

MARIA TERESA FIGUEIRA VERÍSSIMO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM
TAPSIGARGINA NAS ISOMERASES DE
DISSULFURETOS DE MELANOMA**

Orientador Externo: Prof.^a Doutora Zélia Maria Cordeiro da Silva

Co-orientador: Prof. Doutor Carlos Manuel Mendes Novo

Co-orientador: Prof.^a Doutora Paula Alexandra Quintela Videira

Orientador interno: Prof.^a Doutora Maria Alexandra Núncio de
Carvalho Ramos Fernandes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais

Lisboa

2012

MARIA TERESA FIGUEIRA VERÍSSIMO

**EFEITO DO TRATAMENTO COM
TAPSIGARGINA NAS ISOMERASES DE
DISSULFURETOS DE MELANOMA**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biotecnológica no Curso de Mestrado em Engenharia Biotecnológica conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientador Externo: Prof.^a Doutora Zélia Maria Cordeiro da Silva

Co-orientador: Prof. Doutor Carlos Manuel Mendes Novo

Co-orientador: Prof.^a Doutora Paula Alexandra Quintela Videira

Orientador interno: Prof.^a Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos Fernandes

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais

Lisboa

2012

Agradecimentos

A elaboração desta tese contou com o contributo e apoio de várias pessoas, a quem gostaria de expressar o meu reconhecimento e sincero agradecimento:

Ao Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas, por me receber e permitir a realização deste trabalho no seu laboratório.

À Professora Doutora Zélia Silva, pela orientação científica, pela disponibilidade, paciência e generosidade durante a orientação, bem como pelas valiosas correcções, críticas e sugestões ao meu trabalho.

Pelos preciosos ensinamentos, pela confiança, paciência e compreensão, essenciais no decorrer deste trabalho, à Professora Doutora Paula Videira, ao Professor Doutor Carlos Novo e à Professora Doutora Alexandra Fernandes.

Pelo apoio e amizade, à Professora Doutora Guadalupe Cabral.

À Mylène Carrascal, Paulo Severino, Joana Almeida e Mariana Silva, pela amizade, partilha de ideias e companheirismo.

Aos restantes elementos do Departamento de Imunologia, especialmente à Manuela Correia, Glória Nunes, Idalina, Amélia, Elisabete e Filomena, por me terem recebido tão bem, pelo apoio e amizade.

Ao meu namorado, António Pereira, pela amizade, apoio, compreensão e carinho.

À minha família, em especial aos meus pais, irmã e avós, pelo apoio incondicional, ânimo, e por me permitirem continuar a sonhar.

À Vanessa Quico, pela amizade, apoio e boa disposição.

Aos meus colegas de mestrado, Helena Isabel Oliveira, Verónica Felício, Patrícia Justiniano e João Lima, pela amizade e companheirismo.

Resumo

Os fármacos anticancerígenos indutores de stress de reticulo endoplasmático (RE) podem causar a sobreexpressão e/ ou a translocação das isomerases de dissulfuretos (PDIs), classicamente descritas como proteínas residentes do RE, para a superfície celular, com importantes implicações fisiológicas, como, por exemplo, o aumento da resistência à quimioterapia. O objectivo deste trabalho foi investigar o efeito da tansigargina (TG) na viabilidade celular e na expressão e localização das PDIs e chaperonas de RE nas linhas celulares de melanoma SK-MEL-30 e MNT-1. Verificou-se que as células MNT-1 têm maior susceptibilidade à TG. Também foi demonstrado que a TG induz uma acentuada sobreexpressão de todas as proteínas em ambas as linhas celulares. Inesperadamente, ao nível da expressão fenotípica, verificou-se uma diminuição da expressão de GRP78, em SK-MEL-30 e MNT-1, e de CRT, PDI e TMX4 em SK-MEL-30, sugerindo que estas ou não são traduzidas ou são exportadas. Em MNT-1, a expressão fenotípica da CRT aumentou, não havendo alterações para a PDI. Às diferenças de susceptibilidade à TG observadas nas duas linhas poderão corresponder importantes diferenças ao nível da resposta ao stress de RE, que não se esgotam nas diferenças ao nível transcripcional, sendo necessários mais estudos para explicar esses fenómenos.

Palavras-chave: isomerase de dissulfureto (PDI), tansigargina (TG), melanoma

Abstract

Anticancer drugs capable of inducing endoplasmic reticulum (ER) stress can cause the overexpression and/ or the translocation of protein disulfide isomerases (PDIs), classically described as ER resident proteins, to the cell surface, with important physiologic implications, for example, increased resistance to chemotherapy. The aim of this project was to investigate the effect of thapsigargin (TG) on cell viability and on the expression and localization of PDIs and ER chaperones expressed in melanoma cell lines SK-MEL-30 and MNT-1. The results show that MNT-1 cells are more sensitive to TG. It has also been shown that TG induces a sharp overexpression of PDIs and ER chaperones in both melanoma cell lines. Unexpectedly, at phenotypic level, it has been shown a decreased expression of GRP78, in SK-MEL-30 and MNT-1, and of CRT, PDI and TMX4, in SK-MEL-30, suggesting that they may not be translated or are exported, while expression of CRT in MNT-1 cells increased and PDI expression didn't change. Important differences at the level of RE stress responses may account for the differences of sensitivity to TG observed in the two lines. Those differences are not closed in the differences at a transcriptional level, being necessary to perform further studies in order to explain those phenomena.

Keywords: disulfide isomerase (PDI), thapsigargin (TG), melanoma

Resumé

Les drogues anticancéreuses inductrices du stress de réticule endoplasmique (RE) peuvent causer la surexpression et/ ou la translocation des isomérases des disulfures (PDIs), classiquement décrites comme des protéines résidentes de l'ER, pour la superficie cellulaire avec d'importantes implications physiologiques, comme par exemple, l'augmentation de la résistance à la chimiothérapie. L'objectif de ce travail a été la recherche de l'effet de la thapsigargine (TG) sur la viabilité cellulaire et sur l'expression et localisation des PDIs et des chaperons de RE exprimées dans les lignes cellulaires de mélanome SK-MEL-30 et MNT-1. Les résultats démontrent que les cellules MNT-1 sont plus sensibles à TG. Il a été démontré aussi que la TG induit une surexpression accentuée des PDIs et chaperons du RE en tous les deux lignes cellulaires. Imprévisiblement, au niveau de l'expression phénotypique, on a vérifié une diminution de l'expression de GRP78, en SK-MEL-30 et MNT-1, et de CRT, PDI et TMX4 en SK-MEL-30, en suggérant que ceux-ci ou ne sont pas traduites ou sont exportées. En MNT-1, l'expression phénotypique de la CRT a grandit, et n'a pas eu des modifications pour la PDI. Aux différences de sensibilité à la TG, observées sur les deux lignes, peuvent correspondre d'importantes différences au niveau de la réponse au stress de RE, qui ne s'épuisent pas aux différences au niveau transcriptionnelle. Il faut produire d'autres études à fin d'explique ces phénomènes.

Mots-clés: isomérase de disulfure (PDI), thapsigargine (TG), mélanome

O desenvolvimento deste trabalho deu origem ao seguinte poster:

Veríssimo, T, Silva, Z., Novo, C. e Videira, P. A. (2011) Isomerasas de dissulfuretos: impacto do tratamento com tapsigargina na sua expressão e localização celular em linhas celulares de melanoma. Glycosciences in the International Year of Chemistry – Applications to Human Health an Disease, 2011, Lisboa.

Abreviaturas e siglas

- aa** - Aminoácidos
- 7-AAD** - 7-amino-actinomicina D
- Ab1** - Anticorpo 1
- Ab2** - Anticorpo 2
- ABC** - Cassete de ligação ao ATP
- ABCA9** - Transportador ABC, família A, membro 9
- ABCB1** - Transportador ABC, família B, membro 1
- ABCB5** - Transportador ABC, família B, membro 5
- ABCB8** - Transportador ABC, família B, membro 8
- ABCC1** - Transportador ABC, família C, membro 1
- ABCC2** - Transportador ABC, família C, membro 2
- ABCD1** - Transportador ABC, família D, membro 1
- ACTB** - β -actina
- APAF-1** - Factor activador de proteases da apoptose 1
- APC** - Alofocianina
- ASK1** - Cinase reguladora do sinal de apoptose 1
- ATF4** - Factor de activação da transcrição 4
- ATF6** - Factor activador da transcrição 6
- BH** - Proteína da família Bcl-2 que contém motivos homólogos da Bcl-2
- Bcl-2** - Proteína 2 da célula B de linfoma
- BFA** - Brefeldina A
- bZIP** - Fecho de leucinas básico
- Ca_e** - Ca²⁺ extracelular
- Ca_i** - Ca²⁺ intracelular
- cDNA** - DNA complementar
- C/ EBP** - Proteína homóloga da CCAAT/ protein de ligação ao enhancer
- CHOP** - Proteína homóloga da C/ EBP
- c-Jun** - Proteína c-Jun
- CNX** - Calnexina
- CRT** - Calreticulina
- C_t** - Ciclo de limiar
- CTLA-4** - Antígeno-4 associado aos linfócitos T citotóxicos
- DAPI** - 4'6 diamino-2fenilindole
- DMSO** - Dimetilsulfóxido

- DnaJ** - Proteína que contém um domínio J
- EDEM** - Proteína do tipo manosidase promotora da degradação associada ao RE
- eIF2 α** - Factor de iniciação da transcrição 2 α eucariótico
- EMC** - Citotoxicidade melanogénica endógena
- ERAD** - Degradação proteínas associada ao RE
- ERdj5** - Proteína 5 residente do RE do tipo DnaJ
- ERO1 α** - Oxidase 1 α do RE
- ERp5** - Proteína 5 do RE
- ERp57** - Proteína 57 do RE
- ERp72** - Proteína 72 do RE
- ERSE** - Elemento de resposta ao stress de RE
- FAM** - 6 – carboxifluoresceína
- FDA** - *Food and Drug Administration*
- FITC** - Fluoresceína isotiocianato
- FSC** - Dispersão frontal
- FRET** - Transferência de energia por ressonância da fluorescência
- GADD34** - Gene 34 indutível por danos de DNA e paragem de crescimento
- GADD153** - Proteína 153 indutível por danos no DNA e paragem do crescimento
- GAPDH** - Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- gDNA** - DNA genómico
- GRP58** - Proteína 58 regulada pela glucose
- GRP78/ BiP** - Proteína 78 regulada pela glucose/ proteína de ligação à cadeia pesada da imunoglobulina
- GTC** - Tiocinato de guanidina
- IgG** - Imunoglobulina G
- IMs** - Membranas intracelulares
- IP₃R** - Canal receptor do inositol 1,4,5-trifosfato
- IRE1 α** - Enzima dependente do inositol 1 α
- JIK** - Cinase inibidora do terminal N do c-Jun
- JNK** - Cinase do terminal N do c-Jun
- KDEL** - Sequência de aa C-terminal de retenção das proteínas no RE
- LGGL** - Sinal de retenção no RE
- 2-ME** - 2-mercaptoetanol
- MFI** - Intensidade de Fluorescência Média
- MHC classe 1** - Complexo major de histocompatibilidade classe 1
- MDR** - Resistência a múltiplos fármacos

- MDR1** - Proteína de resistência a múltiplas drogas 1
- miRNA** - MicroRNA
- MPT** - Proteína microssomal de transferência de triglicerídeos
- mRNA** - RNA mensageiro
- NF – kB** - Factor nuclear Kb
- NFQ** - *Quencher* não fluorescente
- Nox1** - NADPH oxidase 1
- OS-9** - Osteosarcoma 9
- P5** - Proteína PDI 5
- P4HB** - Subunidade-β do complexo prolin-4-hidroxilase
- p58^{IPK}** - Inibidor da cinase de proteínas activada pela cadeia dupla de RNA (PKR) induzida pelo interferão
- PBS** - Solução-tampão de fosfatos
- PCR** - Reacção em cadeia da polimerase
- PERK** - Cinase do eIF2α do ER pancreático
- PDI** - Isomerase de dissulfureto
- PDIA3** - Membro 3 da família PDI
- PDIA4** - Membro 4 da família PDI
- PDIA5** - Membro 5 da família PDI
- PDIA6** - Membro 6 da família PDI
- PDIR** - Proteína relacionada com a PDI
- P-gp** - P-glicoproteína
- pK_a** - Constante de dissociação
- PKC-β** - Cinase de proteínas C-beta
- PLC** - Complexo de carga do péptido
- PP1** - Fosfatase de proteínas 1
- PS** - Fosfatidilserina
- PSA** - Protease específica da próstata
- PTP** - Poro de transição de permeabilidade
- RE** - Retículo Endoplasmático
- ROS** - Espécies reactivas de oxigénio
- RBP** - Proteína de ligação ao RNA
- RNase** - Ribonuclease
- RQ** - Quantidade relativa de expressão genética em relação à amostra de referência
- RT** - Transcrição reversa

- RT-qPCR** - Reacção em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
- RS** - Retículo sarcoplasmático
- S1P** - Protease *Site-1*
- S2P** - Protease *Site-2*
- SERCA** - ATPase de Ca^{2+} do retículo sarco/ endoplasmático
- SSC** - Dispersão lateral
- STAT** - Transdutor de sinal e activador da transcrição
- STAT3** - Transdutor de sinal e activador da transcrição 3
- TAP** - Transportador de péptidos
- Terminal N** - Terminal amina
- Terminal C** - Terminal carboxílico
- TMX** - Proteína transmembranar relacionada com a tiorredoxina
- TMX1** - Proteína transmembranar relacionada com a tiorredoxina 1
- TMX2** - Proteína transmembranar relacionada com a tiorredoxina 2
- TMX3** - Proteína transmembranar relacionada com a tiorredoxina 3
- TMX4** - Proteína transmembranar relacionada com a tiorredoxina 4
- TMX5** - Proteína transmembranar relacionada com a tiorredoxina 5
- TNF** - Factor de necrose tumoral
- TRAF2** - Factor associado ao receptor TNF 2
- TUN** - Tunicamicina
- TYR** - Tirosinase
- TYRP1** - Proteína relacionada com a tirosinase 1
- TYRP2** - Proteína relacionada com a tirosinase 2
- XBP1** - Proteína 1 de ligação à X-box
- XTP3-B** - Precursor do gene B transactivado pelo XTP3
- UGGT** - UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferase
- UPR** - Resposta à acumulação de proteínas não processadas no RE

Índice geral

1. Introdução.....	17
1.1. Aquisição da estrutura tridimensional e controlo de qualidade de proteínas no retículo endoplasmático (RE).....	17
1.2. A família das isomerases de dissulfuretos (PDIs).....	18
1.2.1 PDI.....	19
1.2.2 ERp57 (PDIA3).....	20
1.2.3 ERp72 (PDIA4).....	24
1.2.4 PDIA5.....	25
1.2.5 PDIA6.....	25
1.2.6 ERdj5.....	26
1.2.7 TMXs.....	27
1.3 Stress do retículo endoplasmático (RE) e a Resposta à Acumulação de Proteínas (UPR).....	27
1.3.1 Os três ramos da resposta à acumulação de proteínas não processadas no RE (UPR).....	29
1.3.2 Apoptose mediada pelo stress de RE.....	32
1.3.3 Indução de stress de RE através da inibição da ATPase de Ca ²⁺ do retículo sarco/ endoplásmico (SERCA) pela taspigargina (TG).....	34
1.4 Introdução ao tema da tese.....	38
2. Materiais e Métodos.....	41
2.1 Cultura e manutenção das linhas celulares de melanoma.....	41
2.2 Anticorpos.....	42

2.3 Tapsigargina (TG).....	42
2.4 Ensaaios de expressão genética.....	43
2.5 Técnicas.....	44
2.5.1 Citometria de fluxo.....	44
2.5.2 Reacção em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR) em tempo real.....	46
2.6 Caracterização das linhas celulares de melanoma.....	48
2.6.1 Análise da expressão fenotípica dos membros da família PDI e de outras chaperonas residentes do RE nas linhas celulares de melanoma por citometria de fluxo.....	48
2.6.2 Análise do efeito da TG na viabilidade celular por citometria de fluxo.....	50
2.7 Análise do efeito da TG na expressão das PDIs.....	51
2.7.1 Análise do efeito da TG na expressão genética das PDIs por RT-qPCR.....	51
2.7.1.1 Tratamento com TG.....	51
2.7.1.2 Extracção de RNA total e conversão em cDNA por RT.....	52
2.7.1.3 Quantificação relativa da expressão genética das PDIs por RT-qPCR.....	54
2.7.2 Análise do efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular das PDIs por citometria de fluxo.....	55
2.9 Análise Estatística.....	55
2.10 Citações e referências bibliográficas.....	55
3. Resultados.....	56
3.1 Caracterização das linhas celulares de melanoma.....	56
3.1.1 Análise do efeito da TG na viabilidade celular por citometria de fluxo.....	56

3.1.2 Análise da expressão fenotípica e da localização celular das PDIs e de outras chaperonas residentes do RE de melanoma por citometria de fluxo.....	60
3.2 Análise do efeito da TG na expressão das PDIs.....	61
3.2.1 Análise do efeito da TG na expressão genética das PDIs por RT-qPCR.....	61
3.2.2 Análise do efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular das PDIs por citometria de fluxo.....	67
4. Discussão.....	71
4.1 Caracterização das linhas celulares de melanoma.....	71
4.1.1 Susceptibilidade das linhas celulares de melanoma à TG.....	71
4.1.2 Expressão e localização das PDIs e outras chaperonas residentes do RE.....	75
4.2 Análise do efeito da TG na expressão dos membros da família PDI e outras chaperonas do RE.....	79
4.2.1 Análise do efeito da TG na expressão genética dos membros da família PDI e outras chaperonas do RE por RT-qPCR.....	79
4.2.2 Análise do efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular dos membros da família PDI e outras chaperonas do RE por citometria de fluxo.....	81
4.3 Perspectivas futuras.....	83
5. Conclusões gerais.....	84
6. Bibliografia.....	86

Índice de figuras

Figura 1 - Família das isomerases de dissulfuretos (PDIs) humanas.....	19
Figura 2 - Ciclo da CNX/ CRT e processamento de oligossacáridos e proteínas no RE.....	22
Figura 3 - Eventos associados ao stress de RE e à resposta à acumulação de proteínas (UPR).....	30
Figura 4 - Apoptose mediada pelo stress de RE.	33
Figura 5 - Estrutura das taspigarginas.....	35
Figura 6 - Efeito da TG na viabilidade celular das três linhas celulares de melanoma.....	58
Figura 7 - Dot plots resultantes da avaliação da apoptose nas células SK-MEL-30 e MNT-1 tratadas com diferentes concentrações de TG, durante 48h, marcadas com Anexina V e 7AAD, por citometria de fluxo.....	59
Figura 8 - Efeito da TG na quantidade relativa de expressão de transcritos da família PDI e de outras chaperonas residentes do RE nas células SK-MEL-30.	65
Figura 9 - Efeito da TG na quantidade relativa de expressão de transcritos da família PDI e de outras chaperonas do RE nas células MNT-1.	66
Figura 10 - Efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular de algumas PDIs e chaperonas residentes do RE nas células SK-MEL-30.	69
Figura 11 - Efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular de algumas PDIs e chaperonas residentes do RE nas células MNT-1.....	70

Índice de tabelas

Tabela 1 - Anticorpos anti-PDI humana e anti-chaperonas residentes do RE usados na análise da expressão fenotípica em células de melanoma.....	43
Tabela 2 - Identificação dos ensaios de expressão genética TaqMan® Gene Expression Assay usados na quantificação de mRNAs da família PDI e de chaperonas residentes do RE em linhas celulares de melanoma.....	44
Tabela 3 - Concentração final, isotipo e anticorpo secundário dos anticorpo anti-PDI e anti-chaperonas residentes do RE usados nas marcações celulares.....	49
Tabela 4 - Volume dos reagentes necessários para preparar a mistura de reacção para uma reacção de RT.. ..	53
Tabela 5 - Condições de tempo e temperatura dos ciclos de RT.....	53
Tabela 6 - Volume dos componentes da mistura de reacção da RT-qPCR em tempo real para cada reacção.....	54
Tabela 7 - Condições de tempo e temperatura da corrida de RT-qPCR em tempo real.....	54
Tabela 8 - Expressão dos membros da família PDI e de outras três chaperonas do RE.. ..	61
Tabela 9 - Níveis de expressão de transcritos dos genes da família PDI e das chaperonas do RE nas células SK-MEL-30 e MNT-1 cultivadas em meio de cultura contendo apenas o solvente (amostras de referência) durante 48h.. ..	63

Índice dos apêndices

Resumo submetido para o workshop Glycosciences in the International Year of Chemistry – Applications to Human Health an Disease.....	95
---	----

1. Introdução

1.1. Aquisição da estrutura tridimensional e controlo de qualidade de proteínas no retículo endoplasmático (RE)

O retículo endoplasmático (RE) é um dos compartimentos celulares responsável pela aquisição da estrutura tridimensional das proteínas secretadas e membranares (Stevens & Argon, 1999) e funciona como um compartimento de armazenamento de Ca^{2+} e fonte de sinais de cálcio (Ni & Lee, 2007). Para além de estar munido de várias chaperonas moleculares e oxirredutases residentes, que assistem a maturação das proteínas, o RE proporciona o ambiente químico adequado para a ocorrência das reacções de oxidação-redução destes processos, quer em termos de concentrações iónicas (nomeadamente da concentração de cálcio) quer de capacidade oxidativa (Feige & Hendershot, 2011; Hebert & Molinari, 2007). As ligações dissulfureto, críticas para a maturação e estabilidade das proteínas nas células eucarióticas, são introduzidas no RE (Ellgaard & Ruddock, 2005). Formando-se entre cisteínas específicas das cadeias polipeptídicas, servem para estabilizar a cadeia polipeptídica (aquisição de estrutura tridimensional específica) ou para ligá-la a outras cadeias polipeptídicas (aquisição de estrutura quaternária). As ligações dissulfureto podem formar-se co-traducionalmente entre cisteínas adjacentes, à medida que a região do terminal amina (N) da cadeia polipeptídica recém-formada é translocada para o lúmen do RE. Em algumas proteínas, as cisteínas do terminal N formam ligações dissulfureto com cisteínas não-adjacentes, localizadas nas regiões mais próximas do terminal carboxilo (C). As ligações dissulfureto prematuras entre cisteínas adjacentes do terminal N podem não fazer parte da estrutura nativa da proteína. Dado serem as que primeiro entram no lúmen do ER é necessário protegê-las, de modo a prevenir a formação de ligações dissulfureto incorrectas. Para isso o RE possui um conjunto de proteínas residentes com função de chaperonas que se ligam às regiões do terminal N, impedindo a formação de pontes de dissulfureto incorrectas. Quando se forma uma ligação dissulfureto incorrecta, é necessário quebrá-la para que se possa formar uma nova ligação dissulfureto com a cisteína correcta do par. Há contudo, ligações dissulfureto que não fazendo parte da estrutura tridimensional da proteína nativa podem servir como intermediárias no seu processo de maturação sendo quebradas à medida que a maturação prossegue. As ligações dissulfureto não-nativas são rearranjadas pelas isomerases de dissulfuretos (PDIs - *protein disulfide isomerases*), de modo a formar as ligações dissulfureto nativas. Uma vez adquirida a sua estrutura tridimensional, as proteínas são processadas no sistema de Golgi e enviadas para os seus destinos funcionais, quer como componentes da célula quer secretadas para o espaço extracelular. Nalguns casos, a proteína resultante do processamento pós-traducional no RE

adquire uma estrutura tridimensional incorrecta, sendo nesse caso direccionada para o processo de degradação de proteínas associado ao RE (ERAD - *endoplasmic reticulum-associated degradation*) no citosol (Feige & Hendershot, 2011). Os membros da família PDI, juntamente com as chaperonas moleculares residentes do RE, constituem um grupo de proteínas essenciais para a aquisição da estrutura tridimensional das proteínas e para o controlo de qualidade das proteínas resultantes. É assim assegurado que as pontes de dissulfureto formadas ligam as cisteínas correctas e que a proteína resultante não interage incorrectamente com outras proteínas, de forma a que apenas as proteínas correctamente maturadas prossigam para a via secretora (Rutkevich & Williams, 2011).

1.2. A família das isomerases de dissulfuretos (PDIs)

A família das isomerases de dissulfuretos ou PDIs é uma família de oxirredutases abundantes e ubíquas nas células dos mamíferos, localizadas principalmente no RE, e que catalisam a formação (actividade de oxidação), quebra (actividade de redução) e rearranjo (actividade de isomerase) de ligações dissulfureto entre cisteínas reactivas das cadeias polipeptídicas recém-sintetizadas, durante o processo de aquisição das estruturas tridimensional e quaternária das proteínas (Ellgaard & Ruddock, 2005; Feige & Hendershot, 2011; Kozlov, Maattanen, Thomas, & Gehring, 2010; Wilkinson & Gilbert, 2004).

A família PDI é formada por 20 membros que partilham propriedades estruturais comuns, mas também apresentam características únicas relacionadas com os sítios de ligação ao substrato e a outras proteínas residentes do RE, que são responsáveis pela especificidade das interacções com o substrato e pelas propriedades funcionais (Kozlov et al., 2010).

Os membros da família PDI pertencem à superfamília da tiorredoxina, uma vez que cada um possui pelo menos um domínio do tipo tiorredoxina, ou seja, um domínio capaz de reagir com cisteínas. A maioria dos membros da família PDI contém domínios do tipo tiorredoxina catalíticos e não-catalíticos, identificados com as letras **a** ou **b**, consoante a presença ou ausência do motivo catalítico, respectivamente, com o uso do apóstrofe (') para indicar a sua posição na proteína (Figura 1) (Kozlov et al., 2010).

A actividade enzimática dos membros da família PDI é determinada por quatro factores: 1) a sequência do centro activo; 2) a presença ou ausência de resíduos adicionais que modulam o pK_a das cisteínas do centro activo; 3) a presença ou ausência de um par de lisina-ácido glutâmico carregado, que está envolvido nas reacções de transferência de prótons; e, 4) para a capacidade de catalisar reacções de isomerização, a presença ou

ausência de um local de ligação ao substrato num domínio não catalítico (Ellgaard & Ruddock, 2005).

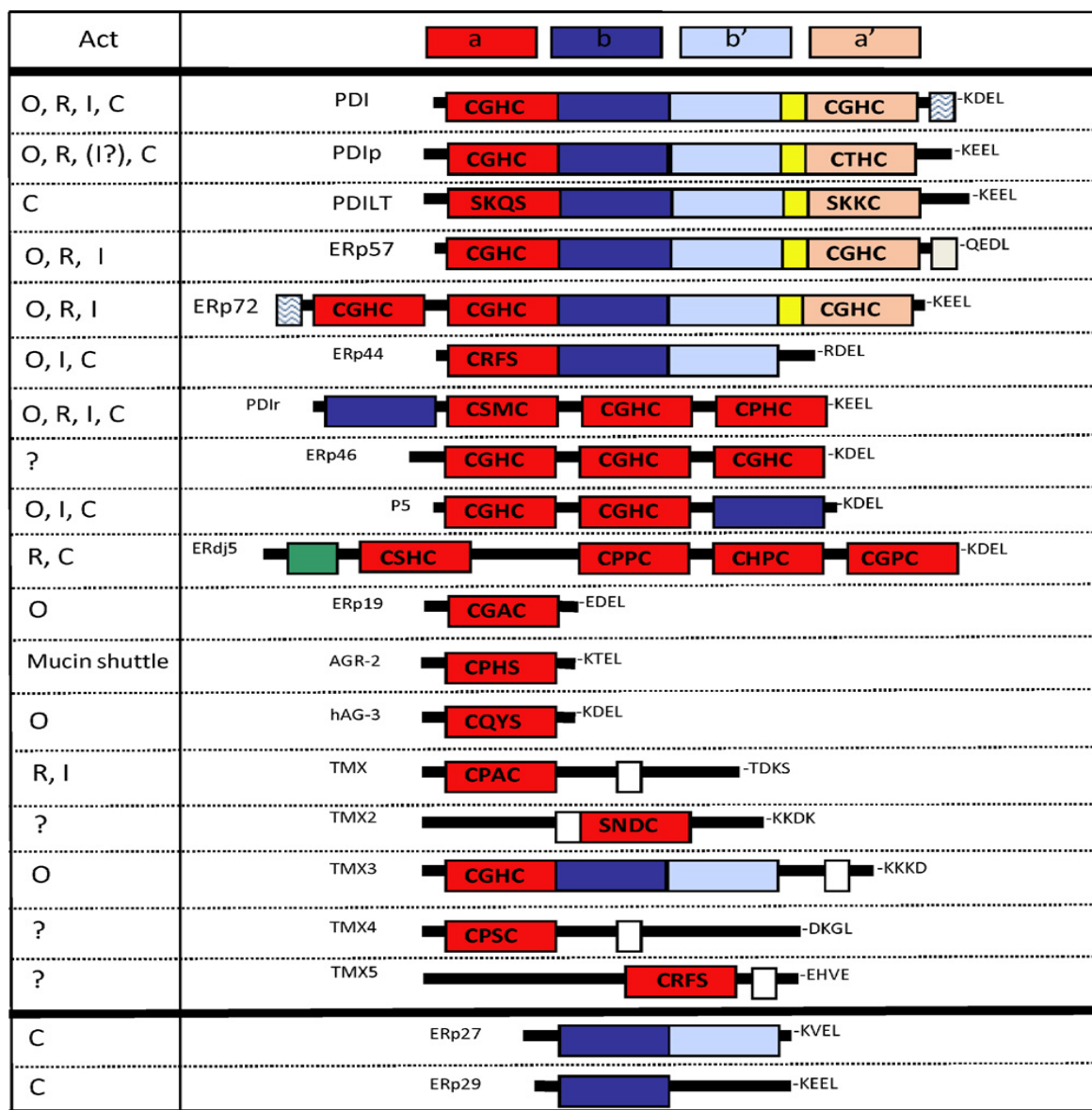


Figura 1 - Família das isomerases de dissulfuretos (PDIs) humanas. Os domínios catalíticos do tipo tiorredoxina **a** e **a'** estão representados a vermelho e a vermelho, respectivamente; os domínios não catalíticos **b** e **b'** estão a azul e azul claro, respectivamente. A amarelo está representado o *x linker*. As caixas com linhas azuis onduladas representam porções ácidas e a caixa bege representa a cauda básica da ERp57. O domínio DnaJ da ERdj5 está representado por uma caixa verde e os domínios transmembranares das TMXs estão representadas por caixas brancas. Para as actividades, O = oxidase, R = redutase, I = isomerase e C = chaperona. (Maattanen, Gehring, Bergeron, & Thomas, 2010).

