

**FERNANDA AUGUSTA DE LIMA BARBOSA GUTERRES**

**SENESCÊNCIA INDUZIDA POR SINVASTATINA EM MODELO DE MELANOMA  
HUMANO: ENVOLVIMENTO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DA VIA  
p53/p21**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila M. B. Winnischofer  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glauca Regina Martinez

**CURITIBA**

**2014**

*O Destino quer que eu cante  
E ao cantar eu me concentro  
A querência eu levo dentro  
E o resto eu toco por diante*

*Podem me chamar de louco  
Mas aprendi com os mais quebras  
A não galopar nas pedras  
Nem pelear por muito pouco*

*A lição número um  
Eu aprendi com meu Pai  
Quem não sabe pra onde vai  
Não vai a lugar nenhum*

*Nunca refuguei bolada  
Se me toca, me apresento  
E tenho a crina esfiapada  
De galopar contra o vento*

*Do meu manancial de penas  
Quase todas se extraviaram  
Um porque se agrandaram  
Outras, por muito pequenas*

*Tive um antes e um depois  
Quando me larguei a esmo  
De certo por isso mesmo  
Os meus destinos são dois*

*Destinos de um índio incréu  
Sob um mesmo coração  
Um que me prende no chão  
Outro me puxa pra o céu*

*Porém, o que me arrebatou  
É o destino de xiru  
Em vez das pilchas de prata  
As garras de couro cru*

*O Destino quer que eu cante  
E ao cantar eu me concentro  
A querência eu levo dentro  
E o resto eu toco por diante..."*

Luiz Marengo  
**Destinos**

Dedico este trabalho à memória de meu avô,

Adão Farias de Lima.

A ele, que contava os anos, meses, dias para

meu retorno para casa.

Agora é a minha vez de contar, uma vida inteira,

até que possa estar com ele novamente.

De bom grado daria todo meu esforço nesta jornada

em troca de ter você de volta.

Saudades.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar e acima de todas as coisas, a Deus. Pela proteção nestes anos todos vivendo sozinha no meio de estranhos, pela iluminação nos momentos em que precisei, e por me manter firme no objetivo de realizar este sonho, mesmo quando tive vontade de desistir.

A Nossa Senhora das Graças, por ocupar o lugar de mãe quando a minha estive longe, por ouvir minhas orações e lamentos, e por compartilhar de minha alegria, e pela companhia nos dias de trabalho e nas madrugadas de escrita.

Este trabalho não teria acontecido sem o amor e cuidado de meus familiares.

Obrigada de coração cheio e pleno a minha mãe, Gisa. Por ser exemplo, por ser apoio, por seu conselho e segurança, desde meus primeiros passos. Este trabalho é um sonho teu também, fruto do teu esforço e dedicação em ensinar e me estimular a sempre ir em frente. Todas as minhas conquistas são dedicadas a ti, para te proporcionar orgulho e alegria em agradecimento por todas as coisas que fizeste por mim.

Obrigada a meu pai do coração, Valdir. Por me levar e buscar na escola, nos vestibulares, na pós-graduação, sempre acreditando na minha capacidade e sendo meu grande incentivador. Palavras nunca serão suficientes para te agradecer pelo teu carinho e dedicação comigo e com meus irmãos. Conviver contigo é aprender todos os dias que o amor é desprendimento.

Agradeço a meu pai, Fernando, de quem herdei o nome, boa parte de inteligência e de vontade de crescer. Agradeço pelo estímulo ao estudo e à leitura, desde pequena, e pelo exemplo de que pela própria capacidade se pode chegar aonde quisermos.

Agradeço, e ao mesmo tempo me desculpo, a meus irmãos. Álvaro e Augusto: vocês são os amores da minha vida, amor fraterno, protetor e fiel. Meus amigos, que me proporcionam divertimento e orgulho. Quando eu agradeço, agradeço por ter vocês, e quando me desculpo, é pela ausência que todo este processo de morar longe causou. De vocês, tenho certeza, virá sempre o melhor.

Meu agradecimento a meus avós é feliz, mas também é triste. Queria muito que meu vô, Adão, vivo estivesse neste momento. Ficou na memória a lição de simplicidade, correção e o cuidado e carinho que me dedicava, sempre atento a todos os meus passos. À minha avó, Genesi, agradeço pelo espírito pioneiro, pelo

amor e dedicação aos netos, pela preocupação com meu bem-estar, pelas saudades e pelas histórias que compartilhamos.

Por fim, quero destacar meu agradecimento a meu marido, Raphael. Agradeço a Deus por ter te colocado em minha vida, você foi alento e salvação, devolvendo sentido a todas as coisas e tornando tudo mais leve. Obrigada pela infinita paciência, pela ajuda e pelos quilômetros de distância percorridos. Obrigada por ser meu amigo e companheiro. Teu amor me mudou e me fez crescer, e aprendo todos os dias contigo.

A todos os meus familiares, mesmo que não os veja com a frequência que gostaria, muito obrigada. Todos sabem o quanto são importantes na caminhada que decidi trilhar, e o incentivo e as palavras e gestos de carinho de cada um me fez mais feliz.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Prof. Sheila. Muitas coisas tenho a enumerar neste agradecimento, mas a principal é a paciência que teve comigo. Além disso, obrigada pelo carinho com que conduziu este trabalho, pelo respeito às minhas ideias e opiniões e pela autonomia de me permitir realizar tantas coisas novas. Disse e repito que és uma pessoa iluminada, profissional exemplar. Obrigada por compartilhar teu conhecimento durante estes seis anos em que trabalhamos juntas. Deus te abençoe, sempre.

Agradeço também a minha co-orientadora, Prof. Glaucia. Pela ajuda na correção dos manuscritos, no delineamento de experimentos e pela orientação precisa e cuidadosa em aspectos deste trabalho em que precisei de mais atenção.

Também gostaria de agradecer aos professores que fizeram parte de minha banca interna e me avaliaram durante estes anos, Prof. Maria Eliane Merlin Rocha e Prof. Silvio Marques Zanata. Obrigada pela avaliação sincera e coerente, pelo conhecimento compartilhado e pelas sugestões, sempre bem-vindas, no aprimoramento desta pesquisa. Aprendi muito através do olhar de ambos.

Aos demais professores do Grupo de Oxidações Biológicas, pelo convívio, orientações e conselhos ao longo do meu doutorado e mestrado.

Aos colegas de laboratório, pela ajuda com protocolos, testes, disciplinas e troca de ideias. Vi muitos entrarem, vi outros saírem. Torço pelos que ficaram, e admiro aqueles que estão indo atrás dos seus objetivos. Boa sorte a todos.

Também gostaria de agradecer aos alunos e professores dos departamentos de Fisiologia, Patologia Básica, Biologia Celular e do Núcleo de Fixação de

Nitrogênio, pela disponibilidade de ajudar no manuseio de equipamentos e na realização de algumas técnicas.

Às agências financiadoras deste projeto: Fundação Araucária, CAPES-REUNI e INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma, e CNPq (este último em especial, pela concessão da bolsa de estudos).

Gostaria de agradecer aos meus amigos, e não citarei nomes para não ser injusta com ninguém. Agradeço-os pelos momentos de distração, pelo incentivo, mesmo que muitas vezes de longe. Cada um de vocês é especial. Quando eu estou presente, quando telefonam, quando mandam mensagens pela internet, tenho consciência da lealdade de cada um. Tenho amigos que significam bons momentos, e por isto agradeço.

Àqueles, aos quais eu possa ter esquecido de mencionar individualmente, ou pelo nome, que me perdoem a falha e recebam meu carinho.

Sirvam as nossas façanhas de modelo a toda Terra, diz o hino do meu estado natal, Rio grande do Sul. Obrigada a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

De tudo, desde as coisas mais simples, até o conhecimento mais rico e complexo, se pode tirar lições para a vida toda. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de vivenciar tudo isto.

## RESUMO

A sinvastatina é um fármaco mundialmente conhecido e utilizado para o tratamento da hipercolesterolemia. Além disso, é descrito que este fármaco é capaz de induzir apoptose e parada de proliferação em diversos tipos de linhagens tumorais, inclusive de melanoma. A parada de proliferação é uma característica importante da senescência celular. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da sinvastatina na senescência de células de melanoma humano metastático (WM9), procurando estabelecer seu mecanismo de ação. A viabilidade celular foi avaliada através do método de cristal violeta para células WM9 tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina (0,05 a 1  $\mu\text{mol/L}$ ), por diferentes tempos. Observamos uma redução de 24% da viabilidade das células WM9 quando tratadas com 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina durante 72h, o que está relacionado ao aumento da marcação positiva para Anexina V. Estes resultados indicam que, em concentrações maiores, a sinvastatina é capaz de induzir a apoptose nestas células. A medida dos níveis de EROs intracelulares demonstrou um aumento de 14% com o tratamento de 0,25  $\mu\text{mol/L}$  e 51% com 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina após 72h de tratamento. Análises da progressão do ciclo celular foram realizadas por citometria de fluxo e mostram que o aumento da quantidade de células na fase G1-S do ciclo ocorre a partir da concentração de 0,25  $\mu\text{mol/L}$ . Estes resultados podem estar relacionados ao aumento da quantidade de células positivamente coradas no ensaio de senescência associada à atividade de  $\beta$ -galactosidase, para 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina. Para melhor compreender o mecanismo molecular envolvido na senescência induzida por sinvastatina e a extensão do envolvimento do estresse oxidativo neste processo, foram avaliados por RTq-PCR os níveis de RNAm dos marcadores de senescência e das enzimas antioxidantes. Pôde-se observar níveis aumentados da expressão de p53, p21, p16, catalase e peroxirredoxina-1. Ainda, ensaios de *Western Blotting* confirmaram o aumento da expressão de fosfo-p53 em células WM9 tratadas com 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina. O aumento da ativação de p53 foi acompanhado pelo aumento dos níveis de proteína p21. Como estes dados indicam uma possível relação entre a senescência e o estresse oxidativo, procuramos avaliar os efeitos de um antioxidante (NAC) e de um inibidor de catalase (ATZ) nas células WM9 tratadas com sinvastatina. Tanto a diminuição de viabilidade quanto a coloração positiva para atividade de  $\beta$ -gal não foram alterados pela adição de ambos os compostos. Além disso, após a adição de ATZ resultados preliminares da avaliação da progressão do ciclo celular demonstraram o aumento do número de células em G1-S (o que está de acordo com o ensaio de atividade de  $\beta$ -gal) e não foram observadas alterações nos níveis de EROs, em comparação aos resultados obtidos com o uso apenas da sinvastatina. Por último, observamos que quando as células WM9 foram tratados com pifitrina- $\alpha$  (um inibidor de p53), não foram observados o coloração positiva para atividade de  $\beta$ -gal e os níveis aumentados de EROs induzidos por sinvastatina, e não foram evidenciadas alterações da porcentagem de células em G1-S. Por outro lado, a pifitrina- $\alpha$  não foi capaz de proteger as células WM9 da perda de viabilidade causada pela sinvastatina, como demonstrado pelo ensaio de viabilidade celular e pelo aumento da porcentagem de células em SubG1. Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que a sinvastatina afeta a proliferação das células de melanoma humano WM9, induzindo a senescência. Estes efeitos podem ser mediados pelo aumento dos níveis de EROs e são dependentes da ativação de p53.

**Palavras-chave:** sinvastatina, melanoma, senescência, EROs

## ABSTRACT

Simvastatin, a worldwide known drug used for the management of hypercholesterolemia, is able to induce apoptosis and cell cycle arrest in several types of malignant tumors, including melanoma. Cell cycle arrest is a key feature of cellular senescence; however, the occurrence of senescence in melanoma cells upon simvastatin treatment has not been investigated until now. The aim of this work was to evaluate the effects of simvastatin on cellular senescence of WM9 metastatic melanoma cells, and elucidate its action mechanism. Cell viability was measured by crystal violet staining in WM9 cells upon treatment with simvastatin at different concentrations (0.05 to 1  $\mu\text{mol/L}$ ) for different time points. We observed 24% reduction in cell viability when WM9 cells were treated with simvastatin (1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 72h, which is correlated with increased positive staining for Annexin-V. These data suggest that, at higher concentrations, simvastatin induces apoptosis. Measurements of intracellular ROS levels showed increased ROS content by 14% to 0,25  $\mu\text{mol/L}$  and 51% to 1  $\mu\text{mol/L}$  of simvastatin upon 72h of treatment. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry, and showed an increase in the number of WM9 cells into G1-S phase of the cell cycle already after treatment with a low dose of simvastatin (0.25  $\mu\text{mol/L}$ ). In agreement with these results, senescence-associated  $\beta$ -galactosidase staining was evident in WM9 cells treated with simvastatin at both 0.25 and 1  $\mu\text{mol/L}$ . For better understanding the molecular mechanism of simvastatin induced senescence and the extent of the involvement of oxidative stress in this process, the mRNA expression levels of senescence markers and antioxidant enzymes were evaluated by RT-qPCR. Increased expression of p53, p21, p16, catalase and peroxiredoxin-1 mRNA levels were observed. Also, Western Blotting assays confirmed the augmented expression of phospho-p53 in WM9 cells treated with 0,25 and 1  $\mu\text{mol/L}$  of simvastatin. The increased expression of activated p53 was accompanied by increased levels of p21. Since these data indicate a connection between senescence and oxidative stress, we analyzed the effects of an antioxidant (NAC) and a catalase inhibitor (ATZ) on melanoma cells treated with simvastatin. Neither the viability decrease nor the positive  $\beta$ -galactosidase staining were altered with the addition of these compounds. Further, preliminary results of cell cycle progression analysis demonstrate an increased amount of WM9 cells in the G1-S phase (in agreement with  $\beta$ -gal staining) and no alterations for ROS levels when ATZ is added, when compared to simvastatin alone. Finally, the effects of simvastatin on positive staining for  $\beta$ -Gal assay and increased ROS levels were abrogated when WM9 cells were pre-treated with pifithrin- $\alpha$  (a p53 inhibitor), with no evident changes in the amount of G1-S number of cells. However, pifithrin- $\alpha$  was unable to reverse the loss of cell viability caused by simvastatin, as demonstrated by viability assay and by the increased percentage of WM9 cells at SubG1. Together, our results indicate that simvastatin treatment affects proliferation of human WM9 melanoma cells, inducing the senescent state. Also, our results showed that simvastatin effects on senescence may be mediated by increased levels of ROS and depend on p53 activation.

**Keywords:** simvastatin, melanoma, senescence, ROS

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HOMEOSTASE DOS MELANÓCITOS EM PELE HUMANA NORMAL	23
FIGURA 2 – ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA .....	24
FIGURA 3 – PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MELANOMA	26
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SINVASTATINA E SUA AÇÃO NA CASCATA DO MEVALONATO .....	29
FIGURA 5 – EFEITOS ANTITUMORAIS PROPOSTOS DOS INIBIDORES DA HMG-CoA REDUTASE .....	33
FIGURA 6 – PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	35
FIGURA 7 – MECANISMO DE AÇÃO DE p53 EM RESPOSTA A DANOS AO DNA	37
FIGURA 8 – FENÓTIPO SENESCENTE E VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS EM SENESCÊNCIA .....	38
FIGURA 9 – FORMAÇÃO DO <i>NEVUS</i> MELANOCÍTICO: UM EXEMPLO DE SENESCÊNCIA NA PROGRESSÃO DO MELANOMA .....	40
FIGURA 10 – VIAS DE FORMAÇÃO DE EROs E PAPEL DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO ESTRESSE OXIDATIVO.....	45
FIGURA 11 – p38 NA REGULAÇÃO DA PROGRESSÃO G1-S.....	48
FIGURA 12 – REAÇÃO DE DECOMPOSIÇÃO DO X-GAL PELA $\beta$ -GALACTOSIDASE .....	61
FIGURA 13 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	71
FIGURA 14 – MICROGRAFIAS DE CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	72
FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA.....	74
FIGURA 16 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA) APÓS 72h DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	76
FIGURA 17 – PORCENTAGEM DE CÉLULAS WM9 NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	77
FIGURA 18 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS E GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS WM9 POSITIVAMENTE CORADAS PARA	

ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADO À ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	79
FIGURA 19 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM35 SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADO À ATIVIDADE DE $\beta$ -GALACTOSIDASE APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	81
FIGURA 20 – NÍVEIS DE RNAm DOS MARCADORES DE SENESCÊNCIA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	82
FIGURA 21 – NÍVEIS DE PROTEÍNA DOS MARCADORES DE SENESCÊNCIA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	83
FIGURA 22 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES EM CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	85
FIGURA 23 – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES EM CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	86
FIGURA 24 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES EM CÉLULAS WM9 NOS PERÍODOS INICIAIS DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	87
FIGURA 25 – NÍVEIS DE RNAm DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	88
FIGURA 26 – NÍVEIS DE PROTEÍNA $p38^{MAPK}$ TOTAL E FOSFORILADA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	90
FIGURA 27 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM NAC.....	91
FIGURA 28 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM NAC E SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADA À ATIVIDADE DE $\beta$ -GAL.....	92
FIGURA 29 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA E COTRATADAS COM ATZ.....	94
FIGURA 30 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA, COTRATADAS COM ATZ E SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADA À ATIVIDADE DE $\beta$ -GAL.....	95
FIGURA 31 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM PIFITRINA- $\alpha$ .....	96
FIGURA 32 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM PIFITRINA- $\alpha$ E	

SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADA À ATIVIDADE DE $\beta$ -GAL.....	98
FIGURA 33 – EFEITO DA PIFITRINA- $\alpha$ E DO ATZ NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA.....	101
FIGURA 34 – EFEITO DA PIFITRINA- $\alpha$ E DO ATZ NOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA.....	103
FIGURA 35 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS EFEITOS DA SINVASTATINA EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO WM9 .....	115

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – EXPRESSÃO DE ANTIOXIDANTES EM CÂNCERES DE PELE, COMPARADOS À PELE NORMAL.....	49
TABELA 2 – <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL	66
TABELA 3 – ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS PARA IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** – análise de variância
- ATP** – adenosina trifosfato
- ATZ** – 3-amino-1,2,4-triazole
- $\beta$ -gal** –  $\beta$ -galactosidase
- CAT** – catalase
- cDNA** – DNA complementar
- CGA** – gangliosídeo A de extrato do condurango
- CDK** – quinase dependente de ciclina
- CoQ** – coenzima Q
- DCFH-DA** – 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato
- DMF** – *N,N*-dimetilformamida
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- DNA** – ácido desoxirribonucleico
- dNTPs** – desoxirribonucleotídeos fosfatados
- DSF** - dissulfiran
- EDTA** – ácido etilenodiaminotetracético
- ERK** – quinase ativada por sinal extracelular
- EROs** – espécies reativas de oxigênio
- FAD** – flavina-adenina dinucleotídeo
- FPP** – farnesil pirofosfato
- GAP** – proteína ativadora de GTPase
- GAPDH** – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GDP** – guanosina difosfato
- GEF** – fator de troca de nucleotídeo de guanina
- GGPP** – geranylgeranyl pirofosfato
- GPx** – glutathione peroxidase
- GRed** – glutathione reductase
- GSH** – glutathione reduzida
- GSSG** – glutathione oxidada
- GTP** – guanosina trifosfato
- HDM2** - *Mouse double minute 2 homolog* de origem humana
- HMBS** – hidroximetilbilano sintase

**HMG-CoA** – 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A

**HPRT** – hipoxantina-guanina fosforibosil transferase

**HRP** – peroxidase de raiz forte

**IGF-I** – fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I

**IR** – radiação ionizante

**MAPK** – proteína quinase ativada por mitógeno

**MDM2** – *mouse double minute 2 homolog*

**MMP** – metaloproteinase de matriz

**NAC** – *N*-acetilcisteína

**NADPH** – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NF-κB** – fator nuclear κB

**OIS** – *oncogene induced senescence*; senescência induzida por oncogene

**PAGE** – eletroforese em gel de poliacrilamida

**PBS** – solução salina fosfato-tamponada

**PCR** – reação em cadeia da polimerase

**PFT** – pifitrina-α

**PI** – iodeto de propídeo

**PI3K** – fosfatidilinositol 3-quinase

**PIP<sub>2</sub>** – fosfatidilinositol-4,5-difosfato

**PIP<sub>3</sub>** – fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

**PKB** – proteína quinase B

**PMSF** – fluoreto de fenilmetilsulfonila

**Prdx-1** – peroxirredoxina-1

**PTEN** – fosfatase lipídica homóloga a tensina e fosfatase

**PVDF** – fluoreto de polivinilideno

**RGP** – fase de crescimento radial

**Rb** – proteína do retinoblastoma

**RNA** – ácido ribonucléico

**RNA<sub>m</sub>** – RNA mensageiro

**RS** – *replicative senescence*; senescência replicativa

**RTK** – receptor tirosina quinase

**RT-qPCR** – PCR quantitativo em tempo real

**SDS** – dodecil sulfato de sódio

**SEM** – erro padrão da média

**SFB** – soro fetal bovino

**SOD** – superóxido dismutase

**TGF- $\beta$ 1** – fator de crescimento tumoral  $\beta$ 1

**TIS** – *therapy induced senescence*; senescência induzida por terapia

**UV** – radiação ultravioleta

**VGP** – fase de crescimento vertical

**2-ME<sub>2</sub>** – 2-metoxiestradiol

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
2.1 MELANOMA.....	21
2.1.1 Homeostase dos melanócitos e surgimento do melanoma.....	21
2.1.2 Bases moleculares da progressão do melanoma .....	24
2.2 ESTATINAS .....	27
2.2.1 Origem e mecanismo de ação das estatinas .....	27
2.2.2 Ação antitumoral das estatinas .....	29
2.2.2.1 Efeitos das estatinas em células de melanoma.....	31
2.3 SENESCÊNCIA CELULAR .....	33
2.3.1 Regulação da progressão do ciclo celular .....	34
2.3.2 Resposta a danos ao DNA.....	36
2.3.3 Senescência replicativa (RS) .....	38
2.3.4 Senescência induzida por oncogene (OIS).....	39
2.3.5 Senescência induzida por terapia (TIS) .....	41
2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO: FORMAÇÃO E PAPEL EM PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS .....	42
2.4.1 Defesas antioxidantes.....	43
2.5 EROs COMO MEDIADORES DE SENESCÊNCIA CELULAR .....	45
2.6 EROs E MELANOMAGÊNESE.....	48
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>51</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>53</b>
<b>5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>54</b>
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>55</b>
6.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR .....	55
6.1.1 Esterilização e manejo de materiais e células .....	55
6.1.2 Soluções, meios de cultura e materiais .....	55
6.1.2.1 Soluções.....	55
6.1.2.2 Meio de cultura, linhagens celulares e condições de cultivo .....	56
6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR .....	57
6.2.1 Avaliação da viabilidade celular: método de cristal violeta.....	57
6.2.2 Avaliação morfológica: microscopia em contraste de fase.....	58

6.2.3 Avaliação da morte celular: marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (PI).....	58
6.3 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR.....	60
6.3.1 Avaliação qualitativa por coloração com $\beta$ -galactosidase.....	60
6.3.2 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo .....	61
6.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES .....	62
6.4.1 Detecção de EROs pela sonda DCFH-DA.....	62
6.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DE MARCADORES DE SENESCÊNCIA E ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	63
6.5.1 Extração e purificação do RNA total e síntese de cDNA .....	63
6.5.2 Análise da modulação da expressão gênica.....	64
6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DOS MARCADORES DE SENESCÊNCIA .....	66
6.6.1 Extração e quantificação de proteínas .....	66
6.6.2 Ensaio para imunodetecção de proteínas ( <i>Western Blotting</i> ) .....	67
6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
<b>7 RESULTADOS.....</b>	<b>70</b>
7.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	70
7.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	71
7.3 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	73
7.4 AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA .....	75
7.5 ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE SENESCÊNCIA CELULAR EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO TRATADAS COM SINVASTATINA.....	78
7.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES ASSOCIADOS À SENESCÊNCIA CELULAR.....	82
7.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	84
7.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS DE MELANOMA APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA.....	88

7.9 ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA p38 <sup>MAPK</sup> EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA.....	89
7.10 ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	90
7.10.1 Avaliação da ação da NAC na citotoxicidade induzida por sinvastatina	90
7.10.2 Avaliação dos efeitos da NAC na indução de senescência celular induzida por sinvastatina .....	91
7.11 ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE (ATZ) EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA.....	93
7.11.1 Avaliação da ação do ATZ na citotoxicidade induzida por sinvastatina .	93
7.11.2 Avaliação dos efeitos do ATZ na indução de senescência celular induzida por sinvastatina .....	94
7.12 ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE PIFITRINA- $\alpha$ EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA.....	96
7.12.1 Avaliação da ação da pifitrina- $\alpha$ na citotoxicidade induzida por sinvastatina.....	96
7.12.2 Avaliação dos efeitos da pifitrina- $\alpha$ na indução de senescência celular induzida por sinvastatina .....	97
7.13 EFEITOS DA PIFITRINA- $\alpha$ E DO ATZ NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA.....	99
7.14 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PIFITRINA- $\alpha$ E DO ATZ NOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA .....	102
<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>116</b>
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias de pele, o melanoma é a menos incidente, porém a mais letal (MENDES *et al.*, 2010). No seu estágio mais agressivo, trata-se de um tumor altamente resistente às abordagens terapêuticas disponíveis, e que apresenta baixos índices de sobrevida. Atualmente, entre os objetivos das pesquisas para tratamento do melanoma encontra-se a modulação de alvos moleculares diretamente envolvidos na progressão da doença, que promovam a parada do crescimento e/ou a morte celular (SMALLEY, 2010). Neste contexto, se destaca a ação antitumoral das estatinas, sendo que a indução de morte celular por apoptose após o uso de estatinas já está bem caracterizada tanto para melanoma como também para outros modelos tumorais (SHELLMAN *et al.*, 2005; GLYNN *et al.*, 2008; OSMAK, 2012). Além disso, evidências indicam que o uso de estatinas também está relacionado à parada de proliferação de células de melanoma (SAITO *et al.*, 2008).

A parada de proliferação é um dos principais indícios da ocorrência de senescência celular. A senescência celular foi originalmente descrita como a perda do potencial replicativo de células normais em cultura, e relacionada ao envelhecimento e ao surgimento de síndromes e doenças características do envelhecimento (COLLADO *et al.*, 2007). Posteriormente, com a caracterização da senescência induzida por oncogene, passou a ser considerada um processo antitumoral (HA *et al.*, 2008). Recentemente, tem sido descrito que o uso de baixas concentrações de alguns quimioterápicos conhecidos foi capaz de induzir senescência em células tumorais, o que ficou conhecido como senescência induzida por terapia (EWALD *et al.*, 2010). A senescência induzida por fármacos e quimioterápicos compartilha as mesmas características fenotípicas da senescência replicativa e da senescência induzida por oncogene, e passou a ser investigada como uma abordagem promissora no manejo do tratamento de tumores (ACOSTA e GIL, 2012).

Levando-se em consideração a ação citostática das estatinas em diversos tipos de linhagens tumorais, este trabalho teve como objetivo principal avaliar se o uso de baixas concentrações de simvastatina seria capaz de induzir a senescência celular em linhagem de melanoma humano metastático (WM9). Para este fim, foram avaliados parâmetros relacionados à caracterização do fenótipo senescente, tais como análise da progressão do ciclo celular, atividade de  $\beta$ -galactosidase associada

à senescência e a expressão (níveis de RNAm e proteína) dos principais marcadores moleculares envolvidos na indução de senescência.

