\text{P}$], usado como sondas para detecção de RNAm específico. Essa sonda é sintetizada em um sistema de transcrição *in vitro* utilizando como molde fragmentos das seqüências de RNAm de interesse, cada qual com tamanho distinto e clonados em um plasmídeo contendo o sítio de ligação da T7 RNA polimerase. Dessa forma, cada produto da transcrição terá um tamanho característico, diferente do outro. O conjunto de sondas é hibridizado ao RNA total da amostra de interesse, sendo esta reação seguida da ação de uma RNase, que quebrará todos os RNAs de fita simples mantendo intactos aqueles que estiverem ligados às seqüências complementares. Esses RNAs restantes, protegidos da RNase, são purificados e aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida. Esse gel foi analisado por autorradiografia, mantendo-se o gel a -70°C , e o sinal gerado foi quantificado em um densitômetro e cada amostra foi comparada a uma banda de controle. As sondas utilizadas (Pharmigen, San Diego, CA) foram: RPA – mCyc-1 Multi-Probe Template Set – BD Pharmigen Technical Data Sheet (número do catálogo: 556241) e RPA – mCyc-2 Multi-Probe

Template Set – BD Pharmigen Technical Data Sheet (número do catálogo: 45621P).

3.8.4. Síntese das sondas

Para a síntese das sondas os seguintes reagentes foram adicionados, nesta ordem, em um tubo de 1,6 mL; 1 µL Rnasin (40 U/µL), 1 µL de uma mistura de nucleotídeos GACU (CTP, ATP, GTP - 2,5 mM e UTP – 61 µM), 2 µL de DTT (Ditiotreitol 100 mM), 4 µL de tampão de transcrição 5X, 1 µL da mistura de moldes de RNA de interesse, 10 µL de [α -³²P]UTP, 1 µL RNA polimerase T7 (20 U/µL). Após suave agitação com auxílio de uma pipeta e uma rápida centrifugação, a mistura foi incubada a 37°C por 1 h. A reação foi finalizada com a adição de 2 µL de Dnase/Rnase-free (1 U/µL), quando então a mistura foi gentilmente homogenizada e incubada a 37°C por 30 minutos. A esse tubo, foram adicionados em ordem: 26 µL de EDTA 20mM, 25 µL de fenol saturado com Tris-HCl, 25 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1), 2 µL de RNAt de levedura (2 mg/mL), seguido de uma agitação vigorosa em um vortex e de uma centrifugação de 22.000xg por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa da superfície foi transferida para um novo tubo de 1,6 mL ao qual adicionou-se 50 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1). Após homogenização em um vortex e centrifugação por 2 minutos a temperatura ambiente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,6 mL ao qual adicionou-se 50 µL de acetato de amônio 4 M e 250

μL de etanol absoluto gelado. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubadas por 30 minutos a -70°C . Após isso, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante cuidadosamente retirados. Ao precipitado foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de etanol a 90% gelado e o material, novamente cetrifugado por 5 minutos a 4°C . O sobrenadante foi removido e o precipitado permaneceu a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos para secagem. O precipitado foi ressuspendido em $50 \mu\text{L}$ de tampão de hibridização, rapidamente centrifugado e uma alíquota de $1 \mu\text{L}$ foi retirada, em duplicata, para quantificação da marcação em um contador de radiação beta (LS5000, Beckman). A amostra foi colocada em um tubo de cintilação contendo 5mL de aquasol (1 L de Triton X-100 da Merck; 0,6 g de POPOP da Sigma; 12 g de PPO da Sigma; 2 L de tolueno da Merck). As sondas poderiam ser mantidas a -20°C e serem usadas por duas hibridizações sucessivas.

3.8.5. Preparação do RNA e hibridização

Para os ensaios de hibridização, foram usados $10 \mu\text{g}$ do RNA total de cada uma das amostras de interesse que foram aliquoteadas cada qual em um tubo de 1,6 mL. Foi utilizado também um tubo contendo RNAt de levedura como controle negativo da reação. Como controle positivo do ensaio, utilizou-se um volume de $2 \mu\text{g}$ de RNA controle (Pharmigen, San Diego, CA). As amostras de RNA foram precipitadas, secas e

ressuspendidas, com auxílio de um vortex, em 8 μL do tampão de hibridização. As sondas foram diluídas para concentração apropriada, conforme as indicações do fabricante, cerca de 2×10^5 cpm/ μL . A cada amostra de RNA foram adicionados 2 μL da sonda diluída e suavemente homogeneizados com pipeta. Para evitar evaporação, foram adicionados 50 μL de óleo mineral em cada tubo. Os tubos contendo as amostras foram transferidos para um banho-seco pré-aquecido a 90°C que foi submetido a uma redução lenta da temperatura até 56°C por 12-16 h.

3.8.6. Tratamentos com RNase

Antes de proceder com o tratamento com RNase, as amostras foram submetidas a uma redução gradativa da temperatura até 37°C por cerca de 15 minutos. Após esse período, foi adicionado, sob o óleo mineral, 100 μL de uma solução de RNase (2,5 mL de tampão de RNase e 6 μL de Rnase A + T1 (A: 80 ng/ μL ; T1: 250 U/ μL volume para 20 amostras) e os tubos foram submetidos a uma centrifugação 22.000xg por 10 segundos e incubados por 45 minutos a 30°C .

À parte, em um tubo de 1,6 mL, foram adicionados 18 μL de uma solução fresca de proteinase K (390 μL de tampão de proteinase K, 30 μL de proteinase K 10 mg/mL, 30 μL de RNAt de levedura, para 20 amostras). Com um pipetador, a fase inferior da reação de RNase foi transferida para o tubo a solução de proteinase K, homogenizada em vortex e centrifugada. A reação ocorreu a 37°C por 15 minutos. A esse tubo, foi adicionado 65 μL de

fenol saturado em Tris e 65 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1) e, após homogenização vigorosa, foi submetido a centrifugação por 5 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 120 μL de acetato de amônio 4 M e 650 μL de etanol absoluto gelado. Após homogenização por inversão, o material foi incubado por 30 minutos a -70°C e centrifugado por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 100 μL de etanol a 90% gelado. Depois de uma nova centrifugação de 5 minutos a 4°C , o sobrenadante foi desprezado e o precipitado seco à temperatura ambiente. Antes de aplicar as amostras no gel, o material foi ressuspendido em 5 μL de tampão de amostra 1X, agitado com auxílio de um vortex e mantido por 3 minutos a 90°C sendo posteriormente mantido em gelo até a aplicação.

3.8.7. Resolução em gel das sondas protegidas

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de aproximadamente 40 cm de altura e 0,4 mm de espessura. As placas de vidro utilizadas como molde foram devidamente limpas e siliconizadas antes da montagem do aparato para polimerização do gel. Para este ensaio, utilizou-se um gel de acrilamida com concentração final de 5%, e para tal foram necessários os seguintes reagentes: 74,5 mL de solução de acrilamida (19:1 acrilamida/bis): 8,85 mL de acrilamida 40%, 9,31 mL de bisacrilamida 2%, 7,45 mL de TBE 10X, 35,82 g de uréia, dH_2O q.s.p.

74,5mL, 450 μ L de persulfato de amônio 10%, 60 μ L de TEMED. A solução foi imediatamente aplicada dentro do molde e todas as bolhas de ar foram removidas e, ao término da aplicação, um pente de 0,5 mm de espessura foi colocado para formação dos poços de aplicação. Após a polimerização (cerca de 1 hora) foi realizada uma pré-corrida em tampão TBE 0,5X em força constante de 40 watts por pelo menos 45 minutos. Após esse período, as amostras foram aplicadas sendo que em uma das canaletas, foi aplicada a sonda diluída em solução de hibridização para uma concentração de 1000-2000 cpm que serve como marcador de tamanhos. As amostras migraram no gel até que o corante azul de bromofenol alcance 30cm, em força constante de 50 watts. Então, o aparato do gel foi desmontado, a placa menor removida e um papel filtro 3M foi colocado sobre o gel. Para secagem do gel, a montagem foi envolta em filme de plástico e transferida para o secador de gel onde permaneceu por 1 h a uma temperatura de 80°C. Posteriormente, um filme de Raio X, Kodak X-AR, foi exposto a esse gel em uma cassette com tela intensificante e mantido a -70°C por um período a ser determinado. A identificação das bandas correspondentes aos RNAs protegidos foi possível através da plotagem das distâncias entre elas em papel gráfico semi-log que fornecem uma curva padrão de distância de migração versus log do comprimento de nucleotídeo, conforme as instruções dos fabricantes. É importante observar que os comprimentos das sondas foram maiores do que o dos fragmentos protegidos devido à presença de sequências flanqueadoras nas sondas derivadas dos plasmídeos, que não hibridizam com o RNAm alvo. Utilizamos essa curva para estabelecer a

identidade das bandas protegidas da RNases. As bandas impressionadas no autoradiograma foram quantificadas em um densitômetro IMAGEMASTER Pharmacia e expressas segundo o conteúdo de GAPDH presente na mesma amostra.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da proliferação de linhagens não-tumorigênica, melan-a, e tumorigênica, Tm1

4.1.1 Resposta mitogênica a fatores de crescimento

Dados preliminares do nosso laboratório mostravam que a proliferação da linhagem de melanócitos murinos melan-a era dependente do éster de forbol, PMA. Esta dependência parecia ser parcialmente revertida quando fatores de crescimento eram adicionados à cultura. Células melan-a e Tm1 foram mantidas na ausência de PMA e cultivadas na presença de concentrações conhecidas de fatores de crescimento como EGF, FGF-1 e FGF-2 por um período de 16 horas, quando então foi realizado um ensaio de viabilidade celular, pelo método MTT (Fig. 3a), ou então se determinou a distribuição das células ao longo das diferentes fases do ciclo celular (Fig. 3b). O resultado mostra um aumento no número de células metabolicamente ativas quando a linhagem melan-a foi incubada com fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF-2), mas não quando foi incubada com fator de crescimento epidermal (EGF), como mostrado na figura 3a. A linhagem tumorigênica Tm1 também foi tratada com esses

fatores de crescimento, mas não se mostrou responsiva a nenhum deles. Por outro lado, o número de células metabolicamente ativas nessa linhagem tumorigênica é maior do que na linhagem melan-a (Fig. 3a), sugerindo que a proliferação de células Tm1 é independente da adição exógena destes fatores de crescimento. A resposta mitogênica das células frente a FGF-1 foi verificada através da incorporação de iodeto de propídio. A linhagem melan-a teve um estímulo proliferativo quando foi incubada com FGF-1, como observado pelo aumento nas fases S/G₂/M do ciclo celular (Fig. 3b). A proliferação de Tm1 é independente da adição deste fator de crescimento, semelhante ao observado para FGF-2. De fato, como mostrado na Fig. 3b, a fração de células Tm1 nas fases S/G₂/M em condições de deprivação de PMA é significativamente maior do que a fração de células melan-a em fase proliferativa nas mesmas condições. Esse resultado sugere que no processo de progressão, os mecanismos de controle da transição entre G₁ e S foram atenuados na linhagem tumorigênica. Resultados semelhantes foram observados em relação à proliferação de Tm5, outra linhagem tumorigênica derivada de melan-a (dados não mostrados).

Figura 3. melan-a é responsiva a FGF-2 e FGF-1, mas não a EGF, enquanto a proliferação de Tm1, contraparte tumorigênica de melan-a, independe da adição destes fatores. As células melan-a e Tm1 foram mantidas sob condições de cultura na ausência de PMA, e depois incubadas com diferentes fatores de crescimento. **(A)** A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT, realizado em triplicata, como descrito em material e métodos. **(B)** A fração proliferativa foi analisada após incorporação com iodeto de propídio. Cada barra representa média±desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata. (*p<0,01).

4.1.2. Avaliação da expressão de ciclinas

A transição entre as diversas fases do ciclo celular depende da expressão de ciclinas. O nível de expressão de ciclinas foi avaliado de maneira comparativa nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 em condições estimuladas e não estimuladas pela adição exógena de fatores de crescimento. Avaliamos assim se a expressão de diferentes ciclinas está relacionada com o aumento da fração de células nas fases proliferativas dessas células. A expressão das ciclinas A₂, B₁, C, D₁, D₂, D₃, A₁, B₂, E, F, G₁, G₂, I e H, foi avaliada através da expressão do RNA mensageiro (RNAm) dessas moléculas, em ensaio de proteção de Rnase, como descrito em material e métodos.

A figura 4 mostra um exemplo de resultado típico deste ensaio, a intensidade das bandas correspondentes aos RNAs mensageiros dessas diferentes ciclinas; controle de carga de RNAm é feito analisando-se os níveis das mensagens de dois genes de expressão constitutiva, L32 e GAPDH. Apesar de ser responsiva a FGF-1 e FGF-2, a linhagem melan-a não apresentou modulação da expressão dessas ciclinas quando foi estimulada por estes fatores de crescimento exógenos. Contudo, pudemos observar que a intensidade das bandas correspondentes às ciclinas D₁, D₂ e D₃ é maior em Tm1 do que em sua linhagem parental, melan-a. Esse aumento foi confirmado após comparação com as bandas controle (GAPDH), que foram usadas para normalizar a intensidade de cada amostra (inserto, Fig. 4). Essa diferença ocorreu independentemente das células terem sido previamente tratadas ou não com fatores de crescimento. O nível dos RNAs mensageiros de ciclinas do tipo D está aumentada, tanto na ausência quanto na presença de fatores de crescimento, o que sugere que Tm1 e Tm5 estão em constante proliferação mediada por ciclinas D. Resultados semelhantes foram também observados quando a abundância dos transcritos das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foi avaliada por SAGE (serial analysis of gene expression), como discutido no manuscrito do anexo C ³⁵. Na tabela 1, estão representados os dados da abundância relativa às *tags* referentes às ciclinas D1, D2 e D3, comparando os níveis de Tm1 e melan-a. Ainda, a análise dos transcritos mais abundantes sugere que vias dependentes de FGF estão constitutivamente ativas em Tm1 e Tm5, mas não em melan-a. Em conjunto, estes dados sugerem que, no modelo que

estudamos, a progressão para tumorigênese está associada à ativação constitutiva das vias de sinalização dependentes de FGF. Estes resultados nos permitiram definir um alvo específico para o estudo dos possíveis papéis de glicosfingolípídios na progressão de melanomas.

Figura 4. Células tumorigênicas têm maior nível de expressão de ciclinas do tipo D do que células melan-a. As células foram mantidas por 16 horas na ausência de PMA e depois tratadas por 24 horas com 5ng/mL de FGF-1 ou FGF-2. O RNA total foi extraído e foi realizado RPA conforme descrito em material e métodos. O inserto mostra a normalização das amostras melan-a, Tm1 e Tm5 com a expressão do controle interno GAPDH.

TAG Unigene	GENE	Frequência melan-a	Frequência Tm1	Aumento relativo	Diferença
GTCCAGGAAA Mm.273049	Ciclina D1	17,44	37	2,12	19,56
GAAAGAAAGG Mm.333406	Ciclina D2	1,09	5	4,59	3,91
CTGCCTTAAT Mm.246520	Ciclina D3	37,06	82	2,21	44,94

Tabela 1. Aumento da expressão de ciclinas avaliado pela técnica de SAGE na linhagem tumorigênica Tm1. As células foram submetidas a ensaio de SAGE (Souza et al., Proteomics, *in press*³⁵ e em anexo C). O número de vezes que cada etiqueta (*tag*) está presente nas bibliotecas geradas foram corrigidas para um universo de 200000 etiquetas por biblioteca. A frequência anotada é então proporcional à abundância de cada etiqueta nas células estudadas. Acúmulo de ciclinas D foi também observado na biblioteca de etiquetas de células Tm5.

4.2. Avaliação de dissialogangliosídios na proliferação celular de melanócitos murinos

Mostramos anteriormente que células transformadas têm alto índice proliferativo independentemente de estímulos externos. Como dissialogangliosídios são marcadores moleculares associados à progressão de melanomas humanos e sua função ainda não está bem esclarecida, avaliamos o possível papel modulador de G_{D3} na resposta proliferativa, induzida ou não por fatores de crescimento em células melan-a transfectadas com o gene ST8Sial, ou uma construção controle.

4.2.1 Expressão de gangliosídios em linhagem celular de melanócito murino

O gene de ST8Sial, que codifica a glicosiltransferase responsável pela conversão do monossialogangliosídio G_{M3} no dissialogangliosídio G_{D3} , foi transfectado em melan-a, a qual expressa G_{M3} , mas não G_{D3} . A figura 5 mostra histogramas com a expressão de gangliosídios na superfície das células transfectadas. Os histogramas da esquerda mostram a expressão de G_{M3} , onde podemos ver uma diminuição na expressão desse gangliosídio nos transfectantes de ST8Sial. A segunda coluna de histogramas mostra a expressão de G_{D3} , presente apenas nos transfectantes de ST8Sial, os quais expressam quantidades diferentes de G_{D3} na sua superfície celular. As colunas da direita mostram a expressão de 9-O-acetil- G_{D3} , que é um derivado de G_{D3} gerado a partir da acetilação dessa molécula. Assim, só as

células que expressam G_{D3} podem convertê-lo em 9-O-acetil- G_{D3} . Curiosamente, as células $G_{M3}^+G_{D3}^+$ na cultura tendem a expressar principalmente 9-O-acetil- G_{D3} , o que sugere que o sistema enzimático responsável pela biossíntese de 9-O-acetil- G_{D3} ou seja induzido pela expressão de ST8Sial ou já esteja presente nas células melan-a. Outra transfecção foi realizada gerando diferentes clones que foram selecionados de acordo com a expressão de G_{D3} em sua superfície celular. A figura I do anexo A mostra a expressão de G_{M3} e G_{D3} nas células controle e nos clones mais comumente utilizados em nossos ensaios. PC.C1 e PC.C3 somente expressa G_{M3} (verde) enquanto que não há expressão de G_{D3} (rosa), mostrado na primeira fileira dessa figura. A fileira abaixo mostra que os clones ST8.C11 e ST8.C17 têm expressão de G_{D3} em sua superfície celular. Alguns ensaios foram realizados com outros clones de G_{D3} -sintase, e a figura II do anexo A mostra a expressão de G_{D3} e de 9-O-acetil- G_{D3} nesses clones utilizados eventualmente.