1.2.1 PDI

A isomerase de dissulfuretos (PDI - *protein disulfide isomerase*) é o membro fundador da família PDI (Feige & Hendershot, 2011; Kozlov et al., 2010). Nas células dos mamíferos, a PDI constitui a subunidade-β do complexo prolil-4-hidroxilase ou P4HB (do

inglês *prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide*), importante para hidroxilar os resíduos de prolina do colagénio e é, também, uma subunidade da proteína microsomal de transferência de triglicerídeos (MTP - *microsomal triglyceride transfer protein*) (Ferrari & Soling, 1999).

A PDI tem quatro domínios do tipo tiorredoxina, **a-b-b'-a'**, com **a** e **a'** contendo os motivos catalíticos CGHC, e os domínios **b** e **b'** contendo bolsas hidrofóbicas de ligação ao substrato (Figura 1) (Kozlov et al., 2010; Maattanen et al., 2010). Os domínios catalíticos **a** e **a'** são funcionalmente semelhantes à tiorredoxina e reagem com os tióis das proteínas recém-sintetizadas, enquanto os domínios **b** e **b'**, embora estruturalmente semelhantes à tiorredoxina, não contêm cisteínas cataliticamente activas, que reajam com os tióis das proteínas recém-formadas. Os domínios **b** e **b'** são frequentemente responsáveis pelo recrutamento de substrato e pela inibição da agregação, conferindo à PDI actividade de chaperona (Ellgaard & Ruddock, 2005; Kozlov et al., 2010). Existe uma região altamente acídica no terminal carboxílico (terminal C), designada por **c**, que contém o motivo KDEL de localização no RE, e uma curta região entre os domínios **b'** e **a'** que se designa por *x-linker* (Imaoka, 2011; Kozlov et al., 2010). Existe, ainda, um domínio **e**, entre os domínios **a** e **b**, que tem homologia com o receptor de estrogénio, sugerindo que a PDI pode funcionar como uma proteína de ligação ao estrogénio intracelular. Servindo de reservatório intracelular de estrogénio, pode, desse modo, modelar as funções biológicas do estrogénio endógeno (Fu & Zhu, 2009; Imaoka, 2011). Para o mecanismo da reacção enzimática da PDI contribuem, para além das cisteínas presentes no centro catalítico, vários outros resíduos. Por exemplo, o resíduo de glutamato posicionado abaixo da cisteína mais próxima do terminal C participa na transferência de protões durante a libertação do substrato. Por sua vez, uma arginina vizinha da cisteína catalítica, modula o seu pK_a através de uma alteração conformacional que permite a entrada da arginina no núcleo hidrofóbico do domínio catalítico e a consequente formação de uma ponte salina com um resíduo de glutamato, que está implicado na libertação do substrato (Kozlov et al., 2010).

1.2.2 ERp57 (PDIA3)

A proteína 57 residente do RE (ERp57 - *endoplasmic reticulum protein 57*) é um membro da família PDI (Figura 1) que não contém bolsas hidrofóbicas nos seus domínios **b** e **b'**, ao contrário da PDI, porque a sua superfície é, na sua maior parte, negativamente carregada e incapaz de ligar péptidos hidrofóbicos. Para compensar a ausência de um local hidrofóbico de ligação ao substrato nos domínios **b** e **b'**, a ERp57 requer a assistência de outras proteínas para reconhecer e interagir com os substratos (Kozlov et al., 2010;

Rutkevich & Williams, 2011). De facto, o domínio **b'** é um dos que tem menor homologia entre a ERp57 e a PDI, o que explica a diferente especificidade de ligação das duas proteínas. A ERp57 tem de se associar às chaperonas moleculares do RE calnexina (CNX) e à calreticulina (CRT) para catalisar a formação e isomerização de ligações dissulfureto (Turano, Gaucci, Grillo, & Chichiarelli, 2011). A porção luminal da CNX e da CRT consiste num domínio globular que contém a lectina (proteína que liga estruturas sacarídicas) e num domínio em forma de gancho, cuja extremidade negativamente carregada apresenta complementaridade com uma pequena área do domínio **b'** da ERp57 positivamente carregada à qual se liga (Kozlov et al., 2010; Turano et al., 2011). Além disso, a CNX e a CRT possuem um local de ligação para o Ca^{2+} que contribui para a estabilidade geral do complexo (Coe & Michalak, 2009; Turano et al., 2011).

A ERp57 interage com a CNX e a CRT no ciclo da CNX/ CRT (Figura 2). Estas lectinas recrutam especificamente proteínas monoglicosiladas, o que faz com que a ERp57 esteja otimizada para realizar as suas actividades em glicoproteínas (Rutkevich & Williams, 2011).

A glicosilação ocorre co-traducionalmente através da transferência de um oligossacarídeo $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, para um resíduo de asparagina dos polipéptidos recém-sintetizados, pela oligossacaril transferase. Após a glicosilação das cadeias recém-formadas, as glucosidases I e II do RE geram oligossacáridos monoglicosilados ($\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) reconhecidos pela CNX e pela CRT. A ligação à CNX/ CRT permite retardar a aquisição da estrutura tridimensional, prevenir a agregação, reter os intermediários da aquisição da estrutura tridimensional no RE e promover a isomerização e formação de dissulfuretos através da acção da ERp57 associada. Os vários ciclos de libertação e ligação da glicoproteína à CNX/ CRT são regulados em grande parte pelas acções opostas da glucosidase II e UDP-Glc:glicoproteína glucosiltransferase (UGGT), que catalisam a remoção e adição dos resíduos terminais de glucose, respectivamente. Após dissociar-se do complexo CNX/ CRT, a glicoproteína pode adquirir a sua estrutura tridimensional rapidamente e passar por um processamento levado a cabo pela glucosidase II e pela manosidase I do RE, para remover a glicosilação e um resíduo de manose do oligossacárido, respectivamente. Posteriormente, a proteína é incorporada nas vesículas de transporte e exportada para o Golgi. As glicoproteínas que não adquirem a sua estrutura tridimensional imediatamente sofrem ciclos de remoção da glicosilação pela glucosidase II e de glicosilação pela UGGT até ser atingida uma conformação tridimensional correcta. Finalmente, as glicoproteínas que adquiriram estrutura tridimensional incorrecta com residência prolongada nos ciclos CNX/ CRT são sujeitas a uma remoção mais extensa da

manose pela acção da manosidase I do RE e das enzimas EDEM (*endoplasmic reticulum degradation enhancing-mannosidase-like protein*). Estas reacções permitem expor os locais de reconhecimento para as lectinas OS-9 e XTP3-B que recrutam substratos para a maquinaria ERAD, para degradação pelos proteossomas citosólicos (Maattanen et al., 2010; Rutkevich & Williams, 2011).

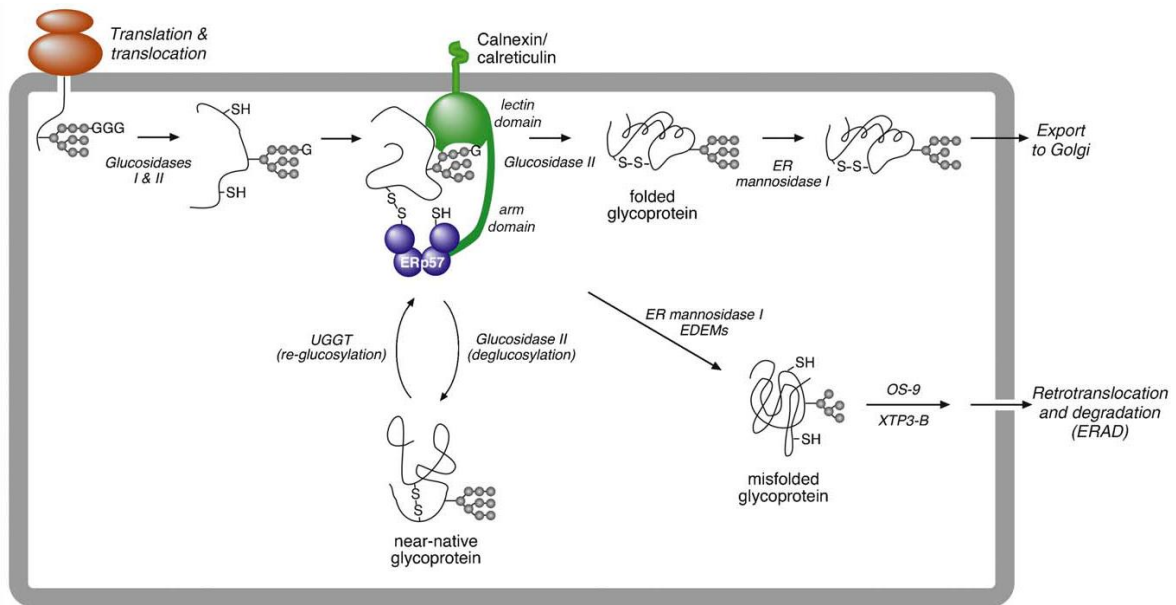


Figura - 2 Ciclo da CNX/ CRT e processamento de oligossacáridos e proteínas no RE. (Rutkevich & Williams, 2011)

A ERp57 também é designada por proteína 58 regulada pela glucose (*GRP58 - glucose-regulated protein 58*), nome indicativo do facto de a ERp57 ser uma proteína sensível ao stress, cuja expressão aumenta após esgotamento de glucose. Para além da sua função específica na aquisição da estrutura tridimensional e controlo de qualidade de proteínas no RE, existem outras funções desempenhadas pela ERp57. Uma função importante no RE é a participação na biossíntese e montagem do complexo major de histocompatibilidade (MHC - *major histocompatibility complex*) classe 1, catalisando a formação de pontes dissulfureto nas cadeias pesadas das moléculas de MHC classe 1 e contribuindo para a formação do complexo de carga do péptido (PLC - *peptide loading complex*), composto pelo heterodímero da cadeia pesada- β_2 microglobulina, CRT, ERp57, tapasina e o transportador de péptidos (TAP - *transporter associated with antigen processing*), que transporta os péptidos originados pelo proteossoma (Wearsch & Cresswell, 2008).

A ERp57 também está envolvida na modulação da actividade da ATPase de Ca^{2+} do retículo sarco/endoplasmático (SERCA - *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*), que transporta iões de cálcio para o RE, através da regulação do estado de oxidação-redução dos grupos sulfidrilo na porção luminal da SERCA, em conjunto com a CRT (Coe & Michalak, 2009).

A ERp57 é uma das proteínas do RE que é recrutada para a superfície celular para participar na formação dos fagossomas. A fagocitose mediada pelo RE parece ser um mecanismo geral para a entrada nos macrófagos, mas também pode ocorrer noutros tipos de células (Desjardins, 2003). A presença de CRT na membrana celular parece ser essencial para a morte celular imunogénica, que é um importante factor para um resultado favorável da quimioterapia das células tumorais. A ERp57 é necessária para a exportação da CRT do RE para a superfície da célula, mas não possui propriedades imunogénicas. A exposição da CRT na superfície da célula pode funcionar como um "*eat me signal*" para as células dendríticas (Obeid, 2008; Panaretakis et al., 2008; Peters & Raghavan, 2011).

A ERp57 tem um papel na modulação da sinalização do transdutor de sinal e activador da transcrição 3 (STAT3 - *signal transducer and activator of transcription 3*) (Coe, Jung, Groenendyk, Prins, & Michalak, 2010). A STAT3 é um membro da família STAT de factores de transcrição e participa na regulação da expressão de genes envolvidos na resposta imunitária, na inflamação, na sobrevivência celular e na proliferação celular. A sua activação induzida por várias citocinas e factores de crescimento tem lugar ao nível da membrana celular e promove a sua importação para o núcleo. No núcleo, o STAT3 liga-se às suas sequências consenso nos promotores ou *enhancers* dos genes alvo. A desregulação da sua activação, isto é, a sua activação constitutiva, é um factor que contribui para a oncogénese e foi detectada em diversos tipos de cancro e linhas celulares transformadas, tendo sido proposto como um alvo para a terapia anti-tumoral. A ERp57 interage com a STAT3 ao nível da membrana celular, onde ocorre a fosforilação de uma tirosina da STAT3. No núcleo, a ERp57 liga ao DNA na proximidade das sequências consenso da STAT3, sendo necessária, pelo menos no caso de alguns genes, para a activação da actividade transcripcional da STAT3 (Chichiarelli et al., 2010; Imaoka, 2011).

A ERp57 é particularmente importante na resposta ao stress induzido por drogas utilizadas na quimioterapia de células neoplásicas. A sua sobreexpressão e consequente aumento das suas actividades de chaperona e redox induzidas como resposta fisiológica ao stress do RE contrariam alguns dos efeitos deletérios do stress de RE pretendidos com a quimioterapia. A inibição da actividade da ERp57 é assim desejável pelo que é um alvo

potencial para a intervenção farmacológica conducente a uma maior eficácia da quimioterapia. A investigação sobre os seus inibidores é assim altamente desejável (Turano et al., 2011).

1.2.3 ERp72 (PDIA4)

A proteína residente do RE ERp72 (*endoplasmic reticulum protein 72*) é o único membro da família PDI com cinco domínios do tipo tiorredoxina (**a⁰-a-b-b'-a'**) e com motivos catalíticos CGHC nos domínios **a⁰**, **a** e **a'**. (Figura 1). Na sua topologia geral, a ERp72 é similar à ERp57, visto que a superfície dos domínios **b** e **b'** é negativamente carregada e não possui um fragmento hidrofóbico exposto, ao contrário da PDI, o que sugere que é improvável que a ERp72 se ligue directamente a substratos proteicos de forma análoga à PDI. A superfície **bb'** da ERp72 correspondente ao local de ligação da CNX da ERp57 é negativamente carregada, pelo que não ocorre nenhuma interacção entre a ERp72 e o domínio P da CNX. Em vez disso, o local de ligação ao substrato da ERp72 ocorre nas regiões hidrofóbicas que ladeiam os centros activos nos seus domínios catalíticos. O domínio **a⁰** parece estar envolvido na formação e isomerização de pontes dissulfureto, o domínio **a** tem papéis intermediários na catálise e na ligação, e o domínio **a'** parece participar na ligação aos substratos (Kozlov et al., 2010; Rutkevich & Williams, 2011).

A NADPH oxidase 1 (Nox1 - *NADPH oxidase 1*) interage com a ERp72, regulando o seu estado de oxidação-redução e as vias de sinalização sensíveis ao estado de oxidação-redução da ERp72. A associação da Nox1 com a ERp72 envolve o local de ligação ao Ca²⁺ e parte do domínio **a⁰**. As espécies reactivas de oxigénio (ROS - *reactive oxygen species*) geradas pela Nox1 oxidam os resíduos reactivos de cisteína da ERp72, resultando numa inibição da sua actividade de redutase. Ainda não se conhece qual a actividade da ERp72 afectada pela regulação da Nox1, mas especula-se que as alterações na actividade de redutase da ERp72 em consequência da oxidação pela Nox1 podem impedir a sua acção no processo de aquisição da estrutura tridimensional das proteínas. No entanto, é digno de nota o facto de a ERp72 ter sido detectada na membrana plasmática de neutrófilos, colocalizada com a Nox1 transmembranar (W. Chen et al., 2008).

1.2.4 PDIA5

O membro 5 da família das isomerases de dissulfuretos (PDIA5 - *protein disulfide isomerase family A, member 5*), é também designada por proteína relacionada com a PDI (PDIR - *protein disulfide isomerase (PDI)-related protein*). Apresenta três motivos activos (CSMC, CGHC e CPHC) e um sinal de retenção no RE (LGGL) no terminal C. (Figura 1) O

motivo CSMC da PDIA5 é único entre a família PDI (Hayano & Kikuchi, 1995; Horibe et al., 2004; Imaoka, 2011). O motivo CGHC é o mais importante para a actividade catalítica, dado que a substituição dos resíduos de cisteína neste motivo originou um mutante da PDIA5 com fraca actividade catalítica com a insulina. Idêntico procedimento para os restantes domínios CXXC resultou num aumento de actividade. Assim, estes resultados sugerem que os motivos de tiorredoxina CXXC da PDIA5 contribuem para a sua actividade enzimática segundo a ordem CGHC > CPHC > CSMC, sendo, no entanto, as suas actividades de isomerase e de chaperona mais fracas do que as da PDI. O motivo CSMC é mais importante na oxidação, enquanto o motivo CGHC funciona principalmente na redução das ligações dissulfureto, com ambas as actividades ocorrendo simultaneamente durante a aquisição da estrutura tridimensional das proteínas recém-sintetizadas no ER (Horibe et al., 2004; Imaoka, 2011).

1.2.5 PDIA6

O membro 6 da família das isomerases de dissulfuretos A (PDIA6 - *protein disulfide isomerase family A, member 6*), também conhecido por P5 (*PDI protein 5*) e ERp5 (*endoplasmic reticulum protein 5*), possui dois domínios catalíticos com o motivo CGHC e um não catalítico do tipo tiorredoxina (Imaoka, 2011; Maattanen et al., 2010; UniProt, 2011).

A pouca eficiência da PDIA6 deve-se à sua incapacidade de interagir directamente com substratos. A PDIA6 forma uma ligação não-covalente, dependente do estado de oxidação-redução, com a proteína 78 regulada pela glucose/proteína de ligação à cadeia pesada da imunoglobulina (GRP78/BiP - *glucose-regulated protein 78/ immunoglobulin heavy chain binding protein*) e reage com os substratos associados à GRP78/BiP, o que demonstra a especificidade da PDIA6 para as proteínas alvo da GRP78/BiP, incluindo aquelas marcadas para serem processadas pelo sistema ERAD. Algumas das proteínas que entram na via secretória reagem com uma PDI específica que promove a aquisição da sua estrutura tridimensional, enquanto outras interagem com várias PDIs. Isto significa que, embora exista alguma redundância relativamente às reacções catalisadas e ao substrato das PDIs, alguns membros da família PDI reconhecem substratos proteicos específicos, interagindo com um sistema de chaperonas específico, como é o caso da ligação da ERp57 ao sistema CNX/CRT e da ligação da PDIA6 à GRP78/BiP (Imaoka, 2011; Jessop, Watkins, Simmons, Tasab, & Bulleid, 2009).

A PDIA6 foi identificada nas membranas intracelulares (IMs - *intracellular membranes*) (sistema tubular denso) das plaquetas, onde tem uma função de isomerase.

Após a estimulação das plaquetas, os níveis de PDIA6 aumentaram na superfície das plaquetas. A PDIA6 associa-se com a integrina β_3 após estimulação das plaquetas. A ligação de anticorpos que bloqueiam a sua actividade de isomerase inibem a função das plaquetas, levando a uma redução na agregação das plaquetas em resposta a agonistas, e a uma diminuição na ligação do fibrinogénio e exposição da selectina-P, devido à disrupção da função das integrinas (Jordan et al., 2005).

1.2.6 ERdj5

A proteína residente do RE ERdj5 (*endoplasmic reticulum-resident DnaJ like protein 5*), também conhecida por proteína do tipo PDI que contém um domínio J (JPDI - *J-domain-containing PDI-like protein*) é uma co-chaperona que contém quatro domínios do tipo tiorredoxina e um domínio do tipo DnaJ no terminal N (Figura 1). A ERdj5 é uma proteína residente do RE (tal como confirma a presença de uma sequência orientadora ou *leader* no terminal N e de um motivo KDEL no terminal C), expressa ubiquamente, mas particularmente abundante nas células epiteliais secretoras ou glandulares, especializadas na secreção de certas substâncias. A presença de domínios do tipo tiorredoxina activos semelhantes aos da PDI sugere que a ERdj5 pode estar envolvida no processo de aquisição da estrutura tridimensional e controlo de qualidade de proteínas no RE. Para além disso, o promotor do gene *ERdj5* contém uma sequência de elemento de resposta ao stress de RE (ERSE - *endoplasmic reticulum stress-response element*) e a sua transcrição é induzida durante o stress de RE, suportando a ideia anterior. O domínio DnaJ funciona como uma co-chaperona da GRP78/BiP. A ERdj5 interage com a GRP78/BiP através do seu domínio DnaJ de forma dependente do ATP. A actividade de ATPase da GRP78/BiP é fraca, por isso, a ERdj5 estimula a actividade de ATPase intrínseca da GRP78/BiP, facilitando a sua interacção com polipéptidos recém-sintetizados em ciclos de ligação e libertação dependentes do ATP (Cunnea et al., 2003; Hosoda, Tokuda, Akai, Kohno, & Iwawaki, 2009).

A ERdj5 interage com a EDEM e funciona como redutase para alguns substratos glicosilados da ERAD que formam ligações dissulfureto não nativas (Ushioda et al., 2008). Por outro lado, a ERdj5 também contribui para a ERAD de substratos não-glicosilados, cooperando com a ERdj4, uma outra co-chaperona da família da ERdj5 (Dong, Bridges, Apsley, Xu, & Weaver, 2008). Para além disso, a sobreexpressão de ERdj5 está relacionada com a apoptose em células de neuroblastoma (Hosoda et al., 2009).

1.2.7 TMXs

TMX (TMX1), TMX2, TMX3, TMX4 e TMX5 são as cinco proteínas transmembranares relacionadas com a tiorredoxina (TMXs - *transmembrane thioredoxin-related protein*) descobertas até à data nos mamíferos. Todas as proteínas da família TMX estão predominantemente localizadas no RE e possuem um domínio transmembranar, um domínio do tipo tiorredoxina com um motivo catalítico CXXC voltado para o lúmen do ER e uma sequência sinal de retenção no RE (Imaoka, 2011).

A TMX1 possui um domínio do tipo tiorredoxina com um motivo activo único, CPAC, com actividade de redutase e de isomerase. A sobreexpressão da TMX1 reduz significativamente o stress de ER induzido pela brefeldina A (BFA), um inibidor do transporte de proteínas entre o ER e o Golgi. Sob condições de stress, a TMX1 impede a degradação da cadeia pesada do MHC classe I sobreexpressa nas linhas celulares humanas. A TMX1 liga-se à CNX, provavelmente devido a não ter um domínio do tipo **b'** de ligação ao substrato na parte luminal. A CNX assiste a formação do complexo TMX1 - MHC classe 1 sob condições de stress, o que levanta a possibilidade de a TMX ter um papel protector em condições patológicas, tais como inflamação e doenças infecciosas, onde ocorre a síntese de grandes quantidades de moléculas classe I. A TMX2 tem um motivo catalítico invulgar, SNDC, em vez de CXXC, mas a sua função no RE ainda não é conhecida (Maattanen et al., 2010; Matsuo, Masutani, Son, Kizaka-Kondoh, & Yodoi, 2009; Sugiura et al., 2010).

A TMX3 contém um motivo activo CGHC, uma sequência KKKD no terminal C e dois domínios não catalíticos (**b** e **b'**), que partilham pouca homologia com os da PDI. A TMX3 tem actividade de isomerase no ER (Haugstetter et al., 2007; Maattanen et al., 2010).

A TMX4 é uma proteína transmembranar N-glicosilada que contém um único domínio do tipo tiorredoxina, com o motivo CPSC, e não possui uma sequência KKKD típica no terminal C. A TMX4 não tem efeito na aceleração da degradação associada ao RE, mas interage com a CNX e a ERp57, cooperando com estas proteínas na catálise do processo de aquisição da estrutura tridimensional das proteínas. A TMX4 tem actividade de redutase. A TMX5 ainda não foi caracterizada (Imaoka, 2011; Sugiura et al., 2010).

1.3 Stress do retículo endoplasmático (RE) e a Resposta à Acumulação de Proteínas (UPR)

O RE tem múltiplas funções na célula, nomeadamente a síntese de proteínas (secretadas, membranares e da superfície celular), participação no metabolismo lipídico, a

síntese de oligossacáridos, o armazenamento de cálcio e, em alguns tipos celulares, a destoxificação de fármacos/compostos vários (Rutkowski & Kaufman, 2007)

Qualquer perturbação fisiológica nas funções normais do RE, decorrente do processo normal de diferenciação celular ou de alterações das condições fisiológicas de origem patológica ou farmacológica, que comprometa a sua funcionalidade no processo de aquisição da estrutura tridimensional das proteínas, pode causar stress de RE, agudo ou crónico, dependendo da duração e da gravidade da perturbação. Estas perturbações causam um desequilíbrio entre a capacidade de processamento do RE e as necessidades da célula relativamente às funções do RE, que leva à acumulação de proteínas no lúmen do RE. A acumulação de proteínas no RE desencadeia um conjunto de respostas de adaptação ao stress de RE, colectivamente designadas por resposta à acumulação de proteínas não processadas no RE (UPR - *unfolded protein response*), destinada inicialmente a restabelecer a homeostase do RE e a evitar a morte celular, mas que pode eventualmente desencadear a apoptose, se a acumulação de proteínas for prolongada ou excessiva, na medida em que as células incapazes de compensar os danos sofridos são eliminadas. O stress agudo do RE é transiente e requer apenas que as células tolerem a perturbação durante um breve período (na ordem de minutos a horas), suficiente para recuperarem a homeostase do RE, enquanto o stress crónico do RE é persistente e requer ajustamentos a longo prazo da função celular que permitam tolerar persistentemente o stress e evitar a apoptose numa escala de tempo que varia entre dias a anos (Ni & Lee, 2007; Rutkowski & Kaufman, 2007; Samali, Fitzgerald, Deegan, & Gupta, 2010; Xu, Bailly-Maitre, & Reed, 2005).

O stress agudo de RE pode ser causado por uma série de estímulos, tais como hipóxia e/ou isquémia, esgotamento de cálcio, privação de glucose, alterações no equilíbrio de oxidação-redução da célula e falhas na modificação pós-tradução das proteínas (Ni & Lee, 2007; Rutkowski & Kaufman, 2007; Szegezdi, Macdonald, Ni Chonghaile, Gupta, & Samali, 2009; Wu & Kaufman, 2006). Estas perturbações fisiológicas podem ser induzidas por compostos, tais como a tunicamicina (TUN) (inibe a glicosilação de proteínas), a BFA (inibe o tráfego para o Golgi) e a tapsigargina (TG) (inibe as ATPases de Ca^{2+} do RE) (Lai, Teodoro, & Volchuk, 2007; Samali et al., 2010).

O stress crónico do RE é mais suave, persistente e pode ser causado, quer por processos patológicos, quer pelo desenvolvimento e metabolismo dos mamíferos. As condições causadoras de stress crónico podem ser várias, nomeadamente a mutação genética das chaperonas do RE ou dos seus substratos (que origina problemas persistentes

de má aquisição da estrutura tridimensional das proteínas), a infecção viral (que pode provocar um aumento da síntese de proteínas, devido à produção de proteínas virais pela maquinaria do hospedeiro), a diferenciação e manutenção normais das células secretoras (por exemplo, linfócitos B, células pancreáticas β , osteoblastos e hepatócitos), cujas funções primárias incluem a produção e secreção de proteínas e, finalmente, perturbações que afectam o funcionamento do proteossoma no processo de degradação de proteínas (que podem criar acumulação de proteínas agregadas e corpos de inclusão associados a várias doenças neurodegenerativas da agregação de proteínas) (Ni & Lee, 2007; Rutkowski & Kaufman, 2007; Szegezdi et al., 2009; Wu & Kaufman, 2006; Xu et al., 2005).

1.3.1 Os três ramos da resposta à acumulação de proteínas não processadas no RE (UPR)

Para ultrapassar o stress de RE, a célula tem de coordenar mecanismos de sinalização para atenuar o influxo de proteínas recém-sintetizadas para o lúmen do RE e aumentar a capacidade de processamento pós-traducional do RE, bem como o tráfego para o Golgi e a capacidade da ERAD, de modo a limpar o RE das proteínas acumuladas e a restaurar a sua homeostase. A activação da UPR permite alcançar estes objectivos através da activação de vias de sinalização que suprimem a tradução e, em simultâneo, induzem a expressão de genes de proteínas residentes do RE que promovem o processamento pós-tradução e a degradação de proteínas via proteossoma (Lai et al., 2007; Rutkowski & Kaufman, 2007).

