

MARIA INÊS AZEVEDO RIBEIRO LABORINHO

**PAPEL DO Ca^{2+} NOS MECANISMOS CELULARES
ENVOLVIDOS NA METASTIZAÇÃO**

Orientador: Professor Doutor Nuno Saraiva

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa
2020**

MARIA INÊS AZEVEDO RIBEIRO LABORINHO

**PAPEL DO Ca²⁺ NOS MECANISMOS CELULARES
ENVOLVIDOS NA METASTIZAÇÃO**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 15 de Junho de 2020, perante o júri nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 65/2020 de 19 de Fevereiro de 2020, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^ª. Doutora Ana Sofia Fernandes

Orientador:

Professor Doutor Nuno Saraiva

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2020

AGRADECIMENTOS

Ao entregar esta dissertação agradeço às pessoas que mais contribuíram para o meu sucesso ao longo de todo este longo percurso.

Agradeço ao Professor Doutor Nuno Saraiva pela sua orientação, motivação, disponibilidade ao longo deste processo, bem como por todos os conhecimentos transmitidos durante o percurso académico.

Agradeço ao Doutor Nuno Almeida pela ajuda laboratorial prestada assim como por toda disponibilidade no fornecimento de informação teórica.

Agradeço aos meus pais pela motivação que sempre me transmitiram ao longo deste percurso, assim como toda a dedicação, amor, carinho e confiança depositada em mim e pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão pela descontração contagiante que tanta falta me fazia. Apesar de muito cabeça no ar sempre me ajudou muito no meu percurso estando disponível para me ouvir e auxiliar da melhor forma.

Às minhas avós que sei que estão a olhar por mim cheias de orgulho pelo que conquistei.

Ao meu Pu que sempre esteve ao meu lado nunca desistindo nem me deixando desistir, tendo sido um grande apoio ao longo de todos estes anos e muitas vezes a minha salvação.

Às minhas TRIIA que foram o meu apoio nos bons e maus momentos, sempre prontas para me dar força para enfrentar as fases menos boas e também para me dar na cabeça quando foi preciso.

À minha prima Joana que me apoiou em tudo o que podia, e que sempre esteve ao meu lado sendo uma das minhas maiores ajudas ao longo deste percurso.

À minha Navidad, a minha companheira de todas as horas, pelas razões que eu e ela bem sabemos e ao Benuron pela sua incondicional dedicação.

A todos os colegas e amigos que a faculdade me trouxe. Ensinaram-me muitas lições e melhor ou pior conseguimos alcançar o objetivo que tínhamos em comum. Sem vocês não seria possível e apesar de não os conseguir nomear a todos sei que sabem que esta mensagem é para vós, assim como este gigante agradecimento.

Na impossibilidade de agradecer individualmente, fica um obrigada a todos os outros que durante estes anos se cruzaram no meu caminho e de uma forma ou outra contribuíram para o seu sucesso.

RESUMO

O processo de metastização compreende várias etapas sequenciais tais como alterações da migração e adesão célula-célula, degradação e invasão da membrana basal, intravasamento, sobrevivência na corrente sanguínea, extravasamento, formação de micrometástases, angiogénese e crescimento secundário de tumores.

O Ca^{2+} é um regulador fundamental da migração celular. Em determinados tipos de cancro, há desregulação dos canais e proteínas que regulam os fluxos intracelulares deste ião. Estas alterações têm sido implicadas na motilidade, metabolismo celular e proliferação celular, bem como na produção de espécies reativas de oxigénio. Uma parte importante da investigação que avalia as vias de sinalização de Ca^{2+} e a sua relevância no cancro, concentra-se em determinar mudanças aos níveis da expressão de proteínas responsáveis pela regulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} , como é exemplo a proteína anti-apoptótica do Golgi (GAAP). Este canal de iões inibe a apoptose e promove a adesão e migração de células.

O trabalho realizado teve como principal objetivo o estudo do impacto da expressão da GAAP no processo de sobrevivência celular a diferentes pHs. Para tal foi testada a viabilidade celular (através do ensaio de Cristal Violeta) de linhas celulares de osteossarcoma e cancro de mama com níveis basais ou com sobreexpressão de GAAP quando mantidas em cultura em meios com vários pHs. As linhas celulares foram mantidas por um curto período (4 dias) ou por um longo período (2 ou 3 semanas) a pHs com valores entre os 6.6 e os 7.8.

Foi possível verificar que com pH do meio mais elevados, as células controlo têm tendência a morrer ao fim de períodos longos em cultura sem troca de meio, no entanto as linhas celulares que sobreexpressam a hGAAP apresentam uma maior capacidade de sobrevivência. Estas quando em comparação com as outras demonstram uma maior sobrevivência quando submetidas a um ambiente desfavorável, o que permite concluir que a sua sobreexpressão confere proteção às células a pHs mais altos.

ABSTRACT

The metastasis process comprises several sequential steps, including changes in cell-cell migration and adhesion, degradation and invasion of the basement membrane, intravasation, survival in the bloodstream, extravasation, formation of micro metastases, angiogenesis and secondary growth of tumors.

Ca^{2+} is a fundamental regulator of cell migration. In certain types of cancer, dysregulation of the channels and proteins that regulate the intracellular flows of this ion occurs. These changes seem to influence motility, cell metabolism and cell proliferation, as well as the production of reactive oxygen species. An important part of the research that evaluates Ca^{2+} signaling pathways and their relevance in cancer focuses on determining changes in the expression levels of proteins responsible for regulating intracellular Ca^{2+} concentrations, such as the Golgi Anti-Apoptotic Protein (GAAP). This is an ion channel that inhibits apoptosis and promotes cell adhesion and migration.

This study investigates the impact of GAAP expression levels and pH conditions of the medium on cell survival. Thus, we analyzed cell viability (through the Crystal Violet assay) of osteosarcoma and breast cancer cell lines, comparing GAAP overexpression to baseline levels, when cells are exposed to different pH conditions. Cell lines were maintained for a short period (4 days) or for a long period (2 or 3 weeks) at pH values ranging between 6.6 and 7.8.

It was found that as the pH increases, cells expressing normal levels of hGAAP tend to die after long periods in culture without medium changes, whilst cells overexpressing the protein showed greater ability to survive. The latter demonstrate greater survival when subjected to an unfavorable environment, which allows us to conclude that hGAAP overexpression provides protection to cells at higher pHs.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS

Ca²⁺ - Cálcio

CTC – Células Tumorais Circulantes

EMT – Transição Epitelial – Mesenquimal

GAAP – Proteína Anti-Apoptótica do Golgi

hGAAP – Proteína Humana Anti-Apoptótica do Golgi

IP3 – Inositol Trifosfato

MEC – Matriz Extracelular

MMPs – Metaloproteinases de Matriz

ORAI1 – Canal Proteico 1 de Libertação de Cálcio Ativado por Cálcio

RE – Retículo Endoplasmático

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio

SOCE – Store-Operated Calcium Entry

SOCs – Store-Operated Calcium Channels

STAT3 – Sinal de Transdução e Ativação da Transcrição 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)

STIM1 – Molécula 1 de Interação Estromal

TME – Microambiente do Tumor

TRP – Potencial Recetor Transitório

vGAAP - Proteína Viral Anti-Apoptótica do Golgi

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E ACRÓNIMOS	VII
ÍNDICE GERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	X
I. INTRODUÇÃO	11
1. CANCRO	11
2. METASTIZAÇÃO.....	12
3. MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS	18
4. PAPEL DO Ca ²⁺ NA METASTIZAÇÃO.....	22
5. GOLGI ANTI-APOPTOTIC PROTEIN	28
6. OBJETIVO	31
II. MÉTODOS	32
1. CULTURA CELULAR	32
2. VIABILIDADE CELULAR	34
III. RESULTADOS	35
1. VIABILIDADE.....	35
IV. CONCLUSÃO / DISCUSSÃO	38
V. BIBLIOGRAFIA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Características do Cancro.....	12
Figura 2 – Percentagem de casos de Cancro da Mama por estadio.....	13
Figura 3 – Sobrevivência relativa de mulheres com Cancro da Mama num intervalo de 5 anos (2009 – 2015) diferenciado por estadio tumoral.....	14
Figura 4 – Impacto do ambiente ácido de um tumor em diferentes etapas da formação de metástases.....	15
Figura 5 – Representação do processo metastático.....	16
Figura 6 – O processo metastático.....	17
Figura 7 - Mecanismos de migração celular.....	19
Figura 8 – Representação esquemática das principais vias de influxo / efluxo / libertação / receção de cálcio envolvidas na regulação da homeostase do Ca^{2+} em células de mamíferos e suas proteínas associadas.....	25
Figura 9 – Principais mecanismos da regulação da homeostase do cálcio.....	27
Figura 10 – Efeitos Funcionais da GAAP.....	29
Figura 11 – Impacto da expressão de hGAAP na viabilidade celular da linha U2OS a diferentes pHs.....	37
Figura 12 – Impacto da expressão da GAAP na viabilidade celular da linha MCF7 a diferentes pHs.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características da Migração Celular.....19

2. METASTIZAÇÃO

A metástase envolve a disseminação de células do tumor primário para os tecidos circundantes e órgãos distantes e é a principal causa de morbidade e mortalidade por cancro (Seyfried & Huysentruyt, 2014).

Estudos indicam que as metástases são responsáveis por 90% das mortes por cancro, ainda que as proporções variem substancialmente entre os diferentes tipos de tumores. Aquando do diagnóstico, o estadio do cancro determina as opções de tratamento e tem uma forte influência na duração da sobrevida do paciente. Em geral, se é encontrado apenas na parte do corpo onde começou pode considerar-se localizado, sendo este o estadio em que a maior parte dos casos se encontra (**Figura 2**); se se espalhou para uma parte diferente do corpo o estadio é regional ou distante. Segundo o *National Cancer Institute*, quanto mais cedo o cancro de mama for detetado, maior é a chance de sobrevivência cinco anos após o diagnóstico, sendo a sobrevida para cancros de mama localizados cerca de 98,8% (**Figura 3**) (Dillekås, Rogers, & Straume, 2019).