Figura 5. Composição de gangliosídeos nos diferentes transfectantes. As células foram incubadas com anticorpos específicos e os gangliosídeos da superfície celular foram analisados por citometria de fluxo. A coluna da esquerda mostra a expressão de G_{M3} em todas as células; a central mostra a expressão de G_{D3}; e a da direita mostra a expressão de 9-O-acetil-G_{D3}. Me-pcDNA3: célula transfectada com o plasmídeo vazio; Me-ST8Sial: célula transfectada com o gene da enzima ST8Sial; Me-ST8D4 e Me-ST8D16: clones de Me-ST8Sial.

4.2.2. Proliferação das células transfectadas

As células transfectadas foram colocadas em placas de 35mm na densidade inicial de 3×10^4 células ($\sim 3 \times 10^3/\text{cm}^2$), em triplicata, e mantidas sob condição de cultura por até 4 dias. O número de células a cada dia foi determinado por contagem direta ou por medida estimativa usando-se o ensaio de MTT. Os tempos de duplicação de todos os clones gerados a partir de melan-a mostraram-se dentro do intervalo de 18 a 19 horas, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Assim, a expressão do dissialogangliosídeo não conferiu uma vantagem proliferativa por si só (dados não mostrados).

4.2.3. Proliferação celular é dependente de PMA

Melan-a e os transfectantes gerados foram mantidos nas mesmas condições de cultura, inclusive na presença de PMA. Células de melanomas crescem independentes da presença de fatores como o PMA, como mostrado na figura 3. Para avaliar se a presença de G_{D3} conferiu alguma vantagem de crescimento independente de PMA, avaliamos a viabilidade celular por exclusão de azul Tripan. As células foram cultivadas em condições de cultura, na presença ou ausência de PMA por 3 dias. Verificamos que, assim como a célula parental, o crescimento celular dos transfectantes também é dependente de PMA. A figura 6a mostra que as células G_{D3}^+ não apresentaram vantagem proliferativa quando privadas de

PMA, pois ambas células, cultivadas na ausência de PMA, têm diminuído o número de células viáveis. Contudo, parte da população era viável, então avaliamos se as células estavam em processo de morte ou se pararam em alguma fase do ciclo celular. Para isso, foi feito um ensaio para determinar se a distribuição das células ao longo das diferentes fases do ciclo celular, através do método de incorporação de iodeto de propídio (Fig. 6b). O gráfico mostra que as células cultivadas na ausência de PMA têm uma diminuição acentuada nas fases S/G₂/M, que correspondem às fases proliferativas do ciclo celular. Na ausência de PMA, a porcentagem de células nessas fases diminui de 52,6% para 10,8% nas células transfectadas controle, e de 51,8% para 10,9% nas células G_{D3}⁺. A figura também mostra que há um aumento no número de células hipodiplóides (H₀), o que indica células em processo de morte.

Figura 6. A proliferação de células derivadas de melan-a é dependente de forbol-miristato-acetato (PMA). As células transfectadas foram cultivadas sob condição de cultura, na presença ou na ausência de PMA por 3 dias. **(A)** A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de Tripan de ensaio realizado em triplicata. **(B)** Histograma representativo das células Me.ST8D16 cultivadas na presença (PMA +) ou ausência (PMA -) do éster de forbol. Ensaio de incorporação de iodeto de propídio, os histogramas indicam a distribuição das células em cada fase do ciclo.

Avaliamos então a quantidade de células hipodiplóides após 3 a 5 dias na ausência de PMA. Como observado anteriormente, as células param em fases G_0/G_1 do ciclo. Além disso, após 5 dias de tratamento, células G_{D3}^- entram em processo de morte, enquanto que células G_{D3}^+ permanecem paradas nas fases do ciclo (Fig. 7). Contudo, a manutenção dessas células por períodos mais prolongados na ausência de PMA também leva as células G_{D3}^+ à morte (dados não mostrados).

Este efeito aparente de proteção à morte ou sobrevivência pode ser melhor avaliado usando-se ensaios de longa duração, como o ensaio de clonogenicidade, que avalia o potencial de sobrevivência e proliferação das células, após certo tratamento. A figura 8 mostra que células que possuem G_{D3} são mais eficazes em formar clones na ausência de PMA ($50 \pm 19,8$), do que os transfectantes controle ($14,2 \pm 5,4$, $p < 0,05$). Assim, apesar de não conferir uma vantagem proliferativa direta, a expressão de G_{D3} parece estar associado à sobrevivência celular.

Figura 7. Deprivação de forbol-miristato-acetato (PMA) após 5 dias sensibiliza células sem G_{D3} à morte. Células foram cultivadas sob condição de cultura, na presença ou ausência de PMA por 3 a 5 dias. A quantidade de células hipodiplóides foi determinada por incorporação de iodeto de propídio.

Figura 8. Células $G_{D3}+$ são mais sensíveis do que células G_{D3}^+ . Células foram plaqueadas em baixa densidade e cultivadas sob condição de cultura, na ausência de PMA por 14 dias. Os clones foram fixados e corados com cristal violeta. (A) Células PC.C1; (B) células ST8.C17, ensaio realizado em quaduplicata.

4.2.4. Proliferação estimulada por fatores de crescimento

Avaliamos se as células paradas em fases G_0/G_1 do ciclo celular retornavam a proliferação após estímulos com fatores de crescimento exógenos. As células foram mantidas sob condições de cultura e depois foram lavadas com PBS e mantidas por 3 dias na ausência de PMA. As células foram incubadas com 2,5 ng/mL e 5 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF), e a distribuição nas fases do ciclo foi avaliada através do método de incorporação de iodeto de propídio e analisada por citometria de fluxo. Não foi observado aumento nas fases proliferativas dessas células quando incubadas com EGF (dados não mostrados). Incubamos essas células com 5ng/mL FGF-2 ou FGF-1 e mostramos que há um aumento na porcentagem das células em fase proliferativa (Fig. 9a) quando estimuladas por FGF-2. Outra metodologia utilizada, o MTT, também mostrou um aumento no número de células quando incubadas com FGF-2 e também com FGF-1 (Fig. 9b).

Figura 9. Resposta mitogênica dos transfectantes sob ação do FGF-2. As células foram cultivadas na ausência de PMA por 3 dias, e então incubadas com FGF-2 ou FGF-1 por 24h. **(A)** A análise do ciclo celular foi feita pela incorporação de iodeto de propídio. **(B)** Avaliou-se o número de células metabolicamente ativas por MTT. Cada barra representa média±desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata; ensaio representativo de 3 ensaios independentes.

4.2.5. Inibição da expressão de gangliosídeos

A biossíntese de gangliosídeos é um processo complexo. A glucosilceramida-sintase é uma das primeiras enzimas a atuar nessa longa cadeia de biossíntese. Essa enzima é inibida por agentes como o D-treo-1-fenil-2-palmitoilamino-3-pirrolidino-1-propanol (PPPP) ou D-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol (d-PDMP). Células tratadas com esses inibidores originam células LacCer⁻G_{M3}⁻G_{D3}⁻, as quais não possuem nenhum gangliosídeo, e nem moléculas de lactosilceramida e glucosilceramida^{53,78}. Avaliamos o papel dos glicosfingolipídios no nosso modelo experimental, na proliferação celular e migração dependente de fatores de crescimento.

4.2.5.1. Tratamento com PPPP

As células foram mantidas sob condições de cultura com diferentes concentrações de PPPP e a composição de gangliosídeos na superfície celular foi analisada por citometria de fluxo após diferentes dias de tratamento. Após 3 dias, o tratamento com concentrações de 250nM de PPPP foi eficiente quanto à inibição da expressão de gangliosídeos (G_{M3} e/ou 9-O-acetil- G_{D3}). A figura 10 ilustra a eficiência de tratamento nos transfectantes usados neste trabalho. Os histogramas ilustram a expressão de G_{M3} e a ausência de 9-O-acetil- G_{D3} na célula Me-pcDNA3 e a eficiente depleção do monossialogangliosídeo após o tratamento com PPPP. Ainda estão ilustrados os histogramas que mostram o perfil de expressão de G_{M3} e presença de 9-O-acetil- G_{D3} em clone derivado de Me-ST8Sial, e a depleção de ambos os gangliosídeos após o tratamento com PPPP. A última coluna de histogramas mostra que o nível de integrina β_1 na superfície celular não se altera, mesmo após o tratamento com PPPP. O nível de integrina β_1 foi verificado já que essas células foram submetidas a ensaios de migração, como descrito adiante. A figura III do anexo A mostra a depleção de G_{M3} (verde) nas células PC.C1 e PC.C3 (primeira e segunda fileira, respectivamente) e a depleção de G_{D3} (rosa) nas células ST8.C11 e ST8.C17 (terceira e quarta fileira, respectivamente).

Figura 10. Depleção de gangliosídeos na superfície das células após tratamento com PPPP. As células foram cultivadas na presença de 250nM de PPPP por 3 dias. Depois, foram incubadas com anticorpos específicos contra gangliosídeos ou β1-integrina, e revelados com anticorpos secundários conjugados com FITC, e sua fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo. A primeira coluna mostra a expressão de G_{M3} nas células; a central mostra a expressão de 9-O-acetil-G_{D3}; e a da esquerda mostra a expressão de β₁ integrina na superfície celular nas diferentes situações. A primeira e terceira linhas mostram as células em condições controle, enquanto que a segunda e quarta linhas mostram as células tratadas com PPPP.

4.2.6. Proliferação de células depletadas de glicosfingolipídios

4.2.6.1. Proliferação e resposta a fatores de crescimento

As células foram tratadas ou não com PPPP por 3 dias na ausência de éster de forbol, e depois foram incubadas por 24 horas com FGF-2, na presença do inibidor. A depleção de glicosfingolipídios foi sistematicamente confirmada como indicado acima. Após o tratamento com FGF-2, a distribuição das células ao longo das diferentes fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo. A figura 11 mostra que o tratamento com FGF-2 induziu aumento da fração de células nas fases proliferativas e que esse estímulo não é dependente da composição de glicosfingolipídios das células, uma vez que a resposta de células $G_{M3}^-G_{D3}^-$, $G_{M3}^+G_{D3}^-$ ou $G_{M3}^+G_{D3}^+$, foi semelhante. Em outro conjunto de ensaios, outros transfectantes foram avaliados, contudo cultivados na ausência de PMA por menos tempo. Isso levou a uma discreta parada no ciclo celular, o que mesmo assim pôde ser revertida após adição de FGF-2, independente da composição de gangliosídios das células (dados não mostrados).

Figura 11. Efeito de FGF-2 em células depletadas de glicosfingolípídios. As células foram tratadas por 3 dias na presença de PPPP e na ausência de PMA e depois então incubadas com 5 ng/mL de FGF-2 por 24 horas. A distribuição nas fases do ciclo foi analisada pela incorporação de iodeto de propídio. Barras representam média e desvio padrão de ensaio representativo de 3 ensaios independentes.

4.2.7. Avaliação dos níveis de ciclinas

Para avaliar o nível de ciclinas das células estimuladas por FGF-1 ou FGF-2, a análise da expressão do RNA mensageiro de diferentes ciclinas foi feito pela metodologia do RPA. Foram realizados 3 ensaios independentes, após estímulo das células com FGF-2 com ou sem pré-tratamento com PPPP. Os diferentes ensaios foram quantificados e a análise estatística foi realizada. Não houve diferença na expressão das ciclinas analisadas (dados não mostrados).

4.2.8 Migração celular

A ação de fatores de crescimento não se restringe apenas à proliferação celular. Dentre suas ações, está também a indução da resposta migratória⁵⁸. Para avaliar essa possível modulação, as células transfectadas foram cultivadas na presença de FGF-2 e foram submetidas a ensaio de migração frente à laminina. Como anteriormente observado em nosso laboratório, as células $G_{M3}^+G_{D3}^+$ são mais migratórias do que as células $G_{M3}^+G_{D3}^-$. Assim, o G_{D3} é uma molécula moduladora da capacidade migratória dessas células. FGF-2 estimulou a resposta migratória de ambas as células. (Fig. 12). A atividade motogênica de FGF-2 foi então avaliada em células depletadas de glicosfingolipídios pelo tratamento prévio com PPPP (Fig. 13). O efeito motogênico de FGF-2 não foi observado quando as células foram depletadas de glicosfingolipídios.

Figura 12. Efeito do FGF-2 na migração dos transfectantes frente à laminina. As células foram submetidas a haptotaxia em laminina por 2 horas na presença ou ausência de 5 ng/mL de FGF-2, em ensaios de migração usando-se câmaras modificadas de Boyden. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata, de ensaio representativo de pelo menos 3 ensaios independentes.

Figura 13. A adição de FGF-2 exógeno não aumenta a capacidade migratória de células depletadas de glicosfingolípídios frente à laminina. Células previamente tratadas com PPPP foram submetidas a ensaio de haptotaxia em câmaras de Boyden modificadas (agente haptotático utilizado, laminina-1) por 2 horas, na presença ou ausência de 5 ng/mL de FGF-2. Barras representam média e desvio padrão de ensaio representativo de dois ensaios independentes.

4.3. Morte celular

4.3.1. Sensibilidade à morte induzida por cisplatina em linhagens não-tumorigênicas e tumorigênicas

Células melan-a e linhagens tumorigênicas, Tm1 e Tm5, foram incubadas com concentrações crescentes de cisplatina (5, 25 e 50 μ M) por 24 horas. A morte celular foi então avaliada pela população hipodiplóide, medida após incorporação de iodeto de propídio por citometria. Como mostrado na Fig. 14A, as células não tumorigênicas foram mais sensíveis à cisplatina do que as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5.

Figura 14A. Células melan-a são mais sensíveis à morte induzida por cisplatina do que linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5. As células foram incubadas por 24 horas na presença de 5, 25 e 50 μ M de cisplatina. A avaliação da morte celular foi feita após incubação das células com iodeto de propídio. Cada ponto representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata.

4.3.2. G_{D3} modula morte celular induzida por diferentes quimioterápicos

4.3.2.1. Sensibilidade a estaurosporina

Os transfectantes derivados de melan-a, expressando ou não dissialogangliosídeos foram avaliados quanto à sensibilidade frente a diversos indutores de morte celular. Estaurosporina foi utilizada como indutor de morte não relacionada a agravo genotóxico direto. Em ensaios iniciais, o processo de morte foi avaliado pela dissipação do potencial transmitocondrial, usando-se o fluorocromo JC-1. Nestes ensaios foi observado que células G_{D3}^{+} eram mais sensíveis à morte induzida por estaurosporina (dados não mostrados). Na Fig. 14B, está representado ensaio onde se avaliou a população de células hipodiplóides após o tratamento de transfectantes derivados de melan-a com estaurosporina. As células foram tratadas por 3 horas, já que esse tempo foi suficiente para que se observassem alterações microscópicas associadas à morte celular. Células G_{D3}^{+} foram mais sensíveis à morte celular induzida por estaurosporina no intervalo citado acima que as células G_{D3}^{-} .

Figura 14B. Células G_{D3}^{+} são mais sensíveis à morte induzida por estaurosporina. As células foram incubadas por 3 horas na presença de 200nM de estaurosporina. A avaliação da morte foi feita por iodeto de propídio, e as células hipodiplóides foram quantificadas. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata e analisado estatisticamente por ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Ensaio representativo de 3 ensaios independentes.

4.3.2.2. Sensibilidade à cisplatina

Utilizamos diferentes concentrações de cisplatina (25, 50 e 100 μ M) por 24 e 48 horas. Analisamos a razão do número de células tratadas sobre o controle e vimos que após 48 horas de tratamento quase não há células sem G_{D3} viáveis (dados não mostrados), sugerindo que é um tempo longo de tratamento, em que possíveis diferenças na sensibilidade entre as células poderiam não ser percebidas. Após 24 horas de tratamento, mostramos que há diferença quanto à sensibilidade das células à maior concentração (100 μ M) de cisplatina, indicando que células G_{D3}^{+} são mais sensíveis à morte induzida por cisplatina (Fig.15). Nestas condições, o efeito citotóxico de cisplatina foi determinado avaliando-se a fração de células hipodiplóides

presentes na população dos transfectantes de melan-a. Como mostrado na Fig. 16, o tratamento por 24 horas com cisplatina foi eficiente na indução de morte celular de 10-30% nos diferentes clones; células G_{D3}^{+} foram mais sensíveis à morte induzida por cisplatina. Esta noção foi confirmada avaliando-se a perda de integridade da membrana plasmática, como mostrado na Fig. 18.

A depleção de glicoesfingolípídios usando PPPP não apresentou efeito significativo quanto à sensibilidade das células à cisplatina, avaliando-se o processo de morte celular quer pela fração de células hipodiplóides (Fig. 17), quer pela perda de integridade da membrana plasmática (Fig. 18).

Figura 15. Células G_{D3}^{+} são mais sensíveis à morte induzida por cisplatina do que células G_{D3}^{-} . As células foram incubadas por 24 horas na presença de $100\mu M$ de cisplatina, após o término do ensaio o número de células viáveis (Nf) foi determinado. A razão entre o número de células viáveis ao final do ensaio e o número de células inicialmente plaqueado (Nf/Ni) é uma medida da fração de células resistentes ao tratamento. A avaliação da morte celular foi feita com MTT e foi feita a conversão da absorbância em número de células.

Figura 16. Células G_{D3}^{+} são mais sensíveis à morte induzida por cisplatina do que células G_{D3}^{-} . As células foram incubadas por 24 horas na presença de $100\mu\text{M}$ de cisplatina. A avaliação da morte celular foi feita determinando-se a fração de células hipodiplóides por citometria de fluxo, usando-se iodeto de propídio como fluoróforo. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata, e os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Ensaio representativo de 7 ensaios independentes.

Figura 17. Depleção de glicosfingolipídios com PPPP não sensibiliza as células ao tratamento com cisplatina. As células foram incubadas por 24 horas na presença de $100\mu\text{M}$ de cisplatina. A avaliação da morte celular foi feita com iodeto de propídio e a quantidade de células hipodiplóides foi colocada no gráfico. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata e os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Ensaio representativo de 4 ensaios independentes.

Figura 18. Células $G_{M3}^-G_{D3}^-$ são mais resistentes à morte induzida por cisplatina. As células foram incubadas por 24 horas na presença de $100\mu M$ de cisplatina. A avaliação da morte celular foi feita determinando-se a integridade da membrana plasmática, por exclusão de iodeto de propídio. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata e os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Ensaio representativo de 2 ensaios independentes.

4.3.2.3. Sensibilidade a temozolamida

Avaliou-se a sensibilidade dos diferentes clones frente a diferentes concentrações de temozolamida [0 ; $60\mu g/mL$], ao longo do tempo [3-5 dias]. A avaliação de quimiosensibilidade foi feita usando-se o ensaio MTT. Os valores obtidos foram convertidos em número de células depois de realizada curva de calibração com números conhecidos de células.