Visto que a exposição de diversos tipos de linhagens celulares à sinvastatina está associada à indução de morte celular por apoptose (KAMINSKY e KOSENKO, 2010), procuramos avaliar se nas concentrações administradas neste trabalho haveria a ocorrência deste processo. Para isto, avaliou-se a viabilidade celular pelo método de cristal violeta e a indução de morte celular – através da marcação com Anexina V e Iodeto de Propídeo (PI) – após o tratamento das células WM9 com este fármaco. Além disso, há evidências da ação pró-oxidante das estatinas em células tumorais (SANCHEZ *et al.*, 2008; QI *et al.*, 2010) e sabe-se que a indução de senescência está relacionada também a fatores indutores de estresse, como o aumento dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ADAMS, 2009). Assim, a possível relação entre a ocorrência de morte celular, a indução de senescência e o estresse oxidativo foi avaliada através do estudo dos níveis de EROs intracelulares e dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes e da proteína p38<sup>MAPK</sup>.

Por fim, procurando uma melhor definição dos mecanismos envolvidos na senescência induzida por sinvastatina, procuramos avaliar se o uso de um inibidor da proteína p53, bem como de compostos que possivelmente interfiram no estresse oxidativo (um antioxidante e um inibidor de catalase) seriam capazes de alterar os efeitos induzidos pela sinvastatina nas células de melanoma humano metastático. Estas avaliações foram realizadas através da análise dos principais parâmetros fenotípicos – viabilidade, progressão do ciclo celular, atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência e determinação dos níveis de EROs intracelulares – na presença dos referidos compostos e da sinvastatina.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MELANOMA

O melanoma é uma neoplasia da pele originária dos melanócitos, e consiste na forma mais fatal de câncer cutâneo, respondendo por 90% das mortes associadas a tumores de pele (GARBE *et al.*, 2010). É considerado um tumor de alta letalidade e baixa incidência e seu surgimento está relacionado principalmente à exposição solar em indivíduos de pele clara, através dos efeitos danosos da radiação ultravioleta (UV) (REBECCA *et al.*, 2012). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2012) estimaram pouco mais de seis mil novos casos de melanoma para o ano de 2012, igualmente distribuídos entre homens e mulheres, sendo que a região de maior incidência desta neoplasia é a região Sul do país.

O melanoma pode ser curado através da excisão cirúrgica, desde que diagnosticado precocemente. Entretanto, o melanoma metastático geralmente é resistente às terapias existentes, e possui prognóstico ruim, com baixo índice de sobrevida (RUSSO *et al.*, 2009). Como mencionado, a exposição solar é o fator de risco ambiental mais importante no desenvolvimento do melanoma, e o único que permanece potencialmente modificável. Assim sendo, ações de prevenção primária, principalmente que estimulem proteção contra a exposição à luz solar em horários de pico de incidência de radiação UV e uso de bloqueadores são consideradas efetivas e de baixo custo para evitar o desenvolvimento desta neoplasia (INGRAFFEA, 2013).

O quimioterápico de escolha para tratamento do melanoma é a dacarbazina, porém em pacientes com doença avançada os índices de resposta ao tratamento são muito baixos (12 a 17%), e a sobrevida permanece em torno de 6 meses (GARBE *et al.*, 2010).

#### 2.1.1 Homeostase dos melanócitos e surgimento do melanoma

Os melanócitos são células pigmentadas especializadas, encontradas predominantemente na pele e nos olhos, onde produzem a melanina. Os melanócitos são encontrados na camada basal da epiderme, sendo que geralmente há um melanócito para cada cinco a oito queratinócitos da camada basal, o que compõe uma “unidade de pigmentação”. Estima-se que os melanócitos possam interagir diretamente com até 35 queratinócitos da epiderme, por meio de expansões dendríticas. É por estas expansões que os melanosomas (organelas que contém a

melanina) são transferidos aos queratinócitos, no processo de pigmentação da epiderme (FERREIRA e ROCHA, 2004). Através da produção e da transferência de melanina aos queratinócitos, os melanócitos protegem a pele dos efeitos danosos da radiação UV, pois o pigmento absorve e dissipa a energia da radiação, protegendo a região nuclear das células (MEYLE e GULDBERG, 2009).

O controle da proliferação dos melanócitos é regulado pelos queratinócitos. Durante a vida adulta, os melanócitos apresentam uma baixa taxa de proliferação, sendo que esta ocorre somente após estímulos específicos, tais como a exposição ao sol e ferimentos. Assim, para proliferar, os melanócitos precisam se destacar da membrana basal e dos queratinócitos, retrair seus dendritos, passar pelo processo de divisão e migrar ao longo da membrana basal antes de finalmente se reacoplar a esta e aos queratinócitos novamente. Uma representação esquemática desse processo pode ser visualizada na Figura 1. A perda do controle da proliferação dos melanócitos pode levar ao desenvolvimento do melanoma, e esta perda pode acontecer através de cinco mecanismos: (1) a diminuição de receptores importantes para a adesão dos melanócitos aos queratinócitos, tais como E-caderina, P-caderina e desmogleínas produzidas através do estímulo de fatores de crescimento produzidos pelos queratinócitos e fibroblastos; (2) aumento de receptores e moléculas sinalizadoras que favorecem interações de células de melanoma com outras células de melanoma ou fibroblastos, tais como a N-caderina; (3) a desregulação de vias de sinalização controladoras da proliferação; (4) perda de ancoragem à membrana basal e (5) a produção aumentada de metaloproteinases de matriz (MMPs) (HAASS e HERLYN, 2005; HAASS *et al.*, 2004).

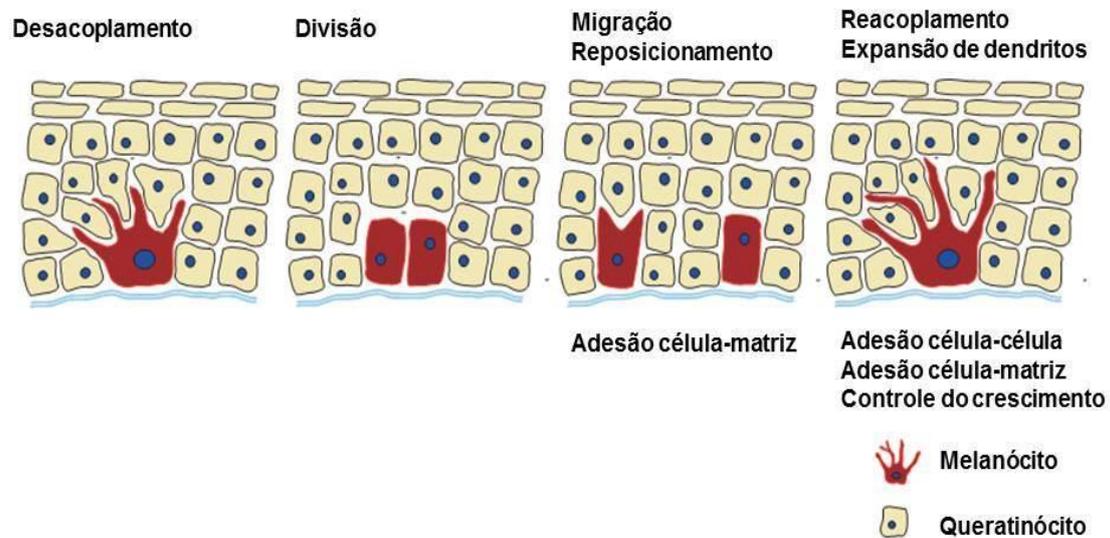


FIGURA 1 – HOMEOSTASE DOS MELANÓCITOS EM PELE HUMANA NORMAL

FONTE: Adaptado de HAASS e HERLYN, 2005

NOTA: Sequência de eventos necessária para a proliferação dos melanócitos, demonstrando a formação de uma nova unidade de pigmentação. A divisão celular dos melanócitos começa com o aumento da produção de fatores de crescimento pelos queratinócitos e fibroblastos, o que leva a diminuição da expressão de caderinas e ao desacoplamento dos melanócitos dos queratinócitos (HAASS e HERLYN, 2005).

O escape dos melanócitos à regulação da proliferação inicialmente pode levar à formação de névos e verrugas. Os névos são lesões benignas, correspondendo a *clusters* de melanócitos senescentes estruturalmente normais junto à membrana basal, e que podem assim permanecer durante muitos anos (MEYLE e GULDBERG, 2009). Segundo o modelo de progressão do melanoma estabelecido por CLARK e colaboradores (1984), os melanócitos seguem uma série de passos até a transformação maligna, como demonstrado na Figura 2. Dessa forma, o início do desenvolvimento aberrante a partir de um *nevus* preexistente ou em nova localização leva ao surgimento do *nevus* displásico, onde os melanócitos já apresentam características morfológicas anormais. Conseqüentemente, pode ocorrer a progressão para o chamado estágio de desenvolvimento radial (RGP), em que as células adquirem a capacidade de proliferação intraepidermal. Lesões que progredem para a fase de crescimento vertical (VGP) são capazes de invadir a derme e formar nódulos, o que pode culminar na fase final (metastática), em que as células ganham a corrente sanguínea e podem chegar a outros órgãos (MILLER e MIHM, 2006).

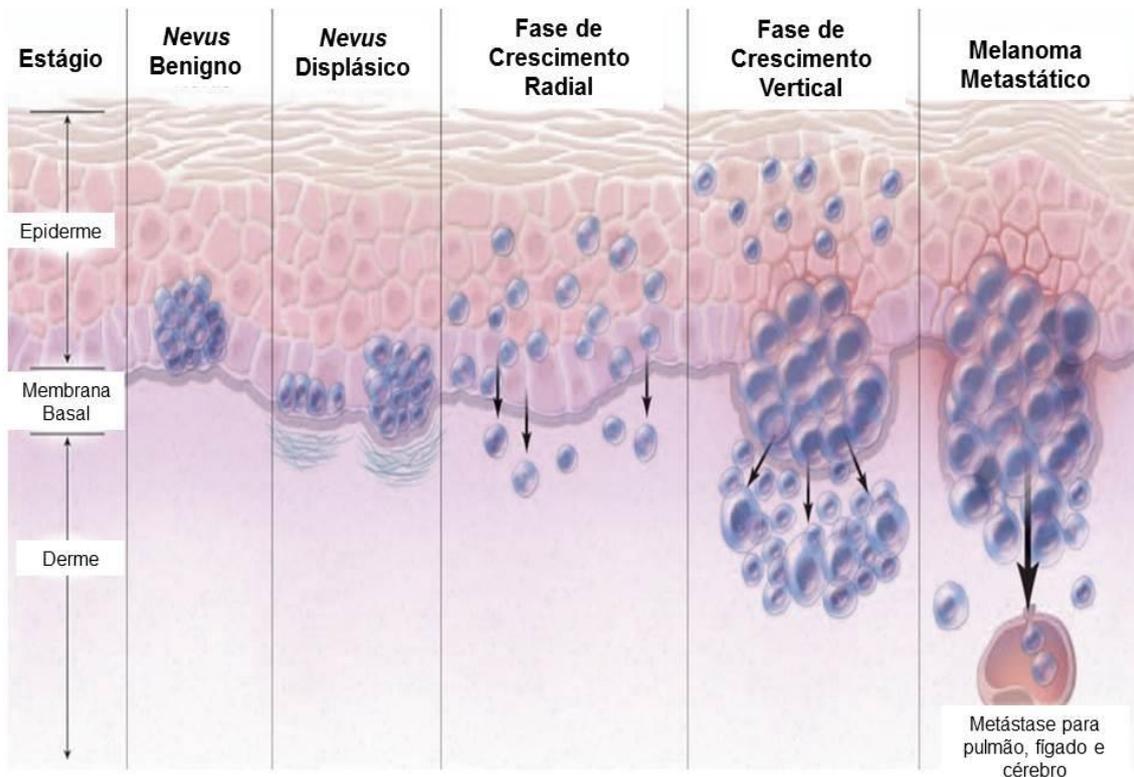


FIGURA 2 – ESTÁGIOS DE PROGRESSÃO DO MELANOMA

FONTE: Adaptado de MILLER e MIHM (2006)

NOTA: No modelo de Clark, os melanócitos progridem através de uma série de passos até a transformação maligna (CLARK *et al.*, 1984). Nos estágios iniciais, o *nevus* melanocítico ocorre através do aumento numérico de melanócitos normais, que podem se tornar atípicos (*nevus* displásico). A fase de crescimento radial é considerada o primeiro estágio de malignidade. A fase de crescimento vertical leva ao melanoma metastático.

É importante compreender que o desenvolvimento do tumor resulta de interações complexas entre influências ambientais – no caso do melanoma, principalmente a radiação UV, como mencionado – que podem levar a alterações genéticas. Estas alterações genéticas compõem as bases moleculares para a progressão do melanoma, e estão relacionadas principalmente a processos de sinalização que controlam a proliferação e a morte celular.

### 2.1.2 Bases moleculares da progressão do melanoma

A compreensão das alterações moleculares que ocorrem durante o desenvolvimento e progressão dos melanomas é assunto de vários estudos recentes sobre a doença. Entre os principais componentes de sinalização celular a sofrer alterações neste tipo de tumor está a via da proteína quinase ativada por mitógeno

(MAPK). A sinalização MAPK é iniciada na membrana celular pela ação de um ligante a um receptor ou pela ação de integrinas, que transmitem sinais ativadores via GTPase RAS, esta, por sua vez, presa ao folheto interno da membrana (Figura 3). RAS pode se ligar a proteínas efetoras, induzindo proliferação e diferenciação celular (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). As proteínas efetoras de RAS melhor caracterizadas até o momento são a serina-treonina quinase RAF e a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K). RAF ativada culmina na ativação de ERK (quinase ativada por sinal extracelular), que possui vários alvos no citoplasma, citoesqueleto e fatores de transcrição nucleares (PEYSSONNAUX e EYCHENE, 2001). Estima-se que ERK esteja ativada em mais de 90% dos melanomas humanos (COHEN *et al.*, 2002). Além disso, o componente mutado mais comum nesta via é a isoforma B de RAF (BRAF), que sofre mutação em cerca de 59-68% dos melanomas (DAVIES *et al.*, 2002; POLLOCK *et al.*, 2003) e em 82% dos névos benignos (POLLOCK *et al.*, 2003). Mutações ativadoras de RAS também estão presentes em cerca de 36% dos melanomas, sendo que a maioria destas mutações foi detectada em amostras de tumores em estágio mais avançado (BALL *et al.*, 1994).

Na via PI3K os lipídeos de membrana são convertidos a mensageiros secundários através da sua fosforilação por um membro da família PI3K ativado. A proteína efetora desta via é conhecida como PKB (proteína quinase B) ou AKT, e pode atuar na sobrevivência, crescimento e metabolismo celular, através da fosforilação de diversos substratos (SHAW e CANTLEY, 2006), sendo que a superexpressão de AKT ocorre em mais de 60% dos casos de melanoma (STAHL *et al.*, 2004). A sinalização PI3K é interrompida pela fosfatase PTEN (fosfatase lipídica homóloga a tensina e fosfatase), que converte PIP<sub>3</sub> a PIP<sub>2</sub>, que não mais serve como sítio de ligação a PKB. A função de PTEN está perdida em 5-20% das amostras teciduais de melanoma, enquanto que em linhagens celulares chega a variar entre 30 a 50%, raramente sendo detectada em estágios iniciais da doença (WU *et al.*, 2003).

A ação das proteínas Rho também é importante na tumorigênese do melanoma. As proteínas Rho são GTPases pequenas, que pertencem a superfamília RAS, e que participam de várias vias de transdução de sinal envolvidas na reorganização do citoesqueleto de actina, regulação da polaridade celular, transcrição gênica, progressão do ciclo e motilidade celular (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002). Geralmente, o papel destas proteínas na formação de

tumores está relacionado a sua superexpressão ou pela ocorrência de falhas no seu ciclo de ativação/desativação (RUTH *et al.*, 2006). A proteína RhoC está envolvida na formação de metástases em células de melanoma, e sua superexpressão está relacionada com maior potencial invasivo destas células, o que pode estar relacionado com o aumento da ativação de AKT (CLARK *et al.*, 2000; RUTH *et al.*, 2006).

Um exemplo das principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento do melanoma pode ser observado na Figura 3.

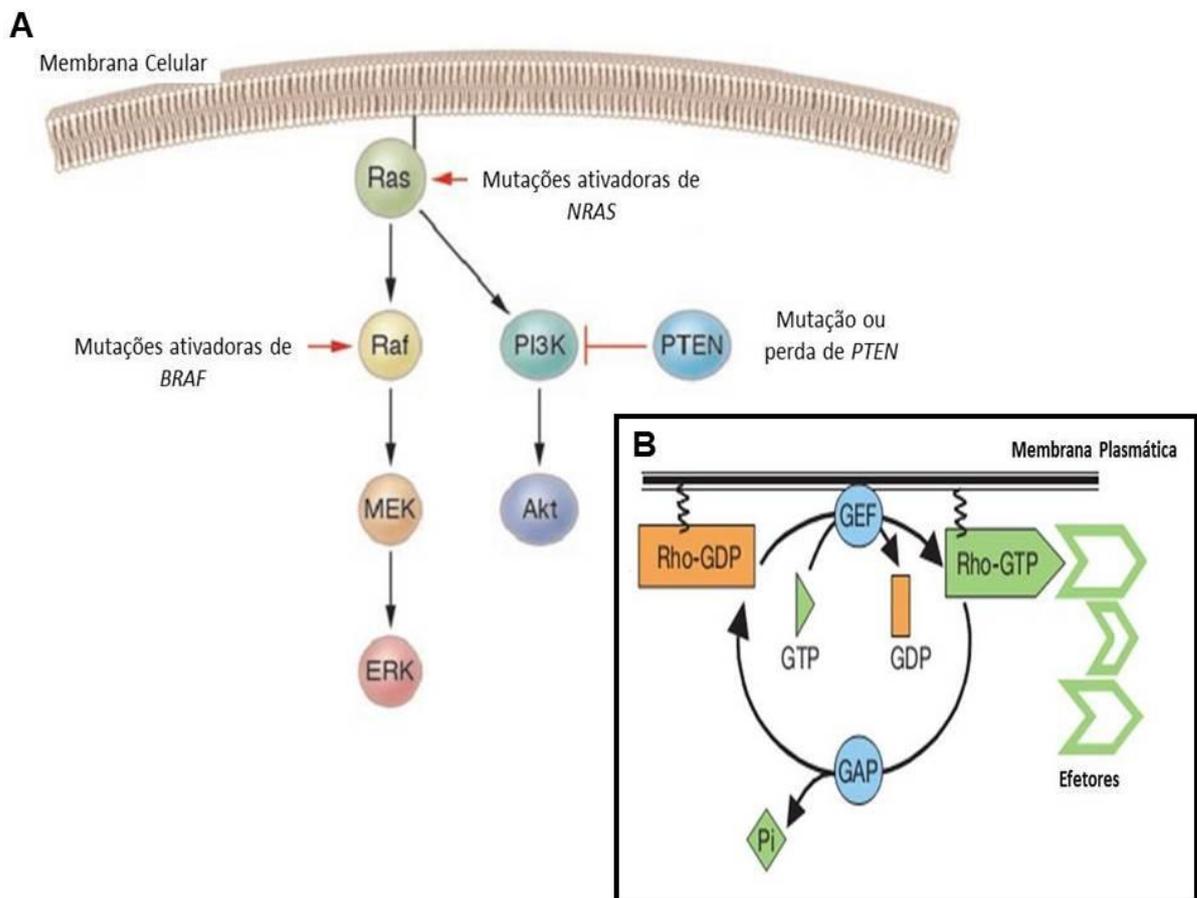


FIGURA 3 – PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NO MELANOMA

FONTE: Adaptado de CHUDNOVSKY *et al.*, 2005; ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2002.

NOTA: A – Esquema ilustrativo da interação das principais vias de sinalização envolvidas no melanoma. Uma destas vias é a via MAPK, ativada por RAS. Outra via destacada é PI3K, inibida pela fosfatase PTEN. B – Ciclo de ativação das GTPases Rho; no seu estágio ligado à GTP, Rho reconhece várias proteínas-alvo (efetores), gerando resposta até voltar a seu estágio inativo, ligado à GDP (GEF: fator de troca de nucleotídeo de guanina; GAP: proteína ativadora de GTPase).

Além das mencionadas, outras vias de sinalização envolvidas com o controle direto da progressão do ciclo celular e indução de morte também estão envolvidas na progressão do melanoma, e serão discutidas em detalhes posteriormente.

Muitos estudos em oncologia investigam a inibição das cascatas de sinalização celular que colaboram para a patogênese e a manutenção do crescimento tumoral. Alguns destes, por exemplo, têm como alvo a inibição da via MAPK em todos os seus níveis, e vários compostos inibidores das quinases RAF e RAS apresentam-se como estratégias terapêuticas atrativas e estão passando atualmente por testes *in vitro* e *in vivo*. Entre estes compostos destacam-se o Sorafenib (inibidor de RAF) e os inibidores das quinases ERK (revisado por RUSSO *et al.*, 2009). Recentemente, nos EUA, foi aprovado o uso do inibidor de BRAF Vemurafenib para o tratamento do melanoma metastático, porém seu uso vem sendo associado ao surgimento de efeitos colaterais severos (KUDCHADKAR *et al.*, 2013). Outros agentes, contudo, têm demonstrado potenciais efeitos antitumorais contra células de melanoma, e neste contexto destacam-se as estatinas, medicamentos cujas ações serão descritas a seguir.

## 2.2 ESTATINAS

### 2.2.1 Origem e mecanismo de ação das estatinas

As estatinas respondem por uma classe de antilipêmicos descoberta durante um programa de *screening* de produtos naturais originários dos fungos *Penicillium citrinum* e *Penicillium brevicompactum*, e classicamente exercem seus efeitos através da inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima que converte o HMG-CoA a mevalonato (Figura 4 – B). Esta conversão é uma reação irreversível, sendo, portanto a etapa limitante da via de síntese do colesterol (SCHACHTER, 2005; BARREIRO e FRAGA, 2008).

O primeiro produto isolado da classe das estatinas foi a compactina e em seguida ocorreu o isolamento de seu derivado metilado, inicialmente chamado de mevilonina, e atualmente conhecido por lovastatina. A sinvastatina (Figura 4 – A) é o derivado semi-sintético 2'-metilado da lovastatina, que ingressou no mercado americano em 1992 com o nome de Zocor<sup>®</sup> (BARREIRO e FRAGA, 2008). Devido ao crescente aumento da incidência de hipercolesterolemia na população, tornou-se um dos medicamentos mais comercializados no mundo (sétima colocação), segundo levantamento publicado pela revista Forbes (no qual a atorvastatina, descrita a seguir, ocupa a primeira colocação) (KING, 2013).

O desenvolvimento da segunda geração das estatinas deu-se pela consideração de fatores estruturais e da identificação do anel  $\gamma$ -lactônico como

principal grupo farmacofórico envolvido no reconhecimento molecular dos inibidores pela HMG-CoA redutase. Desta forma, criou-se uma estrutura química simplificada em relação à lovastatina, em que o grupo farmacofórico é substituído por um sistema difenilpirrólico. O principal representante das estatinas de segunda geração é a atorvastatina (BARREIRO E FRAGA, 2008).

Após ingestão por via oral, as estatinas lipofílicas (entre elas a sinvastatina) permeiam a membrana celular dos enterócitos do intestino delgado, sendo absorvidas de maneira rápida e metabolizadas no fígado principalmente via citocromo P450 (com maior afinidade para CYP3A4). Posteriormente, são distribuídas a outros tecidos através de sua ligação a proteínas plasmáticas – principalmente a albumina – o que reduz sua exposição sistêmica, diminuindo a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos (LENNERNAS e FAGER, 1997).

Além de inibirem a biossíntese do mevalonato e, conseqüentemente, diminuírem os níveis de colesterol, as estatinas podem inibir a formação de outros produtos, como os isoprenóides (Figura 4 – B). Os isoprenóides, como o geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) e o farnesil pirofosfato (FPP), podem se ligar a várias proteínas, permitindo sua ancoragem às membranas celulares (RANG *et al.*, 2006). Este processo de prenilação pós-traducional é essencial para a função das proteínas G, como as proteínas RAS e Rho. Sabe-se que FPP prenila RAS e que GGPP prenila Rho, e isto tem implicações em vários aspectos do crescimento e proliferação celular, e também da apoptose (OSMAK, 2012).

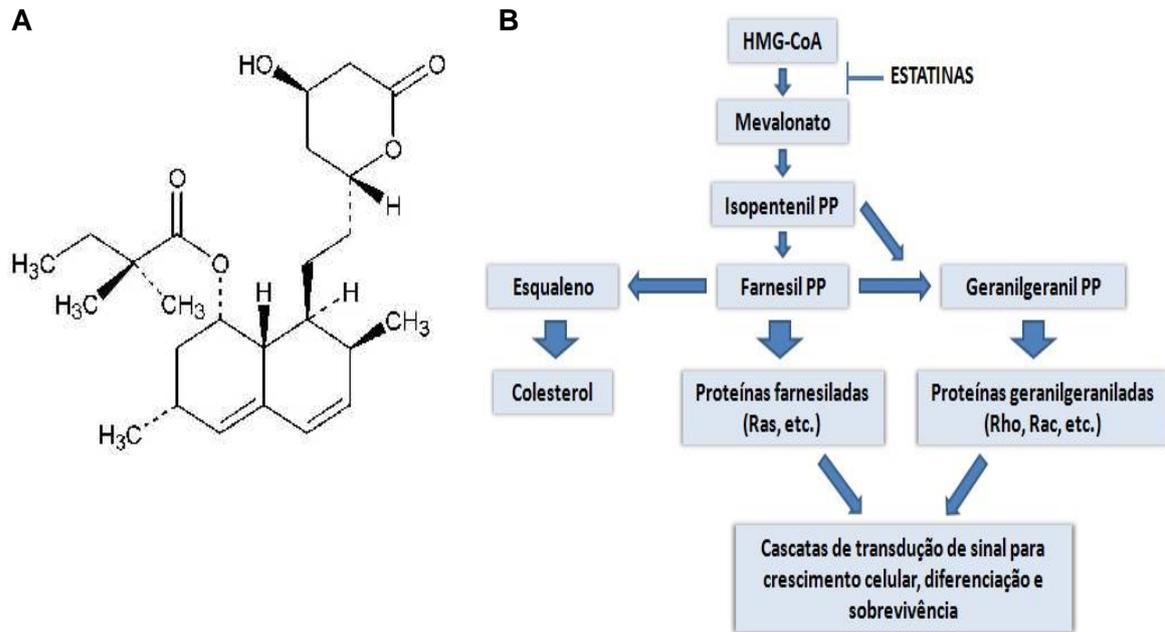


FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA SINVASTATINA E SUA AÇÃO NA CASCATA DO MEVALONATO

FONTE: SAITO *et al.*, 2008

NOTA: A – Estrutura química da sinvastatina; B – Ação das estatinas na cascata do mevalonato, inibindo a biossíntese de colesterol, a formação de derivados isoprenóides e os processos de sinalização relacionados à prenilação de proteínas como RAS e Rho.

