



Instituto Nacional do Câncer
Centro de Pesquisas
Divisão de Biologia Celular

Morte celular induzida pelo manganês em linhagens tumorais

Érika Carvalho

Rio de Janeiro

2009

Érika Carvalho

Morte celular induzida pelo manganês
em linhagens tumorais

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia, Instituto Nacional do Câncer (INCA), Centro de Pesquisa, Divisão de Biologia Celular, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Oncologia.

ORIENTADOR: Dr. Gustavo Amarante Mendes

CO-ORIENTADORA: Dra. Cinthya Sternberg

Rio de Janeiro

2009

Folha de Aprovação

Érika Carvalho Silva

Morte celular induzida pelo manganês em linhagens tumorais

Aprovada em 11/12/2009

Dr. Franklin D. Rumjanek

Dr. João P. B. Viola

Dra. Luciana B. Chiarini

Rio de Janeiro
2009

O presente trabalho foi desenvolvido na Divisão de Biologia Celular do Centro de Pesquisas do Instituto Nacional do Câncer, sob orientação do Dr. Gustavo Amarante Mendes e da Dra. Cinthya Sternberg e com auxílios concedidos pelas seguintes agências: Fundação Ary Frauzino (FAF), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Basic research is like shooting an arrow into the air
and, where it lands, painting a target.”

(H.B. Adkins)

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Gustavo Amarante-Mendes e Cinthya Sternberg, por sempre terem acreditado na minha capacidade e permitido que desenvolvesse esse projeto com liberdade de pensar, criar e tomar decisões. Foi extremamente importante para o meu crescimento científico.

Ao Dr. João Viola, que permitiu a realização desse trabalho, pois com certeza na sua ausência não estaria aqui hoje. Obrigada pelo apoio!

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Alves, pela ajuda com as análises dos meus dados de expressão gênica.

Aos meus pais, que ao longo de toda a minha vida sempre estiveram ao meu lado pra me apoiar, incentivar e ajudar na busca pela realização pessoal e profissional. É a eles que dedico as minhas vitórias, pois sem eles nada disso seria possível. Obrigada!!! Amo muito vocês!!!

Ao meu irmão que permitiu grande parte do meu aprendizado já que eu sempre fazia questão de perturbá-lo com tudo que eu sabia. Desejo a ele e à Juliana toda a felicidade e sucesso desse mundo!!

Ao Davi, que foi um exemplo pra mim em muitos momentos pela sua paciência, inteligência e perseverança no alcance dos seus objetivos. Obrigada também pela

paciência comigo nos momentos de loucura, estresse, e ainda assim tentar me acalmar. Espero que você também sempre agradeça aos céus por ter colocado uma pessoa tão maravilhosa como eu no seu caminho!

Aos companheiros de laboratório: Amanda, André, Bia, Bruno, Douglas, Flavia, Giu, Paty, Pedro, Renata e Steffi, que sempre me ajudaram todos os momentos que precisei, me ouviram ou simplesmente estavam ali pra bater papo e tomar café quando quis companhia.

A todos os integrantes do Serviço de Pesquisa Clínica, que nos momentos de descontração ou trabalho sempre me ajudaram com bons ensinamentos, conversas e empréstimos.

Às amigas mais maravilhosas desse mundo: Babi, Carol e Lari. Que permaneçam na minha vida pra sempre, aturando os meus atrasos e idas ao laboratório mesmo no fim de semana. Obrigada de verdade por terem sempre me proporcionado ótimos momentos.

Aos meus colegas de faculdade, em especial Nathy e Nast, que estiveram presentes sempre que podiam para me ajudar e ouvir.

Aos amigos: Lorena, Luiz, Amanda, Josephine, Fabricio, Tatiana, Renato, Renata e Raphael, pela amizade, companhia e momentos de descontração no meio de todo o estresse desses vários anos de amizade.

A todos os outros pesquisadores que passaram seus conhecimentos com amor fazendo com que eu aprendesse e crescesse cada vez mais.

A Deus e meu anjo da guarda, por sempre iluminarem meu caminho, tornando a minha vida a cada dia mais maravilhosa, por terem colocado no meu caminho pessoas inesquecíveis e por me permitirem sempre tirar boas lições de cada situação.

A todos os outros que não tiveram seus nomes citados aqui, mas que ainda assim estão presentes no meu coração. Obrigada por tudo!!!

Morte Celular Induzida pelo Manganês em Linhagens Tumorais

Resumo

Érika Carvalho Silva

Câncer é um grupo de doenças caracterizadas por modificações genéticas que levam ao desbalanço entre sobrevivência e morte celular, causando um acúmulo de células anormais. Por este motivo, grande parte das terapias atuais para o tratamento do câncer tem como objetivo a indução de apoptose de células tumorais. Vários metais são citotóxicos e induzem morte celular. O manganês é um desses metais, mas seus mecanismos de ação ainda não estão definidos. Dessa maneira, esse trabalho tem como objetivo investigar a indução de morte celular pelo manganês em células tumorais e seus mecanismos. Inicialmente, verificou-se a capacidade do manganês de induzir apoptose em linhagens tumorais hematopoiéticas por citometria de fluxo e *western-blot*. A superexpressão de Bcl-xL foi capaz de bloquear a morte celular induzida pelo manganês, indicando uma dependência da via apoptótica mitocondrial. O manganês não foi capaz de interferir no ciclo celular das linhagens utilizadas e nem apresentou efeito sinérgico com os quimioterápicos cisplatina e vincristina. Em seguida, analisou-se o nível de sensibilidade ao manganês de treze linhagens tumorais de diferentes tecidos, a fim de identificar linhagens mais sensíveis ou resistentes ao manganês. As linhagens C33A e Du145 demonstraram específica sensibilidade e resistência ao tratamento, respectivamente, e foram selecionadas para análise da expressão gênica de genes reguladores da apoptose por qPCR. Como resultado, observou-se que na linhagem C33A o mRNA dos genes pró-apoptóticos BAX e BAD é, respectivamente, 28 e 2,4 vezes mais expresso que na linhagem Du145. Em contrapartida, a linhagem Du145 expressa 3,7 e 6 vezes mais os genes anti-apoptóticos Bcl-xL e cIAP1, respectivamente, do que a linhagem C33A. Esses resultados indicam potenciais moléculas que podem estar envolvidas na resposta não só ao manganês como a outros quimioterápicos. Além disso, após o tratamento com manganês, a expressão de TRAIL na linhagem C33A é reduzida 10 vezes e a de BAD 2,5 vezes. Na linhagem Du145, ocorre um aumento de 160 vezes na expressão de Bcl-W e redução de 2,5 vezes de cIAP2. Assim, o manganês é capaz de induzir morte celular apoptótica em linhagens tumorais específicas e nossos resultados indicam um papel em potencial dos genes diferencialmente expressos nas duas linhagens e em resposta ao tratamento com manganês, de forma que uma avaliação mais aprofundada do papel de cada um pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o câncer.

Palavras-chave: Morte celular, apoptose, manganês

Cell death induced by manganese in cancer cell lines

Abstract

Érika Carvalho Silva

Cancer is a group of diseases characterized by uncontrolled growth and spread of abnormal cells, usually driven by an altered ratio of apoptosis to cell division. Thus, agents that can induce apoptosis are extensively investigated. Many metals are known to be cytotoxic and induce cell death. Manganese is one of these metals, however the underlying mechanisms of manganese-induced apoptosis are not well defined. The aim of this work was to investigate cell death induction by manganese in cancer cell lines and its mechanisms. Initially, the ability of manganese to induce apoptosis in hematopoietic cancer cell line was explored by flow cytometry and western blot. Bcl-xL overexpression was able to block manganese-induced cell death, indicating a dependence of mitochondrial apoptotic pathway. Manganese was not able to interfere in the cell cycle nor presented synergic effect with vincristin or cisplatin. Then, thirteen cancer cell lines were treated with manganese to identify cells more sensitive or resistant to manganese. The cell lines C33A and Du145 have shown specific sensibility and resistance to the treatment, respectively, and were selected to gene expression analysis of apoptosis-regulatory genes by qPCR. The cell line C33A expresses the pro-apoptotic genes BAX e BAD, respectively, 28 and 2,4 fold expression when compared to Du145 cell line. In contrast, Du145 expresses 3,7 and 6 fold more Bcl-xL and cIAP1, respectively, when compared to C33A. These results indicate potential molecules that may be involved in manganese and other chemotherapics response. Besides, after manganese treatment, TRAIL expression in the C33A cell line was reduced by 10 fold and BAD expression reduced by 2.5 fold. In the cell line Du145, manganese treatment increased by 160 fold Bcl-W expression and reduced by 2.5 fold cIAP2 expression. Thus, manganese is able to induce cell death in specific cell lines and our results indicate a role of the differentially expressed genes and in response to manganese treatment. The study of their individual role can lead to the development of new therapeutic strategies to cancer.

Keywords: Cell death, apoptosis, manganese

Lista de Figuras

| | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1 – As duas principais vias apoptóticas. A via extrínseca é ativada por ligantes provenientes do meio extracelulares que ativam as caspases iniciadoras –8 e –10 através da interação com os receptores de morte. A via intrínseca é ativada por estímulos intracelulares, como dano ao DNA, que levam um sinal à mitocôndria, levando a sua permeabilização e liberação de proteínas pró-apoptóticas com posterior ativação da caspase-9. Essas duas vias são capazes de ativar caspases efetoras, como a caspase-3, que levam à apoptose (Hengartner, 2000)..... | 28 |
| Figura 2 – Mecanismos de ativação de caspase. (a) Clivagem proteolítica por uma caspase iniciadora. Esse mecanismo é bastante efetivo e unidirecional. (b) Clivagem proteolítica por proximidade. Nesse mecanismo, recrutamento ou agregação de múltiplas moléculas de procaspase-8 resulta em ativação cruzada. (c) Formação de holoenzima. A oligomerização dependente de ATP de Apaf-1 e citocromo c permite o recrutamento de procaspase-9 em um complexo chamado de apoptossomo. Ativação da caspase-9 é mediada por mudança conformacional e não proteólise (Hengartner, 2000)..... | 30 |
| Figura 3 – Família de proteínas Bcl-2. Os membros da família Bcl-2 podem ser divididos em três grupos de acordo com sua estrutura e função. Os membros anti-apoptóticos normalmente contêm quatro domínios BH. Os membros pró-apoptóticos multi-domínios não apresentam o domínio BH4. Finalmente, existem os membros pró-apoptóticos BH3- <i>only</i> que apresentam apenas o domínio BH3 (Taylor <i>et al.</i> , 2008)..... | 34 |

- Figura 4** – Diferentes modelos para ativação de Bax e Bak. No modelo de ativação direta as proteínas anti-apoptóticas ligam-se diretamente e inibem a atividade pró-apoptótica de Bax e Bak. Em resposta a estímulos de morte celular, proteínas *BH3-only* específicas são ativadas e, por sua vez, são capazes de se ligar e inativar proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 específicas. Bax e Bak são liberadas, podendo oligomerizar na membrana externa mitocondrial facilitando ou mediando a liberação de citocromo c e garantindo apoptose. Já pelo modelo hierárquico alguns membros da subfamília *BH3-only*, chamados de inativador inicial, ligam-se e inativam membros anti-apoptóticos da família Bcl-2. A ligação de um inativador inicial *BH3-only* desloca um ativador latente do sítio de ligação das proteína anti-apoptóticas. A proteína *BH3-only* liberada se liga transientemente pra ativar Bax e Bak, ou age em lipídeos ou outras proteínas celulares (como VDAC) para liberar Bax ou Bak de seu regulador negativo. Esse processo leva a oligomerização de Bax ou Bak na membrana externa mitocondrial facilitando ou mediando a liberação de citocromo c no citosol (Letai, 2008)..... 36
- Figura 5** – Modos de atuação das IAPs para inibir a apoptose. XIAP pode se ligar diretamente às caspases ativadas e inibir sua atividade. O *RING-finger* das proteínas XIAP e cIAP2 parecem promover a ubiquinação das caspases efetoras ativadas. A atividade E3 de XIAP direciona a caspase-3 para degradação, aumentando o efeito inibitório na apoptose de XIAP. Por fim, XIAP e cIAP1 são ubiquitinadas e degradadas por proteassomas em resposta à estímulos apoptóticos nas células T, e sua degradação parece ser importante para o comprometimento das células T com a morte celular (Adaptado de Jesenberger e Jentsch, 2002)..... 44
- Figura 6** – Etapas do processo autofágico. Vias de sinalização específicas são capazes de estimular a autofagia que começa com o

aparecimento de uma membrana de isolamento. Essa membrana cresce e envolve material citoplasmático originando um autofagossomo. Em seguida, ocorre a sua fusão com um lisossomo e há a degradação de seu conteúdo. Diversas proteínas e duas vias de conjugação são essenciais para esse processo (Maiuri *et al*, 2007)..... 47

Figura 7 – Gráfico representando a curva de acúmulo de fluorescência (preto) utilizando a função logística de 5 parâmetros e a representação da função da sua primeira (vermelho) e segunda (verde) derivada. O ponto de interseção da linha vertical verde, que parte do ponto de máxima da função de segunda derivada com a curva de acúmulo de fluorescência corresponde ao ponto característico da amostra (Cq ou CpD2), enquanto a interseção da linha verde com a curva de eficiência (azul) corresponde à eficiência de amplificação da amostra (Eff.) (Ritz *et al.*, 2008)..... 67

Figura 8 – Indução de apoptose na linhagem de células B SKW6.4 pelo manganês. Após tratamento por 48h com 100µM dos diferentes cátions diversas características da apoptose foram analisadas: diminuição do volume celular (primeira linha), exposição de fosfatidilserina (segunda linha), e condensação de fragmentação do DNA (terceira linha). Resultado representativo de três experimentos..... 71

Figura 9 – Indução de apoptose na linhagem de célula T Jurkat pelo manganês. Após tratamento por 48h com 100µM dos diferentes cátions diversas características da apoptose foram analisadas: diminuição do volume celular (primeira linha), exposição de fosfatidilserina (segunda linha), e condensação de fragmentação do DNA (terceira linha). Resultado representativo de três experimentos..... 72

- Figura 10** – Indução de apoptose na linhagem monocítica HL-60 pelo manganês. Após tratamento por 48h com 100µM dos diferentes cátions diversas características da apoptose foram analisadas: diminuição do volume celular (primeira linha), exposição de fosfatidilserina (segunda linha), e condensação de fragmentação do DNA (terceira linha). Resultado representativo de três experimentos..... 73
- Figura 11** – O manganês é capaz de induzir apoptose na linhagem Jurkat de maneira dose- (A) e tempo- (B) dependente. (A) A linhagem celular Jurkat foi tratada por diferentes tempos e concentrações de cloreto de manganês, cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3)..... 75
- Figura 12** – Despolarização mitocondrial induzida pelo manganês. Após o tratamento das linhagens HL-60 e Jurkat com 100µM de cloreto de manganês por 24h, o potencial da membrana externa mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo, através de marcação com DiOC₆. Resultado representativo de dois experimentos..... 79
- Figura 13** – Medida da atividade das caspases 3/7. As linhagens Jurkat e HL-60 foram tratadas com 100µM de cloreto de manganês e cloreto de magnésio por 48h. Em seguida, tiveram a atividade das caspases 3/7 analisadas em um fluorímetro. Resultado representativo de dois experimentos..... 80
- Figura 14** – Clivagem das procaspases -3 e -9 após o tratamento com manganês. Após o tratamento com 100µM de cloreto de manganês e cloreto de magnésio por 48h, foi feito o *western blot* para as linhagens Jurkat e HL-60. Resultado representativo de dois experimentos..... 81

- Figura 15** – Efeito de inibidores de caspases na morte celular induzida pelo manganês. As linhagens HL-60 e Jurkat foram tratadas com 100µM cloreto de manganês por 48h na presença ou não de 20µM dos inibidores de caspase indicados e a porcentagem das células com conteúdo de DNA subdiploide avaliada por citometria de fluxo (N=1)..... 82
- Figura 16** – O tratamento com manganês induz a clivagem do substrato de caspase-3 fodrina. Clivagem de fodrina, verificada por *western blot*, após tratamento das linhagens HL-60 e Jurkat com 100µM de cloreto de manganês por 24h. Resultado representativo de dois experimentos..... 83
- Figura 17** – Fragmentação internucleossomal do DNA após o tratamento com manganês. A fragmentação internucleossomal foi avaliada em gel de agarose após 72h de tratamento com 100µM de cloreto de manganês ou cloreto de magnésio. Resultado representativo de três experimentos..... 84
- Figura 18** – A morte induzida por manganês altera a morfologia da linhagem Jurkat. Morfologia nuclear de Jurkat tratadas com 100µM de MnCl₂, MgCl₂ e CaCl₂ por 48h..... 85
- Figura 19** – A superexpressão de Bcl-xL confere resistência ao tratamento com cloreto de manganês. As linhagens HL-60 e HL-60.Bcl-xL foram tratadas com concentrações de 50 a 400µM de cloreto de manganês por 24h e a porcentagem de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média ± SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N ≥ 3)..... 87
- Figura 20** – Comparação da sensibilidade ao manganês de diferentes hematopoiéticas. As linhagens HL-60, Jurkat e SKW6.4 foram tratadas com concentrações de 25 a 400µM de cloreto de

| | | |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| | manganês por 48h e a condensação e fragmentação de DNA foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiplóide (N \geq 3)..... | 89 |
| Figura 21 | – Avaliação do ciclo celular após tratamento com cloreto de manganês. As linhagens HL-60 e Jurkat foram tratadas com 100 μ M cloreto de manganês por 48h e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular avaliada por citometria de fluxo..... | 91 |
| Figura 22 | – Tratamento da linhagem HL-60 com manganês e quimioterápicos. (A) Tratamento associado à cisplatina. (B) Tratamento associado à vincristina. A linhagem HL-60 foi tratada por 48h com 50 μ M de cloreto de manganês associado a diferentes concentrações dos quimioterápicos cisplatina e vincristina. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiplóide. (N \geq 3)..... | 93 |
| Figura 23 | – Tratamento da linhagem Jurkat com manganês e quimioterápicos. (A) Tratamento associado à cisplatina. (B) Tratamento associado à vincristina. A linhagem Jurkat foi tratada por 48h com 50 μ M de cloreto de manganês associado a diferentes concentrações dos quimioterápicos cisplatina e vincristina. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiplóide. (N \geq 3)..... | 94 |
| Figura 24 | – Avaliação da morte celular autofágica após tratamento com 100 μ M de cloreto de manganês por 48h. As linhagens foram tratadas com as concentrações indicadas de 3-MA concomitantemente com 100 μ M de manganês por 48h e a porcentagem de células com conteúdo de DNA subdiplóide foi avaliada por citometria de fluxo. Resultado respresentativo de | |

| | | |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| | dois experimentos..... | 97 |
| Figura 25 | – O manganês é capaz de induzir apoptose em diferentes linhagens tumorais. (A) Apoptose induzida pelo manganês em linhagens de tumores sólidos. Experimento representativo de três experimentos independentes. (B) Apoptose induzida pelo manganês em linhagens de tumores hematopoiéticos. Após tratamento com 100µM de manganês por 48h, a fragmentação foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3)..... | 99 |
| Figura 26 | – A apoptose induzida pelo manganês não se correlaciona com a apoptose induzida pela cisplatina. (A) Apoptose induzida pela cisplatina em linhagens de tumores sólidos. (B) Apoptose induzida pela cisplatina em linhagens de tumores hematopoiéticos. Após tratamento com 10µM de cisplatina por 48h, o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3)..... | 102 |
| Figura 27 | – A apoptose induzida pelo manganês não se correlaciona com a apoptose induzida pela vincristina. (A) Apoptose induzida pela vincristina em linhagens de tumores sólidos. (B) Apoptose induzida pela vincristina em linhagens de tumores hematopoiéticos. Após tratamento com 10nM de vincristina por 48h, o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3)..... | 103 |
| Figura 28 | – Expressão de genes reguladores da apoptose pertencentes à família Bcl-2. (A) Bcl-xL; (B) Bcl-W; (C) Bak; (D) Bax; (E) Bad; (F) Noxa. Após o tratamento das linhagens C33A e Du145 | |

com 100 μ M de manganês por 16h, foi extraído seu RNA e avaliada a expressão dos genes de interesse. Os gráficos representam os níveis de expressão relativos aos genes normalizadores. * indicam as comparações em que $p < 0,1$. Os valores representam a média dos níveis de expressão normalizados \pm SE. (N = 4)..... 107

Figura 29 – Expressão de genes reguladores da apoptose não-pertencentes à família Bcl-2. (A) cIAP1; (B) cIAP2; (C) DR4; (D) DR5; (E) TRAIL. Após o tratamento das linhagens C33A e Du145 com 100 μ M de manganês por 16h, foi extraído seu RNA e avaliada a expressão dos genes de interesse. Os gráficos representam os níveis de expressão relativos aos genes normalizadores. * indicam as comparações em que $p < 0,1$. Os valores representam a média dos níveis de expressão normalizados \pm SE. (N = 4)..... 108

Lista de Tabelas

| | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabela 1 – Parâmetros utilizados na análise por <i>western blot</i> para os diversos anticorpos..... | 61 |
| Tabela 2 – Parâmetros de reação e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR..... | 65 |

Lista de abreviaturas

| | |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| μL | Microlitro |
| ηm | Nanometro |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| 3-MA | 3-metiladenina |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma-2</i> |
| BH | <i>Bcl-2 homology</i> |
| BIR | Baculovirus IAP Repeat |
| CaCl_2 | Cloreto de Cálcio |
| CARD | <i>Caspase Recruitment Domain</i> |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CEBP α | <i>CCAAT-enhancer binding protein-α</i> |
| CHOP | <i>CEPB homologous protein</i> |
| CpD2 | Ciclo do ponto de máxima da função de segunda derivada curva de acúmulo de fluorescência de uma reação de qPCR |
| Cq | Ciclo de quantificação |
| DD | <i>Death Domain</i> |
| DED | <i>Death Effector Domain</i> |
| DEPC | Dietil-pirocarbonato |
| DISC | <i>Death inducing signaling complex</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeo trifosfato |
| DR | <i>Death Receptor</i> |
| E ou Eff. | Eficiência de amplificação da qPCR |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| FADD | <i>Fas associated death domain</i> |
| FOXO3A | <i>Class O forkhead box transcription factor-3A</i> |
| g | Gramas |
| h | Hora |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| HCl | Ácido Clorídrico |
| IAP | <i>Inhibitor of apoptosis protein</i> |
| IBM | <i>IAP binding motif</i> |
| JAK | <i>Janus kinase</i> |
| KCl | Cloreto de Potássio |
| L | Litros |
| M | Concentração Molar |
| MEM | Membrana externa mitocondrial |
| MgCl ₂ | Cloreto de Magnésio |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| MnCl ₂ | Cloreto de Manganês |
| mRNA | Ácido ribonucléico mensageiro |
| Na ₂ HPO ₄ | Fosfato de sódio |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| PARP | <i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i> |
| pb | Pares de bases |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| PI | Iodeto de propídeo |
| PTP | Poros de transição de permeabilidade |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNAi | RNA de interferência |
| ROS | <i>Reactive oxygen species</i> |
| rpm | Rotações por minuto |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SOD | Superóxido dismutase |
| STAT | <i>Signal transducer and activator of transcription</i> |
| Taq | DNA Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i> |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |

| | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------|
| TNFR | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i> |
| TRADD | <i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i> |
| TRAF | <i>TNF-receptor associated factor</i> |
| TRAIL | <i>TNF-related Apoptosis Inducing Ligand</i> |
| UV | Ultra-violeta |
| UVRAG | <i>UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene</i> |
| VDAC | <i>Voltage dependent anion channel</i> |

Índice

| | |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 26 |
| 1.1. Morte Celular Programada..... | 26 |
| 1.1.1. Apoptose..... | 27 |
| 1.1.1.1. Via extrínseca..... | 31 |
| 1.1.1.2. Via intrínseca e a família Bcl-2..... | 32 |
| 1.1.1.3. Permeabilização da membrana externa mitocondrial..... | 39 |
| 1.1.1.4. Proteínas inibidoras da apoptose..... | 42 |
| 1.1.2. Morte celular autofágica..... | 45 |
| 1.2. Morte celular induzida por metais..... | 48 |
| 1.3. Manganês..... | 48 |
| 1.3.1. Mecanismos de citotoxicidade..... | 49 |
| 2. OBJETIVOS..... | 54 |
| 2.1. Objetivo Principal..... | 54 |
| 2.2. Objetivos secundários..... | 54 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 55 |
| 3.1. Cultura de células..... | 55 |
| 3.2. Determinação da apoptose por morfologia celular..... | 56 |
| 3.3. Medida do conteúdo de DNA e ciclo celular..... | 56 |
| 3.4. Marcação de células apoptóticas com <i>Annexin V</i> | 57 |
| 3.5. Marcação de células com DiOC ₆ | 57 |
| 3.6. Medida da atividade das caspases 3 e 7..... | 57 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.7. Análise da morfologia nuclear..... | 58 |
| 3.8. Fragmentação de DNA internucleossomal..... | 58 |
| 3.9. Western blot..... | 59 |
| 3.10. Extração de RNA..... | 62 |
| 3.11. Tratamento com DNase..... | 62 |
| 3.12. Síntese de cDNA..... | 63 |
| 3.13. Reação de PCR quantitativo..... | 63 |
| 3.14. Quantificação do níveis de expressão..... | 66 |
| 3.15. Análise estatística..... | 68 |
| 4. RESULTADOS..... | 69 |
| 4.1. O manganês é capaz de induzir morte celular em várias linhagens hematopoiéticas..... | 69 |
| 4.2. A morte celular induzida pelo manganês é dose- e tempo- dependente..... | 74 |
| 4.3. A morte celular induzida pelo manganês apresenta diversas características da apoptose..... | 76 |
| 4.4. A morte celular induzida pelo manganês pode ser impedida pela superexpressão de Bcl-xL..... | 86 |
| 4.5. A sensibilidade ao manganês é célula-específica..... | 88 |
| 4.6. O manganês não é capaz de interferir no ciclo celular..... | 90 |
| 4.7. O manganês não apresenta efeito sinérgico com quimioterápicos..... | 92 |
| 4.8. A autofagia tem papel protetor na morte celular induzida pelo manganês na linhagem HL-60..... | 95 |
| 4.9. Manganês induz morte celular em diversas linhagens tumorais..... | 98 |
| 4.10. A sensibilidade ou resistência das linhagens celulares ao manganês é específica | 100 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.11. Expressão diferencial de genes reguladores da apoptose entre diferentes linhagens tumorais..... | 104 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 109 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 121 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 123 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Morte celular programada

Uma relação apropriada entre sobrevivência e morte das células que compõem nosso organismo é crucial durante o desenvolvimento embrionário e fundamental para a manutenção da homeostase em indivíduos adultos. Dessa maneira, uma alteração desse balanço em qualquer direção pode causar doenças graves. Neste sentido, o bloqueio do processo natural de morte celular pode contribuir para o aparecimento de tumores ou doenças auto-imunes.

Nas últimas décadas, o termo morte celular programada foi considerado um sinônimo de apoptose, um processo de morte caracterizado por mudanças morfológicas como diminuição do volume celular, condensação da cromatina, e desintegração da célula em fragmentos chamados corpos apoptóticos que podem ser removidos por fagocitose. Além da apoptose, outra forma de morte celular havia sido descrita, a necrose, referida como uma forma de morte caótica caracterizada por edema celular e rompimento da membrana celular levando à liberação dos componentes intracelulares e resposta inflamatória tecidual (Bröker *et al.*, 2005).

Recentemente, a clássica dicotomia apoptose e necrose é evidenciada como uma simplificação de processos altamente sofisticados que preservam o organismo da geração e propagação de células indesejáveis e/ou potencialmente perigosas. Assim, a nomenclatura mais recente descreve quatro tipos de morte celular programada: apoptose; morte celular autofágica; necrose, não sendo mais descrita como um fenômeno passivo; e cornificação, que ocorre estritamente em células epiteliais da epiderme (Galluzzi *et al.*, 2009).

1.1.1. Apoptose

A apoptose é o tipo de morte celular programada mais bem estudado por ter sido o primeiro a ser descrito. O termo apoptose foi proposto por Currie e colaboradores em 1972 para descrever um tipo comum de morte celular programada que os autores observaram em diversos tecidos e tipos celulares. Os autores observaram que essas células em processo de morte compartilhavam diversas características morfológicas, como diminuição do volume celular, condensação nuclear e fragmentação celular em corpos apoptóticos.

A apoptose pode ser iniciada por diferentes estímulos como, por exemplo, privação de fatores de crescimento, sinalização proveniente de outras células ou alguma forma de dano/estresse celular. Existem duas vias apoptóticas principais, denominadas Via Intrínseca e Via Extrínseca (Amarante-Mendes & Green, 1999). No primeiro caso, estímulos provenientes do interior das células, como por exemplo, lesões no RNA ou DNA, desestruturação do citoesqueleto, alterações no retículo endoplasmático ou modificações citoplasmáticas são capazes de induzir apoptose através da indução da liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol. O citocromo c liberado é capaz de formar um complexo heptamérico com as proteínas Apaf-1 e caspase-9 e dATP, conhecido como apoptossomo. Somente no contexto deste complexo, moléculas de caspase-9 são capazes de ativar proteoliticamente as caspases efetoras -3, -6 e -7, resultando na clivagem de substratos específicos e nas mudanças morfológicas e bioquímicas que caracterizam a apoptose. Por outro lado, a presença de proteínas da família do fator de necrose tumoral (FasL, TNF- α e TRAIL) no espaço extracelular pode desencadear, através da estimulação de seus receptores específicos denominados receptores de morte (Fas, TNFR1 e DR4/DR5, respectivamente), uma cascata bioquímica que se inicia pela ativação das caspases-8 e -10.

Estas caspases iniciadoras podem ativar diretamente as caspases efetoras, ou integrar as duas vias de sinalização apoptótica, clivando a proteína pró-apoptótica Bid, a qual irá se deslocar do citosol para a mitocôndria, ativando a Via Intrínseca como descrito acima. Bid é um dos membros da família Bcl-2, que será mais bem descrita a seguir (Figura 1).

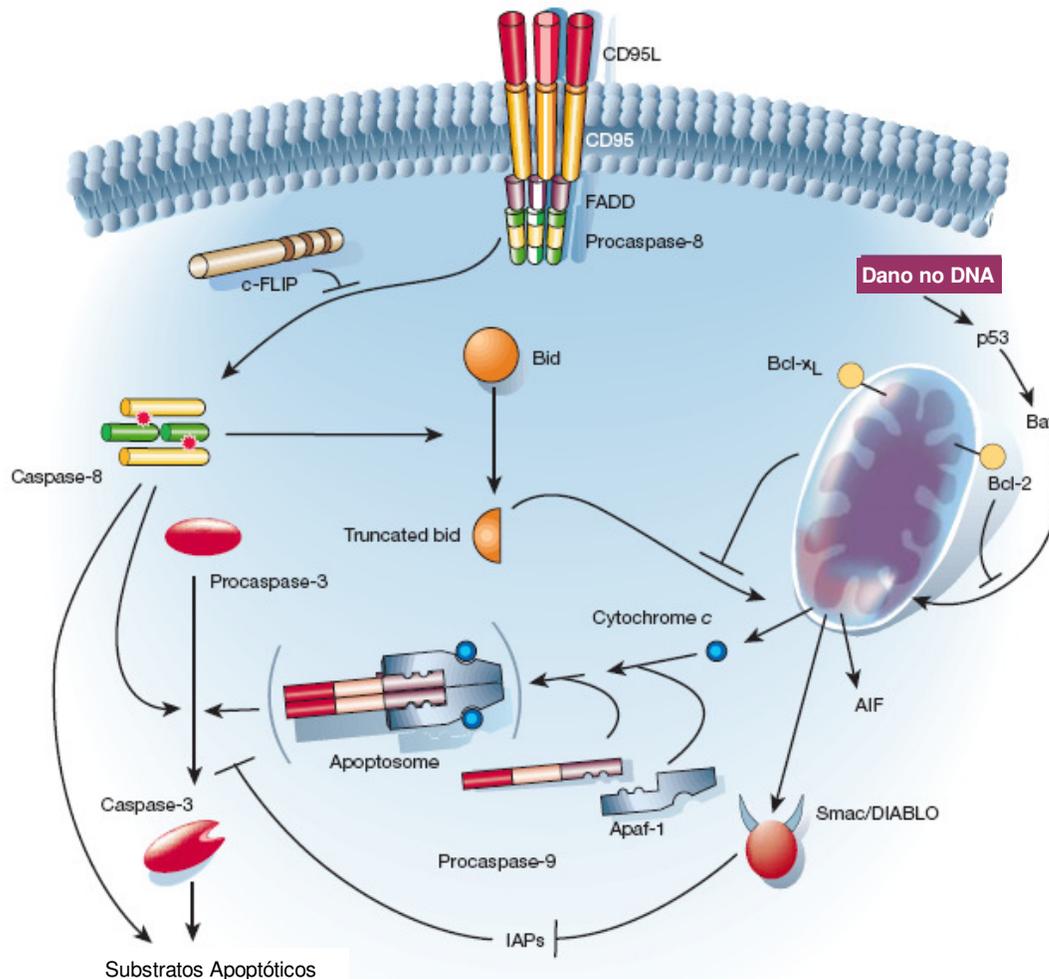


Figura 1. As duas principais vias apoptóticas. A via extrínseca é ativada por ligantes provenientes do meio extracelulares que ativam as caspases iniciadoras –8 e –10 através da interação com os receptores de morte. A via intrínseca é ativada por estímulos intracelulares, como dano ao DNA, que levam um sinal à mitocôndria, levando a sua permeabilização e liberação de proteínas pró-apoptóticas com posterior ativação da caspase-9. Essas duas vias são capazes de ativar caspases efetoras, como a caspase-3, que levam à apoptose (Hengartner, 2000).