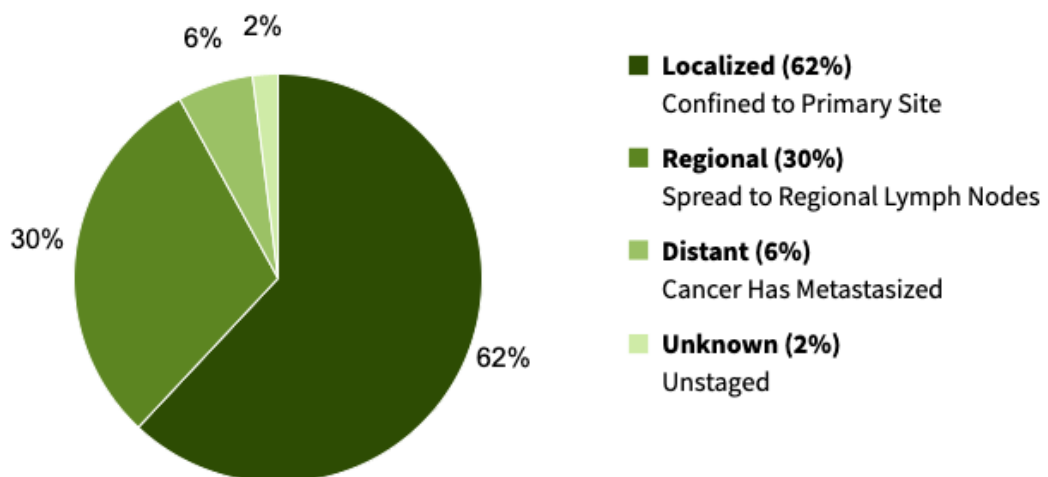


Figura 2 – Percentagem de casos de Cancro da Mama por estadio: Localizado (62%) quando o tumor se encontra confinado ao seu local primário; Regional (30%) quando o tumor se encontra espalhado pelos nódulos linfáticos; Distante (6%) quando o cancro já está metastizado; Desconhecido (2%) para casos sem estadiamento – Resultados retirados de um estudo realizado num grupo de mulheres sem fazer distinção de raça nem idade. Dados dos valores estatísticos baseados na população dos EUA, retirados de SEER 18 (2009-2015) - retirado de *National Cancer Institute Survival Statistics*

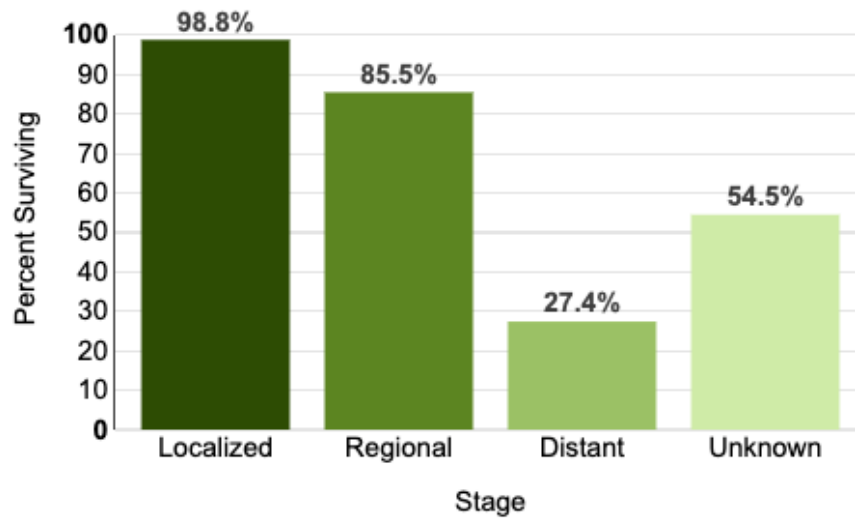


Figura 3 - Sobrevivência relativa de mulheres com Cancro da Mama num intervalo de 5 anos (2009 – 2015) diferenciado por estadio tumoral. Resultados retirados de um estudo realizado num grupo de mulheres sem fazer distinção de raça nem idade. Dados dos valores estatísticos baseados na população dos EUA, retirados de SEER 18 (2009-2015) - retirado de *National Cancer Institute Survival Statistics*

As metástases definem-se como implantes tumorais descontínuos em relação ao tumor primitivo e são consideradas premissa de malignidade, uma vez que as neoplasias benignas não metastizam. O processo de metastização é um processo dinâmico no qual há movimentos de células tumorais no microambiente tumoral, guiadas principalmente por estímulos químicos e mecânicos externos (Lintz, Muñoz, & Reinhart-King, 2017).

O estado fisiológico do microambiente do tumor (TME, do inglês *tumor microenvironment*) está intimamente ligado a cada etapa da tumorigénese, sendo esta um processo complexo e dinâmico, composto por três etapas: a iniciação, a progressão e a metastização. O TME é constituído pela MEC, microfibrilastos, fibroblastos, células neuroendócrinas, células adiposas, células do sistema imunitário e redes vasculares sanguíneas e linfáticas, e tem, através de estudos realizados, demonstrado cada vez mais que desempenha uma importante função tecidual tendo assim um papel crítico na evolução de neoplasias em estado avançado (Wang et al., 2017).

Os tumores, quando em comparação com tecidos normais, mostram frequentemente um pH extracelular acentuadamente reduzido, entre 7,0 e 7,2, que resulta da glicólise anaeróbica ou aeróbica em combinação com uma remoção reduzida de metabolitos ácidos. As pesquisas das causas e consequências da existência do pH ácido dependem muito de medições precisas e reproduzíveis, sendo que estas têm sofrido bastantes alterações ao

longo do tempo. (Zhang, Lin, & Gillies, 2010). Diversos estudos indicam que a acidose induz a disseminação hematogénica e linfática das células tumorais, piorando o prognóstico a longo prazo dos doentes.

Oliver T. e Anne R. desenvolveram um estudo que forneceu uma visão geral sobre o impacto do pH baixo em diferentes etapas da metástase incluindo (a) a invasão local de células tumorais e angiogénese (causada por angiogénese, transição epitelial-mesénquimal (EMT, do inglês *Epithelial-Mesenchymal Transition*) e degradação da matriz), (b) o intravasamento de células tumorais e desapego à circulação (migração e EMT) e (c) a aderência de células tumorais em circulação (por EMT, migração e degradação da matriz) (**Figura 4**) (Thews & Riemann, 2019). Neste foi concluído que os efeitos do pH ácido são independentes dos mecanismos induzidos pela hipóxia, sendo a invasão local diretamente modulada pela acidose tumoral, criando o relaxamento do contacto célula-célula, degradando a matriz extracelular promovendo a migração das células tumorais.

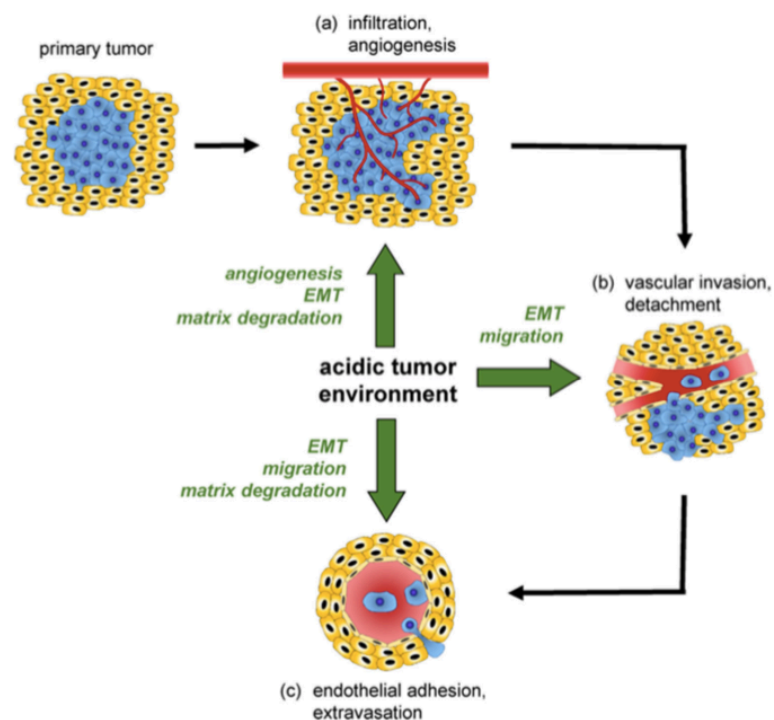


Figura 4 – Impacto do ambiente ácido de um tumor em diferentes etapas da formação de metástases. (a) invasão local de células tumorais e angiogénese (gerada por angiogénese, EMT e degradação da matriz); (b) intravasamento de células tumorais e desapego à circulação (gerado por EMT e migração); (c) aderência de células tumorais em circulação (causada por EMT, migração e degradação da matriz) – retirado de Thews & Riemann, 2019.

A metastização inicia-se com a invasão local do tecido circundante do hospedeiro pelas células do tumor primário e continua com a aquisição da capacidade de invasão e infiltração pelas mesmas nos vasos sanguíneos ou linfáticos (**Figura 5**). Posteriormente, estas células têm de ter a capacidade de sobreviver e transitar no sistema sanguíneo ou linfático. O seu ciclo celular é interrompido, permitindo que tenham a capacidade de aderir aos leitos capilares dentro do órgão alvo e de seguida extravasem para dentro do parênquima. Proliferam, formando pequenos nódulos de células tumorais (micrometástases) e promovem a angiogénese dentro do órgão, que permite o crescimento das mesmas e a sua evolução para tumores macroscópicos. Esta última etapa é denominada de colonização (Hanahan & Weinberg, 2011; Scully, Bay, Yip, & Yu, 2012).

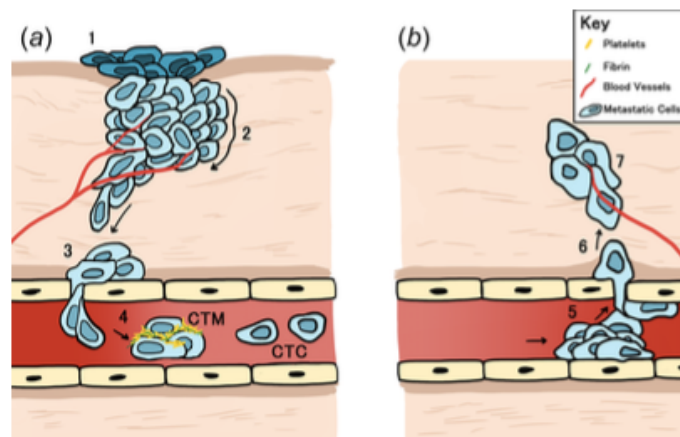


Figura 5 – Representação do processo metastático. (a) Para a metastização, as células no tumor primário (1) começam por se separar por EMT (2), invadir através dos tecidos locais a lesão inicial (3) e invadir posteriormente a membrana basal para o sistema linfático (4). (b) As células metastáticas começam por viajar como CTC (do inglês, *Circulating Tumour Cells*) através da vasculatura; as células do cluster metastático aderem à membrana basal (5) saindo posteriormente num local distante por extravasamento (6) formando um tumor num local secundário (7) - retirado de Lintz, Muñoz, & Reinhart-King, 2017.

