

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e
contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele
artificial

Carla Abdo Brohem

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvy Stuchi Maria Engler

São Paulo
2010

Carla Abdo Brohem

Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e
contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele
artificial

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a Silvy Stuchi Maria Engler
orientador/presidente

1^o. examinador

2^o. examinador

3^o. examinador

4^o. examinador

São Paulo, _____ de 2010

*Aos meus pais,
Lohengrin Brohem e Josélia Brohem,
por todo amor e compreensão, sem os quais esse trabalho seria impossível.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente devo dizer que muitas pessoas contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Sem essas pessoas que colaboraram de alguma forma, seja direta ou indiretamente, o meu doutorado não teria significado metade do que significa hoje para mim. Para todos vocês, muito obrigada!

Agradeço especialmente à minha orientadora Dr^a Silvy Stuchi Maria Engler. Só posso dizer que tive e tenho muita sorte de ter a Sil como chefe (quantas pessoas podem chamar seus orientadores pelo apelido?). Digo sorte, porque ela não somente orientou meu projeto de forma a desenvolver um trabalho da melhor forma possível, mas porque ela sempre quis o meu crescimento profissional e pessoal. Sil, você sabe o quanto você me ajudou em todos esses anos de convivência, nos quais eu cresci muito em vários aspectos da minha vida e eu devo muito a você. Então, muito obrigada por ter me dado a oportunidade de ir ao exterior desenvolver parte do doutorado, por conduzir meu projeto, pela confiança depositada em mim e por toda a cumplicidade e amizade neste longo trajeto.

À Prof^a Dr^a Silvia Berlanga de Moraes Barros que também foi uma peça essencial para esse trabalho, acreditando em mim e me dando a oportunidade de trabalhar com o 4-NC. Obrigada Profa pelo colo, pelas broncas, pelas oportunidades, por sempre me escutar quando entro na sua sala inesperadamente (geralmente para pedir ou reclamar de algo), por fazer do nosso laboratório um ambiente familiar e gostoso de passar a maior parte das horas do nosso dia.

Aos meus colegas de laboratório que acompanharam parte ou o total desenvolvimento deste trabalho. Aos que já passaram e seguiram seus rumos profissionais: Tânia Sawada, Cristina Röpke, Vanessa Vitoriano, Rafael Paes, Tatiana Corrêa, Clarissa Kera, Fabriciano Pinheiro, Juliana Sellis, Kaio Vitzel e Mariana Moura. Aos que ainda estão na longa jornada da pós graduação: Renato Massaro, Laura Cardeal, Rebeca Almeida, Diogo Rivelli, Manoela Tiago, Érika Matheus e Marina Gutierrez.

À Camila Marinho, técnica do laboratório e amiga para todas as horas. Obrigada, Camis, por toda ajuda e cumplicidade destes anos de convivência.

À Laura Cardeal, minha “chefinha” na iniciação científica. A Lau não só me ensinou inúmeras técnicas, mas acabou transmitindo um pouquinho do seu amor e fascinação pela ciência para mim. Minha querida amiga que sempre me ajudou e me protegeu profissional e pessoalmente, muito obrigada!

Ao Renato Massaro. Só posso dizer que ele é essencial para mim. O que seria de mim sem o Renato para tornar a minha vida mais emocionante em todos os aspectos? Agradeço por acreditar em mim, me agüentar e continuar sempre ao meu lado independentemente do que aconteça, sendo meu amigo para todos os momentos e ocasiões.

À Rebeca Almeida, que apesar de me escutar reclamar e pedir para ela 4-NC todos os dias, continua a ser mais do que minha colega. Obrigada por me aturar, pelas caronas e por tornar minhas noites e finais de semana no lab (e fora dele) mais agradáveis.

Ao Diogo Rivelli, que atura a todos do laboratório com muito humor e paciência, e que ainda vai isolar 4-NC para eu realizar os meus experimentos *in vivo*, não é mesmo?

À Dr^a Marisol Soengas e todos do seu laboratório em Madrid (CNIO): Érica Riveiro, Estela Cañon, Damià Tormo, Lionel Larribel, Agnieszka Checinska, Direna Alonso, Tonan Calvo e Eva Perez. E também aos amigos: Paulina Alina, Pilar Sancho, Evelina Mocci e Laura Doglio. Eles foram essenciais para o meu crescimento profissional e me acolheram como se eu pertencesse às suas vidas por muitos anos, tornando a minha estadia na Espanha inesquecível.

