

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES APOPTÓTICOS EM LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO FRENTE TRATAMENTO COM 5'-Te-(fenil) -3-(amino)-timidina

**IZADORA PETER FURTADO¹; FERNANDA SEVERO SABEDRA SOUSA²;
VICTORIA MASCARENHAS BORBA²; CLEOMAR DA SILVA²; OSCAR E.D.
RODRIGUES³;FABIANA K. SEIXAS²**

^{1,2} Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular – Laboratório de Biotecnologia do Câncer
- izapfurtado@gmail.com; nandinha_sousa4@hotmail.com; victoriamborba@gmail.com;
clleos@hotmail.com; seixas.fk@gmail.com

³Universidade Federal de Santa Maria - LabSelen-NanoBio - Departamento de Química

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele tipo melanoma atinge os melanócitos, células localizadas no estrato basal da epiderme e responsáveis pela produção do pigmento melanina. De modo geral, estas neoplasias atingem majoritariamente a epiderme, no entanto, estão propensas a afetar regiões como olhos e mucosas. Apesar de representar apenas 3% dos casos totais de câncer no Brasil (INCA, 2019), o câncer de pele tipo melanoma merece atenção devido ao fato de demonstrar ser um dos tipos tumorais com maior propensão a rápida metástase e resistência a tratamentos (COUTO, 2019). A detecção da doença em estágio inicial é fundamental para revelar o estadiamento das neoplasias e o prognóstico do paciente, além de uma melhor definição de abordagem terapêutica.

A quimioterapia para estágios mais avançados tem sido o tratamento mais utilizado, sendo que fármacos como a dacarbazina, temozolomida, análogos de platina, alcaloides da vinca e taxanos antineoplásicos são amplamente indicados, no entanto a baixa eficácia e as altas taxas de resistência têm se mostrado como problemas no tratamento (GARBE, 2011). Neste sentido, a busca por compostos mais eficientes terapeuticamente tem se tornado interessante. Dentro deste contexto, a molécula de azidotimidina (AZT) surgiu, inicialmente, em testes de avaliação antitumoral, porém devido seu potencial não tão promissor acabou por ser destinado a outros testes, tornando-se posteriormente o fármaco padrão para tratamento contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (FISCHL, 1987). Assim sendo, como forma de potencializar sua possível ação antitumoral, organocalcogênios têm sido inseridos na molécula de AZT e testados em ensaios *in vitro* (DE SOUZA, 2012).

Os compostos organocalcogênios, aqueles que contém em sua estrutura elementos como telúrio, selênio e enxofre, têm despertado a atenção da comunidade científica por demonstrarem atividades antioxidantes e antitumorais frente linhagem celulares de bexiga e pulmão(SOUZA, 2015; ROSA, 2017). Além disso, a capacidade de compostos organocalcogênicos contendo telúrio como substituinte de induzirem apoptose e imunomodulação em células leucêmicas também foram demonstradas (SREDNI, 2012; ABONDANZA, 2008).

A morte celular programada, ou apoptose, é um mecanismo celular responsável pela morte controlada das células com a finalidade de manter a homeostase entre renovação e morte celular. A desregulação no processo de apoptose pode gerar distúrbios na célula e está relacionada com diversas patologias, dentre elas o câncer (ELMORE. 2007). Sendo assim, a habilidade de modular este processo celular apresenta grande potencial no desenvolvimento de novas terapias oncológicas

Desse modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes relacionados com a apoptose em células de melanoma metastático humano após tratamento com a molécula 5'-Te-(fenil) -3-(amino)-timidina.

2. METODOLOGIA

2.1. Síntese da molécula

A molécula 5'-Te-(fenil) -3-(amino)-timidina (3j) foi sintetizada de acordo com Rosa, 2017 pelo grupo de pesquisa LabSelen NanoBio pertencente à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). O composto 3j foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 25µg para a realização das análises.

2.2. Cultivo Celular e Tratamento das células

A linhagem celular de melanoma metastático (WM1366) foi cultivada em meio Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em condições de cultivo controladas a 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados em triplicata com as células em fase logarítmica de crescimento. Quando atingida a confluência, as células foram semeadas em placas de 6 poços, a uma densidade de 2 x 10⁵ células por poço e mantidas em estufa por 24h para que crescessem em monocamada. Posteriormente, foi feito o tratamento da linhagem com o composto 3j na concentração de 25µg e incubação por 48h.