O processo de metastização, também designado por cascata da metastização, compreende várias etapas sequenciais tais como alterações da migração e adesão célula-célula, degradação e invasão da membrana basal, intravasamento, sobrevivência na corrente sanguínea, extravasamento, formação de micrometástases, angiogénese e crescimento secundário de tumores (**Figura 6**). Todas estas etapas devem ser executadas enquanto as células tumorais evitam e sobrevivem aos sinais apoptóticos e ao sistema imunitário do

hospedeiro (Hunter, Crawford, & Alsarraj, 2008). De referir que o insucesso no cumprimento de uma destas etapas impedirá a metastização.

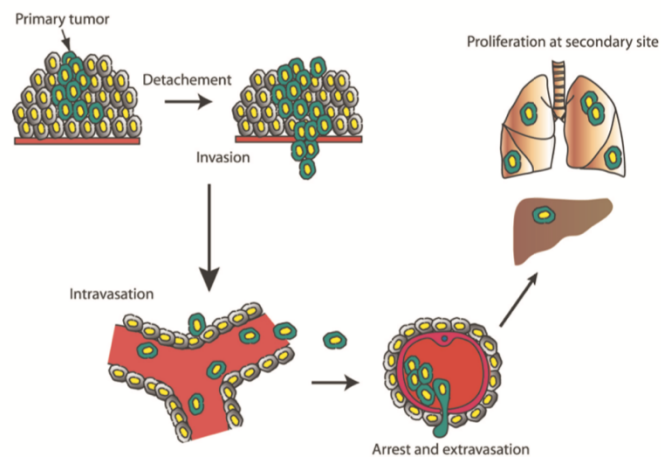


Figura 6 – O processo metastático. Os passos iniciais exigem proliferação do tumor primário e invasão através dos tecidos adjacentes e membranas basais. O tumor invade posteriormente os vasos sanguíneos enquanto as células tumorais individuais se desprendem da massa primária e são transportadas através do sangue para um órgão-alvo distante onde param em pequenos vasos e extravasam para o tecido circundante e proliferam no local secundário – retirado de Ha, Faraji, & Hunter, 2013.

Relativamente à invasão, primeiramente, as células tumorais têm de alterar a adesão célula-célula e a adesão célula-matriz extracelular. A família das caderinas apresenta um papel importante na mediação da adesão célula-célula, nomeadamente a E-caderina, uma vez que ajuda a formar folhas de células epiteliais (*cell sheets*) mantendo a quiescência das células dentro dessas folhas (Hanahan & Weinberg, 2011). A *down-regulation* da E-caderina é determinante para o crescimento metastático, em particular das metástases de cancro da mama, refletindo a progressão e estando associada a um mau prognóstico. Acredita-se que a *down-regulation* da E-caderina resulte na perda de adesão entre as células epiteliais do cancro da mama e outras. Por outro lado, a *up-regulation* da N-caderina é frequentemente observada nas células tumorais da maioria dos tumores de origem epitelial durante a invasão do tecido estromal envolvente (Hanahan & Weinberg, 2011; Scully et al., 2012). Esta desregulação da N-caderina, bem como possivelmente de outras caderinas mesenquimais, permite a adesão de células tumorais às células do estroma e, posteriormente, a invasão do estroma por células tumorais.

Em segundo lugar, tem de existir degradação da matriz extra-celular, pelas MMPs (pro-metaloproteinases de matriz) e pela uroquinase ativadora de plasminogénio, de forma a permitir a penetração dos limites do tecido. Além disso, a heparanase também auxilia na degradação da matriz extra-celular através da lise do proteoglicano sulfato de heparano, que é importante na integridade da matriz extra-celular, bem como na mediação de interações de adesão entre a matriz celular e o recetor de fatores de crescimento. O sulfato de heparano atua também como reservatório para ligação de fatores de crescimento e fatores angiogénicos à heparina. A degradação do sulfato de heparano pela heparanase permite a libertação de substâncias, como o cálcio, que promove o crescimento, invasão e angiogénese (Scully et al., 2012).

3. MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS

As células tumorais podem disseminar-se a partir do tumor primário individualmente, usando para tal movimentos ameboides ou mesenquimatosos usando deste modo a migração individual (**Figura 7**).

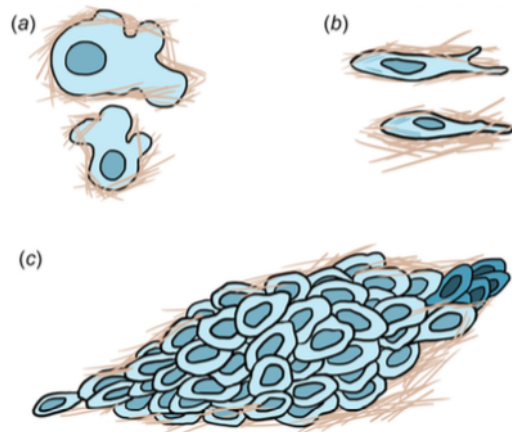


Figura 7 - Mecanismos de migração celular. Movimento ameboide, caracterizado por bolhas, aderências fracas e polaridade rápida (a) e movimento mesenquimal, caracterizado por fibras fortes, polarização e presença de uma borda principal e traseira (b). Migração coletiva (c) - retirado de Lintz, Muñoz, & Reinhart-King, 2017.

Esta migração é maioritariamente regulada por integrinas, enzimas de degradação da matriz, moléculas de adesão célula-célula e comunicação célula-célula. Os mecanismos de migração de células podem ser reprogramados permitindo que estas mantenham as suas propriedades invasivas através da desdiferenciação morfológica e funcional.

As células tumorais têm um largo espectro de mecanismos de invasão e migração, tanto individuais como coletivas, podendo assim modificar os seus mecanismos como resposta a diferentes condições. Esta característica é uma das principais razões pela qual a terapêutica antitumoral mais direcionada para os recetores de adesão ou proteases não surte efeitos no que toca ao atraso da progressão do tumor em ensaios clínicos.

Para migrar, o corpo celular necessita de modificar a sua rigidez tornando-se mais maleável para conseguir posteriormente interagir com as estruturas do tecido circundante. Para que este processo ocorra é necessário concluir um ciclo de diversas etapas interdependentes.

Inicialmente a célula tem que se tornar polarizada e alongada, formando assim um pseudópode (através da extensão da borda principal da célula) que se vai posteriormente ligar ao substrato da MEC. De seguida, o corpo da célula vai começar a contrair-se gerando uma força de tração que vai levar ao seu deslizamento progressivo. O reconhecimento e ligação à MEC são feitos através de protusões celulares podendo estas ser bastante diferentes em morfologia e dinâmica. Estas contêm actina filamentosa assim como conjuntos modificáveis de proteínas estruturais e de sinalização que levam posteriormente a diferentes tipos de interações com substratos da MEC (Friedl & Wolf, 2003).

3.1. DE QUE FORMA SE MOVEM AS CÉLULAS TUMORAIS ATRAVÉS DOS TECIDOS E SE ORGANIZAM EM TUMORES INVASIVOS?

Estudos feitos tanto *in vitro* como *in vivo* demonstram que as células tumorais se infiltram nas matrizes de tecidos vizinhos através de diversos padrões. Podem-se dispersar como células individuais (migração de células individuais) ou expandir-se em cadeias de células sólidas (migração coletiva). Apesar de serem métodos distintos estes podem estar presentes ao mesmo tempo (**Tabela 1**).

Normalmente, quanto menor o estágio de diferenciação, maior a probabilidade de o tumor se espalhar através de células individuais. No entanto estudos demonstram que células agregadas se podem mover como uma unidade funcional. Ao contrário das células migratórias individuais, a adesão célula-célula que ocorre em grupos celulares leva a uma forma específica de montagem do filamento de actina ao longo das junções celulares, o que permite a formação de um corpo contrátil multicelular de tamanho maior. Para além do referido, os movimentos coletivos apresentam um maior controlo da interação célula-MEC por integrinas e proteases que degradam a matriz.

Os grupos de células metastáticas são mais frequentemente observados em carcinomas que apresentam níveis altos ou intermédios de diferenciação, tais como o cancro da mama, cólon e próstata (Hanahan & Weinberg, 2011).

Tabela 1 – Características da Migração Celular. Comparação entre das principais características da migração individual e coletiva de células – retirado de Lintz, Muñoz & Reinhart-King, 2017.

Migration category	Circulating form	Mode of migration	Key features	References
Single	Circulating tumor cells (CTC)	Mesenchymal	Strong stress fibers, polarization, leading/trailing edges	[10,16]
Collective	Circulating tumor microemboli (CTM)	Ameboid Sheets, strands, tubes, clusters	Blebbing, weak adhesions, rapid motility Intact cell-cell junctions	[17] [11-13]

3.2. PAPEL DO Ca^{2+} NA MIGRAÇÃO CELULAR?

O Ca^{2+} é um regulador fundamental da migração celular, dependendo esta do controlo da sua concentração intracelular, que pode ser mediada pela entrada do Ca^{2+} através dos canais existentes na membrana plasmática e libertação do mesmo dos reservatórios intracelulares, principalmente do retículo endoplasmático (RE).

Tendo em conta o papel central que tem a concentração intracelular de Ca^{2+} na migração celular, não surpreende que os canais efetores do mesmo estejam desregulados em diferentes tipos de cancro.

As células tumorais utilizam os mesmos canais de Ca^{2+} e bombas que as células não malignas; no entanto existem por vezes alterações nestes organelos que se tornam essenciais para as células tumorais. Tais alterações podem incluir alterações pronunciadas ao nível da expressão, localização celular alterada, mutações genéticas e mudanças na atividade ou expressão associadas a processos específicos importantes para o cancro. Estas alterações refletem frequentemente as mudanças no fluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática ou organelos intracelulares.

O influxo de cálcio através da membrana plasmática para a célula é um regulador importante dos processos celulares para a progressão do tumor, sendo que canais de iões de quase todas as classes permeáveis ao Ca^{2+} foram agora associados a esse acontecimento (Monteith, Davis, & Roberts-Thomson, 2012).

Os canais de iões com potencial recetor transitório (TRP, do inglês *transient receptor potential*) consistem em seis subfamílias sendo a maioria dos membros permeáveis ao cálcio, muitos dos quais têm um papel na distinção de sensações incluindo a dor, temperatura, sabor e pressão. Esta é a classe de canais mais associada ao cancro. Estudos feitos demonstram que diversos canais TRP como o TRPC1, TRPC6, TRPM7, TRPM8 E TRPV6 são sobreexpressos no cancro da mama, com estudos adicionais que implicam a sobreexpressão do TRPM7 na migração de células de cancro da mama e pâncreas (Ramsey, Delling, & Clapham, 2006).