A UPR é desencadeada pela activação de três proteínas transmembranares, a cinase do factor de iniciação da transcrição 2α eucariótico (eIF2 α - *eukaryotic initiation factor 2 α*) do ER pancreático (PERK - *pancreatic endoplasmic reticulum eIF2 α kinase*), a enzima dependente do inositol 1α (IRE1 α - *inositol requiring enzyme 1 α*) e o factor activador da transcrição 6 (ATF6 - *activating transcription factor 6*), que activam as três vias de sinalização da UPR, respectivamente (Figura 3). Estas proteínas transmembranares apresentam um domínio terminal N citosólico e um domínio terminal C voltado para o lúmen do RE, constituindo assim uma ponte de ligação entre os dois compartimentos. A PERK e a IRE1 α têm em comum a actividade de cinase de serina/ treonina dos seus domínios citosólicos. O domínio citosólico do ATF6, pelo contrário, não tem actividade de cinase. Para além disso, o domínio citosólico da IRE1 α tem também actividade de endorribonuclease. Estes transdutores de stress do RE estão inactivos quando a chaperona GRP78/BiP está ligada aos seus domínios luminiais, impedindo assim a sua agregação. Quando ocorre acumulação de proteínas no RE, a GRP78/BiP é recrutada para impedir a agregação das

proteínas acumuladas, dissociando-se da PERK, da IRE1 α e do ATF6. A PERK e a IRE1 α libertadas homodimerizam e sofrem autofosforilação, o que induz a activação das suas actividades de cinase intrínsecas (Hussain & Ramaiah, 2007).

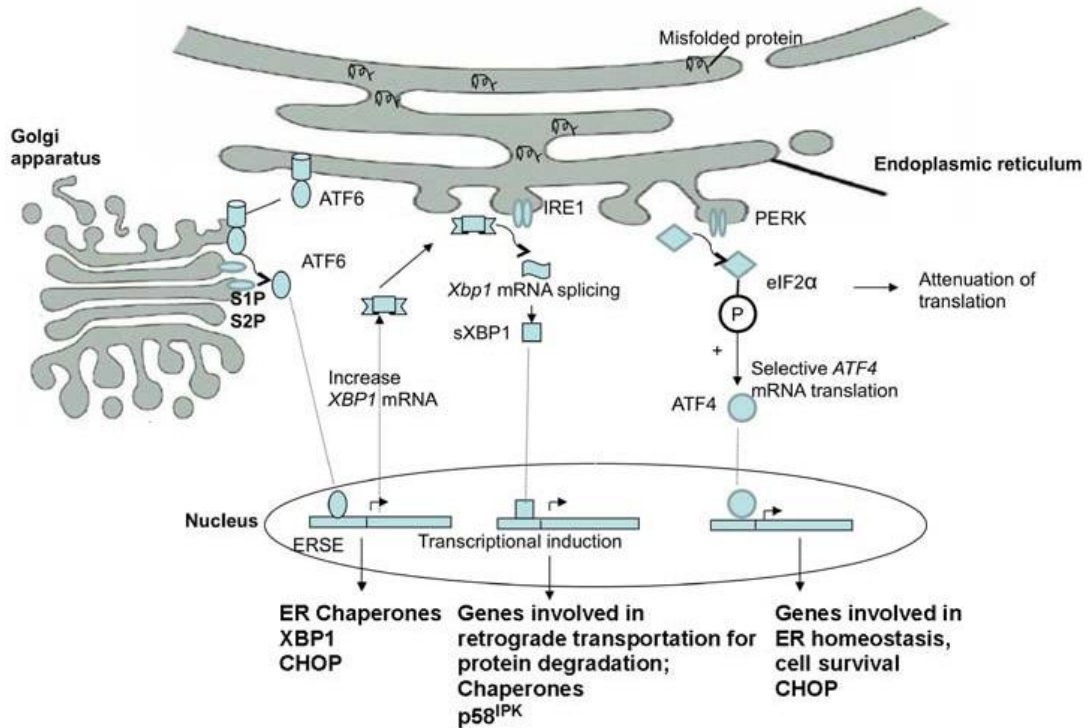


Figura - 3 Eventos associados ao stress de RE e à resposta à acumulação de proteínas (UPR). (X. Li, Zhang, & Li, 2011).

A PERK activada fosforila um resíduo de serina do eIF2 α , inativando-o (Hussain & Ramaiah, 2007). A fosforilação do eIF2 α inibe a ligação do tRNA_i-metionil iniciador da tradução ao ribossoma, resultando na supressão global da tradução, o que reduz o influxo de proteínas clientes do RE para o lúmen (Rutkowski & Kaufman, 2007). Sob estas condições há, contudo, alguns mRNAs seleccionados que são traduzidos, incluindo o mRNA que codifica o factor de activação da transcrição 4 (ATF4 - *activation transcription factor 4*, ATF4) e o gene 34 indutível por danos de DNA e paragem de crescimento (GADD34 - *growth arrest and DNA damage-inducible gene 34*), que regula a desfosforilação do eIF2 α , revertendo a inibição geral da transcrição (Denmeade & Isaacs, 2005). O ATF4 é membro da família de factores de transcrição do tipo fecho de leucinas básico (bZIP - *basic leucine zipper domain*), que, juntamente com o ATF6 e a proteína 1 de ligação à X-box (XBP1 - *X-box-binding protein 1*), regula os promotores de vários genes que codificam proteínas envolvidas na UPR, tais como proteínas envolvidas no transporte de aminoácidos, biossíntese de glutatona, regulação do potencial de oxidação-redução, a proteína homóloga da C/EBP/proteína 153 indutível por danos no DNA e paragem do crescimento (CHOP/GADD153 - *CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein/growth arrest*

DNA damage-inducible gene 153), chaperonas do RE (GRP78/BiP, CRT e CNX) e enzimas envolvidas na aquisição da estrutura tridimensional das proteínas (PDI, ERp57 e ERp72) e na degradação de proteínas defeituosas (Hussain & Ramaiah, 2007; J. Li et al., 2008; Wu & Kaufman, 2006).

A dimerização e a autofosforilação dos domínios de cinase da IRE1 α resultam, por um lado, na activação da actividade de endorribonuclease e, por outro lado, na activação da sua actividade de cinase. Como endorribonuclease, a IRE1 α catalisa a excisão do mRNA da XBP1, do qual é removido um intrão de 26 nucleótidos pela IRE1 α , que normalmente inibe a tradução. Esta excisão resulta na produção da proteína XBP1, um factor de transcrição que induz a expressão de uma série de genes que codificam proteínas necessárias nos processos de modificação pós-tradução do RE, tráfego para o Golgi e ERAD. A XBP1 é translocada para o núcleo e liga-se ao promotor do elemento de resposta ao stress de RE (ERSE) nos genes alvo (Lai et al., 2007). Para além disso, o domínio citosólico da IRE1 α activada liga-se ao factor associado ao receptor TNF 2 (TRAF2 - *TNF receptor-associated factor 2*). Esta interacção é regulada pela cinase inibidora do terminal N do c-Jun (JIK - *c-Jun N-terminal inhibitory kinase*) e induz a activação da apoptose após stress de RE, através da activação da cinase reguladora do sinal de apoptose 1 (ASK1 - *apoptosis signal-regulating kinase 1*) e da via de sinalização da cinase do terminal N do c-Jun (JNK - *c-Jun N-terminal kinase*). O complexo IRE1 α /TRAF2 activa outras cinases, para além da ASK1, envolvidas na imunidade e na inflamação, que activam o factor nuclear kB (NF-kB - *nuclear factor-kB*), um factor de transcrição que induz a expressão de genes anti-apoptóticos associados à defesa do hospedeiro, lançando um sinal de alarme. Para além disso, a IRE1 α também pode promover a apoptose, através da activação da JNK, que leva à fosforilação e activação da proteína pró-apoptótica Bim, enquanto inibe a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma protein-2*). Assim, a IRE1 α tem um papel em todas as três respostas do RE à acumulação de proteínas (adaptação, alarme e apoptose), através da sua acção sobre a XBP1 (adaptação), TRAF2 (alarme [NF-kB]), e efectores da apoptose caspase-12 e ASK1 (apoptose) (Karin, 2006; Rasheva & Domingos, 2009; Xu et al., 2005).

A libertação da GRP78/BiP em resposta ao stress do RE permite a translocação do ATF6 para o Golgi, onde é clivado pelas proteases S1P (*Site-1 Protease*) e S2P (*Site-2 Protease*), originando um fragmento activo, ATF6 α , que contém o domínio citosólico e que é translocado para o núcleo, onde vai coactivar (juntamente com o ATF4 e a XBP1) a transcrição de genes codificadores de chaperonas do RE, da CHOP, da p58^{IPK}, das PDIs e da maquinaria da ERAD (J. Li et al., 2008; Wu & Kaufman, 2006). Um dos alvos do ATF6 é o gene *Xbp1*. A activação do ATF6 precede a activação da IRE1 α durante o stress de RE, o

que permite a acumulação de mRNA *Xbp1* durante os estágios iniciais da activação da UPR, que está assim disponível para a excisão após activação da IRE1 α . A co-chaperona p58^{IPK} é positivamente regulada pelo ATF6 durante as fases tardias da UPR para inibir a actividade da PERK, ligando-se ao seu domínio de cinase. A recuperação da atenuação transcricional também ocorre através da desfosforilação do eIF2 α , que é mediada pelo complexo fosfatase de proteínas 1 (PP1 - *protein phosphatase 1*) e pelo GADD34 (induzido pelo ATF4), para regular negativamente a sinalização da PERK (Rasheva & Domingos, 2009).

Em conjunto, o ATF4, o ATF6 e a XBP1 regulam positivamente as enzimas que catalisam a aquisição da estrutura tridimensional e a degradação de proteínas, que, por sua vez, impedem a agregação das proteínas desnaturadas, ajudam na aquisição da sua estrutura tridimensional e/ ou na degradação das proteínas com conformação tridimensional incorrecta (J. Li et al., 2008). Relativamente à desactivação das vias ATF6, IRE1 α e PERK, à medida que a UPR permanece activa, o nível de GRP78/BiP aumenta de modo a que ela possa ligar e impedir mais activação de ATF6, IRE1 e PERK (Wu & Kaufman, 2006).

1.3.2 Apoptose mediada pelo stress de RE

Todas as vias da UPR contribuem para induzir a via pró-apoptótica, quando a UPR falha o seu objectivo inicial de proteger a célula da toxicidade causada pela acumulação de proteínas no RE. A apoptose iniciada pelo stress de RE depende da libertação do citocromo c para o citosol pela mitocôndria, associada ao colapso no potencial de membrana mitocondrial resultante do influxo de Ca²⁺ libertado para o citosol pelo RE. A família de proteínas homólogas da Bcl-2 regula a libertação de cálcio do RE e a comunicação do sinal de stress de RE à mitocôndria. Todas as proteínas da família Bcl-2 contêm pelo menos um de quatro motivos homólogos da Bcl-2 ou (BH1-4 - *Bcl-2 homologous 1-4*). Os membros anti-apoptóticos da família possuem os quatro domínios BH e incluem a Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1, enquanto as proteínas pró-apoptóticas são divididas em dois subgrupos distintos – as proteínas multidomínios contendo domínios BH1-3 (Bax, Bak, e Bok) e as proteínas BH3 (Bad, Bid, Bik/Nbk, Bim, Bmf, Nix/BNIP3, Hrk, Noxa e Puma), que contêm apenas um domínio, o BH3 (Hussain & Ramaiah, 2007; Szegezdi et al., 2009). A CHOP, a JNK e as caspases participam na sinalização da apoptose induzida pelo stress do RE. A via da PERK é essencial na indução da transcrição do *Chop*. A CHOP regula negativamente a expressão da proteína Bcl-2 e regula positivamente a expressão de GADD34 e da oxidase 1 α do RE (ERO1 α - *endoplasmic reticulum oxidase1 α*). A ERO1 α é uma oxidase de tióis do RE que fornece equivalentes oxidativos às PDIs, mas também produz ROS. A sua sobreexpressão

Ca²⁺ libertado pelo RE (Brenner & Grimm, 2006). Uma vez libertado, o citocromo c e a procaspase-9 são recrutados para o factor activador de proteases da apoptose 1 (APAF-1 - *apoptosis protease-activating factor 1*) para formar o apoptossoma, que catalisa a activação da procaspase-9, originando a caspase-9. A caspase-9 activa caspases a jusante, que por sua vez actuam em vários substratos celulares para facilitar o desmantelamento da célula (Szegezdi et al., 2009). As caspases são uma família de proteases de cisteínas citosólicas aspartato-específicas que existem como pró-enzimas inactivas e que são activadas por clivagem após indução da apoptose (Bian, Elner, & Elner, 2009). O recrutamento do TRAF2 para a IRE1 α também permite a dissociação da TRAF2 da procaspase-12 residente no lado citoplasmático da membrana do RE, permitindo a sua activação. A libertação de Ca²⁺ do RE para o citosol activa as *calpains* (uma família de proteases de cisteínas citosólicas dependentes do Ca²⁺ com um papel na activação da caspase-12), que cliva e activa a procaspase-12. A caspase-12 activa cliva e activa a procaspase-9, que por sua vez activa outras caspases a jusante, incluindo a caspase-3 (Lai et al., 2007).

1.3.3 Indução de stress de RE através da inibição da ATPase de Ca²⁺ do retículo sarco/endoplásmico (SERCA) pela tapsigargina (TG)

A tapsigargina (TG) foi o composto usado neste trabalho para induzir stress de RE. A TG é um dos compostos activos derivados do extracto da raiz da planta *Thapsia garganica* L., usado na medicina tradicional contra a inflamação (Sabala, Czarny, Woronczak, & Baranska, 1993) e cancro (Ghantous, Gali-Muhtasib, Vuorela, Saliba, & Darwiche, 2010). A TG pertence a um grupo de lactonas sesquiterpénicas, designadas genericamente por tapsigarginas, que ocorre nas plantas do género *Thapsia* e na espécie *Laser trilobum*, ambos pertencentes à família *Apiaceae*. As lactonas sesquiterpénicas ocorrem também noutras famílias de plantas superiores, inclusive na família *Asteraceae*. Estruturalmente, as lactonas sesquiterpénicas são terpenos cíclicos constituídos por 15 átomos de carbono (C) (sesquiterpenos) fundidos com um anel de lactona (éster cíclico com 5 C e uma ligação dupla conjugada a um grupo carbonilo) (Figura 5). As tapsigarginas pertencem à classe dos guaianolidos, que são lactonas sesquiterpénicas cuja estrutura química consiste em dois anéis (um de 5 C e um de 7 C, respectivamente), fundido com um anel de lactona que se fecha sobre o C6, por isso, são 6,12-guaianolidos. Para além disso, nas tapsigarginas, os guaianolidos são oxigenados, podendo ser hexa-oxigenados ou penta-oxigenados. A TG faz parte do grupo das tapsigarginas hexa-oxigenadas (Figura 5A), que contêm um núcleo guaianolido com 6 grupos hidroxilo. As tapsigarginas penta-oxigenadas (Figura 5B), frequentemente designadas por trilobolides, possuem um núcleo guaianolido com 5 grupos hidroxilo. Todas as tapsigarginas são inibidores muito potentes da SERCA

(que será abordada a seguir), mas a maioria dos estudos tem focado a TG. As diferenças na estereoquímica do C1 entre os guaianolidos das tapsigarginas e os das outras plantas superiores, tais como as da família *Asteraceae* (relacionadas com a disposição α ou β , respectivamente, sobre o C1) são importantes para a actividade inibitória da SERCA. Para além disso, ao contrário do H7 dos outros 6,12-guaianolidos das *Apiaceae*, o H7 das tapsigarginas hexa-oxigenadas tem uma disposição β , o que altera a conformação da ligação entre o cicloheptano e a lactona para uma conformação *trans*, em contraste com a conformação *cis* típica do anel de lactona dos outros 6,12-guaianolidos das *Apiaceae*. Desta forma, as tapsigarginas hexa-oxigenadas distinguem-se das pentaoxigenadas pelo núcleo guaianolido densamente oxigenado, pela estequeometria do C7 e pelos ácidos gordos invulgares com os quais os grupos álcool do núcleo são esterificados (Christensen et al., 2009).

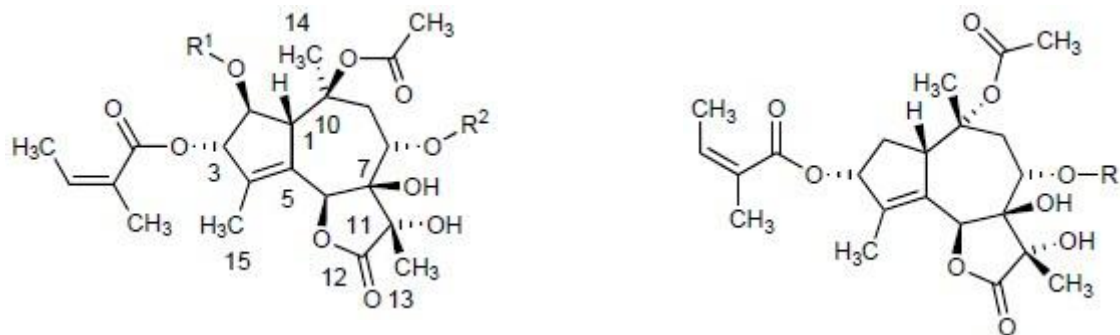


Figura 5 - Estrutura das tapsigarginas. (A) Tapsigarginas hexa-oxigenadas. O núcleo de guaianolido das tapsigarginas hexa-oxigenadas possui 6 grupos hidroxilo, 4 dos quais esterificam com ácidos gordos. (B) Tapsigarginas pentaoxigenadas. As tapsigarginas pentaoxigenadas (trilobolides) têm 5 grupos hidroxilo, dos quais apenas 3 são esterificados. Os ácidos gordos representados por R^1 e R^2 são os únicos que diferem entre as tapsigarginas, consoante o seu grupo alcano. (Christensen et al., 2009)

A SERCA é uma ATPase de Ca^{2+} localizada na membrana do retículo sarcoplasmático (RS) e do RE (Michelangeli & East, 2011). O transporte de cálcio pela SERCA é o único mecanismo de captação de cálcio para o lúmen do RE/RS, pelo que a regulação da função da SERCA é crítica no ajuste da homeostasia do cálcio no RE (Arbaban et al., 2011). Por outro lado, as proteínas SERCA também desempenham um papel crítico na remoção do Ca^{2+} intracelular (Ca_i). As oscilações de Ca_i são desencadeadas pela abertura do canal receptor do inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃R - *inositol 1,4,5-triphosphate receptor*), enquanto a captação do cálcio para o lúmen do RE/RS se deve à actividade das SERCAs. As variações da concentração de Ca_i controlam muitas respostas celulares essenciais, pelo que a regulação dos sinais de Ca^{2+} é fulcral para a coordenação destas funções (X. Li et al., 2011).

A SERCA pertence à família das ATPases do tipo P. Esta designação vem do mecanismo de transporte de iões ou moléculas característico destas enzimas, que se distingue pela conservação temporária da energia do ATP na forma de um intermediário fosforilado da enzima (por isso, são do tipo P), formado entre o fosfato- γ do ATP hidrolisado e um resíduo de aspartato conservado no centro activo da enzima, durante o transporte de Ca^{2+} (Brini & Carafoli, 2009; Sweadner & Donnet, 2001).

Nos mamíferos, a SERCA é codificada por uma família de 3 genes – *SERCA1*, *SERCA2* e *SERCA3*. O transcrito primário de cada gene sofre excisão alternativa dependente do tecido, o que aumenta a diversidade de isoformas da enzima (*SERCA1a,b*, *SERCA2a-c* e *SERCA3a-f*). O padrão de expressão das isoformas é variável ao longo do desenvolvimento e diferenciação de tecidos, pelo que cada isoforma está adaptada a funções específicas. As variantes *SERCA1a* e a *SERCA1b* são expressas nos músculos esqueléticos de contracção rápida dos adultos e do feto, respectivamente. A variante *SERCA2a* é selectivamente expressa nos músculos esqueléticos de contracção lenta e no coração, enquanto a *SERCA2b* é expressa quase ubiquamente. A *SERCA2c* é funcionalmente importante no coração do feto, sendo a sua expressão predominante no ventrículo esquerdo. A *SERCA3* é por sua vez expressa nos músculos liso traqueal e cardíaco e num número limitado de células não-musculares (Brini & Carafoli, 2009).

A *SERCA2* também tem um papel fulcral na manutenção das concentrações de Ca^{2+} no RE/RS, pelo que alterações na sua actividade podem afectar uma série de funções do RE/RS, incluindo a síntese e maturação de proteínas. Tal como referido na secção 1.2.2, a actividade da *SERCA2* é controlada por uma série de proteínas do lúmen do RE/RS que ligam o Ca^{2+} , tais como as chaperonas CRT e CNX, que regulam a actividade da *SERCA2* a partir do lúmen, modelando as oscilações de Ca^{2+} provocadas pelo inositol trifosfato (IP_3). A CRT interage funcionalmente com a *SERCA2b*, mas não com a *SERCA2a*. Estas diferenças funcionais devem-se ao facto de, ao contrário da *SERCA2a*, a *SERCA2b* conter um resíduo N-glicosilado na porção terminal N, que interage com o domínio de lectina da CRT e da CNX. A oxirredutase ERp57 também interage com a *SERCA2b* de forma dependente do Ca^{2+} , através da CRT, resultando na inibição da *SERCA2b*, através da modulação do estado de oxidação-redução global do RE, uma vez que a ERp57 promove a formação de pontes de dissulfureto. O esgotamento de Ca^{2+} no RE desloca a ERp57 da *SERCA2b*, favorecendo a redução das pontes dissulfureto e a estimulação da actividade de ATPase (Brini & Carafoli, 2009; Coe & Michalak, 2010).

A citotoxicidade da TG é dependente da dose, ao contrário de alguns fármacos antiproliferativos convencionais. A TG entra na célula de forma passiva, devido à sua elevada lipofilicidade, dando início à perturbação do Ca_i , e difunde-se nas membranas intracelulares até interagir com a SERCA. Quando a bomba SERCA é inibida, há uma dissipação das reservas de Ca^{2+} do RE/RS, devido à sua fuga passiva para fora do RE/RS, através dos canais IP_3R . O esgotamento da reserva de Ca^{2+} do RE/RS gera um sinal que causa alterações na permeabilidade da membrana plasmática ao cálcio, permitindo o influxo de cálcio extracelular (Ca_e) livre e o aumento de Ca_i inicial, minutos após a exposição a doses eficientes de TG (50 nM). Após 12 horas, ocorre um retorno do Ca_i aos níveis basais, mediado pela activação da bomba de cálcio dependente da calmodulina da membrana plasmática. Durante esta fase, há aumento da síntese de IP_3R , que se move para a membrana plasmática e forma um canal de cálcio que permite o início de um segundo influxo de Ca_e na célula, após mais de 24 horas da exposição à TG. O início do segundo aumento de Ca_i induz a translocação da proteína anexina-V do citoplasma para o lado intracelular da membrana plasmática, onde se liga à fosfatidilserina (PS – *phosphatidylserine*). Este complexo de anexina-V sofre uma rotação para o lado extracelular da membrana plasmática e forma homohexameros de anexina-V, que formam canais de cálcio que permitem o influxo de Ca_e , resultando no eventual aumento do Ca_i . Este aumento no Ca_i precede as alterações morfológicas associadas à apoptose (Denmeade & Isaacs, 2005).

A SERCA representa um potencial alvo terapêutico para a terapia do cancro, uma vez que a sua função normal é necessária para todas as células e a sua inibição sustentada por agentes farmacológicos como a TG resultam na activação de uma resposta do RE, bem como na activação simultânea de vias apoptóticas no RE e na mitocôndria. Contudo, devido ao papel crítico da SERCA no metabolismo celular normal, a TG produz toxicidade significativa nas células normais, pelo que tem de ser selectivamente direccionada para os locais do tumor, de modo a atenuar a citotoxicidade nas células normais. Recentemente, têm sido investigadas pró-drogas baseadas na TG como potencial terapia direccionada para o cancro da próstata. A pró-droga testada é um análogo da TG conjugado com um péptido especificamente clivado pela protease específica da próstata (PSA - *prostate-specific antigen*). A pró-droga produzida é inactiva e é activada apenas pela PSA, nas células de cancro da próstata que expressam PSA, sendo selectivamente tóxica para estas células tumorais (Denmeade & Isaacs, 2005; Jakobsen et al., 2001; Yamaguchi, Bhalla, & Wang, 2003).

1.4 Introdução ao tema da tese

A dacarbazina, temozolomide, nitrosureias (carmustina, lomustina, fotemustina), análogos de platina (cisplatina, carboplatina), alcaloídes da vinca (vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel) são os agentes quimioterapêuticos usados na quimioterapia de melanoma. Por vezes, a dacarbazina e o temozolomide são usados em combinação com outros agentes anticancerígenos para tentar melhorar a taxa de resposta e a sobrevivência dos pacientes (Atkins, 1997).

Quando detectado precocemente, o melanoma é facilmente tratado através de excisão cirúrgica, mas é muito difícil de tratar quando é descoberto nos seus estágios mais avançados, devido à resistência pronunciada ao tratamento. Infelizmente, as opções de tratamento tradicionais não têm sido benéficas para a sobrevivência. As novas opções terapêuticas, tais como o bloqueio do antígeno-4 associado aos linfócitos T citotóxicos CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) através do anticorpo monoclonal Ipilimumab que produz respostas antitumorais favoráveis do sistema imunitário e foi recentemente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso em pacientes com melanoma avançado, têm demonstrado benefícios de sobrevivência impressionantes. Em Agosto de 2011, o vemurafenib foi aprovado pela FDA para o tratamento de primeira linha de melanomas metastáticos e não excisáveis para pacientes cujos tumores têm mutações V600E no gene BRAF (Scheier, Amaria, Lewis, & Gonzalez, 2011).

As terapias convencionais visam a eliminação das células tumorais através da morte celular por apoptose. As deficiências na sinalização da apoptose são um pré-requisito para o crescimento tumoral e contribuem para a resistência às terapias, pelo que a indução da apoptose e a supressão das vias de sobrevivência são alvos terapêuticos importantes no desenvolvimento de terapias mais eficazes contra o melanoma (Eberle, Kurbanov, Hossini, Trefzer, & Fecker, 2007; Gartel, 2012; Giménez-Bonafé, Tortosa, & Pérez-Tomás, 2009).

A UPR induzida pelo stress de RE é caracterizada pela regulação positiva de chaperonas do RE e membros da família PDI e por uma cascata de regulação transcricional, permitindo à célula adaptar-se e focar os seus recursos na reparação do stress de RE. O bloqueio ou inibição da actividade destas proteínas do RE pode ser uma forma de atenuar as respostas homeostáticas ao stress de RE, originando um desequilíbrio que favorece o aumento do stress de RE e a activação da apoptose. Inclusive, a resposta a agentes quimioterapêuticos que induzem stress de RE aumenta quando a actividade da PDI é inibida pela bacitracina, um inibidor da actividade da PDI, sugerindo que o desenvolvimento de

inibidores da PDI e de outras chaperonas do RE é uma estratégia poderosa para aumentar a eficácia da quimioterapia (Lovat et al., 2008).

Deste modo, é importante identificar as proteínas do RE envolvidas nas respostas adaptativas ao stress de RE ou UPR em melanoma, que são potenciais alvos terapêuticos para atenuar as respostas homeostáticas do RE e aumentar a apoptose induzida pelo stress de RE induzido por agentes quimioterapêuticos.

As PDIs são uma família de oxirredutases abundantes e localizadas no RE, onde catalisam o processo de aquisição das estruturas tridimensional e fazem parte do controlo de qualidade das proteínas processadas no RE, juntamente com outras chaperonas do RE, tais como a GRP78, a CNX e a CRT (Ellgaard & Ruddock, 2005; Feige & Hendershot, 2011; Kozlov et al., 2010; Wilkinson & Gilbert, 2004).

A *Besnoitia besnoiti*, um parasita apicomplexa do gado responsável pela besnoitiose bovina, expressa uma PDI com dois domínios de tiorredoxina e um motivo catalítico CXXC, característicos dos membros da superfamília das tiorredoxinas (Marcelino, 2011). Num estudo preliminar, a marcação de neutrófilos com anticorpos anti-PDI de *B. besnoitia* (produzidos pela equipa do Prof. Carlos Novo, INETI/ IHMT) indicou que existe reactividade cruzada destes anticorpos com a PDI humana expressa na superfície dos neutrófilos humanos.

Estudos recentes mostram que pelo menos alguns membros da família PDI e algumas chaperonas do RE têm também outras localizações celulares, para além do RE (Turano, Coppari, Altieri, & Ferraro, 2002). Para além disso, o stress de RE induzido por agentes quimioterapêuticos usados nos tratamentos contra o cancro podem causar a sobreexpressão e/ a translocação dos membros da família PDI com implicações fisiológicas importantes. Por exemplo, a expressão na superfície celular e a secreção da chaperona CRT/CNX (Nomura, Orii, & Senda, 2011) e da chaperona GRP78 são induzidas pelo stress de RE induzido pela TG. A CRT expressa na superfície celular das células tumorais mortas ou em apoptose estimula as respostas imunitárias antitumorais protectoras e terapêuticas em ratinhos (Peters & Raghavan, 2011). Por outro lado, as proteínas da família PDI e as chaperonas do RE protegem contra o stress de RE induzido pelos agentes quimioterapêuticos e contra a apoptose, sendo responsáveis pela resistência das células aos tratamentos.

A análise da localização celular das PDIs e outras chaperonas do RE e do efeito do stress de RE induzido por agentes anticancerígenos na expressão e localização celular

destas proteínas do RE é crucial para elucidar a influência dos agentes anticancerígenos nas respostas ao stress de RE em melanoma.