Muitos dos efeitos das estatinas, entretanto, não estão envolvidos com a redução dos níveis de colesterol. Vários modelos estão sendo propostos para elucidar os demais efeitos exercidos pelas estatinas. BURKE *et al.*, (2009), por exemplo, demonstraram que a sinvastatina é capaz de modular a sinalização exercida por TGF- $\beta$ 1 (fator de crescimento tumoral  $\beta$ 1), impedindo assim a ativação de fibroblastos intestinais (o que é determinante para a ocorrência de fibrose), e isto ocorre através da interrupção da atividade de Rho. Esta interrupção impede a fosforilação de Smad-3, que é o efetor primário das respostas pró-fibróticas ao TGF- $\beta$ 1.

### 2.2.2 Ação antitumoral das estatinas

Em adição ao seu papel original na redução dos níveis de colesterol sérico, as estatinas exercem efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos em células tumorais (revisado por OSMAK, 2012). Recentemente, NIELSEN e colaboradores (2012) demonstraram a diminuição de 15% da mortalidade de pacientes com câncer usuários de estatinas. Para este estudo, realizaram análises em um grande grupo de

indivíduos, recolhendo informações de 1995 a 2009, comparando os dados de pacientes usuários de estatinas com não usuários.

Desta forma, procurando estabelecer um mecanismo de indução para estes efeitos, vários estudos têm sido realizados utilizando estatinas no tratamento de células tumorais *in vitro*. Foi demonstrado por TAKEDA *et al.*, (2007) que a sinvastatina pode suprimir a sobrevivência celular e a atividade invasiva de células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço através da inativação da integrina  $\beta 1$ , que está relacionada com a cascata de sinalização de ERK. Neste estudo também foi evidenciada a ativação de p21 e p27 (inibidores da progressão do ciclo celular) e de caspase-3 (enzima envolvida no processo de apoptose).

Estatinas podem causar mudanças morfológicas e induzir apoptose em linhagens celulares de câncer de cólon, e o mecanismo de ação neste caso está envolvido com a inativação da geranilgeranilação das proteínas RhoA e RhoC, através da diminuição da ligação destas proteínas à membrana (AGARWAL *et al.*, 2002). Evidências também apontam para a ação inibitória da proliferação e invasão das estatinas em linhagens de câncer de mama agressivo. Neste caso, ocorre a inibição da prenilação de RhoA, que causa a inativação de NF- $\kappa$ B de maneira dose-dependente, resultando na menor expressão de MMP-9, diminuindo o potencial invasivo da célula. O efeito antiproliferativo ocorre através do aumento dos níveis de p21 (DENOYELLE *et al.*, 2001). Posteriormente, confirmou-se a inibição das vias Rho/AKT, e o aumento de p21 com concomitante diminuição da ciclina D1 (DENOYELLE *et al.*, 2003).

A indução de apoptose é o melhor e mais descrito efeito antitumoral das estatinas. Linhagens celulares de carcinoma hepático, mieloma, câncer de próstata, glioma e leucemia, por exemplo, apresentam morte por apoptose após tratamento (RELJA *et al.*, 2010; CAFFORIO *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009). É interessante notar, entretanto, que a ocorrência de apoptose nestes trabalhos está associada ao uso de altas doses de estatinas (a partir de 1 até 60  $\mu$ mol/L). Dosagens séricas da concentração destas drogas quando utilizadas para o manejo da hipercolesterolemia indicam que a concentração terapêutica após sua administração se situa na faixa de nanomolar – mesma faixa de concentração necessária para inibição da HMG-CoA redutase – (SOLOMON e FREEMAN, 2008; RANG *et al.*, 2008), o que torna interessante a pesquisa dos efeitos da administração de doses menores destes fármacos.

Sabendo-se que as doses necessárias para inibir a proliferação e induzir apoptose estão relacionadas à alta toxicidade e à observação do surgimento de possíveis efeitos colaterais, o uso de estatinas como monoterapia - particularmente no caso de tumores sólidos - se torna restrito (OSMAK, 2012). Assim sendo, estudos para determinar a interação entre o uso de estatinas e quimioterápicos vem sendo realizados (embora ainda sejam poucos), geralmente com o surgimento de efeitos aditivos ou sinérgicos. Como exemplo, temos um estudo de fase II em que a sinvastatina é utilizada em adição ao irinotecan, 5-fluorouracil e à leucovorina na quimioterapia de pacientes com câncer de cólon metastático (LEE *et al.*, 2009). Concentrações terapêuticas de sinvastatina, neste caso, são capazes de aumentar a sobrevivência destes pacientes. Ainda, os autores discutem que estes efeitos podem estar relacionados a ações antiangiogênicas e à indução de senescência celular nas células tumorais.

#### 2.2.2.1 Efeitos das estatinas em células de melanoma

Triagens clínicas controladas do uso de estatinas na prevenção de doença cardíaca revelaram uma menor incidência de melanoma (e de outros tipos de câncer) entre as pessoas que fazem uso destes medicamentos (DEMIERRE e SONDAK, 2005). Utilizando informações provenientes de bancos de dados de distribuição de medicamentos e incidência de doenças, nos Países Baixos, KOOMEN e colaboradores (2007) analisaram a relação entre o uso de estatinas e a incidência e progressão de melanoma, e revelaram um efeito protetor destes fármacos na progressão da doença, com redução da densidade de Breslow. A densidade de Breslow é uma medida de volume tumoral calculada com base na profundidade do tumor a partir da epiderme e do diâmetro, que fornece uma excelente correlação com o prognóstico do paciente: por exemplo, quanto maior o valor da densidade em milímetros, pior o prognóstico (BRESLOW, 1970). Entretanto, a metanálise sistemática realizada por FREEMAN *et al.*, (2006), que incluiu dados de vários trabalhos realizados, não validou a possibilidade das estatinas atuarem na prevenção do melanoma.

Em trabalhos que analisam a ação das estatinas *in vitro* em linhagens celulares de melanoma, os dados indicam a ação antitumoral destes medicamentos através de vários mecanismos. Foi demonstrado que a sinvastatina é capaz de induzir a apoptose e parada do ciclo celular em diferentes linhagens deste tumor.

Ocorreram diminuição da viabilidade celular, mudanças morfológicas (arredondamento relacionado à inibição da prenilação de proteínas G reorganizadoras do citoesqueleto), apoptose e parada do ciclo celular, com o aumento dos níveis de p21 e p27 em diversas linhagens de origem humana (SAITO *et al.*, 2008). Ensaio utilizando a lovastatina demonstraram que este fármaco é capaz de induzir a apoptose em células de melanoma humano representando os diferentes estágios de progressão da doença, e acredita-se que a apoptose seja mediada pela inibição da geranylgeranilação de proteínas Rho (SHELLMAN *et al.*, 2005). COLLISSON *et al.*, (2003) testaram os efeitos antitumorais da atorvastatina, estatina de segunda geração, em células de melanoma humano, demonstrando que esta é capaz de alterar a localização celular das proteínas RhoA e RhoC, removendo-as da membrana celular e, conseqüentemente atenuando a sinalização mediada por estas proteínas. Além disso, demonstraram a inibição da invasão celular e metástase em modelo murino.

GLYNN *et al.*, (2008) analisaram os efeitos de quatro estatinas em linhagens celulares de melanoma humano. Destas, somente a pravastatina falhou em inibir a proliferação, como também mencionado por SHELLMAN *et al.*, (2005), o que pode estar relacionado ao fato desta ser hidrofílica, não se ligar a proteínas plasmáticas (o que dificulta a distribuição pelos tecidos e entrada nas células) (SCHACHTER, 2005). A lovastatina, mevastatina e a sinvastatina foram eficientes, inibindo a proliferação em todas as linhagens testadas, sendo a sinvastatina o fármaco mais potente nesta finalidade. Outros resultados deste estudo incluem a indução de apoptose e a diminuição da invasão celular (ambos de maneira dependente de concentração). Foram observadas ainda pequenas mudanças na adesão das células a moléculas da matriz extracelular (laminina, vitronectina e colágeno I e IV) e às integrinas (dos tipos  $\alpha 4$  e  $\alpha 5\beta 5$ ) (GLYNN *et al.*, 2008).

Uma representação esquemática dos efeitos antitumorais das estatinas é apresentada na Figura 5.

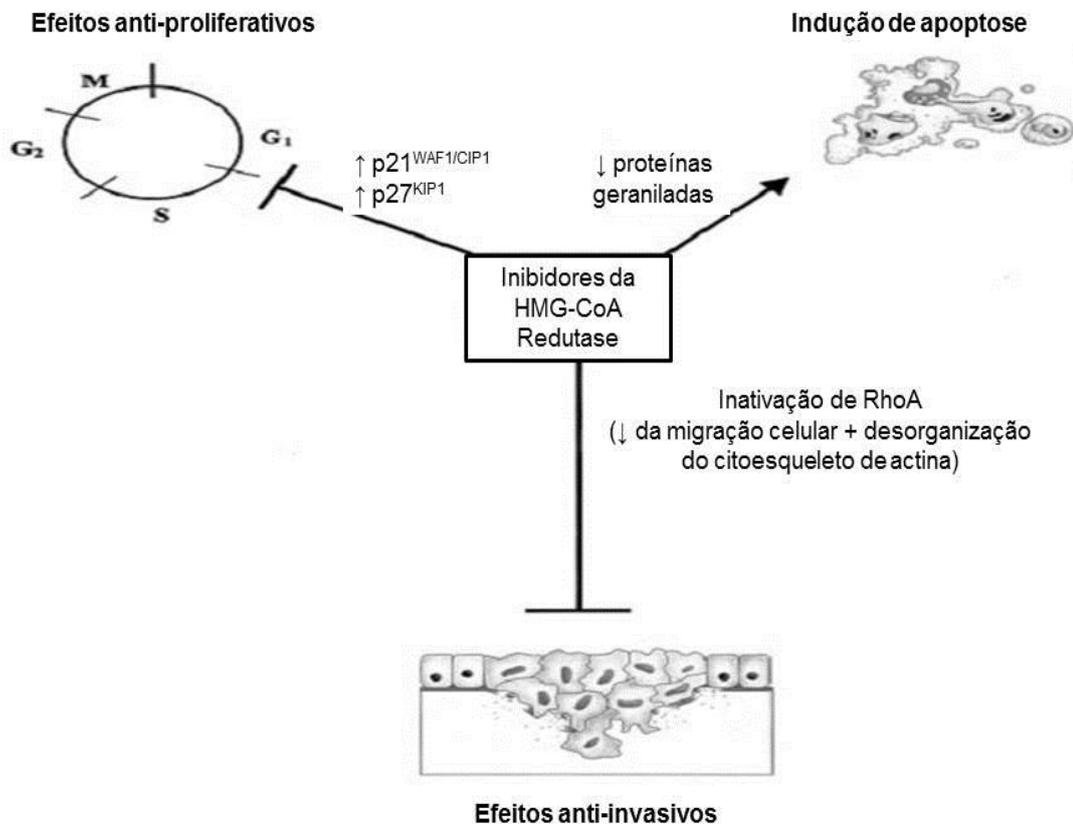


FIGURA 5– EFEITOS ANTITUMORAIS PROPOSTOS DOS INIBIDORES DA HMG-CoA REDUTASE  
 FONTE: CHAN *et al.*, 2003.

NOTA: Demonstração esquemática ilustrativa dos efeitos anti-proliferativos, anti-invasivos e da indução de apoptose mediados pelas estatinas.

A indução da parada de proliferação pelas estatinas poderia ser um indício da ocorrência de senescência celular, um processo de parada da progressão do ciclo celular irreversível com características fenotípicas distintas cuja caracterização vem sendo amplamente estudada e que será discutido em detalhes a seguir.

### 2.3 SENESCÊNCIA CELULAR

O estado de senescência celular é definido como a resposta a um estresse não letal que resulta em parada de proliferação permanente com fenótipo bioquímico e morfológico distinto (EWALD *et al.*, 2010). A irreversibilidade da parada de proliferação, aliada ao fato de a senescência ser uma resposta ao estresse oncogênico, é o que diferencia as células senescentes de células quiescentes ou terminalmente diferenciadas (CAMPISI, 2011). O estudo das vias de sinalização

envolvidas na ativação da senescência celular é importante para a determinação do fenótipo senescente.

### 2.3.1 Regulação da progressão do ciclo celular

A parada de proliferação é um aspecto chave na senescência, assim como a perda de controle sobre a progressão do ciclo celular é na carcinogênese. Células normais possuem potencial proliferativo restrito, regulado pela ação das quinases dependentes de ciclina (CDKs), as quais fosforilam diversas proteínas intracelulares responsáveis pela progressão do ciclo celular, entre elas Rb (FERREIRA e ROCHA, 2004).

As CDKs tornam-se ativas apenas após a formação de complexos com ciclinas específicas, que são proteínas regulatórias cuja concentração varia durante o ciclo celular. A progressão do ciclo celular está relacionada com diferentes combinações ciclinas/CDKs para cada fase, sendo que a transição da fase G1 para S é mediada por CDK4 e CDK6/ciclina D (FERREIRA e ROCHA, 2004).

No início da fase G1 a proteína do retinoblastoma (Rb) liga-se a E2F, um fator de transcrição que controla a expressão de vários genes envolvidos com a progressão do ciclo celular. A ligação de Rb a E2F leva à inativação deste fator de transcrição, e a célula fica em estado quiescente. Entretanto, se Rb for fosforilada, inicialmente pela ação do par CDK4 e CDK6/ciclina D, e posteriormente pelo par CDK2/ciclina E, ocorre a liberação de E2F, que fica livre para ativar seus genes-alvo, permitindo a transcrição de genes que promovem a entrada da célula na fase S do ciclo celular (POZNIC, 2009).

À medida que as células adentram a fase S, as ciclinas do tipo A substituem a ciclina E como parceiras da CDK2. Na fase S tardia, as ciclinas A deixam CDK2 e associam-se a CDK1. Subsequentemente, na entrada da fase G2, as ciclinas A são substituídas pelas ciclinas do tipo B, que no início da fase M desencadeiam os eventos relacionados à mitose (PARK e LEE, 2003).

A ação de inibidores dos complexos ciclina/CDK é fundamental para prevenir o descontrole da proliferação celular. O inibidor de ciclina p16<sup>INK4a</sup>, codificado pelo locus *INK4A/ARF*, age através da ligação à CDK4 e CDK6, bloqueando sua atividade e prevenindo a fosforilação de Rb e impondo a parada do ciclo celular em G1, desta forma atuando como um possível indutor de senescência (SHARPLESS e CHIN, 2003). A Figura 6 apresenta as diferentes fases de progressão do ciclo

celular, a interação entre os complexos ciclina/CDKs e os inibidores responsáveis pelo controle desta progressão.

É importante frisar que mutações em *INK4A/ARF* estão relacionadas ao desenvolvimento de melanoma familiar, porém são raras no melanoma esporádico (NEWTON BISHOP *et al.*, 1999; BATAILLE, 2000). No estudo do melanoma esporádico, há evidências de baixa expressão e do silenciamento de *INK4A/ARF* através de hipermetilação em tumores primários e metastáticos (MARINI *et al.*, 2006).

Outros inibidores da progressão do ciclo celular, tais como  $p21^{Cip1}$  e  $p27^{Kip}$ , possuem atividade mais ampla, sendo capazes de inibir todos os outros complexos ciclina/CDK, pois possuem estruturas que os permitem ligar-se tanto à subunidade ciclina quanto à CDK (SHERR e ROBERTS, 1999; FERREIRA e ROCHA, 2004).

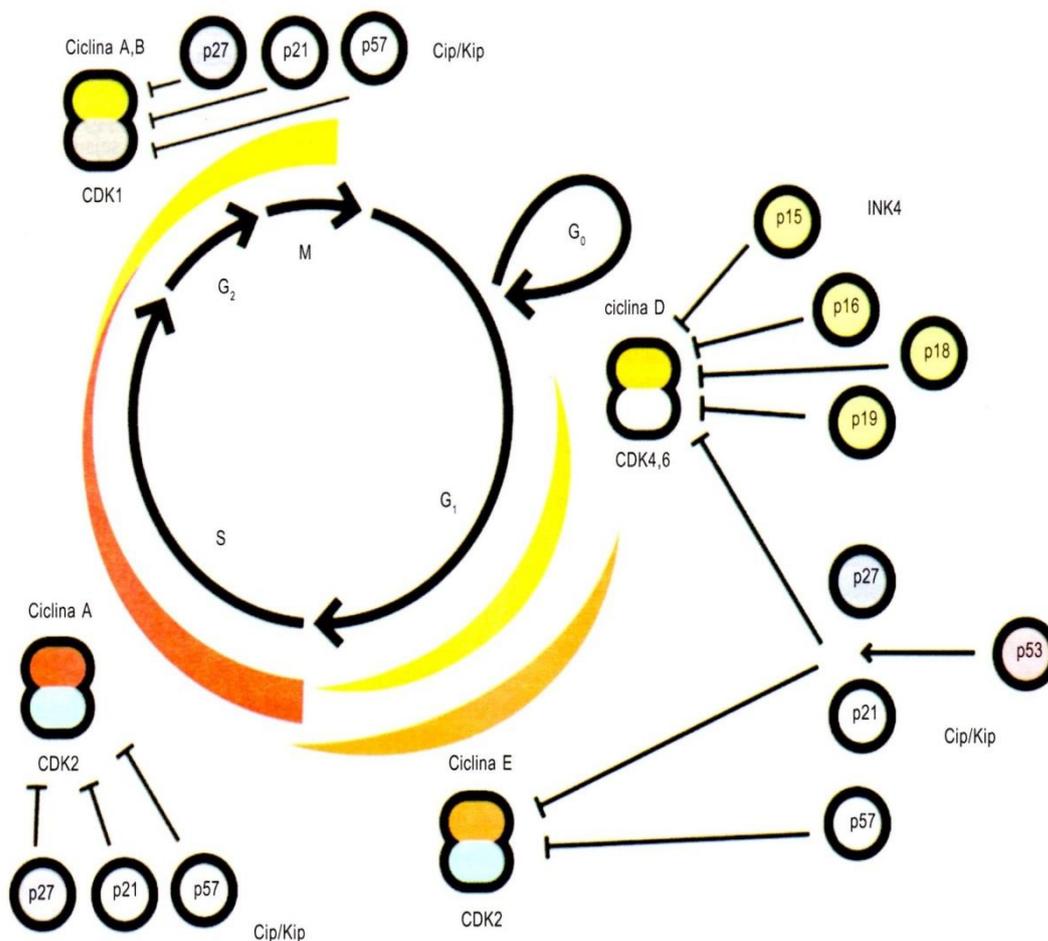


FIGURA 6 – PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

FONTE: FERREIRA e ROCHA (2004)

NOTA: Representação da dinâmica de expressão dos complexos de ciclina/CDKs e seus inibidores ao longo das fases do ciclo celular.

### 2.3.2 Resposta a danos ao DNA

Danos ao DNA podem ser iniciadores do processo de senescência através de diversos mecanismos como diminuição telomérica (caso ocorra danos ao DNA codificante), ou indução da ação de oncogenes, como por exemplo, HRAS. A indução de HRAS em fibroblastos culmina em uma fase hiperreplicativa destas células, em que a senescência é induzida e está diretamente associada a um aumento da resposta aos danos ao DNA; inativando esta resposta, a senescência é revogada e ocorre a transformação dos fibroblastos (DI MICCO *et al.*, 2006). Nesse contexto, surge a função de uma das mais importantes moléculas antitumorais atuantes, a proteína p53. Seu papel é, principalmente, eliminar células danificadas, ou pela promoção da morte celular por apoptose, ou pela retirada do potencial proliferativo destas células, através da indução de senescência (Figura 7). Uma única quebra em DNA dupla fita é capaz de induzir aumento mensurável de p53, que atua como fator transcricional (LEVINE, 1997). Por outro lado, a ligação da proteína HDM2 bloqueia a função de p53, pois direciona a ligação de uma molécula de ubiquitina a p53 e a exportação desta do núcleo para o citoplasma; a subsequente poliubiquitinação de p53 assegura sua rápida degradação em proteossomos citoplasmáticos. O antagonista da ação de HDM2 é a proteína ARF, codificada (assim como p16) pelo locus *INK4A/ARF*; esta se liga à HDM2 e inibe sua ação, aparentemente por meio do sequestro de HDM2 no nucléolo (CHENE, 2003). Além disso, o aumento da expressão de p21 também é mediado por p53 e esta indução, por sua vez, explica a ação citostática (em vez de pré-apoptótica) de p53 (STEWART e WEINBERG, 2006).

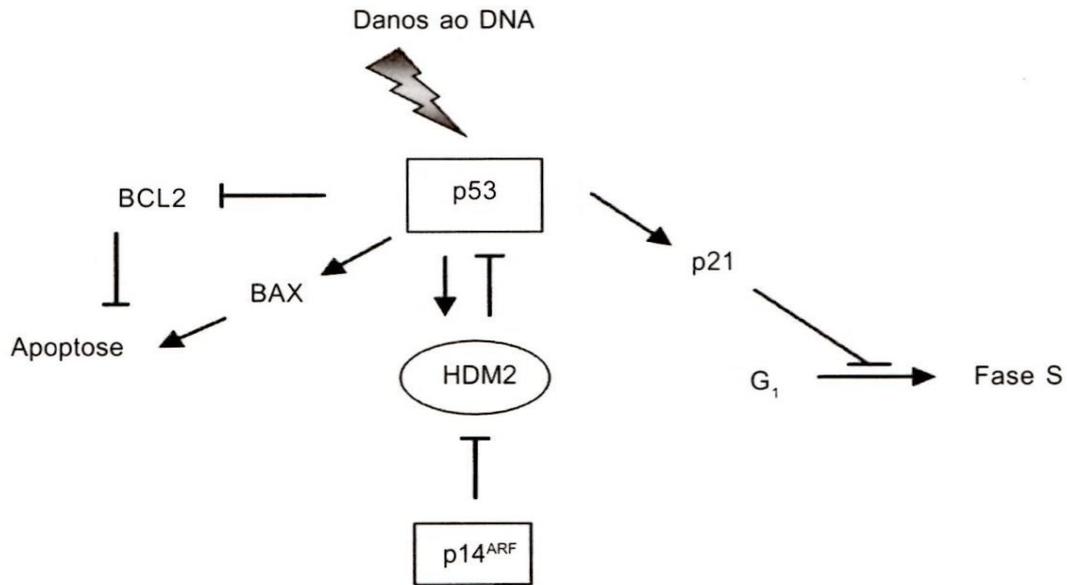


FIGURA 7– MECANISMO DE AÇÃO DE p53 EM RESPOSTA A DANOS AO DNA

FONTA: FERREIRA e ROCHA, 2004

NOTA: A proteína p53 é um regulador transcricional induzido em resposta a danos ao DNA e pode levar à parada do ciclo celular ou indução de apoptose em resposta à depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, oncoproteínas virais e oncogenes celulares ativadas. A proteína Bax é um membro da família Bcl2 de ação pró-apoptótica, ao passo que Bcl2 possui função antiapoptótica; ambas tem sua função regulada por p53 (HASTY e CHRISTY, 2013).

O trabalho de SATYANARAYANA *et al.*, (2004) propõe uma hipótese para o mecanismo de indução da senescência por estímulo clássico e estabelece uma ligação entre as vias de indução de senescência. Os autores demonstraram que para a célula entrar em senescência são necessários dois fatores: (1) sinalização para proliferação celular (ativação de ERK) e (2) sinalização induzida por um componente gerador de estresse (por exemplo, produção de espécies reativas de oxigênio – EROs). A combinação entre estes dois fatores levaria à indução de *INK4A/ARF* e também ao aumento dos níveis de p21.

A análise da expressão de p16, p14/ARF, p53 e p21, portanto, faz parte da determinação do fenótipo senescente. A parada de proliferação e a resistência à apoptose também são importantes características destas células. As alterações morfológicas, entretanto, são a maneira mais comum de examinar a ocorrência de senescência. De maneira geral, células senescentes apresentam aspecto achatado, com frequentes multinucleações. Além disso, a determinação do aumento da atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência, que confere coloração azul às células, é o marcador padrão para determinação visual da senescência celular (CAMPISI e DI FAGAGNA, 2007). É importante frisar que todos estes aspectos que

estão compreendidos no fenótipo senescente são compartilhados nos diferentes tipos de senescência: replicativa, induzida por oncogene e induzida por terapia.

A Figura 8 ilustra as principais características do fenótipo senescente e as vias de sinalização responsáveis por sua ocorrência nas células.

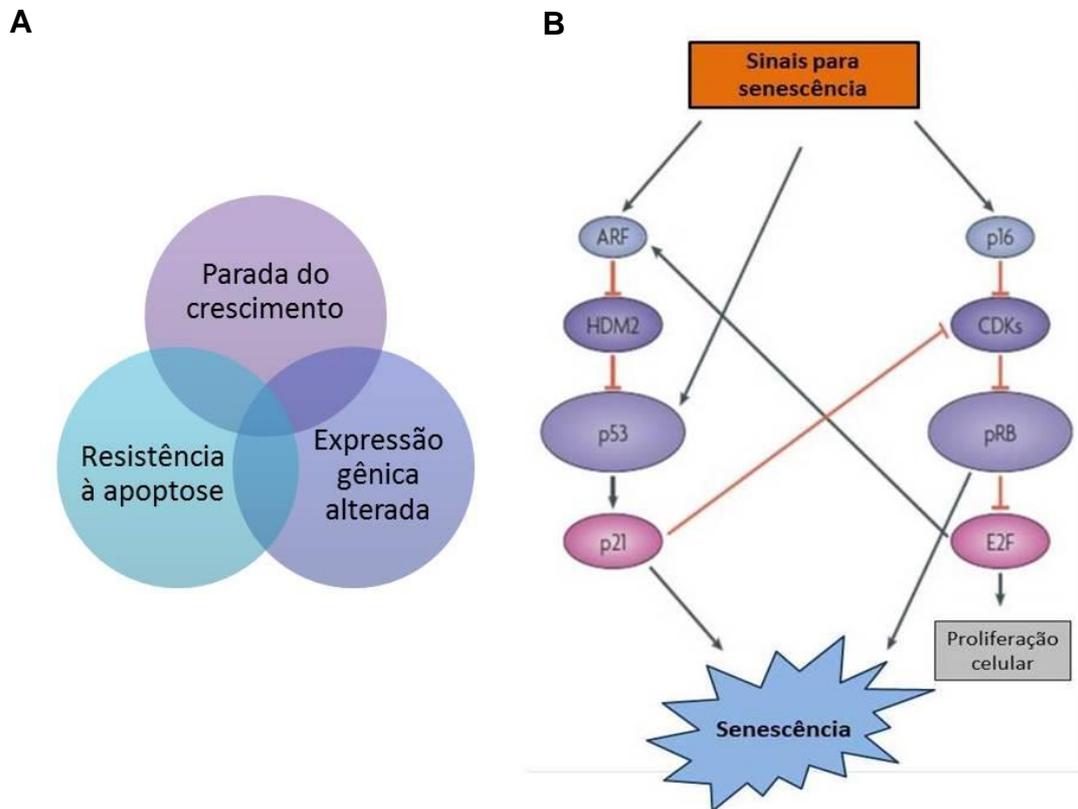


FIGURA 8 – FENÓTIPO SENESCENTE E VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS EM SENESCÊNCIA

FONTE: Adaptado de CAMPISI e DI FAGAGNA, 2007

NOTA: A – O fenótipo senescente corresponde a uma combinação de mudanças de comportamento, estrutura e funcionamento celulares que ocorre após o estabelecimento da senescência. B – Sinais indutores de senescência, tais como danos ao DNA e outros fatores de estresse podem ativar as vias de sinalização de p53 e pRb. A ação citostática de p53 se dá através da ativação de p21, ao passo que a de p16 se dá pela inibição da atividade do fator de transcrição E2F (CAMPISI e DI FAGAGNA, 2007).