A maioria das mudanças morfológicas observadas por Currie em 1972 foram associadas à ativação de cisteína proteases especificamente ativadas em células apoptóticas. Essas proteases são homólogas entre si e são parte de uma família de proteínas conhecidas como caspases. Caspases são altamente específicas e clivam seus substratos após um tetrapeptídeo específico (P4-P3-P2-P1), onde P1 é um resíduo de ácido aspártico. Os outros aminoácidos são específicos para cada caspase da família. As caspases são sintetizadas como enzimas precursoras inativas, ou proenzimas, e têm uma estrutura de domínios similar compreendendo um pro-peptídeo seguido por subunidades grandes e pequenas. O pro-peptídeo pode ter comprimento variável e, no caso de caspases iniciadoras, pode ser usado para recrutar enzimas ou formar uma estrutura de ativação como o apoptossomo. Dois pro-peptídeos distintos foram identificados, o CARD (*caspase recruitment domain*) e o DED (*death effector domain*), que normalmente facilitam a interação com proteínas que contêm os mesmos motivos (Taylor *et al.*, 2008).

Essas proteases estão normalmente inativas dentro da célula saudável, mas em resposta a estímulo apoptótico são convertidas em enzimas ativas. A ativação das caspases é normalmente iniciada por processamento proteolítico entre as subunidades grandes e pequenas para formar um heterodímero. Esse evento de processamento rearranja o sítio ativo das caspases na sua conformação ativa. Elas funcionam tipicamente como heterotetrâmeros, que são formados pela dimerização de dois heterodímeros. As caspases podem ser subdivididas entre iniciadoras, que são capazes de se auto-ativar e iniciar processamento proteolítico de outras caspases; e efetoras, que são ativadas por outras caspases (Figura 2). As caspases efetoras clivam a grande maioria de substratos durante a apoptose. Já as caspases iniciadoras podem ser ativadas por clivagem proteolítica induzida por proximidade através de oligomerização dos receptores de morte causada pelo ligante no

caso da via extrínseca, ou através da formação do apoptossomo na via intrínseca, em que o citocromo c mitocondrial se associa a Apaf-1, dATP e 7 dímeros de caspase-9 (Taylor *et al.*, 2008).

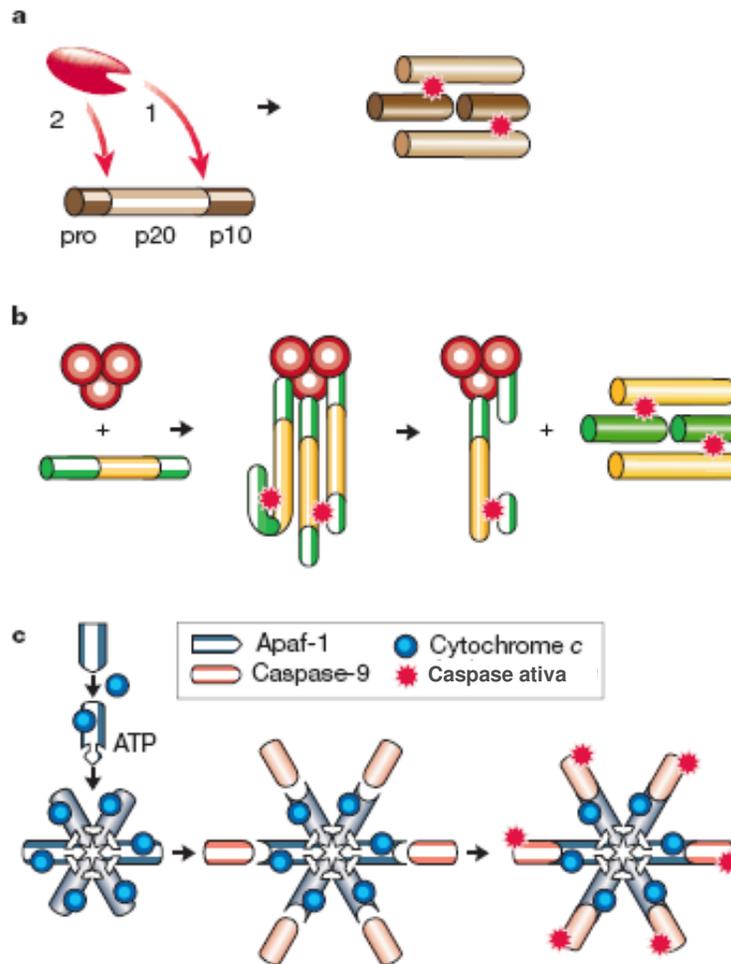


Figura 2. Mecanismos de ativação de caspase. (a) Clivagem proteolítica por uma caspase iniciadora. Esse mecanismo é bastante efetivo e unidirecional. (b) Clivagem proteolítica por proximidade. Nesse mecanismo, recrutamento ou agregação de múltiplas moléculas de procaspase-8 resulta em ativação cruzada. (c) Formação de holoenzima. A oligomerização dependente de ATP de Apaf-1 e citocromo c permite o recrutamento de procaspase-9 em um complexo chamado de apoptossomo. Ativação da caspase-9 é mediada por mudança conformacional e não proteólise (Hengartner, 2000).

1.1.1.1. Via Extrínseca

Uma subfamília da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNF-R) pode recrutar e ativar caspases em resposta a sinais extracelulares específicos. Como a consequência do recrutamento de caspases geralmente é a morte celular, esses receptores são conhecidos como receptores de morte. No entanto, eles também podem alternativamente transmitir sinais de sobrevivência ou diferenciação. Membros da família de receptores TNF compartilham domínios extracelulares ricos em cisteínas. Além disso, os receptores de morte são definidos por um domínio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos chamado domínio de morte (DD), que tem papel crucial na transmissão do sinal de morte da superfície da célula para vias de sinalização intracelulares (Contassot *et al.*, 2007).

Até o momento, oito receptores de morte foram identificados: Fas (CD95, Apo-1), TRAIL-R1 (DR4) e 2 (DR5, Apo-2), TNF-R1, TRAMP (WSL-1, Apo-3), EDAR, p75NTR, e DR6. Apesar de seus nomes, nem todos esses receptores induzem morte celular apoptótica. De fato, cada receptor pode disparar vias de sinalização específicas. A via de sinalização de morte prototípicas desses receptores é a via disparada por Fas. Após exposição ao seu ligante, o receptor multimeriza, recrutando a proteína adaptadora FADD através de interação homotípica de seus DDs (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998). FADD, por sua vez, liga a caspase-8 por interação homotípica entre seus domínios efetores de morte (DED). O complexo resultante é chamado de complexo de sinalização indutor de morte (DISC). O recrutamento de caspase-8 através de FADD no DISC leva ao autoprocessamento da caspase-8, evento responsável pela sua ativação (Salvesen e Dixit, 1999). Uma vez ativa, a caspase-8 ativa cliva as caspases efetoras -3 e -7 ativando-as e

fazendo com que as células entrem em apoptose como consequência da clivagem de várias proteínas vitais por estas caspases efetoras (Fischer *et al.*, 2003).

TRAIL é um dos ligantes que mais tem atraído atenção nos últimos anos por induzir mais morte celular em células tumorais do que em células normais (Ryu *et al.*, 2000). Isso é causado pelo fato de células tumorais, em geral, apresentarem uma maior expressão dos receptores TRAIL-R1 (DR4) e -R2 (DR5), que são capazes de transduzir um sinal de morte celular, e uma menor expressão TRAIL-R3 e -R4, conhecidos como *decoy* e não são capazes de transduzir sinal de morte através da membrana. Os receptores mais bem estudados são DR4 e DR5, que podem transduzir sinais pró-apoptóticos, mas também sinais não-apoptóticos. Ainda não foi descrito como a célula escolhe entre os dois tipos de sinalização (Falschlehner *et al.*, 2007).

1.1.1.2. Via Intrínseca e a família Bcl-2

A liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol é fundamental para a formação do apoptossomo e subsequente ativação de caspases na via de apoptose intrínseca. O mecanismo pelo qual ocorre a liberação do citocromo c ainda é controverso, mas existem inúmeras evidências de que os membros da família de proteínas Bcl-2 são mediadores chave para essa liberação no contexto do estímulo apoptótico. A família de proteínas Bcl-2 é composta por inúmeros membros que, de acordo com sua estrutura e função, podem ser divididos em três subfamílias. Uma delas é a subfamília dos membros anti-apoptóticos, que apresentam quatro domínios de homologia à Bcl-2 (*Bcl-2 homology – BH1-4*) e tem como membros as proteínas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1 e Bcl-B. As duas outras subfamílias são compostas por membros pró-apoptóticos, que podem ter três

domínios BH (BH1-3), como Bax, Bak e Bok, ou apenas o domínio BH-3, chamadas de BH3-*only*, como Bim, Bad, Bik, Bid, Noxa, Puma, Bmf e Hrk (Figura 3) (Taylor *et al.*, 2008).

As proteínas responsáveis pela permeabilização da membrana externa mitocondrial são Bax e Bak, e sua atividade seria controlada pelos membros anti-apoptóticos e BH3-*only* de maneiras distintas. Em células saudáveis, Bax existe como um monômero citosólico (Hsu e Youle, 1998), enquanto Bak reside na membrana externa mitocondrial onde parece estar ligado a Mcl1 (Cuconati *et al.*, 2003) e Bcl-xL (Willis *et al.*, 2005). Na ausência de estímulo apoptótico, acredita-se que os membros anti-apoptóticos da família impeçam a permeabilização mitocondrial pelos membros pró-apoptóticos Bax e Bak através de uma interação direta entre essas proteínas. Após a indução de apoptose, membros pró-apoptóticos BH3-*only* seriam capazes de se ligarem a uma cavidade hidrofóbica formada pelos domínios BH1-3 nos membros anti-apoptóticos, liberando as proteínas Bax e Bak da inibição. Bax sofreria uma mudança conformacional, integrando a membrana externa mitocondrial através de seu C-terminal (Cartron *et al.*, 2002) onde oligomerizaria assim como Bak. Acredita-se que a oligomerização de Bax e Bak cause a permeabilização da membrana externa mitocondrial ou ativação das proteínas responsáveis pela permeabilização mitocondrial permitindo o efluxo de proteínas apoptóticas para o citosol (Hunter *et al.*, 2007). Com base nesse modelo, as proteínas BH3-*only* parecem ser iniciadoras da apoptose em resposta a dano intracelular mas não podem induzir morte celular na ausência de Bax e Bak. Além desse modelo, atualmente já se sabe que alguns membros BH3-*only*, como Bim e Bid, poderiam interagir e ativar Bax e/ou Bak diretamente (Taylor *et al.*, 2008).

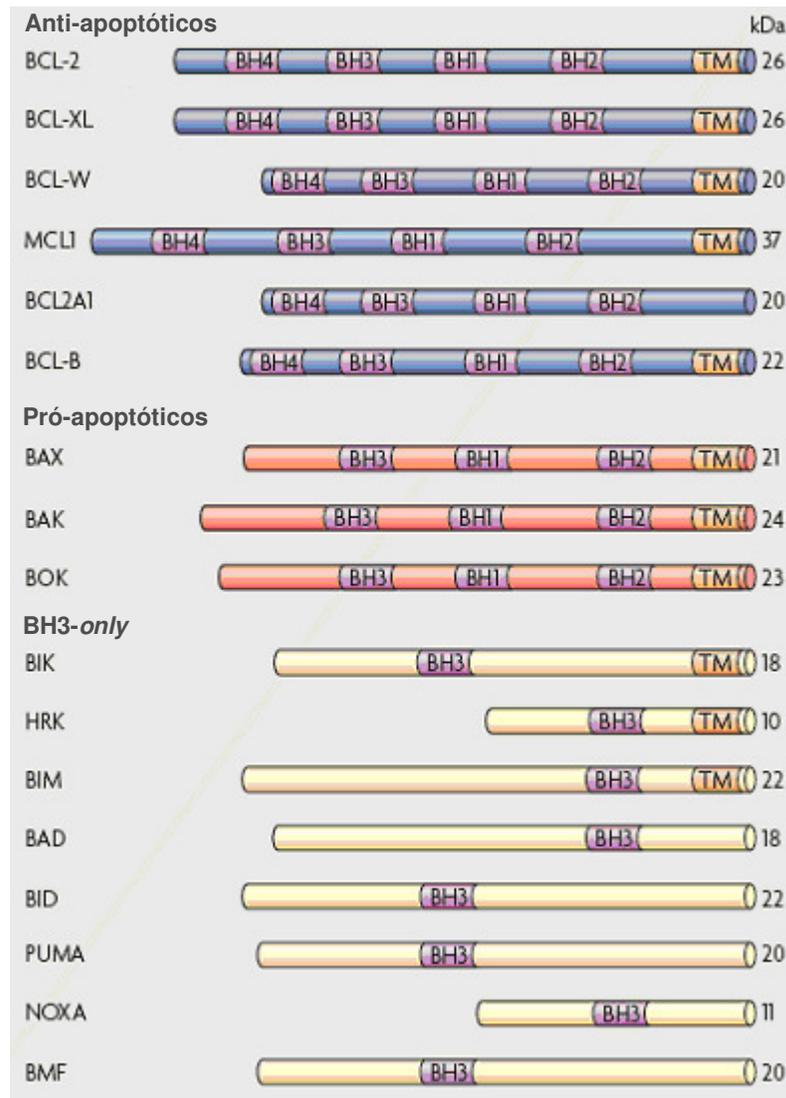


Figura 3. Família de proteínas Bcl-2. Os membros da família Bcl-2 podem ser divididos em três grupos de acordo com sua estrutura e função. Os membros anti-apoptóticos normalmente contêm quatro domínios BH. Os membros pró-apoptóticos multi-domínios não apresentam o domínio BH4. Finalmente, existem os membros pró-apoptóticos BH3-only que apresentam apenas o domínio BH3 (Taylor *et al.*, 2008).

As proteínas responsáveis pela permeabilização da membrana externa mitocondrial são Bax e Bak, e sua atividade seria controlada pelos membros anti-apoptóticos e BH3-*only* de maneiras distintas. Em células saudáveis, Bax existe como um monômero citosólico (Hsu e Youle, 1998), enquanto Bak reside na membrana externa mitocondrial onde parece estar ligado a Mcl1 (Cuconati *et al.*, 2003) e Bcl-xL (Willis *et al.*, 2005). Na ausência de estímulo apoptótico, acredita-se que os membros anti-apoptóticos da família impeçam a permeabilização mitocondrial pelos membros pró-apoptóticos Bax e Bak através de uma interação direta entre essas proteínas. Após a indução de apoptose, membros pró-apoptóticos BH3-*only* seriam capazes de se ligar a uma cavidade hidrofóbica formada pelos domínios BH1-3 nos membros anti-apoptóticos, liberando as proteínas Bax e Bak da inibição. Bax sofreria uma mudança conformacional, integrando a membrana externa mitocondrial através de seu C-terminal (Cartron *et al.*, 2002) onde oligomerizaria assim como Bak. Com base nesse modelo, as proteínas BH3-*only* parecem ser iniciadoras da apoptose em resposta a dano intracelular mas não podem matar na ausência de Bax e Bak. Além desse modelo, atualmente já se sabe que alguns membros BH3-*only*, como Bim e Bid, poderiam interagir e ativar Bax e/ou Bak diretamente (Figura 4) (Taylor *et al.*, 2008).

A proteína anti-apoptótica Bcl-2 encontra-se inserida nas membranas do retículo endoplasmático, envelope nuclear e membrana externa mitocondrial através de seu domínio transmembrana hidrofóbico localizado no seu C-terminal, com a maioria de seus aminoácidos no citosol (Nguyen *et al.*, 1993; Lithgow *et al.*, 1994). Apesar de ser capaz de bloquear a apoptose em qualquer uma dessas localizações subcelulares, as funções de Bcl-2 no retículo endoplasmático e envelope nuclear são pouco conhecidas (Heath-Engel *et al.*, 2006; Pinton *et al.*, 2006).

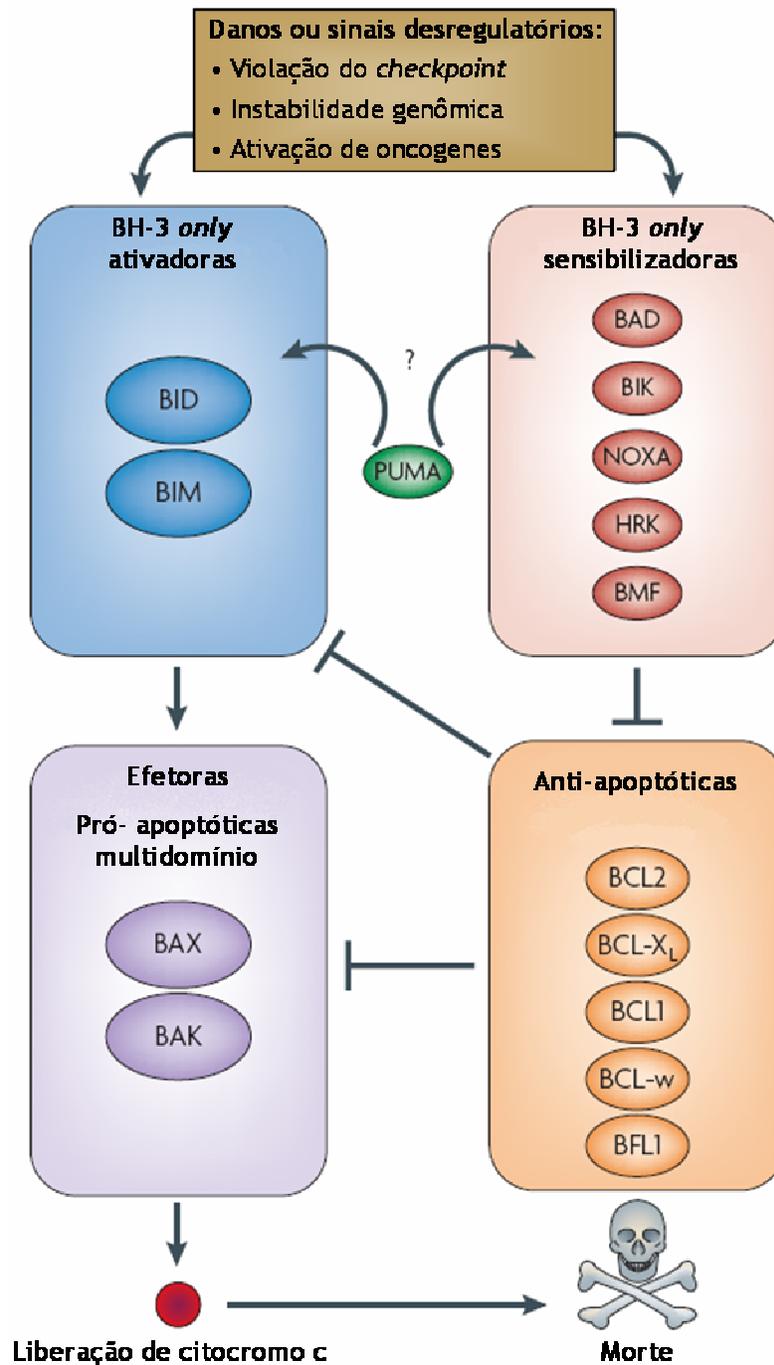


Figura 4. Diferentes modelos para ativação de Bax e Bak. No modelo de ativação direta as proteínas anti-apoptóticas ligam-se diretamente e inibem a atividade pró-apoptótica de Bax e Bak. Em resposta a estímulos de morte celular, proteínas BH3-*only* específicas são ativadas e, por sua vez, são capazes de se ligar e inativar proteínas anti-apoptóticas da

família Bcl-2 específicas. Bax e Bak são liberadas, podendo oligomerizar na membrana externa mitocondrial facilitando ou mediando a liberação de citocromo c e garantindo apoptose. Já pelo modelo hierárquico alguns membros da subfamília BH3-*only*, chamados de inativador inicial, ligam-se e inativam membros anti-apoptóticos da família Bcl-2. A ligação de um inativador inicial BH3-*only* desloca um ativador latente do sítio de ligação das proteínas anti-apoptóticas. A proteína BH3-*only* liberada se liga transientemente para ativar Bax e Bak, ou age em lipídeos ou outras proteínas celulares (como VDAC) para liberar Bax ou Bak de seu regulador negativo. Esse processo leva a oligomerização de Bax ou Bak na membrana externa mitocondrial facilitando ou mediando a liberação de citocromo c no citosol (Letai, 2008).

Enquanto Bcl-2 está constitutivamente ligada a membranas intracelulares, Bcl-xL (Hsu *et al.*, 1997; Hausmann *et al.*, 2000), Bcl-W (Wilson-Annan *et al.*, 2003) e Mcl1 (Nijhawan *et al.*, 2003) existem parcialmente no citosol e translocam para a mitocôndria durante a apoptose. A ligação com proteínas BH3-*only* parece ser o disparo de tal translocação, talvez deslocando o C-terminal de Bcl-xL (Jeong *et al.*, 2004) e Bcl-W (Wilson-Annan *et al.*, 2003) pela ocupação de seus “bolsos” hidrofóbicos. A translocação intracelular provavelmente correlaciona com mudanças conformacionais e profunda inserção de Bcl-xL e Bcl-w na membrana externa mitocondrial. Ainda não está claro se a translocação para a mitocôndria dos membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 representa um mecanismo inibitório de apoptose (Wilson-Annan *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004).

A regulação da morte celular é extremamente importante para que as células só iniciem tal processo quando realmente necessário. A regulação dos níveis de expressão das proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 é uma maneira pela qual as células podem regular a apoptose. Bcl-xL pode ser transcricionalmente induzida por fatores de crescimento através da via JAK-STAT (*janus kinase-signal transducer and activator of*

transcription) para promover a sobrevivência celular. Mcl1 é rapidamente degradada pelo sistema ubiquitina-proteassoma em resposta a privação de citocinas ou outros estímulos de morte como radiação ultravioleta, podendo também ser positivamente regulada no nível pós-transcricional para prevenir a apoptose por inibição da sua taxa de degradação (Zhong *et al.*, 2005; Cuconati *et al.*, 2003). A regulação dos níveis de expressão das proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak é menos aparente e, em muitos casos, essas proteínas parecem ser constitutivamente expressas em níveis constantes. No entanto, já foi demonstrado que a expressão gênica de Bax pode ser induzida por p53 (Burlacu, 2003). Bax e Bak também podem ser reguladas pós-transcionalmente por outros membros da família Bcl-2.

As proteínas BH3-*only* são pró-apoptóticas e funcionam como sensores iniciais dos sinais apoptóticos. A sua expressão pode ser induzida por fatores de transcrição. Noxa, Puma e, em menor extensão, Bid são induzidas pela proteína supressora de tumor p53 em resposta a dano no DNA (Wiens *et al.*, 2000; Oda *et al.*, 2000; Nakano e Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001). Bim é induzida por FOXO3A (*class O forkhead box transcription factor-3A*) em resposta a privação de fatores de crescimento (Dijkers *et al.*, 2000) e pelos fatores de transcrição CEBP α (*CCAAT-enhancer binding protein- α*) ou CHOP (*CEPB homologous protein*) em resposta a estresse de retículo endoplasmático (Puthalakath *et al.*, 2007).

As proteínas BH3-*only* também podem ser ativadas pós-traducionalmente através de diversos mecanismos. Bid é ativada por proteólise mediada por caspase-8, originando tBid (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Além disso, a região N-terminal de tBid também pode ser miristoilada aumentando a sua eficiência de translocação para a mitocôndria após clivagem por caspase-8 que causa a exposição de um resíduo de glicina (Zha *et al.*, 2000). Bik é

ativada por um mecanismo desconhecido em resposta a inibição de síntese protéica (Shimazu *et al.*, 2007). Já a proteína Bad é ativada por defosforilação em resposta a privação de fatores de crescimento e pode ser inativado por sinais provenientes de receptores de fatores de crescimento, que levam a sua fosforilação em diversos sítios e seqüestro por proteínas 14-3-3. BIM está acoplada aos microtúbulos e BMF, aos microfilamentos de actina, possivelmente através de interações com as proteínas cadeia leve de dineína-1 e -2. Uma desorganização do citoesqueleto pode liberar essas proteínas para promover apoptose (Puthalakath *et al.*, 1999; Puthalakath *et al.*, 2001). Além disso, fatores de crescimento estimulam a fosforilação de BIM dependente de ERK, resultando na sua degradação mediada por proteassoma. A retirada de fatores de crescimento resultam em um declínio da sinalização de ERK, aumentando os níveis de BIM (Akiyama *et al.*, 2003; Ley *et al.*, 2005).

Todos esses dados em conjunto mostram a importância dos membros da família Bcl-2 na morte celular por apoptose em resposta aos mais variados estímulos. Seus membros devem ter expressão e atividade finamente regulados para que a indução de morte só ocorra quando realmente necessário e, por isso, estão sujeitos aos mais variados tipos de regulação.

1.1.1.3. Permeabilização da membrana externa mitocondrial

A permeabilização da membrana externa mitocondrial (MEM) é uma etapa extremamente importante da via de sinalização apoptótica, já que diversas proteínas que estão normalmente confinadas à mitocôndria são liberadas e podem ter um papel importante na execução da morte celular. Dentre estas está o citocromo c, fundamental para

a formação do apoptossomo e indução de apoptose pela via intrínseca e, em algumas células, também pela via extrínseca. Outra proteína mitocondrial liberada é a Smac/DIABLO, importante opositora das IAPs. É na mitocôndria também que residem as proteínas AIF, HtrA2/OMI e endonuclease G, proteínas estas que também estão envolvidas em processos de morte celular programada diferentes da apoptose.

A maioria das evidências sugere que essa translocação mitocôndria-citoplasma envolve um processo de difusão simples através da abertura da MEM, já que inúmeras proteínas são liberadas simultaneamente durante a apoptose. A MEM normalmente não é permeável a proteínas e sua permeabilização é considerada o ponto sem retorno na via que leva à morte celular (Kroemer *et al.*, 2007; Chipuk *et al.*, 2006). Diversos mecanismos diretos e indiretos para a criação dessas aberturas foram propostos, e mecanismos diferentes devem atuar em diferentes circunstâncias.

A descoberta inicial de que a estrutura de Bcl-xL se parece com o domínio de translocação da toxina da difteria levou a proposta que Bcl-xL poderia formar poros na membrana (Muchmore *et al.*, 1996). A incubação de Bax com mitocôndria isolada induz a liberação de citocromo c (Jurgensmeier *et al.*, 1998), e incubação de Bax com lipossomos permite a liberação de grande moléculas de dextran (mais de 10^6 Da) (Kuwana *et al.*, 2002). Bcl-xL inibe a liberação de citocromo c induzida por Bax em mitocôndrias isoladas (Jurgensmeier *et al.*, 1998) e a liberação de dextran dos lipossomos (Kuwana *et al.*, 2005). Além disso, a proteína BH3-*only* Bid pode sinergizar com Bax para causar a liberação de citocromo c em ensaios *cell-free*, tanto ativando Bax como prevenindo que membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 inibam Bax e Bak. Assim, um modelo para a ativação de Bax e Bak é que eles formam grandes poros na MEM que permite a liberação de proteínas no citosol, induzindo a ativação de caspases. No entanto, a natureza bioquímica desse possível

poro bem como o número de moléculas de Bax que o compreendem ainda não é conhecido (Youle e Strasser, 2008).

Outro mecanismo potencial para a permeabilização da MEM envolve a proteína VDAC (*voltage dependent anion channel*), que também está presente na MEM (Kroemer *et al.*, 2007). Algumas isoformas de VDAC foram implicadas na liberação de citocromo c e outras proteínas durante a apoptose. Apesar da maioria dos estudos sugerir que os canais VDAC são pequenos e permitiriam a passagem de moléculas de aproximadamente 1,5kDa, Shimizu *et al.* descreveram uma configuração aberta de VDAC que poderia permitir a liberação das proteínas do espaço intermembrana mitocondrial (Shimizu *et al.*, 1999). Uma hipótese alternativa sugere que o fechamento dos canais VDAC levaria a uma hiperpolarização mitocondrial transiente resultando em desbalanço osmótico e ruptura da MEM (Kroemer *et al.*, 2007). Uma terceira possibilidade é que VDAC possa participar no poro de transição de permeabilidade (PTP), um complexo grande e multimérico que se acredita ser composto por proteínas localizadas tanto na membrana externa quanto na interna da mitocôndria (Garrido *et al.*, 2006). Apesar de VDAC interagir com Bak (Cheng *et al.*, 2003), assim como com várias proteínas anti-apoptóticas (Kinnally e Antonsson, 2007), camundongos *Vdac1/Vdac2/Vdac3* triplo *knockout* apresentam apoptose normal (Baines *et al.*, 2007), indicando pequeno ou nenhum papel para as proteínas VDAC na regulação das proteínas da família Bcl-2 e da permeabilização da MEM (Ow *et al.*, 2008).

1.1.1.4. Proteínas Inibidoras da Apoptose

Uma outra família extremamente importante na regulação da apoptose e que tem membros superexpressos em muitos tumores é a família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). Todos os membros dessa família compartilham o domínio BIR, que permite a alguns membros a interação e inibição das caspases. Em adição ao BIR, as IAPs podem apresentar outros domínios funcionais como o domínio RING, com atividade E3 –ligase e que parece direcionar alvos para a degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma (Eckelman *et al.*, 2006).

Dentre as IAPs, a inibidora de caspases mais potente é a proteína XIAP. Essa proteína é composta de três domínios BIR e um domínio RING. Experimentos de mapeamento mostraram que o domínio BIR2 é capaz de inibir diretamente as caspases -3 e -7, enquanto o BIR3 é capaz de inibir a caspase-9. Além disso, esta caspase apresenta uma cavidade de interação com o motivo de ligação a IAP (IBM). Certas proteínas, como Smac/DIABLO, que contêm o IBM são capazes de antagonizar a atividade de XIAP e induzir apoptose (Vaux e Silke, 2005).

IAP celular 1 (cIAP1) e cIAP2 consistem de três domínios BIR e um domínio RING (*really interesting new gene*), e são os parálogos mais próximos de XIAP. Similar a XIAP, a superexpressão de cIAPs protege as células da apoptose. Esses membros, apesar de serem capazes de interagir com as caspases, são capazes de inibir sua função apenas indiretamente. Elas foram identificadas primeiramente por homologia e pela sua associação em um complexo com o TNFR2. O recrutamento dessas IAPs para o complexo requer a presença das proteínas TRAF-1 e -2 e é mediado pela interação entre os domínios BIR das IAPs e os domínios TRAF. O complexo TNFR1 também é capaz de recrutar cIAP1 através

de sua interação com TRAF2 e TRADD. O receptor de TNF é capaz de mediar sinais de sobrevivência e morte. Assim, enquanto os sinais de sobrevivência são transduzidos por interações TRAF2/cIAP1, sinais pró-apoptóticos são mediados por TRADD/FADD interagindo com caspase-8 (Hunter *et al.*, 2007).

Estudos recentes nos domínios RING de XIAP e cIAP1 mostraram que esse domínio está envolvido na ubiquitinação e degradação das IAPs em resposta a estímulos apoptóticos (Figura 5). Após o tratamento com glicocorticóides ou etoposídeo, a degradação de XIAP e cIAP1 induzida por Smac ocorre de maneira rápida e dependente de proteassoma, podendo ser bloqueada na presença de inibidores de proteassoma (Yang *et al.*, 2000). Outros estudos mostraram que XIAP e cIAP1 são capazes de promover a ubiquitinação e degradação proteassomal das caspases -3 e -7, aumentando assim o efeito anti-apoptótico das IAPs (Suzuki *et al.*, 2001).