O objectivo deste trabalho foi investigar o efeito do stress de RE induzido pela TG, um inibidor das ATPases de Ca^{2+} , que esgota o cálcio no lúmen do RE, afectando o funcionamento das proteínas do RE dependentes de cálcio, na viabilidade celular e na expressão e localização celular das PDIs e outras chaperonas residentes do RE em linhas celulares de melanoma. Para cumprir esse objectivo, as três linhas celulares em estudo foram inicialmente caracterizadas ao nível da susceptibilidade ao stress de RE induzido pela TG, testando o efeito de várias concentrações de TG na viabilidade celular das três linhas celulares por citometria de fluxo, utilizando as marcações com anexina V e 7-AAD para distinguir a população viável/ pré-apoptótica das populações apoptótica recente, apoptótica tardia e necrótica e determinar a percentagem de células viáveis resultantes dos tratamentos. Posteriormente, as três linhas celulares foram caracterizadas quanto à expressão fenotípica e localização celular das proteínas do RE, através de citometria de fluxo, marcando superficial e intracelularmente as células das três linhas celulares com anticorpos para os diferentes membros PDIs e chaperonas residentes do RE, a fim de identificar as PDIs e chaperonas do RE expressas em melanoma. Outro objectivo deste trabalho foi investigar o efeito da TG na expressão e localização celular das PDIs e das outras chaperonas do RE de melanoma, não só ao nível transcricional, mas também fenotípico, nas linhas celulares de melanoma SK-MEL-30 e MNT-1. Desta forma, numa primeira fase, efectuou-se a análise da expressão dos genes da família PDI e de outras chaperonas do RE por RT-qPCR, após tratamento com três concentrações de TG, durante 18 e 48h. A nível fenotípico, efectuou-se a análise da expressão fenotípica de algumas PDIs e chaperonas por citometria de fluxo, após as células terem sido tratadas com uma concentração pré-apoptótica de TG, durante 48h. Para o efeito, efectuaram-se marcações intracelulares e superficiais com os anticorpos correspondentes às PDIs e outras chaperonas do RE com níveis de expressão genética mais elevados e mais relevantes nos processos de resposta ao stress de RE – GRP78, PDI, CRT e TMX4 nas células SK-MEL-30 e MNT-1, após tratamento de 48h com TG.

2. Materiais e Métodos

2.1 Cultura e manutenção das linhas celulares de melanoma

Neste estudo, foram usadas três linhas celulares humanas de melanoma maligno, designadas por M8, SK-MEL-30 e MNT-1.

As células M8 e SK-MEL-30 foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 1% (p/v) de aminoácidos não essenciais, 1% (p/v) de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich) e 100 µg/ml de penicilina/ estreptomicina (Gibco-Invitrogen). A cultura de células M8 foi ainda suplementada com 1µg/ml de Fungizone™ (anfotericina B), um antimicótico extraído de *Streptomyces* sp (Gibco-Invitrogen).

As células MNT-1 foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 100 µg/ml de penicilina/ estreptomicina (Gibco-Invitrogen).

As linhas celulares foram mantidas em frascos de cultura (Nunc Brand Products), numa estufa a 37°C e com uma atmosfera humedecida com 5% (v/v) de CO₂.

A manutenção das culturas foi feita a cada dois dias, sempre que as culturas apresentavam um máximo de confluência celular de cerca de 80%. As linhas celulares cultivadas são caracteristicamente aderentes, por isso, sempre que se pretendeu remover as células do frasco de cultura, utilizou-se Tripsina-EDTA, para desagregar as células do plástico. A tripsinização consistiu na remoção do meio de cultura, seguida de lavagem das células com solução-tampão de fosfatos (PBS – *Phosphate Buffered Saline*) aquecido, sem fluxo directo, e de incubação das células a 37°C, por um período máximo de 5 min em Tripsina-EDTA, para permitir a desaderência das células. As células foram recolhidas para um tubo e centrifugadas em PBS a 1000 rpm, durante 5 minutos. Por fim, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento de células foi ressuspendido em meio de cultura fresco e colocado novamente em cultura com uma concentração celular inicial de 10⁶ células/mL.

As linhas celulares foram também preservadas a -80°C e em azoto líquido, em criotubos contendo meio de congelação, constituído por meio DMEM ou RPMI-1640 (consoante a linha celular) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino e 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich).

A avaliação da eventual contaminação das culturas celulares com *Mycoplasma* foi efectuada periodicamente por observação da fluorescência dos núcleos por microscopia de fluorescência. Para a coloração dos núcleos, foi utilizado o corante fluorescente 4'6 diamino-2fenilindole (DAPI), específico para os ácidos nucleicos. O procedimento consiste em cultivar as células sob uma lamela, fixá-las com paraformaldeído 2% (v/v), durante 15 minutos, e incubá-las com uma solução a 0,5 g/ml de DAPI, durante 10 minutos, no escuro. Após a lavagem do corante, prepara-se a lamela para observação num microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i), com filtro UV (330 – 380 nm), numa ampliação de 200X. As células em que só o núcleo apareceu corado com coloração azulada (característica do DAPI), foram consideradas livres de contaminação, enquanto as células que, para além do núcleo corado, também apresentavam coloração no citoplasma, correspondentes a material genético bacteriano, foram consideradas positivas para a contaminação com *Mycoplasma* e rejeitadas. Quando necessária, a descontaminação de *Mycoplasma* foi feita através do tratamento das linhas celulares com meio de cultura contendo 25 µg/ml de Plasmocin™ Treatment (Sigma-Aldrich) (um reagente anti-*Mycoplasma*) durante 2 semanas, substituído a cada 3-4 dias.

2.2 Anticorpos

Os anticorpos usados na análise da expressão fenotípica das PDIs e de outras chaperonas residentes do RE nas linhas celulares de melanoma são os que constam na Tabela 1.

2.3 Tapsigargina (TG)

A tapsigargina (TG) (Sigma-Aldrich) foi dissolvida em DMSO, obtendo-se uma solução *stock* com uma concentração de 37,50 mM. A solução *stock* foi diluída para concentrações finais de teste que variam entre 0,02 µM e 75,00 µM. A concentração final de DMSO foi de 0,2% (v/v), para a concentração de 75,00 µM, e de 0,1% (v/v) para as restantes concentrações. Para cada concentração de TG testada, fez-se sempre um controlo com células cultivadas apenas em meio de cultura contendo DMSO nas mesmas concentrações que as amostras de teste (0,2% de DMSO para o controlo das células tratadas com 75,00 µM de TG e 0,1% para o controlo das células tratadas com as restantes concentrações). O DMSO é tóxico para as células, mas, nas concentrações usadas neste trabalho, os efeitos na viabilidade celular são mínimos. De acordo com os resultados da análise da viabilidade celular por citometria de fluxo, a morte celular nas amostras controlo

tratadas apenas com 0,2% de DMSO é semelhante à verificada nas amostras tratadas apenas com 0,1% de DMSO.

Tabela 1 - Anticorpos anti-PDI humana e anti-chaperonas residentes do RE usados na análise da expressão fenotípica em células de melanoma.

	Anticorpos (Referência)	Fornecedor	Antigénio
Membros da família PDI	Anti-TMX1 (HPA003085)	Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína TMX1: aa 211 – 280
	Anti-TMX3 (HPA014157)	Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína TMX3: aa 16 – 143
	Anti-TMX4 (Ab1) (HPA015752)	Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína TMX4: aa 224 – 344
	Anti-TMX4 (Ab2) (HPA000399)	Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína TMX4: aa 9 – 119
	Anti-PDIA5 (WH0010954M1)	Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína PDIA5: aa 31 – 131
	Anti-PDIA6 (SAB1402501)	Sigma-Aldrich	Proteína PDIA6 completa: aa 1 – 441
	Anti-PDI (610946)	BD Biosciences	Fragmento da proteína PDI: aa 109 – 214
	Anti-ERp57 (E5031)	Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína ERp57: aa 460 – 478
	Anti-ERp72 (610970)	BD Biosciences	Fragmento da proteína ERp72: aa 427 – 642
	Outras chaperonas	Anti-CNX (C7617)	Sigma-Aldrich
Anti-CRT (C7492)		Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína CRT: aa 383 – 399
Anti-GRP78/ BiP (G8918)		Sigma-Aldrich	Fragmento da proteína GRP78/ BiP: aa 636 – 654

2.4 Ensaios de expressão genética

Para a quantificação da expressão genética por reacção em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR – *Reverse Transcription – quantitative Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, utilizaram-se os ensaios de expressão genética optimizados *Taqman® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) indicados na Tabela 2, específicos para cada gene alvo da família PDI ou das chaperonas residentes do RE em estudo e para a β -actina (gene de expressão constitutiva usado como controlo endógeno para normalizar a expressão de mRNAs entre as amostras). Cada ensaio consiste de uma mistura pré-formulada que contém dois oligonucleótidos iniciadores da amplificação (*primers*) a 5' (*forward*) e a 3' (*reverse*) não fluorescentes e uma sonda TaqMan®MGB específica para o transcrito alvo, marcada com o fluorocromo 6-FAM™ e um *quencher* não fluorescente (NFQ – *Non-Fluorescent Quencher*).

Tabela 2 - Identificação dos ensaios de expressão genética *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay* usados na quantificação de mRNAs da família PDI e de chaperonas residentes do RE em linhas celulares de melanoma.

Gene	Identificação do ensaio ¹
<i>ERp57</i>	Hs00607126_m1*
<i>ERp72</i>	Hs01115905_m1*
<i>ERdj5</i>	Hs00943467_m1*
<i>GRP78</i>	Hs99999174_m1*
<i>CNX</i>	Hs00233492_m1*
<i>CLR</i>	Hs00189032_m1*
<i>PDI</i>	Hs00168586_m1*
<i>PDIA5</i>	Hs00895698_m1*
<i>PDIA6</i>	Hs00194922_m1*
<i>TMX1</i>	Hs00997973_g1*
<i>TMX3</i>	Hs00287225_m1*
<i>TMX4</i>	Hs01062739_m1*
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1

¹ Cada ensaio de expressão genética possui uma identificação. O prefixo "Hs", abreviatura de *Homo sapiens*, designa a espécie para a qual o ensaio foi formulado. O sufixo "m1" indica um ensaio cuja sonda e oligonucleótidos iniciadores da amplificação (*primers*) foram desenhados sobre uma junção exão-exão, não detectando DNA genómico, enquanto o sufixo "g1" indica um ensaio cuja sonda e oligonucleótidos iniciadores da amplificação foram também desenhados sobre um único exão, podendo detectar DNA genómico. O símbolo "*" significa que o ensaio é recomendado pelo fabricante para este gene, porque é o ensaio capaz de detectar o maior número de transcritos expressos pelo gene em estudo.

2.5 Técnicas

2.5.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que mede a dispersão de luz e a fluorescência de células ou partículas biológicas microscópicas em suspensão num líquido isotónico com fluxo laminar, à medida que estas atravessam, uma a uma, um feixe de laser. Ao intersectarem o feixe de laser, as partículas provocam a dispersão dos fotões de luz em múltiplos ângulos, dependendo das propriedades físicas das partículas, nomeadamente o tamanho e a complexidade interna (granularidade relativa). A membrana celular, o núcleo e o material granular no interior da célula são factores que afectam a dispersão de luz. A forma da célula e a topografia da superfície celular também contribuem para a dispersão total da luz. Por outro lado, a luz laser que atinge as partículas é absorvida num determinado comprimento de onda e pode ser re-emitada na forma de fluorescência, devido à presença de determinados constituintes celulares fluorescentes (autofluorescência ou fluorescência intrínseca) ou de anticorpos ou outras moléculas (que reconhecem componentes celulares

específicos da superfície da célula ou intracelulares) e que foram previamente marcadas com um fluorocromo (fluorescência extrínseca). Deste modo, é possível analisar múltiplos parâmetros associados a propriedades físicas e químicas de uma partícula consoante as flutuações no brilho que emerge dela. Os diversos parâmetros são medidos em simultâneo, graças a um sistema óptico-electrónico combinado que regista a forma como cada partícula dispersa a luz laser incidente e emite fluorescência quando atravessa o feixe de laser, e converte os sinais luminosos em sinais electrónicos análogos que podem ser processados e analisados por computador. As propriedades medidas em cada partícula individualmente permitem fazer a contagem, análise (sobretudo a separação dos diferentes tipos de células/partículas presentes numa amostra celular heterogénea em subpopulações diferentes) e, nalguns equipamentos, a separação física das células/partículas de uma população heterogénea para posterior análise microscópica, bioquímica ou funcional (BD Biosciences, 2000; Mach, Thimmesch, Orr, Slusser, & Pierce, 2010; Nolan & Yang, 2007; Robinson, 2008).

Os parâmetros medidos são a dispersão frontal (FSC – *Forward Scatter*), a dispersão lateral (SSC – *Side Scatter*) e a intensidade de fluorescência média (MFI – *Mean Fluorescence Intensity*). O FSC mede a luz difractada pela partícula na direcção frontal, detectada por um fotodíodo situado paralelamente ao feixe de laser incidente e é proporcional ao tamanho relativo da partícula. O SSC, por sua vez, mede a luz refractada e reflectida nas interfaces do interior da célula, onde há uma alteração do índice de refração, e é captada a 90 graus do feixe de laser incidente por uma lente designada por canal de dispersão lateral, sendo depois redireccionada para o detector apropriado por um distribuidor do feixe. O SSC é proporcional à granularidade relativa da célula. A MFI consiste numa estimativa da quantidade de locais de ligação dos anticorpos ou outras moléculas fluorescentes por célula ou partícula e, conseqüentemente, da quantidade do componente celular em análise. Numa população heterogénea de células, podem ser usados diferentes fluorocromos para distinguir as subpopulações. O padrão de marcação de cada subpopulação, combinado com os dados da FSC e da SSC, pode ser usado para identificar que células estão presentes numa amostra e para contar as suas percentagens relativas (BD Biosciences, 2000; Mach et al., 2010).

O citómetro de fluxo usado nesta tese, um FACS Calibur Flow Cytometer (Becton Dickinson), possui quatro filtros e é capaz de detectar até quatro fluorescências diferentes: FL-1 (fluorescência verde), FL-2 (amarela), FL-3 (laranja) e FL-4 (vermelha) (BD Biosciences, 2000).

2.5.2 Reacção em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR) em tempo real

A RT-qPCR é uma técnica usada para quantificar a expressão genética, que combina a transcrição reversa (RT – *Reverse Transcription*) com a reacção em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR – *quantitative Polymerase Chain Reaction*) em tempo real, permitindo a monitorização do produto gerado em cada ciclo da reacção de amplificação do DNA complementar (cDNA – *complementary DNA*). A RT-qPCR em tempo real foca-se nos dados recolhidos na fase exponencial da reacção, que consiste num estágio inicial da reacção em que esta ocorre com uma eficiência de 100%, resultando na duplicação exacta da quantidade de produto em cada ciclo, de modo que a quantidade de produto de PCR formado na fase exponencial é directamente proporcional à quantidade inicial de cDNA de cada amostra. Normalmente, a quantificação da expressão genética por RT-qPCR em tempo real investiga as variações (aumento ou diminuição) na expressão de um gene ou conjunto de genes em particular, através da medição da abundância dos transcritos gene-específicos (Applied Biosystems, 2010; Ginzinger, 2002; Huggett, Dheda, Bustin, & Zumla, 2005; Livak & Schmittgen, 2001; Stordeur et al., 2002; VanGuilder, Vrana, & Freeman, 2008).

Na RT, a enzima transcriptase reversa converte o RNA total extraído das células em cDNA, que é utilizado na qPCR em tempo real. A RT e a qPCR podem ser realizadas numa única etapa (*one-step RT-qPCR*) ou em duas etapas (*two-step RT-qPCR*). Neste trabalho, a RT e os passos de amplificação foram realizados em duas reacções separadas. Esta abordagem é útil quando se pretende detectar múltiplos transcritos de uma única amostra ou quando se pretende guardar uma porção do cDNA para posterior utilização. Neste caso, todo o RNA é transcrito em cDNA, porque os oligonucleótidos iniciadores da RT não são específicos, pelo contrário, podem ser oligonucleótidos que se ligam à cauda poli-A (*poly-A tail*) do mRNA, ou aleatoriamente ao longo da cadeia de RNA a ser transcrita. A detecção e medição da amplificação em cada ciclo é possível graças à utilização de fluorocromos que, quando excitados, emitem um sinal de fluorescência proporcional à quantidade de produto de PCR formado (BD Biosciences, 2000; S. A. Bustin, Benes, Nolan, & Pfaffl, 2005).

A química de detecção usada neste trabalho foi a tecnologia TaqMan[®], baseada em sondas hidrolisáveis, específicas para uma sequência de interesse, marcadas com um fluorocromo repórter na extremidade 5' e uma molécula supressora da fluorescência (*quencher*) na extremidade 3'. A sonda intacta liga-se por complementaridade à sequência

alvo. Enquanto a sonda está intacta, o NFQ absorve a fluorescência emitida pelo fluorocromo repórter, devido à proximidade existente entre os dois, através do processo de transferência de energia por ressonância da fluorescência (FRET - *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) ou transferência de Förster, impedindo a sua detecção. A clivagem da extremidade 5' da sonda pela actividade de nuclease 5' da Taq polimerase, provoca a separação física do repórter e do NFQ e torna possível a geração de um sinal detectável (Applied Biosystems, 2010; Stephen A. Bustin, 2005a; Valasek & Repa, 2005).

Os ciclos iniciais de PCR, nos quais a variação da fluorescência está abaixo do limiar de detecção do instrumento, definem uma linha de base (*baseline*). O limiar (*threshold*) é um nível arbitrário de fluorescência determinado com base na variabilidade da linha de base, que corresponde ao primeiro aumento significativo da fluorescência acima da linha de base. O ciclo de limiar (C_t - *threshold Cycle*) é o número de ciclos de PCR necessários para que a variação da fluorescência atinja o limiar (*threshold*). Quanto mais elevado for o número inicial de cópias de DNA alvo, mais cedo se observará um aumento significativo na fluorescência (Applied Biosystems, 2010; Stephen A. Bustin, 2005b).

Os resultados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, também conhecido por método comparativo dos C_t , baseado em dois pressupostos: o primeiro é que, no início da reacção, a acumulação de produto em cada ciclo de PCR é exponencial, e o segundo é que há um gene (ou genes) que é expresso a um nível constante entre as amostras. Estes genes são usados como genes de controlo endógeno para normalizar as diferenças de qualidade e quantidade de mRNA entre as várias amostras. Os genes de controlo endógeno usados normalmente são os genes de expressão constitutiva, tais como os que codificam para a β -actina (*ACTB* - *Actine- β*) e para a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH* - *glyceraldehyde 3-phosphate dehidrogenase*). Neste trabalho, o gene de controlo endógeno usado foi o da β -actina. Este método de quantificação relativa permite determinar a quantidade relativa (RQ - *Relative Quantity*) de expressão de um gene alvo numa amostra de teste, por exemplo, uma amostra tratada com uma certa concentração de TG, em relação a uma amostra de referência ou calibradora, por exemplo, uma amostra não tratada, através da fórmula aritmética $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, em que ΔC_t é a diferença entre os valores de C_t para o gene de interesse e para o gene de controlo endógeno para cada amostra de teste e $\Delta\Delta C_t$ resulta da subtracção do ΔC_t da amostra de referência ao ΔC_t da amostra de teste. O valor negativo desta subtracção ($-\Delta\Delta C_t$) representa assim a diferença no número normalizado de ciclos que ocorrem até se atingir o limiar entre a amostra de teste e a amostra de referência. Por definição, o $\Delta\Delta C_t$ para a amostra de referência é igual a zero e 2^0 é igual a 1, de modo

que a variação na expressão genética relativa à amostra de referência é sempre igual a 1 (VanGuilder et al., 2008).

O sistema de PCR em tempo real usado nesta tese foi o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

2.6 Caracterização das linhas celulares de melanoma

2.6.1 Análise da expressão fenotípica dos membros da família PDI e de outras chaperonas residentes do RE nas linhas celulares de melanoma por citometria de fluxo

A expressão fenotípica dos membros da família PDI e de outras chaperonas residentes do RE nas linhas celulares SK-MEL-30, MNT-1 e M8 foi analisada por citometria de fluxo, através da marcação intracelular e superficial das células com os anticorpos referidos anteriormente na Tabela 1.

As células utilizadas nas marcações foram removidas dos frascos de cultura com Tripsina-EDTA, de acordo com o procedimento descrito na secção 2.1. Após tripsinização, as células foram centrifugadas duas vezes em PBS, a 1000 rpm, durante 5 minutos. O sedimento de células foi ressuscitado em PBS e distribuído pelos tubos de citometria (cerca $1,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^5$ células por tubo); os tubos de citometria destinados à marcação intracelular receberam 50µL de suspensão celular cada, enquanto os tubos de citometria destinados à marcação superficial receberam 100µL de suspensão celular cada.

Para as marcações intracelulares, as células foram previamente fixadas e permeabilizadas usando os reagentes de fixação e permeabilização do conjunto BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences), seguindo as instruções indicadas pelo fabricante. Sumariamente, para a fixação e permeabilização das células, adicionaram-se 250 µL de solução de fixação/ permeabilização por tubo de citometria, deixando incubar durante 20 minutos a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em solução-tampão de permeabilização/lavagem. Cada lavagem consistiu em adicionar 1 mL de solução-tampão de permeabilização/ lavagem por tubo, seguido da centrifugação das células a 1000 rpm, durante 5 minutos. Este procedimento foi também efectuado após cada marcação, para remover o excesso de anticorpo não ligado. Para a marcação com anticorpo primário, as células foram ressuscitadas em 50 µL de solução-tampão de permeabilização/lavagem contendo anticorpo para o antigénio de interesse nas concentrações indicadas na Tabela 3 (um anticorpo diferente para cada tubo)

e incubadas a 4°C por 30 minutos no escuro. Após a lavagem, o sedimento de células foi ressuscitado em 50 µL de solução-tampão de permeabilização/lavagem contendo 1 µL de anticorpo secundário fluorescente anti-IgG de rato conjugado com o corante Alexa Fluor, ou anti-IgG de coelho conjugado com FITC, consoante o isotipo do anticorpo primário (consultar a Tabela 3), e incubadas por 30 minutos, a 4°C, no escuro. Adicionalmente, para cada linha celular, prepararam-se dois tubos de citometria com células marcadas apenas com o anticorpo secundário que serviram de controlo para a marcação específica. O controlo para a marcação específica foi feito desta forma quer na marcação intracelular, quer na marcação superficial. Após a lavagem, o sedimento celular foi ressuscitado em 300 µL de solução FACS FLOW (BD Biosciences) e as células foram analisadas por citometria de fluxo.

Tabela 3 - Concentrações finais, isotipos e anticorpos secundários relativos aos anticorpos anti-PDI e anti-chaperonas residentes do RE usados nas marcações celulares.

Anticorpo Primário	Concentração final de anticorpo (µg/ mL)	Isotipo	Anticorpo Secundário (Fornecedor)
ERp57	10,0	IgG de rato	<i>Alexa Fluor[®] 488 Goat Anti-Mouse IgG (H + L)</i> (Invitrogen)
ERp72	12,0		
CNX	10,0		
CLR	12,0		
PDI	12,0		
PDIA5	12,0		
PDIA6	10,0		
TMX1	10,0		
TMX3	2,0	IgG de coelho	<i>Anti-Rabbit IgG (whole molecule), F(ab')₂ fragment-FITC</i> (SIGMA)
TMX4 (Ab1)	3,0		
TMX4 (Ab2)	10,0		
BiP/GRP78	12,0		

Para a marcação superficial, as células foram incubadas com um anticorpo diferente em cada tubo, nas concentrações indicadas na Tabela 3, durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas uma vez em 1 mL de PBS e centrifugadas a 1000 rpm, durante 5 minutos. O sedimento celular foi ressuscitado em 10 µL de anticorpo secundário fluorescente anti-IgG de rato conjugado com o corante Alexa Fluor 488 ou anti-IgG de coelho conjugado com FITC, dependendo do isotipo do anticorpo primário, previamente diluídos em PBS na proporção de 1:50, durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após a incubação, as células foram novamente lavadas e centrifugadas seguindo o procedimento anterior. Por fim, as células foram ressuscitadas em 300 µL de solução FACS FLOW e analisadas por Citometria de Fluxo.

Os dados obtidos foram analisados com o programa informático *CellQuest* (Becton Dickinson).

2.6.2 Análise do efeito da TG na viabilidade celular por citometria de fluxo

O efeito da TG na viabilidade celular das três linhas celulares em estudo foi analisado por citometria de fluxo, através da marcação das células com anexina V e 7-aminoactinomicina (7-AAD). A anexina V é uma proteína dependente de Ca^{2+} que liga preferencialmente a PS, um fosfolípido da membrana plasmática. Uma das primeiras alterações morfológicas a surgir no processo de apoptose, antes da perda da integridade da membrana plasmática, é a perda da distribuição assimétrica da PS ao longo da bicamada fosfolipídica, verificando-se a sua translocação da camada interna para a camada externa da membrana plasmática. Desta forma, a PS fica exposta ao ambiente extracelular, podendo ser detectada por citometria de fluxo através da ligação da anexina V marcada com um fluorocromo, na presença de cálcio. O 7-AAD é um corante de viabilidade fluorescente que se liga selectivamente ao DNA, desde que a membrana plasmática esteja permeável, devido ao seu elevado peso molecular. Durante os estágios mais tardios de morte celular, a membrana plasmática perde progressivamente a sua integridade, verificando-se a formação de poros que a tornam permeável a corantes de viabilidade como o 7-AAD. Deste modo, a marcação das células com anexina V e com 7-AAD em simultâneo permite a distinção entre células intactas, viáveis (anexina V \neg / 7-AAD \neg), células em apoptose recente (Anexina V $^+$ / 7-AAD \neg), células em apoptose tardia (anexina V $^+$ / 7-AAD $^+$) e células necróticas (anexina V \neg / 7-AAD $^+$) (Koopman et al., 1994; Lecoeur, de Oliveira-Pinto, & Gougeon, 2002; van Engeland, Nieland, Ramaekers, Schutte, & Reutelingsperger, 1998).

Inicialmente, foram cultivadas $0,15 \times 10^6$ células/ poço em placas de cultura de 12 poços (Greiner Bio-One), durante 24h, para aderirem à placa. Após a adesão, as células foram tratadas com várias concentrações de TG, tendo cada concentração sido testada em duplicado, e incubadas durante 48h. As células M8 e SK-MEL-30 foram tratadas com concentrações de TG entre $0,14 \mu\text{M}$ e $75,00 \mu\text{M}$, enquanto as células MNT-1 foram tratadas com concentrações de TG entre $0,02 \mu\text{M}$ e $75,00 \mu\text{M}$. As células usadas como controlo foram tratadas com meio de cultura apropriado sem adição do composto ($0 \mu\text{M}$ de TG), contendo apenas DMSO numa percentagem (v/v) igual à dos tratamentos com TG (um controlo de células tratadas com 0,2% de DMSO, correspondente à concentração de $75,00 \mu\text{M}$, e um controlo de células tratadas com 0,1% de DMSO, correspondente às restantes concentrações). Terminado o período de tratamento, as células foram removidas dos poços através de tripsinização, seguindo os passos indicados na secção 2.1. As células

tripsinizadas foram centrifugadas a 2000 rpm, durante 10 minutos, juntamente com os meios de cultura em que se encontravam as células e o meio das lavagens, para sedimentar todas as células, incluindo as células apoptóticas e necróticas que poderiam estar em suspensão nesses meios. Após a centrifugação, o sedimento celular foi ressuscitado em 200 µL de solução-tampão de ligação da anexina V *Annexin V Binding Buffer* 10x (BD Biosciences), seguindo as indicações do fabricante. Desta suspensão celular, foram transferidos 185 µL para um tubo de citometria, onde as células foram incubadas com 5 µL de solução *APC Annexin V* (BD Biosciences) – que contém a anexina V conjugada com o fluorocromo alofococianina (APC, *allophycocyanin*) - e 10 µL de solução de 7-AAD (Sigma-Aldrich) por tubo, durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Após a incubação, adicionaram-se 200 µL de solução-tampão de ligação da anexina V a cada tubo e procedeu-se à análise das células por citometria de fluxo. Os dados recolhidos foram analisados com a ferramenta informática PAINT-A-GATE 3.0.2 PPC (Becton Dickinson).

2.7 Análise do efeito da TG na expressão das PDIs

2.7.1 Análise do efeito da TG na expressão genética das PDIs por RT-qPCR

2.7.1.1 Tratamento com TG

Neste estudo, usaram-se duas linhas celulares, SK-MEL-30 e MNT-1. As células foram cultivadas, durante 24h, em placas de cultura de 6 poços (Greiner Bio-one), nos quais foram semeadas $0,15 \times 10^6$ células por poço, para aderirem à placa. Após aderirem, as células foram tratadas com TG durante 18h e 48h. As células SK-MEL-30 foram tratadas com 9,38 µM, 18,75 µM e 37,50 µM de TG, enquanto as células MNT-1 foram tratadas com 0,02 µM, 1,17 µM e 37,50 µM de TG. As células usadas como amostra de referência (0 µM de TG) foram tratadas com meio de cultura apropriado com DMSO numa percentagem igual à dos tratamentos com TG, ou seja, de 0,1% (v/v). Para cada condição experimental, foram cultivados 2 poços, a fim de se obter um número de células suficiente para a extração de RNA, cerca de $1,0 \times 10^6$ de células para cada condição. Após os períodos de tratamento, as células foram tripsinizadas, de acordo com o procedimento descrito na secção 2.1 e centrifugadas a 1000 rpm, durante 5 minutos. O sedimento celular foi ressuscitado em PBS. A suspensão celular foi transferida para tubos *ependorf* e centrifugada a 11 000g, durante 2 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos celulares secos foram guardados a -80°C até se proceder à extracção de RNA.