A todos do laboratório de Bioquímica Clínica da Prof^a. Dr^a Ana Campa pelo companheirismo e amizade e, especialmente à Sabrina Okada pela ajuda com os experimentos de EROs. A todos do laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Prof. Dr Mário Hirata e da Prof^a. Dr^a Rosário Hirata, especialmente a André Lucchesi e Vivian Silbiger pela ajuda com os experimentos. A Prof^a. Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro e seu aluno Tiago Franco de Oliveira pela realização de experimentos de lesões ao DNA.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas por nos disponibilizarem seus laboratórios para alguns experimentos, e aos seus alunos pela disposição em nos ajudar.

Às Prof^a. Dr^a Ana Paula de Melo Loureiro e Prof^a. Dr^a Miriam Jasiulionis por terem participado da minha banca de qualificação, lido de forma crítica e contribuído muito para essa forma final da tese.

Aos professores membros da minha banca de defesa, por lerem minha tese e fazerem comentários que certamente ajudarão na elaboração de sua versão final.

Aos meus amigos tão queridos: Danilo Miguel, Daniele Niza, Gabriela Ferreira, Mariana Vassoler, Renato Massaro e Tatiana Takiishi. Embora muitas vezes distantes, eles fizeram e fazem com que meus dias sejam mais felizes e sei posso sempre contar com eles.

E em especial à minha família, meus amores. Aos meus pais, Lohengrin W. A. Brohem e Josélia M. S. A. Brohem, que desde o princípio me apoiaram na decisão de ser “cientista”, me dando a liberdade de escolher a profissão que eu amo e me incentivando em todos os passos desta carreira. Agradeço por toda estrutura familiar que sempre me proporcionaram, e por transmitirem seus valores de cumplicidade, responsabilidade, respeito e amizade. Vocês são meus exemplos de vida, por serem pessoas exemplares e especiais. Pelo carinho, amor e dedicação: eu serei eternamente grata e parte deste título eu devo a vocês.

Às minhas irmãs Bruna e Renata pelas conversas, brigas, broncas, viagens, pizzas, risadas. Sem vocês eu não seria o que sou hoje. Fico muito feliz por ver que as minhas irmãs mais novas são mulheres brilhantes e especiais e que fazem da minha vida mais feliz. Minhas irmãs e minhas amigas, muito obrigada!

Aos meus avós, Raphael Brohem (em memória) e Alice Brohem (em memória) e a José Sales e Camélia Sales, por serem meus exemplos e por sempre me apoiarem e se orgulharem de mim.

Enfim, a FAPESP, CNPq, CAPES e PRP-USP pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento do trabalho.

“La vida no es la que uno vivió, sino
la que uno recuerda y cómo la recuerda
para contarla.”

Gabriel García Márquez

ALUNA: Carla Abdo Brohem

e-mail: carlabrohem@usp.br

ORIENTADORA: Silvy Stuchi Maria Engler

NÍVEL: Doutorado

TÍTULO: Mecanismo de ação do 4-nerolidilcatecol na indução da morte celular e contenção da invasão em linhagens de melanoma humano e modelo de pele artificial

VOLUME: 01

NÚMERO DE PÁGINAS: 235

RESUMO

O melanoma é a forma mais mortal de câncer de pele, origina-se de células produtoras de pigmentos, os melanócitos. Esses podem ser cutâneos ou não-cutâneos (encontrados no revestimento da membrana coróide do olho, nas meninges, e nos tratos gastrintestinal e geniturinário). O aumento da incidência de melanomas malignos nas últimas décadas, e sua alta taxa de mortalidade e grande resistência a maior parte das terapias, tem sido um enorme desafio para a comunidade científica. Particularmente, a falta de habilidade de indução à morte por apoptose em resposta à quimioterapia e outros estímulos externos permitem uma vantagem seletiva para progressão tumoral, formação de metástase e resistência à terapia em melanomas. O estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (EROs) vêm sendo, há muito tempo, reconhecidos como importantes desencadeadores e moduladores da apoptose. Porém o exato papel do estresse oxidativo no processo apoptótico ainda é uma questão de debate. Antioxidantes tendem a possuir propriedades regulatórias de tradução de sinais que devem ou não estar ligadas às suas capacidades de inativar oxidantes. Porém em certas condições, um forte ambiente oxidante onde há falta de suporte para regenerar (reduzir) antioxidantes oxidados, permite que alguns antioxidantes assumam características de um pró-oxidante. Foi demonstrada a capacidade citotóxica de um potente antioxidante, 4-nerolidilcatecol (4-NC), extraído da planta *Pothomorphe umbellata* L. Miq, sobre linhagens tumorais de melanoma e sobre fibroblastos humanos normais. Esse composto foi capaz de induzir a parada do ciclo celular em G1, bem como diminuir a atividade de MMPs e em outras linhagens de melanoma foi capaz de induzir a morte celular por apoptose. Estudos subsequentes mostraram que o mecanismo de ação deste composto inicia-se com a formação e acúmulo de EROs, além da inibição da enzima catalase. O 4-NC foi capaz de induzir a morte por apoptose via mitocondrial, aumentando os níveis das proteínas p53, Noxa, Mcl-1, clivando Bax e Bid e induzindo a clivagem das caspases 3 e 9. Além disso, em modelo de pele artificial contendo melanoma, o 4-NC foi capaz de conter a invasão do melanoma para a estrutura dérmica da pele reconstituída. Foram utilizadas como controle de diferenciação as proteínas Queratina 10 e 14, Involucrina e, como marcador do melanoma, a proteína S100. Parte desta invasão é contida devido à inibição da ativação das MMP-2 e -9 e ativação de TIMP-2 pelo 4-NC. Sendo assim, esse composto se mostra como um potencial quimioterápico no tratamento do melanoma humano.