Para além dos canais TRP, também a molécula 1 de interação estromal (STIM1, do inglês *Stromal Interaction Molecule 1*) e o canal proteico 1 de libertação de cálcio ativado por cálcio (ORAI1, do inglês *Calcium Release-Activated Calcium Channel Protein 1*) são reguladores da mobilização intracelular de Ca^{2+} . ORAI1 medeia o influxo de cálcio após a diminuição das reservas intracelulares do cálcio e a ativação do canal pela STIM1. STIM1 é uma proteína intramembranar localizada no RE onde atua como um sensor intraluminal de cálcio. É ativada quando ocorre a queda transitória da concentração intraluminal de cálcio fazendo com que a proteína se desloque para as junções do RE da membrana plasmática

para ligar e ativar a ORAI1. Forma-se então a via de influxo de cálcio mediada por ORAI1/STIM1 denominada por SOCE (do inglês *Store-Operated Calcium Entry*), fundamental para o influxo e sinalização de Ca^{2+} na fisiologia celular (F. M. Romero, Caro, Guerrero, Bermejo, & Guisado, 2018).

4. PAPEL DO Ca^{2+} NA METASTIZAÇÃO

As vias de sinalização que envolvem o cálcio necessitam de uma regulação com controlo rigoroso, de forma a permitir o adequado funcionamento celular. Esta regulação é conseguida através das bombas, canais e proteínas de ligação ao cálcio que têm como principal objetivo manter a homeostasia celular e realizar funções celulares específicas. As alterações de cálcio citosólico livre, que podem envolver aumentos globais transitórios ou mantidos, permitem processos como a transcrição génica, proliferação e morte celular (Stewart, Yapa, & Monteith, 2014).

A desregulação das vias de sinalização que envolvem o cálcio pode ser uma característica de determinados estados patológicos como a osteoporose, hipertensão e o cancro (Peterlik, Kállay, & Cross, 2013).

O cálcio pode atuar diretamente sobre as enzimas celulares em conjunto com outros metabolitos celulares, como os nucleotídeos cíclicos, para regulação das funções da célula. A alteração na concentração de cálcio intracelular tem sido implicada no início da secreção, contração e proliferação celular, bem como a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Ciarcia et al., 2010).

Durante a lesão vascular através do stress mecânico, fatores de crescimento ou exposição a citocinas, as células musculares lisas vasculares podem sofrer alteração fenotípica passando de maioritariamente quiescentes e contráteis, para células com um fenótipo mais sintético e proliferativo. Esta alteração fenotípica está relacionada com alterações na via de sinalização que envolve o cálcio, tais como a passagem de canais de cálcio dependentes de voltagem típicas das células contráteis, para a SOCE nas células proliferativas (Stewart et al., 2014).

As células neoplásicas e as células saudáveis diferem em aspetos muito específicos, tais como as alterações na via de sinalização do cálcio, ocorridas após estimulação, tanto na natureza do influxo de cálcio como na taxa de recuperação da concentração de cálcio intracelular. A identificação dos principais componentes moleculares da SOCE, ou seja, STIM1 e ORAI1, trouxe um grande interesse na determinação do papel da via de influxo de cálcio na fisiopatologia do cancro (Stewart et al., 2014).

O SOCE é a principal via de influxo de cálcio (**Figura 8**) na maioria dos cancros, sendo mediado pelo sensor de cálcio do retículo endoplasmático 1 e 2 (STIM1 e 2, do inglês *endoplasmic reticulum calcium sensor*) e pela unidade de formação de canais da membrana plasmática orais (ORAI 1-3). Nos últimos anos tem-se verificado um aumento da evidência que associa uma desregulação da SOCE nas células tumorais à promoção da invasão,

migração e proliferação celular. De facto, a sobre-expressão de STIM1 e/ou ORAI1 tem sido descrita em vários tipos de cancro, incluindo no cancro da mama (Stewart et al., 2014), e associada à progressão metastática (Prakriya & Lewis, 2015). O SOCE hiperativo pode promover a disseminação metastática e colonização através da reorganização do citoesqueleto de actina, degradando a matriz extracelular e remodelando o microambiente tumoral.

Uma vez que a localização e função do STIM1 e ORAI1 são fortemente dependentes dos componentes do citoesqueleto de actina, a questão de como a dinâmica entre o SOCE e o Ca^{2+} influencia os eventos dependentes do citoesqueleto, (como a adesão e migração celular) foi rapidamente considerada e avaliada por diversos grupos (Vanoverberghe et al., 2012).

Dos estudos realizados e através da informação por eles fornecida, é neste momento aceite que um dos principais alvos da SOCE é o citoesqueleto e que a dinâmica do conjunto de adesão focal assim como a do citoesqueleto de actina são amplamente influenciadas pela cinética da entrada de Ca^{2+} através de SOCs (do inglês *Store-Operated Calcium Channels*) (F. J. M. Romero, Guerrero, Caro, & Guisado, 2016).

T.A. Stewart et al (2014), propõem exemplos da remodelação do sinal das vias que envolvem o cálcio, comparando células tumorais e não tumorais. Nas células tumorais, o aumento mantido da concentração de cálcio intracelular após um determinado estímulo, deve-se provavelmente a um aumento do influxo de cálcio e pode ter como consequência o aumento da proliferação. Nas mesmas células, se após o estímulo existir um retorno rápido das concentrações de cálcio intracelular às concentrações basais, provavelmente através do aumento do efluxo de cálcio, a consequência mais provável será a resistência ao estímulo apoptótico. Se após o estímulo, o fenótipo das células tumorais levar a picos repetidos de cálcio intracelular, através da alteração da sequestração de cálcio, influxo ou efluxo, a consequência mais provável será a alteração da transcrição de fatores dependentes do cálcio. Estes fatores são importantes na migração e proliferação celular. Por outro lado, as células não tumorais, independentemente do estímulo, conseguem retornar à concentração basal de cálcio intracelular (Stewart et al., 2014).

Quanto aos mecanismos de migração celular e processos importantes na angiogénese tumoral, investigações de A.Fiorio Pla et al demonstram que o ácido araquidónico, um efetor da via de sinalização do fator de crescimento angiogénico, induz uma resposta de cálcio significativamente maior em células endoteliais derivadas de tumor de mama do que em relação às células endoteliais dérmicas normais (Fiorio Pla et al., 2010). Esta diferença parece ser mediada pelo TRPV4 (**Figura 6**) (Stewart et al., 2014). Estes estudos sugerem que a

remodelação nas vias de sinalização do cálcio nas células endoteliais migratórias, está associada ao aumento da responsividade aos ativadores do TRPV4. Esta remodelação pode dever-se a mudanças dinâmicas na localização do TRPV4, uma vez que o ácido araquidónico causa redistribuição do TRPV4 para a membrana plasmática nas células endoteliais, estando relacionada com a remodelação do citoesqueleto de actina. Para além de que o silenciamento do gene TRPV4 aboliu a resposta migratória das células endoteliais do tumor mamário ao ácido araquidónico (Fiorio Pla et al., 2010; Stewart et al., 2014).

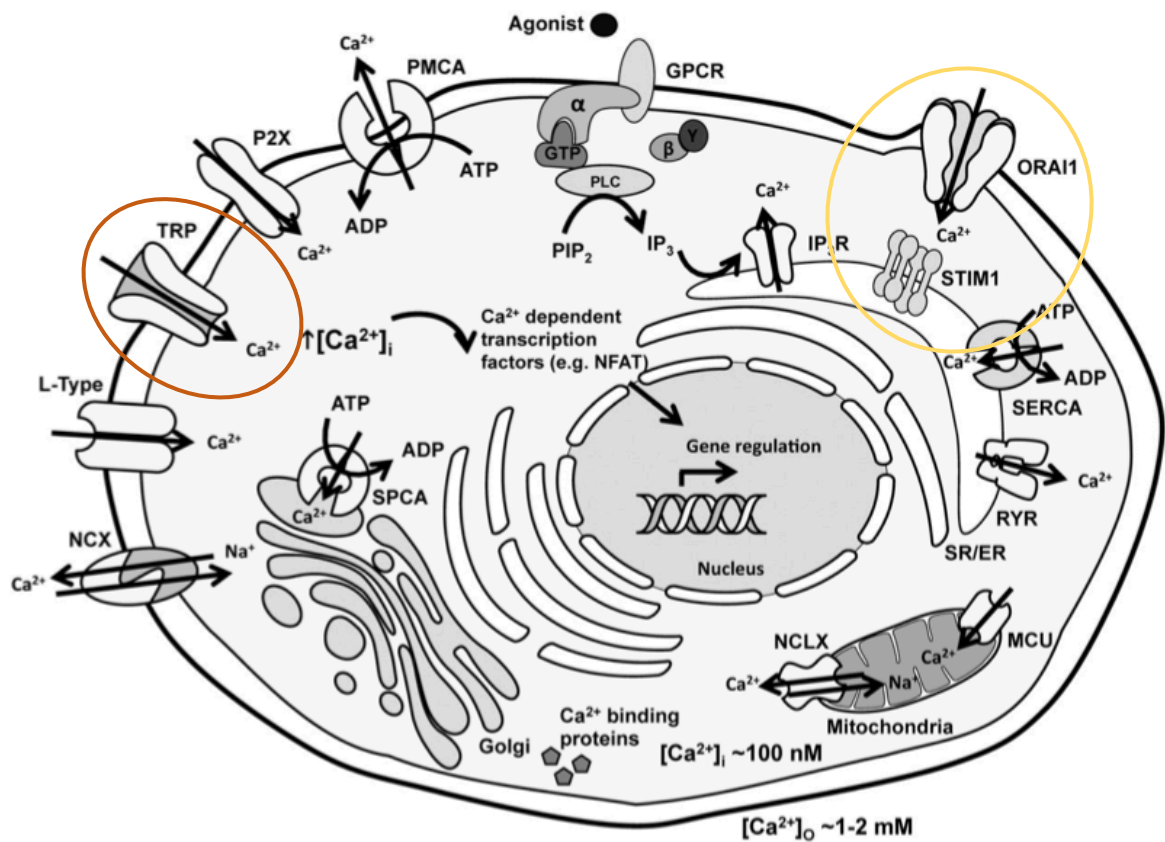


Figura 8 – Representação esquemática das principais vias de influxo / efluxo / liberação / recepção de cálcio envolvidas na regulação da homeostasia do Ca^{2+} em células de mamíferos e suas proteínas associadas.