2.7.1.2 Extracção de RNA total e conversão em cDNA por RT

O método usado para a extracção do RNA total foi o método das colunas de sílica, baseado nas propriedades de ligação selectiva da membrana de sílica para os ácidos nucleicos e que permite eliminar contaminações com DNA genómico (gDNA – *genomic DNA*) através da digestão em coluna do gDNA, que é quebrado quando os lisados são forçados a atravessar o filtro da coluna de filtração por centrifugação. Para extrair o RNA total, utilizou-se o conjunto de reagentes e material de extracção de RNA total *GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit* (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fornecedor. Para cada amostra, preparou-se previamente 250µL de mistura de 2-mercaptoetanol (2-ME)/solução de lise (1: 100). A solução de lise contém tiocinato de guanidina (GTC – *guanidine thiocyanate*) que desnatura e solubiliza as proteínas associadas ao RNA (nucleoproteínas) e a enzima ribonuclease (RNase), diminuindo assim a sua força degradativa, enquanto o 2-ME é usado para inactivar completamente a actividade da RNase. Assim, para libertar o RNA e inactivar a RNase, as amostras celulares obtidas na secção 2.8.1.1 foram lisadas e homogenizadas em 250µL da mistura de 2-ME/solução de lise. De seguida, o lisado foi transferido para uma coluna de filtração encaixada num tubo de colheita de 2mL e centrifugado a 10 000g, durante 2 minutos, para remover todos os restos celulares e o gDNA genómico. Após a centrifugação, rejeitou-se a coluna de filtração, que continha os restos celulares e o gDNA precipitados. À solução aquosa contendo o RNA, que permaneceu no tubo de colheita, adicionou-se um volume de etanol 70% igual ao volume de 2-ME/ solução de lisado (250µL) e ressuspendeu-se a mistura. Para isolar o RNA, através da ligação do RNA precipitado em etanol à coluna, transferiram-se 700µL da mistura de lisado/etanol para uma coluna de ligação encaixada num tubo de colheita de 2mL e centrifugou-se por 1 minuto, a 12 000g. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, mantendo a coluna de ligação e o tubo de colheita. Nos casos em que havia mais do que 700µL da mistura de lisado/etanol, transferiu-se o restante da mistura para a coluna de ligação, repetindo a centrifugação e desprezando o sobrenadante. Na mesma coluna de ligação e no mesmo tubo de colheita, efectuaram-se três lavagens consecutivas da coluna para purificar o RNA. Na primeira lavagem, adicionou-se 250µL de solução de lavagem 1 à coluna de ligação e centrifugou-se a 10 000g, durante 30 segundos. Em seguida, desprezou-se o sobrenadante e efectuou-se a segunda lavagem da coluna, que consistiu em adicionar 400µL da solução de lavagem 2 à coluna e centrifugar a 17 000g, durante 1 minuto. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e, mantendo a mesma coluna de ligação e o mesmo tubo, procedeu-se à terceira lavagem adicionando-se 400µL da solução de lavagem 2 à coluna e centrifugando-se à velocidade de 17 000g, durante 2 minutos, para que a coluna de ligação ficasse seca. Depois da centrifugação, desprezou-se

o sobrenadante, mantendo-se a coluna e o tubo de colheita, e efectuou-se uma lavagem a seco, centrifugando-se a 17 000g, durante 1 minuto. Este passo assegura que a superfície da coluna de ligação não tem resíduos da solução de lavagem 2, pois a coluna de ligação deve estar livre de etanol antes da eluição do RNA. Para a eluição do RNA, transferiu-se a coluna de ligação para um novo tubo de colheita, adicionou-se 55µL de solução de eluição na coluna de ligação e centrifugou-se à velocidade de 17 000g por 1 minuto. Retiraram-se 50µL do líquido do tubo de colheita, que foram adicionados à mesma coluna de filtração e ao mesmo tubo, centrifugando-se por mais 2 minutos, a 17 000g. No final da extracção, obtiveram-se aproximadamente 50 µL de solução contendo RNA.

O RNA total extraído de cada amostra celular foi convertido em cDNA de cadeia simples através de RT, usando o conjunto de reagentes *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reacção, foi preparada uma mistura de reacção (*Master Mix*) (2X) de 50 µL (Tabela 4).

Tabela 4 - Volume dos reagentes necessários para preparar a mistura de reacção para uma reacção de RT.

Componente	Volume (µL)/ Reacção
Solução-tampão de RT (10X)	10
Nucleótidos livres (dNTPs – <i>deoxynucleotides triphosphate</i>) (25X)	4
Oligonucleótidos iniciadores aleatórios (<i>random primers</i>) (10X)	10
Transcriptase reversa MultiScribe™	5
Água livre de nucleases MilliQ (Millipore)	21
Total por Reacção	50

Durante o processo de preparação das misturas, todos os reagentes foram colocados em gelo. A mistura de reacção foi preparada em tubos *ependorf* de 1,5 mL e colocada em gelo até ser adicionada aos tubos de PCR. As amostras de RNA foram adicionadas à mistura de reacção numa proporção de 1:1 (v/v), ou seja, 50 µL de mistura de reacção (2X) para 50 µL de amostra de RNA e misturou-se cuidadosamente. Depois, os tubos foram centrifugados para concentrar a mistura no fundo do tubo e eliminar quaisquer bolhas de ar. O termociclador usado neste procedimento experimental foi o *PTC-100 Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Inc). As condições de tempo e temperatura usadas para a RT estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 Condições de tempo e temperatura dos ciclos de RT.

	Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tempo (min)	10 min	120 min	5 min	∞

No final da reacção, os tubos de PCR com os cDNAs foram guardados a -20°C, até serem utilizados mais tarde para os estudos de expressão genética.

2.7.1.3 Quantificação relativa da expressão genética das PDIs por RT-qPCR

Antes de iniciar a preparação das misturas de reacção, todos os intervenientes (Tabela 6), excepto a água MilliQ, foram descongelados em gelo. Durante o descongelamento, os ensaios de expressão genética TaqMan® Gene Expression Assay foram protegidos da exposição directa à luz. As reacções de RT-qPCR em tempo real foram corridas em placas de 96 poços MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) e cada reacção foi corrida em duplicado. A mistura de reacção (Tabela 6) para cada reacção foi preparada em tubos de PCR de 1,5 mL livres de nucleases, sem adicionar a sonda específica. A sonda foi adicionada directamente na placa, antes da adição da mistura com os outros reagentes. De seguida, adicionou-se 8 µL da mistura de reacção a cada poço da placa. Depois, a placa foi selada com uma cobertura óptica adesiva MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) e centrifugada durante 5 minutos a 5 000g, para depositar o conteúdo e eliminar eventuais bolhas de ar. Em seguida, colocou-se a placa dentro do aparelho e iniciou-se a corrida de PCR em tempo real nas condições indicadas na Tabela 7. O sistema de PCR em tempo real usado nesta tese foi o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Tabela 6 - Volume dos componentes da mistura de reacção de RT-qPCR em tempo real para cada reacção. Os volumes dos componentes da mistura de cada reacção foram calculados para três réplicas de 10 µL de volume total, duas correspondentes à reacção e ao seu duplicado, e uma terceira para fornecer volume em excesso para a perda que ocorre durante as transferências de reagentes.

Componentes da mistura de reacção	1 reacção	3 réplicas
TaqMan® Gene Expression Assay (20X)	2	6
cDNA de interesse (10 a 100 ng de cDNA)	2	6
Água livre de nucleases MilliQ	1	3
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase UNG (Applied Biosystems)	5	15
Volume total	10	30

Tabela 7 - Condições de tempo e temperatura da corrida de RT-qPCR em tempo real.

Etapa	Iniciação	PCR	
Ciclos	1	40	
Tempos (s); Temperaturas (°C)	20; 95	3; 95 (Dissociação)	30; 60 (Extensão)

2.7.2 Análise do efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular das PDIs por citometria de fluxo

Cerca de $0,15 \times 10^6$ de células por poço foram cultivadas em placas de 6 poços (Greiner, Bio-One). Após 24h de cultura, as células foram tratadas com TG. As concentrações de TG usadas foram de $9,38 \mu\text{M}$ para as células SK-MEL-30 e de $0,02 \mu\text{M}$ para as células MNT-1, ambas com 0,1% (v/v) de DMSO. As células usadas como referência da expressão em células não tratadas com TG ($0 \mu\text{M}$ de TG) foram tratadas com meio de cultura apropriado contendo apenas DMSO numa percentagem de DMSO [0,1% (v/v)] igual à dos tratamentos com TG. Após 48h, as células foram tripsinizadas, através do procedimento descrito na secção 2.1, e centrifugadas a 1000 rpm, durante 5 minutos. Em seguida, o sedimento celular foi ressuspensão em PBS e distribuído pelos tubos de citometria para marcação (cerca $1,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^5$ células por tubo). Os procedimentos de marcação intracelular e superficial são idênticos aos descritos na secção 2.7.1. Os anticorpos usados nas marcações foram GRP78, PDI, CRT e TMX4 (Ab2). Após as marcações, as células foram ressuspensas em 200 μL de solução FACS FLOW e avaliadas por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram analisados com o programa CellQuest.

2.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos nas experiências foram analisados estatisticamente recorrendo ao *software* GraphPad Prism 5 (Windows). Os dados foram analisados pelo teste de t-Student, em que se considerou estatisticamente significativo um valor de $P < 0,05$ (* significa que o valor de $P < 0,05$; ** que o valor de $P < 0,01$).

2.10 Citações e referências bibliográficas

Todas as citações e referências bibliográficas foram feitas seguindo a norma da American Psychological Association (APA), adoptada pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.

3. Resultados

3.1 Caracterização das linhas celulares de melanoma

O principal objectivo deste trabalho foi investigar o efeito da TG na viabilidade celular, na expressão e localização celular das PDIs e de outras chaperonas residentes do RE em linhas celulares de melanoma. Para esse efeito, numa primeira fase, as três linhas celulares em estudo foram caracterizadas ao nível da susceptibilidade ao stress de RE induzido pela TG e da expressão fenotípica das PDIs e de outras chaperonas residentes do RE envolvidas no controlo de qualidade das proteínas sintetizadas no RE.

3.1.1 Análise do efeito da TG na viabilidade celular por citometria de fluxo

A TG reduz o cálcio no RE através da inibição das ATPases de Ca^{2+} SERCA, prejudicando o processamento das proteínas, devido ao seu impacto nas actividades funcionais das chaperonas dependentes de cálcio, tendo sido utilizada neste trabalho para induzir o stress de RE. Desta forma, a redução de cálcio leva à acumulação de proteínas processadas incorrectamente no RE que activa uma resposta de adaptação ao stress celular, a via UPR, a fim de restaurar a capacidade de processamento das proteínas do RE (Peters & Raghavan, 2011) e impedir a activação da apoptose. No entanto, se a UPR não for eficaz na resolução do stress de RE, o stress de RE grave ou prolongado induz a apoptose (Minamino, Komuro, & Kitakaze, 2010).

Um dos objectivos da análise do efeito da TG na viabilidade celular foi determinar uma concentração de TG capaz de induzir stress ligeiro de RE, sem activar a apoptose, mantendo a maioria das células viáveis/pré-apoptóticas. Esta concentração foi designada por concentração de pré-apoptose. A pré-apoptose é uma fase da via apoptótica induzida pelo stress celular e caracterizada pela ocorrência de alterações físico-químicas, inclusive alterações na homeostasia do Ca^{2+} , que antecedem a activação da apoptose (Cerella et al., 2007) e a exposição da PS ao ambiente extracelular (Garg, Krysko, Vandenabeele, & Agostinis, 2012) que, tal como foi referido anteriormente, é uma das primeiras alterações morfológicas do processo de apoptose. As células viáveis/pré-apoptóticas são negativas para a marcação com anexina V. Para determinar a concentração de pré-apoptose foi tida em conta a concentração de TG que originou uma percentagem de células viáveis/ pré-apoptóticas (anexina V/ 7AAD⁻) igual ou superior a 90%, por outras palavras, que originou no máximo 10% de células apoptóticas (incluindo células apoptóticas recentes, tardias e necróticas).

A susceptibilidade das células de melanoma ao stress de RE induzido pela TG foi analisada nas três linhas celulares por citometria de fluxo, utilizando anexina V e 7-AAD para distinguir a população viável/ pré-apoptótica das populações apoptótica recente, apoptótica tardia e necrótica e determinar a percentagem de células viáveis. A percentagem de células viáveis foi normalizada, considerando-se que a viabilidade celular das células dos controlos (correspondentes à condição 0 μM de TG) cultivadas apenas em meio de cultura contendo uma percentagem de 0,2% (v/v) de DMSO (igual à percentagem de DMSO no tratamento com 75,00 μM) ou de 0,1% (v/v) de DMSO (igual à percentagem de DMSO nos tratamentos com as restantes concentrações) era igual a 100 %. A concentração máxima de TG testada foi de 75,00 μM para todas as linhas celulares. Várias concentrações de TG, progressivamente mais baixas, preparadas por diluições sucessivas (1:2 ou 1:4), foram testadas até se encontrar a concentração de pré-apoptose para cada linha. A gama de concentrações de TG testadas foi diferente no caso das células MNT-1, porque foi necessário testar duas concentrações de TG adicionais (0,02 μM e 0,038 μM) para determinar a concentração de pré-apoptose. A determinação da percentagem de células viáveis originada por cada concentração de TG permitiu traçar as curvas de viabilidade celular representadas na Figura 6. O traçado das curvas mostra que as células MNT-1 têm maior susceptibilidade ao stress de RE induzido pela TG do que as células M8 e SK-MEL-30. Mais concretamente, para as linhas celulares M8 e SK-MEL-30, a primeira concentração de TG, por ordem decrescente, em que se verificou pelo menos 90% de células viáveis foi de 9,38 μM , enquanto para a linha celular MNT-1 a concentração foi de 0,02 μM (520 vezes menor do que a primeira) (Figura 6). As curvas de viabilidade celular das linhas M8 e SK-MEL-30 apresentam um traçado muito semelhante, sugerindo que existem similaridades nos mecanismos de resposta ao stress de RE induzidos pela TG e de resistência ao fármaco, pelo que se optou por usar apenas uma destas linhas celulares – a SK-MEL-30 - na análise do efeito da TG na expressão das PDIs e outras chaperonas do RE.

Com base na análise dos *dot plots* resultantes da avaliação da apoptose por citometria de fluxo, foram escolhidas três concentrações de TG para cada linha celular, associadas à indução de diferentes graus de stress de RE (ligeiro, moderado e grave) para a análise do efeito da TG na expressão genética das PDIs e outras chaperonas do RE por RT-qPCR. Para as células SK-MEL-30, as concentrações de TG escolhidas foram 9,38 μM , 18,75 μM e 37,50 μM , enquanto as concentrações escolhidas para as células MNT-1 foram 0,02 μM , 1,17 μM e 37,50 μM (Figura 7). Nas células SK-MEL-30, a concentração de 9,38 μM de TG induziu um stress de RE ligeiro, originando $98,89\% \pm 0,58$ de células viáveis/ pré-apoptóticas (anexina V⁻/ 7AAD⁻), $0,31\% \pm 0,19$ de células apoptóticas recentes (anexina V⁺/

7AAD⁻), 0,65% ± 0,56 de células apoptóticas tardias (anexina V⁺/ 7AAD⁺) e 0,74% ± 0,34 de células mortas/ necróticas (anexina V⁻/ 7AAD⁺), tendo esta sido considerada a concentração de pré-apoptose. A concentração de 18,75 μM de TG induziu um stress de RE moderado, uma vez que originou 85,80% ± 1,87 de células viáveis/ pré-apoptóticas, 3,56% ± 1,62 de

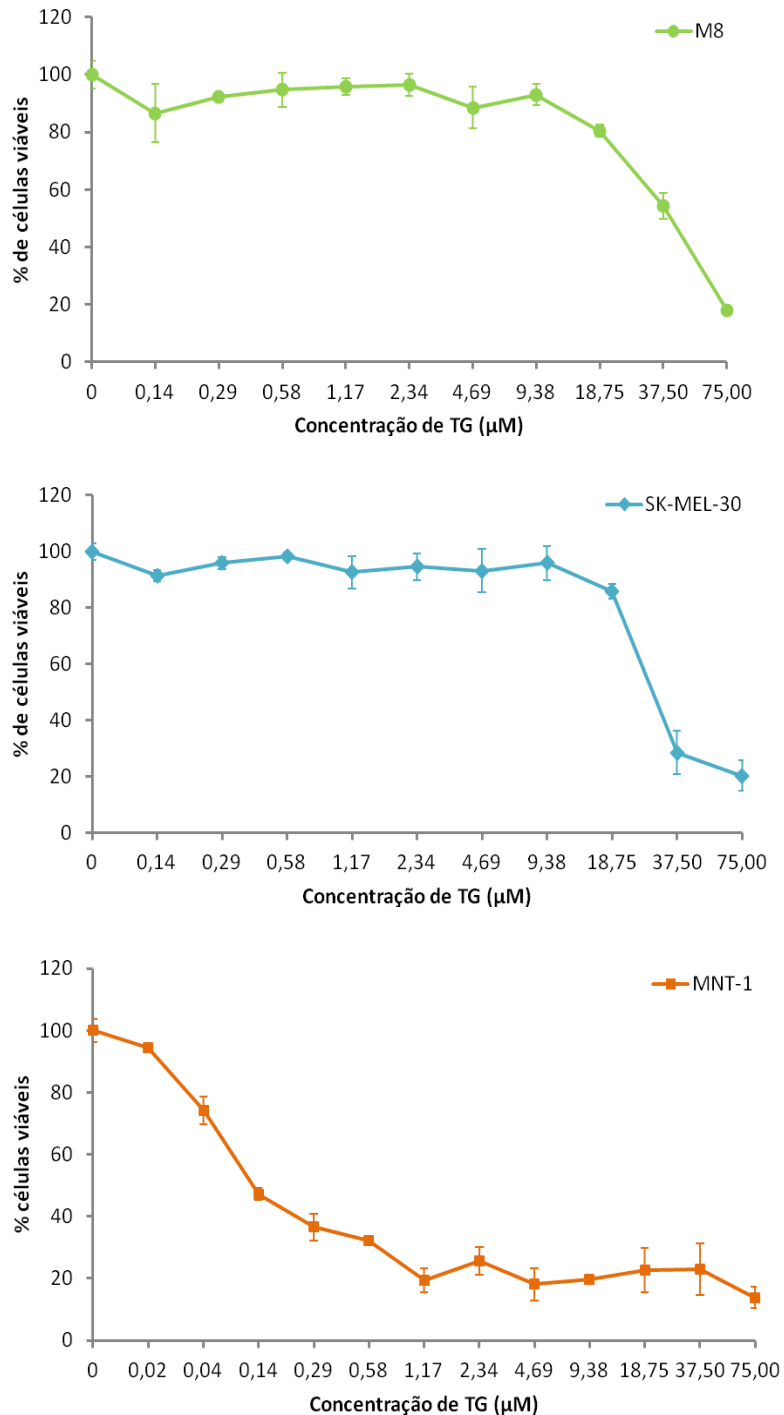


Figura 6 - Efeito da TG na viabilidade celular das três linhas celulares de melanoma. A, perfil de viabilidade celular das células M8; B, perfil de viabilidade celular das células SK-MEL-30; C, perfil de viabilidade celular das células MNT-1. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética da percentagem (%) de células viáveis de pelo menos 2 réplicas e respectivas barras de erro com desvio padrão para cada concentração de TG testada, excepto para a concentração máxima de 75,00 μM (n=1) nas células M8.

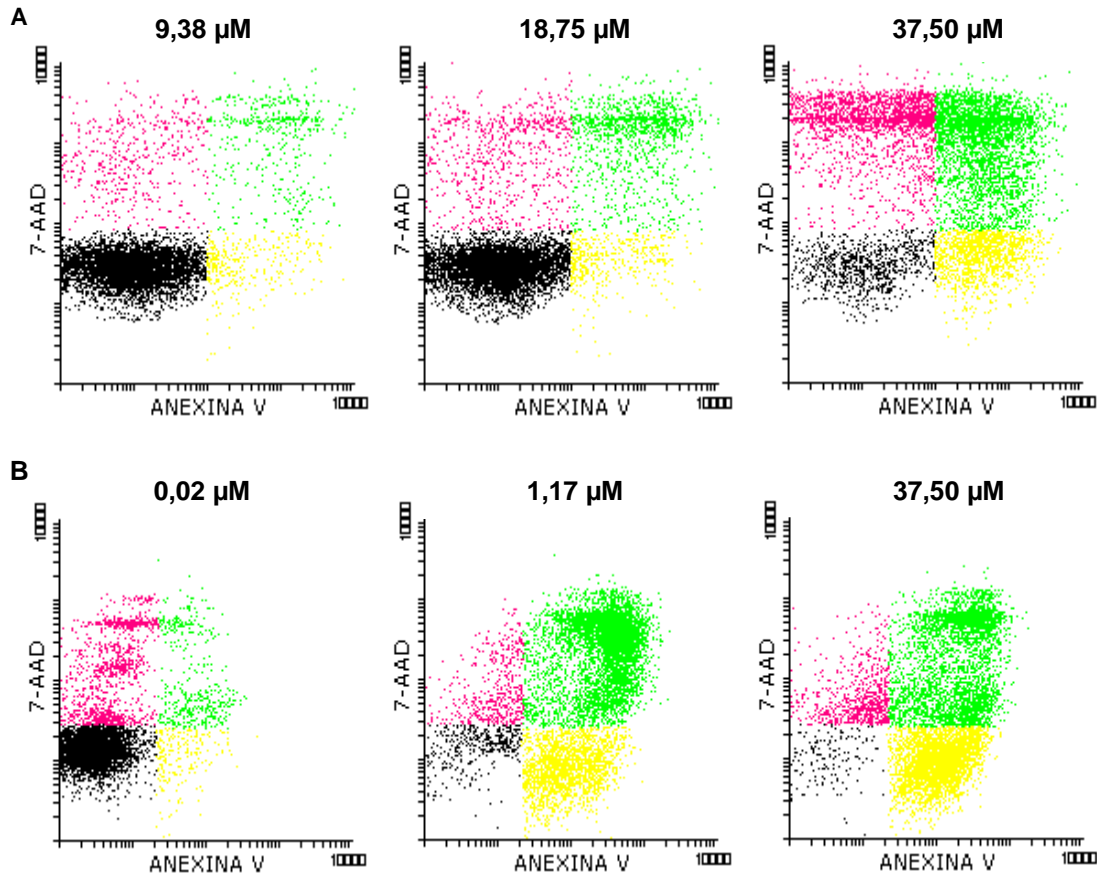


Figura 7 - *Dot plots* resultantes da avaliação da apoptose nas células SK-MEL-30 (A) e MNT-1 (B) tratadas com diferentes concentrações de TG, durante 48h, marcadas com Anexina V e 7AAD, por citometria de fluxo. Preto – células viáveis/ pré-apoptóticas (anexina V⁻/ 7AAD⁻); amarelo – células apoptóticas recentes (anexina V⁺/ 7AAD⁻); verde – células apoptóticas tardias (anexina V⁺/ 7AAD⁺); rosa – células necróticas (anexina V⁻/ 7AAD⁺).

células apoptóticas recentes, $11,78\% \pm 3,05$ de células apoptóticas tardias e $10,25\% \pm 1,35$ de células mortas ou necróticas. Por fim, a concentração de $37,50 \mu\text{M}$ de TG induziu stress de RE grave, dando origem a $28,60\% \pm 6,96$ de células viáveis/ pré-apoptóticas, $9,25\% \pm 0,84$ de células apoptóticas recentes, $36,44\% \pm 7,81$ de células apoptóticas tardias e $36,19\% \pm 12,43$ células mortas ou necróticas. Relativamente às células MNT-1, a concentração de $0,02 \mu\text{M}$ de TG, que originou $94,94\% \pm 0,59$ de células viáveis/ pré-apoptóticas, $2,31 \pm 0,27$ de células apoptóticas recentes, $1,13 \pm 0,06$ de células apoptóticas tardias e $1,47\% \pm 0,33$ de células mortas ou necróticas, gerou um stress de RE ligeiro e foi considerada a concentração de pré-apoptose para esta linha celular. A concentração de $1,17 \mu\text{M}$ de TG deu origem a $19,38\% \pm 3,90$ de células viáveis/ pré-apoptóticas, $15,66\% \pm 3,52$ de células apoptóticas recentes, $59,99\% \pm 8,25$ de células apoptóticas tardias e $4,85\% \pm 1,19$ de células mortas ou necróticas. Tal como se pode observar na Figura 6C, a viabilidade celular das células MNT-1 diminui de forma bastante mais acentuada entre as concentrações $0,02 \mu\text{M}$ e $1,17 \mu\text{M}$. A partir de $1,17 \mu\text{M}$ de TG, a viabilidade celular diminui mais suavemente até atingir cerca de 10%, fase correspondente a um estado de stress de RE mais grave.

Finalmente, a concentração de 37,50 μM originou 22,93% \pm 8,31 de células viáveis/ pré-apoptóticas, 27,58% \pm 11,22 de células apoptóticas recentes, 43,00% \pm 8,27 de células apoptóticas tardias e 4,07% \pm 3,42 de células mortas ou necróticas.

Para a análise do efeito do stress de RE induzido pela TG na expressão fenotípica das PDIs e outras chaperonas do RE nas linhas celulares de melanoma por citometria de fluxo, utilizou-se a concentração de pré-apoptose da TG, de 9,38 μM para as SK-MEL-30 e de 0,02 μM para as MNT-1 para induzir stress de RE.

3.1.2 Análise da expressão fenotípica e da localização celular das PDIs e de outras chaperonas residentes do RE de melanoma por citometria de fluxo

A expressão fenotípica e a localização celular das PDIs e outras chaperonas residentes no RE em estudo foram analisadas por citometria de fluxo. Para identificar as PDIs e outras chaperonas residentes do RE expressas nas três linhas celulares de melanoma e avaliar a sua localização celular, as células foram marcadas superficial e intracelularmente com anticorpos para os diferentes membros PDIs e chaperonas residentes do RE e avaliadas por citometria de fluxo. É importante referir que o protocolo de marcação intracelular, que envolve um passo de fixação e permeabilização das células para permitir a marcação dos componentes celulares internos, também permite a marcação superficial das células. Os dados recolhidos foram expressos em termos de MFI.

Os resultados obtidos (Tabela 8) revelam que todas as PDIs analisadas são expressas intracelularmente nas linhas M8 e MNT-1, enquanto na linha SK-MEL-30, a PDIA5 e a ERp57 não são expressas. As células MNT-1 expressam todas as PDIs, excepto a PDIA6 na superfície celular. Para além disso, as células MNT-1 apresentam um nível mais elevado de expressão de PDIs, quer na superfície celular, quer a nível intracelular, do que as restantes linhas celulares de melanoma. Os perfis de expressão e de localização das PDIs nas SK-MEL-30 parecem ser similares aos perfis da M8, excepto nos casos da ERp57, ERp72 e PDIA5. Nas células SK-MEL-30, a ERp57 e a PDIA5 são expressas unicamente na superfície celular, ao contrário do que acontece nas células M8, em que estas enzimas são expressas a nível intracelular, mas não à superfície. Relativamente à ERp72, embora seja expressa quer intracelularmente, quer à superfície das células SK-MEL-30 e M8, a sua expressão é maior na superfície celular das SK-MEL-30 do que internamente, enquanto, nas células M8 e MNT-1, a expressão é maior a nível intracelular do que na superfície celular.

Tabela 8 - Expressão dos membros da família PDI e de outras três chaperonas do RE. A marcação positiva está denotada pelo sinal '+' e a marcação negativa pelo sinal '-'. As diferenças nos valores de MFI estão representadas por : '+' para $0 < \text{MFI} \leq 10$, '++' para $10 < \text{MFI} \leq 100$, '+++ para $100 < \text{MFI} \leq 500$ e '++++' para $500 < \text{MFI} \leq 3\,000$ (n=1).

Membros da família PDI	M8		SK-MEL-30		MNT-1	
	Superficial	Intracelular	Superficial	Intracelular	Superficial	Intracelular
ERp57	-	+	+	-	+++	++++
ERp72	++	++	++	+	++	++++
GRP78/ BiP	++	+++	+	+++	++	+++
CNX	++	+++	++	+++	++++	++++
PDIA5	++	++	++	-	++	++
PDIA6	+	+++	++	+++	-	+++
TMX1	++	+++	+	++++	++	++++
TMX3	+	++	+	++	++	+++
TMX4 (Ab1)	+	+++	+	+++	++	++++
TMX4 (Ab2)	+	+++	+	+++	++	++++
CRT	+	+++	+	++	++	++++
PDI	+	+	++	++	++	+++

3.2 Análise do efeito da TG na expressão das PDIs

Após a caracterização das linhas celulares, estudou-se o efeito da TG na expressão e localização celular das PDIs e das outras chaperonas do RE de melanoma, quer ao nível transcricional quer fenotípico, em duas das linhas celulares de melanoma em estudo – SK-MEL-30 e MNT-1. A nível transcricional, efectuou-se a análise da expressão dos genes da família PDI e outras chaperonas do RE por RT-qPCR, após tratamento com três concentrações de TG, durante 18 e 48h. A nível fenotípico, efectuou-se a análise da expressão fenotípica de algumas PDIs e chaperonas por citometria de fluxo, após as células terem sido tratadas com uma concentração pré-apoptótica de TG, durante 48h. Tal como referido anteriormente, a concentração de pré-apoptose correspondeu a uma concentração que não originou mais do que 10% de células apoptóticas. Essas concentrações, determinadas com base nos *dot plots* resultantes da avaliação da marcação das células tratadas com várias concentrações de TG com anexina V e 7AAD por citometria de fluxo, foram de 9,38 μM para as SK-MEL-30 e de 0,02 μM para as MNT-1 (Figura 7).