### 2.3.3 Senescência replicativa (RS)

Este estado foi primeiramente descrito em um estudo de HAYFLICK e MOORHEAD (1961), em que os resultados indicavam que fibroblastos humanos normais paravam de proliferar após um número finito de etapas de cultivo destas células *in vitro*, porém permaneciam metabolicamente ativos, num processo denominado senescência replicativa.

A senescência replicativa está associada ao surgimento de síndromes e doenças relacionadas ao envelhecimento, e é causada principalmente – entre outros fatores – pelo encurtamento telomérico. Os telômeros consistem em elementos de DNA repetitivo nas extremidades dos cromossomos que protegem os finais do material genético contra degradação e recombinação. A maquinaria de replicação celular não é capaz de copiar o final de moléculas lineares, portanto, a cada ciclo de divisão celular os telômeros se tornam mais curtos, até alcançarem um tamanho crítico, que leva à instabilidade cromossômica. Em tecidos normais, esta instabilidade desencadeia a senescência celular, ou a apoptose, dependendo do tipo de célula envolvido e do contexto em que estas alterações acontecem (BLASCO, 2005).

Os telômeros podem ser alongados novamente pela ação da telomerase, uma ribonucleoproteína com atividade de transcriptase reversa, que utiliza uma molécula de RNA associada como molde para adição das repetições teloméricas (TTAGGG) ao fim dos telômeros. Os níveis de expressão e atividade desta enzima em tecidos adultos, porém, são reduzidos e não compensam a perda de tamanho que ocorre com os telômeros ao longo das divisões nas células. É interessante notar que a vasta maioria dos tipos de tumores humanos adquiriu mecanismos para manter os telômeros alongados, e que, geralmente estes mecanismos envolvem a expressão aumentada da telomerase (STEWART e WEINBERG, 2006). O encurtamento dos telômeros, entretanto, vem sendo relacionado, através de vários estudos em uma grande variedade de tecidos, com doenças relacionadas ao envelhecimento, como a colite ulcerativa, cirrose hepática, aterosclerose e anemia aplástica, por exemplo (O'SULLIVAN *et al.*, 2002; WIEMANN *et al.*, 2002; SAMANI *et al.*, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2005).

#### 2.3.4 Senescência induzida por oncogene (OIS)

Posteriormente, SERRANO *et al.*, (1997) estabeleceram que os níveis de p16<sup>INK4a</sup> acumulam-se progressivamente ao longo da proliferação de células em cultura transformadas por *RAS*, levando-as a parada permanente em G1. Este processo foi então denominado “senescência induzida por oncogene”, e mostrou que a inibição da progressão do ciclo celular através do locus *INK4a/ARF* possui uma função decisiva na senescência celular.

O processo de formação do *nevus* melanocítico é um exemplo da ocorrência de OIS (Figura 9). A atividade aumentada do oncogene BRAF nos melanócitos faz com que a proliferação destas células aumente. A subsequente parada de proliferação é resultante da ativação de p16, o que leva à formação de um *cluster* de células senescentes, que podem permanecer desta maneira por tempo indeterminado (MEYLE e GULDBERG, 2009). A ocorrência de senescência neste contexto é considerada um mecanismo de ação antitumoral, visto que impede a proliferação desenfreada dos melanócitos, gênese dos melanomas.

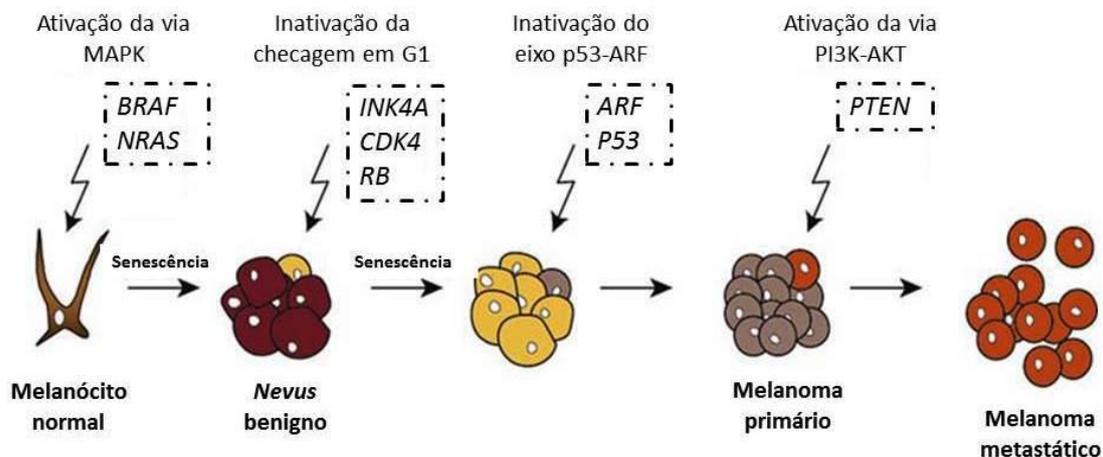


FIGURA 9 – FORMAÇÃO DO *NEVUS* MELANOCÍTICO: UM EXEMPLO DE SENESCÊNCIA NA PROGRESSÃO DO MELANOMA

FONTE: Adaptado de MEYLE e GULDBERG, 2009

NOTA: A senescência celular na formação do *nevus* melanocítico é considerada um mecanismo de proteção contra o câncer, pois impede a proliferação celular indiscriminada, e o processo é fisiologicamente relevante porque é induzido por oncogenes ativados em células somáticas normais. As células tumorais ultrapassam a senescência através da inativação de suas vias de indução chave, como p16 e p53 (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

Níveis aumentados de p16 também são evidenciados em tecidos como a pele e os rins de indivíduos mais velhos (RESSLER *et al.*, 2006; CHKHOTUA *et al.*, 2003), e em modelo animal de envelhecimento, sendo que em modelo animal observa-se ainda o aumento concomitante de ARF (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2004). Ainda não é possível, entretanto, saber se os sinais que servem para prevenir a formação de uma neoplasia através de p16 são os mesmos sinais que promovem o envelhecimento.

### 2.3.5 Senescência induzida por terapia (TIS)

À indução de senescência em células tumorais através do uso de compostos químicos diversos convencionou-se chamar de “senescência terapia-induzida” (TIS). Neste contexto, os estudos foram iniciados com o uso de quimioterápicos conhecidos, tais como a doxorrubicina e a cisplatina. Verificou-se que estes compostos são capazes de induzir senescência em diferentes linhagens celulares, com destaque para o uso de concentrações menores do que as necessárias para induzir apoptose (CHANG *et al.*, 1999; ELMORE *et al.*, 2002). Recentemente, vários outros fármacos vem sendo testados para este fim. ZHU *et al.*, (2013b) demonstraram que o uso do sunitinib (um inibidor de receptores tirosina-quinases) é capaz de induzir senescência em modelo de carcinoma de células renais, e que esta indução é dependente da ativação de p53 tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A ativação de p53 – com consequente acúmulo de p21 – é o mecanismo pelo qual a temozolomida (agente alquilante de DNA) induz senescência em células de melanoma (MHAIDAT *et al.*, 2007).

Outros exemplos interessantes de indutores de TIS são o fator de crescimento semelhante a insulina do tipo I (IGF-I) e o glicosídeo A do extrato da planta condurango (CGA). O IGF-I está relacionado com o crescimento e proliferação celulares e o envelhecimento e induz senescência em culturas primárias humanas e de camundongos via ativação de p53/p21, possivelmente em resposta a danos ao DNA induzidos por EROs (HANDAYANINGSIH *et al.*, 2012). O extrato de condurango é utilizado para vários fins em medicina popular, porém seus efeitos antitumorais não haviam sido validados. Este extrato contém vários gangliosídeos, e foi demonstrado que o CGA é capaz de induzir senescência e apoptose em células HeLa, também relacionada ao aumento dos níveis de EROs e à ativação de p53 (BISHAYEE *et al.*, 2013). O aumento de p21 via p53 também é o mecanismo de indução de senescência pelo metotrexato (reduzidor de folatos) em células de adenocarcinoma colorretal (DABROWSKA *et al.*, 2009).

Em células de câncer de próstata, o tratamento com lovastatina (0,3 $\mu$ mol/L, durante cinco dias) foi capaz de induzir senescência e parada de proliferação em G1 (LEE *et al.*, 2006). A ocorrência de senescência, neste caso, foi relacionada com o defeito da translocação de RhoA para a membrana celular. Este constitui o primeiro exemplo de uso de estatinas como indutores de senescência. Além disso, evidências indicam que o uso de doses terapêuticas (100nm/L) de sinvastatina induz

senescência em cultura primária de células epiteliais prostáticas, o que estaria relacionado ao aumento da expressão de p21 e p27 (MURTOLA *et al.*, 2011).

Além de melhor detalhar os mecanismos pelos quais o fenótipo senescente se estabelece, estes estudos visam avaliar a possibilidade de aplicação clínica da TIS. Algumas vantagens, tais como (1) parada de crescimento persistente, na qual as células permanecem estáveis, (2) indução da resposta imune, aumentando a susceptibilidade às células NK e (3) uso de doses menores dos agentes terapêuticos, limitando possíveis efeitos tóxicos, tornam a TIS uma abordagem promissora como terapia adjuvante no tratamento de tumores (ZHANG e YANG, 2011).

## 2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO: FORMAÇÃO E PAPEL EM PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas constantemente em nosso organismo e removidas pelas defesas antioxidantes, num estado denominado “equilíbrio redox”. Algumas EROs são radicais livres, que são espécies que contêm um ou mais elétrons não pareados. A maioria das moléculas biológicas é não-radical, contendo somente elétrons pareados; os elétrons não-pareados das espécies radicais conferem a estas uma alta reatividade. Uma característica das reações envolvendo radicais livres com não-radicais é que estas tendem a ocorrer como reações em cadeia, em que um radical gera outro, o que geralmente leva a efeitos danosos (HALLIWELL, 1991).

O “estresse oxidativo” ocorre quando há uma superprodução de EROs e/ou função deficiente de antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos. O excesso de EROs pode danificar lipídeos celulares, proteínas e DNA (VALKO *et al.*, 2007).

Como exemplos de espécies reativas de oxigênio temos o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ), hidroperoxila ( $HOO^{\cdot}$ ) e alcoxila ( $LO^{\cdot}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1\Delta_g O_2$ ;  $^1O_2$ ), ozônio ( $O_3$ ) e ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (VALKO *et al.*, 2004).

A adição de um elétron ao  $O_2$  forma o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (MILLER *et al.*, 1990) e sua produção ocorre principalmente nas mitocôndrias, durante o processo de transdução de energia, através de um “vazamento” prematuro destes elétrons dos complexos I e III para o oxigênio (CADENAS e DAVIES, 2000). Este radical

também pode ser produzido por células fagocíticas, no *burst* respiratório, para auxiliar na destruição de patógenos (DECOURSEY e LIGETI, 2005).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma espécie reativa não-radicalar, mas de importante papel biológico. Pode ser formado nos peroxissomos, em condições fisiológicas, e, se liberado no citoplasma, contribui de forma significativa com o estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2004). Muitos dos efeitos oxidantes do  $\text{H}_2\text{O}_2$  são causados pela interação com metais de transição, principalmente  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ , produzindo  $\cdot\text{OH}$  pela reação de Fenton:

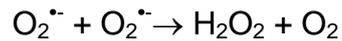


O radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) possui alta reatividade e uma meia-vida muito curta (cerca de  $10^{-9}$ s), reagindo, portanto no próprio local de formação (LIOCHEV e FRIDOVICH, 1994). Dentre os radicais peroxila, o mais simples dos radicais é o radical hidroperoxila ( $\text{HOO}\cdot$ ), que corresponde à forma protonada do  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Foi demonstrado por AIKENS e DIX (1991) que este radical é o iniciador da peroxidação dos ácidos graxos.

#### 2.4.1 Defesas antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que impede, previne ou reverte o dano oxidativo. Uma reação de sequestro (*scavenging*) de radical é protetora somente se o produto é menos reativo ou danoso que a espécie inicial. Entretanto, este não é sempre o caso de reações envolvendo radicais, pois a inativação de um radical pode levar à formação de outro (WINTERBOURN, 2008). Entre os compostos antioxidantes de baixo peso molecular, os mais conhecidos são a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) e a vitamina C (ácido ascórbico), sendo que o primeiro é um antioxidante relacionado à ação em membranas (prevenindo assim a propagação da peroxidação lipídica) e o último é um antioxidante de fase aquosa e está presente no plasma (HALLIWELL, 1991; DAVIES, 2000).

Em resposta ao estresse oxidativo, ocorre a indução da expressão de enzimas antioxidantes. Entre os principais sistemas antioxidantes conhecidos estão as superóxido dismutases (SODs), que catalisam a reação de dismutação do ânion superóxido:



Todos os membros da família das SOD utilizam metais de transição em seus sítios ativos; células animais possuem formas distintas de SOD citoplasmáticas e extracelulares (CuZn-SOD), e a Mn-SOD mitocondrial (revisado por FRIDOVICH, 1995). O produto da reação ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) também é tóxico e necessita ser rapidamente removido, o que é realizado por duas enzimas – glutathiona peroxidase e catalase – que reduzem o  $\text{H}_2\text{O}_2$  à água e oxigênio. A glutathiona peroxidase (GPx) utiliza o poder redutor da glutathiona (GSH) para detoxificar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  citoplasmático, numa reação em que duas moléculas de GSH são oxidadas para formar o composto dissulfeto GSSG. A enzima complementar glutathiona redutase (GRed) utiliza NADPH para reduzir o GSSG a duas moléculas de GSH. Por outro lado, a maior parte da catalase presente em células animais está presente nos peroxissomos, onde possui a função de remover o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos (HALLIWELL, 2007).

As peroxirredoxinas são enzimas que reduzem hidroperóxidos através do uso de elétrons fornecidos por tióis fisiológicos, visto que possuem pelo menos um resíduo de cisteína conservado que sofre um ciclo de oxidação peróxido-dependente e consequente redução tiol-dependente durante a catálise. As peroxirredoxinas protegem componentes celulares removendo as baixas quantidades de peróxidos produzidas como resultado do metabolismo celular normal (RHEE *et al.*, 2005). A representação das vias de formação de EROs e da ação dos principais sistemas antioxidantes enzimáticos está exemplificada na Figura 10.

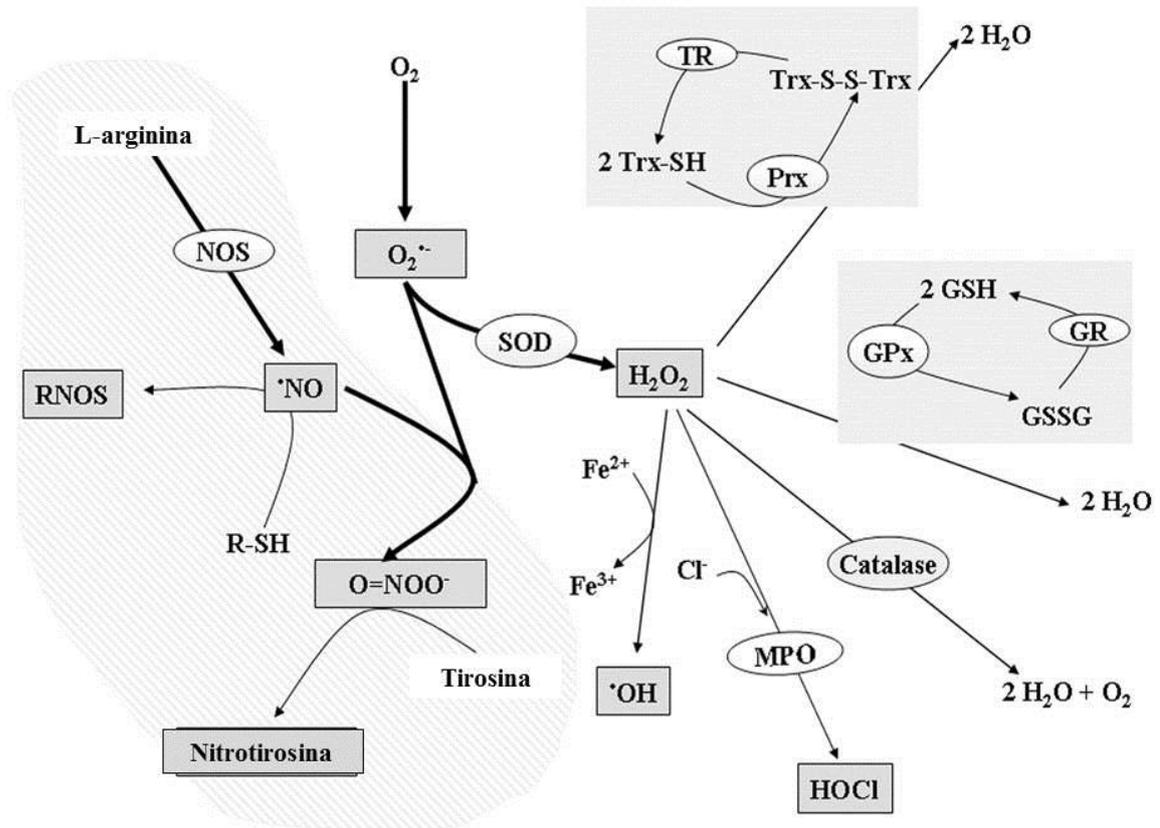


FIGURA 10 – VIAS DE FORMAÇÃO DE EROs E PAPEL DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES NO ESTRESSE OXIDATIVO

FONTE: ZHAO *et al.*, 2007

NOTA: GPx (Glutathione Peroxidase), GR (Glutathione Redutase), SOD (Superóxido Dismutase), Prx (Peroxirredoxina), TR (Tiorredoxina Redutase), MPO (Mieloperoxidase), NOS (Óxido Nítrico Sintase).

## 2.5 EROs COMO MEDIADORES DE SENESCÊNCIA CELULAR

A relação entre oxidantes intracelulares e o programa de senescência foi reforçada pela observação de que o tratamento de fibroblastos normais com  $H_2O_2$  pode induzir à rápida entrada destas células em senescência. De maneira notável, a concentração de  $H_2O_2$  parece influenciar o destino destas células, pois altas concentrações de EROs parecem iniciar a apoptose, enquanto baixas concentrações favorecem a senescência (CHEN *et al.*, 1998). Estes autores também destacam que baixas concentrações de  $H_2O_2$  induzem o aumento dos níveis de p53 e o conseqüente aumento de p21, levando à parada de proliferação em G1.

Como vimos anteriormente, a senescência pode ser mediada pela ativação de oncogenes, como *RAS*. A expressão de *RAS* em fibroblastos resultou em um aumento dos níveis de  $H_2O_2$  intracelular, ao passo que o tratamento destas células com *N*-acetilcisteína (NAC) ou a diminuição do oxigênio ambiente foi suficiente para

bloquear a indução da expressão de p53/p21, e resgatar estas células da senescência RAS-induzida (LEE *et al.*, 1999). Os resultados deste trabalho sugerem que EROs podem estar agindo em resposta a RAS na indução de senescência, porém pouco se sabe sobre os intermediários que estão envolvidos entre RAS e p53 (COLAVITTI e FINKEL, 2005). Os estudos de WU *et al.*, (2004) estabeleceram, de maneira elegante, que a seladina-1 (3 $\beta$ -hidroxiesterol  $\Delta^{24}$ -redutase – uma oxidoredutase dependente de FAD) é um destes intermediários. Os autores descobriram esta conexão realizando um *screening* de supressão genética em fibroblastos embrionários de camundongo, com o objetivo de encontrar genes que, quando suprimidos, permitissem o escape destas células da senescência induzida por RAS, e estabeleceram que, após estresse oncogênico ou oxidativo, a seladina-1 se liga à porção C-terminal de p53, deslocando HDM2 e permitindo assim o acúmulo de p53; não foram observadas mudanças no perfil de acúmulo de p16<sup>INK4a</sup>.

Outra via de indução de senescência relacionada a EROs envolve a expressão constitutiva de AKT. A ativação desta quinase inibe o fator de transcrição Foxo3a e isto culmina na diminuição das defesas antioxidantes (Mn-SOD) e aumento de EROs, que, por sua vez, resulta na maior atividade de p53/p21 (MIYAUCHI *et al.*, 2004).

De considerável importância na relação estresse oxidativo/senescência é a função da família de proteínas p38<sup>MAPK</sup>. Estas proteínas são quinases ativadas por mitógenos, que fazem a ligação entre sinais extracelulares e a maquinaria intracelular, regulando processos como inflamação, progressão do ciclo celular, diferenciação e morte celular (COULTHARD *et al.*, 2009). KURATA (2000) demonstrou que baixas doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziam a parada de proliferação de células linfóides (com ausência de apoptose) e que esta parada possui relação com a ativação de p38, estabelecendo a primeira relação entre p38, estresse oxidativo e senescência celular. Evidências indicam que a ativação de p38 em fibroblastos normais pode ocorrer de forma dependente ou independente do encurtamento telomérico e que persiste mesmo após a retirada do estímulo indutor da senescência, o que tornaria p38 um fator comum na senescência induzida por diferentes estímulos (IWASA *et al.*, 2003). Ainda, os autores observaram que a indução de p38 é acompanhada pelo aumento da expressão de p16 e expressão de pRb, porém não há ativação de p53.

Por outro lado, foi evidenciado que p38 está ativada durante a senescência induzida por p53 em células de câncer de bexiga (JUNG *et al.*, 2004), e que o uso da vitamina C foi capaz de inibir a senescência nestas mesmas células, prevenindo o acúmulo de EROs e a ativação de p38 (KIM *et al.*, 2008). Além disso, em fibroblastos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a presença de p38 é capaz de induzir a expressão das SODs e da catalase, o que levaria à maior sobrevivência destas células, quando comparadas a células em que esta proteína está silenciada (GUTIERREZ-UZQUIZA *et al.*, 2012). Recentemente, demonstrou-se que a peroxirredoxina-1 é capaz de regular a função de p38 na sinalização para senescência, através da modulação da atividade das fosfatases que desfosforilam e inativam p38. O aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medeia a inativação destas fosfatases, porém em altas doses de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a peroxirredoxina as protege contra inativação, o que previne a ocorrência de senescência via p38 em células MCF-7 (linhagem de câncer de mama) (TURNER-IVEY *et al.*, 2013).

Uma demonstração dos mecanismos pelos quais p38 pode exercer função citostática está representada na Figura 11. Como se pode observar, a regulação da progressão G1-S do ciclo celular via p38 está relacionada à ativação e estabilização de p53, sendo a estabilização mediada via p14/ARF. Esta ativação resulta no aumento da expressão de p21. Além disso, p38 pode causar a diminuição dos níveis de ciclina D1, através de inibição direta em nível transcricional, pela ação da proteína HBP1 (repressor da transcrição) ou pela fosforilação de ciclina D1 – sendo a consequência a ubiquitinação e degradação da proteína. Além disso, p38 é capaz de promover a degradação de Cdc25A (fosfatase que ativa CDK4 e CDK2) e ao acúmulo de p16. Todas estas ações levam à parada da progressão do ciclo celular em G1-S (revisado por THORNTON e RINCON, 2009).

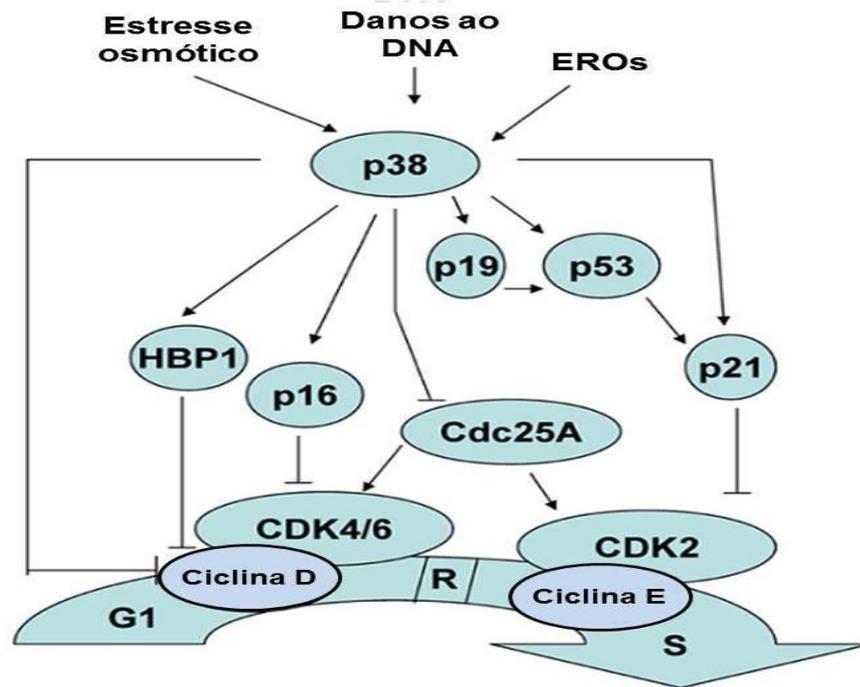


FIGURA 11 – p38 NA REGULAÇÃO DA PROGRESSÃO G1-S

FONTE: THORNTON e RINCON, 2009

NOTA: p38 promove a parada em G1-S através da inibição da ativação de CDK4/6, pelo aumento da expressão gênica de p19 (p14, em humanos) – o que culmina em aumento de p53 – e pela ativação direta de p53, entre outros mecanismos.

## 2.6 EROs E MELANOMAGÊNESE

Espécies reativas de oxigênio podem atuar como moléculas transdutoras de sinais em vias reguladoras do crescimento celular (como por exemplo, MAPK e PI3K), e também assim serem instrumentos do processo de carcinogênese (VALKO *et al.*, 2006).

A transformação dos melanócitos, por exemplo, está associada a alterações estruturais dos melanosossomos. Além de produzirem a melanina, e assim conferirem proteção a estas células, os melanosossomos também protegem a célula realizando o sequestro de radicais livres gerados pela luz solar e pelo metabolismo celular. No melanoma, esta situação se inverte, e os melanosossomos passam a produzir espécies reativas, como o  $H_2O_2$  (FRUEHAUF e TRAPP, 2008).

Como mencionado anteriormente, os névos melanocíticos são compostos por melanócitos em estado de senescência induzida por oncogene. LEIKAM *et al.*, (2008) demonstraram que a geração de melanócitos com fenótipo senescente é dependente da presença de EROs produzidas exclusivamente em células com uma grande quantidade de receptores tirosina-quinases (RTK) ativos.