Palavras chave: 4-nerolidilcatecol. Melanoma. Apoptose. Invasão. Pele artificial.

STUDENT: Carla Abdo Brohem

e-mail: carlabrohem@usp.br

SUPERVISOR: Silvy Stuchi Maria Engler

LEVEL: Doctorate

TITLE: Mechanism of action of 4-nerolidylcatechol: induction of apoptosis via ROS accumulation and inhibition of invasion in melanoma and skin reconstructs model

VOLUME: 01

PAGES: 235

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer, it arises from the pigment-producing cells, melanocytes. These may be cutaneous or non-cutaneous (found in the lining membrane of the eye choroid, the meninges, and gastrointestinal and genitourinary tracts). The increased incidence of malignant melanomas in recent decades, its high mortality rate and high resistance to most therapies has been a major challenge to the scientific community. It's particularly difficult to induce cell death by apoptosis in response to chemotherapy and other external stimuli, which may provide a selective advantage for tumor progression, metastasis formation and resistance to therapy in melanoma. Oxidative stress and reactive oxygen species (ROS) have been recognized for a long time as important triggers and modulators of apoptosis, but the exact role of oxidative stress in the apoptotic process is still a matter of discussion. Antioxidants tend to possess properties to regulate transduction signals that may not be related to their ability to inactivate oxidants. Under certain conditions, in a strong oxidizing environment where there is lack of support to regenerate (reduce) oxidized antioxidants, some antioxidants can assume characteristics of pro-oxidant. The 4-nerolidylcatechol (4-NC) is a potent antioxidant that is extracted from the plant *Pothomorphe umbellata* L. Miq. Its cytotoxic potential has been demonstrated on melanoma tumor cell lines and on normal human fibroblasts. This compound was able to induce cell cycle arrest in G1, decrease the activity of MMPs and cell death by apoptosis. Subsequent studies showed that the mechanism of action of this compound starts with the formation and accumulation of ROS, and inhibition of the enzyme catalase. The 4-NC was able to induce apoptosis via mitochondria, increasing the levels of p53, Noxa, Mcl-1, cleaving Bax and Bid and inducing cleavage of caspases 3 and 9. Furthermore, in a model of artificial skin containing melanoma 4-NC was able to contain the invasion of melanoma to the dermal part of the skin. Proteins keratin 10 and 14, involucrin and S100 were used as control of differentiation. Part of this invasion is restrained due to TIMP-2 activation and the inhibition of MMP-2 and -9 activation by 4-NC. Concluding, this compound can be used as a potential chemotherapeutic agent in the treatment of human melanoma.

Key words: 4-nerolidylcatechol. Melanoma. Apoptosis. Invasion. Artificial Skin.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-NC	4-nerolidilcatecol
ADP	Adenosina difosfato
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APAF-1	<i>Apoptotic activator 1</i>
ARF	<i>ADP Ribosylation Factors</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bfl-1/A1	BCL2-related protein A1
BID	Proteína de domínio <i>BH3 only</i>
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
CB	Carcinoma basocelular
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDKN2A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CE	Carcinoma espinocelular
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cyt c	citocromo c
DiCO6 (3)	<i>3,3' - Dihexyloxacarboxyanine iodide</i>
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM-M	<i>Dulbecco's modified eagle's médium</i>
DNS	<i>Dysplastic nevus syndrome</i>
EC	Envelope Cornificado
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
FHN	Fibroblasto humano normal
FLICE	<i>FADD-like ICE</i>
FS	Fosfatidilserina
HU	Hospital Universitário
IP	Iodeto de propídio
LPC	lisofosfatidilcolina
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MC1R	receptor de melanocortina 1
Mcl-1	<i>Myeloid leukemia cell differentiation protei</i>
MDM2	<i>murine doble minute 2</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MEC	Matriz extraxelular

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