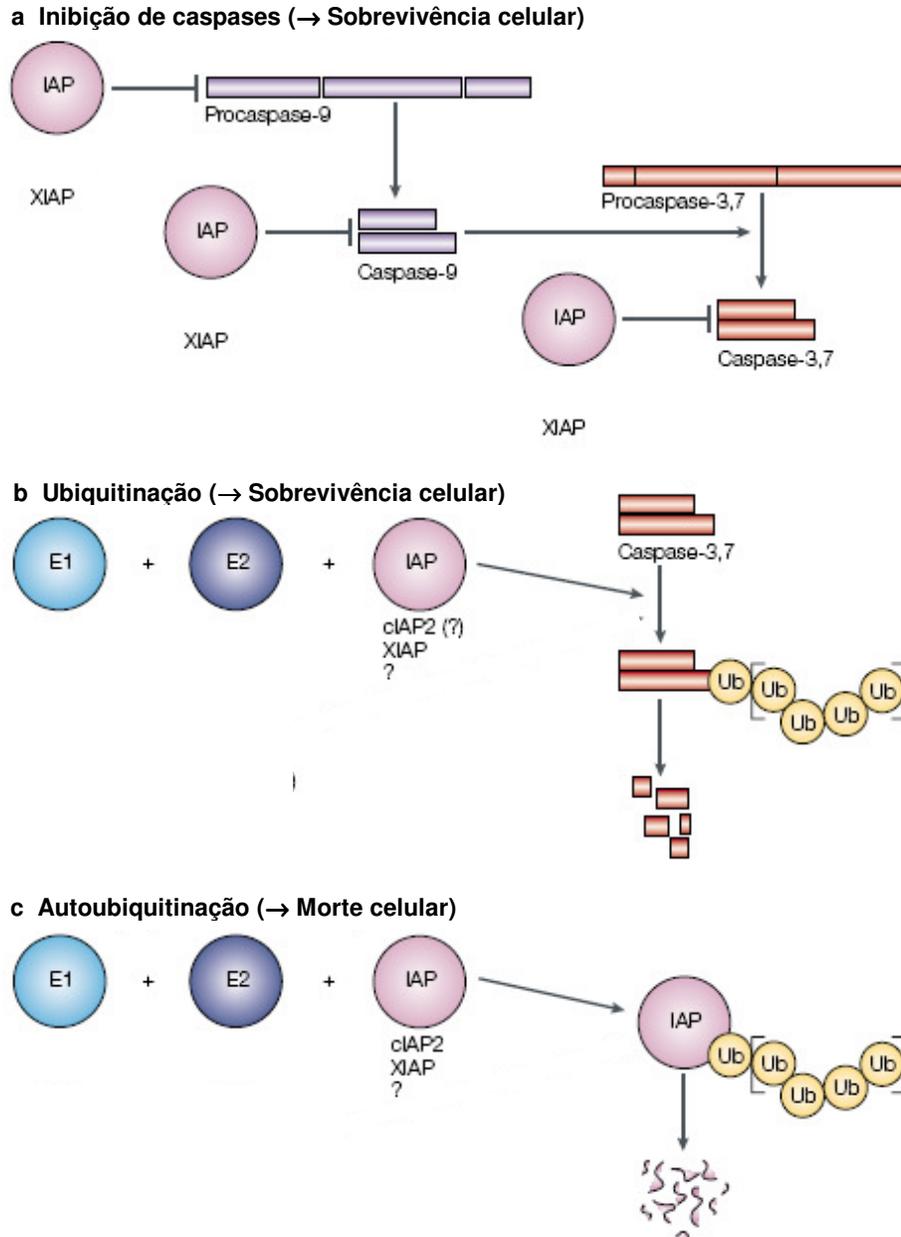


Figura 5. Modos de atuação das IAPs para inibir a apoptose. XIAP pode se ligar diretamente às caspases ativadas e inibir sua atividade. O *RING-finger* das proteínas XIAP e cIAP2 parecem promover a ubiquitinação das caspases efetoras ativadas. A atividade E3 de XIAP direciona a caspase-3 para degradação, aumentando o efeito inibitório na apoptose de XIAP. Por fim, XIAP e cIAP1 são ubiquitinadas e degradadas por proteassomas em resposta à estímulos apoptóticos nas células T, e sua degradação parece ser importante para o comprometimento das células T com a morte celular (Adaptado de Jesenberger e Jentsch, 2002).

1.1.2. Morte celular autofágica

A menor incidência de morte celular pode promover formação e progressão tumoral. Grande parte das terapias atuais para o tratamento do câncer tem como objetivo a morte das células tumorais através da indução de apoptose. Entretanto, seja devido à superexpressão de genes anti-apoptóticos ou mutações em genes pró-apoptóticos, o surgimento de resistência aos tratamentos é inevitável. Assim, o estudo dos mecanismos de formas alternativas de morte celular tem sido bastante incentivado.

Uma dessas formas alternativas de morte celular é a morte celular autofágica. O papel da autofagia na sobrevivência e morte celular ainda está bastante controverso. A autofagia pode de fato proteger as células contra a morte, mas também pode mediar sua degeneração dependendo de circunstâncias específicas. Seus efeitos citotóxicos podem ser explicados pelo potencial autodestrutivo direto de excessiva autofagia (morte celular tipo II) ou, alternativamente pela conexão do processo autofágico com sinais pró-apoptóticos (morte celular tipo I). Nesse sentido, descobertas recentes em modelos de animais transgênicos (Qu *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 2003) e células de cultura após *knockdown* de genes de autofagia (Yu *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2004) sugerem fortemente que a autofagia é de fato um mecanismo supressor de tumor (Kondo *et al.*, 2005).

No nível molecular, a autofagia começa com a etapa de engolfamento de material citoplasmático (citosol e/ou organelas) pela fagoforo (também chamado de membrana de isolamento), que seqüestra material citoplasmático em vesículas de membrana dupla chamadas autofagossomos ou vacúolos autofágicos. Essa etapa pode ser inibida pela 3-metiladenina (3-MA). Em geral, o primeiro processo regulatório envolve a repressão da serina/treonina cinase mTOR, que inibe a autofagia através da fosforilação da proteína

Atg13. Essa fosforilação leva à dissociação de Atg13 de um complexo protéico que contém a cinase Atg1 e Atg17, atenuando então a atividade da cinase Atg1. Quando mTOR é inibido, a re-associação de Atg13 defosforilada com Atg1 estimula sua atividade catalítica e induz autofagia. Entre as etapas iniciais está a ativação da proteína de mamífero Vps34, uma fosfatidilinositol3-cinase (PI3K) classe III, gerando fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P). A ativação de Vps34 depende da formação de um complexo multiprotéico em que participam beclina-1 (Becn1; o ortólogo de mamífero de Atg6), UVRAG (*UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene*) e uma cinase miristoilada, Vps15, ou p150 em humanos (Figura 6) (Maiuri *et al.*, 2007).

Dois sistemas de conjugação parecidos com o utilizado pelo sistema ubiquitina/proteassoma são parte do processo de alongamento. Uma via envolve a conjugação covalente de Atg12 a Atg5, com a ajuda da enzima E1-like Atg7 e a enzima E2-like Atg10. A segunda via envolve a conjugação de fosfatidiletanolamina (PE) a LC3/Atg8 (LC3 é um dos homólogos de Atg8 em mamíferos), pela ação sequencial da protease Atg4, a enzima E1-like Atg7 e a enzima E2-like Atg3. A conjugação de lipídeo leva a conversão da forma solúvel de LC3, chamada LC3-I, para uma forma associada à vesícula autofágica, LC3-II. LC3-II é utilizada como marcador de autofagia por que sua lipidação e recrutamento específico para os autofagossomos fornece uma mudança de marcação de proteína que passe de difusa para pontual e aumenta sua mobilidade eletroforética em géis quando comparada com LC3-I. Além disso, proteínas de fusão LC3-GFP podem ser utilizadas para visualizar autofagossomos por microscopia de fluorescência. O mecanismo de recuperação em que o complexo Atg9 participa é pouco conhecido. Autofagossomos podem maturar por fusão com lisossomos para gerar autolisossomos. Nos autolisossomos, a membrana interna assim como o conteúdo luminal dos vacúolos autofágicos é degradado

por enzimas lisossomais que apresentam atividade ótima em compartimentos ácidos (Maiuri *et al.*, 2007) (Figura 6).

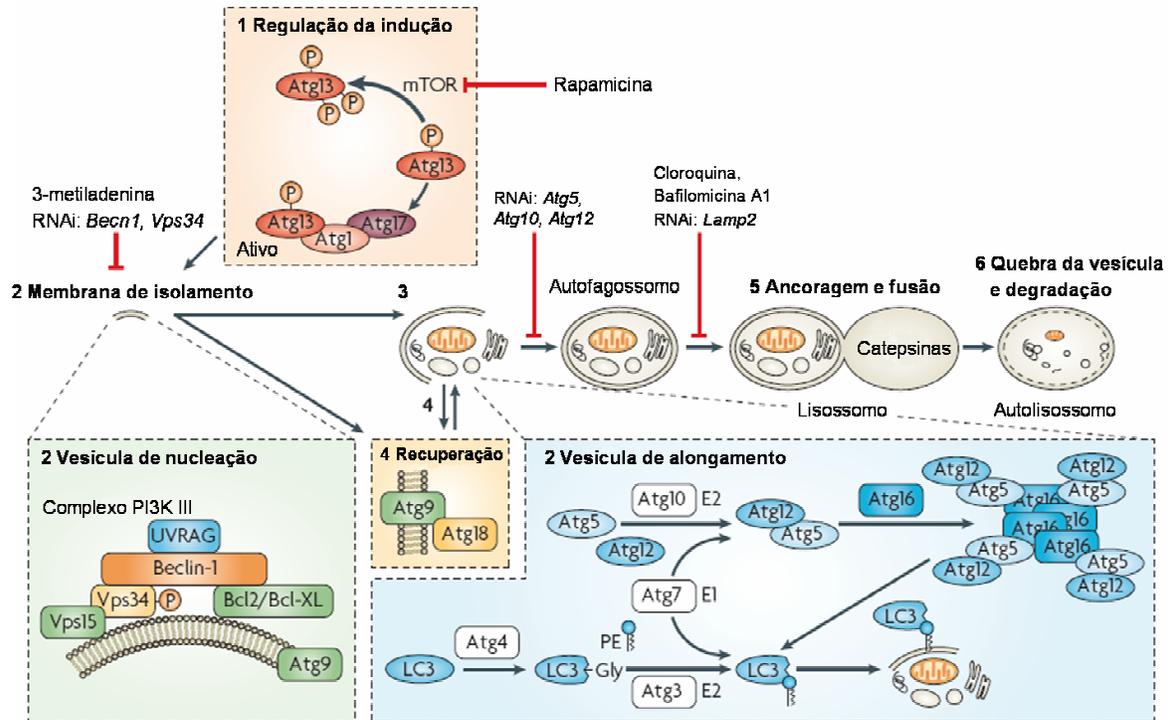


Figura 6. Etapas do processo autofágico. Vias de sinalização específicas são capazes de estimular a autofagia que começa com o aparecimento de uma membrana de isolamento. Essa membrana cresce e envolve material citoplasmático originando um autofagossomo. Em seguida, ocorre a sua fusão com um lisossomo e há a degradação de seu conteúdo. Diversas proteínas e duas vias de conjugação são essenciais para esse processo (Maiuri *et al.*, 2007).

1.2. Morte celular induzida por metais

Agentes capazes de induzir ou potencializar a morte celular na terapia anti-tumoral é algo extremamente desejável e tem sido objeto de estudo em diversos laboratórios científicos de ponta no mundo inteiro. Neste sentido, é interessante ressaltar que vários metais são conhecidos por serem citotóxicos e induzirem morte celular. O arsênico foi o primeiro metal a ser estudado e é utilizado no tratamento de leucemia mielóide crônica há vários anos. A cisplatina é um outro composto a base de metal também amplamente utilizado na clínica atualmente. Recentemente, o papel de diversos outros metais como zinco, cobre, magnésio e até ouro, na progressão tumoral e quimioterapia têm sido estudados.

1.3. Manganês

O manganês, junto com outros metais, é considerado um elemento traço, pois é necessário em pequenas quantidades para o crescimento, desenvolvimento e fisiologia normal do organismo (Roth and Garrick, 2003). Ele é essencial em diversos processos biológicos responsáveis pela regulação da reprodução, formação de tecido conectivo e ósseo, metabolismo de carboidratos e lipídeos, além de ser importante na função cerebral. A concentração nos tecidos costuma variar de 3 a 20 μ M, mas pode chegar a 200 μ M durante o desenvolvimento de certas regiões cerebrais (Chan *et al.*, 1992).

Suas ações biológicas *in vivo* são bastante diversificadas, já que é componente essencial de várias enzimas responsáveis pela regulação metabólica fisiológica da célula,

como galactosiltransferase, piruvato carboxilase, arginase, dipeptidases, piruvato carboxilase e superóxido dismutase 2 (MnSOD).

Um desbalanço de manganês no organismo pode ter conseqüências graves. Enquanto que a sua deficiência pode resultar em déficit neurológico e comportamental, a intoxicação por manganês, geralmente ocasionada por exposição ambiental, leva a uma doença similar ao Mal de Parkinson (Roth e Garrick, 2003).

1.3.1. Mecanismos de citotoxicidade

Os mecanismos envolvidos na citotoxicidade do manganês parecem envolver a ativação de vias de sinalização apoptóticas, estresse oxidativo e alteração do metabolismo celular. Alguns trabalhos mostram que parte da citotoxicidade é devido ao seu transporte para a mitocôndria por um canal de Ca^{+2} .

A maior parte dos trabalhos foi realizada em linhagens neuronais e gliais. Nessas linhagens, foi demonstrado que o manganês é transportado para dentro das células por transportadores específicos (Roth, 2002). Dentro das células, acredita-se que o manganês seja capaz de entrar na mitocôndria, diminuindo a atividade de enzimas do ciclo de Krebs, complexo I e F1 ATPase (Roth, 2002). O estresse celular causado pelo manganês leva à ativação de diferentes vias de sinalização bioquímicas, entre as quais a ativação de p38 e JNK, culminando na apoptose.

Em células de glia, o manganês também é capaz de modular a expressão gênica aumentando, entre outras coisas, a expressão de citocinas próinflamatórias (Filipov *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2007). A análise do perfil de expressão gênica por *microarray* em cultura primária de astrócitos tratada com 200 μM de MnCl_2 por 7 dias

mostrou que 28 genes de quimiocinas pró-inflamatórias foram regulados positivamente como CXCL3, CXCL6, CXCL2, CXCL14, CCL7 e defensina beta, enquanto genes envolvidos em controle do ciclo celular, reparo de DNA e *checkpoint* tiveram expressão diminuída. O tratamento com 10 μ M ou 50 μ M por 7 dias não levou a um aumento dos transcritos de SOD2 ou CXCL2. Sessenta e oito genes responsivos ao manganês tiveram a mesma alteração de expressão em condições de hipóxia. Além disso, o manganês levou os astrócitos a acumularem na fase S do ciclo celular como demonstrado por citometria de fluxo consistente com o efeito de Mn⁺² em genes do ciclo celular. O cátion de manganês também levou a uma diminuição no crescimento da cultura, no entanto mesmo após duas semanas de tratamento com 200 μ M não foram observadas células apoptóticas por ensaio de TUNEL e liberação de LDH no meio (Sengupta *et al.*, 2007).

O manganês também é capaz de induzir apoptose em células B (Schantz *et al.*, 1999). O tratamento com concentrações até mesmo menores que 100 μ M levam a inibição da proliferação e aparecimento de aspectos de apoptose como: diminuição do volume e aumento da granulosidade, aumento da população subdiploide, exposição de fosfatidilserina, condensação nuclear e fragmentação do DNA. Além disso, a apoptose induzida pelo cátion divalente de manganês é específica, visto que, o tratamento com cátions divalente de cálcio e magnésio não afetaram as culturas. A clivagem de PARP pode ser inibida pelo inibidor de caspase ZVAD-fmk e superexpressão de Bcl-2. Por outro lado, o tratamento da linhagem U937 com 250 μ M de MnCl₂ não levou a morte celular. El Mchichi *et al.* (2007) mostraram que a via de sinalização responsável pela apoptose induzida por manganês em células B após tratamento com 400 μ M de MnCl₂ envolve ativação seqüencial de p38 MAPK, MSK1 (*mitogen- and stress- response kinase 1*) e caspase 8. Caspase 8 leva a ativação da caspase 3 de uma maneira dependente da

mitocôndria como mostram a perda do potencial de membrana por DiOC₆ e liberação de citocromo c. A ativação das caspase 3 e 8 pode ser inibida pelo inibidor de caspase 8 IETD-fmk. A superexpressão de Bcl-2 é capaz de inibir a perda de potencial de membrana, liberação de citocromo c e ativação de caspase 3, mas não a ativação de caspase 8. Ao contrário da via clássica, a ativação de caspase 8 não envolve a molécula FADD já que dominantes negativos não inibiram a apoptose induzida por manganês, mas impedem apoptose mediada por TRAIL (El Mchichi *et al.*, 2007).

Em um estudo *in vivo* foi avaliado o efeito da exposição a vapores de manganês em diferentes tipos celulares do sistema imune. A análise das subpopulações de linfócitos T (CD4+RA+ - naive e CD4+RO+ - memória), linfócitos B (CD19+), células NK, imunoglobulinas no soro, linfócitos T totais (CD3+) e linfócitos T totais no sangue de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao manganês que apresentavam concentrações baixa, média ou alta de manganês no sangue, mostrou que os números de linfócitos totais, T CD8+, T totais (CD3+) e B (CD19+) estava significativamente menor no grupo com alta concentração de Mn⁺² (Nakata *et al.*, 2006).

O tratamento com concentrações de 1 a 2 mM de Mn⁺² é capaz de induzir apoptose em células HeLa como verificado por ativação de caspase-3, clivagem de PARP e condensação de DNA. O tratamento com concentrações menores não leva a apoptose. No entanto, a apoptose induzida por manganês não leva a uma liberação de citocromo c no citoplasma e nem à indução de poro de transição de permeabilidade, induzindo, no entanto, um aumento do potencial de membrana, da massa mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio, além da liberação de peróxido de hidrogênio no meio de cultura (Oubrahim *et al.*, 2001).

Com o objetivo de mostrar a toxicidade do manganês em diferentes tecidos, Rovetta *et al.* (2007) analisaram linhagens celulares de fígado, rim, glia, neurônio e músculo em ensaios de densidade, viabilidade por azul de tripan e análise morfológica com concentrações entre 0,1µM a 1mM de MnCl₂ durante o período de 6 ou 7 dias. A concentração de 1mM foi altamente tóxica para todas as linhagens reduzindo a densidade e a viabilidade celular. A concentração de 100µM teve um efeito dependente do tipo celular, diminuindo parcialmente (glia e neurônio), drasticamente (fígado) ou sem maiores efeitos (rim) no número de células. As concentrações de 0,1µM, 1µM e 10µM não exerceram efeitos significativos sobre a viabilidade ou número de células em nenhum dos tipos celulares estudados.

Em células de câncer de mama Hs578T, o tratamento com 1mM de MnCl₂ foi capaz de induzir a expressão a nível protéico (a partir de 500µM) e de mRNA de MnSOD, assim como aumentar a sua atividade ao longo do tempo com tratamentos de 1mM. Com o objetivo de verificar se essa indução era causada por superóxido ou peróxido de hidrogênio adicionou-se diversos compostos como 1-100mM N-acetilcisteína (removedor de ROS e precursor de GSH), que não foi capaz de inibir a indução de MnSOD. No entanto, o tratamento com 10mM tiron (removedor de superóxido e quelante de metal) e 100mM piruvato (scavenger de peróxido de hidrogênio) foram capazes de inibir essa indução. No entanto, o tratamento com tais agentes que inibem a indução de MnSOD não afetaram a viabilidade, de forma que MnSOD não parece estar relacionada com a morte celular (Thongphasuk *et al.*, 1999).

A capacidade do manganês de induzir morte em diversos tipos celulares foi demonstrada de maneira bem restrita, bem como as vias de sinalização que este metal ativa. É, portanto, de grande interesse definir as vias de morte celular utilizadas por ele para que

novas vias e conexões sejam definidas. Existe ainda a possibilidade de que o manganês induza morte celular por vias diferentes da apoptose, no entanto nenhuma dessas vias alternativas de morte celular foi avaliada até o momento. Assim sendo, é extremamente importante definir as vias de morte celular utilizadas pelo manganês, e novas formas de amplificar a ativação destas vias, viabilizando a utilização do manganês ou compostos miméticos como novas abordagens terapêuticas contra o câncer, sobretudo em formas agressivas ou que ainda carecem de tratamento apropriado.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

Investigar o papel do manganês como indutor de morte celular em diversas linhagens celulares tumorais.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Investigar a capacidade do manganês de induzir morte celular apoptótica em diferentes linhagens hematopoiéticas;

2.2.2. Investigar os mecanismos responsáveis por sua citotoxicidade nas linhagens hematopoiéticas;

2.2.3. Avaliar o efeito sinérgico na morte celular induzida por doses subtóxicas de manganês e os quimioterápicos cisplatina e vincristina;

2.2.4. Investigar o papel da autofagia na morte celular induzida pelo manganês;

2.2.5. Comparar o efeito citotóxico do manganês com o da cisplatina e da vincristina em diversas linhagens tumorais hematopoiéticas e não-hematopoiéticas;

2.2.6. Analisar a expressão gênica de genes reguladores da apoptose antes e após o tratamento com manganês em uma linhagem sensível, C33A, e outra resistente, Du145, ao manganês.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

As linhagens A431NS (carcinoma epidermóide – fornecida pelo Dr. Carlos Gil, Serviço de Pesquisa Clínica – INCA), C-33 A (carcinoma de cérvix – fornecida pelo Dr. Carlos Gil, Serviço de Pesquisa Clínica – INCA), Caco-2 (adenocarcinoma colorretal – fornecida pelo Dr. João Viola, Divisão de Biologia Celular – INCA), HeLa (adenocarcinoma de cérvix – fornecida pelo Dr. Carlos Gil, Serviço de Pesquisa Clínica – INCA), HepG2 (carcinoma hepatocelular – fornecida pela Dra. Andréia Thompson Da Poian, Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ), MCF7 (adenocarcinoma de mama – fornecida pelo Dr. Carlos Gil, Serviço de Pesquisa Clínica – INCA) e U-87 MG (glioblastoma – fornecida pelo Dr. Vivaldo Moura Neto, Departamento de Anatomia – UFRJ) foram mantidas em meio DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado com 10% SFB (Gibco, Invitrogen), 2mM glutamina (Gibco, Invitrogen), 100 unidades/mL (Gibco, Invitrogen) de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (Gibco, Invitrogen) à 37°C em 5% de CO₂. As linhagens A549 (carcinoma de pulmão – fornecida pelo Dr. Carlos Gil, Serviço de Pesquisa Clínica – INCA), Du145 (metástase de carcinoma de próstata – fornecida pela Dra. Anamaria Camargo, Instituto Ludwig/SP), HL-60 (leucemia promielocítica aguda – fornecida pelo Dr. Douglas Green), HL-60.Bcl-xL (fornecida pelo Dr. Kapil Bhalla da Escola de medicina da Universidade de Emory, Atlanta), Jurkat (leucemia aguda de célula T – fornecida pelo Dr. João Viola, Divisão de Biologia Celular – INCA), K-562 (leucemia mielóide crônica – fornecida pelo Dr. Martin Bonamino, Divisão de Medicina Experimental – INCA), Raji (linfoma de Burkitt – fornecida pelo Dr. João Viola, Divisão

de Biologia Celular – INCA) e SKW6.4 (linfócito B transformado com EBV – fornecida pelo Dr. Henning Walczak, Divisão de Medicina, *Imperial College*, Londres) foram mantidas em meio RPMI (Gibco, Invitrogen) com os mesmos suplementos e condições de crescimento. O manganês foi acrescentado às culturas de células sob a forma de $MnCl_2$.

3.2. Determinação da apoptose por morfologia celular

Após tratamento, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 1,8mM KH_2PO_4) e analisadas por citometria de fluxo com o equipamento (FACScalibur, BD Biosciences). Células com espalhamento de luz lateral alto e baixo espalhamento de luz frontal foram consideradas apoptóticas.

3.3. Medida do conteúdo de DNA e ciclo celular

A fragmentação nuclear foi avaliada como um indicativo de apoptose. Após a cultura com ou sem o tratamento especificado, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas com 300 μ L do tampão (3,4mM TrisHCl pH7,6, 10mM NaCl, 0,1% NP-40 – Calbiochem, 700U/L RNase - Sigma, 0,075mM iodeto de propídeo - Sigma). A fluorescência dos núcleos individuais foi medida com o citômetro de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences). Os resultados representam a média \pm SD em triplicata. Cada experimento foi repetido pelo menos três vezes.

Esse experimento também foi realizado após o tratamento das linhagens com os inibidores 3-metiladenina (Sigma), zVAD-fmk (Molecular Probes), IETD-fmk (Molecular Probes), DEVD-fmk (Molecular Probes), LEHD-fmk (Molecular Probes).

3.4. Marcação de células apoptóticas com *Annexin V*

A translocação do fosfolípídeo fosfatidilserina da face interna para a face externa da membrana plasmática, como um indicativo inicial de apoptose, foi avaliada por marcação com *AnnexinV* conjugada a FITC (ICB-USP) em células não-permeabilizadas e analisada por citometria de fluxo (FACScalibur, BD Biosciences).

3.5. Marcação de células com DiOC₆

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por marcação com DiOC₆ (Molecular Probes). Após o tratamento indicado na legenda, as células foram incubadas com 200µL de DiOC₆ a 100nM diluído em meio suplementado por 45 minutos a 37°C. As células foram analisadas por citometria de fluxo em FL1 (FACScalibur, BD Biosciences).

3.6. Medida da atividade das caspases 3 e 7

A atividade das caspases 3 e 7 foi medida através do kit *Caspase-Glo 3/7 Assay* (Promega) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, após o tratamento, 10.000 células foram ressuspensas em 100µL de meio de cultura e 100µL do reagente *Caspase-Glo 3/7* foram adicionados. Após homogeneização e incubação de 1h à temperatura ambiente, a produção de luz foi medida em um luminômetro (Veritas, Turner Biosystems).

3.7. Análise da morfologia nuclear

Foram preparadas lâminas contendo células das culturas tratadas ou não com cátions. Essas lâminas foram coradas através do Hemacolor Staining Kit (Merck) de acordo com as instruções do kit. A morfologia nuclear foi avaliada pelo microscópio Nikon Eclipse TS10.

3.8. Fragmentação de DNA internucleossomal

Após o tratamento indicado, em torno de 2×10^6 células foram centrifugadas por 5min 200g e ressuspensas em 1mL de PBS. Adicionou-se 10mL de etanol 70% gelado e estocou-se à -20°C por pelo menos 24h. Em seguida, as células foram centrifugadas por 5 min à 800g e o etanol foi removido. Ressuspendeu-se o pellet em 40 μL de tampão fosfato-citrato (192 partes de Na_2HPO_4 0,2M e 8 partes de ácido cítrico 0,1M pH7,8) e incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se novamente por 5 minutos à 1000g e os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo. Adicionou-se 3 μL de NP-40 0,25% e 3 μL de RNase (Sigma - 1mg/mL) com posterior incubação de 30 minutos à 37°C . Adicionou-se, em seguida, 3 μL de proteinase K (Sigma - 2mg/mL) às amostras e incubou-se por mais 30 minutos à 37°C . As amostras, após adição de 12 μL de tampão de amostra (30% glicerol), foram, então, resolvidas em gel de agarose 1,5% em TAE 1X (0,04M Tris-acetato, 0,001M EDTA) por 5 horas à 4V/cm e o DNA foi detectado com brometo de etídio e luz UV.

3.9. Western blot

Para preparação das frações citosólicas, 1×10^6 células foram lavadas uma vez com PBS gelado, lisadas diretamente com 100 μ L de tampão de amostra (50mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 2.5% 2-mercaptoetanol), fervidas por 5 minutos e armazenadas a -80°C . Para a corrida, 20 μ L da amostra foram aplicados no gel e as proteínas foram resolvidas por 1,5h à 100V em gel SDS-poliacrilamida com concentração adequada para o tamanho da proteína a ser analisada em tampão de corrida (30,3g Tris-base, 144g de glicina e 10g de SDS para 1L de solução). As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioAgency) à 15V por 30 minutos em um tampão de transferência (3 g de Tris-base, 14,4 g de glicina, 100mL de metanol para 1L de solução). A membrana, o gel e os papéis filtro foram umedecidos com o tampão 10% metanol. A membrana foi bloqueada por 1 hora em TBS (10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl) contendo 5% leite desnatado em pó e, então, incubada *overnight* a 4°C com a diluição apropriada do anticorpo primário. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* adequado por 1h. A membrana foi, então, lavada 6 vezes de 10 minutos com TBS-Tween 0,05% e incubada com substrato de peroxidase por 1 minuto (ECL, Amersham, Arlington, IL). A luminescência emitida foi detectada em filmes de quimioluminescência (*Kodak BioMax Light Film*, Kodak).

Soluções:

- Tampão de separação 4X: 36,2g Tris; 1g SDS; ajustar para pH 8,8 e volume de 200mL

- Tampão de empacotamento 4X: 12,2g Tris; 0,8g SDS; ajustar para pH 6,8 e volume de 200mL
- Gel de separação 6% - 2,4ml de bis-acrilamida 30% (29:1), 3ml do tampão de separação 4x (1,5 M Tris pH 8,8, 0,4%SDS), 6,6ml de água destilada, 75µl de persulfato de sódio 10% e 7,5µl de TEMED;
- Gel de separação 10% - 4ml de bis-acrilamida 30% (29:1), 3ml do tampão de separação 4x (1,5 M Tris pH 8,8, 0,4%SDS), 5ml de água destilada, 75µl de persulfato de sódio 10% e 7,5µl de TEMED;
- Gel de empacotamento 4% - 1,35ml de bis-acrilamida 30% (29:1), 2,5ml de tampão de empacotamento 4x (0,5M Tris-base pH 6,8, 0,4% SDS), 5,5ml de água destilada, 70µl de persulfato de sódio e 20µl de TEMED;

Tabela 1. Parâmetros utilizados na análise por *western blot* para os diversos anticorpos.

| Proteína | Concentração de bisacrilamida do gel de corrida | Anticorpo primário | Anticorpo secundário |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Procaspase-3 (BD Biosciences) | 10% | 1:500 diluído em TBST com 5% leite | Anti-mouse 1:1000 diluído em TBST com 5% leite |
| Procaspase-9 (BD Biosciences) | 10% | 1:1000 diluído em TBST com 5% leite | Anti-rabbit 1:2000 diluído em TBST com 5% leite |
| GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) | 10% | 1:1000 diluído em TBST | Anti-mouse 1:20000 diluído em TBST |
| Fodrina (Chemicon) | 6% | 1:1000 diluído em TBST com 5% leite | Anti-mouse 1:2000 diluído em TBST com 5% leite |

3.10. Extração de RNA

Após o tratamento, adicionou-se 2mL de Trizol diretamente na placa de cultura. Após a homogeneização, incubou-se as amostras por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou 200µL de clorofórmio/mL de trizol e as amostras foram agitadas à mão, vigorosamente, por 15 segundos com posterior incubação à temperatura ambiente por 2-3 minutos. Centrifugou-se, então, por 15 minutos à 4°C e 12000g e os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo. Adicionou-se 0,5 mL de isopropanol/mL de Trizol e agitou-se em vórtex por 10 segundos, incubando-se posteriormente à temperatura ambiente por 15 minutos. Centrifugou-se novamente por 15 minutos à 4°C e 12000g e o sobrenadante foi removido cuidadosamente, evitando o contato com o precipitado de RNA. Adicionou-se 1mL de etanol 75%/mL de trizol e centrifugou-se a 7500g por 5 minutos à 4°C. Após deixar secar o precipitado, ele foi ressuscitado em 30µL de água DEPC. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% em TAE.