A avaliação das curvas de crescimento das diferentes células mostrou que o número de células viáveis ao final de cinco dias é semelhante nos grupos de transfectantes (Fig. 19), contudo as células G_{D3}^+ permanecem viáveis, acumulando-se nas fases S/ G_2 /M (dado não mostrado).

Utilizamos então a concentração intermediária de temozolamida (30 $\mu\text{g/mL}$) para avaliar os parâmetros de progressão das células ao longo do ciclo celular. Estes ensaios foram feitos pelo intervalo de 3-5 dias, tendo sido avaliado o conteúdo de DNA, usando-se iodeto de propídio como fluoróforo. Enquanto que nas células que não expressam G_{D3} houve um acúmulo progressivo de células hipodiplóides, as células G_{D3}^{+} não apresentaram variação significativa na fração de células hipodiplóides (Fig. 20a). Assim, o efeito citotóxico de temozolamida é mais pronunciado em células G_{D3}^{-} do que em células G_{D3}^{+} .

Avaliamos a sensibilidade à morte induzida por temozolamida após depleção de glicosfingolipídios, tratando as células com inibidores da glucosilceramida sintase. A figura 20b confirma resultados anteriormente encontrados em que células G_{D3}^{-} são mais sensíveis à morte induzida por temozolamida. Além disso, aqui mostramos que não há efeito de PPPP na sensibilidade das células à morte celular induzida por temozolamida. Ensaio semelhante também foi realizado por MTT, o que também não mostrou diferença após tratamento com PPPP. Esse resultado foi confirmado em ensaios independentes realizados por mais duas vezes, com a PC.C3 e outros dois clones transfectados, ST8.C11 e ST8.C17.

Figura 19. O efeito citostático de temozolamida independe do perfil de gangliosídeos dos transfectantes de melan-a. As células foram tratadas com 30 μ g/mL de temozolamida por 3, 4 e 5 dias. Avaliou-se o número de células metabolicamente ativas através do método de MTT. A densidade óptica obtida foi convertida em número de células. Cada ponto representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em quaduplicata. * $p < 0,05$ para análise estatística por ANOVA com pós-teste de Bonferroni. EtOH: 0,1% de etanol; ctl: controle; tmz: temozolamida.

Figura 20. Células G_{D3}^+ são mais resistentes à morte induzida por temozolamida. As células foram tratadas com 30 μ g/mL de temozolamida por 3, 4 e 5 dias e a morte celular foi avaliada por PI. Cada ponto representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata. * $p < 0,05$ para análise estatística por ANOVA com pós-teste de Bonferroni. EtOH: 0,1% de etanol; ctl: controle; tmz: temozolamida.

4.3.2.4. Sensibilidade a vimblastina

Outros estudos utilizando PPPP também têm demonstrado aumento da sensibilidade do tumor a outras drogas, como vincristina⁵⁹. Vincristina e vimblastina são drogas que inibem a polimerização do citoesqueleto de tubulina, o que leva as células à morte. Estudamos o possível efeito modulador que gangliosídeos teriam na morte induzida por vimblastina. Para isso, primeiramente incubamos as células com diferentes concentrações de vimblastina por 24 horas e a morte celular foi avaliada por iodeto de propídio. Como mostrado na Fig. 21a, a presença de G_{D3} sensibilizou as células frente a essa droga desde a menor concentração utilizada, de 10nM. Como a hipótese é avaliar a sensibilização das células frente a essa droga, doses menores foram testadas a fim de observarmos possíveis diferenças, e observamos que a concentração de 5nM já induzia morte celular, sendo que células ST8.C17 ($12,1 \pm 0,9\%$) continuaram sendo mais sensíveis que células PC.C1 ($8,1 \pm 0,3\%$), como mostrado na Fig. 21b.

Ensaio realizado com células previamente tratadas com PPPP mostraram que a depleção de glicosíngolipídios não é um fator quimiossensibilizante frente a vimblastina. Ensaio tem mostrado que as células G_{D3}^+ , que são mais sensíveis a morte do que células G_{D3}^- , após tratamento com PPPP perdem essa sensibilidade antes verificada (Fig. 22).

Figura 21. Células G_{D3}^+ são mais sensíveis à morte induzida por vincristina. Células foram incubadas com 20, 50 e 100nM (A) ou 2,5; 5 ou 10nM de vincristina (B) por 24 horas e a morte celular foi avaliada por PI. Células G_{D3}^- : PC.C1 e PC.C3 (linhas em azul); células G_{D3}^+ : ST8.C11 e ST8.C17 (linhas em verde). Cada ponto representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata. * $p<0,05$ para análise estatística por ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

Figura 22. Células ST8.C17 tratadas com PPPP são mais resistentes à morte induzida por vincristina. As células foram tratadas com 10nM de vincristina após inibição da expressão de G_{D3} com PPPP ou 5nM de vincristina após tratamento com d-PDMP. A morte celular foi avaliada por PI e a porcentagem de células hipodiplóides foi avaliada. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata. *p significativo para análise estatística por ANOVA com pós-teste de Bonferroni. EtOH: 0,1% de etanol.

4.3.3. Avaliação da morte induzida por cisplatina em linhagem de melanoma humano

Observamos que LB373Mel, uma linhagem de melanoma humano, expressa níveis de G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} (Fig. 23) e então estudamos essa linhagem para avaliar o papel de gangliosídeos na resposta destas células à ação da cisplatina.

Figura 23. Composição de gangliosídeos em células LB373Mel na superfície celular. A presença dos gangliosídeos G_{M3} e 9-O-acetil- G_{D3} na membrana de células LB373Mel foi analisada por citometria de fluxo com anticorpos específicos. Roxo: controle; verde: G_{D3} e rosa: 9-O-acetil- G_{D3} .

Primeiramente, estabelecemos melhor dose de cisplatina e avaliamos o processo de morte celular. A dose de $25\mu\text{M}$ foi estabelecida, e em seguida um estudo de cinética de tratamento, avaliado pelo aparecimento de fragmentação do DNA (fração de células hipodiplóides), permitiu definir a janela de tratamento (Fig. 24a). Em 24 horas de tratamento, observamos um aumento na fragmentação do DNA, mostrado com o alargamento da base correspondente à população G_0/G_1 (vermelho) em comparação ao controle (azul) na figura 24b, mas não houve uma população distinta em processo de morte. A figura 25 mostra a quantificação da população hipodiplóide e que

somente após 40 horas de tratamento houve diferença significativa no aumento da população H_0 . Contudo, após 24 horas de tratamento com cisplatina, houve alterações associadas a eventos ocorridos na apoptose, como despolarização da membrana da mitocôndria e exposição de fosfatidilserina. Avaliamos a despolarização da membrana da mitocôndria usando o fluorocromo JC1; a dissipação do potencial transmitocondrial que caracteriza o processo de morte celular é evidenciado pela diminuição da fluorescência vermelha do composto (leitura em FL2). A porcentagem de células no quadrante inferior esquerdo foi determinada. Com o tratamento, as células em processo de morte celular chegaram a 30,2% da população (Fig. 26)

Figura 24. Cisplatina induz aumento de células hipodiplóides após 40 horas de tratamento. As células LB373Mel foram incubadas por 16, 24, 40 e 48 horas na presença de 25 μ M de cisplatina. (A) A avaliação da morte celular foi feita com iodeto de propídio e a porcentagem de células hipodiplóides (M2) foi analisada. (B) Após 24 horas vemos alargamento da base do histograma de dispersão do conteúdo de DNA das células tratadas (vermelho) em comparação com o controle (azul).

A exposição de fosfatidilserina é um dos eventos precoces do processo de apoptose, observado em diferentes células. Células tratadas por 24 horas com cisplatina, foram incubadas com anexina V conjugada a FITC, e avaliadas quanto à intensidade de fluorescência em citometria de fluxo. A fluorescência FL1 mostra o aumento de células positivas para anexina V. O iodeto de propídio entra em células com alteração da permeabilidade da membrana plasmática, o que foi quantificado pela fluorescência FL3. Quando as células foram incubadas com cisplatina, houve aumento de células positivas para anexina V, além de haver aumento da população com iodeto de propídio positivas (Fig. 27a). As diferentes populações de células foram quantificadas (Fig. 27b). A exposição de PS é um dos eventos iniciais da apoptose, enquanto que a alteração da permeabilidade da membrana plasmática ocorre em processos tardios. A observação de que ambos eventos ocorreram em uma maior população indica que apesar de haver uma pequena proporção de células hipodiplóides após 24 horas, uma significativa fração das células está comprometida com o processo de morte celular.

Figura 25. Cisplatina induz aumento de células hipodiplóides após 40 horas de tratamento. As células LB373Mel foram incubadas por 24, 40 e 48 horas na presença de 25 μ M de cisplatina. A avaliação da morte celular foi feita com iodeto de propídio e a porcentagem de células hipodiplóides foi analisada. Cada ponto representa média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata.

Figura 26. O tratamento de LB373Mel com cisplatina induz a dissipação do potencial transmembranal após 24 h de tratamento. As células LB373Mel foram incubadas por 24 horas com 25 μ M de cisplatina e a morte celular foi avaliada por JC1. (A) A população de células no quadrante inferior direito corresponde às células em que houve dissipação do potencial transmembranal. (B) Avaliação da frequência de perda do potencial transmembranal. Cada barra corresponde à média $\pm$ desvio-padrão de ensaio realizado em triplicata.

Figura 27. Cisplatina induz apoptose em células LB373Mel medida pela exposição de fosfatidilserina e alteração da permeabilidade da membrana celular. Células LB373Mel foram incubadas com 25 μ M de cisplatina por 24 horas e avaliadas com anexinaV e iodeto de propídio. **(A)** O quadrante inferior direito mostra células anexina V positivas (apoptose), enquanto que o quadrante superior esquerdo mostra células positivas tanto para anexina V quanto para iodeto de propídio (fases tardias de apoptose ou oncose). **(B)** À direita vemos os valores quantificados em todas situações. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão da porcentagem de células positivas para anexinaV e/ou iodeto de propídio.

Para verificar se a composição de glicoesfingolipídios alteraria a sensibilidade à morte, tratamos as células LB373Mel com PPPP. Em seguida, avaliamos a morte celular por incorporação de iodeto de propídio após tratamento das células por 40 horas com cisplatina. A figura 28 mostra que quando as células são tratadas com PPPP, há um aumento na morte induzida por cisplatina.

Figura 28. Células LB373Mel depletadas de glicosfingolipídios são mais sensíveis à morte celular mediada por cisplatina. Células LB373Mel foram incubadas com 25 μ M de cisplatina por 40 horas e avaliadas com iodeto de propídio após tratamento com PPPP. Cada barra representa média $\pm$ desvio-padrão da porcentagem de células hipodiplóides de ensaio realizado em triplicata e foi analisado estatisticamente por teste *t* de Student.

5. DISCUSSÃO

Ao longo da progressão do melanoma, diferentes mecanismos moleculares ocorrem em um processo de múltiplas etapas, culminando no processo de transformação celular, gerando a célula cancerosa. Essa célula passa a ser independente de estímulos de proliferação, não responde a fatores inibitórios de proliferação, duplicando assim de maneira descontrolada. Além disso, mecanismos que levam a célula à morte se encontram desregulados na célula tumoral, favorecendo então o processo de sobrevivência celular em diferentes microambientes ¹⁷. Dentre as diferentes moléculas que participam do controle desses processos, glicoconjugados tem mostrado um papel importante na regulação desses mecanismos, podendo modular respostas de proliferação ou de morte celular ^{52,112}.

Temos explorado um sistema de progressão do melanoma murino, constituído de uma linhagem de melanócitos não-tumorigênica (melan-a) e duas linhagens tumorigênicas derivadas desta primeira (Tm1 e Tm5) ¹⁰⁸. Este sistema tem sido útil para caracterização de genes, produtos gênicos e estudos das características da interação da célula tumoral com elementos do microambiente tumoral associados à progressão do melanoma murino ^{35,108} (e em Anexo C). Por não ser tumorigênica quando injetada no tecido subcutâneo de animais singenéticos, melan-a poderia representar a etapa de lesões névicas ou melanoma em fase de crescimento radial, pelo fato de não

proliferar fora do extrato epidérmico. Tm1 e Tm5 representariam um modelo de melanoma em fase de crescimento vertical. Uma característica importante de células melan-a é sua dependência de fatores como o éster de forbol para sua proliferação. Ésteres de fórbol são estimuladores da atividade de PKC, por se assemelharem estruturalmente ao diacilglicerol ⁹³. A exposição continuada das células a estes ésteres, porém, leva a uma regulação negativa da transcrição das várias isoformas de PKC. Nestas condições, as células proliferam em cultura. Esta abordagem experimental interfere com vias de sinalização de receptores de fatores de crescimento, mantendo as células em estado proliferativo.

Com o objetivo de avaliar o perfil de resposta das células a diferentes fatores de crescimento exógenos, mantivemos as células privadas de ésteres de forbol, e avaliamos qual ou quais fatores de crescimento poderiam induzir a proliferação de melan-a e seus derivados tumorigênicos. Mostramos que células melan-a são estimuladas por fatores de crescimento exógenos, como FGF-1 e FGF-2, mas não por EGF ou ainda IL-6 (dado não mostrado). Estes dados estão de acordo com a noção estabelecida na literatura de que a proliferação e sobrevivência de células de origem melanocítica são dependentes de fatores como FGF ¹⁹ (em Anexo B). Sabe-se que melanócitos humanos não expressam receptores para EGF, embora a expressão deste receptor possa existir em células de melanoma ¹¹³. No caso do modelo que estudamos, EGF não interferiu na proliferação de melan-a e de suas contrapartes tumorigênicas. Por outro lado, mostramos que linhagens tumorigênicas, como a Tm1, não são dependentes de PMA

para sua proliferação, e crescem independentemente da adição exógena de fatores de crescimento. Ao longo da progressão do melanoma, as células perdem a dependência de estímulos mitogênicos ^{113,114}. Além disso, essas células mantêm os níveis de proliferação maior do que as células não transformadas, inclusive na ausência de estímulos mitogênicos, já que células tumorigênicas perdem o controle da proliferação celular ¹⁷. Mecanismos moleculares associados a esta independência de fatores extracelulares para proliferação incluem ativação constitutiva de BRAF, perda de expressão ou mutações na fosfatase PTEN ou amplificação gênica e ativação de AKT ¹. A avaliação do proteoma das linhagens tumorigênicas mostrou um acúmulo de proteínas ativadoras das vias a jusante da ativação de receptores de fatores de crescimento, como galectina-1, por exemplo; e diminuição da proteína ligante de fosfoetanolamina, um controlador negativo da proliferação celular ³⁵ (em Anexo C).

A regulação do ciclo celular é feita por diferentes moléculas ao longo das transições entre as fases do ciclo. Verificamos que as linhagens tumorigênicas têm maior expressão de ciclinas do tipo D (D₁, D₂ e D₃) quando comparadas com as células melan-a. Essas ciclinas são estimuladas em resposta a presença de fatores de crescimento e estimulam a transição das fases G₁ e S do ciclo celular. Esse dado mostra que células Tm1 estão em constante processo de proliferação induzidos por ciclinas D. Essas ciclinas não foram moduladas transcritionalmente quando houve o estímulo de proliferação das células melan-a por FGF-1 e FGF-2. É possível que o controle de proliferação se dê não pela síntese de novo de ciclinas D, como

avaliado nos ensaios de proteção de Rnase, mas sim pelo aumento da estabilidade das mensagens destas ciclinas. Estes dados serviram em parte para a validação dos achados da análise SAGE destas mesmas células ³⁵ (em Anexo C). Em conjunto estes dados mostram que a progressão de melan-a para Tm1, que modela a conversão de uma lesão melanocítica não tumorigênica ou um melanoma em fase de crescimento radial para um melanoma em fase de crescimento vertical é caracterizada por uma ativação ou autonomia de crescimento associada às vias de sinalização dependentes de FGF.

Recentemente, vários trabalhos têm mostrado que a atividade mitogênica de diferentes fatores de crescimento dependem da composição de glicosfingolípídios presentes na membrana plasmática ⁷⁸. O grupo de Li et al ⁷⁸ mostrou que a adição de G_{D3} exógeno a fibroblastos estimula a proliferação induzida por EGF, FGF e PDGF. Outros dissialogangliosídeos também parecem modular essa via, como mostrado usando-se G_{D1a} ^{78,115}. A função destes fatores de crescimento depende da necessária aproximação física de duas moléculas do receptor cognato no plano da membrana plasmática ¹¹⁶. A composição de glicosfingolípídios de uma célula poderia interferir na eficiência deste processo de aproximação, ou ainda recrutamento de diferentes moléculas envolvidas com sinalização celular para microdomínios específicos da membrana plasmática. A existência destes microdomínios especializados da membrana plasmática tem sido amplamente discutida na literatura. Atualmente há evidências bastante consistentes de que glicosfingolípídios são necessários para a estruturação

de balsas lipídicas onde receptores e moléculas sinalizadoras coexistem. Alterações na composição dos gangliosídeos podem assim alterar a dinâmica de formação destas estruturas, interferindo com o processo de sinalização celular^{117,118}.

Sabemos que na progressão do melanoma existe o acúmulo de dissialogangliosídeos como G_{D3} e seus derivados. Neste trabalho, exploramos se esse acúmulo está de alguma forma envolvida com alguma vantagem proliferativa que as células tumorais passam a adquirir. Para isso, transfectamos o gene da enzima G_{D3} -sintase, que converte G_{M3} em G_{D3} em linhagem de melanócito. Após estímulos mitogênicos com FGF-1 e FGF-2, mostramos que as células transfectadas são estimuladas a proliferação, assim como sua célula parental. Esse estímulo foi verificado em células que expressam ou não G_{D3} , o que indica que esses gangliosídeos não modulam a resposta proliferativa nesse modelo, sugerindo que não há vantagem de proliferação nas células que expressam G_{D3} . Nesse trabalho também verificamos que o estímulo por FGF-2 não induziu a expressão de ciclinas.