3.2.1 Análise do efeito da TG na expressão genética das PDIs por RT-qPCR

O efeito do stress de RE induzido pela TG na expressão genética das PDIs e de outras chaperonas residentes do RE foi analisado por RT-qPCR. A similaridade entre os

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais

perfis de susceptibilidade das linhas M8 e SK-MEL-30 determinados na secção 3.1.1 sugere que estas linhas respondem de forma similar ao stress de RE induzido pela TG, enquanto a linha MNT-1 demonstrou ser mais sensível, apresentando um perfil de susceptibilidade que se distingue das restantes linhas. Uma vez que as linhas M8 e SK-MEL-30 apresentam um perfil semelhante, utilizou-se apenas uma destas linhas nos estudos de expressão genética por RT-qPCR. Os resultados obtidos na secção 3.1.1 permitiram também seleccionar três tipos de concentrações de TG capazes de induzir stress de RE ligeiro, moderado e grave, respectivamente, estabelecidos através da percentagem de células apoptóticas resultantes dos tratamentos (Figura 2). As células SK-MEL-30 foram tratadas com 9,38 μM , 18,75 μM e 37,50 μM de TG, enquanto as células MNT-1 foram tratadas com 0,02 μM , 1,17 μM e 37,50 μM . As concentrações de pré-apoptose 9,38 μM e 0,02 μM induzem um stress de RE ligeiro, uma vez que originaram 1,69 e 4,91% de células apoptóticas, respectivamente (Figura 2). As concentrações intermédias de 18,75 μM e 1,17 μM de TG originaram mais do que 10% de células apoptóticas (25,59 e 80,50%, respectivamente), tendo sido associadas à indução de stress de RE moderado, menos grave do que stress de RE imposto pela concentração de 37,50 μM , que originou 81,88% de células apoptóticas para a linha SK-MEL-30 e 84,07% para a linha MNT-1. As células foram expostas aos tratamentos por um período curto de 18h e por um período longo de 48h.

Os resultados foram analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, também conhecido por método comparativo dos C_t . Os níveis de expressão de transcritos foram calculados em relação ao nível de expressão de transcritos de *β -actina*, usado como controlo endógeno. A quantidade relativa de transcrito (RQ) foi calculada em relação a uma amostra de referência (RQ = 1) que corresponde à amostra controlo (0 μM de TG), cultivada em meio de cultura contendo apenas o solvente numa percentagem de 0,1% (v/v). O aumento ou a diminuição da expressão de transcritos das PDIs ou chaperonas do RE relativamente às células da amostra de referência são revelados por um valor de RQ maior ou menor do que 1, respectivamente.

Para os tratamentos de 18h de duração, cada concentração foi testada em duplicado (n=2), ou seja, para cada concentração testada realizaram-se 2 ensaios, enquanto nos tratamentos de 48h de duração, cada concentração foi testada apenas uma vez, num único ensaio (n=1). Para além da amostra de teste, preparou-se para cada ensaio uma amostra de referência (0 μM de TG) usada para calcular o RQ para cada ensaio.

Tabela 9 - Níveis de expressão de transcritos dos genes da família PDI e das chaperonas do RE nas células SK-MEL-30 (n=3) e MNT-1 (n=3) cultivadas em meio de cultura contendo apenas o solvente (amostras de referência) durante 48h.

Níveis de expressão de transcritos nas células não tratadas às 48h ($2^{-\Delta Ct} \cdot 1000$) (‰ de β-actina)		
	SK-MEL-30	MNT-1
GRP78	564 ± 126	200 ± 20
CRT	17943 ± 12039	1136 ± 1029
PDI	5410 ± 3859	304 ± 266
TMX4	378 ± 206	24 ± 1
ERp57	2197 ± 1013	569 ± 62
ERp72	2646 ± 1717	367 ± 220
ERdj5	845 ± 617	96 ± 14
PDIA5	261 ± 142	37 ± 21
PDIA6	73 ± 13	32 ± 4
TMX3	473 ± 256	72 ± 14
CNX	12036 ± 3109	3810 ± 275

Os níveis de expressão de transcritos relativamente à β -actina apresentados dizem respeito ao tratamento de 48h, mas os níveis de expressão de transcritos às 18h são semelhantes. A nível da expressão fenotípica (Tabela 8), as células MNT-1 expressam mais PDIs e chaperonas do RE (com valores de MFI entre 40 e 2637) do que as SK-MEL-30 (com valores de MFI entre 1 e 766). Tendo em conta os níveis de expressão de transcritos dos genes das PDIs e das chaperonas do RE (Tabela 9), as células MNT-1 expressam mais PDIs e chaperonas do RE, com valores de expressão de transcritos entre 24 ± 1 e 3810 ± 275 moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de β -actina (para MNT-1) e entre 73 ± 13 e 17943 ± 12039 moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de β -actina (SK-MEL-30).

A quantidade relativa de expressão de transcritos (RQ) da família PDI e de outras chaperonas residentes do RE nas células tratadas com TG em relação às células não tratadas (0 μ M de TG) são apresentados nas Figuras 8 e 9. Os valores de RQ para as células MNT-1 tratadas com 37,50 μ M de TG pelo período de 48h não foram incluídos nos gráficos (Figura 9B), porque os valores de C_t , incluindo o do controlo endógeno, obtidos para estas amostras foram iguais ou superiores a 30 e, nalguns casos, foram indeterminados, significando que as amostras de cDNA continham pouca quantidade inicial de cDNA para a amplificação, ou cDNA de fraca qualidade.

De um modo geral, a quantidade relativa de expressão genética das PDIs e outras chaperonas de RE em estudo aumentou (RQ > 1) nas células SK-MEL-30 tratadas com as diferentes concentrações TG durante 18h (Figura 8A) em relação à amostra de referência, contendo células cultivadas em meio de cultura contendo apenas o solvente, sendo a expressão do transcrito TMX4 nas células tratadas com 18,75 μ M de TG, que diminuiu (RQ

< 1), a única excepção. Embora nalguns casos os genes apresentem valores de RQ diferentes entre concentrações, as diferenças não são estatisticamente significativas excepto para o *GRP78* na amostra tratada com 37,50 μM de TG (7 ± 1 ; $p < 0,05$) em relação à amostra tratada com 18,75 μM de TG. O *GRP78* é o gene que apresenta valores de RQ mais elevados (19 ± 4 , 17 ± 1 e 7 ± 1 nas células tratadas com 9,38 μM , 18,75 μM e 37,50 μM , respectivamente). Os valores de RQ para os restantes genes sobreexpressos variam entre $1,060 \pm 0,5070$ (*TMX4*) e $6,225 \pm 0,2203$ (*CRT*).

Genericamente, a quantidade relativa de expressão genética aumentou ($\text{RQ} > 1$) para todos os genes estudados nas células SK-MEL-30 tratadas com diferentes concentrações de TG, durante 48h (Figura 8B), salvo algumas excepções em que se verificou uma diminuição da mesma ($\text{RQ} < 1$), nomeadamente o *TMX3*, para as concentrações de 9,38 e 18,75 μM de TG, e os genes *PDIA5*, *TMX4*, *CNX* e *CRT*, para a concentração 18,75 μM . Para a maioria dos genes estudados, o RQ é maior para a concentração mais elevada do que para a concentração mais baixa, excepto para o *CRT*, para o qual o RQ é menor para a concentração mais elevada do que para a concentração mais baixa.

Nas células MNT-1 tratadas com TG durante 18h (Figura 9A), a quantidade relativa de expressão de todos os genes estudados aumentou ($\text{RQ} > 1$), excepto para o *TMX3*, para as concentrações 0,02 e 1,17 μM ($\text{RQ} < 1$). O gene *PDIA6* tem o maior RQ observado (257 ± 253), correspondente à concentração de 37,50 μM , enquanto o *GRP78* tem o segundo maior RQ (70 ± 50), correspondente também à mesma concentração. Um grupo de genes, constituído por *ERp57*, *ERdj5*, *PDI*, *PDIA6* e *GRP78*, apresenta um aumento da quantidade relativa de expressão coincidente com o aumento da concentração de TG. A quantidade relativa de expressão do gene *CRT*, por sua vez, diminui à medida que a concentração de TG aumenta, mas mantendo o RQ superior a 1. As diferenças de quantidade relativa de expressão observadas não são estatisticamente significativas.

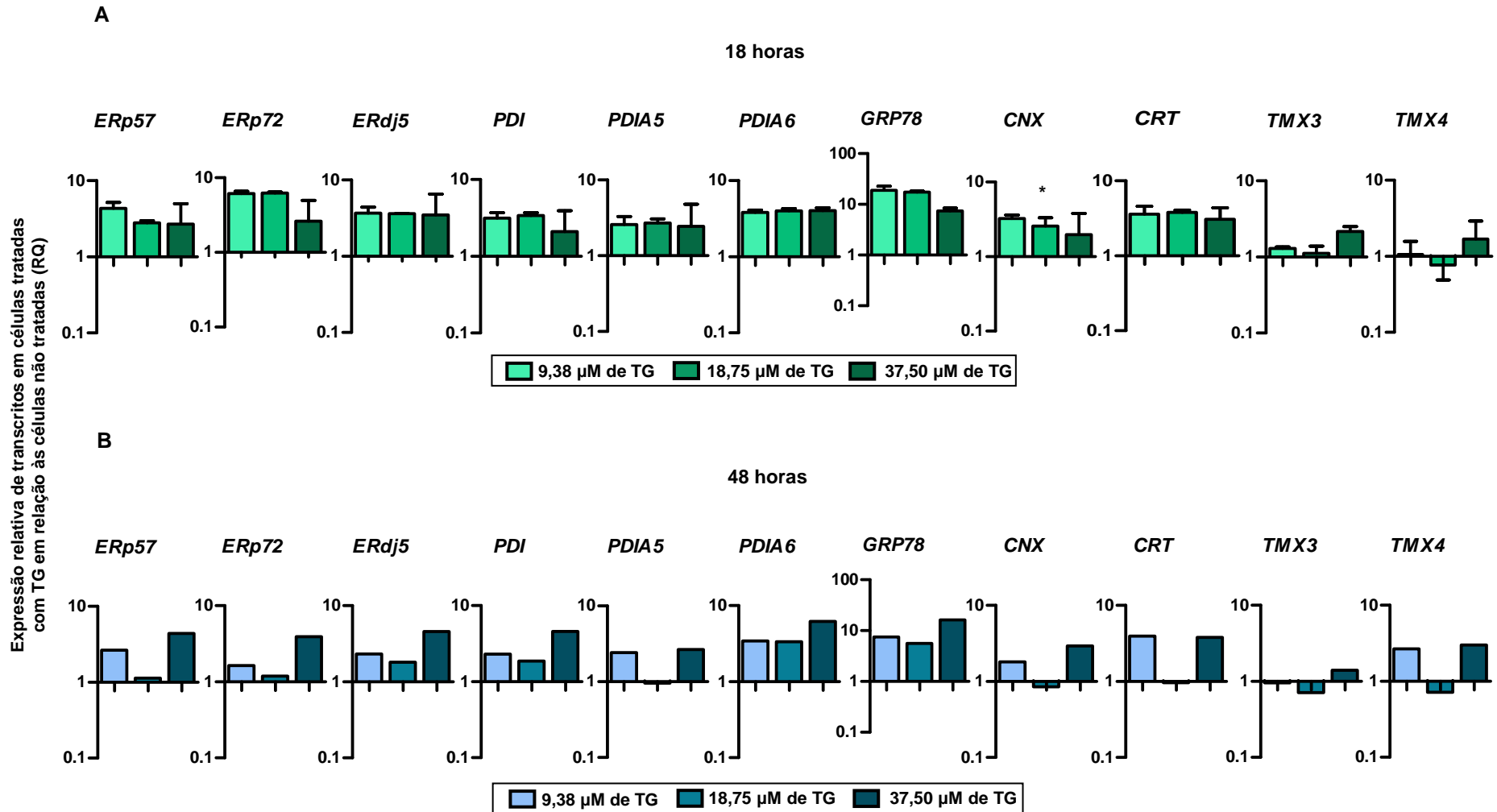


Figura 8 - Efeito da TG na quantidade relativa de expressão de transcritos da família PDI e de outras chaperonas residentes do RE nas células SK-MEL-30. As células foram tratadas por períodos de 18h (A) (n=2) e 48h (B) (n=1). Valores acima ou abaixo de 1 correspondem, a aumento ou diminuição da expressão nas células tratadas relativamente às células não tratadas, respectivamente. Valores estatisticamente significativos: * significa que o valor $p < 0,05$; ** que o $p < 0,01$ e *** que o $p < 0,0001$.

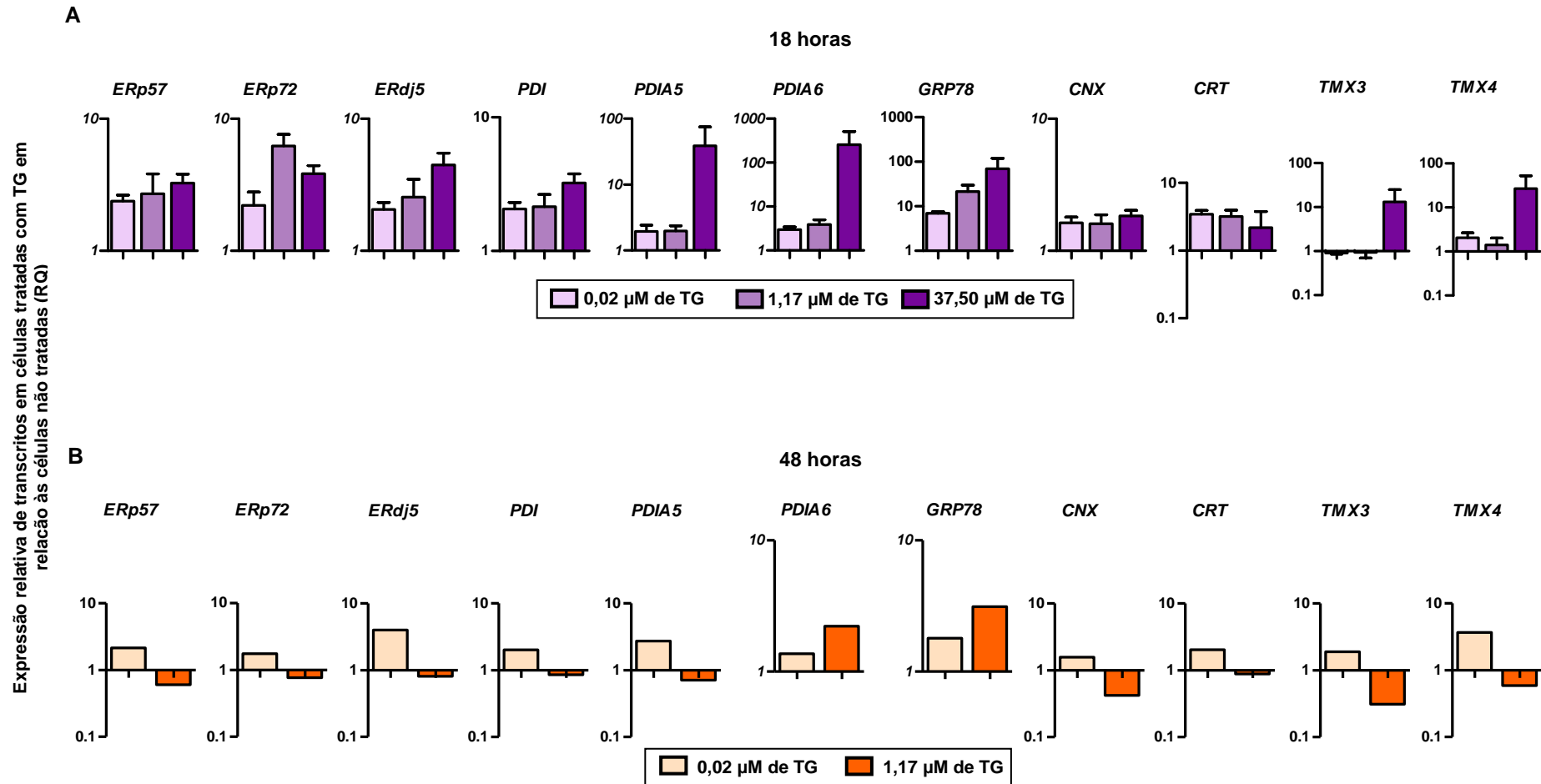


Figura 9 - Efeito da TG na quantidade relativa de expressão de transcritos da família PDI e de outras chaperonas do RE nas células MNT-1. As células foram tratadas durante períodos de 18h (A) (n=2) e 48h (B) (n=1). Valores acima ou abaixo de 1 correspondem a aumento ou diminuição da expressão nas células tratadas relativamente às células não tratadas, respectivamente. Valores estatisticamente significativos: * significa que o valor $p < 0,05$; ** que o $p < 0,01$ e *** que o $p < 0,0001$.

Nas células MNT-1 tratadas com 0,02 μM de TG durante 48h (Figura 9B), todos os genes apresentam um aumento (RQ > 1) da quantidade relativa de expressão relativamente às células não tratadas. Nas células MNT-1 tratadas com 1,17 μM de TG durante 48h, todos os genes apresentam uma diminuição (RQ < 1) da quantidade relativa de expressão, excepto para *PDIA6* e *GRP78*, que apresentam um aumento da quantidade relativa de expressão (RQ > 1). O gene *ERdj5* apresenta o valor de RQ mais elevado (RQ = 4), ao contrário do *TMX3* que apresentam o menor valor de RQ observado (RQ = 2).

3.2.2 Análise do efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular das PDIs por citometria de fluxo

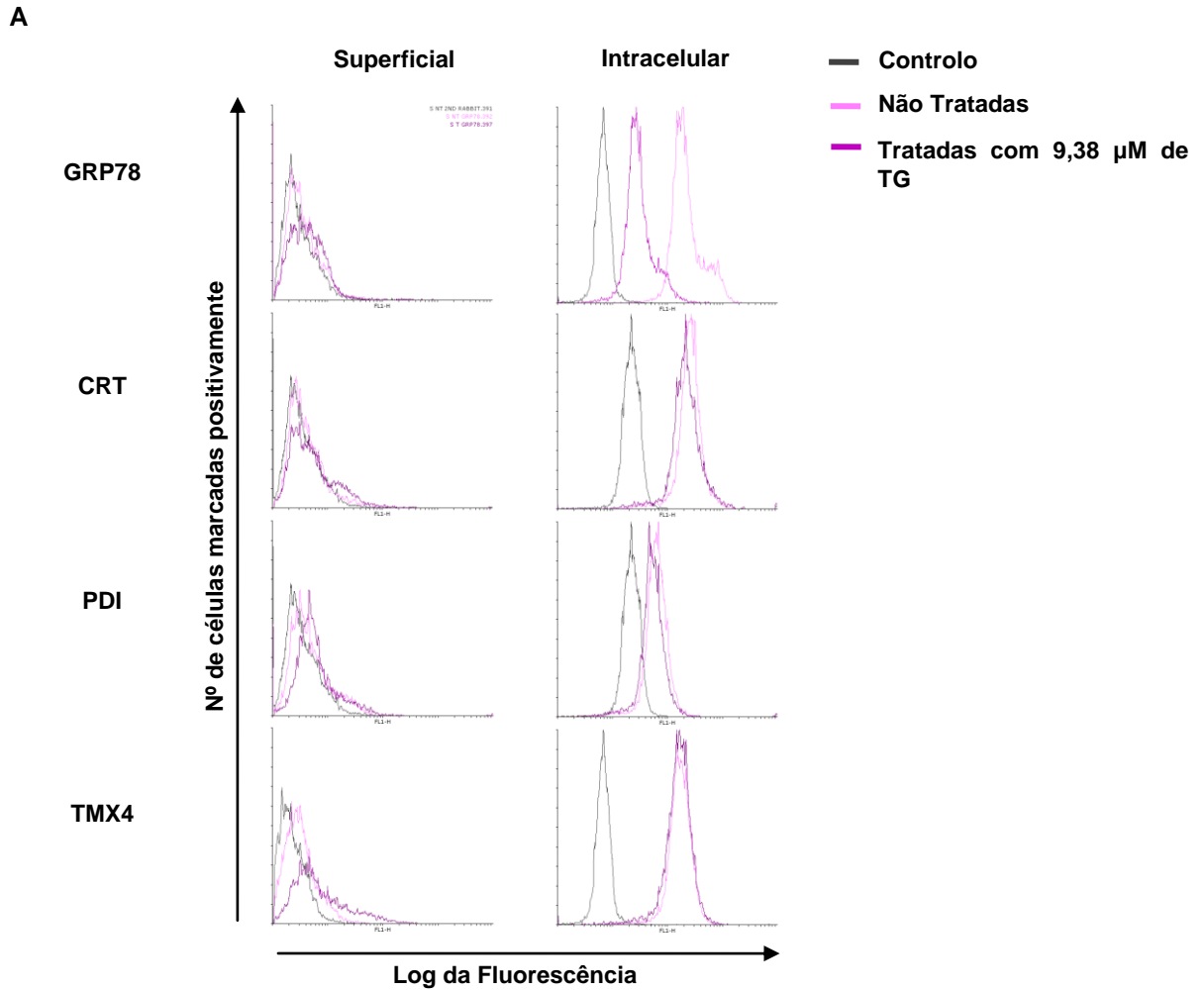
Depois de conhecer os membros da família PDI e outras chaperonas do RE expressas fenotipicamente nas linhas de melanoma por citometria de fluxo e de avaliar o efeito da TG na sua expressão genética, procedeu-se à análise do efeito da TG na expressão fenotípica destas proteínas por citometria de fluxo. Para o efeito, efectuaram-se marcações intracelulares e superficiais com os anticorpos correspondentes às PDIs e outras chaperonas do RE com níveis de expressão genética mais elevados e mais relevantes nos processos de resposta ao stress de RE – GRP78, PDI, CRT e TMX4 – nas células SK-MEL-30 e MNT-1, após tratamento de 48h com TG. O protocolo de marcação intracelular permite a fixação e permeabilização das células necessárias para permitir a marcação dos componentes intracelulares, mas não exclui a marcação superficial, pelo que os resultados da marcação intracelular são um somatório da marcação intracelular e da superficial, enquanto os resultados da marcação superficial dizem respeito apenas à marcação dos componentes da superfície celular. Os resultados dos ensaios de expressão genética (Figuras 3 e 4) mostraram que estas linhas celulares expressam mRNAs da família PDI e de outras chaperonas do RE ao fim de 18h de tratamento com TG. No entanto, as marcações celulares foram realizadas após 48h de tratamento, tempo suficiente para ocorrer a tradução. As células foram tratadas com concentrações pré-apoptóticas de TG (9,38 μM para as SK-MEL-30 e 0,02 μM para as MNT-1) por um período de 48h. Os dados recolhidos foram analisados através da representação da intensidade de fluorescência relativa emitida pelos anticorpos nas células tratadas e não tratadas contra o número de eventos em histogramas e em termos de MFI (Figuras 10 e 11).

De acordo com os resultados obtidos por citometria de fluxo, a TG induz uma diminuição da expressão intracelular de GRP78 em ambas as linhas (Figuras 10 e 11). A expressão intracelular de CRT, PDI e TMX4 também diminui nas células SK-MEL-30 tratadas (Figura 10). Nas células MNT-1 (Figura 11), a TG induz um aumento da expressão

intracelular da CRT. Para além de não ser detectada expressão intracelular da PDI nas células não tratadas, não há alteração na expressão fenotípica intracelular da PDI nas células tratadas com TG.

A marcação superficial não é muito expressiva (Figura 10A) para as proteínas GRP78, CRT e TMX4, nas células SK-MEL-30, apresentando valores de MFI (Figura 10B) que variam entre 1,2 e 5,4, e é negativa para a PDI. Ainda assim, verificou-se um ligeiro aumento da expressão superficial de GRP78 e TMX4 e uma diminuição da expressão de CRT nas células tratadas marcadas superficialmente. Os valores de MFI observados para as células SK-MEL-30 (Figuras 11B) são coerentes com os valores de MFI registados na Tabela 8 para as células SK-MEL-30 (cultivadas em meio de cultura sem solvente e sem TG), excepto para a PDI nas células marcadas superficialmente.

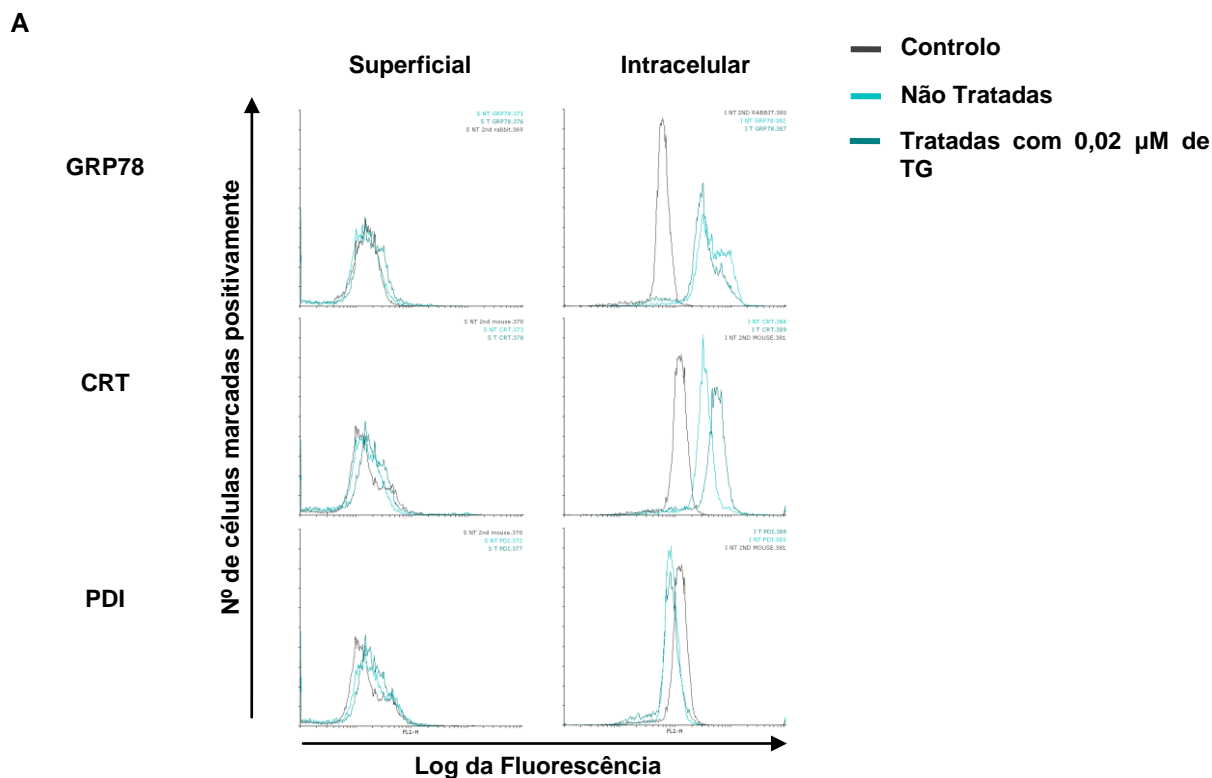
Nas células MNT-1, a marcação superficial com os anticorpos anti-GRP78, -CRT e -PDI também não é expressiva (Figura 11A), originando valores de MFI entre 0,5 e 2,2 (Figura 11B). O valor de MFI observados para a marcação intracelular das células MNT-1 não tratadas com anticorpo anti-GRP78 (Figura 11B) coincide com as diferenças nos valores de MFI apresentadas na Tabela 8, enquanto o valor de MFI para a CRT (de 271,1) não corresponde ao valor de MFI (2637) observado na Tabela 8.



B

Proteína	MFI			
	Superficial		Intracelular	
	NT	T	NT	T
GRP78	1,1 ± 0,2	2,3 ± 1,7	170,0 ± 147,0	36,6 ± 10,0
CRT	1,5	0	266,0	231,0
PDI	0	0	46,6	39,2
TMX4	1,2	5,4	180,3	175,0

Figura 10 - Efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular de algumas PDIs e chaperonas residentes do RE nas células SK-MEL-30. (A) Histogramas que representam a expressão das proteínas GRP78, CRT, PDI e TMX4 avaliada por citometria de fluxo, nas células não tratadas (NT), cultivadas apenas em meio de cultura contendo solvente, e tratadas (T) com 9,38 µM de TG. As células foram marcadas com os anticorpos anti-GRP78 (n=2), -CRT, -PDI e -TMX4 (n=1) de acordo com o procedimento descrito na secção 2.8.2. Como controlo foram usados os valores de intensidade obtidos após marcação das células apenas com o anticorpo secundário, os quais foram subtraídos às intensidades obtidas com a dupla marcação. (B) Valores de MFI resultantes das marcações.