No melanoma, EROs são geradas em todos os estágios de progressão, através de diversos mecanismos e situações como o próprio metabolismo celular, a resposta imune contra o tumor e a síntese de melanina, por exemplo. Os efeitos pleiotrópicos destas espécies reativas quando “tamponadas” adequadamente (como a modulação de cascatas de sinalização celular, a ativação de fatores de transcrição e a difusão de EROs para a matriz extracelular) resultam em uma série de respostas celulares que podem contribuir para a progressão do melanoma – e não para o direcionamento da apoptose ou parada de proliferação. Ainda, o melanoma é um tumor resistente às terapias que objetivam alcançar a apoptose por hipóxia, diferentemente do carcinoma de células escamosas, por exemplo, que se desenvolve no mesmo ambiente hipóxico e exposto à radiação UV, mas que não apresenta esta resistência. Sendo a síntese de melanina a principal fonte de EROs nestas células, acredita-se que estas desenvolveram sistemas antioxidantes mais apurados, que podem proporcionar a estas células o escape do estresse oxidativo (revisado por WITTGEN e VAN KEMPEN, 2007). A Tabela 1 demonstra de maneira bastante simplificada a expressão de antioxidantes em cânceres de pele, em relação à pele normal.

TABELA 1 – EXPRESSÃO DE ANTIOXIDANTES EM CÂNCERES DE PELE, COMPARADOS À PELE NORMAL

Tipo de tumor	Catalase	Mn-SOD	Cu, Zn-SOD	GSH/GSSG
Melanoma	+	+	+	++
SCC	●	●	●	●
BCC	-	●	●	+

NOTA: BCC: Carcinoma de células basais; SCC: Carcinoma de células escamosas; +, expressão aumentada se comparada à da pele normal; ●, expressão equivalente à da pele normal; -, expressão diminuída comparada à pele normal.

FONTE: SANDER *et al.*, 2004

Tendo em vista a produção de EROs nos melanomas e demais tumores, três abordagens terapêuticas podem ser hipotetizadas. A primeira diz respeito à diminuição dos níveis de EROs nas células, rompendo os processos de sinalização promovidos por estas moléculas (FRUEHAUF e MEYSKENS, 2007). Entretanto, os dados a respeito desta abordagem não são animadores, pois o uso de antioxidantes, como a NAC, adjuvantes à quimioterapia, pode proteger as células tumorais contra os efeitos dos medicamentos e da radioterapia (LAWENDA *et al.*, 2008). A segunda

abordagem é uma alternativa à primeira, e consiste em tirar proveito da natureza tóxica das espécies reativas formadas no melanoma, permitindo que estas se acumulem a níveis extremos, forçando a parada de proliferação, ou apoptose (FRUEHAUF e MEYSKENS, 2007). A terceira abordagem diz respeito ao uso de terapias adjuvantes para inibir os sistemas antioxidantes, o que pode ser eficiente, no caso dos melanomas. Nesse contexto, pode-se citar o uso do dissulfiran (DSF) e do 2-metoxiestradiol (2-ME<sub>2</sub>); o primeiro afeta a capacidade redutora da glutathiona e induz apoptose, e o segundo é um inibidor da atividade da SOD capaz de promover parada de proliferação de células de melanoma (CEN *et al.*, 2002; DOBOS *et al.*, 2004).

Como vimos, as estatinas possuem atividade antitumoral em diversos modelos celulares. Entretanto, poucos estudos relacionam a ação antitumoral das estatinas com o aumento dos níveis intracelulares de EROs. Em células HepG2, a diminuição de coenzima Q (CoQ) causada pela administração de altas doses de sinvastatina foi associada à morte celular, ao aumento de danos oxidativos ao DNA e à diminuição da síntese de ATP, efeito revertido pela suplementação de CoQ (TAVINTHARAN *et al.*, 2007). Este estudo fornece a primeira evidência de que a sinvastatina pode exercer efeito em células tumorais a partir da indução de danos oxidativos.

O estudo de SANCHEZ *et al.*, (2008) avaliando a morte de células de câncer de mama induzida por sinvastatina corrobora esta hipótese. Nele, verificou-se que o tratamento da linhagem MCF-7 com diversas estatinas (inclusive a sinvastatina) foi capaz de aumentar a produção de EROs, o que foi diretamente relacionado à diminuição da síntese de DNA, à parada nas fases G1 e G2-M do ciclo celular e à morte por apoptose e necrose. Além disso, o tratamento com *N*-acetilcisteína (NAC) inibiu o efeito das estatinas sobre a morte das células, o que sugere que a ação citotóxica das estatinas em células de câncer de mama seja mediada pelo estresse oxidativo. A sinvastatina também foi capaz de induzir a morte celular por apoptose em células de câncer de cólon, e a apoptose foi acompanhada pelo aumento dos níveis intracelulares de EROs e da glutathiona oxidada (GSSG) e estes efeitos foram revertidos pela adição de NAC e glutathiona reduzida (GSH) (QI *et al.*, 2010). Também neste trabalho foi evidenciado que a adição de SOD e catalase em conjunto foi capaz de reduzir a citotoxicidade e suprimir o aumento dos níveis de EROs induzido por sinvastatina (5µmol/L, 24h).

### 3 JUSTIFICATIVA

O melanoma é um tumor altamente agressivo e resistente às terapias convencionais, especialmente quando se encontra em condições de metástase, o que torna necessária a busca de novas alternativas para o tratamento deste tumor. Atualmente, a busca por compostos antitumorais baseia-se na possibilidade de ação sobre moléculas que participem de vias importantes para o estabelecimento e progressão do tumor. Além disso, compostos com possível ação citostática e indutora de morte celular também emergem como alternativas, quer para uso como quimioterápicos, ou como adjuvantes.

A ação antitumoral das estatinas vem sendo amplamente estudada, bem como o respectivo mecanismo de ação. Os efeitos de inibição da proliferação celular e de indução de morte celular por apoptose são evidenciados para diversas linhagens tumorais, e seus possíveis reflexos na quimioprevenção e na redução de mortalidade por tumores é assunto de diversos estudos clínicos. A ação citostática da sinvastatina é de especial interesse para nosso trabalho, visto que procuramos relacioná-la à ocorrência de senescência celular.

As vias gerais de indução de senescência são conhecidas, e recentemente, o uso de fármacos e quimioterápicos para a indução deste processo em células tumorais tem se mostrado uma estratégia promissora no desenvolvimento de abordagens alternativas para a quimioterapia. Além disso, a possível relação entre a ocorrência da senescência celular com o estresse oxidativo também vem sendo sugerida, e evidências indicam que as estatinas podem exercer efeitos pró-oxidantes em células tumorais.

Tendo em vista: 1) a necessidade do desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o melanoma; 2) a ação antitumoral das estatinas; 3) a necessidade de definir os mecanismos de ação antitumoral das estatinas e, 4) o crescente interesse na indução da senescência celular através do uso de fármacos, este trabalho objetiva avaliar a ação da sinvastatina como indutor de senescência celular em células de melanoma humano metastático. Para este fim, foram analisados diversos parâmetros que definem o já conhecido fenótipo senescente e procurou-se estabelecer um mecanismo de indução da senescência. Também procuramos avaliar a ocorrência de morte celular, buscando relacionar se a ocorrência de senescência e apoptose pode se tratar de um efeito diferenciado entre as concentrações de sinvastatina utilizadas. Por fim, a possível relação entre a

ocorrência de senescência e morte celular com o estresse oxidativo foi avaliada, primeiramente, pela caracterização da resposta de células tratadas somente com simvastatina e, posteriormente, pela adição concomitante de compostos que alteram o balanço oxidativo celular.

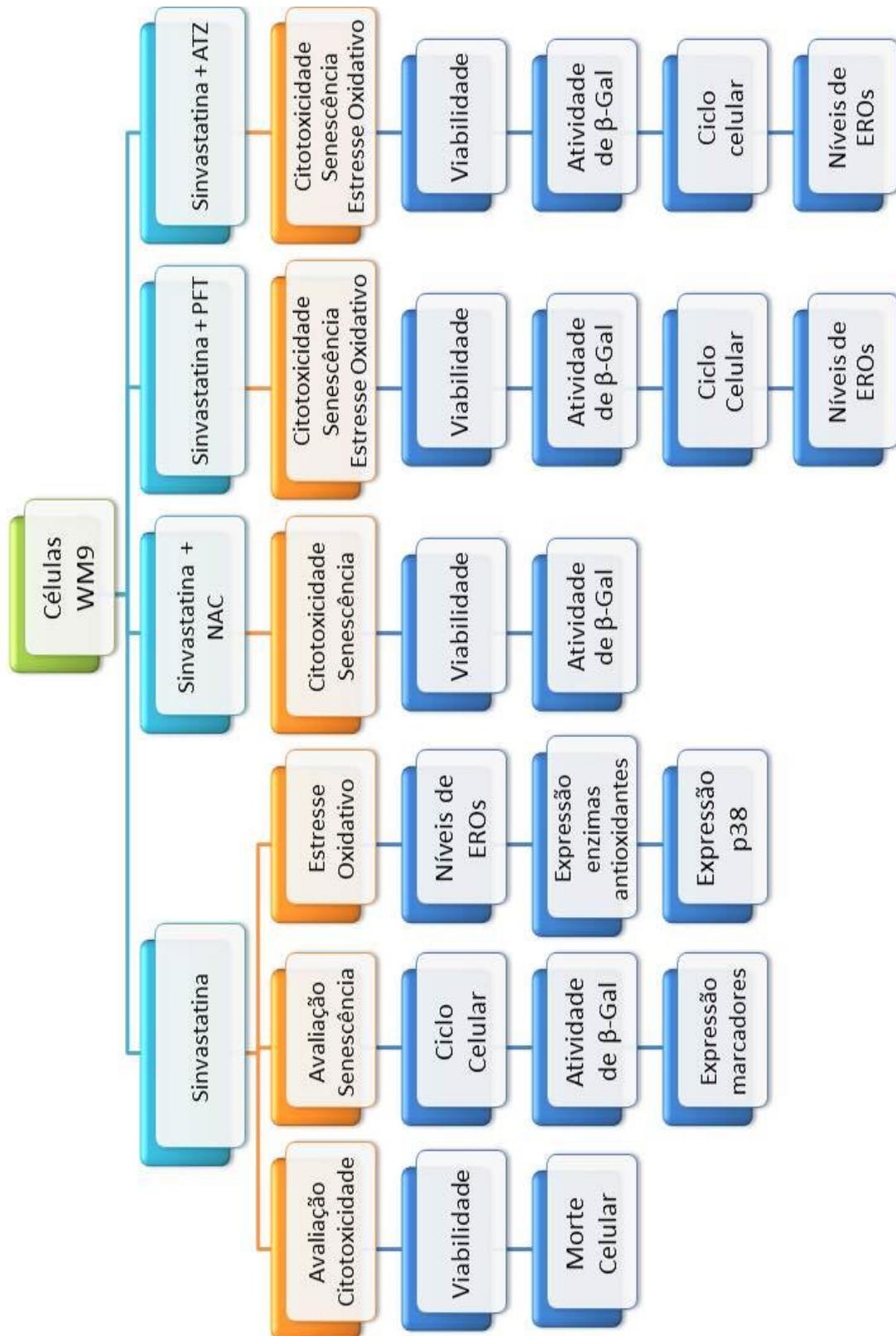
## 4 OBJETIVOS

Considerando que a sinvastatina é capaz de induzir parada de proliferação de células tumorais, e que este efeito pode ser um indício da ocorrência de senescência celular, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar a possível indução de senescência celular mediada por sinvastatina em células de melanoma humano metastático.

Objetivos específicos:

- Avaliar os efeitos do uso de menores concentrações de sinvastatina no estabelecimento do fenótipo senescente em células de melanoma humano metastático utilizando ensaios para avaliação da progressão do ciclo celular, atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência;
- Estabelecer o mecanismo de indução de senescência mediada por sinvastatina através do estudo dos níveis de RNAm e proteína dos marcadores responsáveis pelo estabelecimento deste processo;
- Avaliar a ocorrência de morte celular em células tratadas com menores concentrações de sinvastatina, através de ensaios para determinação de viabilidade e morte celular;
- Relacionar a indução de senescência e morte celular induzidas por sinvastatina a um possível desequilíbrio redox causado pelo uso deste fármaco, analisando níveis de EROs intracelulares, a expressão de enzimas antioxidantes e da proteína p38<sup>MAPK</sup>;
- Analisar o efeito da adição de compostos que interfiram na indução de senescência ou nos níveis de EROs intracelulares induzido pela sinvastatina em células de melanoma humano, através da análise da progressão do ciclo celular, atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência, níveis de EROs intracelulares e viabilidade celular.

## 5 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL



## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 PROCEDIMENTOS EM CULTIVO CELULAR

#### 6.1.1 Esterilização e manejo de materiais e células

Todos os materiais e vidrarias utilizados para os procedimentos de cultivo de células (frascos para soluções e meio de cultura, equipamento para filtração de soluções, tampas, ponteiras plásticas para pipetas automáticas e pipetas de vidro) foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante 30 minutos e sob pressão de 1atm. Após a esterilização, foi realizada a secagem do material em estufa a 50°C.

O manejo das culturas de células para experimentação foi realizado em condições de esterilidade, no interior de capela de fluxo laminar.

#### 6.1.2 Soluções, meios de cultura e materiais

##### 6.1.2.1 Soluções

A solução salina fosfato tamponada (PBS) utilizada para lavagem das células em cultura foi preparada como uma solução estoque concentrada cinco vezes (NaCl 680mmol/L, KCl 13,4mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 40,5mmol/L), e diluída para uso posterior. Esta solução tem seu pH ajustado para 7,4, sendo esterilizada em autoclave nas condições anteriormente mencionadas e armazenada em temperatura ambiente.

Células aderentes foram soltas de seu substrato utilizando-se solução de tripsina-EDTA (NaCl 137mmol/L, KCl 54mmol/L, glucose 5mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 2,3mmol/L, EDTA 0,53mmol/L e 50mg/% de tripsina, pH 7,4). Esta solução é esterilizada por filtração em membrana estéril com poro de 0,22µm (Millipore) sob pressão em aparato Sartorius, em capela de fluxo laminar e armazenada a -20°C.

A solução estoque de sinvastatina (Zocor<sup>®</sup>), droga gentilmente cedida pelo Merck, Sharp & Dohme Laboratórios, encontra-se na concentração de 0,1M diluída em etanol e armazenada a -80°C. Para os experimentos com células utilizamos concentrações variando entre 0,05 a 5µmol/L de sinvastatina também diluídas em etanol. Como controle foram utilizadas as condições: células na presença somente de meio de cultura e células na presença de meio de cultura e 0,025% de etanol (veículo da droga; volume equivalente ao utilizado no tratamento com 0,25µmol/L de sinvastatina).

O antioxidante *N*-acetilcisteína (Sigma-Aldrich) foi diluído em água ultrapura para obter a solução estoque a 0,1M, e esta foi filtrada manualmente em filtro de

poro de 0,22 $\mu$ m e armazenada a 4°C. Para o pré-tratamento das células, a concentração utilizada foi de 2,5mmol/L de NAC.

O inibidor de catalase 3-amino-1,2,4-triazole (ATZ, Santa Cruz Biotechnology) foi diluído em água ultrapura para obter a solução estoque a 1M, esterilizada por filtração manual em filtro de poro de 0,22 $\mu$ m e armazenada a 4°C. Para o cotratamento das células, a concentração utilizada foi de 20mmol/L, como estabelecido por KARG *et al.*, (1993) para linhagem celular de melanoma IGR-1.

O inibidor da proteína p53 pifitrina- $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma-Aldrich) previamente esterilizado por filtração manual para obtenção da solução estoque a 10mmol/L, e armazenado a -20°C. Para o pré-tratamento das células, a concentração utilizada foi de 10 $\mu$ mol/L, como utilizado por MHAIDAT *et al.*, (2007) em linhagens de melanoma humano.

A sonda fluorescente DCFH-DA (Sigma-Aldrich) foi diluída em DMSO para obter a solução estoque a 2mmol/L e esterilizada por filtração manual, como mencionado. Esta solução foi armazenada a -20°C, protegida da luz. Para o cotratamento das células, a concentração utilizada foi de 5 $\mu$ mol/L.

Os anticorpos primários utilizados para ensaio de *Western Blotting* foram: anti-fosfo p53, anti-p53, anti-p21, anti-p16, anti-fosfo p38, anti-p38 e anti-GAPDH. Como anticorpos secundários foram utilizados: anticorpo policlonal de origem caprina anti-IgG de coelho HRP-ligado e anticorpo policlonal de origem equina anti-IgG de camundongo HRP-ligado. Estes anticorpos foram armazenados de acordo com as instruções de cada fabricante e as condições utilizadas para os ensaios estão detalhadas na Tabela 3.

#### 6.1.2.2 Meio de cultura, linhagens celulares e condições de cultivo

O meio de cultura utilizado foi o meio Tu, composto de 80% do volume final de meio MCDB153 (Sigma-Aldrich) e 20% do meio L15 de Leibovitz (Sigma-Aldrich). Estes dois meios são preparados separadamente, esterilizados por meio de filtração em membrana de 0,22 $\mu$ m em aparato Sartorius e misturados posteriormente. O meio Tu foi suplementado com 2mmol/L de CaCl<sub>2</sub>, 5 $\mu$ g/mL de insulina humana (Humulin-R, Lilly France S.A.S), 2% de soro fetal bovino (SFB – Gibco) e 50 $\mu$ g/mL do antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich).

As linhagens celulares estudadas (WM9 e WM35) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Meenhard Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia – EUA). A linhagem WM9

trata-se de uma linhagem de melanoma humano metastático e possui entre suas características: potencial de formar colônias em ágar, cópia extra do cromossomo 7 e deleção do braço longo do cromossomo 6, apresentando mutação em *BRAF* (V600E). A linhagem WM35 trata-se de uma linhagem de melanoma humano de crescimento radial (RGP), e também apresenta mutação de *BRAF* (V600E). Mais informações sobre estas linhagens celulares podem ser encontradas em: <http://www.wistar.org/lab/meenhard-herlyn-dvm-dsc/page/melanoma-cell-lines-0>

*In vitro*, as células WM9 e WM35 desenvolvem-se como culturas aderentes cultivadas em garrafas de poliestireno estéreis (Techno Plastic Products – TPP). Estas culturas foram mantidas em incubadora sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. A subcultura foi realizada de acordo com a confluência das células, utilizando-se a solução de tripsina-EDTA para desprendê-las do substrato plástico. As trocas de meio, quando necessárias, foram realizadas em intervalos de 48-72h, através do acompanhamento da coloração do indicador de pH do meio de cultura. Para o armazenamento das linhagens, as células, em geral numa quantidade de 10<sup>7</sup>/mL, foram suspensas em meio de cultura suplementado com 10% de DMSO e criopreservadas em nitrogênio líquido.

## 6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E MORTE CELULAR

### 6.2.1 Avaliação da viabilidade celular: método de cristal violeta

Para a análise da viabilidade celular após tratamento com sinvastatina, foram plaqueadas 5 x 10<sup>3</sup> células/poço em placas de 24 poços e estas placas foram deixadas em incubadora a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h para a adesão das células. Após este período, foi realizado o tratamento com sinvastatina, nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1 μmol/L. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os tempos de tratamento para a avaliação inicial foram de 72, 96, 120, 144 e 168h. Finalizado o tratamento, o meio de cultura contendo sinvastatina é retirado, as células foram lavadas com PBS, e posteriormente fixadas com metanol 100% durante 10 minutos.

Após este tempo, o metanol foi retirado e adicionou-se aos poços a solução de cristal violeta (cristal violeta 0,2% em etanol 2%) durante 3 minutos. O cristal violeta cora ácidos nucléicos das células aderidas e fixadas (KUENG *et al.*, 1989). O cristal violeta foi retirado e foram realizadas de duas a três lavagens com PBS para a remoção do excesso de corante. Após estas lavagens, foi realizada a eluição do

conteúdo aderido às placas com uma solução de citrato de sódio (citrato de sódio 0,05mol/L em etanol 50%) durante 10 minutos. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200, Tecan Systems, Inc.), utilizando filtro de 540nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (considerado como 100% de células viáveis).

Para os experimentos em que foi utilizado NAC, as células foram pré-incubadas com meio de cultura fresco contendo 2,5mmol/L deste composto durante 3 horas. Em seguida, o meio contendo NAC foi retirado, as células foram lavadas com PBS e receberam o meio contendo sinvastatina. Para os experimentos em que foi utilizada a pifitrina- $\alpha$ , as células foram pré-incubadas com meio de cultura fresco contendo 10 $\mu$ mol/L deste composto durante 2 horas. Em seguida, procedeu-se como mencionado para NAC. Para experimentos em que foi utilizado o ATZ, as células foram diretamente incubadas com meio de cultura contendo sinvastatina e 20mmol/L de ATZ. Finalizado o tempo de tratamento, em todos os casos procedeu-se a coloração com cristal violeta como descrito anteriormente.

#### 6.2.2 Avaliação morfológica: microscopia em contraste de fase

Para determinação da ocorrência de alterações morfológicas nas células após tratamento com sinvastatina, estas foram plaqueadas em placas de 24 poços e tratadas, nas mesmas condições descritas para o experimento de determinação de viabilidade celular. Após o tratamento, as células foram analisadas em microscópio de contraste de fase. Para este experimento utilizou-se microscópio Olympus CK2 (Olympus Optical Co.) e a captura das imagens foi realizada em câmera digital SONY Cybershot (Sony Corporation) em aumento de 200x. As micrografias obtidas e o aspecto das células submetidas aos tratamentos foram comparados ao aspecto morfológico considerado normal das células da condição controle.

#### 6.2.3 Avaliação da morte celular: marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo

Para determinar a ocorrência de morte celular após o tratamento com sinvastatina, as células WM9 foram marcadas com Anexina V e Iodeto de Propídeo. Para isto, foram plaqueadas 1 x 10<sup>5</sup> células/placa, em placas de 60mm de diâmetro e incubadas durante 24h para adesão. Após este tempo, as células foram tratadas com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina. Estes experimentos foram realizados em

duplicata. Após 72h de tratamento, as células foram coletadas. Para a coleta, o meio de cultura contendo o tratamento foi retirado, as placas foram lavadas com PBS e as células foram soltas com a solução de tripsina-EDTA e ressuspensas em meio de cultura fresco, para inativação da tripsina. Esta solução foi colocada em tubos de fundo cônico de 5mL e centrifugada a 2000rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células utilizado para marcação.

Para marcação com Anexina V-FITC, o *pellet* foi ressuspendido em 0,5mL de tampão de ligação (10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1,8 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4). Desta suspensão, 0,1mL foi incubada com 5µL de Anexina V-FITC (BD Biosciences) durante 15 minutos. Após este tempo, 0,4mL de tampão de ligação foi adicionado a cada amostra e a fluorescência foi medida em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (BD Biosciences) utilizando filtro FL1-H, e capturando 10000 eventos. A Anexina V é bastante utilizada para detecção da morte celular por apoptose. Seu uso se baseia no princípio de que em células apoptóticas ocorre a externalização da fosfatidilserina, um lipídeo de membrana, que em condições normais, estaria voltado para o folheto interno da membrana celular. Nestas condições, a Anexina V reconhece e se liga à fosfatidilserina, e seu fluoróforo conjugado emite fluorescência (VAN ENGELAND *et al.*, 1996). Como controle positivo da ocorrência de apoptose neste experimento utilizou-se a condição de células tratadas com 5µmol/L de sinvastatina.

Para a marcação com iodeto de propídeo (PI), o *pellet* de células foi incubado com uma solução de 50µg/mL de PI durante 15 minutos, sob proteção da luz. Após este período, a fluorescência foi medida em citômetro de fluxo, utilizando o filtro FLH-2. O PI é um agente que ao se intercalar ao DNA produz adutos fluorescentes, o que indica o rompimento das células e o extravasamento do seu conteúdo nuclear, que estaria possivelmente relacionado à ocorrência de necrose (KRISHAN, 1975). Como controle positivo para detecção de fluorescência do PI neste experimento utilizou-se a condição de células incubadas com uma solução de PI a que foi adicionado 0,1% de Triton X-100, detergente que permite a entrada do PI nas células.

As análises dos dados foram realizadas utilizando o *software* Cyflogic 1.2.1 (desenvolvido por Cyflo Ltd., e disponível em <http://www.cyflogic.com>).

### 6.3 AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA CELULAR

#### 6.3.1 Avaliação qualitativa por coloração com $\beta$ -galactosidase

Para análise qualitativa da ocorrência de senescência celular em células tratadas com sinvastatina foi utilizado o kit *Senescence  $\beta$ -galactosidase staining* (Cell Signaling Technology). Foram plaqueadas  $2,5 \times 10^4$  células por poço em placas de 6 poços e as células foram incubadas durante 24h para adesão. Após a adesão, foi adicionado às placas o meio contendo sinvastatina nas concentrações de 0,05 a  $1 \mu\text{mol/L}$ , e o tempo de tratamento utilizado foi de 72h. Após o tratamento, foi realizado o ensaio para a detecção da senescência celular, seguindo as recomendações do fabricante do kit utilizado. Para isto, o meio contendo os tratamentos foi removido e as placas foram lavadas com PBS. As células foram então fixadas com uma solução fixadora por cerca de 10-15 minutos em temperatura ambiente. Durante esta incubação, procedeu-se a preparação da solução de coloração contendo:  $930 \mu\text{L}$  da solução de coloração diluída,  $10 \mu\text{L}$  de solução corante complementar A,  $10 \mu\text{L}$  de solução corante complementar B e  $50 \mu\text{L/mL}$  de X-gal  $20\text{mg/mL}$  diluída em DMF (*N-N*-dimetilformamida) para cada amostra a ser corada.

Após a incubação para fixação, os poços foram lavados por duas vezes com PBS, e  $1\text{mL}$  da solução de coloração completa foi adicionada a cada poço. As placas foram incubadas *overnight* em incubadora a  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$ . Após este período, as células foram observadas em microscópio Olympus CK2 e a captura das imagens foi realizada em câmera digital SONY Cybershot (em aumento de  $200\times$ ). Deve-se verificar o desenvolvimento de coloração azul na região perinuclear das células consideradas senescentes. A atividade aumentada da  $\beta$ -galactosidase resulta, em parte, do aumento da massa lisossomal em células senescentes, o que permite a detecção da atividade da  $\beta$ -gal em pH subótimo – pH 6 (o pH ótimo é 4). A enzima degrada o X-gal, e o produto desta reação sofre uma oxidação (Figura 12), convertendo-se em um composto insolúvel de cor azul, que se acumula na região perinuclear das células (DIMRI *et al.*, 1995).