Estendemos a análise então a uma abordagem complementar, isto é, a inibição da biossíntese de glicosfingolipídios, usando o inibidor de uma enzima chave para sua formação, a glucosilceramida-sintase. O inibidor utilizado foi PPPP, que se caracteriza por inibir a atividade enzimática, sem no entanto alterar com o padrão de expressão de ceramida intracelular⁵³. Esta característica deste inibidor é importante pelo potencial sinalizador de ceramida intracelular, associada, por exemplo, ao processo de morte celular. Mostramos que os diversos transfectantes de melan-a mantinham seu

padrão de resposta proliferativa a FGF-1 e FGF-2, mesmo quando seus glicosfingolipídios eram depletados. Estes resultados contrastam com o que foi encontrado no tratamento de células como fibroblastos, usando uma abordagem semelhante à nossa ⁷⁸. Como se trata de um efeito modulatório que glicosfingolipídios exercem sobre a sinalização de fatores de crescimento, uma possibilidade é que a cinética de ativação tenha sido alterada, sem no entanto alterar o resultado final, isto é a ativação da transição G₁/S. Abordagens experimentais para avaliar esta possibilidade incluiriam estudos da cinética da autofosforilação do receptor de FGF em células modificadas como aquelas que geramos genética ou metabolicamente. A implicação final, porém, é que neste modelo, a interferência de gangliosídios e outros glicosfingolipídios não é significativa a ponto de gerar-se um alvo para controle da proliferação celular propriamente dita. De fato, mostramos também que a presença de G_{D3} não foi suficiente para conferir uma vantagem proliferativa em termos de tempo de duplicação.

Contudo, a taxa de duplicação ou resposta proliferativa a fatores de crescimento não são as únicas vantagens associadas ao aumento do número de células em uma população de células tumorais. G_{D3} parece favorecer sobrevida de linhagem de queratinócito que expressam gangliosídios, pois foram mais resistentes à deprivação de soro, sugerindo que os gangliosídios podem estar atuando na sobrevivência celular ¹¹⁹. A linhagem melan-a requer fatores externos, como o PMA, para crescerem. Após a transfecção e expressão de G_{D3} e seus derivados, elas continuaram

dependendo de PMA para proliferação. Após 3 dias mantidas na ausência de PMA, as células param em fases G_0/G_1 do ciclo celular. Essa parada é revertida após estímulos como fatores de crescimento, FGF-1 e FGF-2. Contudo, experimentos em que deixamos as células por tempos mais longos na ausência de PMA (por exemplo, 5 dias) mostraram que células G_{D3}^- , assim como a célula parental, morrem, enquanto que células que passaram a expressar G_{D3} se mantêm paradas nas fases G_0/G_1 do ciclo celular. Embora, cultivo por tempos ainda mais prolongados levem ambos os transfectantes à morte, a clonogenicidade de células que expressam G_{D3} é significativamente maior do que a de células que não o expressa. Dados iniciais mostram que a depleção de glicosfingolipídios não interfere com a capacidade de sobrevivência (dados não mostrados). Este aparente paradoxo sugere que a expressão do dissialogangliosídeo seria um marcador de um estado de sobrevivência. Estes dados são compatíveis com a noção de que há um progressivo acúmulo de G_{D3} ao longo da progressão tumoral, que culmina no aparecimento de células capazes de sobreviverem em tecidos muito diferentes dos seus tecidos de origem.

FGF não apresenta porém somente capacidade mitogênica. A interação de FGF e seus receptores também induzem um comportamento migratório em muitas células. Os transfectantes utilizados neste estudo foram avaliados quanto a sua atividade migratória na presença de FGF-2. Observamos que FGF-2 tem atividade motogênica em células $G_{M3}^+G_{D3}^-$ e em células $G_{M3}^+G_{D3}^+$. O estímulo motogênico de FGF-2, porém, depende dos glicosfingolipídios presentes na célula, uma vez que quando depletadas

com PPPP, as células não mais respondem a FGF-2. Em conjunto, os dados de proliferação e migração celular sugerem que a formação de complexos como dímeros do receptor de FGF ocorrem de maneira independente dos glicosfingolipídios, mas que o recrutamento de elementos a jusante desta via relacionados com a resposta migratória, mas não a resposta proliferativa, depende da presença destas moléculas na membrana plasmática de transfectantes de melan-a.

Uma linha de resultados bastante intrigante têm aparecido na literatura nos últimos oito anos. Diversas evidências experimentais têm mostrado o envolvimento de G_{D3} no processo de morte celular associado à ativação de caspases (apoptose) ^{52,84,110,120}. O fato de que células tumorais acumulam um gangliosídeo apoptogênico sugere que estas células tenham desenvolvido mecanismos de resistência a ação indutora de morte do gangliosídeo; por exemplo, convertendo-o em um gangliosídeo desprovido desta ação ^{110,121}; ou ainda, compartimentalizando a molécula de maneira que não haja a interação produtiva dos sinais de morte celular ³⁹.

O desenvolvimento de mecanismos de resistência a apoptose por si só é um achado freqüente em diferentes tumores, e tem implicações práticas quanto ao desenvolvimento de quimiorresistência. Exemplos bem estudados dos mecanismos associados à quimiorresistência em tumores incluem mutações em *P53* e acúmulo de proteínas da família de MDR, que atuam na extrusão de xenobióticos. Apesar de G_{D3} ser apoptogênico, seu derivado 9-O-acetil- G_{D3} não o é ¹¹⁰. O processo de O-acetilação é muito freqüente em células em cultura transfectadas com o gene ST8Sial ¹²²⁻¹²⁴. Este fenômeno

foi observado nos transfectantes gerados neste trabalho. G_{M3} , molécula precursora de G_{D3} , pode também dar origem a G_{M2} , através da ação da G_{M2}/G_{D2} -sintase. Dados de nosso laboratório têm mostrado que G_{M2} confere relativa resistência à morte induzida por estaurosporina no mesmo modelo que avaliamos aqui (L. N. S Andrade, A. H. Otake e R. Chammas, dados não publicados). Ainda, como a ação de G_{D3} parece estar relacionada à liberação de citocromo c da mitocôndria, mecanismos de resistência associados ao silenciamento ou perda de expressão de genes a jusante desta via de indução de morte (por exemplo, perda da expressão de APAF-1) poderiam justificar a resistência à morte celular mesmo na presença do gangliosídeo apoptogênico.

Um fato que é relativamente pouco lembrado, talvez pela sua dificuldade de abordagem experimental, é a distribuição topográfica de G_{D3} . Logo após sua síntese, o gangliosídeo é segregado na membrana plasmática. Os dados referentes a seu efeito pró-apoptogênico estão associados ao seu transporte para mitocôndria^{36,86,125}. Como o gangliosídeo seria transportado da membrana para a mitocôndria? Não há ainda uma clara via intracelular que demonstre a possibilidade de trânsito entre estes compartimentos. Assim, é possível que o gangliosídeo seja endereçado para mitocôndria a partir de sua síntese no complexo de Golgi. Assim, sob determinado estímulo, o gangliosídeo sintetizado de novo seria transportado para mitocôndria. Os eventos moleculares para este transporte precisam ser esclarecidos. Dados iniciais, porém tem relacionado à resposta de estresse

do retículo, com acúmulo de calnexina, uma chaperona residente no retículo endoplasmático, com este processo ¹²⁵.

Para avaliarmos então o envolvimento de G_{D3} com o processo de morte celular, usamos a mesma estratégia utilizada no estudo da resposta proliferativa. Inicialmente comparamos o perfil de resposta biológica de melan-a, comparando-a com a resposta das linhagens tumorigênicas e depois avaliamos os transfectantes derivados de melan-a, utilizando drogas utilizadas como opção terapêutica no tratamento de melanomas.

Mostramos que células melan-a são mais sensíveis a morte induzida por cisplatina do que linhagens Tm1 ou Tm5. A morte induzida por cisplatina pode ser mediada por p53. Sequenciamento do gene *P53*, em melan-a e seus transfectantes, mostrou-nos que há uma mutação neste gene nesta linhagem (dados não mostrados); assim, os mecanismos de morte avaliados nas linhagens de camundongo são pelo menos em parte independentes de P53. No caso de cisplatina, por exemplo, ativação da quinase c-Abl, que fosforila p73, outro gene supressor de tumor, induz apoptose ¹²⁶.

Um trabalho mostrou que a adição de G_{D3} em células endoteliais aumenta a sensibilidade à morte das mesmas, sugerindo uma interação do dissialogangliosídeo com a mitocôndria, ativando vias de sinalização de morte ¹²⁷. Nossos ensaios mostraram que as células que sintetizam G_{D3} são mais sensíveis à morte celular induzida por estaurosporina, associada à mobilização de estoques de Ca²⁺ do retículo endoplasmático. Ainda, nossos dados mostraram que células de melanócitos que passam a expressar G_{D3} são mais sensíveis à morte induzida por cisplatina e vimblastina. Assim, a

expressão *per se* de G_{D3} não induz morte celular em melan-a, mas em condições onde vias de ativação de morte celular são evocadas, como nos tratamentos com estaurosporina, cisplatina e vimblastina, a expressão constitutiva do gene da sialiltransferase sensibiliza as células à morte celular.

Com o objetivo de avaliar se a presença do dissialogangliosídeo é necessária para a ativação das vias de morte celular, células foram tratadas com o inibidor da glucosilceramida-sintase, para depleção dos glicosfingolipídios. A inibição da glucosilceramida-sintase, seja com o uso de inibidores, como o PPPP, ou por inibição gênica, retarda a formação de melanomas, sem no entanto alterar a taxa de proliferação dessas células^{50,79}. Se a taxa de proliferação parece permanecer a mesma nas células em que a formação do tumor está retardada, talvez a taxa de morte dessas esteja aumentada. Especula-se que, com o a inibição da glucosilceramida-sintase, haja acúmulo do precursor dos glicosfingolipídios, a ceramida. Esta é conhecida como indutora de processos de morte. A atividade da glucosilceramida-sintase encontra-se freqüentemente aumentada em tumores quimiorresistentes. Este é um mecanismo eficiente para manutenção de baixos níveis intracelulares de ceramida^{30,128}. O tratamento de células com inibidores de glucosilceramida-sintase, como o PDMP e imino-açúcares, leva a quimiossensibilização frente a algumas drogas, associada ao aumento de ceramida^{30,129}. PPPP foi escolhido por não alterar os níveis intracelulares de ceramida⁵³, para que assim pudessemos avaliar

o papel dos glicosfingolipídios no processo de morte, e não o de seu precursor.

Cisplatina leva as células à parada de ciclo e conseqüente morte celular. Contudo, as células do melanoma adquirem resistência ao tratamento (^{95,130} e anexo D). Nós mostramos que células G_{D3}^{+} apresentaram maior sensibilidade à cisplatina. Como células transfectadas foram selecionadas após constante pressão seletiva com o antibiótico G418, isso poderia estar acionando outros mecanismos de resistência, independente do conteúdo de glicosfingolipídios. As células foram selecionadas com altas doses de geneticina (1,6mg/mL) e mantidas com 0,8mg/mL. Esse antibiótico que leva as células a apoptose por processos ainda não muito bem esclarecidos ¹³¹. Dessa forma as células vão sendo progressivamente selecionadas, e outros mecanismos de resistência podem estar sendo ativados. Assim, a quimiorresistência dessas células pela modulação de gangliosídios pode estar sendo influenciada por essa resistência adquirida ao longo do processo de seleção clonal, que envolve eventos epigenéticos como proposto por Rubin ¹³².

Nós mostramos que a morte celular induzida por cisplatina independe da presença dos glicosfingolipídios, uma vez que não houve alteração no padrão da resposta de sensibilidade a cisplatina das células G_{D3}^{+} . Resultados semelhantes foram observados quando tratamos as células com estaurosporina (dados não mostrados). Uma possível explicação para a manutenção do estado de sensibilização dos transfectantes recai sobre o controle de expressão gênica que ceramidas poderiam exercer. Não

avaliamos aqui o nível de ceramida endógena. Com a expressão de enzimas que modificam glicoesfingolípídios, é possível que a ceramida disponível para sinalização de transcrição ou modulação funcional de Pgp ou MDR ³⁰ esteja em níveis mais baixos, quando comparamos com os transfectantes controle. Assim, a capacidade de extrusão das drogas em células que expressam G_{D3} poderia ser diferente daquela dos transfectantes controle, o que poderia explicar a sensibilidade aumentada frente às drogas. Em relação aos ensaios de depleção de glicoesfingolípídios, estes ensaios usualmente eram realizados ao longo de 4 dias (três nos quais as células eram depletadas, seguida de tratamento por até um dia com os quimioterápicos na presença de PPPP). Embora este período seja usualmente suficiente para reversão de efeitos transcricionais e que dependam da presença dos gangliosídeos propriamente ditos, efeitos mais complexos, como efeitos epigenéticos não são necessariamente revertidos em períodos de poucos dias. Isto poderia explicar a não-reversão da sensibilidade aumentada das células positivas para G_{D3} em relação à morte induzida por cisplatina e estaurosporina.

Os efeitos observados em relação à cisplatina, porém não foram estendidos para a linhagem humana, LB373-Mel, que expressa dissialogangliosídeos endógenos e não foi submetida a pressões de seleção com antibióticos como geneticina, por exemplo. Esta linhagem se mostrou sensível à cisplatina e foi possível torná-la ainda mais sensível à droga após a depleção dos glicoesfingolípídios. Este achado reforça a necessidade de

se avaliar os possíveis mecanismos de indução de morte e quimiorresistência.

A sensibilidade das células a vimblastina depende da presença dos glicosfingolipídios, uma vez que ela foi revertida em células tratadas com PPPP. Assim, a expressão de G_{D3} não é somente um marcador da sensibilidade das células melan-a à morte induzida por vimblastina, mas poderia ser de fato um modulador da sinalização deste processo.

A associação entre a ausência de glicosfingolipídios e a resistência à morte induzida por vimblastina nestas células se correlaciona com achados recentes que mostram que a redistribuição de microdomínios enriquecidos em colesterol e glicosfingolipídios, como por exemplo as caveolas, depende de microtúbulos ^{133,134}. É possível que a compartimentalização de gangliosídios como G_{D3} para a membrana plasmática dependa também da integridade do sistema de microtúbulos. Com o tratamento com vimblastina, alterações neste citoesqueleto poderiam levar vesículas de gangliosídios para organelas residentes no centro de organização dos microtúbulos, como as mitocôndrias.

Outro agente alquilante usado no nosso trabalho foi a temozolamida. Trabalhos relatam que células tratadas com temozolamida acumulam nas fases S, G_2 e M do ciclo celular ¹³⁵. Isso também ocorreu nos nossos experimentos. Mais do que isso, células que expressam G_{D3} tendem a acumular mais nessas fases. Além disso, mostramos que essas células são mais resistentes a morte induzida por temozolamida. Isso corrobora dados de que células de melanoma que expressam G_{D3} e derivados são mais

resistentes a tratamentos com essa droga. No entanto, quando tratamos as células com inibidores da glucosilceramida-sintase (GCS), vimos que as células não apresentaram respostas diferentes após a indução da morte com temozolamida. Isso reforça ainda mais a idéia de que as células transfectadas foram sendo selecionadas ao longo de sua manutenção em cultura. Além disso, isso sugere que glicosfingolipídios, como G_{D3} podem interferir diferencialmente no processo de morte celular, dependendo dos mecanismos indutores deste processo. A ausência de sensibilização por inibição metabólica ou genética da glucosilceramida-sintase foi relatada em relação a outras drogas, como adriamicina, por exemplo ¹³⁶. Pode ser ainda que no nosso modelo não exista uma atividade de outros glicosfingolipídios na sensibilidade a morte induzida por temozolamida ou por vimblastina. Outros inibidores da glucosilceramida-sintase também têm sido alvo de pesquisa *in vivo*, como N-butildeoxinojirimicina (NB-DNJ), que tem mostrado reduzir a atividade da glucosilceramida em 70%, além de reduzir a tumorigênese *in vivo* ⁵⁶. Estudos preliminares de nosso grupo têm mostrado que esse inibidor não modula a indução a morte por esses quimioterápicos.

O que nos parece claro é que a expressão de G_{D3} em melanócitos modula diferencialmente a resposta a quimioterápicos. Células que passam a expressar G_{D3} são mais sensíveis a morte induzida por estaurosporina, vimblastina e cisplatina. Estas drogas têm mecanismos de ação diferentes, porém, G_{D3} parece alterar essas respostas. Por outro lado, células que passam a expressar G_{D3} passam a ser mais resistentes ao tratamento com drogas como temozolamida, cujos mecanismos de indução de morte são

semelhantes ao de cisplatina. Dessa forma, nessa abordagem, esse dissialogangliosídeo parece modular mecanismos de sobrevivência celular específicos. É importante mencionar que as células tratadas com diferentes quimioterápicos vão sendo aos poucos selecionadas (Figura 29). Células mais resistentes aos tratamentos convencionais vão sendo geradas e assim dificultando o tratamento dos tumores. Entender como as vias de seleção funcionam e, fundamentalmente, o desenho de potenciais drogas quimiossensibilizantes é de grande importância para instituírem-se terapias mais efetivas, que nos permitam no futuro controlar o crescimento e a expansão do tumor.

Figura 29. Processo de seleção das células tumorigênicas resistentes a tratamentos convencionais. A massa tumoral é tratada com a droga hipotética 1. Após alguns meses, células resistentes a essa droga repopulam e formam uma nova massa tumoral. A compreensão dos mecanismos de resistência nos leva a tratamentos combinados, atingindo células resistentes a diferentes tratamentos. Alvos como a glucosilceramida-sintase são potenciais alvos de interesse para manipulação farmacológica. Como mostramos neste trabalho, sua eficiência dependerá dos mecanismos de ação dos quimioterápicos utilizados e das vias de transformação celular ativadas em um dado tumor.

6. CONCLUSÕES

1. A comparação sistemática entre a linhagem não tumorigênica melan-a e as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5, derivadas da primeira, indicam que a progressão deste modelo se caracterizou pelo ganho de autonomia de proliferação celular. Enquanto a linhagem normal é dependente de FGF-1 e FGF-2, a proliferação das linhagens tumorais é independente destes fatores.
2. O remodelamento de gangliosídios na linhagem melan-a, com superexpressão do dissialogangliosídio associado a tumor G_{D3} , não levou a vantagem proliferativa ou facilitação da resposta mitogênica de FGF-2, contudo G_{D3} mostrou-se relacionado à sobrevivência das células transfectadas. O remodelamento de glicosfingolipídios levou à perda da resposta migratória dependente de FGF-2. Assim, a interferência de gangliosídios se dá na transdução dos sinais deflagrados pela interação fator de crescimento e seu receptor, interferindo diferencialmente nas respostas celulares ao fator de crescimento exógeno.
3. A expressão do dissialogangliosídio G_{D3} conferiu sensibilidade à morte celular induzida por estaurosporina, e pelos quimioterápicos cisplatina e vimblastina; e, resistência a temozolomida. Inibição da biossíntese de glicosfingolipídios reverteu somente o padrão de morte induzida por vimblastina, sugerindo que G_{D3} seja um dos efetores do mecanismo de morte induzido por esta droga.