3.11. Tratamento com DNase

Para a eliminação do DNA contaminante nas amostras de RNA, foi realizado um tratamento com a DNase RQ1 (Promega). Para a reação adicionou-se 8 µL de RNA, 1µL de *RQ1 RNase-free DNase 10X Reaction Buffer* e 1µL de *RQ1 RNase-free DNase* e incubou-se a 37°C por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se 1µL de *RQ1 DNase Stop Solution* para terminar a reação e incubou-se a 65°C por 10 minutos para inativar a DNase. O RNA total foi quantificado através da medida de absorvância num comprimento de onda de 260nm, em um *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc.,*

Wilmington – DE, EUA). A pureza do RNA foi avaliada através da razão entre dois valores de absorvância: (i) A_{260nm} / A_{280nm} para identificar contaminação protéica e (ii) A_{260nm} / A_{230nm} para identificar contaminação por solventes orgânicos. Ambos os valores devem ser superiores a 1,8 para estimar uma solução com RNA de boa qualidade (Imbeaud *et al.*, 2005).

3.12. Síntese de cDNA

A reação de transcrição reversa foi feita de acordo com o protocolo da enzima Superscript II (Invitrogen). Primeiramente, adicionou-se 3 μ g de RNA total a 1 μ L oligo-dT (500 μ g/mL) e 1 μ L dNTP (10mM de cada) e o volume completado para 12 μ L. A solução resultante foi incubada por 5 minutos à 65°C e, após a incubação, resfriada rapidamente em gelo. Adicionou-se, então, 4 μ L do tampão 5X, 2 μ L DTT 0,1M e 1 μ L (200 unidades) da enzima SuperScript II (Invitrogen), e as amostras mantidas por 50 minutos à 42°C. As reações foram inativadas à 70°C por 15 minutos.

3.13. Reação de PCR quantitativo

O cDNA resultante de cada amostra foi diluído 10X e 1 μ L foi adicionado ao volume total de 12,5 μ L das reações de PCR quantitativa, contendo 6,25 μ L de SYBR Green (Applied Biosystems) e oligonucleotídeos especificados na tabela 1.

Todos os ensaios de qPCR foram realizados no equipamento ABI 7700. O protocolo utilizado para os genes 18S, HPRT1 e Rb-13a foi o seguinte: um passo inicial de desnaturação (95°C por 10min), seguido por 40 ciclos de 15s a 95°C (desnaturação), 60°C

por 1 minuto (anelamento e extensão). Para todos os outros genes foi utilizado o seguinte protocolo: um passo inicial de desnaturação (95°C por 15min), seguido por 40 ciclos de 30s a 95°C (desnaturação), 25s na temperatura de anelamento indicada na tabela (anelamento) e 72°C por 30s (extensão). Posteriormente, a PCR foi imediatamente seguida de uma análise de curva de dissociação no qual ocorre um aumento progressivo na temperatura partindo de uma temperatura de 45°C até chegar a 95°C. Este procedimento é realizado para se certificar que o produto esperado foi amplificado e se produtos não específicos ou dímeros de oligonucleotídeos estão sendo formados. Os seguintes controles foram incluídos para cada corrida de cada gene da qPCR: (i) controle negativo da síntese de cDNA (reação sem a transcriptase reversa) e (ii) controle negativo sem amostra de cDNA. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Tabela 2. Parâmetros de reação e seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.

| Gene alvo | Seqüência (5'→3') | Concentração Final | Tm |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------|------|
| 18S | F: AGGATGAGGTGGAACGTGTG R: CTTCACGGAGCTTGTTGTCC | 0,5µM | - |
| Bad | F: CCG AGT GAG CAG GAA GAC TC R: GGT AGG AGC TGT GGC GAC T | 0,4µM | 60°C |
| Bak | F: TTT TCC GCA GCT ACG TTT TT R: TGG TGG CAA TCT TGG TGA AGT | 0,4µM | 60°C |
| Bax | F: CCC TTT TGC TTC AGG GTT TC R: TCT TCT TCC AGA TGG TGA GTG | 0,4µM | 56°C |
| Bcl-W | F: AGT TCG AGA CCC GCT TCC R: CCC GTC CCC GTA TAG AGC | 0,4µM | 60°C |
| Bcl-xL | F: CTG AAT CGG AGA TGG AGA CC R: TGG GAT GTC AGG TCA CTG AA | 0,4µM | 60°C |
| β-actina | F: GCC CTG AGG CAC TCT TCC A R: CCA GGG CAG TGA TCT CCT TCT | 0,4µM | 65°C |
| Ciap1 | F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT R: ATG GAC AGT TGG GAA AAT GC | 0,4µM | 59°C |
| Ciap2 | F: AGT CTT GCT CGT GCT GGT TT R: TGC TTT TGC CAG ATC TGT TG | 0,4µM | 58°C |
| DR4 | F: AGA GAG AAG TCC CTG CAC CA R: GTC ACT CAA GGG CGT ACA AT | 0,4µM | 56°C |
| DR5 | F: CAG GTG GAC ACA ATC CCT CT R: AAG ACC CTT GTG CTC GTT GT | 0,6µM | 57°C |
| GAPDH | F: GGA GAA GGC TGG GGC TCA T R: GTC CTT CCA CGA TAC CAA AGT T | 0,4µM | 56°C |
| HPRT1 | F: GTGGAAGATATAATTGACACTGGC R: AACACTTCGTGGGGTCCTTT | 0,5µM | - |
| Noxa | F: AGC TGG AAG TCG AGT GTG CT R: ACG TGC ACC TCC TGA GAA AA | 0,4µM | 54°C |
| Rb-13a | F: GACAAGAAAAAGCGGATGGT R: GTACTTCCAGCCAACCTCGT | 0,5µM | - |
| TRAIL | F: AAG GCT CTG GGC CGC AAA ATA AAC R: GCC AAC TAA AAA GGC CCC GAA AAA | 0,4µM | 59°C |

3.14. Quantificação dos níveis de expressão

A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das reações de PCR quantitativo em tempo real, as amplificações das triplicatas de cada amostra foram representadas por curvas logísticas ou sigmóides de cinco parâmetros, ajustadas pela minimização do erro médio quadrático dos valores de fluorescência dos 40 ciclos nessas triplicatas. Para tal, utilizou-se o pacote *qpcR* (Ritz *et al.*, 2008) desenvolvido para o ambiente estatístico R versão 2.8.1 (www.r-project.org). O ciclo de quantificação (Cq) foi determinado pelo ponto de interseção de uma linha perpendicular, a partir do ponto de máxima da função de segunda derivada da função logística escolhida para representar a curva de amplificação da triplicata de reação de cada amostra (Figura 7). O uso deste ponto característico da curva de acúmulo de fluorescência ajustada é conveniente uma vez que ele se encontra numa região de eficiência constante na fase exponencial da curva de amplificação, além de ser invariante ao poço ou placa de origem da reação de PCR (Rebrikov & Trofimov, 2006), diferente de métodos mais tradicionais como a do ciclo *threshold*. A eficiência (E ou Eff.) foi calculada para cada amostra utilizando a razão entre o valor de fluorescência no ciclo de quantificação sobre o do ciclo anterior.

Posteriormente, os dados de ECq para cada amostra foram processados em conjunto para servir de entrada para o pacote *geNorm*, o qual determinou os genes com expressão mais estável, ou seja, os melhores genes normalizadores independente de grupo (Vandesompele *et al.*, 2002). Os níveis de expressão normalizados foram então obtidos pela razão entre os dados brutos de expressão de cada amostra e seu respectivo fator de normalização, dado pela média geométrica dos níveis de expressão dos genes normalizadores (18S, β -actina, GAPDH, HPRT1 e Rb-13a).

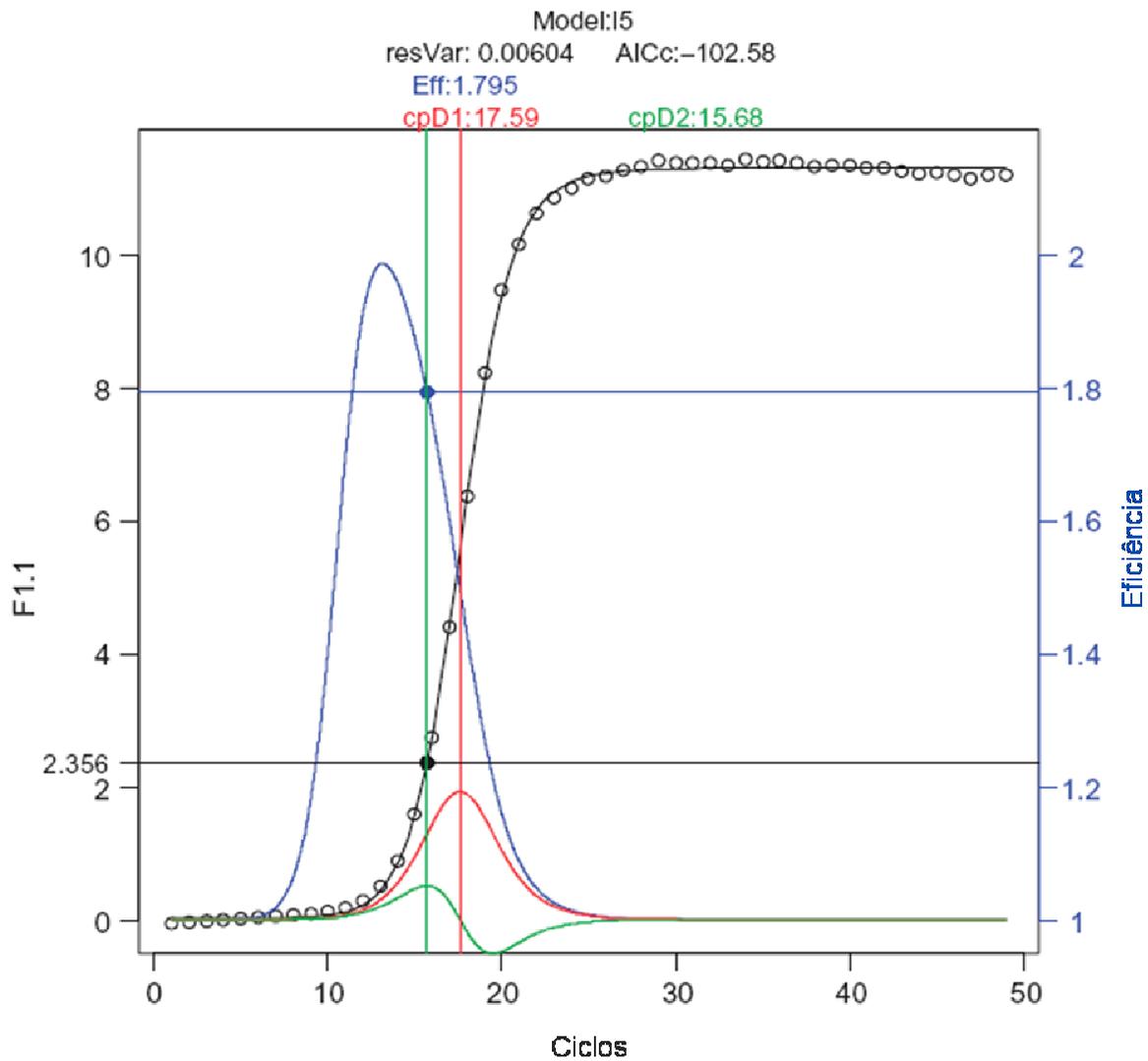


Figura 7. Gráfico representando a curva de acúmulo de fluorescência (preto) utilizando a função logística de 5 parâmetros e a representação da função da sua primeira (vermelho) e segunda (verde) derivada. O ponto de interseção da linha vertical verde, que parte do ponto de máxima da função de segunda derivada com a curva de acúmulo de fluorescência corresponde ao ponto característico da amostra (Cq ou CpD2), enquanto a interseção da linha verde com a curva de eficiência (azul) corresponde à eficiência de amplificação da amostra (Eff.) (Ritz *et al.*, 2008).

3.15. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste *Kruskal-Wallis rank sum*. Esse é um método não-paramétrico utilizado quando há a intenção de se comparar mais de dois grupos. No experimento realizado há dois fatores de interesse: (i) Tipo Celular (C33A e Du145) e (ii) Tratamento (Controle e Mn) e, portanto, quatro grupos experimentais possíveis, ou ainda, seis comparações de interesse para os valores de expressão normalizados de cada gene: i) C33A:Controle *versus* C33A:Mn; ii) C33A:Controle *versus* Du145:Controle; iii) C33A:Controle *versus* Du145:Mn; iv) C33A:Mn *versus* Du145:Controle; v) C33A:Mn *versus* Du145:Mn; e vi) Du145:Controle *versus* Du145:Mn. Todas as análises acima descritas foram realizadas com o auxílio de pacotes do programa R versão 2.8.1 (www.r-project.org).

4. RESULTADOS

4.1. Manganês induz morte celular em várias linhagens hematopoiéticas

Com o objetivo de analisar o efeito do manganês em diversas linhagens hematopoiéticas, avaliou-se por citometria de fluxo a capacidade do cloreto de manganês, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio de induzir apoptose nas linhagens de célula B SKW6.4, de célula T Jurkat e monocítica HL-60. As linhagens foram tratadas com 100 μ M dos diferentes cátions e diferentes aspectos analisados por citometria de fluxo.

Na figura 8, pode-se observar o efeito drástico do manganês sobre a morfologia da linhagem SKW6.4. Houve um aumento de aproximadamente 70% de células com tamanho reduzido e alta complexidade interna em comparação com a cultura controle. Nem o magnésio ou o cálcio tiveram efeito sobre a morfologia da mesma linhagem. Além disso, existe ainda um aumento bastante expressivo na marcação para anexina-FITC e da condensação e fragmentação de DNA, mudanças que também não foram observadas no tratamento da linhagem SKW6.4 com outros cátions (Figura 8). Esses resultados corroboram dados da literatura indicando que o manganês é capaz de induzir apoptose em células B, diferentemente de outros cátions bivalentes.

Observando as figuras 2 e 3, verifica-se que a apoptose induzida pelo manganês não é específica para linhagens de células B. A figura 9A, mostra que o manganês também é capaz de induzir alterações na morfologia celular em células Jurkat, causando um aumento de 30% no número de células com tamanho reduzido e complexidade aumentada. A

exposição de fosfatidilserina também aumenta em cerca de 30% (Figura 9B) e a fragmentação nuclear (Figura 9C) perto de 15% em comparação com a cultura controle.

Na figura 10, os resultados se repetem para a linhagem monocítica HL-60. Há um aumento de aproximadamente 30% de células com morfologia alterada (Figura 10A) e exposição de fosfatidilserina (Figura 10B). Houve um aumento de pouco mais de 15% de células com conteúdo subdiploide de DNA em relação ao controle (Figura 10C). Apesar dos resultados não apresentarem a mesma magnitude dos observados na linhagem SKW6.4, pode-se concluir que as linhagens de célula T Jurkat e de célula monocítica HL-60 também são sensíveis ao tratamento com manganês.

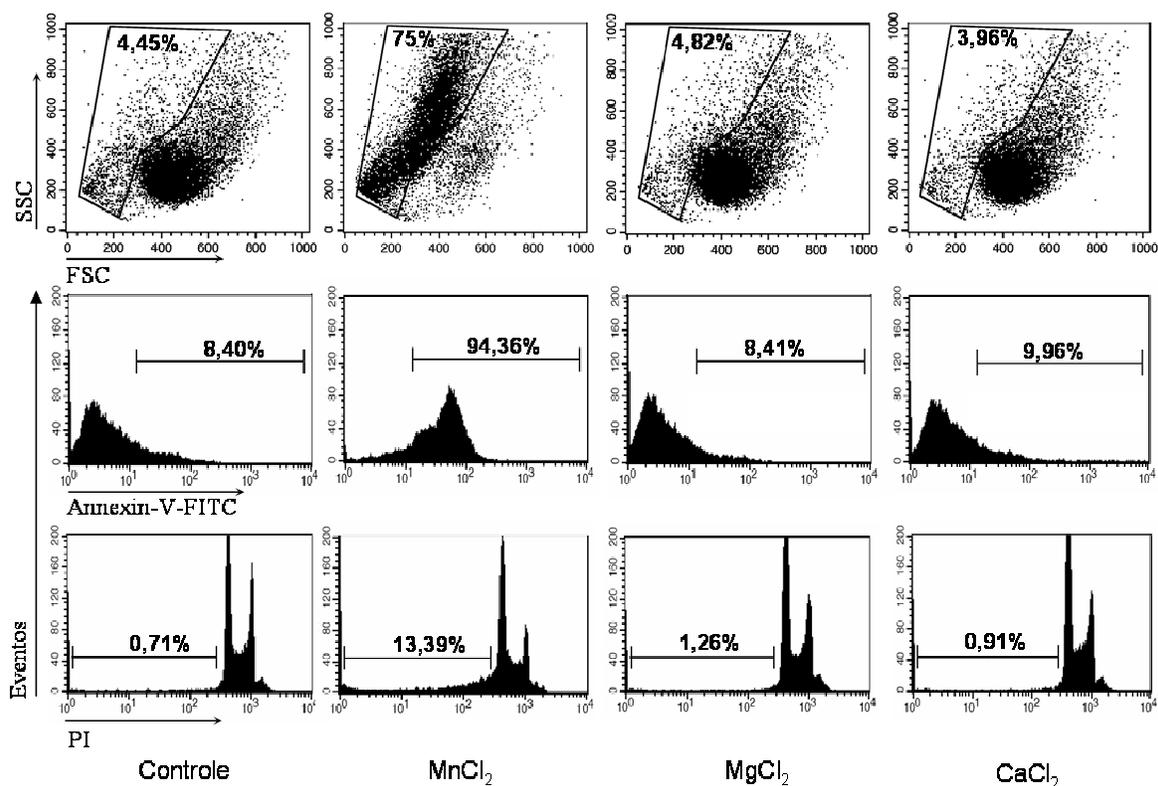


Figura 8. Indução de apoptose na linhagem de células B SKW6.4 pelo manganês. Após tratamento por 48h com 100 μ M dos diferentes cátions diversas características da apoptose foram analisadas: diminuição do volume celular (primeira linha), exposição de fosfatidilserina (segunda linha), e condensação de fragmentação do DNA (terceira linha). Resultado representativo de três experimentos.

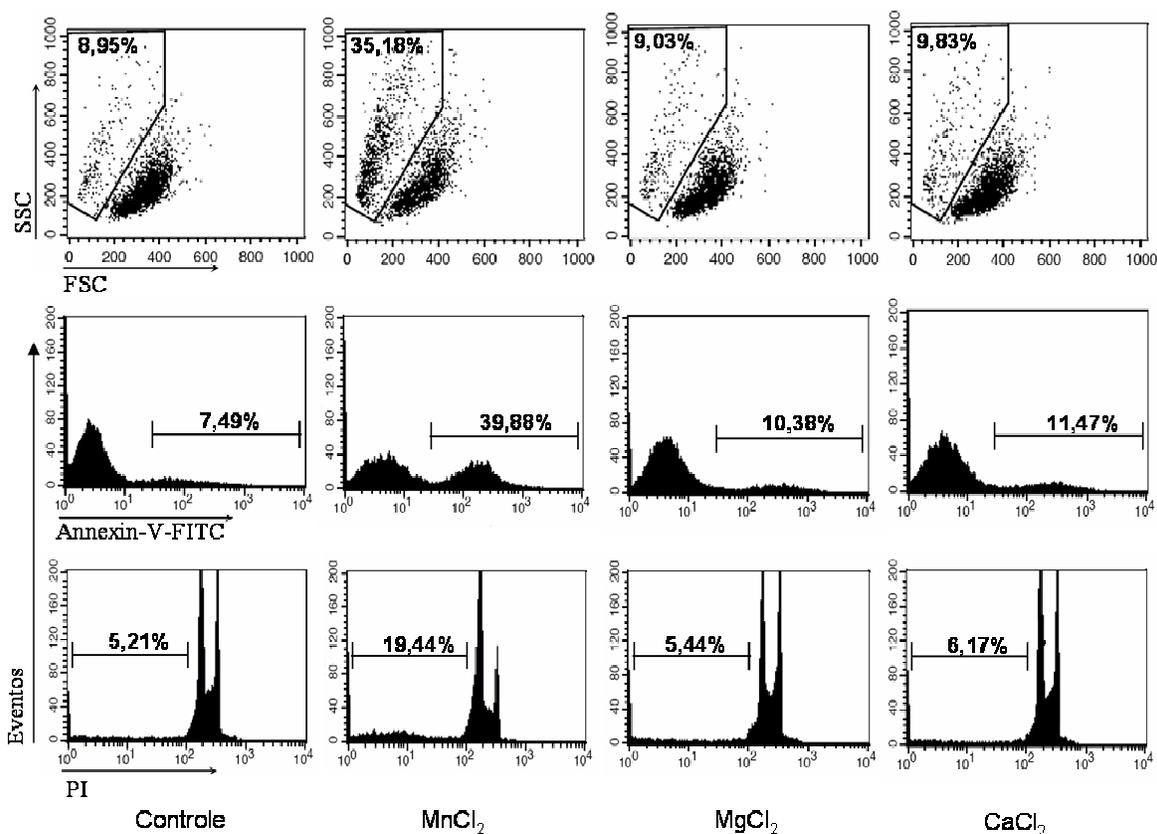


Figura 9. Indução de apoptose na linhagem de célula T Jurkat pelo manganês. Após tratamento por 48h com 100 μ M dos diferentes cátions diversas características da apoptose foram analisadas: diminuição do volume celular (primeira linha), exposição de fosfatidilserina (segunda linha), e condensação de fragmentação do DNA (terceira linha). Resultado representativo de três experimentos.

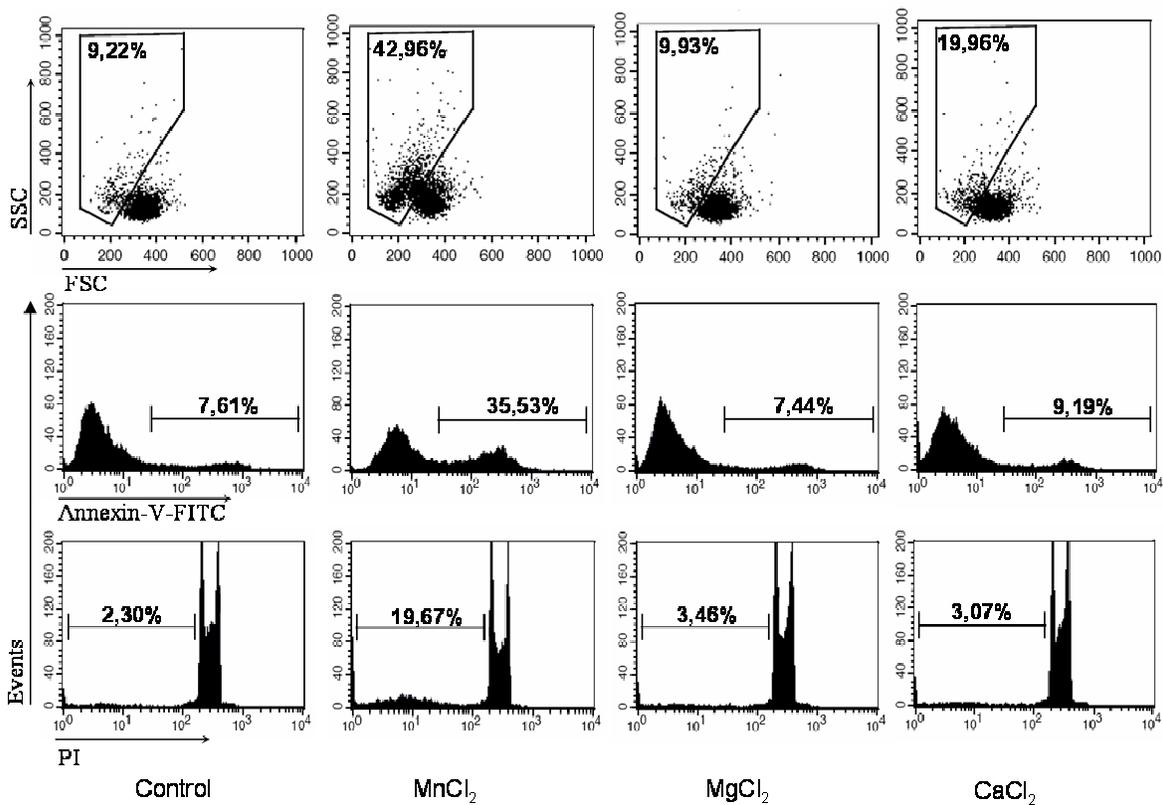


Figura 10. Indução de apoptose na linhagem monocítica HL-60 pelo manganês. Após tratamento por 48h com 100 μ M dos diferentes cátions diversas características da apoptose foram analisadas: diminuição do volume celular (primeira linha), exposição de fosfatidilserina (segunda linha), e condensação de fragmentação do DNA (terceira linha). Resultado representativo de três experimentos.

4.2. A morte celular induzida pelo manganês é dose- e tempo-dependente

Avaliou-se também os parâmetros dose- e tempo- dependentes na morte celular induzida pelo manganês. Dessa maneira, a linhagem celular Jurkat foi tratada com as doses de 25, 50, 100, 200 e 400 μ M de cloreto de manganês, cloreto de magnésio e cloreto de cálcio por 24, 48 e 72 horas. Na figura 11A, pode-se perceber que o manganês é capaz de induzir morte celular dose-dependente, sendo a dose de 400 μ M é capaz de reduzir a viabilidade da cultura em cerca de 80%. Além disso, pode-se observar que mesmo doses bastante altas dos outros cátions bivalentes não são capazes de induzir nem um pequeno aumento na morte celular.

Na figura 11B, pode-se observar que a apoptose induzida por manganês também depende do tempo de tratamento. A ampliação do tempo de tratamento aumenta a apoptose induzida pelo manganês com uma mesma dose, no caso a de 200 μ M.

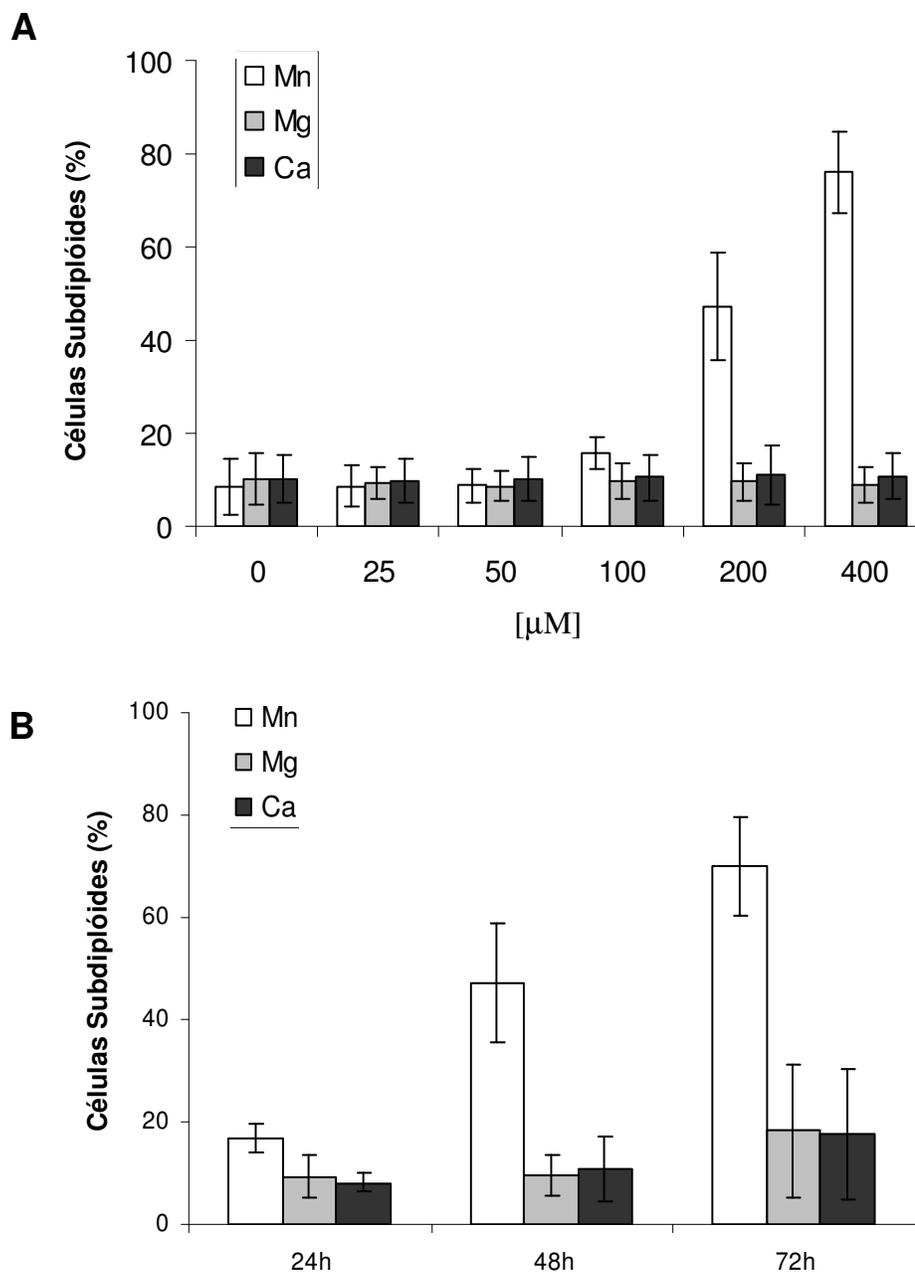


Figura 11. O manganês é capaz de induzir apoptose na linhagem Jurkat de maneira dose- (A) e tempo- (B) dependente. (A) A linhagem celular Jurkat foi tratada por diferentes tempos e concentrações de cloreto de manganês, cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3).

4.3. A morte celular induzida pelo manganês apresenta diversas características da apoptose

A maioria das vias de sinalização apoptóticas são reguladas por eventos mitocondriais como a liberação de citocromo c e SMAC/Diablo no citosol, o que, em geral, é acompanhado pela perda do potencial transmembrana mitocondrial. A avaliação do potencial de membrana mitocondrial pode ser feita através de certos corantes fluorescentes como o DiOC₆. Dessa maneira, para avaliar se o manganês seria capaz de causar a despolarização mitocondrial, as linhagens Jurkat e HL-60 foram tratadas com 100µM de cloreto de manganês por 24h e depois incubadas com o corante fluorescente DiOC₆. Como se pode observar na figura 12, o tratamento com manganês causa uma diminuição da marcação com DiOC₆ em aproximadamente 30% das células.

Todas as vias de sinalização apoptóticas culminam na ativação das cisteína proteases chamadas de caspases. A forma ativada dessas proteases é responsável pelas alterações morfológicas características da apoptose. Dessa maneira, para desvendar o mecanismo de morte celular induzido por um agente citotóxico é primordial avaliar a ativação de caspases. Avaliou-se a ativação das caspases efetoras -3 e -7, que são capazes de reconhecer o mesmo tetrapeptídeo DEVD nas proteínas alvo. Foi utilizado um ensaio luminescente em que o peptídeo DEVD está conjugado a aminoluciferina que depois de liberada, no caso de existirem caspases ativas nas células, é capaz de produzir luz. Assim, pode-se observar, na figura 13, que o manganês é capaz de induzir a ativação das caspases efetoras 3 e 7 após 48h de tratamento com 100µM de manganês, mas não com magnésio.

A ativação de caspases também pode ser observada por *western blot* na figura 14. O tratamento com manganês leva a uma diminuição da proforma da caspase-3 e da caspase-9. A diminuição da procaspase-9 também corrobora o envolvimento da via mitocondrial que havia sido discutido na figura 12, uma vez que a ativação da mesma depende estritamente da formação do apoptossomo.

Cada caspase reconhece e cliva após uma seqüência específica de aminoácidos que termina com um aspartato. Baseado nessa seqüência de aminoácidos, foram desenvolvidos inibidores específicos para cada caspase. Dessa forma, para avaliar a importância das caspases -3, -8 e -9 na morte celular induzida pelo manganês, as linhagens HL-60 e Jurkat foram tratadas por 48h com 100 μ M de manganês e incubadas concomitantemente com 20 μ M dos inibidores DEVD-fmk (inibidor de caspase-3), IETD-fmk (inibidor de caspase-8), LEHD-fmk (caspase-9). Conforme observado na figura 15A, os inibidores DEVD-fmk e IETD-fmk reduziram cerca de 20% da apoptose induzida pelo manganês na linhagem HL-60, enquanto o inibidor LEHD-fmk não parece ter causado qualquer efeito. Já na linhagem Jurkat (Figura 15B), os inibidores causaram uma redução na apoptose de menos de 10%. Apesar dos resultados com inibidores de caspases não terem sido os esperados, eles não mostram que as caspases não têm papel relevante e sim que outras condições de tratamento devem ser testadas.