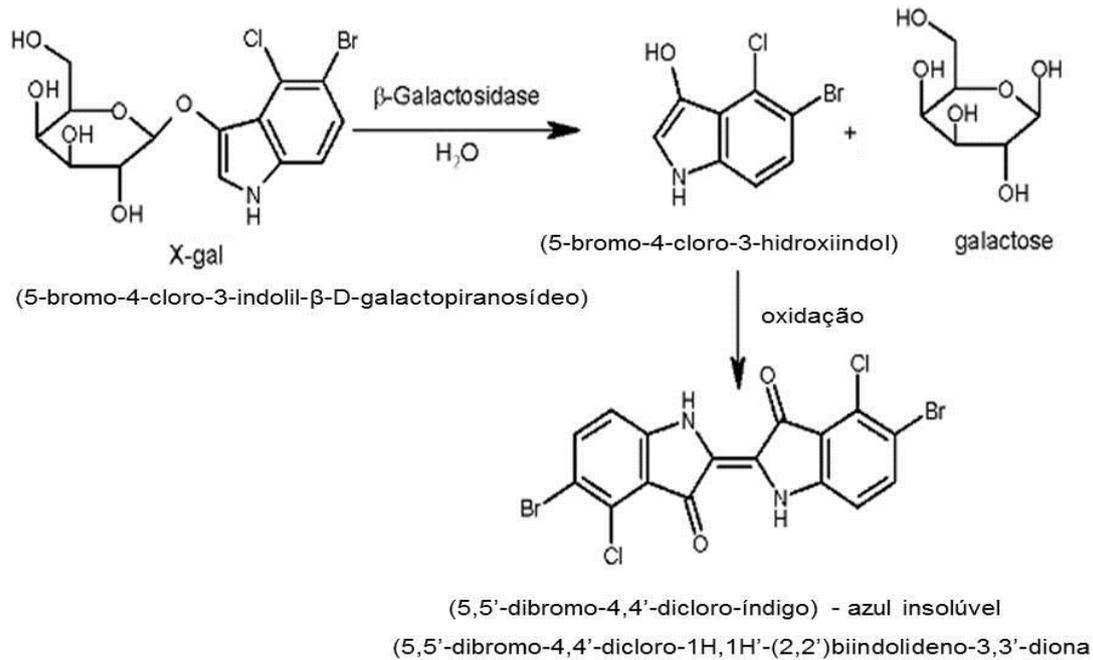


FIGURA 12 – REAÇÃO DE DECOMPOSIÇÃO DO X-GAL PELA  $\beta$ -GALACTOSIDASE

FONTE: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:X-gal\\_reaction.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:X-gal_reaction.png)

NOTA: A expressão de  $\beta$ -gal é detectável em pH 6 em células senescentes, o que não ocorre em células quiescentes, terminalmente diferenciadas ou imortalizadas (DIMRI *et al.*, 1995).

A coloração para detecção de atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência também foi realizada em células tratadas com NAC, pifitrina- $\alpha$  e ATZ. Para isto, as células foram incubadas com cada composto, como descrito no item 6.2.1, e após o tratamento com sinvastatina, a coloração foi de acordo com o protocolo. Para análise destes experimentos, bem como para o experimento com células WM35 utilizou-se microscópio Zeiss com câmera acoplada (aumentos de 100x e 200x).

Para conservação a longo prazo de placas coradas, pode-se remover a solução de coloração e adicionar glicerol 70%. A conservação das placas foi feita a 4°C.

### 6.3.2 Análise de ciclo celular por citometria de fluxo

Para verificar o efeito da sinvastatina no ciclo celular, células WM9 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células/placa) em placas de 60mm. Após 24h de incubação para aderência, o meio de cultura foi retirado e as células foram tratadas com sinvastatina durante 72h. Após o tratamento, foi realizada a coleta das células. Primeiramente, foi coletado o sobrenadante das culturas, o qual foi recolhido em

tubos de fundo cônico de 5mL. A seguir, as células aderentes foram lavadas e colhidas com solução de tripsina-EDTA, como descrito no item 6.2.3. Esta suspensão foi adicionada ao sobrenadante no tubo de coleta. Este material foi centrifugado (2000rpm, 5min), sendo que após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, permanecendo apenas o *pellet* de células. O *pellet* obtido foi ressuspenso em PBS e centrifugado novamente por duas vezes consecutivas. Após estas lavagens, o *pellet* de células foi incubado em solução de marcação contendo 50µg/mL de PI, 0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrato de sódio e 0,2mg/mL de RNase A durante 30 minutos, protegido da luz a 4°C. A análise do conteúdo de DNA das células foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur, utilizando o filtro FLH-2 e capturando 10000 eventos. A porcentagem de células em cada fase do ciclo foi definida a partir dos histogramas obtidos no *software* Cyflogic.

Análises da progressão do ciclo celular na presença dos compostos pifitrina- $\alpha$  e ATZ foram realizadas. Resumidamente, as células foram pré-tratadas com pifitrina- $\alpha$  ou cotratadas com ATZ e expostas à sinvastatina durante 72h. Após o tratamento, as células foram coletadas e analisadas por citometria de fluxo, como descrito.

## 6.4 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES

### 6.4.1 Detecção de EROs pela sonda DCFH-DA

Para verificar se o tratamento com sinvastatina é capaz de aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares foi utilizado o método que avalia a oxidação da sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluorescina diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA é um composto não-fluorescente permeável à membrana das células, e que no interior destas é convertido por esterases a composto DCFH, também não fluorescente. Por sua vez, na presença de EROs o DCFH é oxidado a DCF, que é fluorescente, permitindo assim a detecção e quantificação de EROs intracelulares (RHEE *et al.*, 2010).

Para a análise qualitativa dos níveis de EROs após tratamento com sinvastatina, células WM9 foram plaqueadas ( $1 \times 10^5$  células/placa) em placas de 60mm, e incubadas para adesão por 24h. Após a adesão, foi realizado o tratamento com sinvastatina nas doses de 0,25 e 1µmol/L durante 72h na presença da sonda DCFH-DA (5µmol/L). Após este período, o meio de tratamento com a sonda foi descartado, as células aderentes foram lavadas com PBS e coletadas com solução de tripsina-EDTA. A suspensão de células foi centrifugada (2000rpm, 5 minutos), e o

sobrenadante foi descartado, restando apenas o *pellet* de células. Este foi ressuspenso em 0,5mL de PBS e a fluorescência foi analisada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur, utilizando filtro FL1-H, captando 10000 eventos. Como controle positivo para detecção da fluorescência de DCFH-DA neste experimento foram utilizadas células tratadas durante 30 minutos com 300µmol/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados foram analisados em *software* Cyflogic.

Para a avaliação quantitativa dos níveis de EROs intracelulares de células WM9 tratadas com sinvastatina, estas foram plaqueadas em placas de fluorescência de 96 poços (1 x 10<sup>3</sup> células/poço), tratadas com sinvastatina e coincubadas com a sonda DCFH-DA, como mencionado anteriormente. Após 72h de incubação, a fluorescência foi medida em leitor de microplacas (Tecan Infinite 200) utilizando comprimento de onda de 520nm de emissão e 480nm de excitação. Os valores de fluorescência foram normalizados pela porcentagem de células viáveis após o tratamento.

Também foi realizada uma análise cinética da produção de EROs em células WM9 após o tratamento com sinvastatina. Para isto, as células foram plaqueadas, incubadas para aderência por 24h e então tratadas com 0,25 e 1µmol/L de sinvastatina. As medidas qualitativas para avaliação dos níveis de EROs intracelulares foram realizadas através de citometria de fluxo após 6, 12 e 24h de tratamento.

Análises da geração de EROs após tratamento com sinvastatina e com a adição de pifitrina-α e ATZ também foram realizadas. Células WM9 foram plaqueadas, incubadas para aderência, e então pré-tratadas com pifitrina-α ou cotratadas com ATZ, conforme descrito anteriormente. Decorrido o tempo de tratamento com a sinvastatina (72h), as células foram então coletadas e analisadas através de citometria de fluxo.

## 6.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DE MARCADORES DE SENESCÊNCIA E ENZIMAS ANTIOXIDANTES

### 6.5.1 Extração e purificação do RNA total celular e síntese do cDNA

Células WM9 foram plaqueadas (1 x 10<sup>6</sup> células/placa) em placas de 100mm e incubadas para aderência durante 24h, nas condições de temperatura e atmosfera já mencionadas e posteriormente foram tratadas com 0,25 e 1µmol/L de sinvastatina durante 72h. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS e soltas das

placas com solução de tripsina-EDTA, adicionando-se meio de cultura fresco para inativação da tripsina. A suspensão foi coletada em tubos de fundo cônico de 5mL e centrifugada durante 5 minutos a 3000g. Após a centrifugação o sobrenadante foi completamente removido, restando somente o *pellet* de células. Nesta etapa, o *pellet* pode ser armazenado a -80°C até a extração do RNA ser realizada.

A extração do RNA celular foi realizada utilizando o kit *Illustra RNA spin mini* (Ge Healthcare), seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, o método consiste em lisar as células pela incubação em solução contendo grandes quantidades de íons caotrópicos. O tampão de lise contém componentes que promovem a inativação de RNAses e cria condições de ligação de favorecem a adsorção do RNA a uma membrana de sílica. O DNA contaminante é removido pela DNase I (1U/ $\mu$ L). Vários passos de lavagem com tampões removem sais, metabólitos e componentes celulares macromoleculares. O RNA purificado foi então eluído com água livre de RNAses, sendo imediatamente quantificado pela medida da absorbância em 260 e 280nm em equipamento Nanodrop<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific).

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit *Superscript III Reverse Transcriptase* (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Para isto, foi utilizado 1 $\mu$ g de RNA total extraído. A primeira reação consistiu na síntese da cauda poliA, através da adição de *primers* Oligo(dT) e incubação a 70°C durante 5 minutos, seguida de 5 minutos de resfriamento. Após esta etapa, adicionou-se às amostras uma mistura de MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, transcriptase reversa e tampão de reação e estas foram incubadas a 25°C durante 5 minutos. A síntese posterior foi realizada em termociclador Mastercycler<sup>®</sup> Gradient (Eppendorf) a 42°C durante 1h. A inativação da transcriptase reversa foi realizada por incubação a 70°C, durante 15 minutos.

As amostras de cDNA foram então diluídas em água livre de RNAses numa solução estoque 1:3. Para realização da reação de PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR), as amostras foram diluídas 1:30.

#### 6.5.2 Análise da modulação da expressão gênica

A reação de RT-qPCR foi realizada a partir do cDNA sintetizado e utilizando *primers* para os genes alvo, de acordo com a tabela 2. Esta reação foi realizada em equipamento RotorGene (Corbett Research) utilizando *SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen). A reação foi preparada para um volume final de 18 $\mu$ L, sendo destes:

4,5µL de cDNA amostra, 4,5µL do mix de *primer* e 9µL de SYBR Green. No equipamento, a reação foi iniciada com temperatura de *holding* de 95°C, durante 5 minutos. Em seguida, foram realizados 50 ciclos de amplificação (95° C – 10 segundos; 60°C – 20 segundos). Após a ciclagem, foi realizado o *melting* da reação, com temperatura variando de 60 a 90°C, com 1°C de elevação a cada 5 segundos. O pré-*melting* selecionado foi de 5 minutos.

A expressão relativa dos genes alvo foi normalizada em relação à expressão de quatro genes constitutivamente expressos em células WM9: (1) hGAPDH (que codifica para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, uma enzima da via glicolítica), (2) hHPRT (que codifica para hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, enzima do metabolismo de purinas), (3) hHMBS (que codifica para hidroximetilbilano sintase, enzima da biosíntese do heme) e (4) hTUBA (que codifica para α-tubulina, proteína que compõe os microtúbulos). Esta normalização foi realizada pelo *software* geNorm (desenvolvido por VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

TABELA 2 – PRIMERS UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Gene e concentração do mix	Sequência
p16 <sup>INK4A</sup> (600nM)	F: 5'-CAGTAACCATGCCCCGCATAG-3', R: 5'-CTGTAGGACCTTCGGTGACT)-3'
p14/ARF (600nM)	F: 5'-CTGCAGGTCATGATGTTTGGC-3' R: 5'-CGTCATGGACTGGACTGGTAC-3'
p53 (800nM)	F: 5'-TGGTAATCTACTGGGACGGA-3' R: 5'-TTGCGGAGATTCTCTTCCTCT-3'
p21 (800nM)	F: 5'-ACTCTCAGGGTCGAAAACGG-3' R: 5'-GATTAGGGCTTCCTCTTGGAGA-3'
SOD-1 (800nM)	F: 5'-GTGCAGGGCATCATCAATTTTC-3' R: 5'-AATCCATGCAQGCCTTCAGT-3'
SOD-2 (600nM)	F: 5'-GGACACTTACAAATTGCTGCTTGT-3' R: 5'-AGTAAGCGTGCTCCCACACAT-3'
CAT (600nM)	F: 5'-GATAGCCTTCGACCCAAGCA-3' R: 5'-ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT-3'
PRDX-1 (600nM)	F: 5'-TGGCCGCTCTGTGGATGAGACTTT-3' R: 5'-CAGGCTTGATGGTATCACTGCCAGGTT-3'
GPx (600nM)	F: 5'-TGCTGGCCTCCCCTTACAG-3' R: 5'-GCACACATGGCGCAATTG-3'
GRed (800nM)	F: 5'-GTGGCACTTGCGTGAATGTT-3' R: 5'-GGAAAGCCATAATCAGCATGATC-3'
hGAPDH (400nM)	F: 5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGA-3' R: 5'-CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'
hHMBS (600nM)	F: 5'-TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT-3' R: 5'-CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC-3'
hTUBA (800nM)	F: 5'-TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG-3' R: 5'-AGTGCCAGTGCGAACTTCATC-3'
hHPRT (600nM)	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

## 6.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA DOS MARCADORES DE SENESCÊNCIA

### 6.6.1 Extração e quantificação de proteínas

Em placas de 100mm, foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células/placa e deixadas em incubadora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) durante 24h para adesão. Em seguida, as células foram tratadas com 0,25 e 1µmol/L de sinvastatina e após 72h de tratamento, coletadas para extração de proteínas. Para o procedimento de coleta, o meio de tratamento foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado. Após estas lavagens, foi adicionado cerca de 600µL por placa de tampão RIPA + (10mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, desoxicolato de sódio 1%, Triton X-100 1%, SDS 1%,

1mM PMSF e Coquetel Inibidor de Fosfatases B – Santa Cruz Biotechnology) e as células foram retiradas através de raspagem com *cell scraper*. Este lisado foi coletado em tubo de 1,5mL e imediatamente colocado em gelo. No gelo, o lisado foi homogeneizado por pipetagem contínua para diminuir sua viscosidade. Em seguida, cada amostra de lisado foi passada por uma seringa de insulina. Após este passo, as amostras foram centrifugadas a 15000g, por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, colocado em tubos novos e mantido em gelo.

A quantificação de proteínas totais foi realizada imediatamente após a extração pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Após quantificadas, as amostras foram alíquotadas e armazenadas a -80°C.

#### 6.6.2 Ensaio para imunodeteção de proteínas (*Western Blotting*)

Foram utilizadas alíquotas com 50µg de proteína para eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS PAGE (12,5% ou 15%, este último para melhor separação de proteínas de menor peso molecular). Às amostras, foi adicionado Tampão de Amostra Redutor (Solução 5x: 300mM Tris-HCl pH 6,8, glicerol 50%, SDS 10%, β-mercaptoetanol 25%, azul de bromofenol 0,05%) e estas então foram aquecidas a 100°C durante 10 minutos e posteriormente resfriadas por 5 minutos. A eletroforese foi realizada durante 3 horas (Tampão de Corrida: 25mM Tris-HCl pH 8,3, glicina 192mM, SDS 1%), 100V, 400mA. Os marcadores de peso molecular utilizados foram: PAGERULER Plus™ 10 - 250kDa (Fermentas Biotech) e SuperSignal\* Protein Standard (Thermo Scientific).

Após a eletroforese, as proteínas do gel SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare) através de transferência semi-seca em equipamento modelo T77 (GE Healthcare), 60V durante 1h (Tampão de Transferência: 48mM Tris-HCl pH 8,3, glicina 39mM, SDS 0,037%, metanol 20%). A visualização da transferência foi realizada através da coloração da membrana com solução de Ponceau (Bio Agency) e a membrana foi descorada através de lavagens sucessivas com tampão TBST (50mM Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150mM, Tween-20 0,1%).

A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1h com solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado ou 5% de BSA em TBST) em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a

membrana foi incubada com o anticorpo primário, sob agitação branda seguindo instruções do fabricante para cada anticorpo. Posteriormente, o excesso de anticorpo primário foi retirado após lavagem da membrana (4x com TBST, 15min) e esta foi incubada com anticorpo secundário por 1h em temperatura ambiente. Novamente, após a incubação, a membrana foi submetida a lavagens (4x com TBST, 15min) e então foi preparada para revelação.

TABELA 3 – ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS UTILIZADOS PARA IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS

<b>Anticorpo</b>	<b>Origem e Diluição Recomendada</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-Fosfo-p38 <sup>MAPK</sup> (Thr180/Tyr182)	Rabbit/1:1000	Cell Signaling Technology®
Anti-p38 <sup>MAPK</sup>	Rabbit/1:1000	Cell Signaling Technology®
Anti-Fosfo-p53 (Ser15)	Rabbit/1:1000	Cell Signaling Technology®
Anti-p53	Rabbit/1:1000	BD Pharmingen™
Anti-p21	Mouse/ 1:1000	BD Pharmingen™
Anti-p16 (C-20)	Rabbit/ 1:200 a 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Anti-GAPDH	Rabbit/1:5000	Sigma-Aldrich
<i>Anti-mouse IgG HRP-linked Antibody</i>	1:3000	Cell Signaling Technology
<i>Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody</i>	1:10000	Sigma-Aldrich

Para a revelação, o excesso de TBST foi retirado, e a membrana foi incubada com o substrato quimioluminescente ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate – Thermo Scientific) durante 1min, em temperatura ambiente. O excesso de substrato foi retirado, e a membrana posicionada em cassete revestido por filme de PVC. Em câmara escura na ausência total de luz, o filme fotográfico (Amersham Hyperfilm™ ECL – GE Healthcare) foi colocado em contato com a membrana. Após a exposição, o filme foi imerso em solução reveladora até o aparecimento das bandas, lavado em água, imerso em solução fixadora e novamente lavado em água (Soluções Reveladora e Fixadora utilizadas: Kodak® *processing chemicals for autoradiography*

*films* – Sigma Aldrich). A medida densitométrica foi realizada através do *software* ImageJ 1.38e/Java 1.5 (desenvolvido por Wayne Rasband, e disponível na web).

## 6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas deste trabalho foram realizadas utilizando teste de variância ANOVA *One-Way* seguido por Teste de Múltiplas Comparações de Dunnet, para comparar vários grupos de dados entre si. Comparações entre dois grupos foram realizadas utilizando o Teste-*t* de Student. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados estão apresentados como média  $\pm$  SEM (erro padrão da média) de pelo menos três experimentos independentes. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

O efeito da sinvastatina na viabilidade das células WM9 foi avaliado pelo ensaio de cristal violeta. Para isto, células foram tratadas com diferentes concentrações de sinvastatina, e a avaliação da viabilidade ocorreu em tempos que variaram de 72 a 168h de tratamento. O resultado foi expresso como valor de porcentagem de células viáveis em relação ao controle do experimento (células tratadas somente com etanol, veículo da droga), considerado como 100% de células viáveis.

Pode-se observar que ocorreu a redução dependente de concentração da quantidade de células viáveis após 72h de tratamento com sinvastatina, e que este efeito se manteve até 168h de tratamento. Após 72h de tratamento, a redução de porcentagem de células viáveis é de cerca de 12% para células tratadas com 0,5 $\mu$ mol/L de sinvastatina e 24% para 1 $\mu$ mol/L, em relação a seu controle. Estas porcentagens se mantêm similares durante os tempos de 96, 120 e 144h. Após 168h, a diminuição de viabilidade é estatisticamente significativa para a concentração de 0,5 $\mu$ mol/L de sinvastatina, observando-se uma redução de cerca de 15% da quantidade de células viáveis para esta concentração e de 40% de redução de viabilidade após tratamento com 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina (Figura 13). Os resultados indicam a perda de viabilidade de células tratadas com concentrações mais altas de sinvastatina, o que poderia estar relacionado à ocorrência de morte celular.

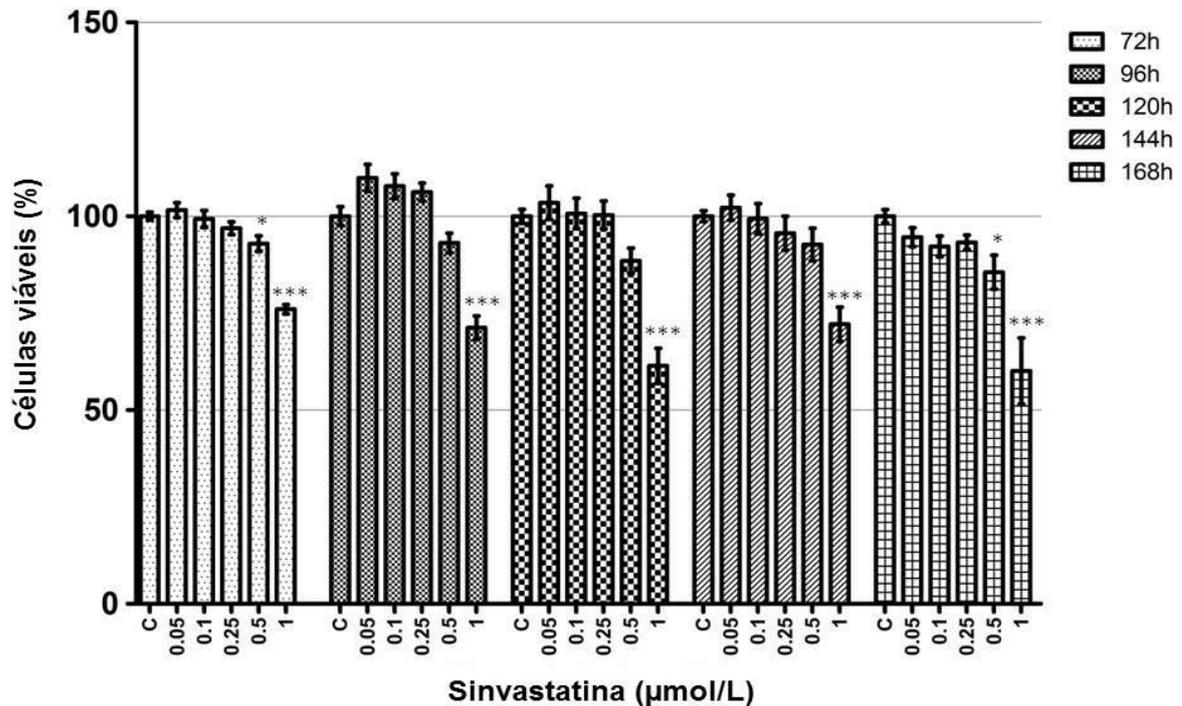


FIGURA 13 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA  
 FONTE: O autor (2014)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 após o tratamento com 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1µmol/L de sinvastatina nos tempos de 72, 96, 120, 144 e 168h de exposição. Na condição controle foi adicionado apenas o veículo da droga: etanol (0,025%). O resultado é representado pela média ± SEM das porcentagens de células viáveis de quatro experimentos independentes, realizados em triplicata, e cada tempo possui seu controle representado como 100%. As significâncias estatísticas obtidas em relação a cada dose são referentes aos seus controles nos diferentes tempos (\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 7.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DE CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA

Como mencionado anteriormente, as células WM9 crescem como culturas aderentes. Sua morfologia habitual é poligonal, ligeiramente alongada, podendo ou não apresentar filamentos originando-se a partir do citoplasma. Através da análise de micrografias, pôde-se observar que o tratamento com sinvastatina durante 72h, nas doses avaliadas, induz algumas alterações morfológicas nestas células, que serão discutidas detalhadamente em seção posterior (Figura 14). Ainda, nas doses de 0,5 e 1µmol/L de sinvastatina ocorre a diminuição da quantidade de células aderidas ao substrato plástico e o aumento da quantidade de células não aderidas (Figura 14). Visto que a perda de aderência pode refletir a ocorrência de morte

celular, procuramos em seguida avaliar a ocorrência do processo de apoptose em células tratadas com sinvastatina.

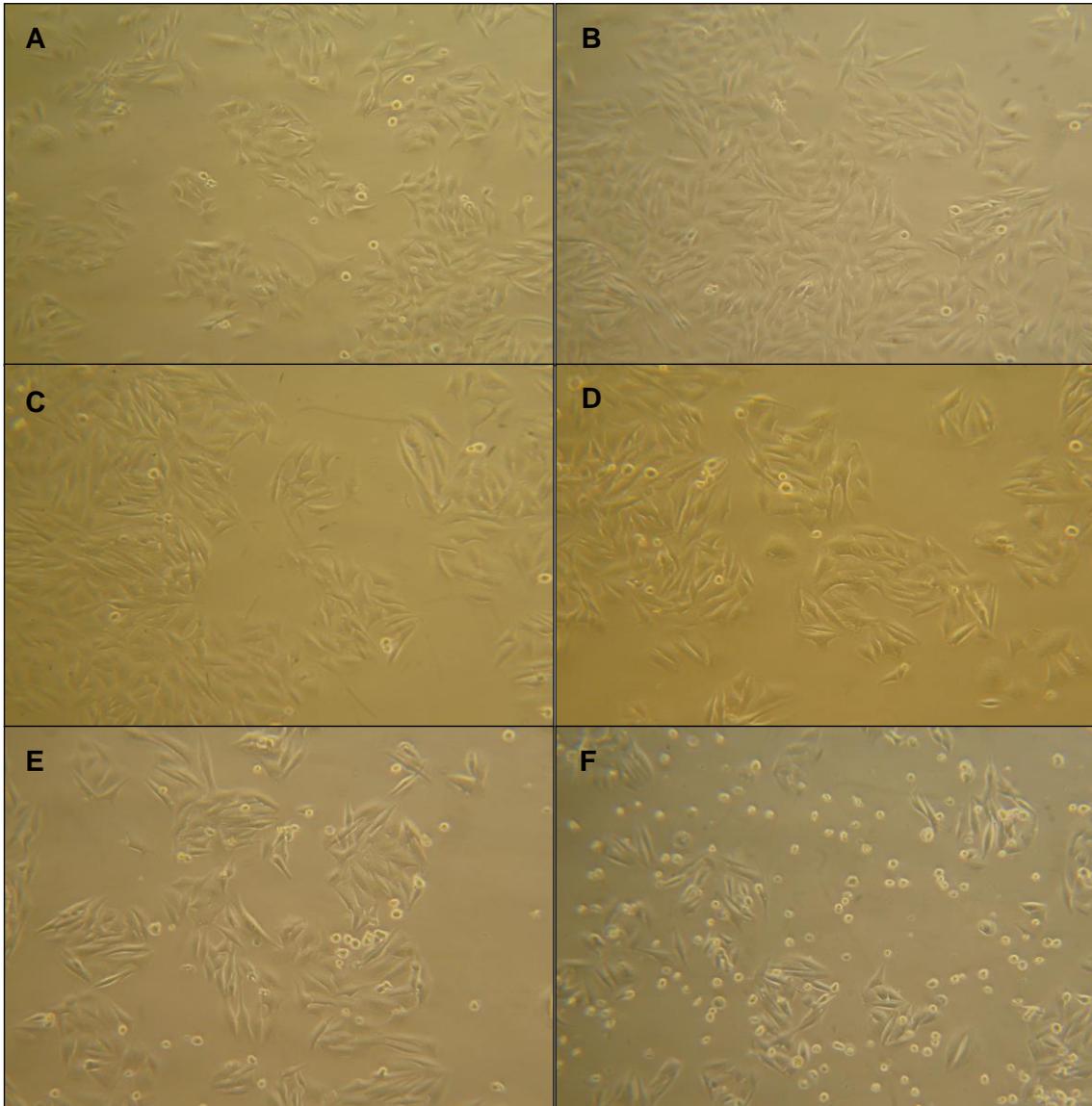


FIGURA 14 – MICROGRAFIAS DE CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA  
FONTE: O autor (2014)

NOTA: Micrografias das células WM9 (aumento de 100x) após 72h de tratamento com sinvastatina. A – Células tratadas somente com o veículo da droga (controle), apresentando morfologia e adesão características. B, C e D – Células tratadas com 0,05, 0,1 e 0,25µmol/L de sinvastatina, respectivamente. E e F – Células tratadas com 0,5 e 1µmol/L de sinvastatina, respectivamente, apresentando aumento da quantidade de células não aderidas.