4. O remodelamento dos glicosfingolipídios da linhagem de melanoma humano LB373Mel sensibilizou as células à morte induzida por cisplatina. Diferenças no comportamento de diferentes linhagens como as utilizadas neste trabalho podem ser atribuídas a diferentes vias de transformação e seleção sofrida pelas células tumorais ao longo da progressão tumoral.

7. REFERÊNCIAS

1. Chudnovsky, Y., Khavari, P. A., and Adams, A. E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J.Clin.Invest*, 115: 813-824, 2005.
2. Henderson, B. E., Ross, R. K., and Pike, M. C. Toward the primary prevention of cancer. *Science*, 254: 1131-1138, 1991.
3. Houghton, A. N. and Polsky, D. Focus on melanoma. *Cancer Cell*, 2: 275-278, 2002.
4. Clark, W. H., Jr., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., and Van Horn, M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum.Pathol.*, 15: 1147-1165, 1984.
5. Clark, W. H. Tumour progression and the nature of cancer. *Br.J Cancer*, 64: 631-644, 1991.
6. de Wit, P. E. J., van Muijen, G. N. P., de Waal, R. N. W., and Ruiter, D. J. Pathology of malignant melanoma, including new markers and techniques in diagnosis and prognosis. *Curr.Op.Oncol.*, 8: 143-151, 1996.
7. Henderson, R. A. and Finn, O. J. Human tumor antigens are ready to fly. *Adv.Immunol.*, 62: 217-256, 1996.
8. Houghton, A. N., Herlyn, M., and Ferrone, S. Melanoma Antigens. *In* C. M. Balch, A. N. Houghton, G. W. Milton, A. J. Sober, and S. Soong (eds.), *Cutaneous Melanoma*, 2 ed, pp. 130-142. Pennsylvania: J.B. Lippincott Co., 1992.

9. Elder, D. Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. *Acta Oncol.*, 38: 535-547, 1999.
10. Li, G. and Herlyn, M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol.Med.Today*, 6: 163-169, 2000.
11. Hsu, M., Andl, T., Li, G., Meinkoth, J. L., and Herlyn, M. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J.Cell Sci.*, 113 (Pt 9): 1535-1542, 2000.
12. Chammas, R., Sonnenburg, J. L., Watson, N. E., Tai, T., Farquhar, M. G., Varki, N. M., and Varki, A. De-N-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. *Cancer Res*, 59: 1337-1346, 1999.
13. Xie, S., Luca, M., Huang, S., Gutman, M., Reich, R., Johnson, J. P., and Bar-Eli, M. Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res.*, 57: 2295-2303, 1997.
14. Iida, J., Pei, D., Kang, T., Simpson, M. A., Herlyn, M., Furcht, L. T., and McCarthy, J. B. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *J.Biol.Chem.*, 276: 18786-18794, 2001.
15. Dippold, W. G., Dienes, H. P., Knuth, A., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. Immunohistochemical localization of ganglioside GD3 in human malignant melanoma, epithelial tumors and normal tissues. *Cancer Res.*, 45: 3699-3705, 1985.
16. Urmacher, C., Cordon-Cardo, C., and Houghton, A. N. Tissue distribution of GD3 ganglioside detected by mouse monoclonal antibody R24. *Am.J.Dermatol.*, 11: 577-581, 1989.

17. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
18. Halaban, R., Miglarese, M. R., Smicun, Y., and Puig, S. Melanomas, from the cell cycle point of view (Review). *Int.J Mol.Med.*, 1: 419-425, 1998.
19. Chammas R, Duarte APM, Otake AH, and Costa M Genética e Biologia Molecular do Melanoma e de sua Progressão. *In Oliveira Filho RS (ed.)*, Melanoma Cutâneo Localizado e Linfonodo Sentinela, pp. 1-19. São Paulo: Lemar, 2003.
20. Roussel, M. F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, 18: 5311-5317, 1999.
21. Powers, C. J., McLeskey, S. W., and Wellstein, A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr.Relat Cancer*, 7: 165-197, 2000.
22. Brose, M. S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Guerrero, R., Elnhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., Roth, J. A., Albelda, S. M., Davies, H., Cox, C., Brignell, G., Stephens, P., Futreal, P. A., Wooster, R., Stratton, M. R., and Weber, B. L. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.*, 62: 6997-7000, 2002.
23. Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M., and Hazan, R. B. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell*, 2: 301-314, 2002.
24. Guimaraes, C. A., Benchimol, M., Amarante-Mendes, G. P., and Linden, R. Alternative programs of cell death in developing retinal tissue. *J.Biol.Chem.*, 278: 41938-41946, 2003.
25. Igney, F. H. and Krammer, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 277-288, 2002.

26. Stahl, J. M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N. R., Shanmugam, S., and Robertson, G. P. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.*, 63: 2881-2890, 2003.
27. Robertson, G. P. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.*, 24: 273-285, 2005.
28. Soengas, M. S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S. W. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409: 207-211, 2001.
29. Saida, T. Recent advances in melanoma research. *J.Dermatol.Sci.*, 26: 1-13, 2001.
30. Gouaze, V., Liu, Y. Y., Prickett, C. S., Yu, J. Y., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Res.*, 65: 3861-3867, 2005.
31. Lavie, Y., Cao, H., Bursten, S. L., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 271: 19530-19536, 1996.
32. Giglia-Mari, G. and Sarasin, A. TP53 mutations in human skin cancers. *Hum.Mutat.*, 21: 217-228, 2003.
33. Whiteman, D. C., Parsons, P. G., and Green, A. C. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *Int.J.Cancer*, 77: 843-848, 1998.
34. Bernard, K., Litman, E., Fitzpatrick, J. L., Shellman, Y. G., Argast, G., Polvinen, K., Everett, A. D., Fukasawa, K., Norris, D. A., Ahn, N.

- G., and Resing, K. A. Functional proteomic analysis of melanoma progression. *Cancer Res.*, 63: 6716-6725, 2003.
35. Gustavo A.de Souza, Lyris M.F.Godoy, Verônica R.Teixeira, Andréia H.Otake, Adão Sabino, José C.Rosa, Anemari R.Dinarte, Daniel G.Pinheiro, Wilson A.Silva Jr., Marcos N.Eberlin, Roger Chammas, and Lewis J.Green. Proteomic and SAGE analysis of melanoma progression. *Proteomics* . 2005, no prelo.
 36. Tomassini, B. and Testi, R. Mitochondria as sensors of sphingolipids. *Biochimie.*, 84: 123-129, 2002.
 37. Morales, A., Colell, A., Mari, M., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J. C. Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease. *Glycoconj.J.*, 20: 579-588, 2004.
 38. Svennerholm, L. Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J.Neurochem.*, 10: 613-623, 1963.
 39. Chammas, R., Sonnenburg, J. L., Watson, N. E., Tai, T., Farquhar, M. G., Varki, N. M., and Varki, A. De-N-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. *Cancer Res.*, 59: 1337-1346, 1999.
 40. Tsuji, S. Molecular cloning and functional analysis of sialyltransferases. *J.Biochem.*, 120: 1-13, 1996.
 41. Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y., and Sanai, Y. Expression Cloning of A Cmp-Neuac-Neuac-Alpha-2-3Gal-Beta-1-4Glc-Beta-1-1'Cer Alpha-2,8-Sialyltransferase (Gd3 Synthase) from Human-Melanoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 7952-7956, 1994.
 42. Rosenberg, J. M. and Cheresch, D. A. Increased activity of cytidine-5'-monophospho-N-acetyl-neuraminic acid:GM3 sialyltransferase

- leads to enhanced expression of GD3 on human melanoma cells derived from a metastatic lesion. *Proc.Am.Soc.Biol.Chem.*, 45: 1822-1827, 1986.
43. Rademacher, T. W., Parekh, R. B., and Dwek, R. A. Glycobiology. *Annu.Rev.Biochem.*, 57: 785-838, 1988.
 44. Varki, A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *Faseb J.*, 11: 248-255, 1997.
 45. Collins, B. E., Ito, H., Sawada, N., Ishida, H., Kiso, M., and Schnaar, R. L. Enhanced binding of the neural siglecs, myelin-associated glycoprotein and Schwann cell myelin protein, to Chol-1 (alpha-series) gangliosides and novel sulfated Chol-1 analogs. *J Biol Chem*, 274: 37637-37643, 1999.
 46. Hakomori, S. Traveling for the glycosphingolipid path. *Glycoconj.J.*, 17: 627-647, 2000.
 47. Liour, S. S. and Yu, R. K. Differential effects of three inhibitors of glycosphingolipid biosynthesis on neuronal differentiation of embryonal carcinoma stem cells. *Neurochem.Res.*, 27: 1507-1512, 2002.
 48. Peguet-Navarro, J., Sportouch, M., Popa, I., Berthier, O., Schmitt, D., and Portoukalian, J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J.Immunol.*, 170: 3488-3494, 2003.
 49. Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R. L. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, 96: 9142-9147, 1999.

50. Deng, W., Li, R., Guerrero, M., Liu, Y., and Ladisch, S. Transfection of glucosylceramide synthase antisense inhibits mouse melanoma formation. *Glycobiol.*, 12: 145-152, 2002.
51. Ranes, M. K., El Abbadi, M., Manfredi, M. G., Mukherjee, P., Platt, F. M., and Seyfried, T. N. N -butyldeoxynojirimycin reduces growth and ganglioside content of experimental mouse brain tumours. *Br.J Cancer*, 84: 1107-1114, 2001.
52. Malisan, F. and Testi, R. GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta*, 1585: 179-187, 2002.
53. Lee, L., Abe, A., and Shayman, J. A. Improved inhibitors of glucosylceramide synthase. *J.Biol.Chem.*, 274: 14662-14669, 1999.
54. Platt, F. M., Neises, G. R., Dwek, R. A., and Butters, T. D. N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis. *J.Biol.Chem.*, 269: 8362-8365, 1994.
55. Ranes, M. K., El Abbadi, M., Manfredi, M. G., Mukherjee, P., Platt, F. M., and Seyfried, T. N. N -butyldeoxynojirimycin reduces growth and ganglioside content of experimental mouse brain tumours. *Br.J.Cancer*, 84: 1107-1114, 2001.
56. Guerrero, M. and Ladisch, S. N-butyldeoxynojirimycin inhibits murine melanoma cell ganglioside metabolism and delays tumor onset. *Cancer Lett.*, 201: 31-40, 2003.
57. Zeng, G., Gao, L., Birkle, S., and Yu, R. K. Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res.*, 60: 6670-6676, 2000.
58. Zeng, G., Gao, L., and Yu, R. K. Reduced cell migration, tumor growth and experimental metastasis of rat F-11 cells whose

expression of GD3-synthase is suppressed. *Int.J.Cancer*, 88: 53-57, 2000.

59. Bleicher, R. J. and Cabot, M. C. Glucosylceramide synthase and apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta*, 1585: 172-178, 2002.
60. Colell, A., Garcia-Ruiz, C., Roman, J., Ballesta, A., and Fernandez-Checa, J. C. Ganglioside GD3 enhances apoptosis by suppressing the nuclear factor- kappa B-dependent survival pathway. *Faseb J.*, 15: 1068-1070, 2001.
61. Sun, P., Wang, X. Q., Lopatka, K., Bangash, S., and Paller, A. S. Ganglioside loss promotes survival primarily by activating integrin-linked Kinase/Akt without phosphoinositide 3-OH kinase signaling. *J.Invest.Dermatol.*, 119: 107-117, 2002.
62. Lang, Z., Guerrero, M., Li, R., and Ladisch, S. Ganglioside GD1a enhances VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 282: 1031-1037, 2001.
63. Yoshida, S., Fukumoto, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R., and Furukawa, K. Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res.*, 61: 4244-4252, 2001.
64. Cheresch, D. A., Reisfeld, R. A., and Varki, A. P. O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science*, 225: 844-846, 1984.
65. Sjoberg, E. R., Chammas, R., Ozawa, H., Kawashima, I., Khoo, K. H., Morris, H. R., Dell, A., Tai, T., and Varki, A. Expression of de-N-acetyl-gangliosides in human melanoma cells is induced by genistein or nocodazole. *J Biol Chem*, 270: 2921-2930, 1995.

66. Hannun, Y. A. and Bell, R. M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, **243**: 500-507, 1989.
67. Merzak, A., Koochekpour, S., and Pilkington, G. J. Adhesion of human glioma cell lines to fibronectin, laminin, vitronectin and collagen I is modulated by gangliosides in vitro. *Cell Adhesion Commun.*, **3**: 27-43, 1995.
68. Pilkington, G. J. The role of the extracellular matrix in neoplastic glial invasion of the nervous system. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, **29**: 1159-1172, 1997.
69. Cheresch, D. A., Harper, J. A., Schulz, G., and Reisfeld, R. A. Localization of the gangliosides GD2 and GD3 in adhesion plaques and on the surface of human melanoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **81**: 5767-5771, 1984.
70. Cheresch, D. A. and Klier, F. G. Disialogangliosides GD2 distributes preferentially into substrate-associated microprocesses on human melanoma cells during their attachment to fibronectin. *J.Cell Biol.*, **102**: 1887-1897, 1986.
71. Ono, M., Handa, K., Sonnino, S., Withers, D. A., Nagai, H., and Hakomori, S. GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochem.*, **40**: 6414-6421, 2001.
72. Hakomori, S. Bifunctional role of glycosphingolipids. *J.Biol.Chem.*, **265**: 18713-18716, 1990.
73. Yamamura, S., Handa, K., and Hakomori, S.-I. A close association of GM3 with c-src and rho in GM3-enriched microdomains at the B16

melanoma cell surface membrane: a preliminary note. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 236: 218-222, 1997.

74. Kasahara, K., Watanabe, Y., Yamamoto, T., and Sanai, Y. Association of Src family tyrosine kinase Lyn with ganglioside GD3 in rat brain. Possible regulation of Lyn by glycosphingolipid in caveolae-like domains. *J.Biol.Chem.*, 272: 29947-29953, 1997.
75. Kwiatkowska, K. and Sobota, A. The clustered Fcγ receptor II is recruited to Lyn-containing membrane domains and undergoes phosphorylation in a cholesterol- dependent manner. *Eur.J.Immunol.*, 31: 989-998, 2001.
76. Nakano, J., Raj, B. K. M., Asagami, C., and Lloyd, K. O. Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorigenic characteristics. *J.Invest.Dermatol.*, 107: 543-548, 1996.
77. Birklé, S., Gao, L., Zeng, G., and Yu, R. K. Down-regulation of GD3 ganglioside and its O-acetylated derivative by stable transfection with antisense vector against GD3-synthase gene expression in hamster melanoma cells: effects on cellular growth, melanogenesis, and dendricity. *J.Neurochem.*, 74: 547-554, 2000.
78. Li, R., Manela, J., Kong, Y., and Ladisch, S. Cellular gangliosides promote growth factor-induced proliferation of fibroblasts. *J.Biol.Chem.*, 275: 34213-34223, 2000.
79. Deng, W., Li, R., and Ladisch, S. Influence of cellular ganglioside depletion on tumor formation. *J.Natl.Cancer Inst.*, 92: 912-917, 2000.
80. Olshefski, R. S. and Ladisch, S. Glucosylceramide synthase inhibition enhances vincristine-induced cytotoxicity. *Int.J.Cancer*, 93: 131-138, 2001.

81. Bissel, M. J. and Radisky, D. Putting tumours in context. *Nature Reviews Cancer*, 1: 46-54, 2001.
82. Manfredi, M. G., Lim, S., Claffey, K. P., and Seyfried, T. N. Gangliosides influence angiogenesis in an experimental mouse brain tumor. *Cancer Res.*, 59: 5392-5397, 1999.
83. Lang, Z., Guerrero, M., Li, R., and Ladisch, S. Ganglioside GD1a enhances VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 282: 1031-1037, 2001.
84. De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomasini, B., Zeuner, A., Rippo, M. R., and Testi, R. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science*, 277: 1652-1655, 1997.
85. Thornton, M. V., Kudo, D., Rayman, P., Horton, C., Molto, L., Cathcart, M. K., Ng, C., Paszkiewicz-Kozik, E., Bukowski, R., Derweesh, I., Tannenbaum, C. S., and Finke, J. H. Degradation of NF-kappa B in T cells by gangliosides expressed on renal cell carcinomas. *J.Immunol.*, 172: 3480-3490, 2004.
86. Rippo, M. R., Malisan, F., Ravagnan, L., Tomassini, B., Condo, I., Costantini, P., Susin, S. A., Rufini, A., Todaro, M., Kroemer, G., and Testi, R. GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2 controlled fashion. *FASEB J* 14, 2047-2054. 2000.
87. Scorrano, L., Petronilli, V., Di Lisa, F., and ernardi, P. Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Biological Chemistry* 274, 22581-22585. 1999.
88. Kristal, B. S. and Brown, A. M. Apoptogenic ganglioside GD3 directly induces the mitochondrial permeability transition. *Journal of Biological Chemistry* 274, 23169-23175. 1999.

89. Garcia-Ruiz, C., Colell, A., Paris, R., and Fernandez-Checa, J. C. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release and caspase activation. *FASEB J* 14, 847-858. 2000.
90. Jung, I. D., Lee, J., Lee, K. B., Park, C. G., Kim, Y. K., Seo, D. W., Park, D., Lee, H. W., Han, J. W., and Lee, H. Y. Activation of p21-activated kinase 1 is required for lysophosphatidic acid-induced focal adhesion kinase phosphorylation and cell motility in human melanoma A2058 cells. *Eur.J.Biochem.*, 271: 1557-1565, 2004.
91. Di Sano, F., Fazi, B., Citro, G., Lovat, P. E., Cesareni, G., and Piacentini, M. Glucosylceramide synthase and its functional interaction with RTN-1C regulate chemotherapeutic-induced apoptosis in neuroepithelioma cells. *Cancer Res.*, 63: 3860-3865, 2003.
92. Jaken, S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 8: 168-173, 1996.
93. Gescher, A. Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs? *Gen.Pharmacol.*, 31: 721-728, 1998.
94. Hurley, L. H. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer*, 2: 188-200, 2002.
95. Kartalou, M. and Essigmann, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat.Res.*, 478: 23-43, 2001.
96. Perez, R. P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur.J.Cancer*, 34: 1535-1542, 1998.