Na figura 16, é mostrado um *western blot* para a fodrina, que figura entre os substratos da caspase-3. Essa proteína tem um tamanho de 240kDa e é clivada em fragmentos de 120kDa após a indução de apoptose. Como se pode observar na figura 1, o tratamento com 100 μ M de manganês por 24h é capaz de levar à clivagem de fodrina

demonstrando que as caspases que sofreram clivagem apresentam realmente sua atividade de protease ativada.

Além disso, uma das alterações mais tardias da apoptose é a fragmentação internucleossomal do DNA. Essa fragmentação também é dependente de caspase e é realizada pela enzima CAD, cuja ativação requer a clivagem do seu inibidor ICAD pela caspase-3. Na figura 17, pode-se observar que existe uma fragmentação de DNA internucleossomal, cuja característica é a presença de bandas de múltiplos de 200 pares de base após resolução em gel de agarose. Pode-se observar ainda que o tratamento com magnésio não é capaz de induzir essa fragmentação. Conclui-se então que a morte celular induzida pelo manganês se dá através da ativação de caspases, levando a clivagem internucleossomal de DNA, que constituem características de morte celular por apoptose.

As alterações morfológicas induzidas pela apoptose também podem ser observadas através da análise de células coradas com hematoxilina-eosina. Após indução de apoptose, as células apresentam diminuição do tamanho celular e condensação da cromatina, de forma que o núcleo, mais densamente marcado, passa a ocupar praticamente toda a célula e o citoplasma deixa de ser visto. Como podemos observar na figura 18, a linhagem Jurkat, após tratamento com 100 μ M de cloreto de manganês por 48h apresenta células com morfologia apoptótica. Nas culturas tratadas com cloreto de magnésio e cloreto de cálcio não foram observadas células com essa morfologia. Esses resultados estão em concordância com os dados obtidos por citometria de fluxo, nos permitindo concluir que o manganês é capaz de induzir morte celular apoptótica nas linhagens em estudo.

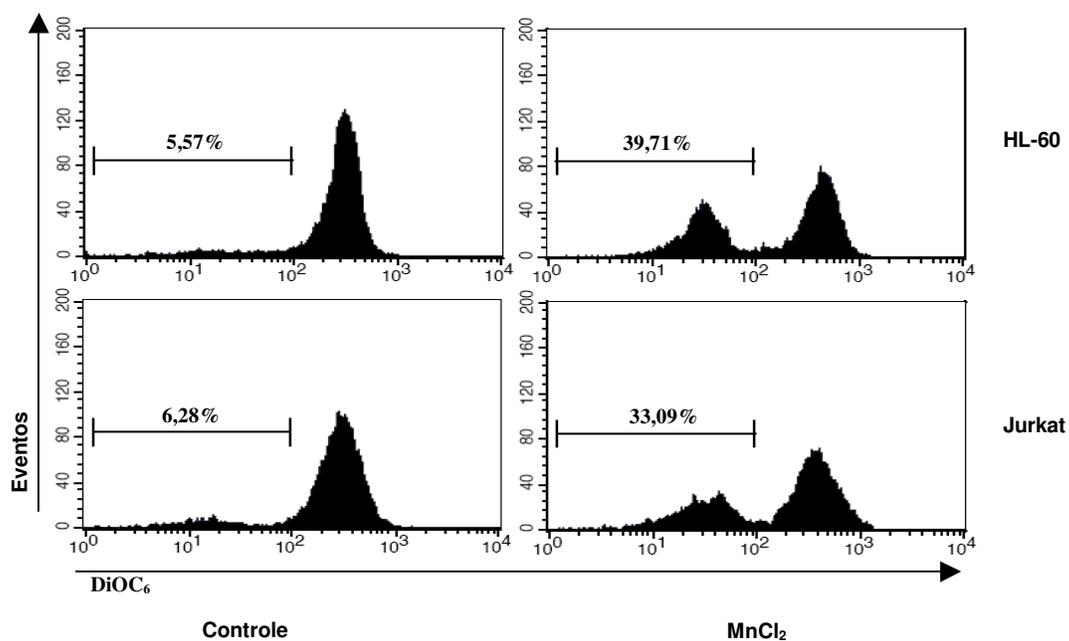


Figura 12. Despolarização mitocondrial induzida pelo manganês. Após o tratamento das linhagens HL-60 e Jurkat com 100 μ M de cloreto de manganês por 24h, o potencial da membrana externa mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo, através de marcação com DiOC₆. Resultado representativo de dois experimentos.

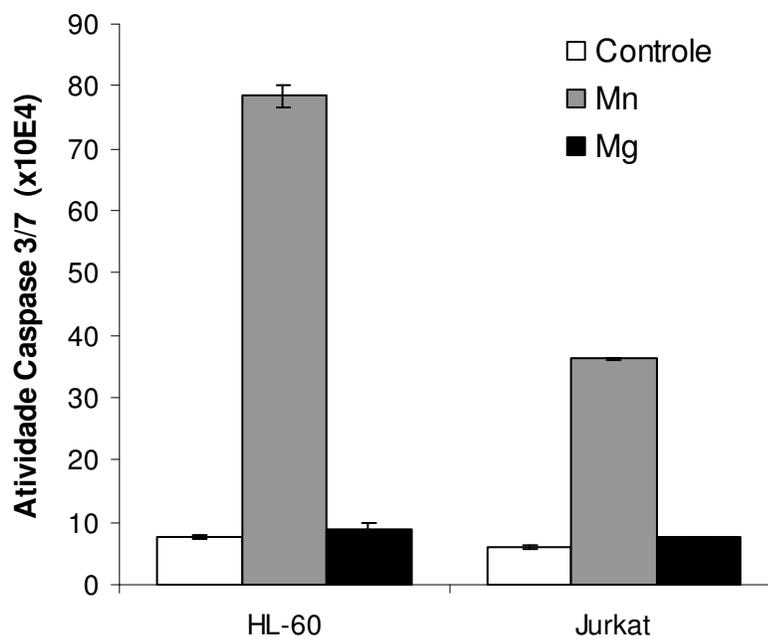


Figura 13. Medida da atividade das caspases 3/7. As linhagens Jurkat e HL-60 foram tratadas com 100 μ M de cloreto de manganês e cloreto de magnésio por 48h. Em seguida, tiveram a atividade das caspases 3/7 analisadas em um fluorímetro. Resultado representativo de dois experimentos.

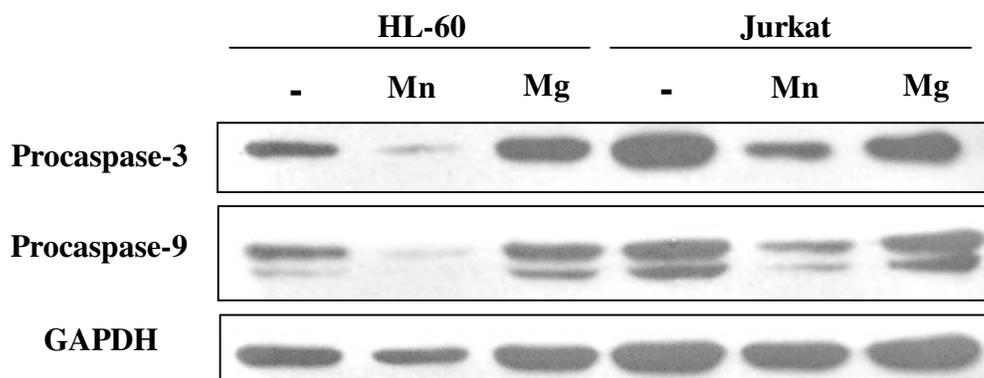


Figura 14. Clivagem das procaspases -3 e -9 após o tratamento com manganês. Após o tratamento com 100 μ M de cloreto de manganês e cloreto de magnésio por 48h, foi feito o *western blot* para as linhagens Jurkat e HL-60. Resultado representativo de dois experimentos.

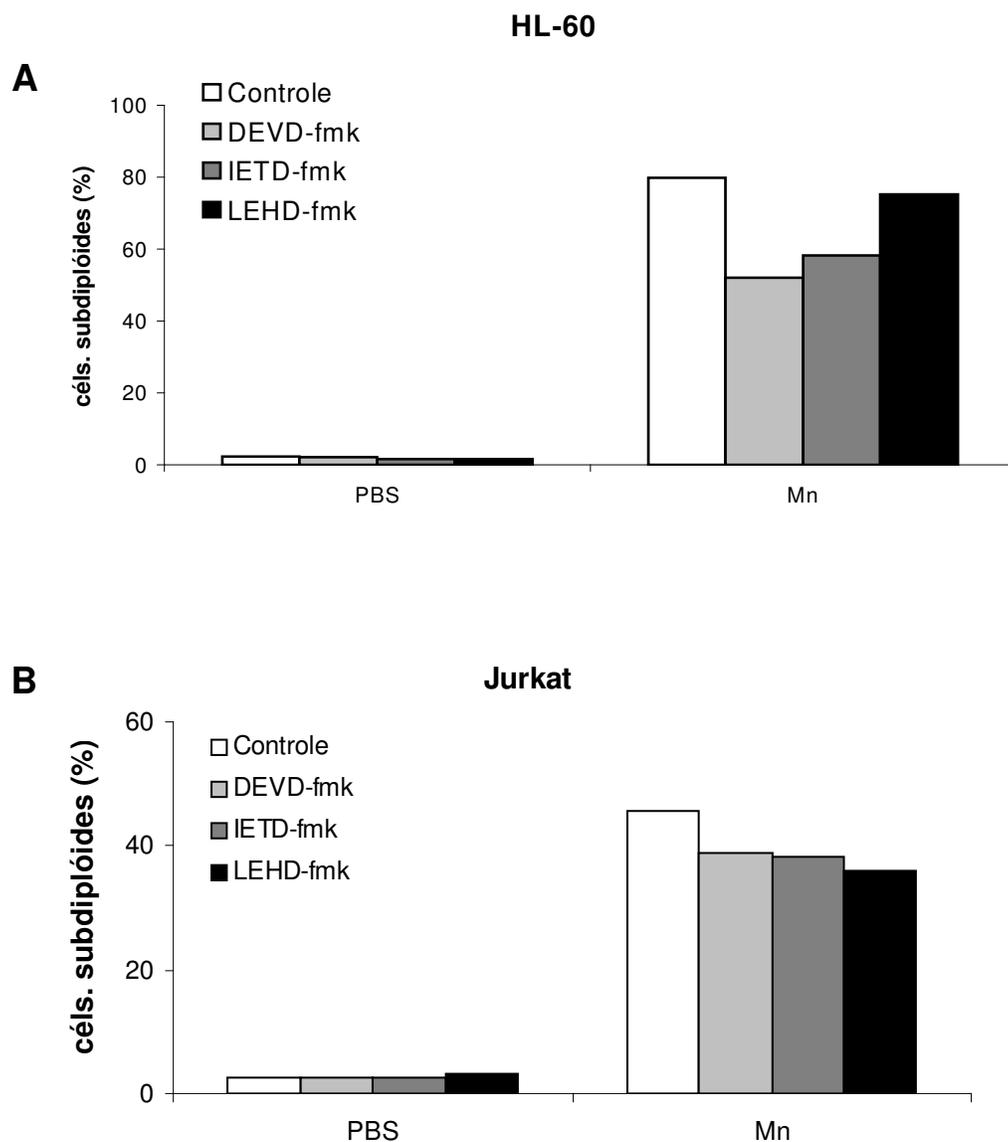


Figura 15. Efeito de inibidores de caspases na morte celular induzida pelo manganês.

As linhagens HL-60 e Jurkat foram tratadas com 100 μ M cloreto de manganês por 48h na presença ou não de 20 μ M dos inibidores de caspase indicados e a porcentagem das células com conteúdo de DNA subdiploide avaliada por citometria de fluxo (N=1).

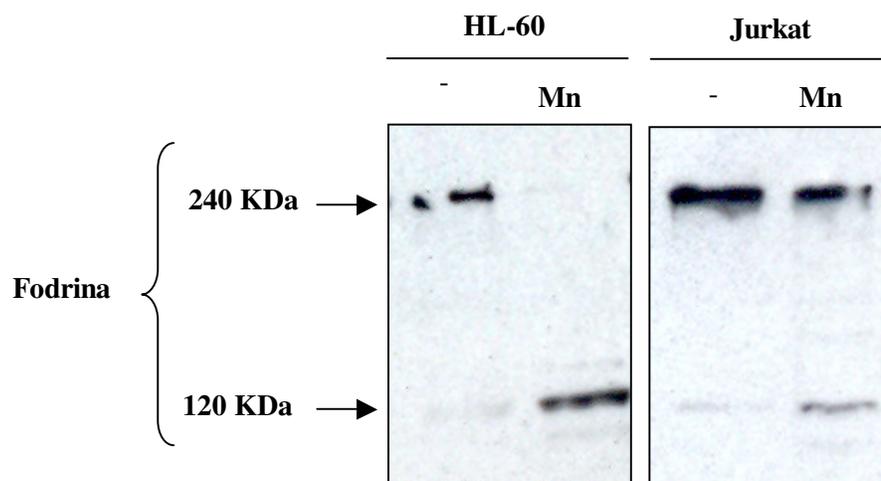


Figura 16. O tratamento com manganês induz a clivagem do substrato de caspase-3 **fodrina**. Clivagem de fodrina, verificada por *western blot*, após tratamento das linhagens HL-60 e Jurkat com 100 μ M de cloreto de manganês por 24h. Resultado representativo de dois experimentos.

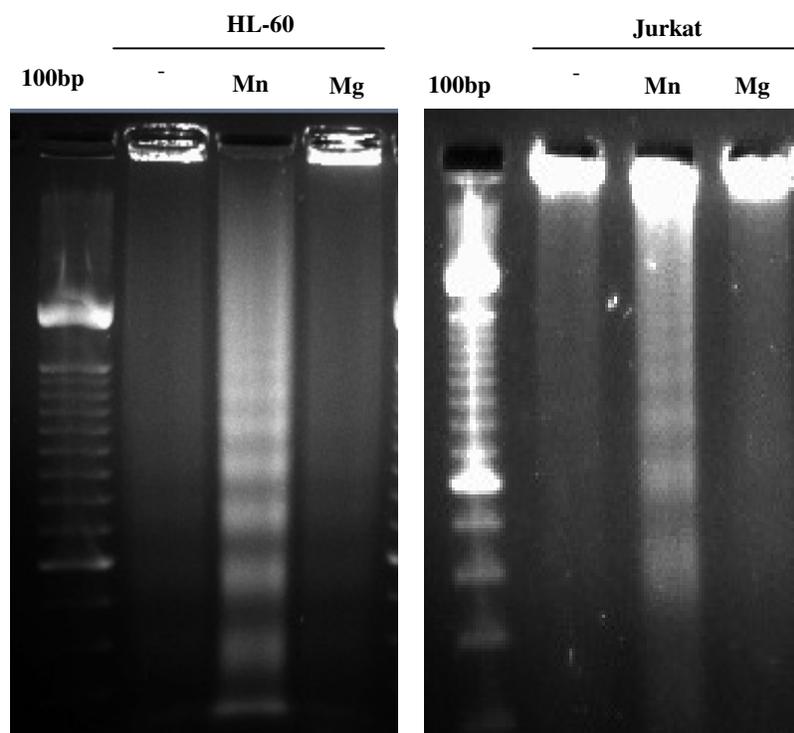


Figura 17. Fragmentação internucleossomal do DNA após o tratamento com manganês. A fragmentação internucleossomal foi avaliada em gel de agarose após 72h de tratamento com 100 μ M de cloreto de manganês ou cloreto de magnésio. Resultado representativo de três experimentos.

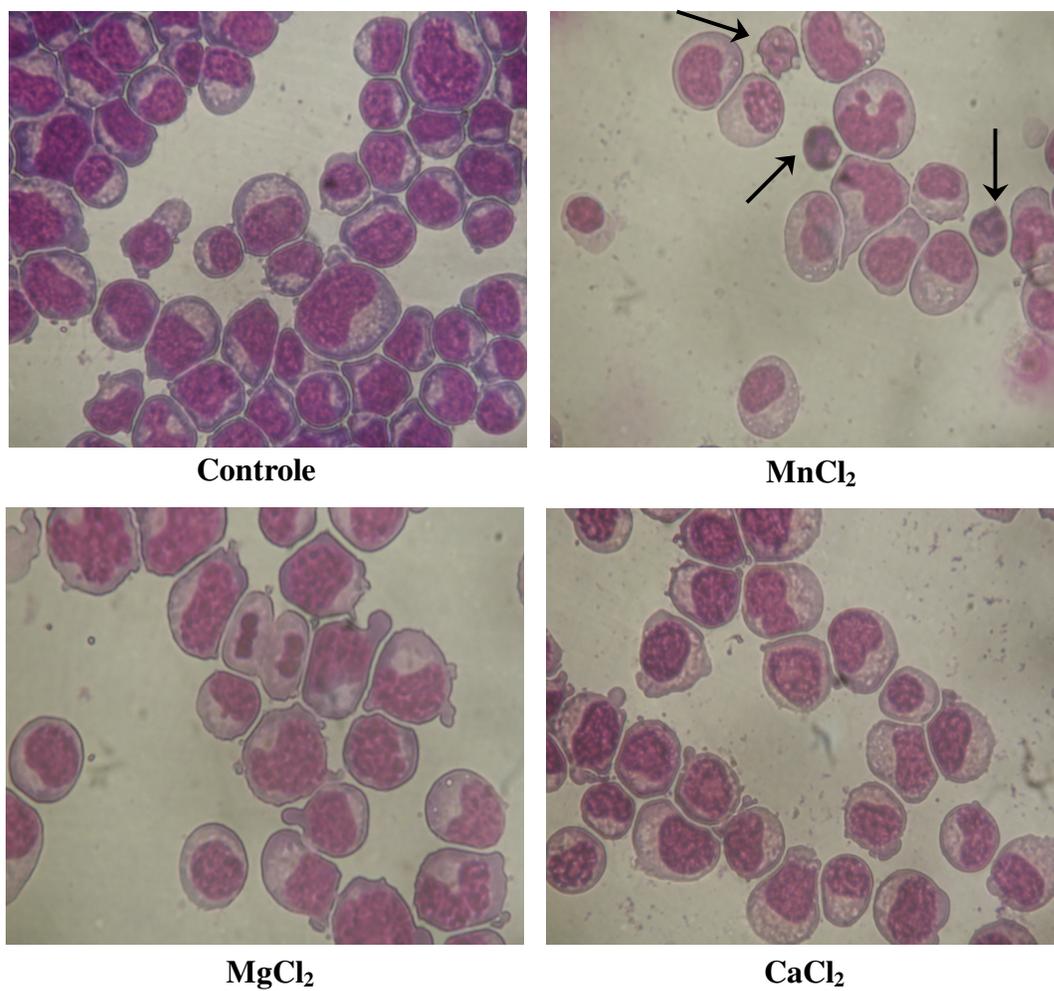


Figura 18. A morte induzida por manganês altera a morfologia da linhagem Jurkat. Morfologia nuclear de Jurkat tratadas com 100 μ M de MnCl₂, MgCl₂ e CaCl₂ por 48h.

4.4. A morte celular induzida pelo manganês pode ser impedida pela superexpressão de Bcl-xL

A proteína Bcl-xL, pertencente à família de proteínas Bcl-2, é capaz de inibir a apoptose atuando na mitocôndria e prevenindo a liberação de citocromo c e a perda do potencial de membrana mitocondrial. Conforme mostrado na figura 12, o manganês é capaz de induzir a permeabilização da mitocôndria e conseqüente perda do potencial de membrana. Assim, para confirmar a ativação da via mitocondrial e investigar o efeito da proteína Bcl-xL nesse modelo, foi avaliado se a superexpressão da proteína Bcl-xL seria capaz de reverter o efeito do tratamento com cloreto de manganês.

As linhagens HL-60 e HL-60.Bcl-xL foram tratadas com diferentes doses de cloreto de manganês por 24h. A figura 19 mostra que a linhagem HL-60 é extremamente sensível ao tratamento como demonstrado anteriormente, mas a superexpressão de Bcl-xL é capaz de inibir totalmente a apoptose induzida pelo manganês em todas as concentrações testadas. Esses dados, portanto, confirmam o papel da via mitocondrial na morte induzida pelo manganês.

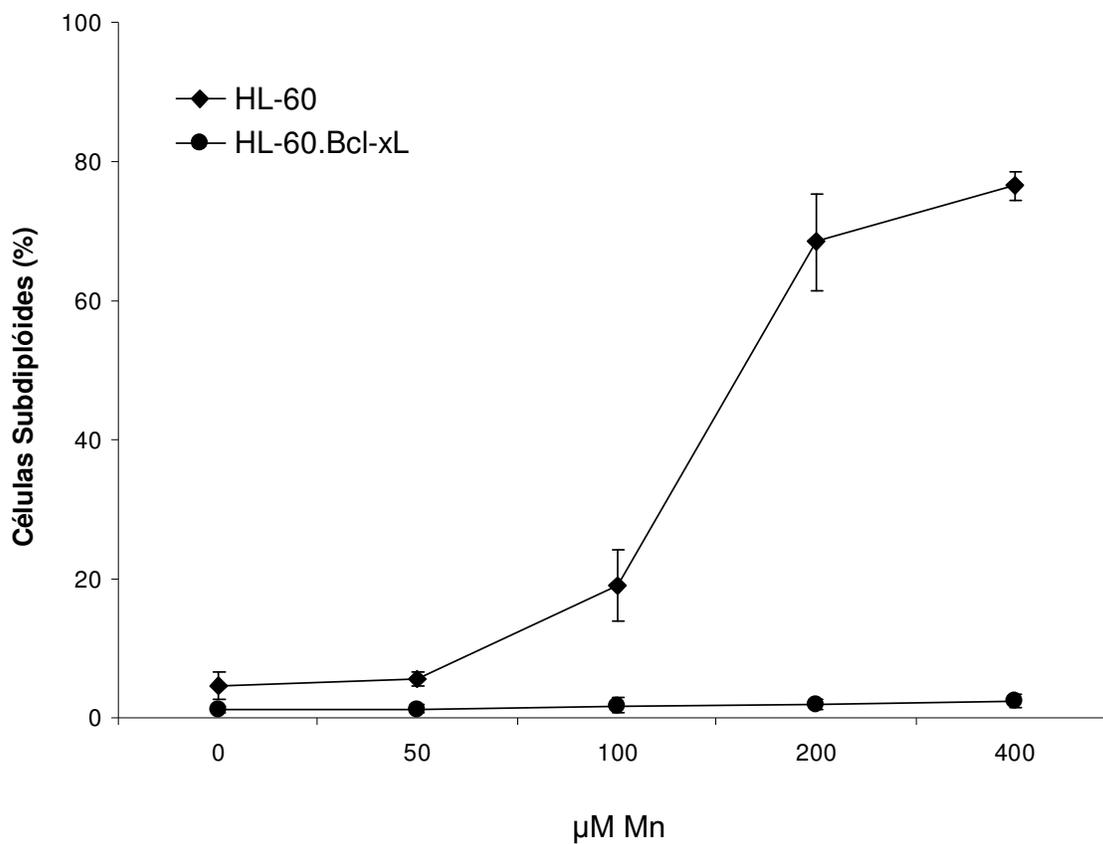


Figura 19. A superexpressão de Bcl-xL confere resistência ao tratamento com cloreto de manganês. As linhagens HL-60 e HL-60.Bcl-xL foram tratadas com concentrações de 50 a 400 μM de cloreto de manganês por 24h e a porcentagem de morte celular foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3).

4.5. A sensibilidade ao manganês é célula-específica

Devido às diferenças intrínsecas que existem entre linhagens celulares distintas, é esperado que elas não respondam da mesma maneira aos estímulos provenientes do meio externo, permitindo ainda o estudo de terapias específicas para cada tipo de tumor. Assim, procurou-se avaliar a diferença de sensibilidade das diferentes linhagens hematopoiéticas ao tratamento com manganês. Dessa maneira, as linhagens HL-60, SKW6.4 e Jurkat foram tratadas com doses crescentes de cloreto de manganês por 48h e a indução de morte celular foi avaliada. Como se pode observar na figura 20, a linhagem SKW 6.4 é a mais sensível ao manganês, apresentando uma incidência de morte celular de aproximadamente 20 e 40% nas concentrações de 25 e 50 μ M de manganês, respectivamente. Essas mesmas concentrações não foram capazes de induzir morte celular de maneira significativa nas linhagens Jurkat e HL-60. O tratamento com 100 μ M é capaz de induzir morte em todas as linhagens. Nessa concentração, a linhagem SKW6.4 permanece a mais sensível apresentando uma incidência de 60% de células apoptóticas, enquanto as linhagens HL-60 e Jurkat apresentam apenas entre 30 e 40% de incidência de morte celular. No entanto, o tratamento com 200 μ M de manganês tem efeito similar nas linhagens HL-60 e SKW 6.4, induzindo aproximadamente 80% de apoptose. A linhagem Jurkat permanece a mais resistente nesta concentração, exibindo uma incidência de morte celular entre 50 e 60% em comparação ao controle. Na dose mais alta analisada (400 μ M), os resultados se modificam, pois a linhagem HL-60 passa a ser a mais sensível apresentando 90% de morte por apoptose, enquanto as linhagens SKW6.4 e Jurkat não exibem aumento de incidência de células apoptóticas em relação à concentração de 200 μ M (Figura 20).

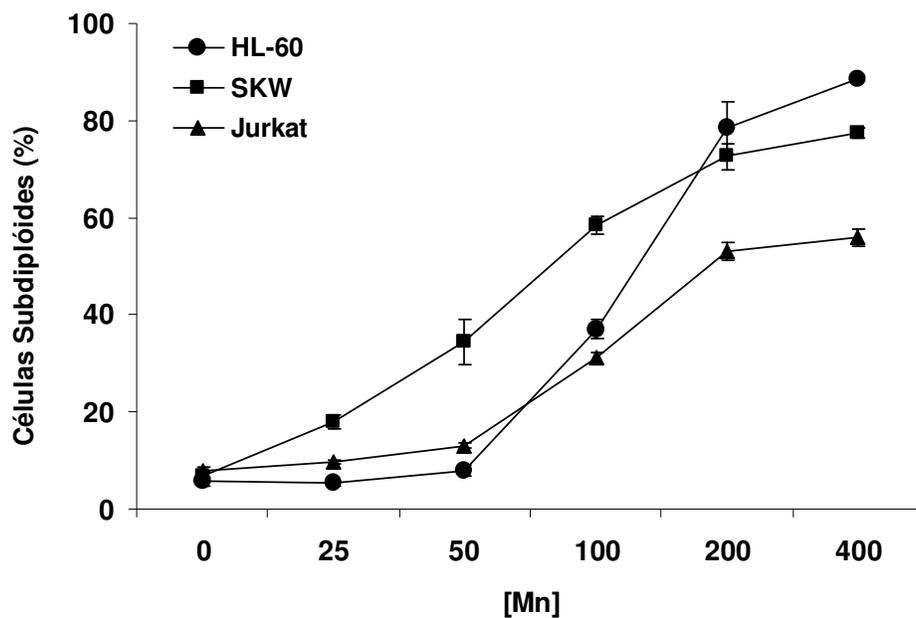


Figura 20. Comparação da sensibilidade ao manganês de diferentes hematopoiéticas.

As linhagens HL-60, Jurkat e SKW6.4 foram tratadas com concentrações de 25 a 400 μM de cloreto de manganês por 48h e a condensação e fragmentação de DNA foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide ($N \geq 3$).

4.6. O manganês não é capaz de interferir no ciclo celular

Existem alguns trabalhos na literatura mostrando que o tratamento com manganês é capaz de interromper o ciclo celular de certas linhagens em fases específicas (Sengupta *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008). Tendo isso em vista, as linhagens Jurkat e HL-60 foram tratadas com 100 μ M de manganês por 48h e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi analisada. Como se pode observar na figura 21, o manganês não foi capaz de interferir com o ciclo celular de nenhuma das duas linhagens. Com relação à linhagem Jurkat, a porcentagem de células na fase G0/G1 é pouco maior do que 50%, na fase S aproximadamente 30% e a fase G2/M corresponde a aproximadamente 18% das células da cultura. As porcentagens encontradas na linhagem HL-60 são pouco diferentes das encontradas na linhagem Jurkat e também não foram modificadas pelo tratamento com manganês. A porcentagem de células nas fases G0/G1 correspondem a aproximadamente 45%, a fase S a 40%, e as fases G2/M a 14% das células da cultura.

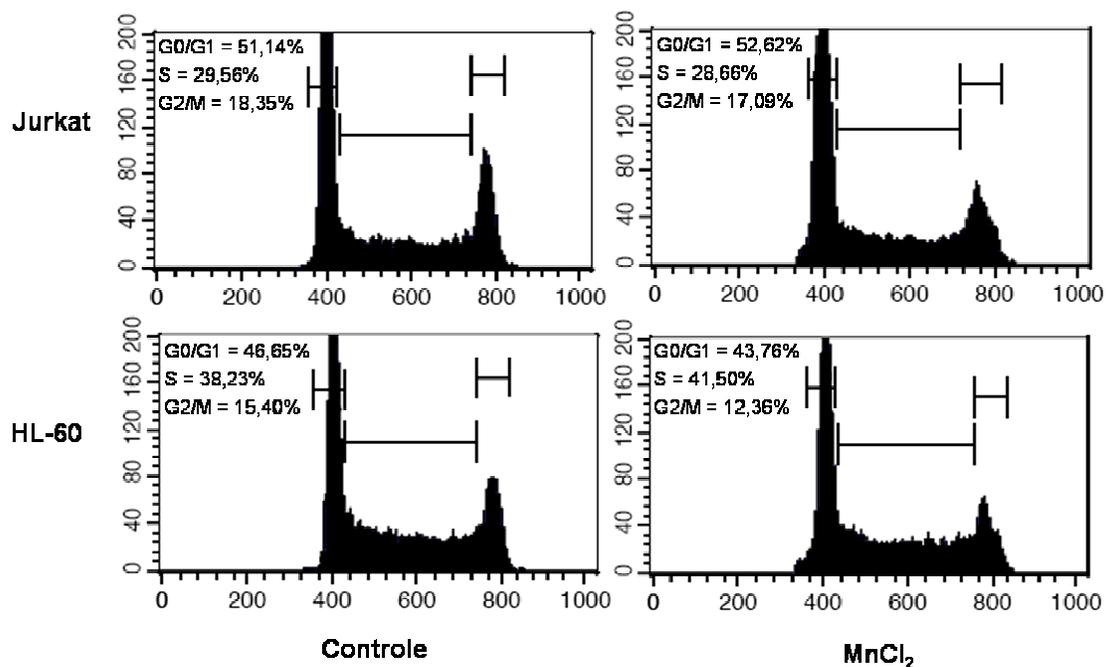


Figura 21. Avaliação do ciclo celular após tratamento com cloreto de manganês. As linhagens HL-60 e Jurkat foram tratadas com 100 μ M cloreto de manganês por 48h e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular avaliada por citometria de fluxo. Resultado representativo de dois experimentos.

4.7. O manganês não apresenta efeito sinérgico com quimioterápicos

Uma possibilidade interessante a ser avaliada era a capacidade do manganês de sinergizar com drogas quimioterápicas já utilizadas na clínica como vincristina e cisplatina. Desta maneira, as linhagens Jurkat e HL-60 foram tratadas com baixas concentrações de cisplatina (1 μ M, 2,5 μ M e 5 μ M) e de vincristina (1nM, 3nM 6nM) isoladamente ou concomitantemente com uma concentração subtóxica de 50 μ M de cloreto de manganês.

Na figura 22, pode-se observar o tratamento da linhagem HL-60 com cisplatina e vincristina isoladamente ou associadas a 50 μ M de cloreto de manganês por 48h. A adição de manganês ao tratamento com as referidas drogas também não teve efeito sinérgico na linhagem HL-60, permanecendo os níveis de morte celular inalterados pela adição do manganês.

A figura 23A mostra o tratamento da linhagem Jurkat tratada apenas com cisplatina ou manganês e cisplatina concomitantemente. Após 48h de tratamento, a avaliação da apoptose demonstrou que o manganês não teve efeito sobre o tratamento com a droga. Na figura 23B são mostrados os resultados do tratamento da linhagem Jurkat com vincristina e manganês e, conforme os dados com cisplatina, também não houve efeito sinérgico.