As principais vias de influxo de cálcio incluem as mediadas pela família dos canais TRP, canais de iões permeáveis ao cálcio, canais de cálcio dependentes de voltagem e os componentes da via SOCE (Orai1 e Stim1). A ativação dos receptores acoplados à proteína G localizados na membrana plasmática leva à geração de inositol trifosfato (IP_3) e à consequente estimulação dos receptores IP_3 localizados no RE, resultando na liberação de Ca^{2+} - retirado de Stewart et al., 2014.

Investigações anteriores sugerem que o recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula óssea desempenha um papel importante na neoangiogénese tumoral, que é essencial para sustentar o crescimento do tumor e facilitar a disseminação metastática. A remodelação da sinalização de cálcio foi identificada em células progenitoras endoteliais derivadas de doentes com carcinoma de células renais em relação a controlos saudáveis (Lodola et al., 2012).

O Ca^{2+} é um sinalizador intracelular bastante versátil que pode controlar muitas funções celulares diferentes atuando de várias maneiras para regular diversos processos celulares, nomeadamente na junção sináptica, onde o Ca^{2+} desencadeia a exocitose em microssegundos enquanto na outra extremidade está a atuar durante horas para controlar processos como a proliferação celular ou transcrição de genes.

O nível de Ca^{2+} intracelular é determinado por um equilíbrio entre as reações 'on', que introduzem o Ca^{2+} no citoplasma e durante as quais uma pequena porção de Ca^{2+} se liga a efetores responsáveis pela estimulação de diversos processos dependentes de Ca^{2+} , e as reações 'off', através das quais o sinal é removido pela ação conjunta de bombas e tampões. Quase todos os sistemas de Ca^{2+} têm em comum o facto de funcionarem através de breves impulsos de Ca^{2+} criados por reações de ativação/desativação referenciadas na **Figura 9** (Berridge, Bootman, & Roderick, 2003).

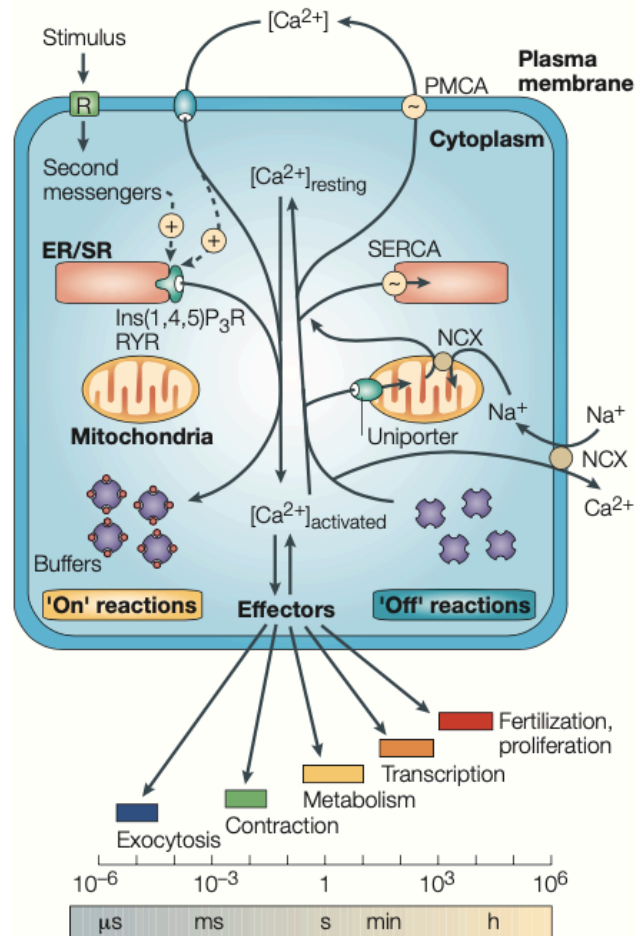


Figura 9 – Principais mecanismos da regulação da homeostasia do cálcio. Durante as reações ‘on’ os estímulos induzem a entrada de Ca^{2+} externo e a formação de segundos mensageiros que libertam o Ca^{2+} interno que é posteriormente armazenado no RE. A maior parte desse Ca^{2+} (referenciado através de círculos vermelhos) está ligada a buffers, quanto uma pequena parte se liga aos efetores ativando diversos processos celulares que operam num largo espectro temporal. Durante as reações ‘off’ o Ca^{2+} é removido da célula através de bombas. As mitocôndrias também atuam durante o processo uma vez que captam o Ca^{2+} através de uniporte que é posteriormente lentamente libertado de volta ao citosol. A sobrevivência das células depende da homeostasia do Ca^{2+} pelo que o seu fluxo durante as reações ‘off’ corresponde ao fluxo durante as reações ‘on’ – retirado de Berridge, Bootman & Roderick, 2003.

F.M. Davis *et al* demonstraram que a atenuação do sinal de cálcio pela quelação de cálcio intracelular reduziu significativamente o fator de crescimento epidérmico e a EMT induzida por hipoxia. Para além destes resultados, descobriram que a expressão do canal TRP tipo melastatina-7 regulava a fosforilação do sinal de transdução e ativação da transcrição 3 (STAT3, do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) induzida pelo fator de crescimento epidérmico e que também regulava a expressão de vimentina,

marcador EMT. Nesta investigação concluíram que enquanto a quelação intracelular de cálcio bloqueia quase completamente a indução de muitos marcadores da EMT, incluindo vimentina, Twist e N-caderina, o efeito do silenciamento do TRPM7 foi específico para a proteína vimentina (Davis et al., 2014).

Após a identificação de canais, bombas ou trocadores de cálcio aberrantemente expressos, os investigadores muitas vezes dependem de abordagens baseadas no silenciamento genético ou inibidores/ativadores químicos para avaliar o seu papel na sinalização de cálcio em processos cancerígenos importantes, tais como a proliferação e a migração (Stewart et al., 2014).

Uma parte importante da investigação que avalia as vias de sinalização de cálcio e a sua relevância no cancro, concentra-se em determinar mudanças nos níveis de expressão de proteínas responsáveis pela regulação dos fluxos de cálcio intracelulares, como é exemplo a proteína anti-apoptótica do Golgi (GAAP, do inglês *Golgi Anti-Apoptotic Protein*) (Stewart et al., 2014).

5. GOLGI ANTI-APOPTOTIC PROTEIN

A morte celular programada desempenha um papel essencial durante o crescimento e desenvolvimento de células e em resposta a sinais de stress (Sierla, 2011). As proteínas anti-apoptóticas do Golgi (GAAPs), são um novo grupo evolutivamente conservado de proteínas oligoméricas multitransmembranares expressas no Aparelho de Golgi que inibem a apoptose e promovem a libertação de Ca^{2+} a partir dos reservatórios intracelulares existentes (Saraiva et al., 2013). São bastante conservadas em todos os eucariotas, estando também presentes em alguns procariotas e orthopoxvírus e formam canais de iões seletivos a catiões que explicam as suas múltiplas funções.

No grupo dos eucariotas, as GAAP regulam os níveis e fluxos de Ca^{2+} do Aparelho de Golgi e Retículo Endoplasmático (RE), conferindo resistência a uma larga gama de estímulos apoptóticos e promovendo a adesão e migração de células através da ativação dos canais ativadas pela libertação do cálcio (**Figura 10**). Estas são importantes para a manutenção da viabilidade das células humanas (Carrara, Parsons, Saraiva, & Smith, 2017).

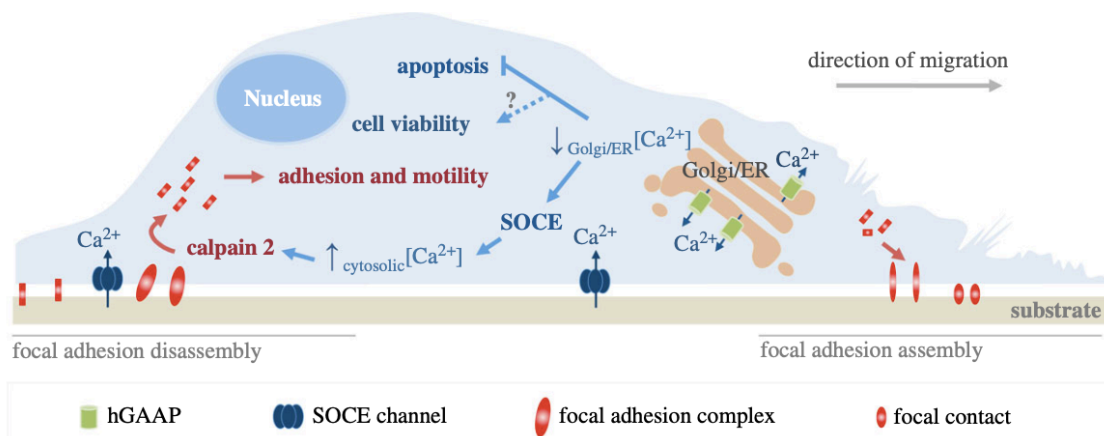


Figura 10 – Efeitos Funcionais da GAAP. Modelo resumido dos efeitos funcionais da GAAP na regulação do fluxo iónico intracelular, apoptose, adesão celular e migração – retirado de Carrara et al, 2017

A proteína humana anti-apoptótica (hGAAP, também conhecida como proteína TMBIM4, do inglês *Transmembrane BAX Inhibitor Motif Containing 4*) partilha cerca de 73% da identidade ao nível de aminoácidos com a proteína viral (orthopoxvirus) anti-apoptótica

(vGAAP) (Sierla, 2011). Estudos demonstraram que ambas têm propriedades anti-apoptóticas contra diversos estímulos pró-apoptóticos após sobreexpressão em cultura de células humanas. Nestes os estímulos testados incluíam indutores conhecidos por implementar apoptose através das vias intrínseca e extrínseca. Apesar de vGAAP não ser essencial para a replicação do vírus, esta tem um papel importante na virulência do mesmo. A proteína hGAAP é essencial para a sobrevivência das células, sendo considerada um *housekeeping gene*. A estreita relação entre as proteínas foi então confirmada pelo fato da vGAAP poder complementar a perda de hGAAP promovendo assim a sobrevivência celular (Gubser et al., 2007).

A hGAAP é um canal catiónico do Golgi altamente conservado que modula os fluxos intracelulares de Ca^{2+} sendo expressa em todos os tecidos humanos e essencial para a viabilidade celular fornecendo resistência contra diversos stresses apoptóticos. Para além de tudo melhora a adesão e migração celular, aumentando a alternância das aderências focais devido à ativação da entrada de Ca^{2+} nos reservatórios (N. Almeida et al., 2020). Diversos estudos indicam esta como uma proteína com capacidades inibitórias em diferentes contextos de apoptose sendo que o seu impacto na morte celular inclui atividades em vários compartimentos celulares incluindo a modulação da homeostase do cálcio do RE, sinalização do stress do RE, produção de espécies reativas de oxigénio, entre outros efeitos (Rojas-Rivera & Hetz, 2015).