### 7.3 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

A ocorrência de morte celular foi avaliada pela marcação com Anexina V-FITC e PI, através de citometria de fluxo após 72h de tratamento. Como controle positivo para marcação com Anexina utilizou-se o tratamento das células WM9 com 5 $\mu$ mol/L de sinvastatina, visto que já é descrita a indução de apoptose por estatinas em modelo de melanoma. Os resultados estão apresentados na Figura 15 – A e mostram o aumento significativo da quantidade de células positivas para marcação com Anexina nas concentrações de 1 e 5 $\mu$ mol/L de sinvastatina, demonstrando que a sinvastatina é capaz de induzir apoptose em células de melanoma WM9. Por outro lado, não foram observadas alterações na quantidade de células apoptóticas para células tratadas com 0,25 $\mu$ mol/L de sinvastatina, quando comparadas à condição controle.

A marcação de células positivas para PI é aumentada em células WM9 tratadas com 5 $\mu$ mol/L de sinvastatina, porém na condição de 1 $\mu$ mol/L foi evidenciado somente um discreto aumento, enquanto que para 0,25 $\mu$ mol/L de sinvastatina não foram observadas diferenças na marcação com PI, em relação ao controle (Figura 15 – B). Estes dados indicam que não há ocorrência de necrose em células tratadas com baixas doses de sinvastatina.

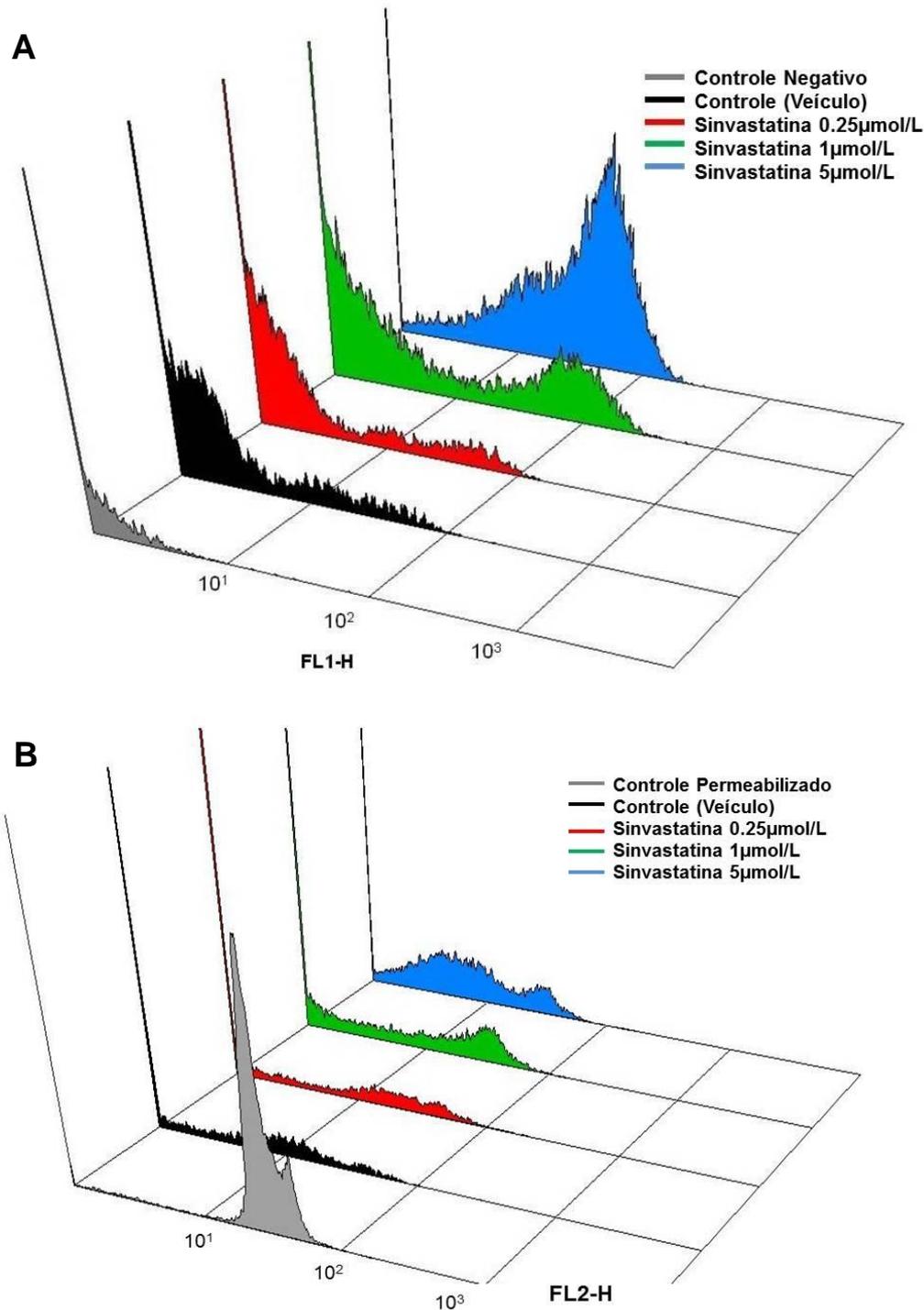


FIGURA 15 – AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: A – Representação tridimensional sobreposta da fluorescência de células marcadas com Anexina V. Histograma cinza: células não tratadas na ausência de Anexina V (controle não marcado); Histograma preto: controle; Histogramas vermelho, verde e azul representam células WM9 tratadas com 0,25, 1 e 5 $\mu\text{mol/L}$  de simvastatina, respectivamente; Histogramas representativos de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. B – Representação tridimensional sobreposta da fluorescência de células marcadas com PI. Histograma cinza: células não tratadas e marcadas com solução desnaturante de PI (controle permeabilizado); Histogramas preto, vermelho, verde e azul representam as mesmas condições descritas para a marcação com Anexina V.

A indução de apoptose, como mencionado, é um efeito já bastante descrito para as estatinas em diversos modelos tumorais. Entretanto, sabe-se que a sinvastatina também possui ação citostática, causando parada da progressão do ciclo celular e, desta forma, procuramos avaliar esta ação em células WM9 tratadas com este fármaco.

#### 7.4 AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA

A análise da progressão do ciclo celular foi realizada através da avaliação do conteúdo de DNA de células permeabilizadas com PI, por citometria de fluxo. Os resultados estão representados nas Figuras 16 e 17 – A. Após o tratamento das células WM9 com sinvastatina por 72h foi observado o aumento significativo da porcentagem de células na fase G1-S do ciclo celular. Este aumento é estatisticamente significativo a partir da dose de  $0,25\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina. Na condição controle, cerca de 66% das células encontram-se nesta fase. Para os tratamentos com 0,25, 0,5 e  $1\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina, observa-se que cerca de 72% das células estão em G1-S, o que é um indicativo da parada de ciclo.

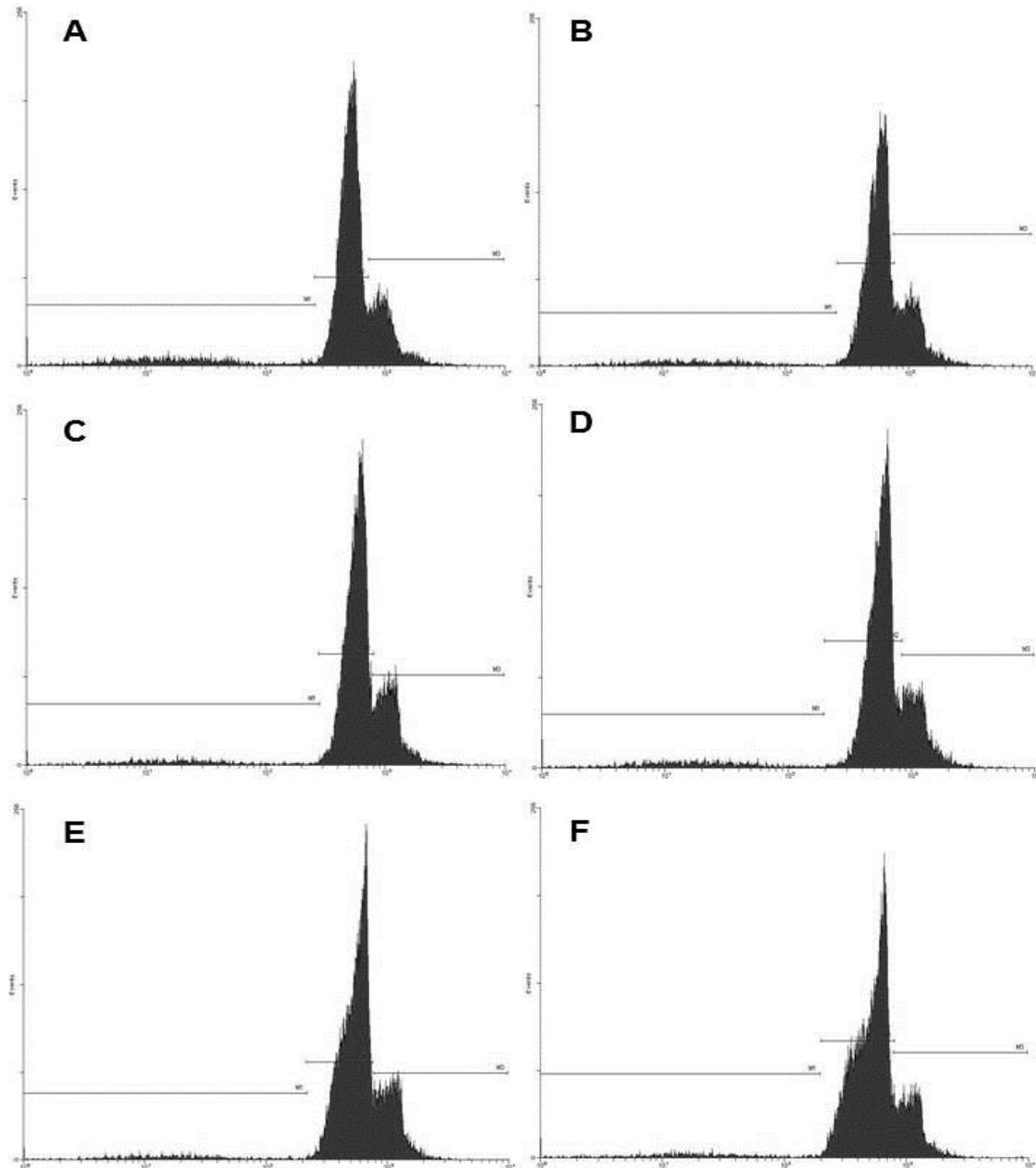


FIGURA 16 – DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ATRAVÉS DAS FASES DO CICLO CELULAR (REPRESENTAÇÃO POR HISTOGRAMA) APÓS 72h DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA  
 FONTE: O autor (2014)

NOTA: Histogramas representativos da análise da progressão do ciclo celular de células WM9 tratadas com diferentes concentrações de simvastatina. A – Controle (células tratadas somente com veículo do fármaco); B, C, D, E e F – Células tratadas com 0,05, 0,1, 0,25, 0,5 e 1µmol/L de simvastatina, respectivamente. As delimitações correspondem a quantidade de células em SubG1 (ausência de pico), quantidade de células em G1-S (pico maior) e quantidade de células em G2-M (pico menor).

Além do aumento em G1, observou-se a concomitante diminuição da porcentagem de células WM9 na fase G2-M do ciclo celular. Na condição controle, cerca de 29% das células encontravam-se nesta fase, enquanto que para as doses

de 0,25, 0,5 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina esta porcentagem diminuiu para 24%. Este experimento também permite a análise do conteúdo de DNA fragmentado, numa condição denominada SubG1. Observou-se uma tendência, embora não significativa, do aumento da porcentagem de células em SubG1 para o tratamento com 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina (Figura 17 – B). Este resultado está de acordo com os resultados anteriores obtidos através da marcação com PI para avaliação de morte celular (Figura 15 – B).

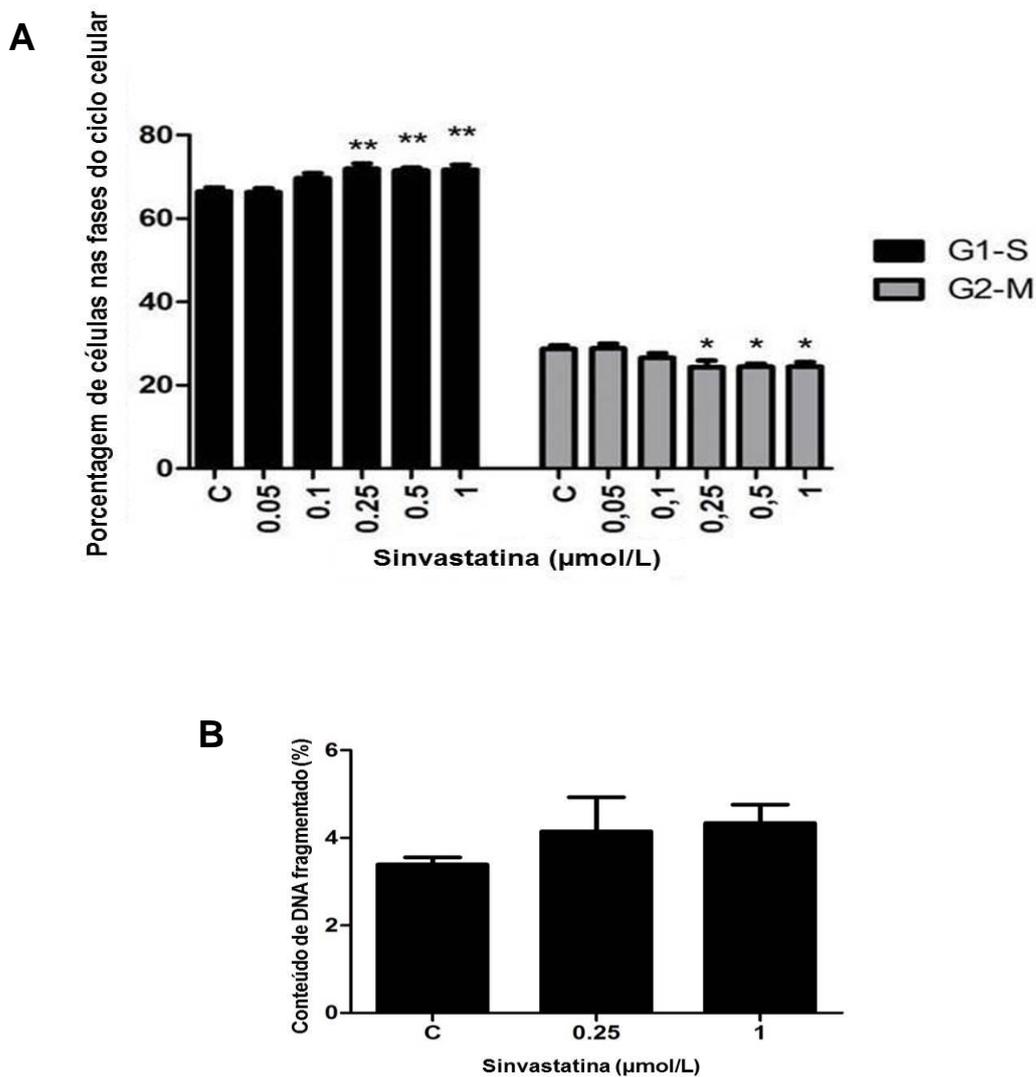


FIGURA 17 – PORCENTAGENS DE CÉLULAS WM9 NAS DIFERENTES FASES DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

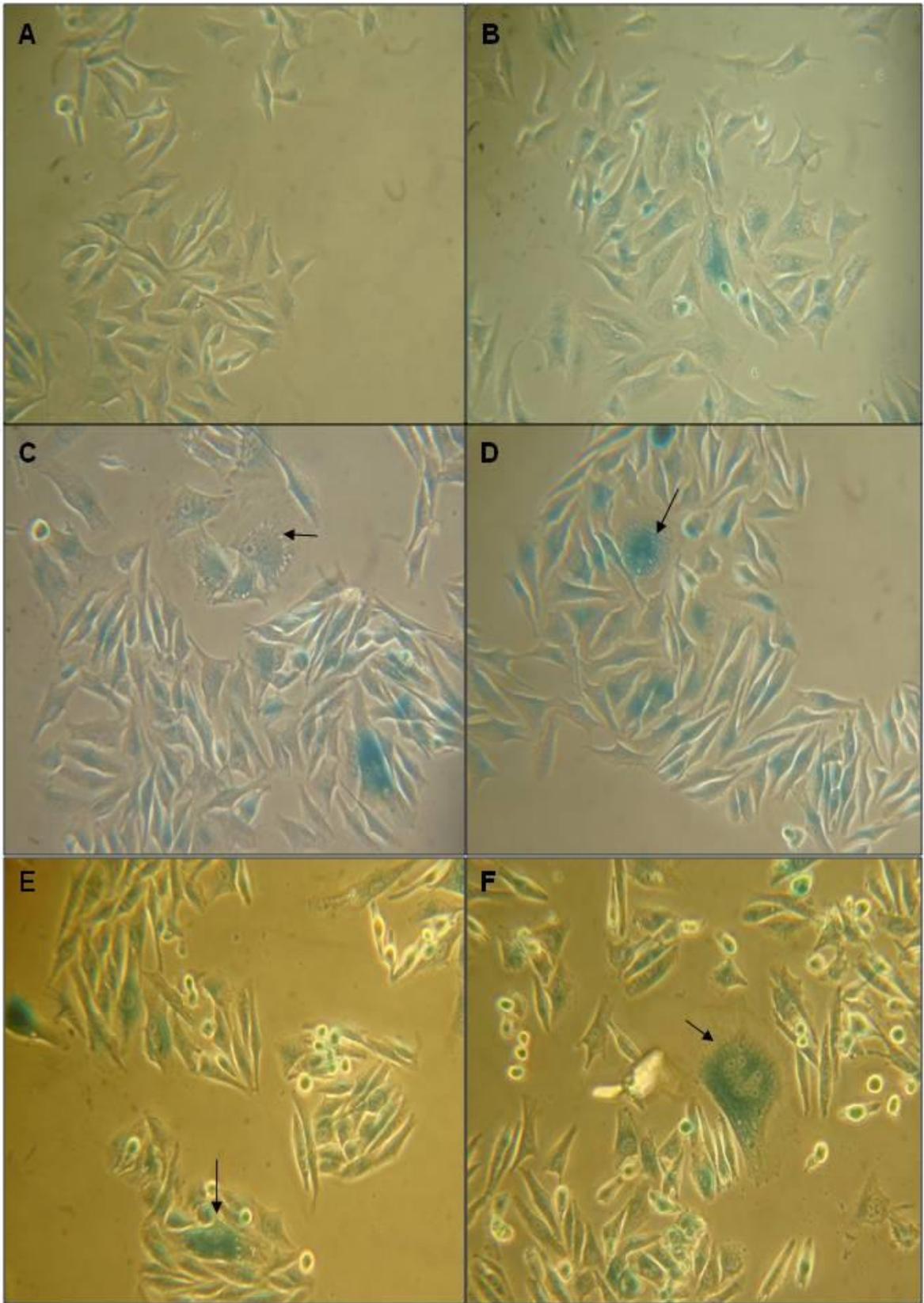
NOTA: A – Porcentagem de distribuição de células WM9 nas fases G1-S e G2-M após 72h de tratamento com sinvastatina (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ). B – Porcentagem de células com DNA fragmentado (SubG1). Os gráficos representam dados de três experimentos independentes realizados em duplicata.

O aumento da porcentagem de células em G1 poderia indicar a ocorrência de senescência celular, o que foi avaliado subsequentemente.

#### 7.5 ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE SENESCÊNCIA CELULAR EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO TRATADAS COM SINVASTATINA

Para analisar se o tratamento com sinvastatina é capaz de induzir senescência em células de melanoma humano, utilizamos o marcador padrão para detecção de senescência celular, que se trata da detecção da atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência. Como mencionado anteriormente, o tratamento com sinvastatina induz alterações morfológicas em células de melanoma, que são melhor evidenciadas neste ensaio.

A análise microscópica após a coloração das células para atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência revelou que, após 72h de tratamento com sinvastatina, as células WM9 desenvolvem coloração azul característica de células senescentes (Figura 18). A aparência das células tratadas difere das células não-tratadas, apresentando-se com aspecto achatado e com frequentes multinucleações. A contagem das células demonstrou que, a partir da concentração de  $0,05\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina, o número de células coradas positivamente aumenta em relação ao controle, variando de 17% para esta concentração e 22% para  $0,1\mu\text{mol/L}$ . A partir da dose de  $0,25\mu\text{mol/L}$  este aumento fica mais evidente, chegando a cerca de 70% de células coradas. Valores próximos a 75% foram obtidos para as concentrações de  $0,5$  e  $1\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina.



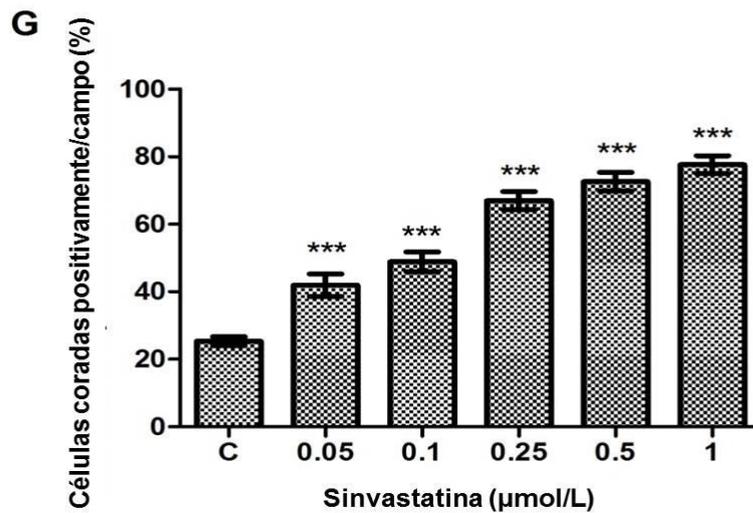


FIGURA 18 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS E GRÁFICO DA QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS WM9 POSITIVAMENTE CORADAS PARA ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADO À ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: A-F – Micrografias representativas (aumento de 200x) de células WM9 após o tratamento com sinvastatina (72h) submetidas ao ensaio de atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência. A – Controle (células tratadas somente com veículo); B-F – Células tratadas com 0,05, 0,1 0,25, 0,5 e 1µmol/L de sinvastatina, respectivamente. Células consideradas senescentes aparecem coradas em azul. O aparecimento de multinucleações e o aumento de tamanho das células é indicado pelas setas. G – Gráfico representativo da porcentagem de células senescentes em cada condição ( $n = 10$  campos microscópicos escolhidos aleatoriamente, por condição); (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ). Os dados representam a média  $\pm$  SEM de quatro experimentos independentes realizados em duplicata.

Para avaliar se este efeito não se trata de uma particularidade para a linhagem WM9, realizou-se a detecção da atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência após o tratamento com sinvastatina em células WM35. Trata-se de uma linhagem de melanoma de crescimento radial. Após 72h de tratamento, verificou-se que células WM35 tratadas com 0,25 e 1µmol/L de sinvastatina também apresentam alterações morfológicas e coloração positiva característicos de células senescentes (Figura 19).

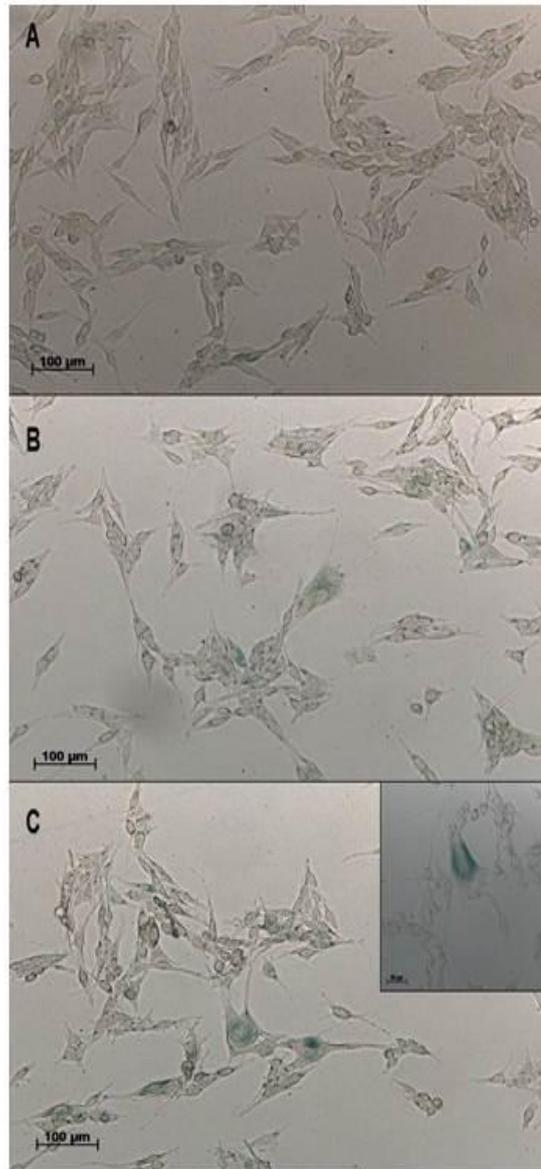


FIGURA 19 - MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM35 SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADO À ATIVIDADE DE  $\beta$ -GALACTOSIDASE APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Micrografias representativas (aumento de 100x) de células WM35 após o tratamento com sinvastatina (72h) submetidas ao ensaio de atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência. A – Controle (células tratadas somente com veículo); B e C – Células tratadas com 0,25 e 1  $\mu$ mol/L de sinvastatina, respectivamente. Células consideradas senescentes aparecem coradas em azul. O aparecimento de multinucleações e o aumento de tamanho das células está destacado pelas setas e pelo painel interno.

Analisando-se os resultados de análise da progressão do ciclo celular (Figura 18) e da atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência (Figura 17) em conjunto, fica

evidente que as células WM9 tratadas com sinvastatina desenvolvem alguns aspectos fenotípicos característicos do processo de senescência celular. Buscando avaliar mais a fundo a ocorrência do fenótipo senescente, procuramos elucidar as alterações moleculares por trás deste processo.

## 7.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES ASSOCIADOS À SENESCÊNCIA CELULAR

Procurando estabelecer o mecanismo de indução de senescência mediado pela sinvastatina, realizou-se a análise dos níveis de RNAm e proteína dos principais marcadores de senescência relacionados à regulação da progressão do ciclo celular. As análises de expressão de RNAm foram realizadas por RT-qPCR e a avaliação da expressão e ativação de proteínas foi realizada por *Western Blotting*.