2.3. Extração de RNA, confecção de cDNA e PCR em tempo real

Para extração de RNA total, as células foram desaderidas dos poços e armazenadas em tubos, seguindo protocolo TRIzol® Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA). A quantificação das amostras para medição de valores de concentração e pureza foi feita através de espectrometria com luz UV, utilizando equipamento NanoVue, para posterior confecção de cDNA (DNA complementar) com uso do kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA) a partir de 2µl de RNA. A avaliação da expressão dos genes p53, Bax, Casp-3, Casp-9 e Bcl-2 foi realizada pela amplificação destes utilizando os primers específicos, através da técnica de PCR em tempo real (qPCR).

2.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 7.0. Os dados obtidos foram analisados através de ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os valores de P < 0.05 foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de expressão dos genes pró-apoptóticos p53, Bax, Casp-3 e Casp-9 e do gene anti-apoptótico Bcl-2 na linhagem celular WM1366 tratada com o composto 3j apresentaram diferença estatística em comparação com as células controle, evidenciando a expressão proeminente do gene p53.

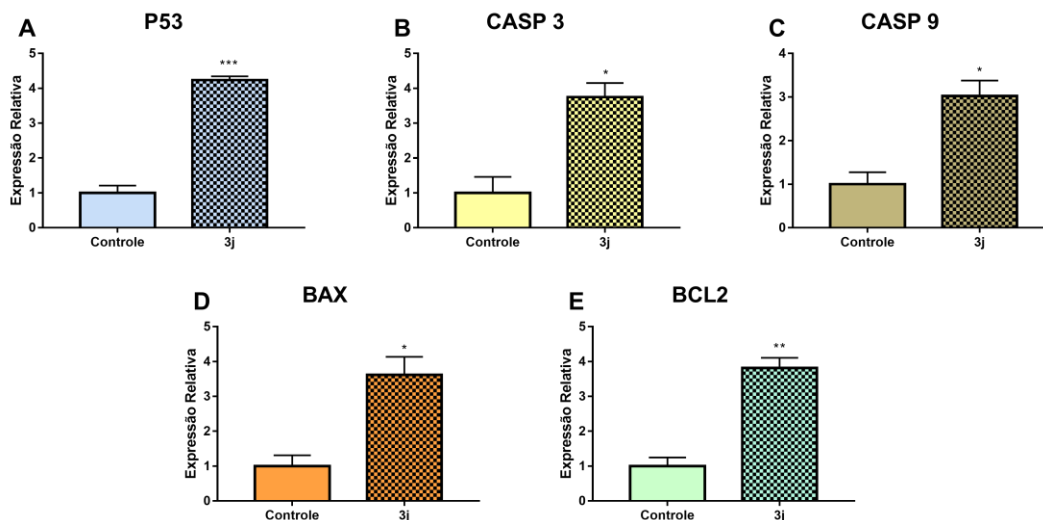


Figura 1: Avaliação da expressão relativa de genes pró e anti-apoptóticos em células WM1366 após tratamento com composto 3j por 48h. (A) gene p53; (B) gene Casp-3; (C) gene Casp-9; (D) gene Bax e (E) gene Bcl-2. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias, seguidas pelo teste de Tukey. Os valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

O gene p53 é responsável por codificar a proteína essencial na regulação da proliferação celular após danos irreparáveis no DNA, desencadeando o processo de apoptose (BØRRESEN-DALE, 2003). Além disso, regula a expressão de genes membros da família anti-apoptótica, como o gene Bcl-2. A expressão positiva desse gene se contrapõe a expressão do gene Bax, seu antagonista de caráter pró-apoptótico (YOULE, 2008; GHIBELLI, 2010). Esses fatores evidenciam a expressão do gene p53 e a mobilização dessas rotas pode indicar que o processo de apoptose está sendo prevenido, pela expressão de Bcl-2, e ao mesmo tempo induzido, pelo resultado de expressão de Bax.