O Ca^{2+} funciona como um sinal intracelular altamente multifuncional que atua numa larga faixa temporal, regulando vários processos celulares. Está presente em muitos processos biológicos diferentes, sendo que a sinalização por si induzida surge pela entrada através da membrana plasmática ou pela libertação dos reservatórios intracelulares, principalmente o RE e o Aparelho de Golgi (Berridge et al., 2003).

É libertado dos reservatórios intracelulares pelo inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que interage com os recetores IP3 que são por sua vez canais de libertação de Ca^{2+} presentes no RE e Aparelho de Golgi. Entra posteriormente no citosol ativando as enzimas citosólicas podendo ser também depois absorvido pelas mitocôndrias, que têm um papel importante na descodificação dos sinais de cálcio durante a fisiologia normal (Pinton, Pozzan, & Rizzuto, 1998).

Foram realizados estudos que, tendo como base a localização da hGAAP nos reservatórios intracelulares de Ca^{2+} e a importância estabelecida da sinalização intracelular deste nas células sensibilizadoras para a indução da apoptose, realçam a possibilidade do papel anti-apoptótico da hGAAP poder ser mediado. Tal poderia ocorrer através da modulação do conteúdo de cálcio das reservas ou do fluxo do mesmo entre essas reservas e as

mitocôndrias opostas, salientando evidências de que a hGAAP altera os fluxos intracelulares de cálcio induzidos tanto por estímulos fisiológicos como apoptóticos (Mattia et al., 2009).

6. OBJETIVO

Dadas as funções descritas da hGAAP e a importância que o pH do meio extracelular demonstra nos processos de sobrevivência e migração de células tumorais, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência do pH na sobrevivência de células tumorais com sobre-expressão de hGAAP.

II. MÉTODOS

1. CULTURA CELULAR

A cultura celular é uma técnica na qual as células são removidas de um organismo e colocadas em meio fluido em que, sob condições apropriadas, podem sobreviver e até crescer. Esse crescimento pode ser caracterizado por divisão celular ou diferenciação, durante as quais as células se podem transformar em tipos específicos capazes de funções análogas em tecidos ou órgãos de todo o organismo. Envolve essencialmente a distribuição de células num ambiente artificial (*in vitro*), composto pelos nutrientes, temperatura, pH e humidade necessários para permitir que as células cresçam e proliferem (Lynn, 2009).

No estudo realizado foram utilizadas linhas celulares cuja expressão foi alterada de modo a que se pudessem tirar conclusões. Foram utilizadas as linhas MCF7 (do inglês *Michigan Cancer Foundation – 7*) e U2OS (do inglês *Human Bone Osteosarcoma Epithelial Cells*).

MCF7 é uma linha celular do cancro de mama, frequentemente utilizada e promovida por mais de 40 anos por vários grupos de investigação. Fundada em 1973 pelo Dr. Soule e colegas da Michigan Cancer Foundation, de onde deriva o seu nome, as células MCF7 foram primeiramente isoladas do derrame pleural de uma mulher de 69 anos com doença metastática.

Esta é uma linha que tem sido regularmente usada e estudada ao longo de vários anos por diversos grupos de investigação, tendo demonstrado ser uma linha celular modelo adequada a investigações de cancro de mama por todo o Mundo. É uma linha celular pouco agressiva e não invasiva com baixo potencial metastático (Comşa, Cîmpean, & Raica, 2015).

A MCF7 é uma linha com células de interesse uma vez que têm uma série de características semelhantes ao epitélio mamário. A linhagem tem uma tipologia do tipo epitelial cujas monocamadas formam estruturas de cúpula devido à acumulação de fluido entre o prato de cultura e a monocamada celular. É principalmente utilizada como modelo *in vitro* para estudar a biologia do cancro de mama. Devido ao número de variáveis disponíveis esta ocupa um papel importante no desenvolvimento de fármacos para quimioterapia assim como no entendimento da resistência aos medicamentos (Cooper, 2012).

O osteossarcoma humano é um tumor maligno primário do osso que afeta crianças e jovens (entre os 15 e os 29), assim como adultos numa fase mais tardia (a partir dos 60 anos). É o sexto tipo mais comum de cancro em crianças e aparece durante a segunda década de vida no período de crescimento, tendo uma grande incidência em adolescentes que sofrem de surtos de crescimento. A sua causa é desconhecida apesar da influência genética, radiações e o rápido crescimento ósseo estarem relacionados com o seu desenvolvimento.

A linha celular U2OS do osteossarcoma humano foi formada em 1964 a partir de um sarcoma relativamente diferenciado da tíbia de uma menina de 15 anos. Foi uma das primeiras linhas celulares a ser criada sendo utilizada em diversas áreas de pesquisa biomédica (Niforou et al., 2008).

As linhas celulares de osteossarcoma humano (U2OS Neo, U2OS hGAAP e U2OS hGAAP CtMut) e cancro da mama (MCF7 Neo e MCF7 hGAAP) foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, 100U/mL de penicilina e 0,1mg/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a 37°C, sob uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂. O meio de células MCF7 foi adicionalmente suplementado com insulina a 0,1% (N. A. Almeida, 2019).

Foram analisadas 3 linhas celulares:

Neo (U2OS e MCF7) – linhas celulares em que o nível de expressão de GAAP é normal, ou seja, apenas a expressão proveniente do gene endógeno;

hGAAP (U2OS e MCF7) – linhas celulares em que o nível de expressão de GAAP é elevado, ou seja, para além da expressão proveniente do gene endógeno a GAAP é também expressa a partir de um plasmídeo contendo o gene GAAP sob o controlo de um promotor forte;

CtMut (U2OS) – linha celular com expressão endógena do gene GAAP *wild type* e sobreexpressão proveniente de um plasmídeo contendo o gene GAAP não funcional (mutado na região C terminal).

Foram testados 4 valores de pH de meio: 6.6, 7.0, 7.4 (valor fisiológico e mais usualmente utilizado na cultura de células) e 7.8 para que seja possível analisar o impacto do pH na sobrevivência das linhas celulares mencionadas acima.

2. VIABILIDADE CELULAR

O teste de Cristal Violeta (CV) é um dos métodos mais usados para detetar a viabilidade celular sob diversas condições (Violet et al., 2014). É um método simples, rápido e versátil, que deteta a biomassa de células aderentes, composto por uma coloração com corante cristal violeta que se liga às proteínas e ao DNA (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016).

O cristal violeta é um corante triarilmetano que se pode ligar a moléculas do tipo ribose, como o DNA dos núcleos, cuja coloração pode ser usada para quantificar o DNA total da população de células determinando assim a viabilidade celular (Violet et al., 2014). É diretamente proporcional à biomassa celular e pode ser medido a 570nm.

Este método permite distinguir entre efeitos ao nível da morte/sobrevivência ou maior/menor proliferação celulares (Feoktistova et al., 2016). As células que sofrem de morte celular perdem a sua aderência e são conseqüentemente separadas do grupo geral de células, reduzindo a quantidade de coloração existente na cultura em questão.

No estudo realizado foram semeadas cerca de 3000 células em placas de 96 poços com 190 µL de meio de cultura a diferentes pHs e as células foram incubadas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂ pelo tempo indicado. Foi preparada uma solução de trabalho de Cristal Violeta a 0,1% e após o tempo de incubação indicado as células foram lavadas com PBS de pH 7,4 a 37°C e fixadas com 100 µL de etanol frio a 96% por 10 minutos. Após os 10 minutos o etanol e PBS presentes foram retirados e as células coloradas com 100 µL da solução de Cristal Violeta durante 5 minutos. Após o tempo estabelecido, as células foram lavadas com água. Para finalizar os cristais de Cristal Violeta foram dissolvidos com 200 µL de uma solução de etanol a 96% com ácido acético e lida a respetiva absorvância a 595nm. Realizaram-se duas experiências independentes, cada uma composta por quatro culturas replicadas.

III. RESULTADOS

1. VIABILIDADE

1.1. Impacto da expressão de hGAAP na viabilidade celular da linha U2OS a diferentes pHs

Os resultados obtidos após 4 dias de cultura de células U2OS Neo, hGAAP e hGAAP CtMut são considerados como controlo, uma vez que até essa altura as células não tinham ainda sido sujeitas a nenhum stress por falta de nutrientes ou fatores de crescimento, e todas as linhas celulares demonstraram uma sobrevivência equiparada ao controlo Neo a pH 7.4. Tendo a maior parte uma viabilidade próxima dos 100%, que é considerada como controlo na linha Neo a pH 7.4 (**Figura 11A**). O pH do meio de cultura não afetou significativamente o crescimento e sobrevivência das células durante este tempo em cultura.

Após 3 semanas em cultura (**Figura 11B**), verifica-se o decréscimo na sobrevivência celular principalmente nas linhas Neo e CtMut, ao contrário da linha hGAAP que demonstra uma sobrevivência nitidamente superior ao controlo a pH 7.0, 7.4 e 7.8. À medida que o pH do meio vai aumentando, as células não resistem tanto tempo em cultura, acabando por morrer, mas nas linhas celulares em que a hGAAP é sobreexpressa, verifica-se uma manutenção parcial da sobrevivência, o que nos leva a concluir que a hGAAP confere algum tipo de proteção às células em cultura, especialmente a pHs mais altos.