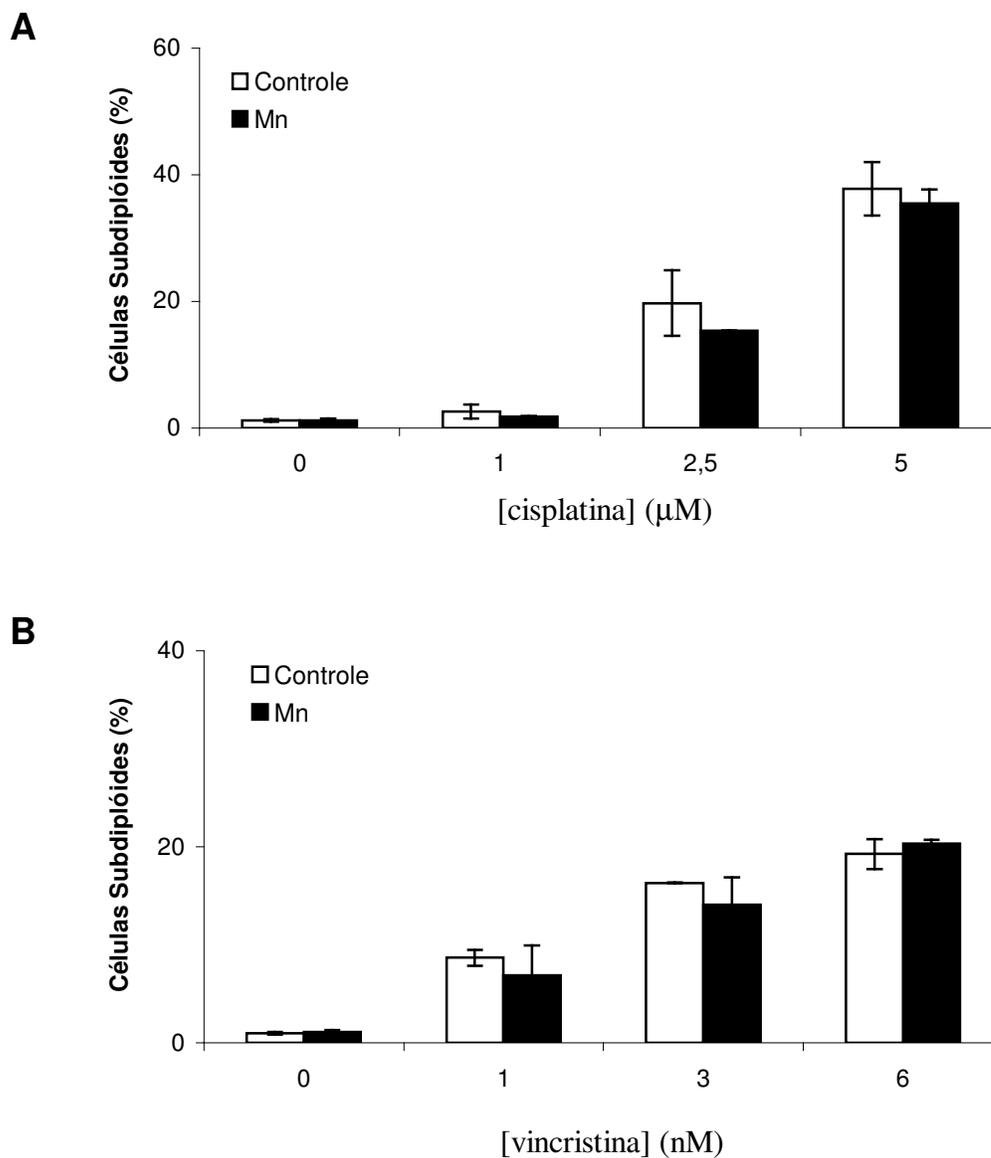


Figura 22. Tratamento da linhagem HL-60 com manganês e quimioterápicos. (A) Tratamento associado à cisplatina. **(B)** Tratamento associado à vincristina. A linhagem HL-60 foi tratada por 48h com 50 μM de cloreto de manganês associado a diferentes concentrações dos quimioterápicos cisplatina e vincristina. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. ($N \geq 3$).

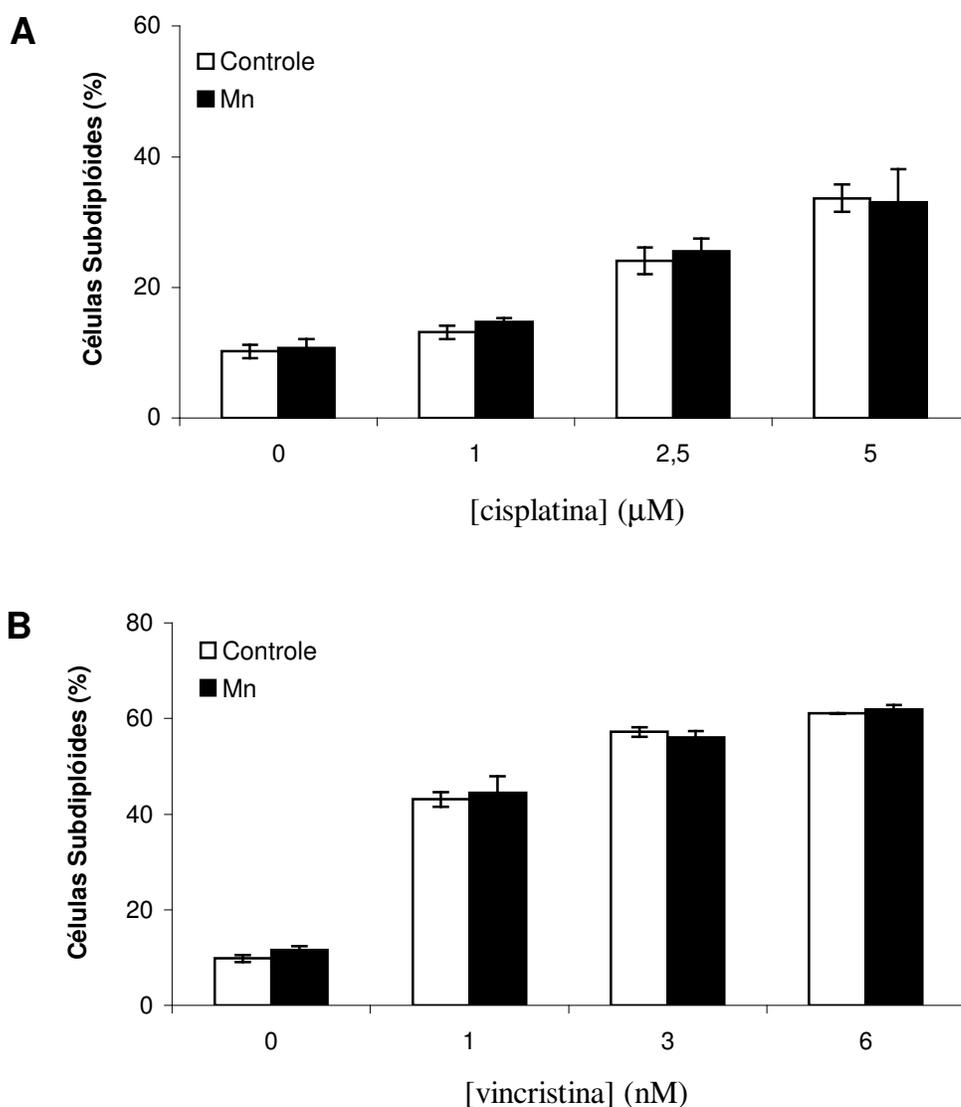


Figura 23. Tratamento da linhagem Jurkat com manganês e quimioterápicos. (A) Tratamento associado à cisplatina. **(B)** Tratamento associado à vincristina. A linhagem Jurkat foi tratada por 48h com 50 μM de cloreto de manganês associado a diferentes concentrações dos quimioterápicos cisplatina e vincristina. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA sub-diploide. (N \geq 3).

4.8. A autofagia tem papel protetor na morte celular induzida pelo manganês na linhagem HL-60

A autofagia é um processo celular que pode tanto contribuir como evitar ou postergar processos de morte celular. O inibidor a 3-metiladenina (3-MA) inibe uma das primeiras etapas deste processo que é a formação da membrana de isolamento, que permitirá em última análise que componentes citoplasmáticos sejam capturados em um vacúolo autofágico. Para avaliar se o tratamento com manganês poderia induzir autofagia, as linhagens foram tratadas com as concentrações indicadas de 3-MA concomitantemente com 100 μ M de manganês e a porcentagem de células com conteúdo de DNA subdiploide foi avaliada por citometria de fluxo.

Para avaliar a citotoxicidade do inibidor e definir qual seria a melhor dose para o tratamento, a linhagem HL-60 foi tratada com as concentrações 1, 3 e 10mM do inibidor 3MA. Nessa linhagem, apenas a dose de 10mM mostrou significativa citotoxicidade, induzindo uma morte celular de 80% (Figura 24A). O tratamento com 1mM não induziu nenhum aumento com relação a morte celular basal na cultura. A dose 3mM elevou a morte celular basal de 5 para 11%. Quando essa linhagem foi tratada com o inibidor concomitantemente com o cloreto de manganês, pode-se observar que mesmo a dose mais baixa de 3-MA, 1mM, é capaz de potencializar a morte celular induzida pelo manganês, indicando que nessa linhagem o manganês parece induzir autofagia, e que este processo estaria contribuindo para a sobrevivência celular.

Como na linhagem HL-60 a dose de 1mM de 3-MA foi suficiente para observar o efeito da autofagia, a linhagem Jurkat foi tratada apenas com essa dose. No entanto, essa

linhagem se mostrou mais sensível ao tratamento com o inibidor. Mesmo no estado basal 1mM do inibidor foi capaz de induzir um aumento de cerca de 10% na morte celular basal da cultura. O mesmo aumento da morte celular é visto no tratamento concomitante com o manganês, indicando a importância da autofagia basal para a sobrevivência celular e que o tratamento com manganês não induz um aumento desse processo (Figura 24B).

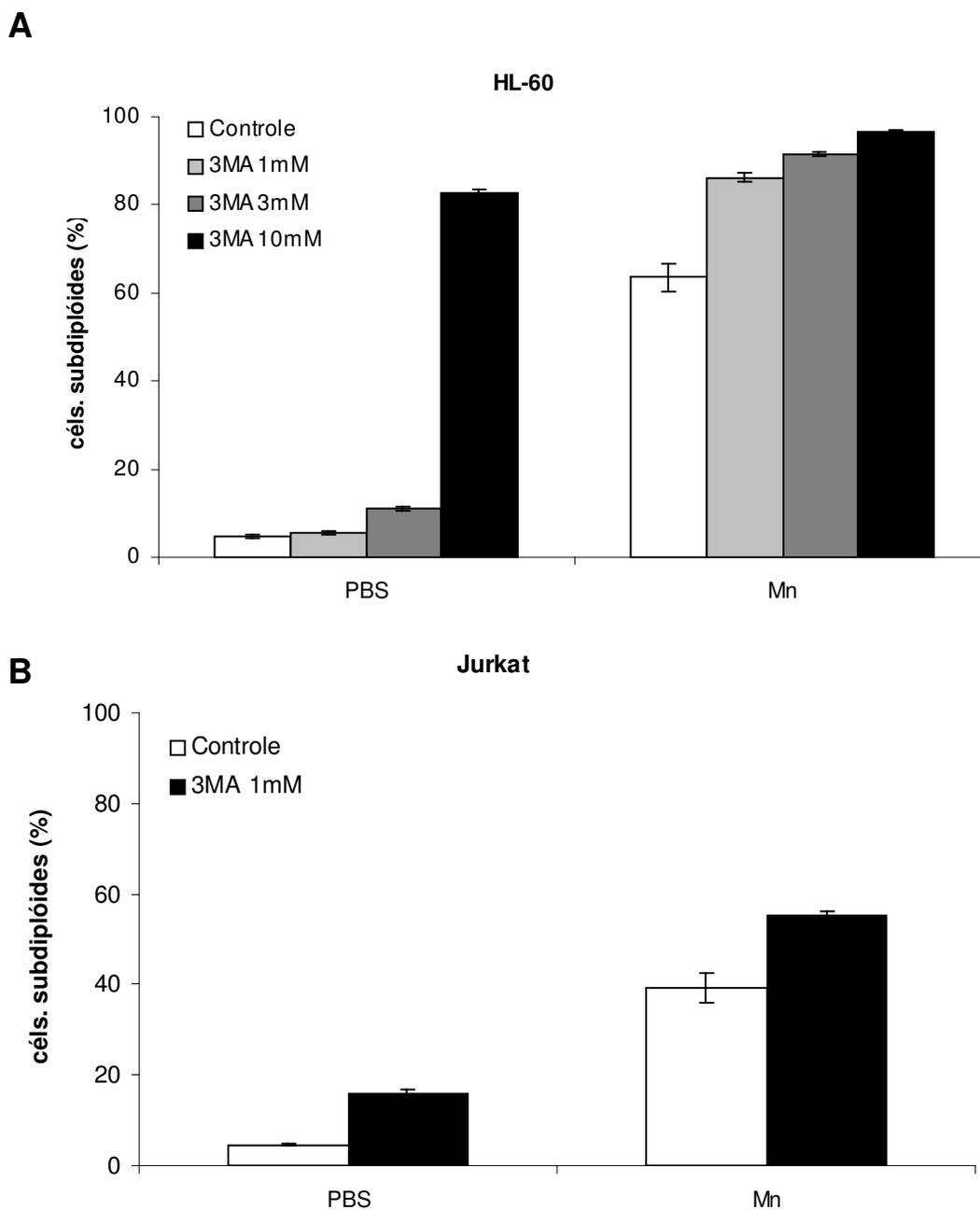


Figura 24. Avaliação da morte celular autofágica após tratamento com 100 μ M de cloreto de manganês por 48h. As linhagens foram tratadas com as concentrações indicadas de 3-MA concomitantemente com 100 μ M de manganês por 48h e a porcentagem de células com conteúdo de DNA subdiploide foi avaliada por citometria de fluxo. Resultado respresentativo de dois experimentos.

4.9. Manganês induz morte celular em diversas linhagens tumorais

Uma vez que não foi observado sinergismo entre baixas doses de manganês e conhecidos quimioterápicos, a citotoxicidade do manganês foi então analisada em maior detalhe através da sua capacidade de induzir morte celular por apoptose em diversas linhagens tumorais. Foram utilizadas linhagens de tumores sólidos – A549 (carcinoma de pulmão), Du145 (metástase de carcinoma de próstata), A431NS (carcinoma epidermóide de vulva), C-33A (carcinoma de cérvix uterino), Caco-2 (adenocarcinoma colorretal), HeLa (adenocarcinoma de cérvix uterino), HepG2 (carcinoma hepatocelular), MCF7 (adenocarcinoma de mama) e U-87 MG (glioblastoma) – e tumores hematopoiéticos – HL-60 (leucemia promielocítica aguda), Jurkat (leucemia aguda de célula T), K-562 (leucemia mielóide crônica) e Raji (linfoma de Burkitt). Todas as linhagens foram tratadas com a dose de 100 μ M de manganês por 48h e a morte celular foi avaliada por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo.

Como pode ser observada na figura 25, a apoptose induzida pelo manganês é dependente do tipo celular e provavelmente das vias de sinalização que se encontram alteradas nessas linhagens tumorais. Pode-se perceber a presença de três grupos: um grupo de linhagens extremamente sensível ao tratamento, composto pelas linhagens C-33A e Caco-2; um grupo que apresenta sensibilidade intermediária, composto pelas linhagens de tumores hematopoiéticos (HL-60, Jurkat, Raji e K562) e pelas linhagens HeLa, HepG2 e A431NS; e um grupo de células resistentes, composto pelas linhagens A549, MCF7, Du145 e U87.

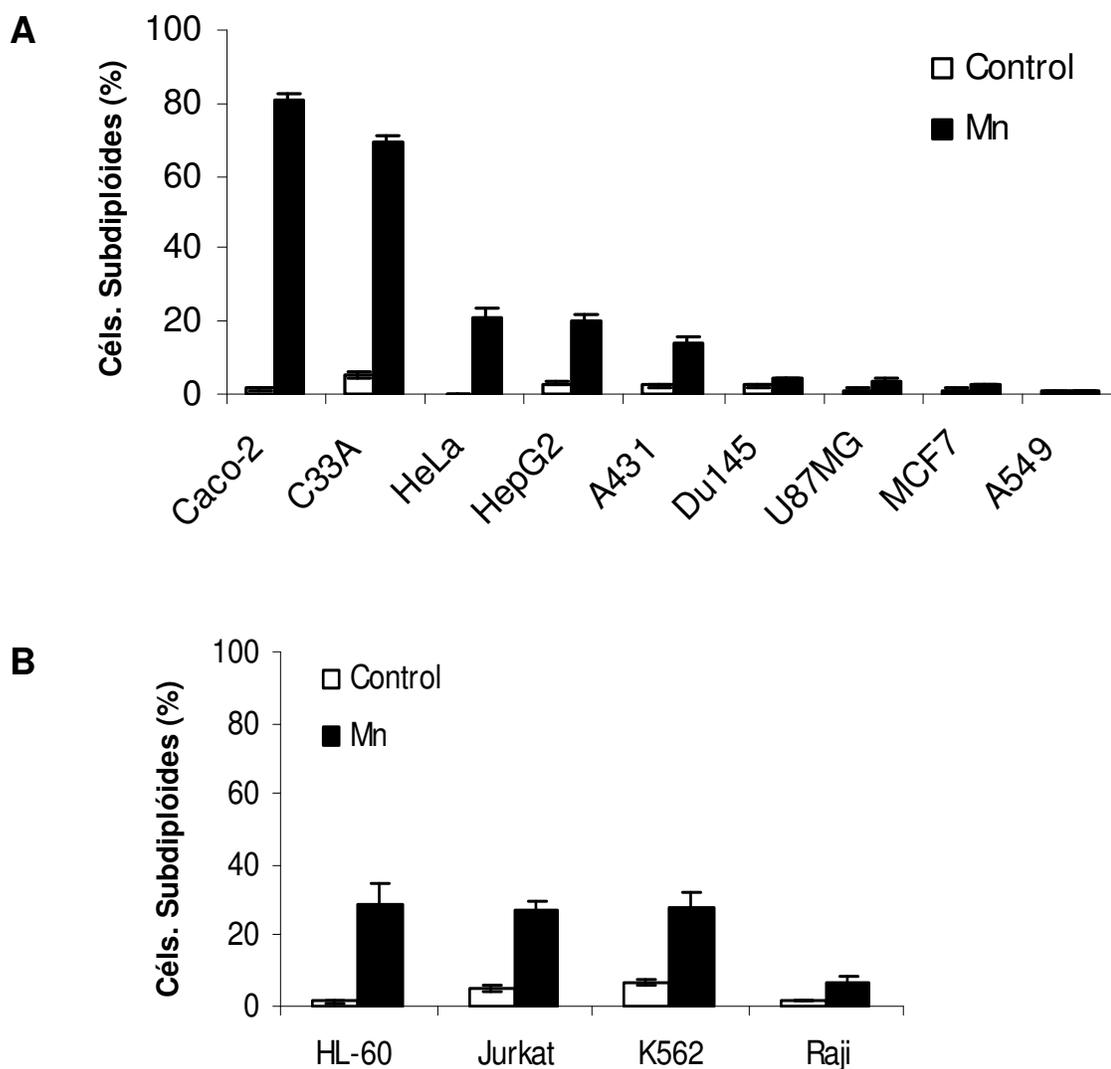


Figura 25. O manganês é capaz de induzir apoptose em diferentes linhagens tumorais.

(A) Apoptose induzida pelo manganês em linhagens de tumores sólidos. Experimento representativo de três experimentos independentes. (B) Apoptose induzida pelo manganês em linhagens de tumores hematopoiéticos. Após tratamento com 100 μ M de manganês por 48h, a fragmentação foi avaliada por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3).

4.10. A sensibilidade ou resistência das linhagens celulares ao manganês é específica

Com objetivo de avaliar se a sensibilidade das linhagens era específica para o manganês, ou se elas eram já intrinsecamente sensíveis a qualquer tipo de tratamento, todas as linhagens tumorais testadas para a sensibilidade ao manganês também foram tratadas com os quimioterápicos vincristina e cisplatina. Os quimioterápicos vincristina e cisplatina foram escolhidos por terem mecanismos de ação diferentes: o primeiro se liga irreversivelmente aos microtúbulos impedindo o progresso da mitose; e o segundo é um agente que forma *crosslinks* no DNA impedindo a separação da dupla fita durante a replicação.

Na figura 26A, pode-se observar a resposta das linhagens de tumores sólidos ao tratamento com 10 μ M de cisplatina. A linhagem HepG2 foi a mais sensível, apresentando uma incidência de apoptose de cerca de 50%. As linhagens Caco-2, C-33A, A431, Du145 e U87MG apresentam uma sensibilidade intermediária, com 15% de incidência de apoptose. As linhagens HeLa, MCF7 e A549 não apresentaram nenhuma alteração após o tratamento com essa concentração de cisplatina.

As linhagens de tumores hematopoiéticos Jurkat e HL60 apresentaram uma grande sensibilidade ao tratamento com cisplatina apresentando uma incidência de apoptose em torno de 80 e 100%, respectivamente. As linhagens K562 e Raji apresentaram incidência apoptose em torno dos 15% como as linhagens de tumores sólidos de sensibilidade intermediária (Figura 26B).

O tratamento com 10nM de vincristina por 48h induziu morte celular bastante intensa em grande parte das linhagens analisadas. Na figura 8A, pode-se observar que apenas as linhagens HeLa e A549 se mostraram totalmente resistentes ao tratamento com vincristina. As linhagens MCF7, U87MG e Du145 apresentaram incidência de apoptose entre 20 e 50%. Todas as outras linhagens de tumores sólidos apresentaram incidência de apoptose superior a 50% (Figura 27A).

As linhagens Jurkat e HL-60 apresentaram uma enorme sensibilidade ao tratamento com vincristina apresentando incidência de apoptose em torno de 90%. A linhagem K562 teve uma incidência de apoptose de cerca de 50% e a linhagem Raji foi a mais resistente, exibindo uma incidência de apoptose em torno de 20% (Figura 27B).

Observando-se em conjunto as figuras 25, 26 e 27 nota-se que, embora as linhagens Caco-2 e C33A sejam extremamente sensíveis ao manganês, elas não são igualmente sensíveis ao quimioterápico cisplatina. Em contraste, a linhagem Du145, embora bastante resistente ao tratamento com manganês, apresenta 50% das células com conteúdo subdiploide de DNA após o tratamento com vincristina. Esses resultados em conjunto mostram que o manganês ativa vias de sinalização específicas nessas linhagens que as tornam especificamente sensíveis ou resistentes ao manganês.

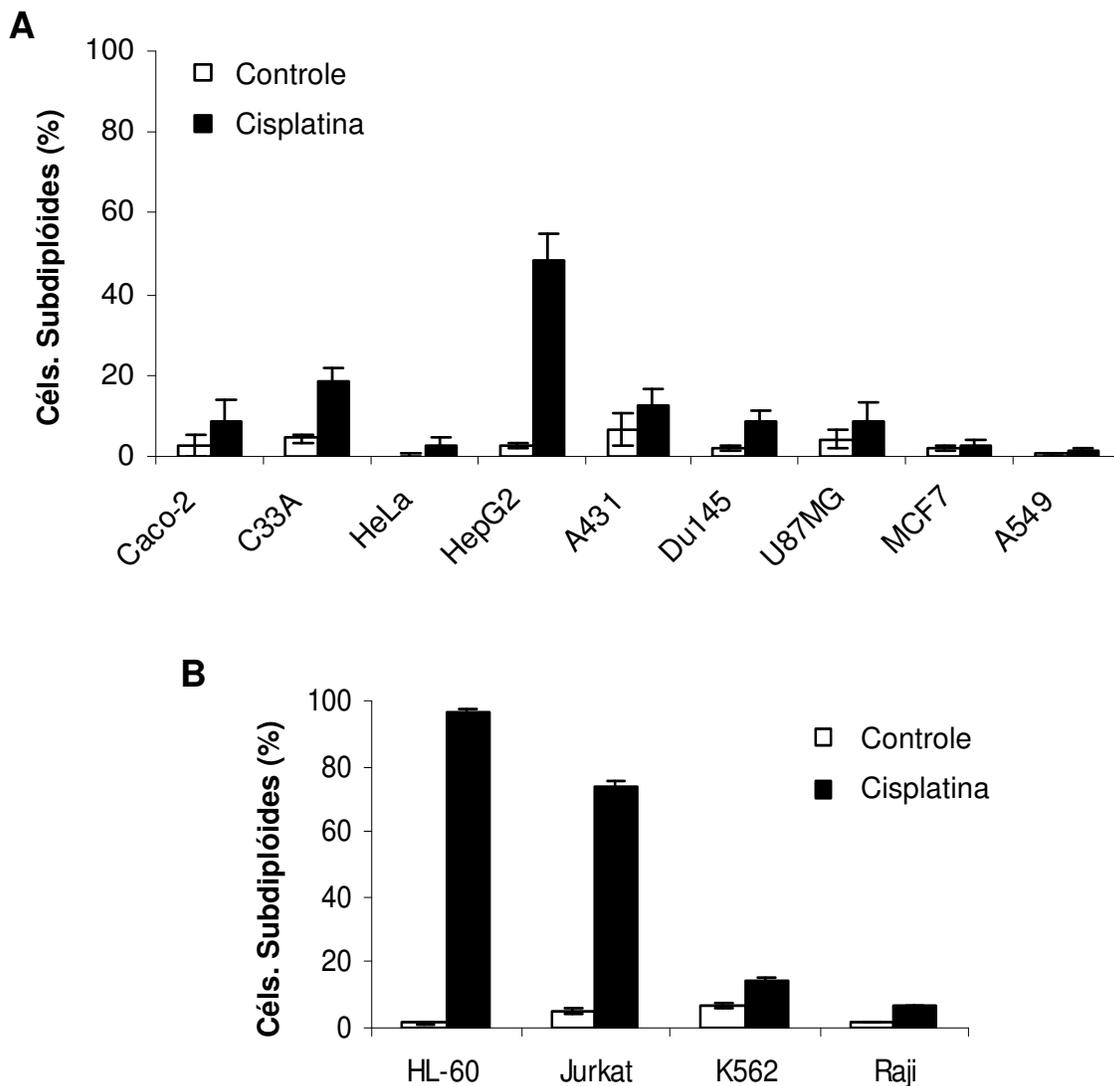


Figura 26. A apoptose induzida pelo manganês não se correlaciona com a apoptose induzida pela cisplatina. (A) Apoptose induzida pela cisplatina em linhagens de tumores sólidos. **(B)** Apoptose induzida pela cisplatina em linhagens de tumores hematopoiéticos. Após tratamento com 10 μ M de cisplatina por 48h, o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3).

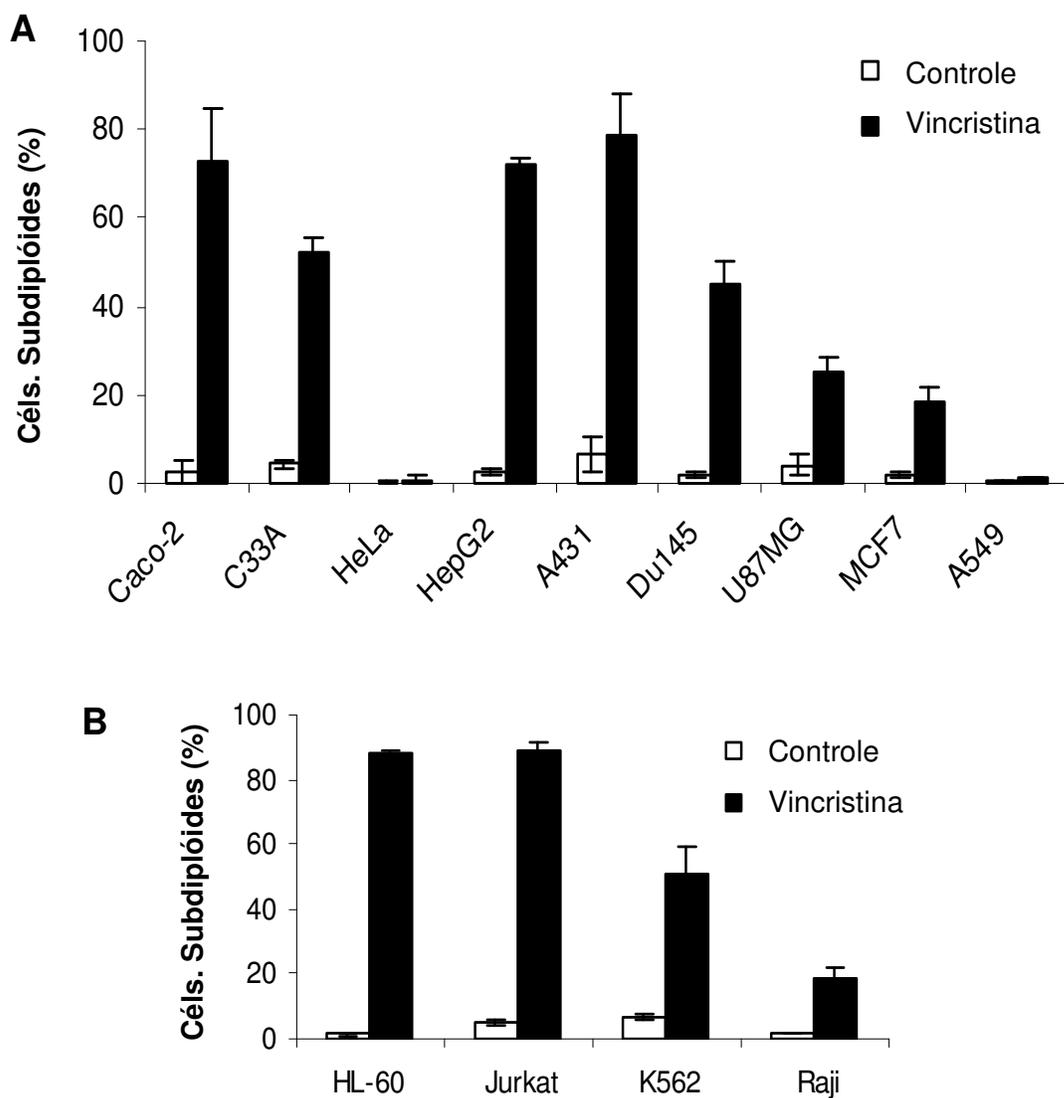


Figura 27. A apoptose induzida pelo manganês não se correlaciona com a apoptose induzida pela vincristina. (A) Apoptose induzida pela vincristina em linhagens de tumores sólidos. **(B)** Apoptose induzida pela vincristina em linhagens de tumores hematopoiéticos. Após tratamento com 10nM de vincristina por 48h, o conteúdo de DNA foi analisado por citometria de fluxo. Os valores representam a porcentagem média \pm SD das células com conteúdo de DNA subdiploide. (N \geq 3).

4.11. Expressão diferencial de genes reguladores da apoptose entre diferentes linhagens tumorais

Dentre as linhagens testadas para a sensibilidade ao manganês, foram selecionadas duas com características opostas para um estudo mais aprofundado: uma bastante sensível, C33A, e outra muito resistente ao tratamento, Du145. Essas duas linhagens foram tratadas por 16h com 100 μ M de manganês. A partir do RNA dessas culturas controle e tratadas realizou-se PCR em tempo real para quantificar a expressão de alguns genes responsáveis pela regulação da apoptose: Bcl-xL e Bcl-W, genes anti-apoptóticos da família Bcl-2; Bak e Bax, genes pró-apoptóticos multi-domínios da família Bcl-2; Bad e Noxa, genes pró-apoptóticos BH3-*only* da família Bcl-2; cIAP1 e cIAP2, pertencentes a família das IAPs e, portanto, com função inibidora da apoptose; DR4 e DR5, receptores de morte do ligante TRAIL; e TRAIL.

Os resultados das reações de PCR em tempo real apresentaram ótima reprodutibilidade para cada replicata e diferentes amostras, e nenhum dos resultados mostrados apresentou dímeros de oligonucleotídeos ou outro contaminante. Alguns dos genes não amplificaram em ambas as linhagens: o gene Noxa amplificou apenas na linhagem Du145; e o gene TRAIL que amplificou apenas na linhagem C33A. Quanto ao gene cIAP2, é apresentado apenas o resultado da linhagem Du145, porque a amplificação na linhagem C33A apresentou dois picos de dissociação, o que poderia indicar a presença de uma isoforma exclusiva dessa linhagem. Os resultados mostram ainda que a maioria das diferenças entre as linhagens está na expressão basal dos genes analisados, e não na regulação transcricional diferencial após o tratamento com manganês.