97. Joneson, T., McDonough, M., Bar-Sagi, D., and Van Aelst, L. RAC regulation of actin polymerization and proliferation by a pathway distinct from Jun kinase. *Science*, 274: 1374-1376, 1996.
98. Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., and Perez, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol.Pharmacol.*, 59: 657-663, 2001.
99. Wang, D. and Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 4: 307-320, 2005.
100. Wunderlich, V. and Bottger, M. High-mobility-group proteins and cancer--an emerging link. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 123: 133-140, 1997.
101. Zamble, D. B., Jacks, T., and Lippard, S. J. p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, 95: 6163-6168, 1998.
102. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22: 7265-7279, 2003.
103. Murphy, P. M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N.Engl.J.Med.*, 345: 833-835, 2001.
104. Newlands, E. S., Stevens, M. F., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., and Brock, C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat.Rev.*, 23: 35-61, 1997.
105. Gerson, S. L. Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *J.Clin.Oncol.*, 20: 2388-2399, 2002.
106. Jordan, M. A. and Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat.Rev.Cancer*, 4: 253-265, 2004.

107. Bennett, D. C., Cooper, P. J., and Hart, I. R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int.J.Cancer*, 39: 414-418, 1987.
108. Correa, M., Machado, J., Jr., Carneiro, C. R., Bosco, P. J., Bader, M., Travassos, L. R., Chammass, R., and Jasiulionis, M. G. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. *Int.J.Cancer*, 2004.
109. Matarrese, P., Fusco, O., Tinari, N., Natoli, C., Liu, F. T., Semeraro, M. L., Malorni, W., and Iacobelli, S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. *Int.J.Cancer*, 85: 545-554, 2000.
110. Malisan, F., Franchi, L., Tomassini, B., Ventura, N., Condo, I., I, Rippo, M. R., Rufini, A., Liberati, L., Nachtigall, C., Kniep, B., and Testi, R. Acetylation Suppresses the Proapoptotic Activity of GD3 Ganglioside. *J.Exp.Med.*, 196: 1535-1541, 2002.
111. Werner, E. and Werb, Z. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J.Cell Biol.*, 158: 357-368, 2002.
112. Birkle, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R. K., and Aubry, J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie.*, 85: 455-463, 2003.
113. Halaban, R. Molecular correlates in the progression of normal melanocytes to melanomas. *Sem.Cancer Biol.*, 4: 171-181, 1993.
114. Halaban, R., Cheng, E., Smicun, Y., and Germino, J. Deregulated E2F transcriptional activity in autonomously growing melanoma cells. *J Exp.Med.*, 191: 1005-1016, 2000.

115. Li, R., Liu, Y., and Ladisch, S. Enhancement of epidermal growth factor signaling and activation of Src kinase by gangliosides. *J.Biol.Chem.*, 2001.
116. Givol, D. and Yayon, A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *Faseb J.*, 6: 3362-3369, 1992.
117. Harder, T. and Simons, K. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 9: 534-542, 1997.
118. Simons, K. and Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 1: 31-39, 2000.
119. Sun, P., Wang, X. Q., Lopatka, K., Bangash, S., and Paller, A. S. Ganglioside loss promotes survival primarily by activating integrin-linked kinase/Akt without phosphoinositide 3-OH kinase signaling. *J.Invest Dermatol.*, 119: 107-117, 2002.
120. Simon, B. M., Malisan, F., Testi, R., Nicotera, P., and Leist, M. Disialoganglioside GD3 is released by microglia and induces oligodendrocyte apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 9: 758-767, 2002.
121. Chen, H. Y. and Varki, A. O-acetylation of GD3: An Enigmatic Modification Regulating Apoptosis? *J.Exp.Med.*, 196: 1529-1533, 2002.
122. Satake, H., Chen, H. Y., and Varki, A. Genes modulated by expression of GD3 synthase in chinese hamster ovary cells: Evidence that the Tis21 gene is involved in the induction of GD3 9-O-acetylation. *J.Biol.Chem.*, 2002.
123. Shi, W. X., Chammas, R., and Varki, A. Induction of sialic acid 9-O-acetylation by diverse gene products: implications for the expression

- cloning of sialic acid O-acetyltransferases. *Glycobiol.*, 8: 199-205, 1998.
124. Shi, W. X., Chammas, R., and Varki, A. Linkage-specific action of endogenous sialic acid O-acetyltransferase in Chinese hamster ovary cells. *J.Biol.Chem.*, 271: 15130-15138, 1996.
 125. Tomassini, B., Malisan, F., Franchi, L., Nicolo, C., Calvo, G. B., Saito, T., and Testi, R. Calnexin suppresses GD3 synthase-induced apoptosis. *Faseb J.*, 18: 1553-1555, 2004.
 126. Torigoe, T., Izumi, H., Ishiguchi, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Yoshida, T., Igarashi, T., Niina, I., Wakasugi, T., Imaizumi, T., Momii, Y., Kuwano, M., and Kohno, K. Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr.Med.Chem.Anti-Canc.Agents*, 5: 15-27, 2005.
 127. Ha, K. T., Lee, Y. C., and Kim, C. H. Overexpression of GD3 synthase induces apoptosis of vascular endothelial ECV304 cells through downregulation of Bcl-2. *FEBS Lett.*, 568: 183-187, 2004.
 128. Liu, Y. Y., Han, T. Y., Giuliano, A. E., and Cabot, M. C. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *Faseb J.*, 15: 719-730, 2001.
 129. Cabot, M. C., Giuliano, A. E., Han, T. Y., and Liu, Y. Y. SDZ PSC 833, the cyclosporine A analogue and multidrug resistance modulator, activates ceramide synthesis and increases vinblastine sensitivity in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells. *Cancer Res.*, 59: 880-885, 1999.
 130. Zick, Y., Eisenstein, M., Goren, R. A., Hadari, Y. R., Levy, Y., and Ronen, D. Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconj.J.*, 19: 517-526, 2004.

131. Jin, Q. H., Zhao, B., and Zhang, X. J. Cytochrome c release and endoplasmic reticulum stress are involved in caspase-dependent apoptosis induced by G418. *Cell Mol.Life Sci.*, 61: 1816-1825, 2004.
132. Rubin, H. Selected cell and selective microenvironment in neoplastic development. *Cancer Res.*, 61: 799-807, 2001.
133. Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L., and Helenius, A. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J.Cell Biol.*, 170: 769-779, 2005.
134. Ewers, H., Smith, A. E., Sbalzarini, I. F., Lilie, H., Koumoutsakos, P., and Helenius, A. Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A*, 102: 15110-15115, 2005.
135. Xu, G. W., Mymryk, J. S., and Cairncross, J. G. Pharmaceutical-mediated inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to BCNU and temozolomide. *Int.J.Cancer*, 116: 187-192, 2005.
136. Norris-Cervetto, E., Callaghan, R., Platt, F. M., Dwek, R. A., and Butters, T. D. Inhibition of glucosylceramide synthase does not reverse drug resistance in cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 279: 40412-40418, 2004.

8. ANEXOS

8.1. Figuras extras

Figura I. Composição de gangliosídeos em novos transfectantes. As células foram incubadas com anticorpos específicos e os gangliosídeos da superfície celular foram analisados por citometria de fluxo. PC.C1 e PC.C3: células transfectadas com o plasmídeo vazio; ST8.C11 e ST8.C17: células transfectadas com o gene da enzima ST8Sial. Roxo: controle; verde: G_{M3} ; rosa: G_{D3} .

Figura II. Composição de G_{D3} e 9-O-acetil- G_{D3} em células G_{D3}^+ . As células foram incubadas com anticorpos específicos e os gangliosídeos da superfície celular foram analisados por citometria de fluxo. A coluna da esquerda mostra a expressão de G_{D3} nas células ST8.C3, ST8.C11 e ST8.C14 e a da direita mostra a expressão de seu derivado 9-O-acetil- G_{D3} .

Figura III. Depleção de gangliosídeos na superfície das células após tratamento com PPPP. As células foram cultivadas na presença de 250nM de PPPP por 3 dias. Depois, foram incubadas com anticorpos específicos, conjugados com FITC, e sua fluorescência foi avaliada em citometria de fluxo. A primeira coluna mostra a expressão de G_{M3} nas células controle (PC.C1 e PC.C3) e de G_{D3} nas células ST8.C11 e ST8.C17; a da esquerda mostra respectivamente a expressão dos gangliosídeos após o tratamento das células com PPPP.

MELANOMA CUTÂNEO LOCALIZADO e LINFONODO SENTINELA

RENATO SANTOS DE OLIVEIRA FILHO

Professor Orientador do Programa de Pós-Graduação em
Cirurgia Plástica Reparadora da Escola Paulista de Medicina da
Universidade Federal de São Paulo. Coordenador da Linha de Pesquisa
“Linfonodo Sentinela no Melanoma Cutâneo” – CNPq.
Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Titular do Colégio Brasileiro de Cirurgiões – Cirurgia Oncológica.

São Paulo – 2003 – Brasil

**MELANOMA CUTÂNEO LOCALIZADO e
LINFONODO SENTINELA**

Renato Santos de Oliveira Filho

Cyro Festa Neto

Francisco Macedo Paschoal

Luis Fernando R. Tovo

Lydia Masako Ferreira

Mílvia Maria Sílvia e Silva Enokihara

Reinaldo Tovo Filho

Ricardo Caponero

Roger Chammas

Projeto Gráfico

CLR Balieiro Editores Ltda.

Revisão

Renata Almeida Leite Ribeiro Balieiro

Editoração Eletrônica

Eduardo Seiji Seki

Fotolitos/Impressão/Acabamento

OESP Gráfica S.A.

Apoio

Miriam Domingos de Oliveira / Pedro Luis de Campos Baptista

Direitos Reservados

Nenhuma parte pode ser duplicada ou
reproduzida sem expressa autorização do Editor

Rua Tamandaré, 884 - Aclimação
Cep 01525-001 - São Paulo - SP
E-mail: livrariamarina@sti.com.br
Site: www.lemareditora.com.br

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
do Departamento Nacional do Livro**

M517 Melanoma cutâneo localizado e linfonodo
sentinela / Editor Renato Santos de
Oliveira Filho. – São Paulo : Lemar, 2003.
210p. ; 26cm.

ISBN 85-86652-16-4

1. Câncer. 2. Oncologia. I. Oliveira Filho,
Renato Santos.

CDD 61.994

GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DO MELANOMA E DE SUA PROGRESSÃO

ROGER CHAMMAS
ANA PAULA MARQUES DUARTE
ANDRÉIA HANADA OTAKE
MARILENA DA COSTA

MODELOS DE PROGRESSÃO TUMORAL EM MELANOMAS

Melanomas são neoplasias malignas de melanócitos que figuram entre os cânceres humanos mais indolentes a diversos tratamentos. Diferentemente do que vem sendo observado com outros tumores, a incidência de melanomas tem crescido nas últimas décadas. O incremento em sua incidência só é menor do que aquele observado para os tumores pulmonares em mulheres associado ao crescente hábito de fumar observado nos últimos 20 anos³⁰. A alta mortalidade por melanomas, quando diagnosticados tardiamente, tem estimulado a busca de marcadores de progressão desses tumores para que se possa diagnosticar a lesão o mais precocemente possível, quando os tratamentos cirúrgicos ainda podem ser curativos. Clark, Elder & Guerry propuseram um modelo, classicamente aceito, para a progressão de melanomas^{9,10}:

1. Melanócitos de lesões névicas, originados direta ou indiretamente de melanócitos imaturos, poderiam converter-se progressivamente em: melanócitos de nevos displásicos, melanomas de crescimento radial (invasivo *in situ*), melanomas de crescimento vertical e, finalmente, melanomas metastáticos. As características histopatológicas de cada uma dessas lesões serão discutidas em capítulo adiante.
2. Alternativamente, como em todos os modelos de progressão, melanócitos imaturos poderiam originar *ab initio* qualquer uma das formas tumorais propriamente ditas.

Como observado em diversos tipos de cânceres, cerca de 10% dos melanomas apresentam um evidente componente familiar. A exis-

tência de síndromes hereditárias que se caracterizam pela maior incidência de melanomas foi inicialmente descrita simultaneamente por Clark e Lynch, em 1978^{11,45}. Membros dessas famílias apresentavam um grande número de nevos comuns e atípicos (nevos displásicos). Nevos representam tanto lesões precursoras quanto marcadoras para o desenvolvimento de melanomas. Estima-se que um em cada cinco nevos displásicos (nevos com atipias arquiteturais) progrida para melanoma de crescimento vertical. A existência de uma lesão pré-maligna que se converta (em cerca de 20% dos casos) em maligna tem justificado a busca de elementos fenotípicos e genotípicos com potencial valor preditivo para o fenômeno de progressão^{16,17,31}.

Estudos em sistemas celulares que modelam a progressão tumoral de melanomas, bem como estudos genéticos em membros de famílias com síndrome do nevo displásico têm sido úteis no mapeamento de genes associados ao desenvolvimento dos melanomas. Mais recentemente, Hanahan & Weinberg propuseram que os genes associados a tumor estariam envolvidos na aquisição de pelo menos uma de seis principais características da célula cancerosa: 1. auto-suficiência nas vias de proliferação celular; 2. resistência a sinais de bloqueio das vias de proliferação celular; 3. evasão da resposta apoptótica; 4. potencial ilimitado de replicação; 5. indução sustentada de angiogênese; e 6. invasão tecidual e metástase²⁸. A capacidade de invasão tecidual depende da atividade migratória da célula invasora, que alguns têm sugerido como disfuncional. Com essa proposta, Hanahan & Weinberg definem o contexto funcional em que deveriam ser inseridas as moléculas de potencial valor preditivo no estudo da progressão tumoral. Será nesse contexto que analisaremos as principais alterações celulares e moleculares que ocorrem ao longo da progressão tumoral de melanomas.

INTERAÇÕES ENTRE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS NA UNIDADE DE PIGMENTAÇÃO

Melanócitos são células pigmentadas localizadas na camada basal da epiderme, no infundíbulo e na região bulbar dos folículos pilosos, na coróide e nas leptomeninges. Os melanoblastos, células precursoras dos melanócitos, são de origem neuroectodérmica e que migram a partir da crista neural, de 2 a 3 semanas após a fertilização. Uma vez na derme, os melanoblastos embrionários sofrem um processo de maturação e/ou diferenciação dando origem às células precursoras de melanócitos (pré-melanócitos precoces e intermediários), que na epiderme diferenciar-se-iam completamente para melanócitos^{32,41}. O grau

de diferenciação dos melanócitos pode ser avaliado pela capacidade de síntese de melanina que depende da atividade de enzimas como as tirosinases, enzimas expressas preferencialmente por melanócitos e algumas células de melanoma. Na epiderme, os melanócitos interagem especificamente com queratinócitos, definindo as unidades de pigmentação da epiderme (Fig. 1.1). Os melanócitos normais são encontrados somente na camada basal da epiderme; geralmente, há um melanócito para cada cinco a oito queratinócitos da camada basal numa unidade de pigmentação. Estima-se que os melanócitos possam interagir diretamente com até 35 queratinócitos da epiderme, por meio de expansões dendríticas como as ilustradas na figura 1.1. É por essas expansões citoplasmáticas que os melanossomos são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos no processo de pigmentação da epiderme. Em geral, na unidade de pigmentação, os melanócitos estão quiescentes; isto é, não se encontram em proliferação; embora possam, sob estímulo (como mencionado a seguir), proliferar-se.

Figura 1.1 – Organização da unidade de pigmentação da epiderme. Microfotografia de corte de pele humana, identificando a epiderme (E) e a derme (D), a linha tracejada indica a zona da membrana basal, tipo especializado de matriz extracelular. Na epiderme, os queratinócitos são as células predominantes; observam-se os núcleos dos queratinócitos nas diferentes camadas da epiderme. A camada basal é aquela que está em contato direto com a membrana basal. A seta evidencia um melanócito (completamente corado devido à reação imunohistoquímica com anticorpos específicos), cujo aspecto é dendrítico. Um melanócito interage com até oito queratinócitos da camada basal, formando a unidade de pigmentação da epiderme, na qual ocorrem as interações fisiológicas entre queratinócitos e melanócitos (barra = 10cm).

O estado não-proliferativo dos melanócitos nas unidades de pigmentação depende de sua interação com os queratinócitos. Evidências experimentais mostram que queratinócitos suprimem a proliferação de melanócitos e essa atividade parece depender do contato célula-célula. Embora a base molecular desse controle local da proliferação de melanócitos não esteja completamente esclarecida, parece haver o envolvimento de duas famílias de moléculas localizadas na membrana plasmática de ambos os tipos celulares.

A primeira família de moléculas é a família das caderinas. Caderinas são moléculas de adesão celular, encontradas em especializações das membranas: as junções aderentes^{1,3,48}. Queratinócitos e melanócitos expressam E-caderinas, que interagem de maneira homofílica e heterotípica nas unidades de pigmentação, isto é, uma molécula de E-caderina dos queratinócitos interage com uma molécula de E-caderina do melanócito. As moléculas de E-caderina são as principais efetoras do processo conhecido como *inibição* (de proliferação) *por contato*^{23,53}. A formação de junções aderentes contendo E-caderinas está associada ao recrutamento de β -cateninas para a junção aderente. Admite-se que β -cateninas livres no citoplasma transloquem-se para o núcleo, no qual, ligando-se a fatores de transcrição (como, por exemplo, Tcf/LEF), estimulariam a proliferação. Uma vez que as junções aderentes são formadas, haveria uma diminuição de β -catenina livre, portanto, haveria menos estímulo para a proliferação. A perda de função ou diminuição de expressão de E-caderinas é um evento freqüente ao longo da progressão tumoral de diferentes tumores, incluindo-se melanomas^{34,38,44}. O gene da E-caderina localiza-se no cromossomo 16, e há evidências de seu silenciamento transcripcional por metilação em diferentes cânceres do trato gastrointestinal, mama e próstata. Não há evidências de que esse seja um mecanismo operante no desenvolvimento de melanomas. Mutações em β -catenina, associadas a um aumento em sua vida média e potencial ativação de Tcf/LEF foram identificadas em melanomas^{57,59}.

A diminuição na expressão de E-caderina em melanomas é acompanhada por um progressivo aumento na expressão de N-caderina, expressa, por exemplo, em fibroblastos dérmicos e células endoteliais. Melanócitos normais presentes na derme também deixam de expressar E-caderina e passam a expressar N-caderina³⁵. Ainda não se conhecem todas as implicações das alterações de classe de caderinas expressas por melanócitos e melanomas que, contudo, podem ser utilizadas como marcadores fenotípicos.