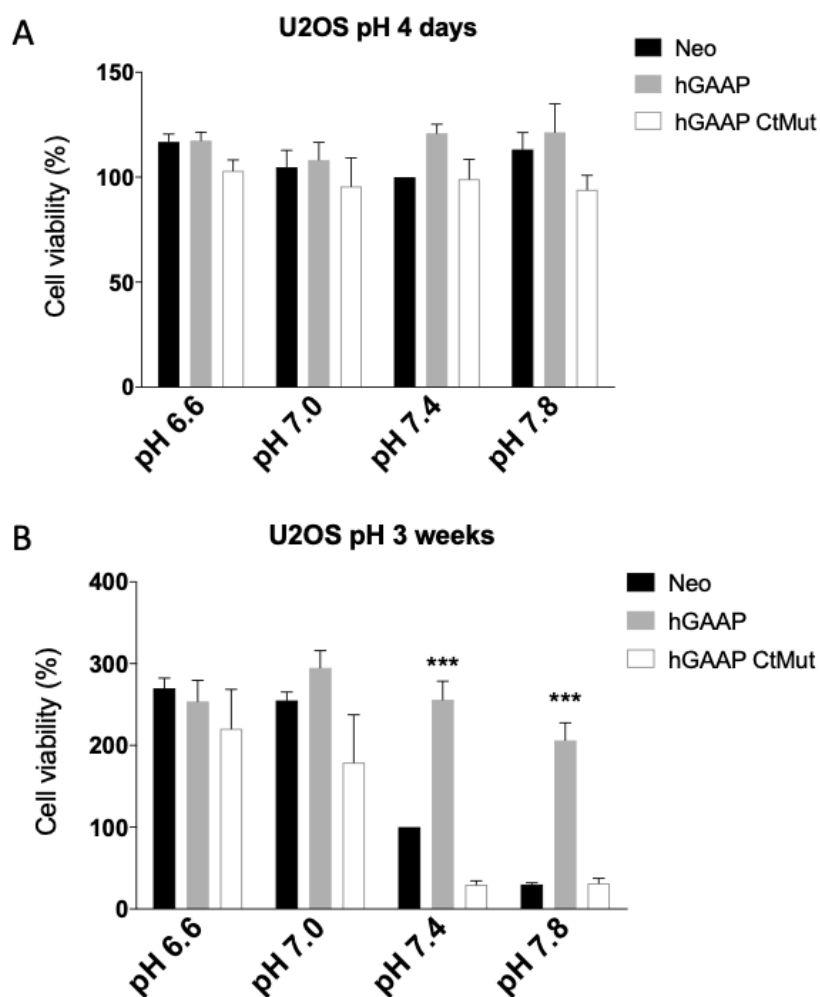


Figura 11 – Impacto da expressão de hGAAP na viabilidade celular da linha U2OS a diferentes pHs. As linhas celulares U2OS Neo, hGAAP e CtMut foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, por 3 semanas a diferentes pHs (6.6, 7.0, 7.4 e 7.8). Foram recolhidos resultados após 4 dias (Painel **A**) e 3 semanas (Painel **B**) de estudo. A viabilidade celular foi analisada pela técnica de Cristal Violeta e os resultados obtidos estão sumarizados na figura e são apresentados em relação ao controlo Neo a pH 7.4 que foi considerado 100%. Estudo estatístico realizado através do teste Two-Way ANOVA Tukey Test com o Software GraphPad Prism 8, *** $p < 0,001$ (comparando com Neo a cada respetivo pH).

1.2. Impacto da expressão da GAAP na viabilidade celular da linha MCF7 a diferentes pHs

No caso da linha celular MCF7, os resultados obtidos foram recolhidos após 2 semanas em cultura e a pHs mais altos (7.4 e 7.8) demonstram um decréscimo na sobrevivência celular da linha Neo, decréscimo esse que foi menor na linha hGAAP.

À medida que o pH do meio vai aumentando, as células têm tendência a morrer ou a reduzir a sua proliferação, mas nas linhas celulares em que a hGAAP é sobreexpressa, verifica-se o contrário, o que nos leva a concluir que a hGAAP também confere algum tipo de proteção às células MCF7 cultivadas a pHs mais altos.

O estudo na linha celular MCF7 foi realizado com o objetivo de confirmar que o fenómeno verificado na linha U2OS não é específico das mesmas. O resultado obtido com a linha U2OS foi também observado, pelo menos em parte, na linha celular de cancro de mama MCF7, confirmando que o aumento da sobrevivência celular a pHs mais elevados aquando da sobreexpressão de hGAAP não é tendência apenas da linha celular U2OS.

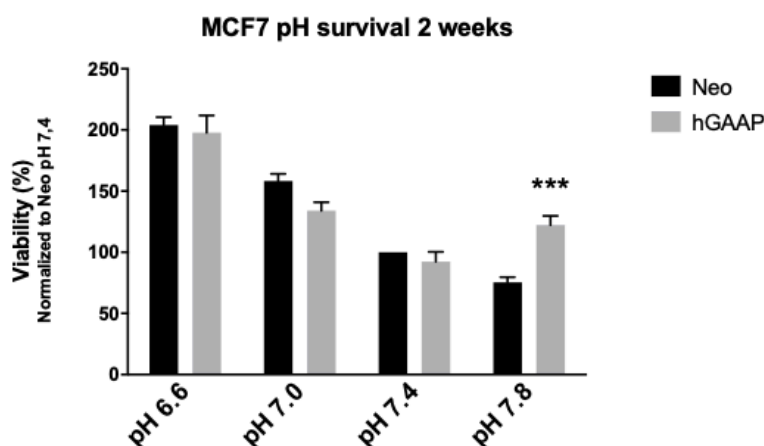


Figura 12 – Impacto da expressão da GAAP na viabilidade celular da linha MCF7 a diferentes pHs. As linhas celulares MCF7 Neo e hGAAP foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB, por 3 semanas a diferentes pHs (6.6, 7.0, 7.4 e 7.8). Foram recolhidos resultados após 2 semanas de estudo. A viabilidade celular foi analisada pela técnica de Cristal Violeta e os resultados obtidos estão sumarizados em cima. Estudo estatístico realizado através do teste Two-Way ANOVA Tukey Test com o Software GraphPad Prism 8, *** $p < 0,001$ (comparando com Neo a cada respetivo pH).

IV. CONCLUSÃO / DISCUSSÃO

A progressão tumoral está altamente associada ao estado fisiológico do microambiente tumoral (TME) (Roma-Rodrigues, Mendes, Baptista, & Fernandes, 2019). Este é constituído por uma rede complexa composta por matriz extracelular (MEC), células estromais e células imunoinflamatórias que influenciam a invasão, intravasão e metastização das células tumorais. A interface estroma-inflamatória representa um espaço dinâmico, no qual a troca de várias informações moleculares está associada à transição para o ambiente tumorigénico. Estudos recentes sugerem que a carcinogénese é influenciada pelo TME e controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro, encontrando-se a subjacente importância dos componentes do mesmo e dos biomarcadores imunológicos na determinação do prognóstico e da resposta terapêutica (Alsibai & Meseure, n.d.).

O desenvolvimento de fármacos antitumorais eficazes tem sido desafiado pela complexidade geral dos tumores causada pela sua heterogeneidade, que é por sua vez aumentada pela progressão do cancro e determinada pelo seu microambiente.

Compreender como a composição do TME altera durante o desenvolvimento do tumor pode permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas capazes de combater o mesmo num estadio evolutivo específico (Pottier et al., 2015).

A rápida proliferação maligna cria um microambiente, em torno de cancros sólidos, maioritariamente hipóxico. Consequentemente, como resposta adaptativa, as células tumorais favorecem a atividade metabólica através da produção de energia e componentes intermediários que promovem a replicação celular através da glicólise anaeróbica. A libertação da acumulação excessiva de lactato diminui o pH extracelular levando a um microambiente considerado propício à promoção da motilidade, invasão e metástase tumoral, o que sistematicamente influenciará a resposta ao tratamento recebido (Abaza & Luqmani, 2013). Este processo é conhecido como o efeito Warburg.

A homeostase em organismos multicelulares é fortemente mantida por um processo conhecido como morte celular programada, ou apoptose. A sua desregulação está associada à tumorigénese e, especialmente, ao desenvolvimento da quimiorresistência. Diversas proteínas foram ligadas à desregulação da apoptose e são coletivamente chamadas proteínas de sobrevivência, das quais faz parte a GAAP. Estas inibem a morte celular, fornecendo alvos para possível descoberta e desenvolvimento de fármacos.

A absorção mitocondrial de cálcio é mediada por uniporte de baixa afinidade que deteta os microdomínios de Ca^{2+} elevados que são estabelecidos nas junções entre o RE e as mitocôndrias. As junções estreitas com um papel importante na sinalização de cálcio foram

também observadas entre o Aparelho de Golgi e as mitocôndrias. Alterações na homeostase de Ca^{2+} intracelular contribuem para a indução da apoptose. A mudança no controlo das funções fisiológicas para o envolvimento na apoptose provavelmente implica mudanças no padrão de sinalização de cálcio afetando proteínas e organelos efetores citosólicos. A sinalização de cálcio entre organelos de armazenamento e mitocôndrias desempenha um papel importante na sensibilização de células para a apoptose (Berridge et al., 2003).

A capacidade que a hGAAP demonstra ao interferir na sinalização intracelular de Ca^{2+} fornece uma explicação provável para a sua capacidade de supressão da apoptose. Esta é uma ideia apoiada por observações de que a modulação da atividade do recetor IP_3 torna as células menos sensíveis à apoptose desencadeada por processos intrínsecos e extrínsecos. Uma diminuição na quantidade de Ca^{2+} disponível para a sinalização pode impedir que haja fluxos citotóxicos de Ca^{2+} entre os reservatórios e as mitocôndrias. As proteínas reguladoras da morte celular foram ligadas ao metabolismo celular sendo demonstrado, em diversos estudos, que a capacidade destas aumentarem a frequência da abertura do IP_3 eleva as oscilações do Ca^{2+} resultando numa maior atividade mitocondrial. A hGAAP é uma nova proteína que modula a entrada e libertação de Ca^{2+} , o que pode explicar o seu papel decisivo na regulação da morte celular por apoptose (Mattia et al., 2009).

Uma das famílias de proteínas de sobrevivência mais extensa são as proteínas Bcl-2. Estas consistem num grupo de proteínas que determinam o destino das células promovendo ou inibindo a apoptose e podem ser divididas em três subfamílias com base na sua estrutura e funções. O grupo 1, que inclui as proteínas anti-apoptóticas, é formado por diversas proteínas como a Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, entre outras, que suprimem a apoptose. Diversos estudos estabeleceram o papel da família Bcl-2 como proteínas pró-sobrevivência na sobrevivência celular, proliferação e quimiorresistência em vários tumores (Pandey et al., 2016).

Quando em comparação com a hGAAP e tendo por base os resultados obtidos no estudo realizado, podemos especular que ambas agem com o mesmo propósito: inibir a morte celular programada, aumentando consideravelmente a sobrevivência das células.

Analisando os resultados obtidos, levando em consideração os valores de pH a que as linhas celulares foram submetidas, pode concluir-se que há um claro aumento da sobrevivência celular a pHs mais elevados quando a hGAAP é sobreexpressa. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto do pH influenciar o funcionamento de inúmeros processos e moléculas celulares.

O pH alcalino é tóxico para muitas células, incluindo tumores, o que se pode confirmar pelos resultados obtidos após 2 e 3 semanas em cultura (linhas celulares MCF7 e U2OS

respetivamente) uma vez que as linhas celulares Neo e CtMut sofreram uma diminuição significativa da sua sobrevivência. No entanto, se os tumores se adaptarem com sucesso à sua condição utilizando-a para a sua própria ativação celular, poderão aumentar a sua sobrevivência. Os resultados mostram que a linha hGAAP quando submetida a um ambiente desfavorável mantém uma sobrevivência semelhante a quando estava submetida a um pH adequado ao crescimento celular.