O gene Casp9 é responsável pela expressão da proteína caspase-9, a qual desencadeia uma cascata de reações de outras caspases responsáveis pela morte celular programada. Essa proteína inicia a clivagem proteolítica no ambiente celular e ativa outras (MCILWAIN, 2013). Já o gene Casp-3 codifica a proteína chamada caspase-3, uma caspase executora que, quando ativada, segue a cascata proteolítica e promove a degradação de proteínas do DNA cromossomal, ocasionando a perda da integridade da célula (ELMORE, 2007). A presença da expressão destes genes pode indicar que a linhagem tratada com o composto 3j ativou a via de caspases 3 e 9 para indução de apoptose.

O mecanismo de morte celular programada pode ocorrer de através de duas vias de sinalização distintas: extrínseca e intrínseca. A primeira delas, também chamada via dos receptores de morte celular, está relacionada ao desencadeamento da apoptose devido a fatores externos através de sinais extracelulares provindos de proteínas sinalizadoras e seus respectivos receptores localizados na membrana celular. Por outro lado, a via intrínseca (ou via da mitocôndria) é ativada por fatores internos (intracelulares), como danos no DNA. Essa via é regulada pela expressão de genes Bcl-2 e Bax, de modo que a expressão destes no presente estudo demonstram que a provável via de sinalização ativada no qual o composto apresenta seu efeito é a via intrínseca (ELMORE, 2007).

4. CONCLUSÕES

Tendo em vista os dados obtidos neste trabalho, foi possível elucidar e avaliar a expressão de genes envolvidos no processo de apoptose células submetidas ao tratamento com a molécula 5'-Te-(fenil) -3-(amino)-timidina, de modo a indicar uma indução de morte celular por apoptose por este composto

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abondanza, T. S. Oliveira, C. R. Barbosa, C. M. Pereira, F. E. Caires, A. C. Comasseto, J. V. Queiroz, M. L. Valadares, M. C. Bincoletto, M. C. Bcl-2 expression and apoptosis induction in human HL60 leukaemic cells treated with a novel organotellurium(IV) compound RT-04. **Food Chem Toxicol.** V.46, n.7, p. 2540-2545, 2008.
- Børresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. **Hum Mutat** (2003) doi:10.1002/humu.10174
- Couto GK, Segatto NV, Oliveira TL, Seixas FK, Schachtschneider KM and Collares T (2019) The Melding of Drug Screening Platforms for Melanoma. **Front. Oncol.** 9:512. doi: 10.3389/fonc.2019.00512
- De Souza D. Síntese E Atividades Antioxidante E Antitumoral De 5 Arilseleno Azidotimidina. (2012)
- Eggermont AMM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. **Lancet.** (2014) 383:816–27. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60802-8
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol** (2007) doi:10.1080/01926230701320337
- Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, Gottlieb MS, Volberding PA, Laskin OL, Leedom JM, Groopman JE, Mildvan D, Schooley RT, et al. The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. **N Engl J Med** (1987) doi:10.1056/NEJM198707233170401
- Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, Kirkwood JM. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. **Oncologist** (2011) doi:10.1634/theoncologist.2010-0190
- Ghibelli L, Diederich M. Multistep and multitask Bax activation. **Mitochondrion** (2010) doi:10.1016/j.mito.2010.08.003
- INCA, Instituto Nacional do Câncer, 2018. Online Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 05/09/19.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol** (2013) 5:1–28. doi:10.1101/cshperspect.a008656
- Rosa, R.M. Piccoli, B.C. Silva, F.D.A. Dornelles, L. Rocha, J.B.T. Sonego, M.S. Begnini, K.R. Collares, T. Seixas, F.K. O. E. D. Rodrigues. Synthesis, antioxidant and antitumoral activities of 5'-arylchalcogeno-3-aminothymidine (ACAT) derivatives. **Med. Chem. Commun**, v.8, p.408–414, 2017.
- Sredni, B. Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. **Semin. Cancer Biol.** v.22, n.1, p.60-69, 2012
- Souza, D. Mariano, D.O.C. Nedel, F. Schultze, E. Campos, V.F. Seixas, F. Silva, R.F. Munchen, T.S. Ilha, V. Dornelles, L. Braga, A.L. Rocha, J.B.T. Collares, T. Rodrigues, O.E.D. New Organochalcogen Multitarget Drug: Synthesis and Antioxidant and Antitumoral Activities of Chalcogenozidovudine Derivatives. **J. Med. Chem**, v.58, n.8, p.3329–3339, 2015.
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol** (2008) doi:10.1038/nrm2308