A outra classe de moléculas expressas por células da unidade de pigmentação são as conexinas. Conexinas são proteínas que formam as junções comunicantes “gap junctions”, responsáveis pela formação de verdadeiros sincícios funcionais nos tecidos em que estão presentes. As junções comunicantes permitem o tráfego de moléculas pequenas de uma célula a outra. Queratinócitos estão conectados entre si e com melanócitos via junções comunicantes. Admite-se que entre as moléculas que permeiam as junções comunicantes estejam segundos-mensageiros que atuam como moduladores da proliferação celular. Sugere-se que, enquanto em células normais as junções comunicantes sejam funcionais, nas células tumorais, as junções sejam desorganizadas ou disfuncionais⁴⁴. Diversas questões estão abertas quanto ao possível papel das junções comunicantes na gênese e na manutenção de melanomas, bem como quanto à sua aplicação prática.

Alterações no padrão de expressão ou função de E-caderinas ou conexinas podem representar os primeiros eventos associados ao escape de melanócitos do controle negativo de proliferação local de queratinócitos³⁴.

FATORES DE PROLIFERAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA E IMORTALIZAÇÃO DE MELANÓCITOS E MELANOMAS

Em algumas condições fisiológicas, fatores produzidos por queratinócitos e fibroblastos dérmicos podem levar à proliferação ou à sobrevivência sustentada de melanócitos. Entre os principais fatores mitogênicos para melanócitos, estão os fatores de crescimento como FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos básico), HGF/SF (fator de crescimento de hepatócitos/“scatter factor”), endotelinas e fator de crescimento de mastócitos (também conhecido como o ligante de *c-kit* ou M/SCF). Esses fatores são produzidos por queratinócitos (FGF-2, endotelinas e M/SCF) e por fibroblastos (FGF-2, HGF/SF e M/SCF), tendo sua síntese estimulada por radiação ultravioleta (UV-B, por exemplo)^{24,26}.

Esses fatores são fundamentais ao longo do desenvolvimento embrionário normal, como ilustrado, por exemplo, em indivíduos com piebaldismo, condição caracterizada por áreas de epiderme destituídas completamente de melanócitos e associada a mutações no gene *c-kit*; ou em genes associados a endotelina-3 e seu receptor, como

nas síndromes de Waardenburg e Hirschsprung, respectivamente, que também cursam com piebaldismo⁶¹. Ao longo da progressão tumoral, é freqüente observar-se a superexpressão de FGF-2 ou de HGF/SF por células do próprio melanoma, constituindo alças autócrinas de manutenção da sobrevivência celular. É importante observar que a proliferação de melanócitos depende da ação sinérgica de diferentes fatores mitogênicos e que, até o momento, não se definiu uma única via suficiente para a geração de melanomas. Assim, por exemplo, a superexpressão de FGF-2, ausente em melanócitos normais, já é observada em nevos comuns, displásicos e melanomas de crescimento radial, porém parece insuficiente para a aquisição de um fenótipo completamente autônomo de crescimento dessas lesões²⁴. O achado de FGF-2 em células de melanoma de crescimento radial microinvasivo, isto é, encontrado na derme não está associado à atividade proliferativa dessa célula, que é virtualmente nula. Mais recentemente, esse dado tem sido interpretado como um possível mecanismo de evasão do melanócito névico ou do melanoma de crescimento radial do processo de morte celular – os fatores mitogênicos estimulariam vias de proliferação celular e também vias bioquímicas de sobrevivência ou resistência à apoptose. Essa via sustentaria a sobrevivência dessas células na derme, em que os melanócitos/melanomas de crescimento radial estariam privados da estimulação dependente de contato dos queratinócitos.

Com a progressão para melanomas de crescimento vertical, células de melanoma passam a expressar FGF-2 e TGF- α ; que passam a estimular a proliferação de melanomas de maneira autócrina. M/SCF que atua como fator de proliferação de melanócitos, atua como inibidor da proliferação de melanomas; curiosamente, a expressão do ligante de *c-kit*, receptor de M/SCF, diminui em melanomas. Ainda, outros fatores de crescimento como VEGF e PDGF α passam a ser expressos secretados atuando de maneira parácrina no microambiente do melanoma, agindo sobre células endoteliais e fibroblastos respectivamente. TGF- α , expresso por melanomas, não age em melanócitos, uma vez que essas células não expressam os receptores para esse polipeptídeo, que é membro da família do fator de crescimento epidérmico (EGF). Contudo, com a progressão tumoral, células de melanoma de crescimento vertical e melanomas metastáticos freqüentemente apresentam o receptor de EGF amplificado, sendo responsáveis então àquele polipeptídeo⁴⁹. Como o M/SCF, ainda outros fatores inibem a proliferação de melanomas, por exemplo, o fator de cresci-

mento transformante (TGF- β), a interleucina-6 (IL-6) e o interferon- β . Embora essa ação seja limitada e ainda não apresente maiores implicações clínicas, ilustra os diferentes níveis de controle microambiental que são progressivamente perdidos ao longo da evolução do melanoma.

Fatores de crescimento como FGF-2 não atuam somente estimulando a proliferação de melanócitos. A persistente expressão de FGF-2 está associada ao recrutamento, à proliferação e à migração de células endoteliais, o que favorece a invasão da massa tumoral por vasos neoformados (angiogênese)^{15,52}, ainda, FGF-2 é um potente modulador da migração de melanócitos e melanomas, favorecendo o processo de metástase. Assim, além de estar associado à formação dos nevos, FGF-2 também está associado à progressão de melanomas em fase de crescimento radial para melanomas em fase de crescimento vertical. Essa noção tem sido explorada em ensaios pré-clínicos, usando-se abordagens que visam o bloqueio da expressão de FGF-2 e de seu receptor⁶⁵.

Com divisões subseqüentes, células normais adultas vão apresentando o encurtamento progressivo das extremidades de seus cromossomos (telômeros). Há evidências de que esse encurtamento funcionaria como um relógio biológico quando a célula atingisse um número definido de divisões, o grau de encurtamento telomérico atingiria um nível crítico que deflagraria o processo de morte celular. Esse processo não ocorre em células progenitoras e células embrionárias que expressam enzimas que atuam na síntese das extremidades dos telômeros: as telomerasas. O processo de imortalização da célula neoplásica cursa, muitas vezes, com aumento da atividade de telomerasas. Essa característica molecular é útil para a diferenciação de lesões névicas e melanomas. Enquanto em nevos (comuns ou displásicos) a atividade telomerásica é freqüentemente baixa, em melanomas, ela tende a ser alta⁶⁰. Contudo, a atividade telomerásica não parece útil na discriminação entre melanomas nas fases de crescimento radial e vertical⁵¹.

CONTROLE DO CICLO CELULAR DE MELANÓCITOS E MELANOMAS

Enquanto a proliferação de melanócitos normais e células das fases iniciais da progressão de melanomas depende da ação sinérgica de diferentes fatores de crescimento, melanomas de lesões metastáticas

proliferam de maneira autônoma. Essa noção é bastante disseminada entre os diferentes grupos que cultivam células derivadas de melanoma, quer para investigação fundamental, quer para aplicações clínicas como desenvolvimento de vacinas autólogas ou testes de drogas.

A comparação entre os elementos de controle do ciclo celular de melanócitos e melanomas vem sugerindo um importante papel dos genes supressores de tumor da família Rb (inicialmente identificadas no retinoblastoma) na gênese de melanomas, como confirmado pelas diferentes linhas de evidência discutidas a seguir.

Os genes da família do gene do retinoblastoma (pRb, p107 e p130) caracterizam-se por serem proteínas nucleares, freqüentemente encontradas como fosfoproteínas, isto é, fosforiladas em aminoácidos específicos e que controlam a função de uma família de fatores transcricionais: a família E2F. Fatores da família E2F controlam a transcrição de um grande número de genes, que controlam, por exemplo, a síntese de DNA (Fig. 1.2). A interação entre Rb e E2F depende do grau de fosforilação de Rb. Formas pouco fosforiladas de Rb estão associadas à repressão transcricional dos genes controlados por E2F; a hiperfosforilação de Rb está associada à liberação do papel de E2F. Essa função de Rb parece associada às flutuações do grau de organização da cromatina em torno de complexos pouco fosforilados (mais compacta) ou hiperfosforilados (mais frouxa) de Rb. Os genes da família Rb controlam, assim, a passagem das células pelo ponto de restrição entre as fases G_0/G_1 e S. A perda funcional de Rb, ou sua persistente hiperfosforilação, está associada à contínua proliferação^{25,27}.

Em melanomas, não se observam mutações ou deleções de genes da família Rb com freqüência; porém, Rb é freqüentemente hiperfosforilado nessas células. A fosforilação de Rb depende de quinases-dependentes de ciclinas, como CDK (“cyclin-dependent kinases”) 2, 4 e 6 (Fig. 1.2). A função dessas quinases, como o próprio nome indica, é dependente de cofatores protéicos que por terem sua expressão variável ao longo do ciclo celular foram chamados de ciclinas. Ciclinas da fase G_1 são as ciclinas D e E. Essas ciclinas existem em complexos com CDK2 (ciclinas A e E) e CDK4 e CDK6 (ciclinas D). Esses complexos fosforilam Rb, controlando assim sua função.

Figura 1.2 – Eventos críticos da transição $G_1 \rightarrow S$. Numa célula não-proliferativa (fase G_1 do ciclo celular), a proteína Rb hipofosforilada (P), forma um complexo com proteínas da família E2F. Em resposta a estímulos, como fatores de crescimento induzidos por radiação ultravioleta, quinases dependentes de ciclinas (CDK, por exemplo CDK2,4 e 6) fosforilam Rb, liberando E2F que passa a induzir a expressão de genes-chave da fase de síntese de DNA, promovendo a transição das células da fase G_1 para fase S. A atividade de CDKs depende da sua interação com ciclinas (por exemplo, ciclinas D e E). Em células não-proliferativas, esses complexos são inibidos por inibidores específicos de algumas CDKs, como p16^{INK4a} e p15^{INK4b}, ou por inibidores universais como p21^{WAF1/CIP1}, que é transcricionalmente regulada pelo gene supressor de tumor p53. O acúmulo desses inibidores está associado à parada da célula na fase G_1 , sua falta ou expressão deficiente relaxa o controle sobre o ciclo celular. A vida média de p53 é regulada por MDM-2, que estimula a degradação de p53. p19^{ARF} bloqueia a função de MDM-2. Os genes p15^{INK4b}, p16^{INK4a} e p19^{ARF} mapeiam na região 9p21, frequentemente mutada ou suprimida em indivíduos com quadros de melanoma familiar.

Os complexos ciclinas-CDK, encontrados como complexos binários em muitas células tumorigênicas, são encontrados como complexos quaternários em células normais quiescentes. Nesses complexos, além da ciclina e da quinase, encontram-se também um inibidor da quinase e o antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), não-funcional enquanto associado ao complexo. São exemplos de inibidores das quinases, as moléculas como produtos gênicos de *CDKN2A* (p16^{INK4A}, CDK4I), *CDKN2B* (p15), p21, p27^{29,58}. Quando células normais são estimuladas a proliferar, os complexos quaternários

rios tendem a se dissociar ou, alternativamente, há relativo excesso dos complexos binários ciclinas-CDK: Rb é hiperfosforilado atenuando-se a repressão transcricional de genes associados à transição $G_1 \rightarrow S$, o que leva à replicação do DNA e à subsequente divisão celular. O crescimento autônomo de melanomas depende, em parte, da ativação constitutiva de membros da família E2F (principalmente E2F₂ e E2F₄). Da mesma forma como a discutida para os fatores de crescimento, a ativação constitutiva desses fatores transcricionais não é suficiente para a transformação maligna de melanócitos.

IDENTIFICAÇÃO DOS *LOCI* DE SUSCETIBILIDADE AO MELANOMA CUTÂNEO – A CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO DO MELANOMA MALIGNO FAMILIAL

A elucidação, ainda que parcial, dos mecanismos moleculares associados à ativação constitutiva dos membros da família E2F veio de estudos genéticos nos quais se avaliaram pacientes portadores de formas hereditárias do melanoma cutâneo (síndrome do nevo displásico).

Essa síndrome é caracterizada pelo risco aumentado para o desenvolvimento de melanoma cutâneo, já em idade precoce, frequentemente associado aos múltiplos melanomas primários e à presença de nevos displásicos. Ao mesmo tempo em que são marcadores de predisposição genética, como discutido anteriormente, também são lesões potencialmente precursoras do melanoma maligno. Indivíduos com nevos displásicos apresentam um risco relativo pelo menos 89 vezes maior de desenvolvimento de melanomas do que indivíduos da população geral, e, quando portadores de um melanoma primário, seu risco para o desenvolvimento de um segundo melanoma primário é 230 vezes maior que o de indivíduos da população geral⁵⁴.

Estudos de ligação genética em pacientes com síndrome do nevo displásico permitiram a identificação de *loci* no cromossomo 9p21 fortemente associados ao desenvolvimento de melanomas. Essa região do cromossomo 9p21, com deleções e/ou mutações frequentes está associada a possíveis genes supressores de tumor^{22,56}. A organização genômica desses *loci* de suscetibilidade ao melanoma é bastante complexa. Pelo menos três genes mapeiam em 9p21: os genes dos inibidores de CDK, p15 e p16 (*CDKN2B* e *CDKN2A*, respectivamente) e p19^{ARF}. Os genes p16 e p19^{ARF} são genes distintos e transcritos independentemente, porém compartilham seqüências codificadoras:

nucleotídeos do segundo éxon de p16 também constituem o segundo éxon de p19^{ARF}, porém traduzidos em quadro de leitura alternado (daí seu nome, ARF: “alternate reading frame”).

O gene *CDKN2A* codifica um inibidor de CDK4 e CDK6. A perda de função desse gene, associada às mutações na linhagem germinativa de pacientes com melanoma familiar, favorece a noção de seu envolvimento na gênese de melanomas. Como já mencionado, as atividades de CDK4 e de CDK6 estão associadas à hiperfosforilação de Rb, levando à ativação ou à liberação funcional de membros da família de E2F. Enquanto o alvo de *CDKN2A* é a via de Rb, o alvo de p19^{ARF} é a via de um outro gene supressor de tumor, p53. Entre várias funções, p53 induz a transcrição do inibidor universal de CDKs, p21. A função normal de p53 é controlada por MDM2, uma proteína que leva à degradação de p53; essa função de MDM2, por sua vez, é inibida por p19^{ARF}. Na presença de p19^{ARF}, a vida média de p53 normal é maior, o que, especula-se, está associado à estabilidade genômica de células expostas a agentes que lesam o DNA (agentes genotóxicos). Assim, a suscetibilidade de células deficientes em p19^{ARF} ao acúmulo de mutações seria maior do que a de células normais.

A frequência de identificação de mutações germinativas em *CDKN2A* varia de 8 a 50% dependendo dos grupos étnicos avaliados. Mutações no éxon 2 estão associadas a mutações também em p19^{ARF}. Em estudos experimentais, perda do éxon 2 de *CDKN2A*/p19^{ARF} esteve sempre associada ao desenvolvimento de melanomas experimentais quando o oncogene Ras era expresso de maneira constitutiva. Esses estudos têm paralelos em famílias, nas quais o éxon 2 de *CDKN2A*/p19^{ARF} é freqüentemente alterado^{54,66}.

Outros genes parecem associados ao melanoma familiar, naquelas famílias em que os *loci* do cromossomo 9p21 são normais. Mutações em CDK4, associadas à sua ativação constitutiva foram identificadas em linhagens celulares e em algumas famílias. Em sistemas experimentais, inibidores de CDK2 como p27^{KIP} comportam-se como possíveis genes supressores de tumor. O complexo β -catenina-Tcf/LEF induz à transcrição de ciclina D, que age na transição G₁→S. A interação de fatores de crescimento com seus receptores, que sinalizam via Ras, também induz a transcrição dos genes de ciclinas e reprime a transcrição de p27^{KIP}. Em princípio, todos e qualquer um desses genes poderiam estar envolvidos no desenvolvimento de melanomas (e de outros tumores). Outras alterações citogenéticas encontradas em melanomas sugerem que genes localizados nos cro-

mossomos 1, 3, 6, 11 e 14 possam ainda participar de alguma forma da gênese de melanomas. Outras aberrações cromossômicas sugerem a participação de genes como nm23, mapeado no cromossomo 10, como genes supressores de metástases. Essas evidências são ainda inconclusivas.

Duas outras condições genéticas ainda merecem destaque. Deleções em *CDKN2A* também estão associadas ao desenvolvimento de outros tumores, em particular tumores de pâncreas. Essas deleções acometem o éxon 2 do gene *CDKN2A/p19^{ARF}*, assim, ambas as vias de Rb e p53 são comprometidas nesses tumores⁶⁴.

Melanomas freqüentemente acometem pacientes com *Xeroderma pigmentosum*. Nessa síndrome, o sistema de reparo de DNA por excisão está funcionalmente comprometido. Assim, dímeros de timidina, freqüentemente formados por indução de radiação ultravioleta, não são excisados e reparados. O risco de desenvolvimento de melanomas e outros tumores cutâneos é significativamente maior nesses pacientes; estima-se que o risco de desenvolvimento de melanomas seja 2.000 vezes maior que o risco da população geral. Reconhece-se atualmente que a exposição ao sol (e, portanto a radiação ultravioleta) é o fator ambiental isolado mais importante para o desenvolvimento de melanomas². O risco de desenvolvimento de melanomas em indivíduos com baixa capacidade de bronzeamento ou que apresentem nevos displásicos (esporádicos) parece ser modificado pela capacidade de reparo de DNA⁴². De fato, indivíduos com nevos displásicos e melanomas apresentam menor capacidade de reparo de DNA do que indivíduos que apresentam somente nevos displásicos; contudo não parece haver diferenças entre indivíduos com nevos displásicos e indivíduos normais quanto à suscetibilidade a diferentes mutagênicos⁴².