Por ser a resistência à apoptose uma das características que uma célula normal deve adquirir para se transformar em uma célula tumoral, é extremamente comum encontrar nestas genes anti-apoptóticos superexpressos e genes pró-apoptóticos silenciados. Dessa forma, ao se avaliar a expressão gênica de linhagens tumorais, uma informação bastante relevante é o perfil de expressão basal dos genes, ou seja, sem qualquer tratamento. Inicialmente, portanto, comparou-se a expressão dos genes entre as amostras controle das duas linhagens e foram observadas algumas diferenças significativas. O gene Bcl-xL se encontra 3,7 vezes mais expresso na linhagem Du145 do que na linhagem C33A (Figura 28A). Já o gene anti-apoptótico, Bcl-W, não mostrou diferença de expressão entre as duas linhagens (Figura 28B). A expressão basal de Bak não é diferente entre as duas linhagens, no entanto, a proteína Bax encontra-se 28 vezes mais expressa na linhagem C33A do que na linhagem Du145 (Figuras 28 C e D). O gene Bad encontra-se 2,4 vezes mais expresso na linhagem C33A (Figura 28E).

Ao se comparar a expressão dos genes reguladores da apoptose que não pertencem a família Bcl-2, observou-se que o gene cIap1 encontra-se seis vezes mais expresso na linhagem Du145 quando comparada a linhagem C33A (Figura 29A). Não se observou diferenças significativas na expressão dos genes DR4 e DR5 entre as duas linhagens (Figuras 29 C e D).

Em seguida, avaliou-se a modificação de expressão induzida pelo tratamento com manganês. Na linhagem C33A são encontradas diferenças significativas apenas na expressão dos genes Bad e TRAIL. A linhagem C33A na situação controle expressa 2,5 vezes mais o gene Bad que a linhagem tratada (Figura 28E). A modificação de expressão do gene TRAIL é ainda mais significativa, a linhagem na situação controle expressa 10 vezes mais o gene (Figura 29E). Além disso, apesar de não serem diferenças

estatisticamente significativas, existem algumas diferenças de expressão nos genes Bcl-W, DR5, Bak e Bax. O tratamento com manganês parece induzir um aumento de 2,5 vezes na expressão dos genes Bcl-W e DR5. Os genes Bak e Bax, por sua vez, apresentam expressão 4 e 2,6 vezes maior na cultura controle do que na cultura tratada, respectivamente (Figuras 28 C e D).

A análise da expressão gênica na linhagem Du145, revelou que o gene Bcl-W tem sua expressão aumentada em cerca de 160 vezes após o tratamento com manganês (Figura 28B). Já o gene cIAP2 é 2,5 vezes mais expresso na cultura controle do que na cultura tratada com manganês (Figura 29B). Apesar de não ter apresentado uma diferença estatisticamente significativa, o gene Noxa é 3 vezes mais expresso nos controles da linhagem Du145 do que nas culturas tratadas com manganês, indicando uma tendência para a repressão da expressão deste gene (Figura 28F).

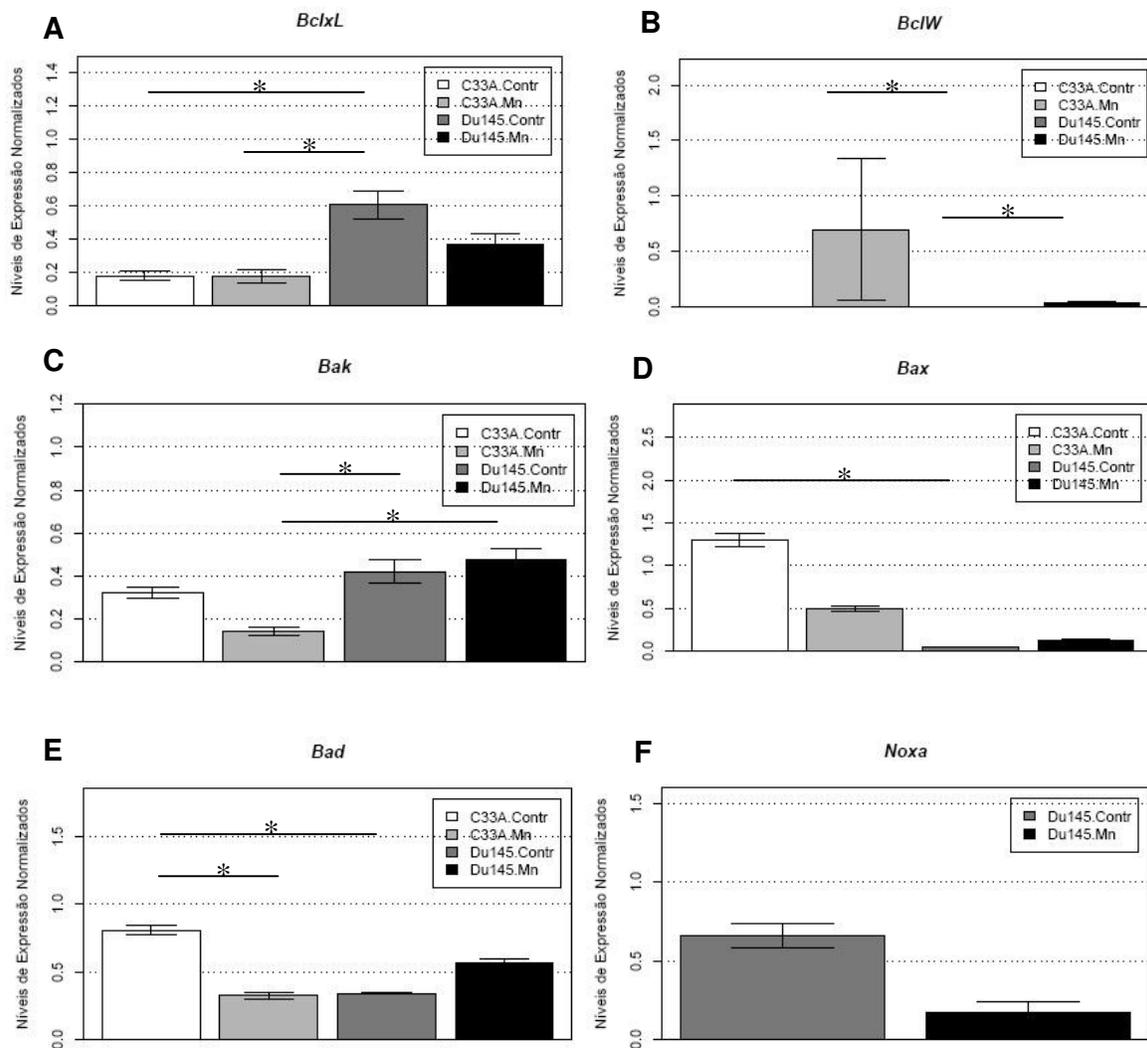


Figura 28. Expressão de genes reguladores da apoptose pertencentes à família Bcl-2. (A) Bcl-xL; (B) Bcl-W; (C) Bak; (D) Bax; (E) Bad; (F) Noxa. Após o tratamento das linhagens C33A e Du145 com 100µM de manganês por 16h, foi extraído seu RNA e avaliada a expressão dos genes de interesse. Os gráficos representam os níveis de expressão relativos aos genes normalizadores. * indicam as comparações em que $p < 0,1$. Os valores representam a média dos níveis de expressão normalizados \pm SE. (N = 4).

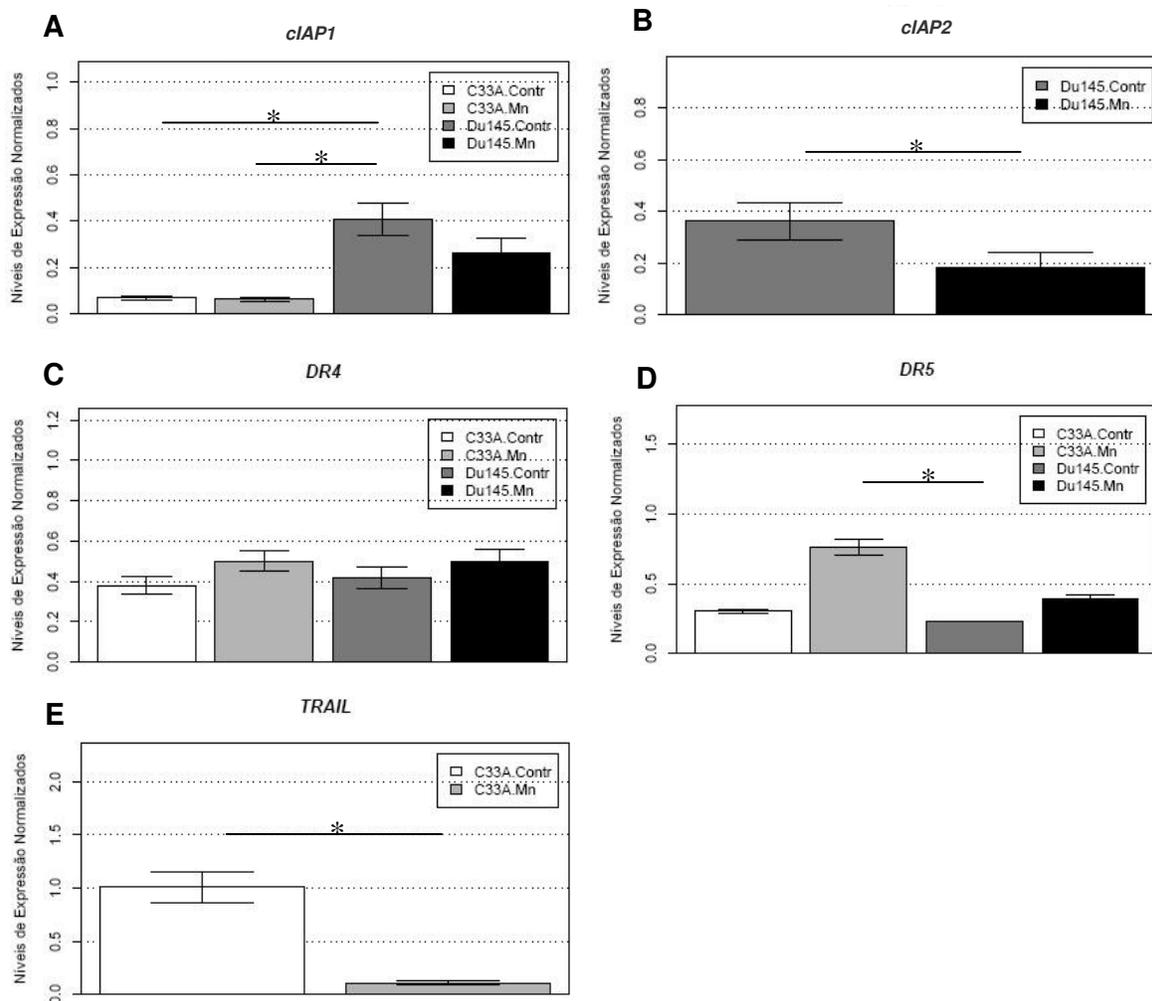


Figura 29. Expressão de genes reguladores da apoptose não-pertencentes à família Bcl-2. (A) cIAP1; (B) cIAP2; (C) DR4; (D) DR5; (E) TRAIL. Após o tratamento das linhagens C33A e Du145 com 100 μ M de manganês por 16h, foi extraído seu RNA e avaliada a expressão dos genes de interesse. Os gráficos representam os níveis de expressão relativos aos genes normalizadores. * indicam as comparações em que $p < 0,1$. Os valores representam a média dos níveis de expressão normalizados \pm SE. (N = 4).

5. DISCUSSÃO

Recentemente, diversos trabalhos na literatura têm mostrado o papel de metais na indução de morte celular e seu papel como potenciais quimioterápicos (Wolf *et al.*, 2007; Franklin e Costello, 2009). Dessa maneira, torna-se interessante a investigação do manganês como indutor de apoptose ou outros tipos de morte celular, já que não existem muitos estudos a respeito dos efeitos anti-tumorais deste metal.

Schranz *et al.* (1999) mostraram que o manganês é capaz de induzir apoptose em diversas linhagens de células B, mas que falhou em induzir apoptose na linhagem mielóide U937, indicando que a capacidade do manganês de induzir apoptose seria específica para linhagens daquela origem. Deste modo, decidimos avaliar a especificidade deste cátion para células B, através de ensaios de sensibilidade em outras linhagens celulares. Inicialmente, investigamos as linhagens Jurkat e HL-60, como modelos de linfócitos T e monócitos, respectivamente. Demonstramos que outras linhagens de células hematopoiéticas também sofrem apoptose após exposição ao manganês e, assim como demonstrado por Schranz *et al.*, a exposição a outros cátions divalentes não tem o mesmo efeito. Mostramos ainda que o efeito do manganês também é dose- e tempo-dependente e apresenta diversas características morfológicas e bioquímicas clássicas do processo de apoptose além de ativação de caspase.

Sengupta *et al.* (2007) mostraram que o manganês diminui a expressão de genes reguladores do ciclo celular e induz em astrócitos um acúmulo na fase S do ciclo celular. O efeito do manganês no ciclo celular também foi mostrado por Zhao *et al.* (2008), onde o tratamento da linhagem A549 com 500 μ M de manganês causa uma parada no ciclo celular nas fases G0/G1 e S. Demonstraram ainda que o tratamento com manganês causa uma

diminuição na expressão de Cdk4, Cdk2 e ciclina A, bem como um aumento de p53 e inibidor de CDK p21, o que poderia ser responsável pela parada no ciclo celular (Zhao *et al.*, 2008). No entanto, no presente estudo não observamos efeitos modulatórios do manganês no ciclo celular, sugerindo que esse efeito pode ser específico para cada tipo celular, além de depender da concentração de manganês utilizada no tratamento das células.

Por ser a proteína anti-apoptótica Bcl-xL extremamente potente, o seu efeito protetor sobre a linhagem HL-60 após o tratamento com o manganês era esperado. A diminuição da citotoxicidade do manganês pela superexpressão de Bcl-xL é consistente com os dados de Schrantz *et al.* (1999), que mostraram um efeito protetor de Bcl-2, indicando que em ambos os casos a via mitocondrial de morte celular está sendo ativada. A diminuição do potencial de membrana mitocondrial e diminuição da forma inativa da caspase-9 (procaspase-9) após o tratamento com o manganês também indicam a ativação da via mitocondrial. Esses dados diferem da morte celular induzida pelo manganês em células HeLa, que parece ser independente da mitocôndria, pois o tratamento com este metal não leva a liberação de citocromo c, mas sim a um aumento do potencial de membrana mitocondrial (Oubrahim *et al.*, 2001), indicando mais uma vez que o efeito do manganês é dependente do tipo celular estudado.

O tratamento com os inibidores DEVD-fmk, IETD-fmk e LEHD-fmk teve resultados não esperados na linhagem HL-60. O tratamento com LEHD-fmk, inibidor de caspase-9, parece não ter tido qualquer efeito sobre a porcentagem de células com conteúdo de DNA subdiploide. No entanto, o inibidor de caspase-8, IETD-fmk, parece ter inibido 20% da morte celular o que poderia indicar uma ativação da via extrínica da apoptose ou uma ativação de caspase-8 independente de receptor de morte. De fato, El Mchichi *et al.* (2007) demonstraram a ativação de caspase-8 independente de FADD após o tratamento

com manganês na linhagem de células B BL41, indicando que a caspase-8 poderia ser ativada por uma via mitocondrial, embora sua ativação não tenha sido verificada por outras técnicas. Já a falta de resposta ao inibidor de caspase-9 poderia ter sido causada por uma concentração insuficiente de inibidor ou uma superativação de caspase-9. Apesar de os dados da literatura indicarem que a concentração de 20 μ M deste inibidor é suficiente para inibir a ativação das caspases, o ideal é que a concentração de inibidores farmacológicos seja sempre ajustada por curva dose-resposta para cada célula.

O tratamento da linhagem Jurkat com os mesmos inibidores de caspases, DEVD-fmk, IETD-fmk e LEHD-fmk, mostrou um efeito mínimo destes na apoptose induzida pelo manganês. Esses resultados poderiam indicar uma menor dependência das caspases na morte celular induzida por manganês nesse tipo celular já que, como visto pelas figuras 13 a 15, a ativação de caspases seria realmente menos pronunciada nessa linhagem quando comparada com a HL-60.

O manganês é um metal normalmente tóxico para o organismo. Testes com ratos mostraram que, após injeção intravenosa, o manganês é rapidamente transportado da corrente sanguínea para órgãos como o cérebro (Maynard e Cotzias, 1955). Uma exposição exagerada a este metal, portanto, pode levar ao seu acúmulo nesses órgãos e causar doenças como o manganismo. Como a utilização de altas doses de manganês em um cenário clínico seria inviável devido a citotoxicidade, seria extremamente interessante, portanto, que baixas doses do manganês pudessem sensibilizar células tumorais ao tratamento com quimioterápicos já utilizados na clínica. Existem trabalhos na literatura mostrando a capacidade do manganês de potencializar a morte celular induzida por certas substâncias, como *1-metil-4-fenilpiridinium* (MPP⁺) e dopamina (Wang e Zhu, 2003; Oikawa *et al.*,

2006). No entanto, o tratamento combinado de 50 μ M de manganês com os quimioterápicos vincristina e cisplatina nas linhagens HL-60 e Jurkat não mostrou efeito sinérgico. Os quimioterápicos testados, porém, conhecidamente ativam a via intrínseca de apoptose, via que também se acredita ser a utilizada pelo manganês nas duas linhagens utilizadas para estudo. Dessa forma, ainda seria interessante investigar a possibilidade do manganês apresentar efeito sinérgico com outros quimioterápicos que ativassem vias de morte celular extrínseca, vias de estresse de retículo ou até outros tipos de morte celular, como autofágica e necrótica.

Células tumorais, em geral, apresentam defeitos em vias de morte celular apoptótica. Assim, as investigações de outras vias de morte celulares têm sido muito incentivadas. Existem alguns trabalhos indicando que outras vias de morte celular podem contribuir para morte celular induzida pelo manganês. Roth *et al.* (2000) demonstraram que o manganês é capaz de induzir necrose na linhagem PC12 quando há inibição geral de caspases por zVAD-fmk e DEVD-CHO, um inibidor seletivo de caspase-3, indicando uma possível contribuição de ambos processos para a morte celular. Outro estudo demonstra que a morte induzida pelo manganês na linhagem NIH3T3 derivada de camundongos tem a participação de caspase-12 (Oubrahim *et al.*, 2002), caspase esta que em camundongos está envolvida na via de apoptose iniciado por estresse de retículo endoplasmático. Têm surgido ainda diversos trabalhos mostrando a importância da morte celular autofágica para prevenir o desenvolvimento de tumores e a possibilidade da ativação desta via de morte como uma alternativa na terapia do câncer. Portanto, decidiu-se investigar a morte celular autofágica induzida por manganês já que não existem trabalhos estudando esse tipo de morte celular após o tratamento com manganês. De acordo com os dados mostrados, a inibição da

autofagia com 3-MA concomitantemente com o tratamento com manganês na linhagem HL-60 aumenta o percentual de células com conteúdo de DNA subdiploide de modo que a autofagia parece ter um efeito protetor nessa linhagem. Os resultados da linhagem Jurkat mostram que o tratamento dessa linhagem com baixas doses do inibidor já é capaz de induzir uma significativa morte celular, indicando que a autofagia em níveis basais é essencial para a sobrevivência celular. De fato, seria esperado que linhagens diferentes não tivessem os mesmos níveis basais de autofagia e nem a mesma sensibilidade ao tratamento com inibidores.

Apesar de todas as linhagens hematopoiéticas testadas serem sensíveis ao manganês, seria ainda mais interessante investigar linhagens de outros tipos celulares para tentar encontrar linhagens especificamente sensíveis ou resistentes ao manganês. Com esse objetivo, treze linhagens foram estudadas e comparadas para a sensibilidade ao manganês. Duas linhagens demonstraram grande sensibilidade ao manganês: C33A e Caco-2. Essa sensibilidade não se correlaciona com a sensibilidade das mesmas linhagens aos quimioterápicos cisplatina e vincristina, indicando que essas linhagens são especificamente mais sensíveis ao tratamento do manganês. Em contraste, as linhagens Du145, U87MG, MCF7 e A549 demonstraram grande resistência ao tratamento com manganês.

Os experimentos realizados para detecção da apoptose após o tratamento com manganês foram realizados em sua maioria 48 horas após a adição do cátion e quando a análise foi feita após 24 horas de tratamento, o percentual de células com conteúdo de DNA subdiploide estava apenas ligeiramente superior ao controle. Isso sugere que a apoptose induzida pelo manganês exige a produção de novas proteínas, indicando a possibilidade de uma regulação transcricional de genes reguladores da apoptose. Não existe nenhum trabalho na literatura mostrando a expressão de genes reguladores da apoptose nas

linhagens selecionadas para o estudo e poucos trabalhos utilizam linhagens provenientes dos mesmos tecidos tumorais, carcinoma de próstata e carcinoma de cérvix, indicando que os resultados desse trabalho podem ser extremamente importantes para direcionar estudos futuros. Com relação ao manganês, os únicos trabalhos que avaliam expressão gênica foram realizados em linhagens de células provenientes do sistema nervoso para avaliar a expressão de genes inflamatórios (Filipov *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Sengupta *et al.*, 2007).

Assim, para os experimentos posteriores foram selecionadas duas linhagens, uma apresentando sensibilidade e outra resistência, com o objetivo de se avaliar a expressão de genes responsáveis pela regulação da apoptose antes e após o tratamento com o manganês. Entre as linhagens sensíveis, foi escolhida a linhagem C33A por não existirem trabalhos na literatura avaliando expressão gênica dos genes estudados.

Foram encontradas quatro linhagens resistentes ao tratamento com manganês: Du145, U87MG, MCF7 e A549. A resistência da linhagem A549 se repetiu após o tratamento com as drogas cisplatina e vincristina, indicando que essa linhagem apresenta algum mecanismo bastante forte para inibir a morte celular que não é específica para o manganês. De fato, Zhao *et al.* (2008) mostraram que o manganês só foi capaz de induzir apoptose na linhagem A549 após o tratamento com 2mM, indicando que a linhagem é realmente bastante resistente. Além disso, na literatura existem trabalhos mostrando a superexpressão de alguns genes anti-apoptóticos, como Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1, em linhagens de câncer de pulmão de células não pequenas, caso da A549 (Song *et al.*, 2005). Apesar da linhagem MCF7 também ter demonstrado resistência ao tratamento pela técnica utilizada, uma avaliação da cultura pelo microscópio mostrou que existe uma grande diminuição do número de células após o tratamento com manganês. Dessa forma, o

resultado encontrado pode ser explicado pelo fato de essa linhagem apresentar mutação na caspase-3, responsável pela fragmentação do DNA ao clivar o inibidor de CAD, impedindo a detecção da morte celular através da avaliação de conteúdo subdiploide de DNA. É possível ainda que a mutação na caspase-3 impeça a morte celular por apoptose e essa linhagem inicie um outro processo de morte celular, de forma que pode ser um modelo interessante a ser estudado no futuro. A linhagem U87MG é oriunda de glioblastoma e já existem estudos utilizando a linhagem para o tratamento com manganês e mostrando que a indução de morte celular por este metal nessas linhagens ocorre pela exposição a doses cerca de dez vezes maiores que a utilizada nesse trabalho (Puli *et al.*, 2006). Já a linhagem Du145 parece ter um mecanismo de resistência mais específico para o manganês quando se analisa o tratamento com outras drogas, além de existirem poucos trabalhos de expressão de genes apoptóticos, sendo por esses motivos selecionada para os estudos posteriores.

No presente trabalho, observou-se que, ao se comparar as linhagens Du145, resistente ao tratamento com manganês, com a linhagem C33A, sensível ao tratamento com manganês, há diferença na expressão dos genes Bcl-xL, Bax, Bad e cIAP1. Os genes anti-apoptóticos Bcl-xL e cIAP1 encontram-se mais expressos na linhagem Du145, e os genes pró-apoptóticos Bax e Bad encontram-se mais expressos na linhagem C33A. Esses resultados correlacionam com a resistência ou sensibilidade das linhagens ao tratamento com manganês, de forma que esses genes merecem ser estudados com mais atenção no futuro em outras linhagens provenientes dos mesmos tecidos tumorais para avaliar o seu potencial como fatores preditivos de resposta ao tratamento com quimioterápicos.

O gene Bcl-xL está 3,7 vezes mais expresso na linhagem Du145 do que na linhagem C33A. Já foi demonstrado que existe uma superexpressão do gene Bcl-xL em diversos tumores e que, em linhagens de carcinoma de próstata, a inibição da expressão

desse gene por RNA de interferência seria capaz de induzir significativa apoptose (Wang *et al.*, 2008). Castilla *et al.* (2006) demonstraram ainda que Bcl-xL consegue promover a sobrevivência celular através de interação com Bak. Esse grupo mostrou que após tratamento da linhagem de carcinoma de próstata LNCaP com camptotecina, inibidor da topoisomerase I, a interação de Bcl-xL com Bak desaparecia, ocorria diminuição da expressão de Bcl-xL e aumento de Bak com um progresso da apoptose, fornecendo um modelo em que Bcl-xL exerceria um efeito inibitório em Bak via heterodimerização (Castilla *et al.*, 2006). De fato, na linhagem Du145 a expressão de Bcl-xL é maior do que a expressão de Bak mesmo após o tratamento com manganês, indicando que a resistência da linhagem Du145 poderia ser explicada pela manutenção do desbalanço entre Bcl-xL e Bak, sendo favorecida a sobrevivência celular sinalizada por Bcl-xL.

Na linhagem Du145, o tratamento com manganês levou a uma diminuição de Bcl-xL sem alteração de Bax e Bak. De acordo com esses resultados, Liu e Stein (1997) também observaram que o tratamento com 10nM de Taxol da linhagem levava, após 24h, à diminuição da expressão de Bcl-xL na ausência de alteração dos níveis de Bax, Bak e Bcl-2. Em contraste, esse mesmo grupo mostrou que o tratamento da linhagem LNCaP com estramustina induziu apoptose, mas não estava associada com mudanças no nível intracelular das proteínas Bcl-xL ou Bax (Liu e Stein, 1997). Esses resultados em conjunto revelam que cada quimioterápico é capaz de ativar vias de sinalização diferentes e alterar de maneira bem particular a expressão de genes pró- e anti-apoptóticos. Portanto, estudos de expressão gênica após o tratamento com agentes quimioterápicos citotóxicos são extremamente interessantes porque podem levar ao desenvolvimento de tratamentos que combinam de forma apropriada esses agentes para criar um cenário de genes expressos que melhorem ainda mais a resposta ao tratamento.

A expressão de Bcl-W na linhagem Du145 sofre aumento de 160 vezes após o tratamento com manganês e pode ser importante para o fenômeno de resistência da linhagem. Apesar de não existirem trabalhos descrevendo a expressão desse gene em outras linhagens de carcinoma de próstata, a proteína Bcl-W está normalmente superexpressa em células de carcinoma coloretal. Lapham *et al.* (2009) demonstraram ainda que seu promotor é ativado pela beta-catenina/TCF4, cuja ativação está abaixo da via de sinalização Wnt. Mutações em diversos componentes da via wnt/beta-catenina foram identificadas em quase todos os cânceres humanos e já foi amplamente correlacionada na literatura ao desenvolvimento do carcinoma de próstata (Robinson *et al.*, 2008). Seria agora extremamente importante investigar se a beta-catenina também é responsável pelo aumento de expressão de Bcl-W na linhagem Du145 e como o manganês levaria a sua ativação, para avaliar a combinação de manganês e outros quimioterápicos a que essa linhagem também seria resistente, com inibidores dessa via de sinalização.

Apesar do tratamento com manganês induzir apoptose eficientemente na linhagem C33A, o tratamento induz uma diminuição nos níveis de expressão de Bak e Bax. Um estudo de Nair *et al.* (2008) também mostrou uma redução nos níveis do RNA de Bax na linhagem C33A após o tratamento combinado de plumbagina e radiação. Essa combinação induziu ativação de caspase-3 na linhagem C33A, confirmando que a plumbagina associada a irradiação induz morte celular por vias dependentes de caspase. No entanto, esse grupo observou que apesar da diminuição do RNA de Bax, os níveis da proteína se mantiveram inalterados. Dessa maneira, é interessante investigar o que acontece com os níveis das proteínas de todos os genes estudados após o tratamento com manganês e observar se as modificações de expressão gênica correlacionam-se com a expressão protéica. Mesmo que ocorra uma diminuição da expressão protéica Bax e Bak, um aumento na expressão de

proteínas pró-apoptóticas BH3-*only* poderia ser suficiente para alterar o balanço das proteínas da família Bcl-2 a favor da morte celular.

Com relação ao gene BAD, parece controverso sua expressão diminuir após o tratamento na linhagem sensível e aumentar, mesmo que sutilmente, na linhagem resistente. No entanto, foi recentemente demonstrado que no câncer de próstata a proteína pró-apoptótica BAD é capaz de integrar diversas vias de sinalização anti-apoptóticas (Smith *et al.*, 2009). A ativação de vias de sinalização como EGFR e PI3K levaria à fosforilação de BAD e inibição da apoptose. Nesse sentido, em diversos carcinomas de próstata os níveis da proteína BAD encontram-se aumentados e estudos mostram que a expressão da proteína aumenta o crescimento do tumor (Smith *et al.*, 2009). Smith *et al.* (2009) sugerem que a expressão aumentada de BAD confere vantagem proliferativa aos tumores, enquanto sua defosforilação aumenta a sensibilidade dessas células à apoptose. Dessa maneira, não é a expressão de Bad, mas sim seu estado de fosforilação que é realmente importante para entender qual papel está desempenhando na célula.

O receptor de morte DR5 tem sua expressão aumentada em 2,5 vezes após o tratamento com manganês, enquanto a expressão de TRAIL diminui consideravelmente. Kendrick *et al.* (2008) demonstraram por imunohistoquímica um aumento na expressão de DR5 em tumor após o tratamento com cisplatina por 24h. Dessa forma, testaram a citotoxicidade do anti-DR5, TRA-8, sozinho ou em combinação com cisplatina e demonstraram que a combinação do anti-DR5 com cisplatina apresentou efeito aditivo em 86% dos pacientes (Kendrick *et al.*, 2008). Além disso, o inibidor de Bcl-2, ABT-737, também é capaz de aumentar a expressão do receptor DR5 colaborando para tornar células, antes resistentes, em susceptíveis ao tratamento com TRAIL (Song *et al.*, 2008). Esses resultados apontam para a possibilidade de um tratamento combinado do manganês e anti-

DR5 em linhagens de carcinoma de cérvix caso o manganês tenha o mesmo efeito de indução de anti-DR5 em outras linhagens. Embora, TRAIL e seus receptores venham ganhando um lugar de destaque cada vez maior no tratamento do câncer esses dados devem ainda ser analisados de uma maneira mais criteriosa. A morte celular induzida por TRAIL depende de um balanço entre a expressão dos receptores DR4 e DR5, e de seus receptores *decoy*, que não são capazes de transmitir sinais através da membrana celular. Além disso, mesmo os tradicionais receptores de morte de TRAIL, DR4 e DR5, são capazes de transmitir sinais de sobrevivência celular tornando sua sinalização ainda mais complexa.

Dois grupos que utilizaram a linhagem Du145 como modelo para o carcinoma de próstata no intuito de investigar compostos que pudessem induzir morte celular mostraram que há um aumento bastante proeminente na expressão de Bax após o tratamento com os compostos, e que havia grande indução de apoptose (Shi *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2006). Esses resultados em conjunto indicam que Bax pode ter grande importância para a indução de morte celular na linhagem Du145. Como o tratamento com manganês da linhagem Du145 não induziu aumento de expressão de Bax ou outros genes pró-apoptóticos, esse pode ser um dos motivos da resistência da linhagem. Talvez a expressão ectópica de Bax ou o tratamento combinado com compostos que induzam sua expressão possam tornar a linhagem sensível ao manganês e apresentar efeito sinérgico.

Apesar de a expressão de cIAP1 na linhagem Du145 ter sido muito mais expressiva do que na linhagem C33A, existem trabalhos na literatura mostrando a expressão aumentada desse gene, causada por amplificação, em carcinoma de cérvix e que a expressão de cIAP1 poderia ser um marcador preditivo de resistência a radioterapia (Imoto *et al.*, 2002). Como se trata de uma análise comparativa, cabem ainda maiores pesquisas para avaliar se cIAP1 estaria superexpresso na linhagem C33A quando

comparada com outros tumores, e se, em carcinomas de próstata, cIAP1 também está normalmente superexpresso e se poderia ser considerado um fator preditivo de resistência ao tratamento com quimioterápicos.