A sobreexpressão da hGAAP em linhas celulares tumorais (U2OS e MCF7) induz fenómenos celulares invasivos, sugerindo que esta pode desempenhar um papel importante na progressão do cancro primário não invasivo para um estado metastático competente. Uma vez que a hGAAP regula várias características importantes do cancro, como a resistência à morte celular e ativação de invasão e metástase, e a sua expressão tem sido relatada num número crescente de tecidos malignos, é possível afirmar que esta poderá estar envolvida na progressão do tumor e a metastização (Carrara et al., 2017). Deste modo, e tendo em conta os dados obtidos, podemos concluir que a expressão de hGAAP poderá em teoria ter algum tipo de impacto na sobrevivência de células tumorais sujeitas a restrição de nutrientes e a variações bruscas de pH. A regulação do pH no tumor é importante não apenas no contexto da eficácia de vários tipos de terapias bem como na potenciação da formação de metástases (Kato et al., 2013). Assim, e tendo em conta todas as outras funções descritas para hGAAP, podemos afirmar que a análise do nível de expressão de hGAAP poderá providenciar informações úteis sobre o potencial de metastização de um tumor.

O grande volume de estudos sobre vários tipos de cancro nas últimas décadas tem vindo a gerar evidências de que o nível de expressão de proteínas anti-apoptóticas está relacionado com a proliferação, sobrevivência e quimiorresistência de células cancerígenas. Apesar de tudo são ainda necessários diversos estudos para melhor compreender a regulação das proteínas assim como a sua dinâmica tecidual e mecanismos associados à resistência a diferentes abordagens terapêuticas. Existe uma permanente necessidade de desenvolver novas estratégias e agentes para combater a resistência à quimioterapia e radioterapia utilizadas nos tumores, sendo o objetivo final desenvolver um novo agente que possa eliminar células tumorais sobreviventes que são especialmente resistentes às terapias convencionais (Pandey et al., 2016).

V. BIBLIOGRAFIA

- Abaza, M., & Luqmani, Y. A. (2013). The Influence of pH and Hypoxia on Tumor Metastasis. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(10), 0. <https://doi.org/10.1586/14737140.2013.843455>
- Almeida, N. A. (2019). *Effect on Dietary Antioxidants and pH Modulation on Cancer Cell Survival*.
- Almeida, N., Carrara, G., Palmeira, C. M., Fernandes, A. S., Parsons, M., Smith, G. L., & Saraiva, N. (2020). The Human Golgi Anti-Apoptotic Protein Induces Cell Invasion by an H₂O₂-Dependent Mechanism. *Redox Biology*, 28(May), 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101361>
- Alsibai, K. D., & Meseure, D. (n.d.). Significance of Tumor Microenvironment Scoring and Immune of Biomarkers in Patient Stratification and Cancer Outcomes. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72648>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Boyle L., & Homer M. (2015). What Is Cancer? - National Cancer Institute. Retrieved July 15, 2019, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
- Carrara, G., Parsons, M., Saraiva, N., & Smith, G. L. (2017). Golgi Anti-Apoptotic Protein: A Tale of Camels, Calcium, Channels and Cancer. *Open Biology*, 7(5). <https://doi.org/10.1098/rsob.170045>
- Ciarcia, R., D'Angelo, D., Pacilio, C., Pagnini, D., Galdiero, M., Fiorito, F., ... Giordano, A. (2010). Dysregulated Calcium Homeostasis and Oxidative Stress in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 224(2), 443–453. <https://doi.org/10.1002/jcp.22140>
- Comşa, Ş., Cîmpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147–3154.
- Cooper, J. (2012). Cell Line Profile. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*, 7(86012803), 1–4.

- Davis, F. M., Azimi, I., Faville, R. A., Peters, A. A., Jalink, K., Putney Jr, J. W., ... Monteith, G. R. (2014). Induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer cells is calcium signal dependent. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823da96d>
- Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, 8(12), 5574–5576. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Fiorio Pla, A., Genova, T., Pupo, E., Tomatis, C., Genazzani, A., Zaninetti, R., & Munaron, L. (2010). Multiple Roles of Protein Kinase A in Arachidonic Acid-Mediated Ca²⁺ Entry and Tumor-Derived Human Endothelial Cell Migration. *Molecular Cancer Research*, 8(11), 1466–1476. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0002>
- Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 362–374. <https://doi.org/10.1038/nrc1075>
- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., Van Kuppeveld, F. J. M., & Smith, G. L. (2007). A New Inhibitor of Apoptosis from Vaccinia Virus and Eukaryotes. *PLoS Pathogens*, 3(2), 0246–0259. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030017>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hunter, K. W., Crawford, N. P., & Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Research*, 10. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7876-8-17>
- Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Maehata, Y., Suzuki, A., Maeda, T., & Baba, Y. (2013). Acidic Extracellular Microenvironment and Cancer. *Cancer Cell International*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-13-89>
- Lintz, M., Muñoz, A., & Reinhart-King, C. A. (2017). The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 139(2), 1–9. <https://doi.org/10.1115/1.4035121>
- Lodola, F., Laforenza, U., Bonetti, E., Lim, D., Dragoni, S., Bottino, C., ... Porta, C. (2012). Store-Operated Ca²⁺ Entry Is Remodelled and Controls In Vitro Angiogenesis in Endothelial Progenitor Cells Isolated from Tumoral Patients. *PLoS ONE*, 7(9).

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042541>
- Lynn, D. E. (2009). *Cell Culture*. U.S. Department of Agriculture. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00048-5>
- Mattia, F., Gubser, C., Van Dommelen, M. M. T., Visch, H.-J., Distelmaier, F., Postigo, A., ... Van Kuppeveld, F. J. M. (2009). Human Golgi Antiapoptotic Protein Modulates Intracellular Calcium Fluxes. *Molecular Biology of The Cell*, 20, 3638–3645. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Monteith, G. R., Davis, F. M., & Roberts-Thomson, S. J. (2012). Calcium Channels and Pumps in Cancer: Changes and Consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 31666–31673. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.343061>
- Niforou, K. N., Anagnostopoulos, A. K., Vougas, K., Kittas, C., Gorgoulis, V. G., & Tsangaris, G. T. (2008). The Proteome Profile of the Human Osteosarcoma U2OS Cell Line. *Cancer Genomics and Proteomics*, 5(1), 63–77.
- Pandey, M. K., Prasad, S., Tyagi, A. K., Deb, L., Huang, J., Karelia, D. N., ... Aggarwal, B. B. (2016). Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death. *Pharmaceuticals*, 9(1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ph9010011>
- Peterlik, M., Kállay, E., & Cross, H. S. (2013). Calcium Nutrition and Extracellular Calcium Sensing: Relevance for the Pathogenesis of Osteoporosis, Cancer and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*, 5(1), 302–327. <https://doi.org/10.3390/nu5010302>
- Pinton, P., Pozzan, T., & Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO Journal*, 17(18), 5298–5308. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5298>
- Pottier, C., Wheatherspoon, A., Roncarati, P., Longuespée, R., Herfs, M., Duray, A., ... Quatresooz, P. (2015). The Importance of the Tumor Microenvironment in the Therapeutic Management of Cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 15(8), 943–954. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1059279>
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *American Physiological Society*, 1383–1436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00301-7>
- Ramsey, I. S., Delling, M., & Clapham, D. E. (2006). An Introduction to TRP Channels. *Annual Review of Physiology*, (2). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>

- Rojas-Rivera, D., & Hetz, C. (2015). TMBIM protein family: ancestral regulators of cell death. *Oncogene*, *34*(3), 269–280. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.6>
- Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2019). Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>
- Romero, F. J. M., Guerrero, A. M. L., Caro, C. P., & Guisado, E. P. (2016). The Interplay Between Cytoskeleton and Calcium Dynamics. *Intech*, 73–88. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Romero, F. M., Caro, C. P., Guerrero, A. L., Bermejo, N. E., & Guisado, E. P. (2018). Regulation of Calcium Signaling by STIM1 and ORAI1. *Calcium and Signal Transduction*, 3–22. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78587>
- Saraiva, N., Prole, D. L., Carrara, G., Johnson, B. F., Taylor, C. W., Parsons, M., & Smith, G. L. (2013). HGAAP Promotes Cell Adhesion and Migration Via the Stimulation of Store-Operated Ca²⁺ Entry and Calpain 2. *Journal of Cell Biology*, *202*(4), 699–713. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301016>
- Scully, O. J., Bay, B.-H., Yip, G., & Yu, Y. (2012). Breast Cancer Metastasis. *Cancer Genomics & Proteomics*, *320*, 13–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804003-4.00002-5>
- Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C. (2014). On the Origin of Cancer Metastasis. *National Institute of Health*, 1–37. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195205\)5:3<581::AID-CNCR2820050319>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195205)5:3<581::AID-CNCR2820050319>3.0.CO;2-Q)
- Sierla, M. E. (2011). *Characterisation of the GAAP (Golgi anti- apoptotic protein) gene family in Arabidopsis thaliana*. Imperial College London. <https://doi.org/>
- Stewart, T. A., Yapa, K. T. D. S., & Monteith, G. R. (2014). Altered Calcium Signaling in Cancer Cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1848*(10), 2502–2511. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.08.016>
- Thews, O., & Riemann, A. (2019). Tumor pH and metastasis: a malignant process beyond hypoxia. *Cancer and Metastasis Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-09777-y>
- Vanoverberghe, K., Lehen'kyi, V., Thébault, S., Raphaël, M., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., ... Prevarskaya, N. (2012). Cytoskeleton Reorganization as an Alternative Mechanism of Store-Operated Calcium Entry Control in Neuroendocrine-Differentiated Cells. *PLoS ONE*, *7*(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045615>

- Violet, C., Solution, S., Solution, S., Code, C., Number, P., Reagents, U. S., & Conditions, S. (2014). Crystal Violet Cell Cytotoxicity Assay Kit. *BioVision*, (408), 1800–1801. Retrieved from <https://www.biovision.com/documentation/datasheets/K329.pdf>
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., ... Guo, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 8(5), 761–773. <https://doi.org/10.7150/jca.17648>
- Weinberg, R. A., & Hanahan, D. (2000). The Hallmarks Of Cancer. *Netherlands Heart Journal*, 100(9), 57–70. <https://doi.org/10.1007/BF03091804>
- Zhang, X., Lin, Y., & Gillies, R. J. (2010). Tumor pH and its Measurement. *The Journal of Nuclear Medicine*. <https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068981>