O ESCAPE DE MELANÓCITOS E MELANOMAS DA EPIDERME

Como mencionado anteriormente, os melanócitos, normalmente, distribuem-se na epiderme e em folículos pilosos, nos quais interagem diretamente com queratinócitos. Na epiderme, os melanócitos normais estão em contato com a membrana basal, um tipo especializado de matriz extracelular constituído principal e especificamente de heparan-sulfato proteoglicano (perlecan), colágeno IV e lamininas e que separa o extrato epidérmico da derme. É freqüente o en-

contro de melanócitos névicos quiescentes na derme; células de melanomas de crescimento radial, geralmente encontradas na epiderme, na qual se verificam células de melanoma em proliferação ativa também podem ser encontradas na derme e na qual, como no caso dos melanócitos névicos, não apresentam capacidade proliferativa detectável (diagnostica-se aí o melanoma de crescimento radial microinvasivo). Células de melanoma em fase de crescimento vertical e melanomas metastáticos são encontrados na derme, proliferando ativamente. O achado de células das diferentes fases de progressão na derme mostra que, embora necessária para a progressão, a capacidade migratória dos melanócitos transformados não é suficiente para o estabelecimento da metástase.

A transmigração dos derivados de melanócitos da epiderme para a derme requer a diminuição de expressão de E-caderinas que está acoplada, por mecanismos ainda não completamente elucidados a um aumento da secreção de metaloproteinases capazes de degradar a membrana basal, condição necessária para o deslocamento de células da epiderme para a derme. A expressão de metaloproteinases parece ser controlada transcricionalmente por Tcf/LEF, como já foi discutido. A migração dos melanócitos transformados para a derme é mediada por integrinas, que podem agir como receptores de elementos da matriz extracelular. A migração pela membrana basal proteolizada parece ser mediada por integrinas que reconhecem a glicoproteína laminina. Nessa condição, parece que as integrinas $\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha 7 \beta 1$ são os principais efetores da saída de derivados de melanócitos da epiderme para a derme^{6,14, 40,55}.

Na derme, a resposta proliferativa e migratória dos melanócitos névicos e de melanomas em fase de crescimento radial parece ser bastante discreta. Essas células caracterizam-se por expressarem FGF-2 que mais parece associado à sobrevivência delas (resistência à apoptose), do que atuando como fator mito e motogênico. Já as células de melanoma, em fase de crescimento vertical, apresentam-se em proliferação e ativa migração pelo estroma intersticial. Nesse novo ambiente, a integrina que parece mediar a resposta migratória dessas células transformadas é o receptor de vitronectina, $\alpha_v \beta 3$. De maneira independente, a expressão da integrina $\alpha_v \beta 3$ é um dos principais fatores preditivos de prognóstico, estando associado ao caráter localmente invasivo de melanomas^{13,50}.

Essa integrina é expressa em compartimentos especializados da membrana da célula migratória. A integrina se concentra no pólo

anterior das células de melanoma que migram por matrizes complexas. Esse pólo tem sido chamado de invadopódio. Sua função não é restrita à resposta migratória. Além de mediar a migração, essa integrina funciona como um co-receptor do receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase. Há evidências da formação de complexos ternários entre o receptor do ativador de plasminogênio, o pró-ativador de plasminogênio e a integrina. Nesse complexo, parece haver a ativação de pró-uPA em uPA, que atua como a serino-protease que converte plasminogênio em plasmina que, por sua vez, ativa as pró-metaloproteinases em metaloproteinases⁵. Assim, a matriz extracelular vai sendo remodelada e permite a invasão progressiva das células de melanoma.

A proteólise da matriz extracelular está associada a um segundo fenômeno. Há uma série de fatores de crescimento residentes na matriz extracelular. Com a proteólise, esses fatores são liberados e disponibilizados para exercer sua função. Entre esses fatores, classicamente são citados membros da família de FGF, como o FGF-2 que além de induzir a proliferação de células de melanoma (fase de crescimento vertical e melanoma metastático) é um potente agente angiogênico. Uma vez liberados, esses fatores ativam a proliferação e a invasão de células endoteliais que permeiam a massa tumoral, formando os vasos neoformados, cuja principal função é a de levar nutrientes para as células proliferativas dos melanomas.

INDUÇÃO SUSTENTADA DE ANGIOGÊNESE E METÁSTASES

Acredita-se que as células tumorais possam proliferar até formar uma massa de 1mm^3 , ou 10^6 células, sem que haja a permeação da massa tumoral por vasos sanguíneos ou linfáticos. Níveis de detecção clínica são cerca de três ordens de grandeza maiores do que esses valores. Admite-se que as técnicas atuais de imagem possam detectar massas de 500 a 1.000mm^3 (1cm^3) que seriam constituídas de cerca de 10^9 células. A expansão da população tumoral a níveis clinicamente detectáveis pressupõe, necessariamente, a infiltração do tumor por vasos neoformados. Melanomas produzem diferentes polipeptídeos capazes de induzir a formação de vasos linfáticos e sanguíneos, que uma vez formados anastomosam-se com capilares já existentes garantindo, assim, o influxo de nutrientes para a massa tumoral. Os principais fatores angiogênicos são VEGFs e FGF-2, que induzem tan-

to a linfangiogênese quanto a angiogênese. Além da oferta de nutrientes, outras células podem estar sendo trazidas para o microambiente dos tumores por esses vasos neoformados. Aí se destacam diferentes elementos do sistema imune inato e específico que influenciam a progressão para a metástase¹².

Da mesma forma que esses vasos neoformados canalizam o influxo de células para o tumor, eles podem mediar o efluxo de células tumorais para o organismo, consistindo em via de escape para a metastatização. Admite-se que os vasos neoformados têm membranas basais incompletas, o que facilitaria sua invasão pelas células tumorais (um processo chamado de intravasamento). Isso parece ser particularmente verdadeiro no caso de melanomas, nos quais se caracterizou um fenômeno que vem sendo chamado de mimetismo vasculogênico⁴⁷. Há evidências experimentais de que as células de melanoma interagem especificamente com células endoteliais, formando vasos ou “lacunas” venolinfáticas cujas paredes são compostas de complexos de células endoteliais e tumorais. Nessa situação, o revestimento do vaso é formado, também, pela própria célula tumoral. Esse fenômeno depende da expressão de caderinas (provavelmente N-caderinas) pelas células tumorais e endoteliais. Além das caderinas, as células endoteliais de vasos neoformados também expressam $\alpha v \beta 3$ integrinas^{7,19}. Essa observação é a base para a utilização de anticorpos específicos contra essa integrina em abordagens antiangiogênicas. O bloqueio da função normal dessa integrina em células endoteliais está associado à apoptose da célula endotelial, após disrupção das interações com a matriz extracelular⁴.

Dessa maneira, células tumorais ganhariam fácil acesso ao sistema linfático-venoso, o que facilitaria sua disseminação. É necessário enfatizar que o grande número de anastomoses linfático-venosas em nosso organismo permite o livre trânsito de células de um sistema para outro, assim, é inválido afirmar que a rota de transporte de células que metastatizam por via linfática é o vaso linfático e que a rota de transporte de células que metastatizam por via hematogênica é o vaso sangüíneo. O achado de metástases linfáticas é mais decorrência da capacidade da célula tumoral de proliferar adequadamente no microambiente do linfonodo do que decorrência da via de acesso utilizada. A capacidade de metastatização para diferentes territórios dependerá, então, da capacidade da célula de interagir com moléculas de adesão território-específicas, favorecendo a parada da célula no leito vascular do órgão que vai ser invadido, justificando, em parte,

o tropismo de metástases para órgãos específicos como os pulmões por exemplo²¹; da capacidade de produzir fatores autócrinos que garantam a proliferação da célula tumoral; da resistência a fatores anti-proliferativos ou citotóxicos (por exemplo, radicais livres, como NO – produzido pela célula endotelial); e da resposta a fatores teciduais específicos que favoreçam a proliferação celular no órgão ou no linfonodo que é sede da metástase. Das moléculas território-específicas associadas à parada de melanomas no leito vascular, destaca-se a integrina $\alpha 4\beta 1$, expressa em melanomas e que interage com a molécula de adesão de endotélios, VCAM (“vascular cell adhesion molecule”)^{6,63}. Há evidências de que células de melanoma apresentam um processo de rolamento sobre endotélios ativados, como ocorre no extravasamento fisiológico de leucócitos^{20,46}. Ainda, o CD44, um proteoglicano facultativo que também é expresso em diferentes leucócitos e atua como receptor de ácido hialurônico, é anormalmente superexpresso em melanomas metastáticos^{39,43}.

De fato, há ainda vários antígenos carboidrato-dependentes expressos em melanomas como dissialogangliosídeos^{18,33,62} e condroitim-sulfato proteoglicanos^{36,37}, cuja função é pouco conhecida. Esses antígenos parecem estar associados à progressão tumoral, uma vez que seus níveis vão gradualmente aumentando das lesões precursoras para as metastáticas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

MELANOMAS COMO MICROAMBIENTES – NOVOS ALVOS PARA TERAPIA

Como ocorre em diferentes tumores, fica claro que o desenvolvimento de melanomas é consequência da disfunção de múltiplos genes associados à manutenção da homeostasia celular – funções como: proliferação, sobrevivência e morte celular, reparo de DNA. Claramente, não existe uma via que leva ao desenvolvimento de melanomas, mas algumas vias de sinalização que parecem ser primordiais como as discutidas ao longo deste capítulo. Algumas das moléculas discutidas têm sido úteis como indicadoras de prognóstico e porque permitiriam a definição mais precisa de risco relativo de evolução de lesões precursoras ou, ainda, porque permitiriam o diagnóstico precoce nos casos de predisposição familiar reconhecida. O estudo de melanomas permite-nos também recapitular a importância crescente que o con-

ceito de tumores como microambientes vem assumindo em Oncologia Experimental. A noção de que os tumores são constituídos não só por células tumorais, cujo genoma é provavelmente instável, mas, também, por células normais como as células endoteliais e as células inflamatórias tem aberto um número de perspectivas terapêuticas, ainda em experimentação, antes impensáveis. Espera-se que, desses conceitos, possam emergir propostas eficientes para o controle da progressão dos melanomas, como propostas de angiostáticos e eventuais imunoterapias.

Agradecimentos – Os autores recebem apoio da FAPESP (97/13100-9, 00/14812-7, 01/11678-0), CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barth AI, Nathke IS & Nelson, WJ – Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 683-690.
2. Bataille V, Snieder H, MacGregor AJ, Sasieni P & Spector TD – Genetics of risk factors for melanoma: an adult twin study of nevi and freckles. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 457-463.
3. Birchmeier W & Behrens J – Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 11-26.
4. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M et al – Integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157-1164.
5. Brooks PC, Stromblad S, Sanders L et al – Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha v \beta 3$. *Cell* 1996; 85: 683-693.
6. Chammass R & Brentani RR – Integrins and metastases: an overview. *Tumor Biol* 1991; 12: 309-320.
7. Cheresch DA – Death to a blood vessel, death to a tumor. *Nature Medicine* 1998; 4(4): 395-396.
8. Chin L – Modeling malignant melanoma in mice: pathogenesis and maintenance. *Oncogene* 1999; 18: 5304-5310.
9. Clark WH – Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 1991; 64: 631-644.
10. Clark Jr WH, Elder DE, Guerry D et al – A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15: 1147-1165.
11. Clark Jr WH, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM & Mastrangelo MJ – Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol* 1978; 114:732-738.
12. Coussens LM & Werb Z – Inflammatory cells and cancer: think different! *J Exp Med* 2001; 193: F23-F26.
13. Danen EH, Jansen KF, van Kraats AA et al – Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. *Int J Cancer* 1995; 61: 491-496.
14. Danen EH, van Muijen GN, van de Wiel-van K et al – Regulation of integrin-mediated adhesion to laminin and collagen in human melanocytes and in non-metastatic and highly metastatic human melanoma cells. *Int J Cancer* 1993; 54: 315-321.
15. De Cristan G, Morbidelli L, Alessandri G et al – Synergism between gangliosides and basic fibroblastic growth factor in favouring survival, growth, and motility of capillary endothelium. *J Cell Physiol* 1990; 144: 505-510.
16. De Wit PE J, van Muijen GNP, de Waal RNW & Ruiter DJ – Pathology of malignant melanoma, including new markers and techniques in diagnosis and prognosis. *Curr Op Oncol* 1996; 8: 143-151.
17. Elder D – Tumor progression, early diagnosis and prognosis of melanoma. *Acta Oncol* 1999; 38: 535-547.
18. Elder DE, Rodeck U, Thurin J et al – Antigenic profile of tumor progression stages in human melanocytic nevi and melanomas. *Cancer Res* 1989; 49: 5091-5096.
19. Eliceiri BP & Cheresch DA – Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J Sci Am (Suppl 3)*: 2000; 6: S245-S249.

20. Giavazzi R, Foppolo M, Dossi R & Remuzzi, A – Rolling and adhesion of human tumor cells on vascular endothelium under physiological flow conditions. *J Clin Invest* 1993; 92: 3038-3044.
21. Goetz DJ, el Sabban ME, Hammer DA & Pauli BU – Lu-ECAM-1-mediated adhesion of melanoma cells to endothelium under conditions of flow. *Int J Cancer* 1996; 65: 192-199.
22. Goldstein AM, Dracopoli NC, Engelstein M et al – Linkage of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 489-496.
23. Gottardi CJ, Wong E & Gumbiner BM – E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol* 2001; 153: 1049-1060.
24. Halaban R – Molecular correlates in the progression of normal melanocytes to melanomas. *Sem Cancer Biol* 1993; 4: 171-181.
25. Halaban R – Melanoma cell autonomous growth: the Rb/E2F pathway. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 333-343.
26. Halaban R – The regulation of normal melanocyte proliferation. *Pigment Cell Res* 2000; 13: 4-14.
27. Halaban R, Cheng E, Smicun Y & Germino J – Deregulated E2F transcriptional activity in autonomously growing melanoma cells. *J Exp Med* 2000; 191: 1005-1016.
28. Hanahan D & Weinberg RA – The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
29. Hayward NK – The current situation with regard to human melanoma and genetic inferences. *Curr Opin Oncol* 1996; 8: 136-142.
30. Henderson BE, Ross RK & Pike MC – Toward the primary prevention of cancer. *Science* 1991; 254: 1131-1138.
31. Henderson RA & Finn OJ – Human tumor antigens are ready to fly. *Adv Immunol* 1996; 62: 217-256.
32. Herlyn M, Berking C, Li G & Satyamoorthy, K – Lessons from melanocyte development for understanding the biological events in naevus and melanoma formation. *Melanoma Res* 2000; 10: 303-312.
33. Herlyn M, Thurin J, Balaban G, Bennicelli JL et al – Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression. *Cancer Res* 1985; 45: 5670-5676.
34. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M et al – E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 2000; 156: 1515-1525.
35. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR & Herlyn M – Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1: 188-194.
36. Iida J, Meijne AML, Knutson JR, Furcht LT & McCarthy JB – Cell surface chondroitin sulfate proteoglycans in tumor cell adhesion, motility and invasion. *Sem Cancer Biol* 1996; 7: 155-162.
37. Iida J, Pei D, Kang T et al – Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan regulates matrix metalloproteinase-dependent human melanoma invasion into type I collagen. *J Biol Chem* 2001; 276: 18786-18794.
38. Johnson JP – Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1999; 18: 345-357.
39. Knutson JR, Iida J, Fields GB & McCarthy JB – CD44/chondroitin sulfate proteoglycan and alpha2beta1 integrin mediate human melanoma cell migration on type IV collagen and invasion of basement membranes. *Mol Biol Cell* 1996; 7:383-396.
40. Kramer RH, McDonald KA, Crowley E, Ramos DM & Damsky CH – Melanoma cell adhesion to basement membrane mediated by integrin-related complexes. *Cancer Res* 1989; 49: 393-402.
41. LaBonne C & Bronner-Fraser M – Molecular mechanisms of neural crest formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:81-112.
42. Landi MT, Baccarelli A, Calista D, Fears TR & Landi G – Glucocorticoid use and melanoma risk. *Int J Cancer* 2001; 94: 302-303.
43. Lesley J, Hyman R, English N, Catterall JB & Turner GA – CD44 in inflammation and metastasis. *Glycoconjugate Journal* 1997; 14: 611-622.
44. Li G & Herlyn M – Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today* 2000; 6:163-169.
45. Lynch HT, Frichot III, BC & Lynch JF – Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978; 15: 352-356.
46. Ma YQ & Geng JG – Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow. *J Immunol* 2000; 165: 558-565.
47. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS & Hendrix MJ – Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752.
48. Mareel M, Vleminckx K, Vermeulen S, Bracke M & van Roy F – E-cadherin expression: a counterbalance for cancer cell invasion. *Bull Cancer* 1992; 79: 347-355.

49. Mattei S, Colombo MP, Melani C et al – Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes. *Int J Cancer* 1994; 56: 853-857.
50. McGregor BC, McGregor JL, Weiss LM et al – Presence of cytoadhesins (IIb-IIIa-like glycoproteins) on human metastatic melanomas but not on benign melanocytes. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 495-499.
51. Miracco C, Pacenti L, Santopietro R et al – Detection of telomerase activity and correlation with mitotic and apoptotic indices, Ki-67 and expression of cyclins D1 and A in cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2000; 88: 411-416.
52. Nugent MA & Iozzo RV – Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000; 32: 115-120.
53. Perl A-K, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H & Christofori G – A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998; 392: 190-193.
54. Platz A, Ringborg U & Hansson J – Hereditary cutaneous melanoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10: 319-326.
55. Ramos DM, Berston ED & Kramer RH – Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells. *Cancer Res* 1990; 50: 728-734.
56. Ranade K, Hussussian CJ, Sikorski RS et al – Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nat Genet* 1995; 10: 114-116.
57. Robbins PF, El Gamil M, Li Y F, Kawakami Y et al – A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 183: 1185-1192.
58. Rocco JW and Sidransky D – p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001; 264: 42-55.
59. Rubinfeld B, Robbins P, El Gamil M et al – Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275: 1790-1792.
60. Rudolph P, Schubert C, Tamm S et al – Telomerase activity in melanocytic lesions: a potential marker of tumor biology. *Am J Pathol* 2000; 156: 1425-1432.
61. Spritz RA – Piebaldism, Waardenburg syndrome, and related disorders of melanocyte development. *Semin Cutan Med Surg* 1997; 16: 15-23.
62. Thurin J, Thurin M, Herlyn M et al – GD2 ganglioside biosynthesis is a distinct biochemical event in human melanoma tumor progression. *FEBS Lett* 1986; 208: 17-22.
63. Varner JA & Cheresch DA – Integrins and cancer. *Curr Op Cell Biol* 1996; 8: 724-730.
64. Vasen HF, Gruis NA, Frants RR et al – Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden). *Int J Cancer* 2000; 87: 809-811.
65. Wang Y & Becker D – Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med* 1997; 3: 887-893.
66. Yang FC, Merlino G & Chin L – Genetic dissection of melanoma pathways in the mouse. *Semin Cancer Biol* 2001; 11: 261-268.