Embora o tratamento com manganês na linhagem Du145 tenha levado à diminuição da expressão de genes anti-apoptóticos como cIAP1 e cIAP2, essa linhagem foi resistente ao tratamento com manganês. Esse resultado está de acordo com Gill *et al.* (2009), que mostrou que o *knockdown* de cIAP1, cIAP2 e XIAP não era capaz de sensibilizar a linhagem de carcinoma de próstata PC3 à morte celular induzida por etoposídeo ou tunicamicina, embora pudesse sensibilizar ao tratamento com TRAIL. Além disso, apesar da linhagem Du145 expressar os receptores DR4 e DR5, não foi possível detectar expressão do ligante TRAIL. Esses dados em conjunto reforçam o potencial do tratamento combinado do manganês com TRAIL na linhagem Du145.

Não houve amplificação dos genes Noxa ou cIAP2 na linhagem de câncer de cérvix C33A. De fato, não existem trabalhos na literatura dando suporte para a expressão ou funcionalidade dessas proteínas nesse tipo de tecido.

O manganês parece ser um potente indutor de morte celular. Desvendar os mecanismos moleculares responsáveis pela sensibilidade ou resistência ao seu tratamento pode ajudar o desenvolvimento de terapias direcionadas para tumores com defeitos específicos em vias de morte. Mesmo que exista a possibilidade do manganês não poder vir a ser utilizado como tratamento de qualquer tumor devido a sua citotoxicidade, o estudo de novas vias de regulação da apoptose é extremamente importante para o desenvolvimento de compostos destinados a interferir nas via de interesse.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O manganês é capaz de induzir apoptose não apenas em linfócitos B, como em diversas linhagens de tumores hematopoiéticos e sólidos.
- ✓ A morte celular induzida pelo manganês em células HL-60 e Jurkat apresenta características típicas de apoptose como perda do potencial de membrana mitocondrial, exposição de fosfatidilserina, ativação de caspase-3/7, clivagem de substratos de caspases, clivagem internucleossomal de DNA, e mudança da morfologia celular.
- ✓ A morte celular induzida por manganês pode ser inibida pela superexpressão de Bcl-xL.
- ✓ A sensibilidade das diferentes linhagens ao tratamento com manganês é diferente e dependente da dose.
- ✓ O manganês não é capaz de interferir no ciclo celular da linhagem Jurkat e HL-60.
- ✓ O tratamento combinado de doses subtóxicas do manganês com baixas doses de quimioterápicos utilizados na clínica não apresenta efeito sinérgico na indução de morte celular.
- ✓ Na linhagem HL-60, o tratamento com manganês parece induzir autofagia como uma tentativa de salvar a célula da morte.
- ✓ O manganês é um agente indutor de morte extremamente potente das linhagens Caco-2 e C33A. Essa morte induzida pelo manganês não se deve a uma maior sensibilidade intrínseca da célula a qualquer tratamento.

✓ A linhagem C33A expressa grandes quantidades de Bax e Bad em comparação com a linhagem Du145.

✓ A linhagem Du145 expressa níveis maiores de Bcl-xL e cIAP1 do que a linhagem C33A.

✓ O tratamento da linhagem C33A com manganês leva à diminuição da expressão do genes pró-apoptóticos Bak, Bax, Bad e Trail, e aumento da expressão de Bcl-W e DR5.

✓ Na linhagem Du145, o manganês induz um aumento na expressão de Bcl-W e diminuição na expressão de Noxa e Ciap2.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akiyama, T.; Bouillet, P.; Miyazaki, T.; Kadono, Y.; Chikuda, H.; Chung, U.I.; Fukuda, A.; Hikita, A.; Seto, H.; Okada, T.; Inaba, T.; Sanjay, A.; Baron, R.; Kawaguchi, H.; Oda, H.; Nakamura, K.; Strasser, A.; Tanaka, S. Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO Journal* **22**:6653–6664 (2003).
- Akkari, Y.M., Bateman, R.L., Reifsteck, C.A., D'Andrea, A.D., Olson, S.B., and Grompe, M. The 4N cell cycle delay in Fanconi anemia reflects growth arrest in late S phase. *Mol. Genet. Metab.* **74**: 403-412 (2001).
- Amarante-Mendes, G.P.; Green, D.R. The Regulation of Apoptotic Cell Death. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32**:1053-1061 (1999).
- Baines, C.P.; Kaiser, R.A.; Sheiko, T.; Craigen, W.J.; Molkentin, J.D. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nature Cell Biology* **9**:550–555 (2007).
- Bolton, E.C.; Mildvan, A.S.; Boeke, J.D. Inhibition of reverse transcription in vivo by elevated manganese ion concentration. *Molecular Cell* **9**:879–889 (2002).
- Bröker, L.E.; Kruyt, F.A.; Giaccone, G. Cell death independent of caspases: a review. *Clinical Cancer Research* **11**(9):3155-62 (2005).
- Burlacu, A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **7**(3):249-257 (2003).
- Butterworth, J.; Priestman, D. Substrate specificity of manganese-activated prolydase in control and prolydase-deficient cultured skin fibroblasts. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **7**:32–34 (1984).

- Cartron, P.F.; Moreau, C.; Oliver, L.; Mayat, E.; Meflah, K.; Vallette, F.M. Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function. *FEBS Letters* **512**:95–100 (2002).
- Castilla, C.; Congregado, B.; Chinchón, D.; Torrubia, F. J.; Japón, M. A.; Sáez, C. Bcl-xL is overexpressed in hormone-resistant prostate cancer and promotes survival of LNCaP cells via interaction with proapoptotic Bak. *Endocrinology* **147**(10):4960-4967 (2006).
- Chan, A.W.K.; Minski, M.J.; Lim, L.; Lai, J.C.K. Changes in brain regional manganese and magnesium levels during postnatal development: modulation by chronic manganese administration. *Metabolic Brain Disease* **7**:21-33 (1992).
- Chang, H.K.; Shin, M.S.; Yang, H.Y.; Lee, J.W.; Kim, Y.S.; Lee, M.H.; Kim, J.; Kim, K.H.; Kim, C.J. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **29**(8):1597-602 (2006).
- Chen, C.J.; Ou, Y.C.; Lin, S.Y.; Liao, S.L.; Chen, S.Y.; Chen, J.H. Manganese modulates pro-inflammatory gene expression in activated glia. *Neurochemistry International* **49**:62-71 (2006).
- Chen, N.; Chen, X.; Huang, R.; Zeng, H.; Gong, J.; Meng, W.; Lu, Y.; Zhao, F.; Wang, L.; Zhou, Q. Bcl-xL is a target gene regulated by hypoxia-inducible factor-1{alpha}. *Journal of Biological Chemistry* **284**(15):10004-12 (2009).
- Cheng, E.H.; Sheiko, T.V.; Fisher, J.K.; Craigen, W.; Korsmeyer, S. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**:513–517 (2003).
- Chipuk, J. E.; Bouchier-Hayes, L.; Green, D. R. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death and Differentiation* **13**:1396–1402 (2006).
- Contassot, E.; Gaide, O.; French, L.E. Death receptors and apoptosis. *Dermatologic Clinics* **25**:487-501 (2007).

- Cuconati, A.; Mukherjee, C.; Perez, D.; White, E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes and Development* **17**:2922–2932 (2003).
- Cuconati, A.; Mukherjee, C.; Perez, D.; White, E. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes and Development*. **17**:2922–2932 (2003).
- Day, C.L.; Chen, L.; Richardson, S.J.; Harrison, P.J.; Huang, D.C.; Hinds, M.G. Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**:4738–4744 (2005).
- Debatin, K.M.; Krammer, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* **23**:2950-2966 (2004).
- Eckelman, B.P.; Salvesen, G.S.; Scott, F.L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO reports*. **7**(10):988-994 (2006).
- El Mchichi, B.; Hadji, A.; Vazquez, A.; Leca, G. P38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese induced mitochondria-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation* (2007).
- Endo, S.; Connor, J.H.; Forney, B.; Zhang, L.; Ingebritsen, T.S.; Lee, E.Y.C.; Shenolikar, S. Conversion of protein phosphatase 1 catalytic subunit to a Mn²⁺-dependent enzyme impairs its regulation by inhibitor 1. *Biochemistry* **36**:6986–6992 (1997).
- Falschlehner, C.; Emmerich, C.H.; Gerlach, B.; Walczak, H. TRAIL signalling: Decisions between life and death. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**:1462-1475 (2007).
- Filipov, N.M.; Seegal, R.F.; Lawrence, D.A. Manganese modulates *in vitro* production of proinflammatory cytokines and nitric oxide by microglia through a nuclear factor kappa B-dependent mechanism. *Toxicological Sciences* **84**:139-148 (2005).

- Fischer, U.; Janicke, R.U.; Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* **10**:76–100 (2003).
- Fraga, C.G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine* **26**:235-244 (2005).
- Franklin, R.B.; Costello, L.C. The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *Journal of Cellular Biochemistry* **106**(5):750-7 (2009).
- Galluzzi, L.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.; Alnemri, E.S.; Andrews, D.W.; Baehrecke, E.H.; Bazan, N.G.; Blagosklonny, M.V.; Blomgren, K.; Borner, C.; Bredesen, D.E.; Brenner, C.; Castedo, M.; Cidlowski, J.A.; Ciechanover, A.; Cohen, G.M.; De Laurenzi, V.; De Maria, R.; Deshmukh, M.; Dynlacht, B.D.; El-Deiry, W.S.; Flavell, R.A.; Fulda, S.; Garrido, C.; Golstein, P.; Gougeon, M.L.; Green, D.R.; Gronemeyer, H.; Hajnóczky, G.; Hardwick, J.M.; Hengartner, M.O.; Ichijo, H.; Jäättelä, M.; Kepp, O.; Kimchi, A.; Klionsky, D.J.; Knight, R.A.; Kornbluth, S.; Kumar, S.; Levine, B.; Lipton, S.A.; Lugli, E.; Madeo, F.; Malomi, W.; Marine, J.C.; Martin, S.J.; Medema, J.P.; Mehlen, P.; Melino, G.; Moll, U.M.; Morselli, E.; Nagata, S.; Nicholson, D.W.; Nicotera, P.; Nuñez, G.; Oren, M.; Penninger, J.; Pervaiz, S.; Peter, M.E.; Piacentini, M.; Prehn, J.H.; Puthalakath, H.; Rabinovich, G.A.; Rizzuto, R.; Rodrigues, C.M.; Rubinsztein, D.C.; Rudel, T.; Scorrano, L.; Simon, H.U.; Steller, H.; Tschopp, J.; Tsujimoto, Y.; Vandenabeele, P.; Vitale, I.; Vousden, K.H.; Youle, R.J.; Yuan, J.; Zhivotovsky, B.; Kroemer, G. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation* **16**(8):1093-107 (2009).
- Gao, S., Fu, W., Durrenberger, M., De Geyter, C. & Zhang, H. Membrane translocation and oligomerization of hBok are triggered in response to apoptotic stimuli and Bnip3. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 1015–1024 (2005).
- Garrido, C.; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P.E.; Didelot, C.; Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome *c* release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation* **13**, 1423–1433 (2006).

- Grieger J.L. Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential markers. *Neurotoxicology* **20**:205–212 (1999).
- Hausmann, G.; O'Reilly, L.A.; van Driel, R.; Beaumont, J.G.; Strasser, A.; Adams, J.M.; Huang, D.C. Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *The Journal of Cell Biology* **149**:623–634 (2000).
- Heath-Engel, H.M.; Shore, G.C. Regulated targeting of Bax and Bak to intracellular membranes during apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. **13**:1277–1280 (2006).
- Hodge, D.R.; Xiao, W.; Peng, B.; Cherry, J.C.; Munroe, D.J.; Farrar, W.L. Enforced expression of superoxide dismutase 2/manganese superoxide dismutase disrupts autocrine interleukin-6 stimulation in human multiple myeloma cells and enhances dexamethasone-induced apoptosis. **65**(14):6255-6263 (2005).
- Hsu, Y.T.; Wolter, K.; Youle, R. Cytosol to membrane redistribution of members of the Bcl-2 family during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:3668–3672 (1997).
- Hsu, Y.T.; Youle, R. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**:10777–10783 (1998).
- Hsu, Y.T.; Youle, R.J. Nonionic detergent induced dimerization of members of the Bcl-2 family. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**:13829–13834 (1997)
- Hunter, A.M.; LaCasse, E.C.; Korneluk, R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**:1543-1568 (2007).
- Hurley, L.S. Teratogenic aspects of manganese, zinc, and copper nutrition. *Physiological Reviews* **61**:249-295 (1981).

- Imoto, I.; Tsuda, H.; Hirasawa, A.; Miura, M.; Sakamoto, M.; Hirohashi, S.; Inazawa, J. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Research* **62**(17):4860-4866 (2002).
- Irons, M.J.; O'Brien, P.J. Biochemical evidence for Mn²⁺-dependent 5'-nucleotidase activity in isolated rod outer segments. *Experimental Eye Research* **45**:813–821 (1987).
- Jeong, S.Y.; Gaume, B.; Lee, Y.J.; Hsu, Y.T.; Ryu, S.W.; Yoon, S.H.; Youle, R.J. Bcl-x(L) sequesters its C-terminal membrane anchor in soluble, cytosolic homodimers. *EMBO Journal* **23**:2146–2155 (2004).
- Jiménez Del Río, M.; Vélez-Pardo, C. Transition metal-induced apoptosis in lymphocytes via hydroxyl radical generation, mitochondria dysfunction, and caspase-3 activation: na *in vitro* model for neurodegeneration. *Archives of Medical Research* **35**:185-193 (2004).
- Jürgensmeier, J.M.; Xie, Z.; Deveraux, Q.; Ellerby, L.; Bredesen, D.; Reed, J.C. Bax directly induces release of cytochrome *c* from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:4997–5002 (1998).
- Keen, C.L.; Ensunsa, J.L.; Watson, M.H.; Baly, D.L., Donovan, S.M., Monaco, M.H., Clegg, M.S. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology* **20**:213-223 (1999).
- Kendrick, J.E.; Straughn, J.M. Jr; Oliver, P.G.; Wang, W.; Nan, L.; Grizzle, W.E.; Stockard, C.R.; Alvarez, R.D.; Buchsbaum, D.J. Anti-tumor activity of the TRA-8 anti-DR5 antibody in combination with cisplatin in an ex vivo human cervical cancer model. *Gynecologic Oncology* **108**(3):591-597 (2008).
- Kinnally, K. W.; Antonsson, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* **12**:857–868 (2007).

- Kitahara, N.; Sawai, Y.; Tsukada, K. Purification and properties of magnesium- and manganese-dependent ribonucleases H from chick embryo. *Journal of Biochemistry* **92**:855–864 (1982).
- Klebanoff, S.J.; Schlechte, K.G.; Waltersdorff, A.M. Stimulation of the bactericidal activity of polymorphonuclear leukocytes by manganese. *Journal of Leukocyte Biology* **53**(6):666-672 (1993).
- Knecht E, Hernandez-Yago J, Grisolia S. Regulation of lysosomal autophagy in transformed and nontransformed mouse fibroblasts under several growth conditions. *Exp Cell Res* 1984; 154:224-32.
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5:726-34.
- Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews* **87**:99–163 (2007).
- Kudrin, A.V. Trace elements in regulation of NF- κ B activity. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **14**:129-142 (2000).
- Kuhn, N.J.; Ward, S.; Leong, W.S. Submicromolar manganese dependence of Golgi vesicular galactosyltransferase (lactose synthetase). *European Journal of Biochemistry* **195**:243–250 (1991).
- Kuwana, T.; Bouchier-Hayes, L.; Chipuk, J.E.; Bonzon, C.; Sullivan, B.A.; Green, D.R. Newmeyer, D.D. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Molecular Cell* **17**:525–535 (2005).
- Kuwana, T.; Mackey, M.R.; Perkins, G.; Ellisman, M.H.; Latterich, M.; Schneiter, R.; Green, D.R.; Newmeyer, D.D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**:331–342 (2002).

- Lapham, A.; Adams, J.E.; Paterson, A.; Lee, M.; Brimmell, M.; Packham, G. The Bcl-W promoter is activated by beta-catenin/TCF4 in human colorectal carcinoma cells. *Gene* **432**(1-2):112-117 (2009).
- Ley, R.; Ewings, K.E.; Hadfield, K.; Cook, S. Regulatory phosphorylation of Bim: sorting out the ERK from the JNK. *Cell Death and Differentiation*. **12**:1008–1014 (2005).
- Letai, A.G. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer* **8**(2):121-132 (2008).
- Li, H.; Zhu, H.; Xu, C.; Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial adamage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**:491–501 (1998).
- Li, J.J.; Oberley, L.W.; Fan, M.; Colburn, N.H. Inhibition of AP-1 and NF-kappaB by manganese-containing superoxide dismutase in human breast cancer cells. *FASEB Journal* **12**(15):1713-1723 (1998).
- Lithgow, T.; van Driel, R.; Bertram, J.F.; Strasser, A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth and Differentiation*. **5**:411–417 (1994).
- Liu, Q.Y.; Stein, C.A. Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression. *Clinical Cancer Research* **3**(11):2039-2046 (1997).
- Luk, E.; Jensen, L.T.; Culotta, V.C. The any highways for intracellular trafficking of metals. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **8**:803-809 (2003).
- Luo, X.; Budihardjo, I.; Zou, H.; Slaughter, C.; Wang, X. Bid, a Bcl2 interacting protein mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**:481–490 (1998).
- Maiuri, M.C.; Zalcvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **8**:741-752 (2007).

- Maynard, L.S.; Cotzias, G.C. The partition of manganese among organs and intracellular organelles of the rat. *The Journal of Biological Chemistry* **214**(1):489-95 (1955).
- Miller, K.B.; Caton, J.S.; Finley, J.W. Manganese depresses rat heart muscle respiration. *Biofactors* **28**(1):33-46 (2006).
- Miller, K.B.; Newman, S.M.; Caton, J.S.; Finley, J.W. Manganese alters mitochondrial integrity in the hearts of swine marginally deficient in magnesium. *Biofactors* **20**(2):85-96 (2004).
- Nair, S.; Nair, R.R.; Srinivas, P.; Srinivas, G.; Pillai, M.R. Radiosensitizing effects of plumbagin in cervical cancer cells is through modulation of apoptotic pathway. *Molecular Carcinogenesis* **47**(1):22-33 (2008).
- Nakano, K.; Vousden, K. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell* **7**, 683–694 (2001).
- Nakata, A.; Araki, S.; Park, S. H.; Park, J.T.; Kim, D.S.; Park, H.C.; Yokoyama, K. Decreases in CD8+ T, Naive (CD4+CD45RA+) T, and B (CD19+) lymphocytes by exposure to manganese fume. *Industrial Health* **44**:592-597 (2006).
- Nakata, A.; Araki, S.; Park, S. H.; Park, J.T.; Kim, D.S.; Park, H.C.; Yokoyama, K. Decreases in CD8+ T, Naive (CD4+CD45RA+) T, and B (CD19+) lymphocytes by exposure to manganese fume. *Industrial Health* **44**:592-597 (2006).
- Nguyen, M.; Millar, D.G.; Yong, V.W.; Korsmeyer, S.J.; Shore, G. Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**, 25265–25268 (1993).
- Nijhawan, D.; Fang, M.; Traer, E.; Zhong, Q.; Gao, W.; Du, F.; Wang, X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes and Development*. **17**, 1475–1486 (2003).
- Nishito, Y.; Usui, H.; Shinzawa-Itoh, K.; Inoue, R.; Tanabe, O.; Nagase, T.; Murakami, T.; Takeda, M. Direct metal analyses of Mn⁺²-dependent and -independent protein

- phosphatase 2A from human erythrocytes detect zinc and iron only in the Mn⁺²-independent one. *FEBS Letters* **447**:29–33 (1999).
- Nowak, T.; Suelter, C. Pyruvate kinase: activation by and catalytic role of the monovalent and divalent cations. *Molecular and Cellular Biochemistry* **35**:65–75 (1982).
- Oda, E.; Ohki, R.; Murasawa, H.; Nemoto, J.; Shibue, T.; Yamashita, T.; Tokino, T.; Taniguchi, T.; Tanaka, N. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**:1053–1058 (2000).
- Oikawa, S.; Hirose, I.; Tada-Oikawa, S.; Furukawa, A.; Nishiura, K.; Kawanishi, S. Mechanism for manganese enhancement of dopamine-induced oxidative DNA damage and neuronal cell death. *Free Radical Biology and Medicine* **41**(5):748-56 (2006).
- Orent, E.R.; McCollum, E.V. Effects of deprivation of manganese in the rat. *The Journal of Biological Chemistry* **92**:651-678 (1931).
- Oubrahim, H.; Chock, P.B; Stadtman, E.R. Manganese(II) induces apoptotic cell death in NIH3T3 cells via a caspase-12-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **277**(23):20135-20138 (2002).
- Oubrahim, H.; Stadtman, E.R.; Chock, P.B. Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(17):9505-9510 (2001).
- Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**:532-42 (2008).
- Pinton, P.; Rizzuto, R. Bcl-2 and Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death and Differentiation*. **13**:1409–1418 (2006).
- Powell, J.T.; Brew, K. Metal ion activation of galactosyltransferase. *The Journal of Biological chemistry* **251**:3645–3652 (1976).

- Puli, S.; Lai, J.C.; Edgley, K.L.; Daniels, C.K.; Bhushan, A. Signaling pathways mediating manganese-induced toxicity in human glioblastoma cells (u87). *Neurochemical Research* **31**(10):1211-8 (2006).
- Puli, S.; Lai, J.C.K.; Edgley, K.L.; Daniels, C.K.; Bhushan, A. Signaling pathways mediating manganese-induced toxicity in human glioblastoma cells (U87). *Neurochemical Research* **31**:1211-1218 (2006).
- Puthalakath, H.; Huang, D.C.; O'Reilly, L.A.; King, S.M.; Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Molecular Cell* **3**:287–296 (1999).
- Puthalakath, H.; O'Reilly, L.A.; Gunn, P.; Lee, L.; Kelly, P.N.; Huntington, N.D.; Hughes, P.D.; Michalak, E.M.; McKimm-Breschkin, J.; Motoyama, N.; Gotoh, T.; Akira, S.; Bouillet, P.; Strasser, A. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim via de-phosphorylation and transcription induction. *Cell* **129**, 1337–1349 (2007).
- Puthalakath, H.; Villunger, A.; O'Reilly, L.A.; Beaumont, J.G.; Coultas, L.; Cheney, R.E.; Huang, D.C.; Strasser, A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**:1829–1832 (2001).
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *beclin 1* autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation* **112**:1809-20 (2003).
- Rebrikov, D.V.; Trofimov, D.Iu. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **42**(5):520-8 (2006).
- Rens-Domiano, S.; Roth, J.A. Characterization of tyrosylprotein sulfotransferase from rat liver and other tissues. *The Journal of Biological Chemistry* **264**:899–905 (1989).

- Ritz, C.; Spiess, A.N. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative realtime polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics* **24**:1549-1551 (2008).
- Robinson, D.R.; Zylstra, C.R.; Williams, B.O. Wnt signaling and prostate cancer. *Current Drug Targets* **9**(7):571-580 (2008).
- Roth, J.A.; Garrick, M.D. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochemical Pharmacology* **66**:1-13 (2003).
- Roth, J.A.; Horbinski, C.; Higgins, D.; Lein, P.; Garrick, M.D. Mechanisms of manganese-induced rat pheochromocytoma (PC12) cell death and cell differentiation. *Neurotoxicology* **23**:147-157 (2002).
- Rovetta, F.; Catalani, S.; Steimberg, N.; Boniotti, J.; Gilbert, M.E.; Marigliò, M.A.; Mazzoleni, G. Organ-specific manganese toxicity: a comparative *in vitro* study on five cellular models exposed to MnCl₂. *Toxicology In Vitro* **21**:284-292 (2007).
- Ryu, H.S.; Chang, K.H.; Chang, S.J.; Kim, M.S.; Joo, H.J.; Oh, K.S. Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) receptors in cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* **10**(5):417-424 (2000).
- Salvesen, G.S.; Dixit, V.M. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:10964-7 (1999).
- Schranz, N.; Blanchard, D.A.; Mitenne, F.; Auffredou, M.T.; Vazquez, A.; Leca, G. Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase dependent cell-death blocked by Bcl-2. *Cell Death and Differentiation* **6**:445-453 (1999).
- Schranz, N.; Auffredou, M.T.; Bourgeade, M.F.; Besnault, L.; Leca, G.; Vazquez, A. Zinc-mediated regulation of caspases activity: dose-dependent inhibition or activation of caspase-3 in the human Burkitt lymphoma B cells (Ramos). *Cell Death and Differentiation* **8**:152-161 (2001).

- Schroeder, H.A.; Balassa, J.J.; Tipton, I.H. Essential trace elements in man: manganese. A study in homeostasis. *Journal of Chronic Diseases* **19**:545-571 (1966).
- Schulze-Osthoff, K.; Ferrari, D.; Los, M.; Wesselborg, S.; Peter, M.E. Apoptosis signaling by death receptors. *European Journal of Biochemistry* **254**:439–59 (1998).
- Schwarze, P.E.; Seglen, P.O. Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Experimental Cell Research* **157**:15-28 (1985).
- Sengupta, A.; Mense, S.M.; Lan, C.; Zhou, M.; Mauro, R.E.; Kellerman, L.; Bentsman, G.; Volsky, D.J.; Louis, E.L.; Graziano, J.H.; Zhang, L. Gene expression profiling of human primary astrocytes exposed to manganese chloride indicates selective effects on several functions of the cells. *Neurotoxicology* **28**:478-489 (2007).
- Setoguchi, K., Otera, H. & Mihara, K. Cytosolic factor- and TOM-independent import of C-tail-anchored mitochondrial outer membrane proteins. *EMBO J.* **25**, 5635–5647 (2006).
- Shi, C.; Yu, L.; Yang, F.; Yan, J.; Zeng, H. A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **309**(3):578-83 (2003).
- Shimazu, T.; Degenhardt, K.; Nur-E-Kamal, A.; Zhang, J.; Yoshida, T.; Zhang, Y.; Mathew, R.; White, E.; Inouye, M. NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes and Development* **21**:929–941 (2007).
- Shimizu, S.; Kanaseki, T.; Mizushima, N.; Mizuta, T.; Arakawa-Kobayashi, S.; Thompson, C.B.; Tsujimoto, Y. Role of Bcl-2 family proteins in a nonapoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology* **6**:1221-8 (2004).
- Shimizu, S.; Narita, M.; Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**:83–487 (1999).

- Shintani, T.; Klionsky, D. J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**:990–995 (2004).
- Singh, T.J. Activation of a manganese-dependent membrane protein kinase by serine and tyrosine phosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **171**:75–83 (1990).
- Smith, A.J.; Karpova, Y.; D`Agostino R. Jr; Willingham, M.; Kulik, G. Expression of Bcl-2 protein BAD promotes prostate cancer growth. *PLoS One* **4**(7):e6224 (2009).
- Song, J.K.; Hunt, J.A. Specific role of manganese and magnesium on RNA synthesis in rabbit bone marrow erythroid cell nuclei. *Biological Trace Element Research* **16**:203–219 (1988).
- Song, L.; Coppola, D.; Livingston, S.; Cress, D.; Haura, E.B. Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* **4**(3):267-276 (2005).
- Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology* **5**:189-200 (2005).
- Suzuki, Y.; Nakabayashi, Y.; Takahashi, R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(15):8662–8667 (2001).
- Takeuchi, M.; Ishida, A.; Kameshita, I.; Kitani, T.; Okuno, S.; Fujisawa, H. Identification and characterization of CaMKP-N, nuclear calmodulin-dependent protein kinase phosphatase. *Journal of Biochemistry* **130**:833–840 (2001).
- Taylor, R.C.; Cullen, S.P.; Martin, S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **9**(3):231-41 (2008).

- Thongphasuk, J.; Oberley, L.W.; Oberley, T.D. Induction of superoxide dismutase and cytotoxicity by manganese in human breast cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **365**(2):317-327 (1999).
- Tian, G.; Kane, L.S.; Holmes, W.D.; Davis, S.T. Modulation of cyclindependent kinase 4 by binding of magnesium(II) and manganese(II). *Biophysical Chemistry* **95**:79–90 (2002).
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, A. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**: RESEARCH0034 (2002).
- Vaux, D.L.; Silke, J. IAPs, RINGs and Ubiquitylation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **6**:287-297 (2005).
- Wang, R.; Lin, F.; Wang, X.; Gao, P.; Dong, K.; Wei, S. H.; Cheng, S. Y.; Zhang, H. Z. Suppression of Bcl-xL expression by a novel tumor-specific RNA interference system inhibits proliferation and enhances radiosensitivity in prostatic carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **61**(6):943-952 (2008).
- Wang, R.G.; Zhu, X.Z. Subtoxic concentration of manganese synergistically potentiates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Brain Research* **961**(1):131-8 (2003).
- Wedler, F.C.; Denman, R.B. Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Current Topics in Cellular Regulation* **24**:153–169 (1984).
- Wedler, F.C.; Denman, R.B.; Roby, W.G. Glutamine synthetase from ovine brain is a manganese(II) enzyme. *Biochemistry* **21**:6389–6396 (1982).
- Wiens, M.; Krasko, A.; Muller, C.I.; Muller, W.E. Molecular evolution of apoptotic pathways: cloning of key domains from sponges (Bcl-2 homology domains and death domains) and their phylogenetic relationships. *Journal of Molecular Evolution* **50**:520–531 (2000).

- Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC:
 Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced
 by BH3-only proteins. *Genes and Development* **19**:1294–1305 (2005).
- Wilson-Annan, J.; O'Reilly, L.A.; Crawford, S.A.; Hausmann, G.; Beaumont, J.G., Parma,
 L.P.; Chen, L.; Lackmann, M.; Lithgow, T.; Hinds, M.G.; Day, C.L.; Adams, J.M.;
 Huang, D.C. Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of
 prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *The Journal of Cell Biology* **162**:877–
 887 (2003).
- Wolf, F.I.; Maier, J.A.; Nasulewicz, A.; Feillet-Coudray, C.; Simonacci, M.; Mazur, A.;
 Cittadini, A. Magnesium and neoplasia: from carcinogenesis to tumor growth and
 progression or treatment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **458**(1):24-32
 (2007).
- Xu, Y.; Kim, S.O.; Li, Y.; Han, J. Autophagy contributes to caspase-independent
 macrophage cell death. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:19179–19187
 (2006).
- Yamagata, A.; Yoshimitsu, K.; Masui, R.; Fukuyama, K. The crystal structure of
 exonuclease RecJ bound to Mn⁺² ion suggests how its characteristic motifs are
 involved in exonuclease activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences
 of the United States of America* **99**:5908–5912 (2002).
- Yang, P.; Klimis-Tavantzis, D.J. Effects of dietary manganese on arterial
 glycosaminoglycan metabolism in Sprague-Dawley rats. *Biological Trace Element
 Research* **64**:275–288 (1998).
- Yang, Y.; Fang, S.; Jensen, J.P.; Weissman, A.M.; Ashwell, J.D. Ubiquitin protein ligase
 activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic
 stimuli. *Science* **288**(5467):874–877 (2000).
- Youle, R.J.; Strasser, A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell
 death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**:47-59 (2008).

- Yu L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S.Welsh, E.H. Baehrecke, M.J. Lenardo, Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8, *Science* **304**:1500–1502 (2004).
- Yue, Z.; Jin, S.; Yang, C.; Levine, A.J.; Heintz, N. *Beclin 1*, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:15077-82 (2003).
- Zha, J.; Weiler, S.; Oh, K.J.; Wei, M.C.; Korsmeyer, S.J. Posttranslational N-myristoylation of Bid as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* **290**:1761-1765 (2000).
- Zhang, P.; Anglade, P.; Hirsch, E.C.; Javoy-Agid, F.; Agid, Y. Distribution of manganese-dependent superoxide dismutase in the human brain. *Neuroscience* **6**:317–330 (1994).
- Zhao, P.; Zhong, W.; Ying, X.; Yuan, Z.; Fu, J.; Zhou, Z. Manganese chloride-induced G0/G1 and S phase arrest in A549 cells. *Toxicology* **250**(1):39-46 (2008).
- Zhong, Q.; Gao, W.; Du, F.; Wang, X. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* **121**:1085–1095 (2005).
- Gill, C.; Dowling, C.; O'Neill, A.J.; Watson, R.W. Effects of cIAP-1, cIAP-2 and XIAP triple knockdown on prostate cancer cell susceptibility to apoptosis, cell survival and proliferation. *Molecular Cancer* **8**:39 (2009).
- Song, J.H.; Kandasamy, K.; Kraft, A.S. ABT-737 induces expression of the death receptor 5 and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* **283**(36):25003-13 (2008).