B

Proteína	MFI			
	Superficial		Intracelular	
	NT	T	NT	T
GRP78	0,5	0	496,4	357,6
CRT	0	2,2	271,4	401,5
PDI	0,6	2,1	0	0

Figura 11 - Efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular de algumas PDIs e chaperonas residentes do RE nas células MNT-1. (A) Histogramas que representam a expressão das proteínas GRP78, CRT e PDI avaliada por citometria de fluxo, nas células não tratadas (NT) e tratadas (T) com 9, 38 μM de TG. As células foram marcadas com os anticorpos anti-GRP78, -CRT e -PDI ($n=1$) de acordo com o procedimento descrito na secção 2.8.2. Como controlo foram usados os valores de intensidade obtidos após marcação das células apenas com o anticorpo secundário, os quais foram subtraídos às intensidades obtidas com a dupla marcação. (B) Valores de MFI resultantes das marcações.

4. Discussão

O melanoma maligno é a forma mais agressiva de cancro da pele, com uma incidência que tem vindo a aumentar nas últimas décadas. A resistência do melanoma metastático à quimioterapia tradicional e aos novos agentes anticancerígenos deve-se principalmente à resistência das células de melanoma à apoptose induzida pelos fármacos (Gartel, 2012). A elevada mortalidade e resistência à terapia são, portanto, o grande desafio para a investigação de novos alvos terapêuticos para o melanoma, que se focam na indução da apoptose e na supressão das vias de sobrevivência das células tumorais (Eberle et al., 2007).

As células tumorais aumentam a produção de proteínas de sobrevivência que protegem as células da morte através da inibição da apoptose, em resposta à quimioterapia (Giménez-Bonafé et al., 2009). A UPR é um mecanismo conservado evolutivamente que permite às células adaptarem-se ao stress de RE, regulando a sobrevivência e a morte da célula (Ni, Zhou, Wey, Baumeister, & Lee, 2009). A UPR é orquestrada pela activação transcricional de múltiplos genes, incluindo os genes que codificam as proteínas residentes do RE envolvidas no processamento de proteínas no RE, pela diminuição da iniciação da tradução e pela tradução selectiva de mRNAs específicos, regulados pela chaperona GRP78/ BiP (Hersey & Zhang, 2009). Desta forma, o conhecimento das vias de sinalização da apoptose nas células de melanoma é importante para o desenvolvimento de novas terapias mais eficazes, direccionadas para a activação da apoptose, através da indução da expressão ou actividade de proteínas pró-apoptóticas ou da inibição da expressão ou actividade das anti-apoptóticas, combinada com a quimioterapia tradicional. Neste sentido, analisou-se o efeito do agente anticancerígeno TG na expressão e localização das proteínas do RE, nomeadamente os membros da família PDI e outras chaperonas residentes do RE, cuja função é antagonizar o stress de RE e impedir a activação da apoptose induzidos pela TG. O conhecimento fundamental dos fenómenos associados à reparação de stress de RE induzidos por esta droga (TG) poderá revelar-se de grande utilidade, porque o controlo deste fenómeno poderá estar na origem da elaboração de terapias mais eficazes contra o melanoma.

4.1 Caracterização das linhas celulares de melanoma

4.1.1 Susceptibilidade das linhas celulares de melanoma à TG

O esgotamento de cálcio no RE prejudica o funcionamento das oxirredutases e chaperonas do RE que assistem no processo de aquisição da estrutura tridimensional das

proteínas recém-sintetizadas, uma vez que para além de dependerem do cálcio para o seu funcionamento também são responsáveis pela manutenção da homeostasia do cálcio no RE, essencial para o funcionamento das chaperonas. A interferência da depleção de cálcio nestas enzimas leva à acumulação de proteínas imaturas ou processadas incorrectamente no lúmen do RE, resultando na indução de stress de RE e na activação da UPR (Simmen, Lynes, Gesson, & Thomas, 2010), cujo objectivo inicial é reestabelecer a homeostase do RE mediante processos que aumentam a capacidade de processamento pós-traducional do RE através da activação transcricional de múltiplos genes que codificam um conjunto de chaperonas e outras proteínas residentes do RE, da redução geral da iniciação da tradução e da promoção da degradação das proteínas acumuladas. No entanto, se estas respostas não conseguirem aliviar o stress de RE, a activação prolongada da UPR pode levar à apoptose (Hersey & Zhang, 2009; Shi, Porter, Parameswaran, Bae, & Pestka, 2009). O cálcio é acumulado no RE através do transporte pelas bombas de cálcio ATPases do RS/ER SERCA. A TG, que provoca o esgotamento do cálcio no RE através da inibição das SERCA (Vander Griend et al., 2009), foi usada neste trabalho para induzir o stress de RE nas linhas celulares de melanoma, tendo-se verificado que estas apresentam diferentes susceptibilidades ao stress de RE induzido pela TG. A linha celular MNT-1 é mais susceptível ao efeito da TG do que as linhas SK-MEL-30 e M8, uma vez que para induzir o stress de RE ligeiro nas células MNT-1 foi necessária uma concentração 520 vezes menor do que a concentração que induziu stress de RE ligeiro nas células SK-MEL-30 e M8. Para além disso, as linhas SK-MEL-30 e M8 apresentaram susceptibilidades à TG idênticas, sugerindo a existência de similaridades nas respostas ao stress de RE induzido pela TG entre as duas linhas. O lúmen do RE contém membros da família PDI e chaperonas como a GRP78, a CNX e a CRT, cuja expressão é aumentada durante a UPR a fim de aumentar a capacidade de processamento do RE e ajudar a ultrapassar o stress de RE (Ozcan & Tabas, 2012). De acordo com os resultados das marcações superficial e intracelular com anticorpos anti-membros da família PDI e anti-chaperonas do RE das células cultivadas apenas em meio de cultura, realizadas para identificar as PDIs expressas nas linhas celulares de melanoma, assim como a sua localização celular, as células MNT-1 apresentam maiores níveis de expressão dos membros da família PDI e chaperonas do RE (com valores de MFI entre 40 e 2637) do que as linhas celulares SK-MEL-30 (com valores de MFI entre 1 e 766) e M8 (com valores de MFI entre 6 e 482), sugerindo que as células MNT-1 seriam mais resistentes à apoptose induzida pela TG do que as restantes, por possuírem maior quantidade de proteínas do RE envolvidas no processo de aquisição da estrutura tridimensional das proteínas que lhes conferiria maior capacidade para processar as proteínas acumuladas no lúmen do RE e resolver o stress de RE induzidos pela TG.

Contudo, os ensaios de viabilidade celular mostraram que as células MNT-1 têm menor resistência à TG, contrariando à partida a hipótese de que uma maior expressão de PDIs e das chaperonas do RE antes da aplicação do tratamento com TG tornaria as células MNT-1 menos sensíveis ao stress de RE induzido pela TG. A nível transcricional, contudo, os níveis de expressão de transcritos dos genes das PDIs e das chaperonas do RE em relação à expressão do gene da β -actina nas amostras de referência mostram que as células MNT-1 expressam menos PDIs e menos chaperonas do RE do que a linha SK-MEL-30. Isto leva a crer que os transcritos expressos mais acentuadamente nas células SK-MEL-30 não são traduzidos, enquanto os transcritos expressos nas células MNT-1 o são, talvez devido a uma maior necessidade de manter uma elevada taxa de processamento de proteínas no RE imposta pela melanogénese - que inclui a biogénese de melanossomas, a síntese de melanina e a homeostasia relacionada com a citotoxicidade melanogénica endógena (EMC – endogenous melanogenic cytotoxicity) – nas células MNT-1, visto que estas células são melanóticas, possuindo melanossomas altamente pigmentados (de estágio III e IV) (K. G. Chen, Valencia, Gillet, Hearing, & Gottesman, 2009). A activação da UPR induz a transcrição de genes que codificam para proteínas envolvidas na recuperação da homeostasia do RE, nomeadamente membros da família PDI e outras chaperonas, tais como a GRP78, a CNX e a CRT, pelo que é importante investigar o efeito do tratamento com TG na expressão destas proteínas para perceber se as diferenças de sensibilidade à TG entre as linhas celulares estão relacionadas com diferenças na sobreexpressão ou subexpressão destas proteínas. A eficácia da quimioterapia de cancro é prejudicada pela resistência tumoral intrínseca ou adquirida aos fármacos, designada por resistência a múltiplos fármacos (MDR – *Multi-Drug Resistance*), que pode resultar de diversos mecanismos, como, por exemplo, a incapacidade das células para sofrerem apoptose e a acumulação reduzida de fármaco nas células tumorais. O mecanismo mais comum de MDR é o aumento do efluxo de uma classe de fármacos citotóxicos hidrofóbicos mediado por um dos transportadores de uma família de transportadores dependentes de energia que possuem domínios de ligação ao ATP altamente conservados, conhecidos por transportadores com cassete de ligação ao ATP (ABC – *ATP-binding cassette*) (La Porta, 2009).

A P-glicoproteína (P-gp) ou ABCB1 é um transportador ABC da membrana plasmática responsável pelo efluxo de diversas substâncias das células animais, incluindo a TG, pelo que a TG pode ser eliminada do citoplasma nas células que expressam P-gp. Nas células que expressam P-gp, a TG não induz o efeito de mobilização intracelular do cálcio nem a depleção do cálcio do RS/ RE que se observa nas células que não expressam P-gp. Desta forma, as células com MDR mediada pela P-gp são resistentes à TG (Sulová et al., Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais

2009). Assim, a resistência à TG apresentada pelas células SK-MEL-30 e M8 em relação às MNT-1 pode estar relacionada com a expressão P-gp.

Sabe-se, no entanto, que os melanomas são intrinsecamente resistentes aos tratamentos de quimioterapia, por estarem munidos de mecanismos adicionais de resistência relacionados com a presença dos melanossomas, que estão implicados na sequestração e exportação dos fármacos, podendo ser esta, em parte, a explicação para as diferentes sensibilidades à TG apresentadas pelas linhas celulares analisadas neste trabalho. A resistência MDR intrínseca e adquirida das células de melanoma aos fármacos anticancerígenos deve-se, pelo menos em parte, ao sistema de transportadores ABC, que também desempenha um papel crítico na redução da citotoxicidade da melanogénese nos melanócitos (EMC), através da sequestração dos intermediários e metabolitos tóxicos da melanina em organelos subcelulares, tais como pequenas vesículas, endossomas, lisossomas e melanossomas, que são exportados das células via diferentes mecanismos, incluindo exocitose e exportação de melanossomas. As células de melanoma expressam um grupo de transportadores ABC da membrana dos melanossomas, que inclui ABCA9, P-gp ou ABCB1, ABCB5, ABCB8, ABCC1 ou proteína MDR 1 (MDR1), ABCC2 e ABCD1 que podem estar associados à resistência MDR e/ ou dos melanócitos à EMC (K. G. Chen, Valencia, et al., 2009; K. G. Chen et al., 2006). A sensibilidade dos melanomas aos fármacos é regulada pela dinâmica da melanogénese, na medida em que existem diferenças entre melanossomas em diferentes estádios (I-IV) em termos da sua resposta à EMC e aos fármacos citotóxicos. As alterações da EMC e da resistência ou sensibilidade aos fármacos desenrolam-se em três fases. Na primeira fase, caracterizada pelo desenvolvimento de pré-melanossomas (melanossomas de estádios I e II) e pela iniciação da pigmentação na matriz melanossómica (melanossomas de estádios II-III), a função melanossómica é activada para sequestrar os químicos para a síntese de melanina, bem como para esvaziar o citoplasma dos intermediários tóxicos da melanina. Estes melanossomas de estádios mais recentes têm um papel protector nos melanócitos normais, mas nos melanomas tornam também as células resistentes aos fármacos, porque para além de reduzirem a EMC também capturam o fármaco acumulado no citoplasma através do sistema de transportadores ABC. Na fase intermédia, caracterizada por melanossomas em transição entre os estádios II e III (estádio II-III), melanossomas de estágio III e melanossomas em transição entre os estádios III e IV (estádio III-IV), a maioria das células de melanoma são resistentes aos fármacos, porque atingem a homeostasia em termos de EMC e de sensibilidade aos fármacos. Durante a última fase, na qual os melanossomas estão nos estádios III-IV, IV e IV*, o processo de maturação dos melanossomas leva à EMC máxima. Os melanossomas de estágio IV* são melanossomas de estágio IV que possuem

membranas danificadas e libertam melanina para o citoplasma, um indicador de EMC, provocando efeitos citotóxicos deletérios para as células de melanoma que contribuem para aumentar a sensibilidade aos fármacos. Uma maneira de superar a EMC é a exportação dos melanossomas. Nos melanócitos normais, a exportação dos melanossomas para os queratinócitos ocorre naturalmente, mas nas células de melanoma este fenómeno pode ser deficiente. Nesta última fase, as células de melanoma são mais sensíveis aos fármacos anticancerígenos, porque há uma diminuição da sequestração dos fármacos e a ECM é máxima.

As células MNT-1, melanóticas, são ricas em melanossomas altamente pigmentados de estádios III, IV e IV* que aumentam a sensibilidade aos fármacos através dos efeitos citotóxicos da EMC, ao contrário dos melanossomas de estádios II e III, que diminuem a sensibilidade aos agentes quimioterapêuticos, através da redução da EMC via exportação dos melanossomas (K. G. Chen, Leapman, et al., 2009; K. G. Chen, Valencia, et al., 2009). As diferenças nas susceptibilidades à TG verificadas entre as linhas celulares de melanoma analisadas podem estar associadas à quantidade e ao estágio de desenvolvimento dos melanossomas. A observação das culturas celulares por microscopia óptica e dos sedimentos celulares obtidos através da tripsinização das células permitiu verificar que as células SK-MEL-30 e M8 são pouco pigmentadas, em comparação com as células MNT-1 que são altamente pigmentadas, sugerindo que as primeiras são amelanóticas, contendo melanossomas de estágios I e II, sem produção de melanina. Desta forma, a menor sensibilidade à TG verificada nas células SK-MEL-30 e M8 pode dever-se, em parte, à presença predominante de melanossomas de estágio I e II, sem melanina, que promovem a desintoxicação da EMC via exportação de melanossomas e inibem a acumulação dos fármacos citotóxicos no citoplasma, diminuindo deste modo a sensibilidade à TG.

4.1.2 Expressão e localização das PDIs e outras chaperonas residentes do RE

Segundo os resultados obtidos para a análise da expressão superficial e intracelular das PDIs e outras chaperonas do RE por citometria de fluxo, todos os membros da família PDI (excepto ERp57 e PDIA5, na linha celular SK-MEL-30) e as chaperonas GRP78, CNX e CRT são expressas nas linhas celulares de melanoma, a nível intracelular. Algumas destas proteínas residentes do RE também são expressas na superfície celular das linhas SK-MEL-39, M8 e MNT-1. Nalguns casos, nas células SK-MEL-30, a expressão é maior na superfície celular do que internamente, nomeadamente no caso da ERp57, PDIA5 (que não são expressas intracelularmente) e ERp72. Para além disso, as células MNT-1 apresentam um

nível mais elevado de expressão de membros da família PDI e de chaperonas do RE do que as outras linhas de melanoma. As chaperonas residentes do RE, bem como os membros da família PDI, estão presentes sobretudo, mas não exclusivamente, no RE. Pelo menos algumas destas proteínas foram detectadas e desempenham funções noutras localizações celulares, importantes nos processos fisiológicos e patológicos, tais como a resposta imunitária e o cancro. A ERp57, por exemplo, tem funções bem conhecidas no RE, no que diz respeito ao processo de aquisição da estrutura tridimensional e controlo de qualidade das glicoproteínas e à participação na montagem do MHC classe 1. No entanto, a ERp57 está presente em muitas outras localizações celulares, estando envolvida na transdução de sinal da superfície celular, em processos regulatórios no núcleo e nos complexos multiméricos envolvidos na reparação do DNA (Turano et al., 2011). A CRT, quando localizada no RE, tem funções importantes na aquisição da conformação correcta das proteínas e glicoproteínas, bem como no controlo dos níveis homeostáticos de cálcio no RE e no citosol. Contudo, estudos recentes mostram que a CRT está também presente noutras localizações intracelulares, na superfície celular e na matriz extracelular. Na superfície celular, a CRT é necessária para o processamento e apresentação de antigénios para a resposta imunitária adaptativa, na captação das células tumorais que expressam CRT pelas células dendríticas, na fagocitose de células apoptóticas, proliferação celular, adesão celular e migração (Gold et al., 2010). Inclusivamente, estudos recentes mostram que a expressão da CRT na superfície celular pode ser induzida em diferentes tipos de células por diferentes tratamentos celulares, incluindo o tratamento com TG, promovendo a fagocitose das células tumorais apoptóticas. O tratamento com TG induz também a secreção e expressão de GRP78 na superfície celular e a secreção de PDI (Peters & Raghavan, 2011). A CNX, para além das suas funções de chaperona na assistência do processamento de proteínas no RE, é também expressa na superfície celular através da interacção com glicoproteínas, sendo dinamicamente destruída por endocitose (Okazaki, Ohno, Takase, Ochiai, & Saito, 2000). A GRP78/ BiP, apesar de ser uma chaperona típica do RE e o principal regulador do stress de RE, devido às suas propriedades antiapoptóticas bem como à sua capacidade de controlo da activação da UPR, pode ser expressa na superfície celular, em particular nas células tumorais, interagindo com proteínas da superfície celular específicas e actuando como um receptor nas vias de sinalização. A expressão de GRP78/ BiP na superfície celular é induzida pelo stress de RE devido à hipoxia e privação de nutrientes, causadas pelo microambiente tumoral. Inclusivamente, a indução de GRP78 pelo stress do RE nas células tumorais favorece a sobrevivência celular e contribui significativamente para a progressão tumoral e resistência aos fármacos nas células tumorais. A sua expressão também foi detectada no núcleo e nas mitocôndrias (Zhang, Liu, Ni, Gill, & Lee, 2010). A PDI está

principalmente localizada no RE e actua como uma chaperona. Contudo, também foi detectada no invólucro nuclear, citosol e outras endomembranas tais como o Golgi, vesículas secretórias e membrana plasmática. Na superfície celular, a PDI tem uma actividade redutora para os tiois exteriores (Turano et al., 2002). A PDIA6, proteína típica do RE, está também presente no citosol e na superfície celular (Goplen et al., 2006). A proteína do RE PDIA5, por sua vez, também é expressa na superfície celular. Relativamente às proteínas transmembranares do RE TMX1, 3 e 4 não existem evidências de que sejam expressos na superfície celular.

Tal como foi referido anteriormente, a ERp57 tem várias funções e múltiplas localizações em vários tipos de células, mas é classicamente descrita como uma proteína residente do RE, pelo que era esperado detectar a expressão desta proteína a nível intracelular. O mesmo era esperado para a PDIA5, visto que é uma proteína residente do RE. Nas células M8 e MNT-1, a ERp57 e a PDIA5 são expressas fenotipicamente a nível intracelular, no entanto, nas células SK-MEL-30, estas proteínas não foram detectadas através da marcação intracelular com os anticorpos anti-ERp57 e -PDIA5 avaliada por citometria de fluxo. Porém, a marcação superficial das células SK-MEL-30 com os anticorpos anti-ERp57 e -PDIA5 avaliada por citometria de fluxo foi positiva. As marcações intracelulares e superficiais com os anticorpos anti-ERp57, - ERp72 e PDIA6 foram efectuadas em paralelo. Pode ter ocorrido uma falha na permeabilização das células, que impedisse a marcação intracelular. De qualquer modo, tal como foi referido anteriormente, o protocolo para a marcação intracelular permite também a marcação superficial das células com os anticorpos em estudo, correspondendo a um somatório das fracções de marcação intracelular e superficial, pelo que deveria existir alguma marcação positiva, correspondente à fracção de marcação superficial, nas células marcadas de acordo com o protocolo da marcação intracelular. Tal não acontece, provavelmente devido a diferenças entre os protocolos de marcação intracelular e superficial, em termos das condições de tempo e temperatura de incubação das células com os anticorpos, resultando na menor especificidade da marcação superficial. Na marcação intracelular, as células foram incubadas com os anticorpos a 4°C, durante 30 minutos, na presença da solução de permeabilização, para manter as células permeabilizadas, enquanto na marcação superficial, as células foram incubadas com os anticorpos à temperatura ambiente, durante 15 minutos. No caso da marcação superficial, a menor duração da incubação das células com o anticorpo, à temperatura ambiente, pode ter originado marcação inespecífica nas células marcadas superficialmente. Contudo, esta marcação inespecífica verificou-se apenas para estes anticorpos. Os níveis de expressão de transcritos dos genes ERp57 e PDIA5 nas células SK-MEL-30 cultivadas em meio de cultura contendo apenas o solvente,

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais

durante 48h, confirmam que estes genes são expressos nestas células, com valores de 2197 ± 1013 (às 48h) moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de mRNA de β -actina, para ERp57, e de 261 ± 142 (às 48h) para PDIA5, tendo o ERp57 uma expressão mais elevada do que o PDIA5, relativamente à expressão do gene de controlo endógeno β -actina. Relativamente à ERp72, embora seja expressa a nível intracelular e à superfície das células SK-MEL-30 e M8, a sua expressão é maior na superfície celular das SK-MEL-30 do que internamente. Neste caso, pode ter ocorrido marcação inespecífica, uma vez que a marcação superficial é maior do que a intracelular.

Os perfis de susceptibilidade à TG das células de melanoma determinados anteriormente, que mostraram que as células MNT-1 são mais sensíveis à TG do que as células M8 e SK-MEL-30, sugerem que as diferenças de susceptibilidade podem estar relacionadas com os perfis de expressão e localização das PDIs nestas linhas celulares de melanoma. Tal como foi referido anteriormente, as células MNT-1 são melanóticas e ricas em melanossomas de estágio III, IV e IV*, correspondentes às fases de produção e deposição da melanina na matriz fibrillar melanossómica. A síntese e distribuição da melanina na epiderme envolvem vários passos, nomeadamente a transcrição de proteínas melanogénicas, a biogénese dos melanossomas, a distribuição das proteínas melanogénicas pelos melanossomas, o transporte dos melanossomas para as extremidades das dendrites dos melanócitos e finalmente a transferência para os queratinócitos (Park, Kosmadaki, Yaar, & Gilchrist, 2009). A maioria das proteínas melanogénicas são glicoproteínas enzimáticas e estruturais, tais como a tirosinase (TYR – *Tyrosinase*), as proteínas relacionadas com a tirosinase TYRP1 (*Tyrosine-related protein 1*) e TYRP2 (*Tyrosine-related protein 2*) e a cinase de proteínas C-beta (PKC- β – *Protein Kinase C-beta*), cujo processamento pós-traducional envolve a interacção directa com o complexo CNX/CLR (N-glicosilação) por um período definido de tempo durante a passagem através do RE (Cheung, Guo, Ling, Che, & Liu, 2012; Jimbow, Chen, Park, & Thomas, 2001; Jimbow et al., 2000). Deste modo, a síntese elevada de melanina nas células MNT-1 requer um aumento do processamento pós-tradução no RE e, conseqüentemente, da expressão das proteínas do RE envolvidas nesse processo, pelo que os níveis elevados de expressão intracelular nesta linha celular, em comparação com as restantes, pode dever-se à síntese mais elevada de melanina.

4.2 Análise do efeito da TG na expressão dos membros da família PDI e outras chaperonas do RE

As linhas celulares de melanoma em estudo apresentam diferentes sensibilidades ao stress de RE induzido pelo tratamento com TG. As células MNT-1 são mais sensíveis do que as células SK-MEL-30 e M8, mais resistentes. Uma vez que as linhas celulares SK-MEL-30 e M8 apresentam sensibilidades idênticas ao stress de RE induzido pela TG, selecionou-se apenas uma destas linhas - SK-MEL-30 – para proceder à análise do efeito da TG na expressão genética por RT-qPCR e na expressão fenotípica e localização celular por citometria de fluxo. Uma das respostas ao stress de RE induzido pela TG é a indução da expressão de genes envolvidos no processamento pós-traducional de proteínas no RE que irão ajudar a aliviar o stress de RE imposto pela TG. Visto que as linhas celulares de melanoma investigadas apresentaram susceptibilidades diferentes ao stress de RE induzido pela TG, considerou-se importante verificar se estas diferenças estão relacionadas com diferenças na expressão destas proteínas entre as linhas celulares.

4.2.1 Análise do efeito da TG na expressão genética dos membros da família PDI e outras chaperonas do RE por RT-qPCR

As três concentrações de TG usadas na análise da expressão genética das proteínas do RE em estudo para cada linha celular foram determinadas com base nos *dot plots* resultantes da avaliação da apoptose por citometria de fluxo obtidos na secção 3.1.1. As concentrações foram escolhidas correlacionando o grau de stress de RE induzido com a percentagem de células viáveis originada. As concentrações de pré-apoptose 9,38 μM (SK-MEL-30) e 0,02 μM (MNT-1) de TG induziram um stress de RE ligeiro, uma vez que originaram ambas uma percentagem de células viáveis/ pré-apoptóticas superior a 90,00%. As concentrações 18,75 μM (SK-MEL-30) e 1,17 μM (MNT-1) de TG induziram um stress moderado de RE, originando uma percentagem de células viáveis/ pré-apoptóticas inferior a 90,00%. A concentração de 18,75 μM de TG originou 85,80% \pm 1,87 de células viáveis/ pré-apoptóticas, enquanto a concentração de 1,17 μM de TG deu origem a 19,38% \pm 3,90 de células viáveis/ pré-apoptóticas. A viabilidade celular das células MNT-1 diminui de forma bastante mais acentuada entre as concentrações 0,02 μM e 1,17 μM de TG. A partir de 1,17 μM de TG, a viabilidade celular diminui mais suavemente até atingir cerca de 10% (75,00 μM), fase correspondente a um estado de stress de RE mais grave. Dada esta diferença no traçado da curva em que se verifica que concentrações bastante superiores a 1,17 μM não aumentam drasticamente a morte celular, talvez devêssemos ter usado concentrações inferiores de TG para gerar uma situação de stress moderado, nas células MNT-1.

Os valores de RQ para as células MNT-1 tratadas com 37,50 μM de TG pelo período de 48h não foram incluídos nos gráficos (Figura 9B), porque os valores de C_t , incluindo o do controlo endógeno, obtidos para estas amostras foram iguais ou superiores a 30 e, nalguns casos, foram indeterminados. Os valores de C_t demasiado elevados ou indeterminados sugerem que as amostras de cDNA continham pouca quantidade inicial de cDNA para a amplificação, ou cDNA de fraca qualidade. Uma explicação possível para a ocorrência destes valores de C_t é a ausência de transcrição devido à morte celular resultante do tratamento prolongado com uma concentração elevada de TG. Como se verificou nos ensaios de viabilidade celular, o tratamento com uma concentração de TG de 37,50 μM durante 48h origina cerca de 22,93% \pm 8,31 de células viáveis/ pré-apoptóticas. No entanto, estas células que parecem viáveis/ pré-apoptóticas podem estar já bastante danificadas em consequência do tempo de exposição ao fármaco e terem a sua maquinaria celular debilitada, e consequentemente o processo de transcrição afectado.

De um modo geral, a expressão genética dos membros da família PDI e das chaperonas *GRP78*, *CNX* e *CRT* aumentou nas células tratadas com TG, em ambas as linhas celulares, excepto nalguns casos. Este resultado era espectável, uma vez que o stress de RE induzido pela depleção de cálcio induzida pela TG activa a via de sinalização UPR (Peters & Raghavan, 2011), que activa a transcrição de chaperonas do RE e membros da família PDI, melhorando assim a capacidade de processamento de proteínas do RE e aliviar a acumulação de proteínas no RE e, consequentemente, servir para resolver o stress celular (Ni et al., 2009), sobretudo de *GRP78*, o principal regulador da apoptose, protegendo a célula contra a apoptose induzida pelo stress de RE. A sobreexpressão de *GRP78* fornece sinais de sobrevivência para as células de cancro durante a oncogénese e confere resistência aos fármacos, para além de estar correlacionado com um grau patológico, taxa de recorrência mais elevados e pobre sobrevivência em pacientes com cancro da mama, do fígado, da próstata, do cólon e gástrico (Ozcan & Tabas, 2012; Rao et al., 2002; Shi et al., 2009). Em condições fisiológicas, a *GRP78* interage directamente com os domínios intraluminais dos três sensores de stress de RE, IRE1 α , ATF6 e PERK. Em condições de stress de RE, a *GRP78* liga-se ao domínio hidrofóbico das proteínas acumuladas no RE, de modo a permitir a sua estabilização e modificação pela maquinaria do RE, causando a libertação dos sensores de stress de RE, resultando na sua activação e na iniciação das três vias da UPR (Hersey & Zhang, 2009; Shi, Gerritsma, Bowes, Capretta, & Werstuck, 2007).

De um modo geral, a expressão dos membros da família PDI e das chaperonas do RE resultante do tratamento de 18h foi mais elevada nas células SK-MEL-30 do que nas células MNT-1, sobretudo a expressão do gene *GRP78*, o mais sobreexpresso, sugerindo

que a maior resistência das células SK-MEL-30 ao stress de RE induzido pela TG se deve à maior expressão destas proteínas do RE.

4.2.2 Análise do efeito da TG na expressão fenotípica e localização celular dos membros da família PDI e outras chaperonas do RE por citometria de fluxo

Após a análise do efeito da TG na expressão genética das proteínas do RE em estudo, efectuou-se a marcação intracelular e superficial das células SK-MEL-30 e MNT-1 tratadas durante 48h com as respectivas concentrações de pré-apoptose de TG com anticorpos anti-GRP78, -CRT, -PDI e -TMX4.

A TG induziu uma diminuição da expressão intracelular de GRP78 em ambas as linhas, apesar do RQ > 1 verificado na análise da expressão genética indicar um aumento da expressão das PDIs e das chaperonas do RE a nível transcricional. A expressão intracelular de CRT, PDI e TMX4 também diminuiu nas células SK-MEL-30 tratadas, apesar dos valores de RQ > 1 indicarem um aumento da transcrição dos genes correspondentes. Estes resultados sugerem que os transcritos não foram traduzidos ou exportados. A secreção de GRP78 para o espaço extracelular já foi verificada em tumores, estando ligada à resistência aos fármacos das células endoteliais (Ni et al., 2009). Inclusivamente a depleção de cálcio induzida pela TG induz a secreção e expressão na superfície celular da GRP78/ BiP (Peters & Raghavan, 2011). Deste modo, uma explicação possível para a diminuição da expressão fenotípica de GRP78 verificada nas células tratadas com TG durante 48h podia ser a da secreção desta proteína para o sobrenadante. Também está documentado que o tratamento com TG induz a expressão na superfície celular e a secreção da CRT (Peters & Raghavan, 2011). A diminuição da expressão fenotípica da CRT nas células SK-MEL-30 tratadas com TG durante 48h pode assim dever-se à indução da secreção de CRT pela TG. Não se sabe se, nas células MNT-1 tratadas com TG durante 48h, a diminuição da expressão fenotípica da CRT poderia também ocorrer se o tratamento fosse prolongado, ou se a marcação celular fosse avaliada passado mais tempo do que as 48h.

Nas células MNT-1, apesar de a nível transcricional se ter verificado um RQ > 1 às 48h, indicando um aumento da expressão da PDI induzido pela TG, não há alteração na expressão fenotípica intracelular da PDI nas células tratadas com TG. Para além disso, não foi detectada expressão intracelular da PDI nas células não tratadas, mas o nível de expressão de transcritos do gene PDI indica que este é expresso nas células não tratadas,

com um valor expressivo de 354 ± 64 moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de mRNA de β -actina.

Embora a marcação superficial das células SK-MEL-30 tratadas e não tratadas (cultivadas em meio de cultura contendo apenas DMSO) não seja muito expressiva para as proteínas GRP78, CRT e TMX4, sendo negativa para a PDI, verifica-se um ligeiro aumento da expressão superficial de GRP78 e TMX4 e uma diminuição da expressão de CRT nas células tratadas. Os valores de MFI observados para as células SK-MEL-30 são coerentes com os valores de MFI para as células SK-MEL-30 (cultivadas em meio de cultura sem solvente e sem TG), excepto para a PDI nas células não tratadas marcadas superficialmente.

Nas células MNT-1, a marcação superficial das células tratadas e não tratadas com os anticorpos anti-GRP78, -CRT e -PDI também não é expressiva. O valor de MFI observado para a marcação intracelular das células MNT-1 não tratadas com anticorpo anti-GRP78 coincide com valores de MFI apresentados nas células cultivadas em meio de cultura sem solvente e sem TG (Tabela 8), enquanto o valor de MFI para a CRT (de 271,1) resultante da marcação intracelular nas células não tratadas não corresponde à diferença de MFI ($500 < \text{MFI} \leq 3000$) observada na Tabela 8.

Os valores de MFI observados para a marcação intracelular das células SK-MEL-30 cultivadas em meio de cultura contendo apenas o solvente (não tratadas) com os anticorpos anti-GRP78, -PDI e -TMX4 coincidem com os valores de MFI para a marcação intracelular com os mesmos anticorpos para as células SK-MEL-30 cultivadas em meio de cultura sem solvente e sem TG apresentados na Tabela 8. Os valores de MFI para a marcação intracelular das células SK-MEL-30 cultivadas em meio de cultura contendo apenas o solvente com anticorpo anti-CRT não coincidem com as diferenças da Tabela 8 para as mesmas células, cultivadas em meio de cultura sem solvente e sem TG, marcadas intracelularmente com o mesmo anticorpo. Os níveis de expressão de transcritos do gene *CRT* em relação à expressão do gene de controlo endógeno *β -actina* nas células da amostra de referência (cultivadas em meio de cultura contendo apenas o solvente) às 48h para a concentração de pré-apoptose são bastante elevados (17943 ± 12039 moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de mRNA de *β -actina*) corroborando o valor mais elevado de MFI.

Estes resultados sugerem que existem factores envolvidos na regulação da expressão das PDIs e chaperonas do RE, que não se limitam à transcrição e que precisam de ser investigados.

4.3 Perspectivas futuras

O presente trabalho permitiu esclarecer alguns aspectos sobre a susceptibilidade das linhas celulares de melanoma ao stress de RE induzido pela TG e sobre o efeito da TG na expressão genética das PDIs e chaperonas do RE nas linhas celulares de melanoma. Alguns resultados foram inconclusivos, mas servem de base para a realização, num futuro próximo, de estudos mais aprofundados para clarificar os resultados pouco conclusivos e dar continuidade ao trabalho desenvolvido.

No que diz respeito às diferentes resistências à TG verificadas nas linhas celulares de melanoma seria interessante investigar a expressão de P-gp (transportador ABC da membrana plasmática responsável pelo efluxo de diversas substâncias das células animais) incluindo a TG nestas linhas celulares de melanoma para perceber se a resistência à TG está relacionada com a expressão do P-gp.

Em relação à análise do efeito da TG na expressão fenotípica as PDIs e chaperonas do RE, para confirmar a ocorrência e deslindar as razões que originam a diminuição da expressão de GRP78, em SK-MEL-30 e MNT-1, e de CRT, PDI e TMX4 em SK-MEL-30, sugerindo que estas ou não são traduzidas ou são exportadas, seria importante analisar e monitorizar a presença da GRP78 e de outras proteínas do RE no sobrenadante de células SK-MEL-30 e MNT-1 tratadas com TG, ao longo do tempo. Esta análise envolveria a recolha dos sobrenadantes das culturas e avaliação da presença das proteínas por outras técnicas, como por exemplo, western blot.

Por outro lado, a análise da expressão fenotípica da PDI a nível intracelular e superficial nas células MNT-1 e a nível superficial nas células SK-MEL-30, bem como da CRT nas células MNT-1 a nível superficial após o tratamento com TG carece de mais ensaios de citometria de fluxo para confirmar os valores de MFI obtidos, podendo também ser útil realizar a avaliação da marcação superficial e intracelular das células tratadas com TG com anticorpos anti-PDI e anti-chaperonas do RE por microscopia confocal para confirmar o efeito da TG na expressão fenotípica e na localização celular das PDIs e das chaperonas do RE estudadas.

5. Conclusões gerais

As células MNT-1 têm maior susceptibilidade ao stress de RE induzido pela TG do que as células M8 e SK-MEL-30. As curvas de viabilidade celular das linhas M8 e SK-MEL-30 apresentam um traçado muito semelhante, sugerindo que existem similaridades nos mecanismos de resposta ao stress de RE induzidos pela TG e de resistência ao fármaco.

Segundo a análise da expressão genética das PDIs e chaperonas do RE, todos estes genes são expressas nas linhas celulares de melanoma. A nível da expressão fenotípica, as células MNT-1 expressam mais PDIs e chaperonas do RE (com valores de MFI entre 40 e 2637) do que as células SK-MEL-30 (com valores de MFI entre 1 e 766), sugerindo que as células MNT-1 são mais resistentes à apoptose induzida pela TG do que as restantes, por possuírem maior quantidade de proteínas do RE envolvidas no processo de aquisição da estrutura tridimensional das proteínas que lhes conferiria maior capacidade para processar as proteínas acumuladas no lúmen do RE e resolver o stress de RE induzidos pela TG. A nível da expressão de transcritos dos genes das PDIs e das chaperonas do RE em relação à expressão do gene da β -actina, a linha MNT-1 expressam menos PDIs e chaperonas do RE do que a linha SK-MEL-30, sugerindo que os transcritos expressos mais acentuadamente nas células SK-MEL-30 não são traduzidos ou são exportados, enquanto os transcritos expressos nas células MNT-1 são traduzidos, possivelmente devido a uma elevada taxa de processamento de proteínas no RE imposta pela melanogénese. Para além disso, os ensaios de viabilidade celular mostraram que as células MNT-1 têm menor resistência à TG, pelo que a maior expressão fenotípica de PDIs e das chaperonas do RE antes da aplicação do tratamento com TG não lhes confere maior resistência à TG.

De um modo geral, a quantidade relativa de expressão genética das PDIs e outras chaperonas de RE aumenta acentuadamente ($RQ > 1$) em ambas as linhas celulares de melanoma - SK-MEL-30 e MNT-1 - tratadas com as diferentes concentrações TG durante 18h e 48h. Fenotipicamente, a TG induz uma diminuição da expressão intracelular de GRP78 em ambas as linhas, apesar de haver um aumento da expressão a nível transcricional, os transcritos não foram traduzidos ou exportados. Do mesmo modo, a expressão intracelular de CRT, PDI e TMX4 também diminui nas células SK-MEL-30 tratadas. Nas células MNT-1, a TG induz um aumento da expressão intracelular da CRT. Apesar de não ser detectada expressão intracelular da PDI nas células não tratadas e de não haver alteração na expressão fenotípica intracelular da PDI nas células tratadas com TG, a nível transcricional verificou-se um aumento da expressão, confirmando que esta

proteína é expressa em melanoma. A expressão fenotípica induzida pela TG nas células MNT-1 é muito superior ao valor de MFI observado na marcação intracelular das células MNT-1 nas células cultivadas em meio de cultura sem solvente e sem TG, mas está de acordo com os níveis de expressão de transcritos bastante elevados para o gene da *CRT*.

As diferenças de susceptibilidade ao stress de RE induzido pela TG nas duas linhas celulares de melanoma podem estar relacionadas com diferenças importantes a nível da resposta ao stress de RE, que não se limitam às diferenças a nível da transcrição, sendo necessários mais estudos para explicar esses fenómenos.

6. Bibliografia

- Applied Biosystems. (2010). Introduction to Gene Expression: Getting Started Guide. Part Number 4454239 Rev. A 05/2010. Carlsbad: Applied Biosystems.
- Arbaban, A., Brouland, J. P., Gelebart, P., Kovacs, T., Bobe, R., Enouf, J., & Papp, B. (2011). Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer. *BioFactors (Oxford, England)*, 37(3), 139-149.
- Atkins, M. (1997). The role of cytotoxic chemotherapeutic agents either alone or in combination with biological response modifiers. In J. Kirkwood (Ed.), *Molecular Diagnosis, Prevention & Therapy of Melanoma*. New York: Marcel Dekker.
- BD Biosciences. (2000). Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Manual Part Number: 11-11032-01: Becton, Dickinson and Company.
- Bian, Z. M., Elner, S. G., & Elner, V. M. (2009). Dual involvement of caspase-4 in inflammatory and ER stress-induced apoptotic responses in human retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(12), 6006-6014.
- Brenner, C., & Grimm, S. (2006). The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene*, 25(34), 4744-4756.
- Brini, M., & Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiological Reviews*, 89(4), 1341-1378.
- Bustin, S. A. (2005a). Real-time PCR. In J. Fuchs & M. Podda (Eds.), *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* (pp. 1117-1124). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bustin, S. A. (2005b). Real-time reverse transcription PCR. In J. Fuchs & M. Podda (Eds.), *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics* (pp. 1131-1135). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Cerella, C., Mearelli, C., Coppola, S., D'Alessio, M., De Nicola, M., Diederich, M., & Ghibelli, L. (2007). Sequential phases of Ca²⁺ alterations in pre-apoptotic cells. *Apoptosis*, 12(12), 2207-2219.
- Chen, K. G., Leapman, R. D., Zhang, G., Lai, B., Valencia, J. C., Cardarelli, C. O., . . . Gottesman, M. M. (2009). Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. *J Natl Cancer Inst*, 101(18), 1259-1271.
- Chen, K. G., Valencia, J. C., Gillet, J. P., Hearing, V. J., & Gottesman, M. M. (2009). Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 22(6), 740-749.
- Chen, K. G., Valencia, J. C., Lai, B., Zhang, G., Paterson, J. K., Rouzaud, F., Gottesman, M. M. (2006). Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26), 9903-9907.

- Chen, W., Shang, W. H., Adachi, Y., Hirose, K., Ferrari, D. M., & Kamata, T. (2008). A possible biochemical link between NADPH oxidase (Nox) 1 redox-signalling and ERp72. *The Biochemical journal*, 416(1), 55-63.
- Cheung, F. W., Guo, J., Ling, Y. H., Che, C. T., & Liu, W. K. (2012). Anti-melanogenic property of geoditin A in murine B16 melanoma cells. *Mar Drugs*, 10(2), 465-476.
- Chichiarelli, S., Gaucci, E., Ferraro, A., Grillo, C., Altieri, F., Cocchiola, R., Eufemi, M. (2010). Role of ERp57 in the signaling and transcriptional activity of STAT3 in a melanoma cell line. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 494(2), 178-183.
- Christensen, S. B., Skytte, D. M., Denmeade, S. R., Dionne, C., Moller, J. V., Nissen, P., & Isaacs, J. T. (2009). A Trojan horse in drug development: targeting of thapsigargin towards prostate cancer cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 9(3), 276-294.
- Coe, H., Jung, J., Groenendyk, J., Prins, D., & Michalak, M. (2010). ERp57 modulates STAT3 signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*, 285(9), 6725-6738.
- Coe, H., & Michalak, M. (2009). Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *General physiology and biophysics*, 28 Spec No Focus(Journal Article), F96-F103.
- Coe, H., & Michalak, M. (2010). ERp57, a multifunctional endoplasmic reticulum resident oxidoreductase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(6), 796-799.
- Cunnea, P. M., Miranda-Vizuete, A., Bertoli, G., Simmen, T., Damdimopoulos, A. E., Hermann, S., Spyrou, G. (2003). ERdj5, an endoplasmic reticulum (ER)-resident protein containing DnaJ and thioredoxin domains, is expressed in secretory cells or following ER stress. *The Journal of biological chemistry*, 278(2), 1059-1066.
- Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (2005). The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. *Cancer biology & therapy*, 4(1), 14-22.
- Desjardins, M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nature reviews.Immunology*, 3(4), 280-291.
- Dong, M., Bridges, J. P., Apsley, K., Xu, Y., & Weaver, T. E. (2008). ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Molecular biology of the cell*, 19(6), 2620-2630.
- Eberle, J., Kurbanov, B. M., Hossini, A. M., Trefzer, U., & Fecker, L. F. (2007). Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist Updat*, 10(6), 218-234.
- Ellgaard, L., & Ruddock, L. W. (2005). The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties. *EMBO reports*, 6(1), 28-32.
- Feige, M. J., & Hendershot, L. M. (2011). Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current opinion in cell biology*, 23(2), 167-175.

- Ferrari, D. M., & Soling, H. D. (1999). The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *The Biochemical journal*, 339 (Pt 1)(Pt 1), 1-10.
- Fu, X. M., & Zhu, B. T. (2009). Human pancreas-specific protein disulfide isomerase homolog (PDIp) is an intracellular estrogen-binding protein that modulates estrogen levels and actions in target cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 115(1-2), 20-29.
- Garg, A., Krysko, D., Vandenabeele, P., & Agostinis, P. (2012). The emergence of phox-ER stress induced immunogenic apoptosis (Vol. 1, pp. 1-3): *OncolImmunology*.
- Gartel, A. L. (2012). Mechanisms of apoptosis induced by anticancer compounds in melanoma cells. *Curr Top Med Chem*, 12(1), 50-52.
- Ghantous, A., Gali-Muhtasib, H., Vuorela, H., Saliba, N. A., & Darwiche, N. (2010). What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug discovery today*, 15(15-16), 668-678.
- Giménez-Bonafé, P., Tortosa, A., & Pérez-Tomás, R. (2009). Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets*, 9(3), 320-340.
- Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*, 30(6), 503-512.
- Gold, L. I., Eggleton, P., Sweetwyne, M. T., Van Duyn, L. B., Greives, M. R., Naylor, S. M., . . . Murphy-Ullrich, J. E. (2010). Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J*, 24(3), 665-683.
- Goplen, D., Wang, J., Enger, P., Tysnes, B. B., Terzis, A. J., Laerum, O. D., & Bjerkvig, R. (2006). Protein disulfide isomerase expression is related to the invasive properties of malignant glioma. *Cancer Res*, 66(20), 9895-9902.
- Haugstetter, J., Maurer, M. A., Blicher, T., Pagac, M., Wider, G., & Ellgaard, L. (2007). Structure-function analysis of the endoplasmic reticulum oxidoreductase TMX3 reveals interdomain stabilization of the N-terminal redox-active domain. *The Journal of biological chemistry*, 282(46), 33859-33867.
- Hayano, T., & Kikuchi, M. (1995). Molecular cloning of the cDNA encoding a novel protein disulfide isomerase-related protein (PDIR). *FEBS letters*, 372(2-3), 210-214.
- Hebert, D. N., & Molinari, M. (2007). In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological Reviews*, 87(4), 1377-1408.
- Hersey, P., & Zhang, X. D. (2009). Treatment combinations targeting apoptosis to improve immunotherapy of melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 58(11), 1749-1759.
- Horibe, T., Gomi, M., Iguchi, D., Ito, H., Kitamura, Y., Masuoka, T., . . . Kikuchi, M. (2004). Different contributions of the three CXXC motifs of human protein-disulfide isomerase-related protein to isomerase activity and oxidative refolding. *The Journal of biological chemistry*, 279(6), 4604-4611.

- Hosoda, A., Tokuda, M., Akai, R., Kohno, K., & Iwawaki, T. (2009). Positive contribution of ERdj5/JPDI to endoplasmic reticulum protein quality control in the salivary gland. *The Biochemical journal*, *425*(1), 117-125.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*, *6*(4), 279-284.
- Hussain, S. G., & Ramaiah, K. V. (2007). Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *CURRENT SCIENCE*, *93*(12), 1684-1696.
- Imaoka, S. (2011). Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. *International review of cell and molecular biology*, *290*(Journal Article), 121-166.
- Jakobsen, C. M., Denmeade, S. R., Isaacs, J. T., Gady, A., Olsen, C. E., & Christensen, S. B. (2001). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of thapsigargin analogues for targeting apoptosis to prostatic cancer cells. *Journal of medicinal chemistry*, *44*(26), 4696-4703.
- Jessop, C. E., Watkins, R. H., Simmons, J. J., Tasab, M., & Bulleid, N. J. (2009). Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins. *Journal of cell science*, *122*(Pt 23), 4287-4295.
- Jimbow, K., Chen, H., Park, J. S., & Thomas, P. D. (2001). Increased sensitivity of melanocytes to oxidative stress and abnormal expression of tyrosinase-related protein in vitiligo. *Br J Dermatol*, *144*(1), 55-65.
- Jimbow, K., Park, J. S., Kato, F., Hirosaki, K., Toyofuku, K., Hua, C., & Yamashita, T. (2000). Assembly, target-signaling and intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stage of melanosome biogenesis. *Pigment Cell Res*, *13*(4), 222-229.
- Jordan, P. A., Stevens, J. M., Hubbard, G. P., Barrett, N. E., Sage, T., Authi, K. S., & Gibbins, J. M. (2005). A role for the thiol isomerase protein ERP5 in platelet function. *Blood*, *105*(4), 1500-1507.
- Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, *441*(7092), 431-436.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, *84*(5), 1415-1420.
- Kozlov, G., Maattanen, P., Thomas, D. Y., & Gehring, K. (2010). A structural overview of the PDI family of proteins. *The FEBS journal*, *277*(19), 3924-3936.
- La Porta, C. A. (2009). Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma. *Curr Cancer Drug Targets*, *9*(3), 391-397.
- Lai, E., Teodoro, T., & Volchuk, A. (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *22*(Journal Article), 193-201.

- Lecoeur, H., de Oliveira-Pinto, L. M., & Gougeon, M. L. (2002). Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods*, *265*(1-2), 81-96.
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D. R., & Lee, A. S. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell death and differentiation*, *15*(9), 1460-1471.
- Li, X., Zhang, K., & Li, Z. (2011). Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *Journal of hematology & oncology*, *4*(Journal Article), 8.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, *25*(4), 402-408.
- Lovat, P. E., Corazzari, M., Armstrong, J. L., Martin, S., Pagliarini, V., Hill, D., Redfern, C. P. (2008). Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res*, *68*(13), 5363-5369.
- Maattanen, P., Gehring, K., Bergeron, J. J., & Thomas, D. Y. (2010). Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. *Seminars in cell & developmental biology*, *21*(5), 500-511.
- Mach, W. J., Thimmesch, A. R., Orr, J. A., Slusser, J. G., & Pierce, J. D. (2010). Flow cytometry and laser scanning cytometry, a comparison of techniques. *J Clin Monit Comput*, *24*(4), 251-259.
- Matsuo, Y., Masutani, H., Son, A., Kizaka-Kondoh, S., & Yodoi, J. (2009). Physical and functional interaction of transmembrane thioredoxin-related protein with major histocompatibility complex class I heavy chain: redox-based protein quality control and its potential relevance to immune responses. *Molecular biology of the cell*, *20*(21), 4552-4562.
- Michelangeli, F., & East, J. M. (2011). A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochemical Society transactions*, *39*(3), 789-797.
- Minamino, T., Komuro, I., & Kitakaze, M. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res*, *107*(9), 1071-1082.
- Ni, M., & Lee, A. S. (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS letters*, *581*(19), 3641-3651.
- Ni, M., Zhou, H., Wey, S., Baumeister, P., & Lee, A. S. (2009). Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. *PLoS One*, *4*(8), e6868.
- Nolan, J. P., & Yang, L. (2007). The flow of cytometry into systems biology. *Brief Funct Genomic Proteomic*, *6*(2), 81-90.

- Nomura, R., Orii, M., & Senda, T. (2011). Calreticulin-2 is localized in the lumen of the endoplasmic reticulum but is not a Ca²⁺-binding protein. *Histochem Cell Biol*, 135(6), 531-538.
- Obeid, M. (2008). ERP57 membrane translocation dictates the immunogenicity of tumor cell death by controlling the membrane translocation of calreticulin. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(4), 2533-2543.
- Okazaki, Y., Ohno, H., Takase, K., Ochiai, T., & Saito, T. (2000). Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 275(46), 35751-35758.
- Ozcan, L., & Tabas, I. (2012). Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med*, 63, 317-328.
- Panaretakis, T., Joza, N., Modjtahedi, N., Tesniere, A., Vitale, I., Durchschlag, M., Kroemer, G. (2008). The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell death and differentiation*, 15(9), 1499-1509.
- Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M., & Gilcrest, B. A. (2009). Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 66(9), 1493-1506.
- Peters, L. R., & Raghavan, M. (2011). Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(2), 919-931.
- Rao, R. V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Bredesen, D. E. (2002). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett*, 514(2-3), 122-128.
- Rasheva, V. I., & Domingos, P. M. (2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 14(8), 996-1007.
- Robinson, J. P. (2008). Flow Cytometry. In G. E. Wnek & G. L. Bowlin (Eds.), *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering (Vol. 1, pp. 1100-1110)*. New York: Informa Healthcare.
- Rutkevich, L. A., & Williams, D. B. (2011). Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology*, 23(2), 157-166.
- Rutkowski, D. T., & Kaufman, R. J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends in biochemical sciences*, 32(10), 469-476.
- Sabala, P., Czarny, M., Woronczak, J. P., & Baranska, J. (1993). Thapsigargin: potent inhibitor of Ca²⁺ transport ATP-ases of endoplasmic and sarcoplasmic reticulum. *Acta Biochimica Polonica*, 40(3), 309-319.
- Samali, A., Fitzgerald, U., Deegan, S., & Gupta, S. (2010). Methods for monitoring endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *International journal of cell biology, 2010(Journal Article)*, 830307.

- Scheier, B., Amaria, R., Lewis, K., & Gonzalez, R. (2011). Novel therapies in melanoma. *Immunotherapy*, 3(12), 1461-1469.
- Shi, Y., Gerritsma, D., Bowes, A. J., Capretta, A., & Werstuck, G. H. (2007). Induction of GRP78 by valproic acid is dependent upon histone deacetylase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(16), 4491-4494.
- Shi, Y., Porter, K., Parameswaran, N., Bae, H. K., & Pestka, J. J. (2009). Role of GRP78/BiP degradation and ER stress in deoxynivalenol-induced interleukin-6 upregulation in the macrophage. *Toxicol Sci*, 109(2), 247-255.
- Simmen, T., Lynes, E. M., Gesson, K., & Thomas, G. (2010). Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim Biophys Acta*, 1798(8), 1465-1473.
- Stevens, F. J., & Argon, Y. (1999). Protein folding in the ER. *Seminars in cell & developmental biology*, 10(5), 443-454.
- Stordeur, P., Poulin, L. F., Craciun, L., Zhou, L., Schandené, L., de Lavareille, A., . . . Goldman, M. (2002). Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. *J Immunol Methods*, 259(1-2), 55-64.
- Sugiura, Y., Araki, K., Iemura, S., Natsume, T., Hoseki, J., & Nagata, K. (2010). Novel thioredoxin-related transmembrane protein TMX4 has reductase activity. *The Journal of biological chemistry*, 285(10), 7135-7142.
- Sulová, Z., Seres, M., Barancík, M., Gíbalová, L., Uhrík, B., Poleková, L., & Breier, A. (2009). Does any relationship exist between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and intracellular calcium homeostasis. *Gen Physiol Biophys*, 28 Spec No Focus, F89-95.
- Sweadner, K. J., & Donnet, C. (2001). Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *The Biochemical journal*, 356(Pt 3), 685-704.
- Szegezdi, E., Macdonald, D. C., Ni Chonghaile, T., Gupta, S., & Samali, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *American journal of physiology. Cell physiology*, 296(5), C941-953.
- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., & Ferraro, A. (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*, 193(2), 154-163.
- Turano, C., Gaucci, E., Grillo, C., & Chichiarelli, S. (2011). ERp57/GRP58: a protein with multiple functions. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 16(4), 539-563.
- UniProt, K. B. S. P. (2011). [Protein disulfide-isomerase A6 precursor - Homo sapiens (Human)]. Web Page.
- Ushioda, R., Hoseki, J., Araki, K., Jansen, G., Thomas, D. Y., & Nagata, K. (2008). ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5888), 569-572.

- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*, 29(3), 151-159.
- van Engeland, M., Nieland, L. J., Ramaekers, F. C., Schutte, B., & Reutelingsperger, C. P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 31(1), 1-9.
- Vander Griend, D. J., Antony, L., Dalrymple, S. L., Xu, Y., Christensen, S. B., Denmeade, S. R., & Isaacs, J. T. (2009). Amino acid containing thapsigargin analogues deplete androgen receptor protein via synthesis inhibition and induce the death of prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 8(5), 1340-1349.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5), 619-626.
- Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2008). The quality control of MHC class I peptide loading. *Current opinion in cell biology*, 20(6), 624-631.
- Wilkinson, B., & Gilbert, H. F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochimica et biophysica acta*, 1699(1-2), 35-44.
- Wu, J., & Kaufman, R. J. (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation*, 13(3), 374-384.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., & Reed, J. C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2656-2664.
- Yamaguchi, H., Bhalla, K., & Wang, H. G. (2003). Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer research*, 63(7), 1483-1489.
- Zhang, Y., Liu, R., Ni, M., Gill, P., & Lee, A. S. (2010). Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem*, 285(20), 15065-15075.

APÊNDICES

Apêndice I

Resumo submetido para o *workshop Glycosciences in the International Year of Chemistry – Applications to Human Health and Disease*

Veríssimo T., Silva Z., Novo C. and Videira P. A.

The family of Protein Disulfide Isomerases (PDIs) are present in the endoplasmic reticulum (ER), being part of a quality-control system for proper folding of glycoproteins. More recently, however, it was reported that at least some members of the family also have a different cellular distribution [1]. Moreover, ER stress-inducing drugs used in cancer treatments may cause overexpression and/or translocation of PDI family members with important physiological implications. For instance, the cell surface expression and secretion of the ER chaperone calreticulin/calnexin (CRT/CNX) [2], which is involved in correct folding of N-glycosylated proteins, is induced by thapsigargin-induced ER stress [3]. The CRT expressed on the surface of dead and dying tumor cells was suggested to stimulate therapeutic and protective antitumor immune responses in mice [3]. On the other hand, proteins of the PDI family protect against chemotherapeutic induced ER stress and apoptosis thus leading to reduced treatment efficacy [4].

In this study, our goal is to analyze the impact of thapsigargin, which depletes ER calcium, on the expression and location of the PDI family members of melanoma cell lines.

Preliminary results indicate that SK-MEL-30 and M8 have similar thapsigargin susceptibilities, while MNT-1 is more sensitive to the drug. The drug has effect at transcription level by upregulation or downregulating the expression of different PDI family members. The consequences of this regulation on protein expression levels and/or location are currently being investigated.

The fundamental knowledge on chemotherapeutic drugs influence on ER stress responses may enlighten the way to develop more efficient melanoma therapies.