Os resultados estão representados na Figura 20 e demonstram que os níveis de RNAm de p53 e p21 estão aumentados de forma estatisticamente significativa em células WM9 após o tratamento com 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina durante 72h. Além disso, também foi demonstrado o aumento dos níveis de RNAm de p16, mas somente para a concentração de 0,25  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina. Não foram evidenciadas alterações nas quantidades de RNAm de p14/ARF após o tratamento das células WM9 com sinvastatina.

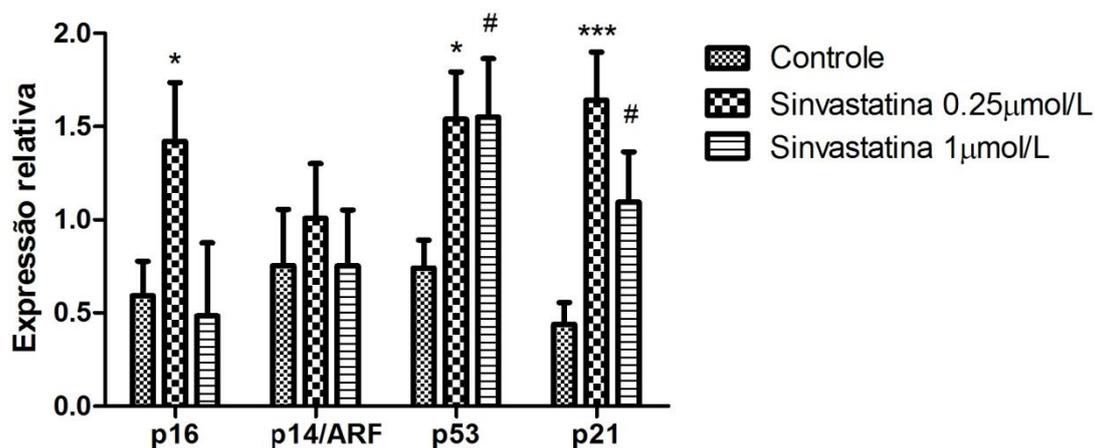


FIGURA 20 – NÍVEIS DE RNAm DOS MARCADORES DE SENESCÊNCIA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Expressão relativa dos marcadores de senescência celular p16, ARF, p21 e p53 em células WM9 após o tratamento com 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina. A condição controle corresponde a células WM9 tratadas somente com o veículo da droga (etanol). Os resultados foram normalizados pela expressão de quatro genes constitutivamente expressos: GAPDH, HPRT, HMBS e  $\alpha$ -tubulina, e demonstram a média  $\pm$  SEM de seis experimentos independentes (p16 \*  $p = 0,0302$ ; p53 \*  $p = 0,0152$  e #  $p = 0,0238$ ; p21 \*\*\*  $p < 0,0001$  e #  $p = 0,016$ ).

Em seguida, realizou-se a análise da expressão de proteína para estes marcadores em células WM9 tratadas com sinvastatina. Os dados obtidos estão representados na Figura 21. Pôde-se perceber o aumento da ativação da proteína p53 após tratamento das células WM9 com 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina, através da análise da expressão dos níveis de p53 fosforilada (p-p53). Não foram observadas alterações entre as condições controle e células tratadas com sinvastatina no que se refere à quantidade de proteína p53 total. Também foi demonstrado o aumento da expressão proteica de p21 em células WM9 tratadas com ambas as concentrações de sinvastatina testadas, o que corrobora os resultados obtidos na análise de RT-qPCR (Figura 20). Não foram observadas alterações significativas dos níveis expressão das proteínas p16 e p14/ARF após o tratamento das células WM9 com sinvastatina em relação a condição controle.

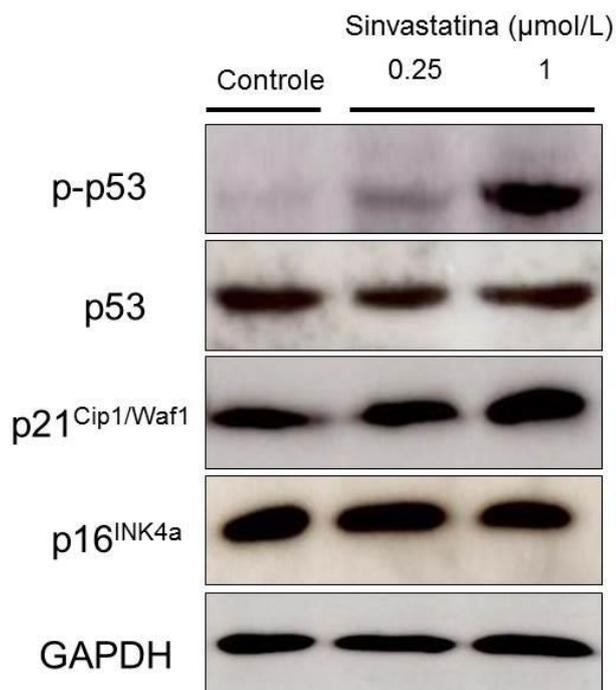


FIGURA 21 – NÍVEIS DE PROTEÍNA DOS MARCADORES DE SENESCÊNCIA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: *Western Blotting* para imunodeteção dos marcadores de senescência celular p-p53, p53, p21 e p16. A expressão de GAPDH foi utilizada para controle da expressão proteica. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Sabendo-se que a senescência celular pode ser resultado do estresse oxidativo e da possibilidade de a sinvastatina agir como pró-oxidante em células tumorais, procuramos avaliar o possível envolvimento de EROs neste processo.

#### 7.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

Para investigar o envolvimento do estresse oxidativo na senescência celular induzida por sinvastatina foi realizada a análise dos níveis de EROs intracelulares das células WM9 após tratamento. Esta medida foi realizada através da detecção da fluorescência emitida pela sonda DCFH-DA quando oxidada, por citometria de fluxo e leitura em microplaca. Os resultados obtidos por citometria de fluxo estão representados na Figura 22 e mostram que, em relação à condição controle, ocorre o deslocamento para a direita dos picos de fluorescência para células WM9 tratadas com 0,25, 0,5 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina por 72h, o que indica que o aumento dos níveis intracelulares de EROs ocorre de maneira dependente de concentração.

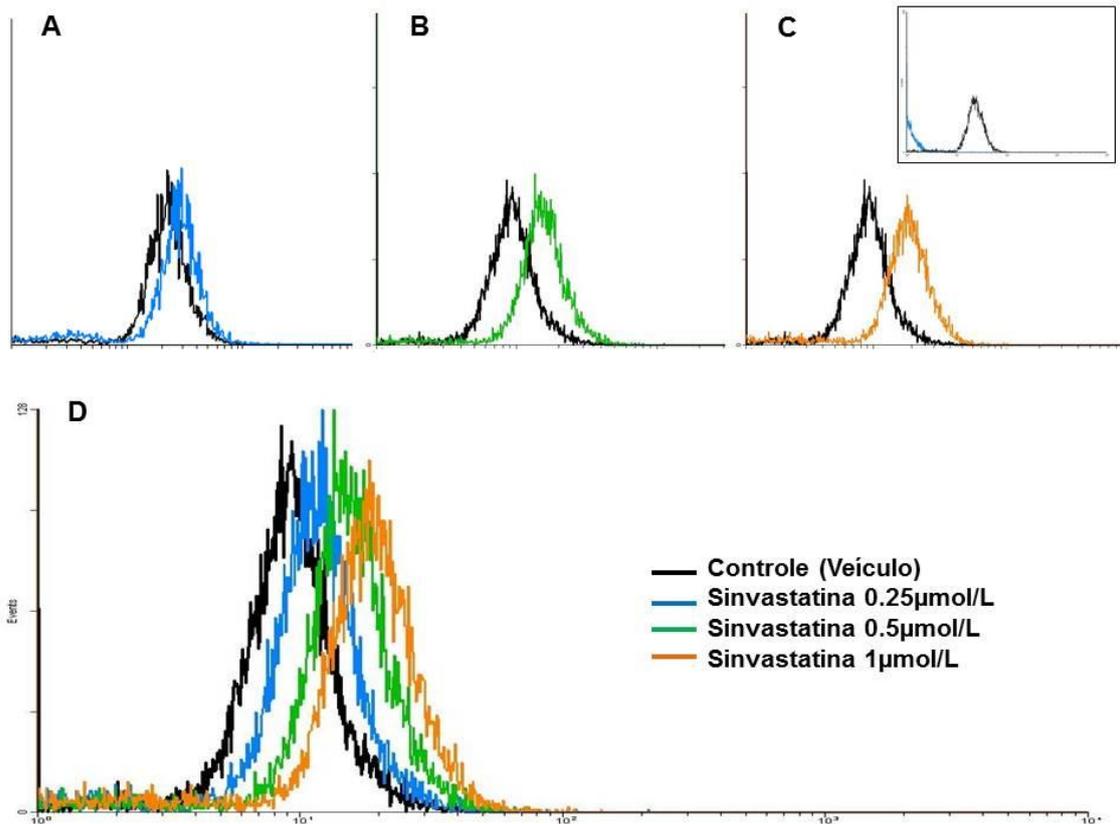


FIGURA 22 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES EM CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: A-D – Histogramas representativos para detecção de EROs em células WM9 após 72h de tratamento com simvastatina. A-C – Linha preta: Controle (células tratadas com veículo); Linha azul: células tratadas com 0,25μmol/L de simvastatina; Linha verde: células tratadas com 0,5μmol/L de simvastatina; Linha laranja: células tratadas com 1μmol/L de simvastatina, respectivamente. D – Controle e tratamentos mostrados em sobreposição. Painel interno – Linha azul: controle negativo (células WM9 na ausência da sonda DCFH-DA); Linha preta: controle positivo (células WM9 na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Resultados similares foram obtidos quando a leitura da fluorescência foi medida em microplaca. Pôde-se mensurar um aumento dos níveis de EROs intracelulares em relação ao controle de 14% para a dose de 0,25μmol/L de simvastatina e de 53% para 1μmol/L (Figura 23).

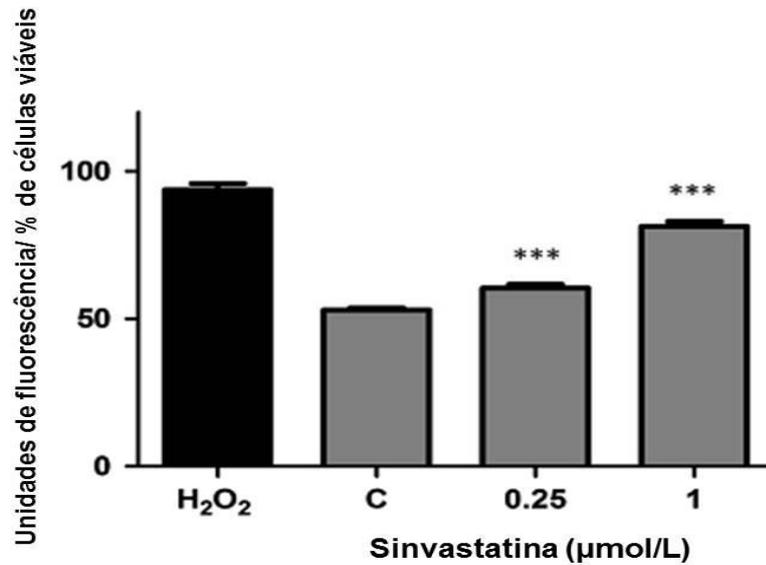


FIGURA 23 – QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES EM CÉLULAS WM9 APÓS O TRATAMENTO COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Medida da intensidade de fluorescência em células WM9 após 72h de tratamento com simvastatina. O peróxido de hidrogênio foi utilizado como controle positivo. Os resultados estão demonstrados como uma relação entre unidades arbitrárias de fluorescência e porcentagem de células viáveis. Dados representativos de quatro experimentos independentes realizados em quadruplicata (\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

A partir destes resultados, procuramos estabelecer em que momento do tratamento com simvastatina se dá o início do aumento dos níveis de EROs intracelulares. Para isto, os níveis de EROs foram avaliados após 6, 12 e 24h de tratamento com 0,25 e 1µmol/L de simvastatina. Os resultados estão indicados na Figura 24 e indicam aumento dos níveis de EROs após 24h de tratamento, porém este aumento só é perceptível para a dose de 1µmol/L.

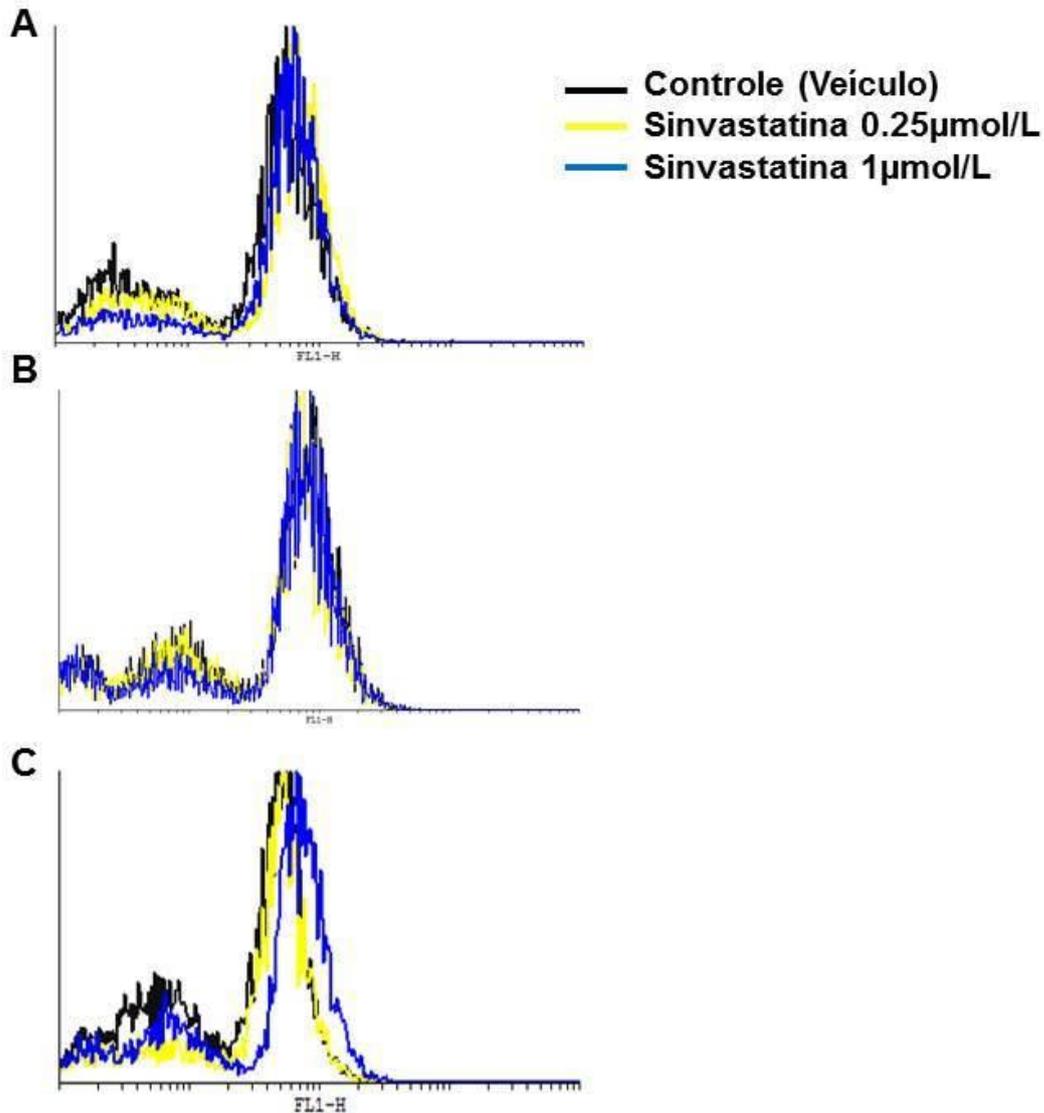


FIGURA 24 – ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES EM CÉLULAS WM9 NOS PERÍODOS INICIAIS DE TRATAMENTO COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: A-C – Histogramas gerados por citometria de fluxo para detecção de EROs em células WM9 após 6, 12 e 24h de tratamento com sinvastatina, respectivamente. Linhas pretas: Controle (células tratadas somente com veículo); Linhas amarelas: células tratadas com 0,25μmol/L de sinvastatina; Linhas azuis: células tratadas com 1μmol/L de sinvastatina.

Estes dados indicam que o aumento dos níveis intracelulares de EROs ocorre, para a maior concentração testada da droga, em um tempo inicial de tratamento. Este aumento pode estar relacionado ao começo da resposta celular ao tratamento com sinvastatina, o que sugere que a ocorrência de senescência pode ser uma resposta ao estresse oxidativo.

Para melhor compreender os eventos relacionados ao aumento dos níveis de EROs intracelulares, realizou-se a análise dos níveis de expressão das enzimas antioxidantes após o tratamento com sinvastatina.

## 7.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE RNAm DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM CÉLULAS DE MELANOMA WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

A avaliação dos níveis de expressão do RNAm das enzimas antioxidantes foi realizada por RT-qPCR após 72h de tratamento das células WM9 com 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina. Os resultados estão representados na Figura 25. Não foram observadas alterações nos níveis de RNAm de células WM9 após o tratamento com sinvastatina para as enzimas GPx e GRed, tampouco para o par SOD-1 e SOD-2. Por outro lado, o tratamento das células WM9 promoveu o aumento da expressão do RNAm da catalase para as doses de 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina, em relação ao controle. Também foi evidenciado o aumento significativo da quantidade de RNAm de Prdx-1, porém somente para a concentração de 0,25  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina.

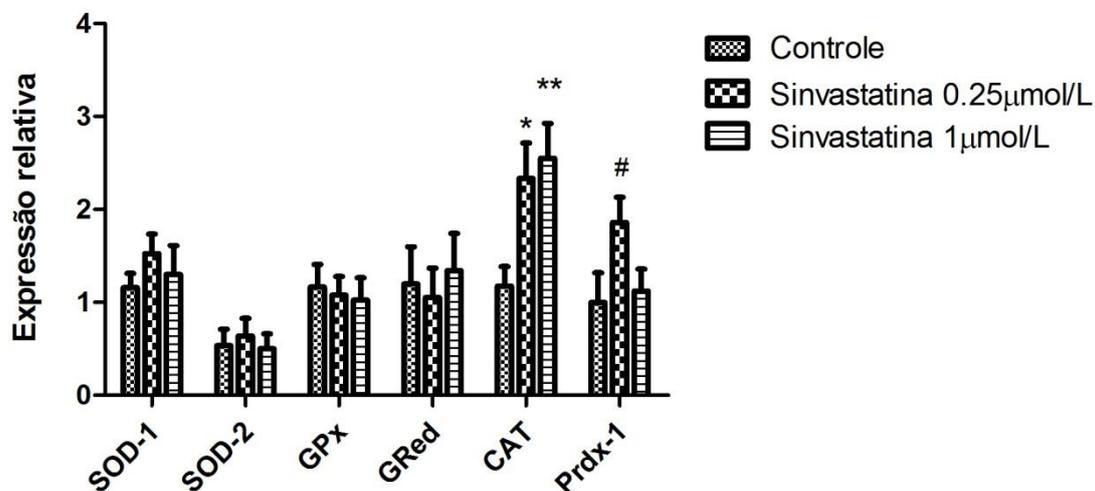


FIGURA 25 – NÍVEIS DE RNAm DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES DE CÉLULAS WM9 APÓS TRATAMENTO COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Expressão relativa das enzimas antioxidantes SOD-1, SOD-2, GPx, GRed, CAT e Prdx-1 em células WM9 após o tratamento com 0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$  de sinvastatina. A condição controle corresponde a células WM9 tratadas somente com o veículo da droga (etanol). Os resultados foram normalizados pela expressão de quatro genes constitutivamente expressos: GAPDH, HPRT, HMBS e  $\alpha$ -tubulina, e demonstram a média  $\pm$  SEM de seis experimentos independentes (CAT \*  $p = 0,0169$  e \*\* $p = 0,0062$ ; Prdx-1 #  $p = 0,0334$ ).

O aumento dos níveis de RNAm de catalase e peroxirredoxina-1 em células WM9 na condição de 0,25µmol/L pode estar relacionado ao discreto aumento dos níveis intracelulares de EROs observado para esta dose (Figuras 22 e 23). De forma interessante, após tratamento das células WM9 com 1µmol/L de sinvastatina observam-se níveis de EROs bastante elevados e concomitante ausência de aumento da expressão de peroxirredoxina-1. Além disso, não há aumento nos níveis de RNAm de catalase se compararmos a condição de tratamento 1µmol/L de sinvastatina com a condição de 0,25µmol/L, o que pode ser um indicativo de que, nestas condições, a resposta antioxidante ainda estaria ocorrendo através da catalase, enquanto a resposta mediada pela peroxirredoxina estaria novamente em níveis basais em células tratadas com 1µmol/L de sinvastatina.

#### 7.9 ANÁLISE DA ATIVAÇÃO DA PROTEÍNA p38<sup>MAPK</sup> EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

Sabendo-se que o estresse oxidativo e a ocorrência de senescência podem estar ligados à ativação da proteína p38<sup>MAPK</sup>, foi realizada a análise da modulação de expressão e ativação desta proteína (através da análise dos níveis de proteína p38 total e fosforilada) pelo método de *Western Blotting*. Não foram detectadas alterações nos níveis de expressão tanto de proteína fosforilada, quanto de proteína total em células WM9 após o tratamento com 0,25 e 1µmol/L de sinvastatina durante 72h (Figura 26).

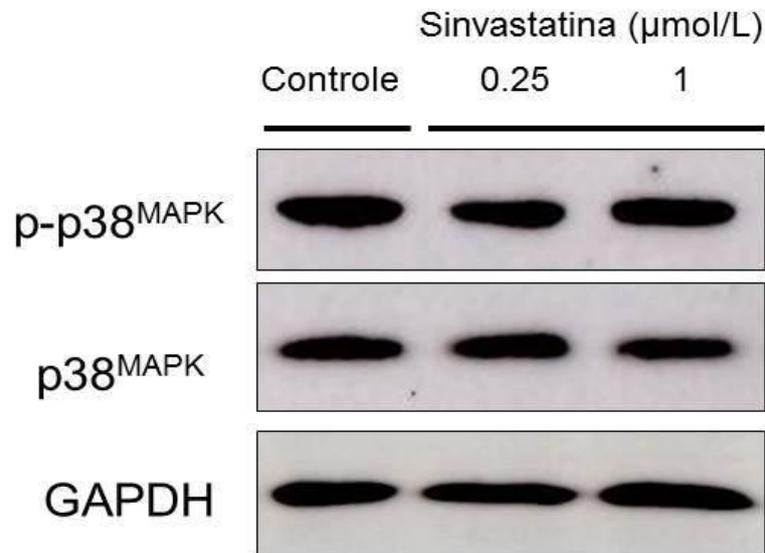


FIGURA 26 – NÍVEIS DE PROTEÍNA p38<sup>MAPK</sup> TOTAL E FOSFORILADA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: *Western Blotting* para imunodeteção de p38<sup>MAPK</sup> e p-p38<sup>MAPK</sup>. A expressão de GAPDH foi utilizada para controle da expressão proteica. Imagens representativas de três experimentos independentes.

Para melhor avaliar o papel do estresse oxidativo na indução da senescência celular mediada por simvastatina em células de melanoma humano, foi realizada a análise de parâmetros de viabilidade, senescência e EROs em células tratadas com simvastatina, em conjunto à adição de NAC e ATZ.

## 7.10 ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE N-ACETILCISTEÍNA EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

### 7.10.1 Avaliação da ação da NAC na citotoxicidade induzida por simvastatina

A N-acetilcisteína (NAC) é um tiol, precursor da L-cisteína e da glutatona reduzida. Sendo assim, NAC atua como um precursor de grupos sulfidril e como *scavenger* de EROs, tais como o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (ZAFARULLAH *et al.*, 2003). Para avaliar se a adição de um antioxidante poderia interferir na ação citotóxica da simvastatina nas células WM9, realizamos ensaios de avaliação da viabilidade celular após tratamento conjunto com ambas as drogas.

A Figura 27 ilustra o efeito da pré-incubação das células WM9 durante 3h com diferentes concentrações (2,5, 5 e 10mM) de NAC, e posterior tratamento com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina por 72h. Não foi observada diminuição do efeito citotóxico da sinvastatina em células pré-tratadas com NAC em relação aos resultados obtidos sem a adição do antioxidante, visto que a viabilidade das células permanece em torno de 90% após 72h de tratamento com 0,25 $\mu$ mol/L de sinvastatina. Para células tratadas com 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina também não ocorrem diferenças estatisticamente significativas entre células pré-tratadas ou não-tratadas com NAC. Assim sendo, pode-se inferir que a adição de NAC não recupera a viabilidade das células de melanoma humano tratadas com sinvastatina.

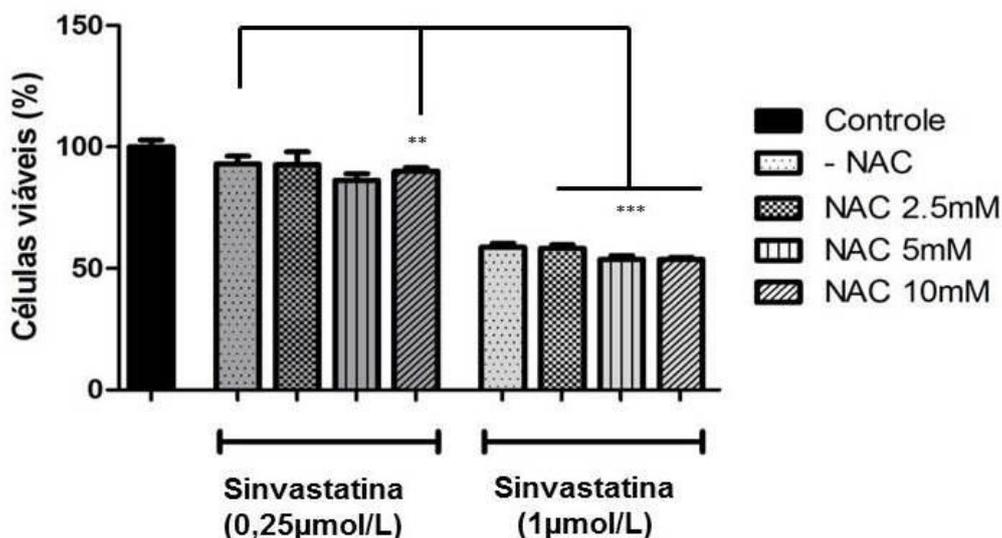


FIGURA 27 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM NAC

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 tratadas com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina, após 3h de pré-tratamento com NAC. Na condição controle foi adicionado somente o veículo da droga: etanol. O resultado é representado pela média  $\pm$  SEM das porcentagens de células viáveis de três experimentos independentes realizados em triplicata, sendo que o controle é representado como 100%. As significâncias estatísticas obtidas em relação a cada dose são referentes à condição controle (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 7.10.2 Avaliação dos efeitos da NAC na indução de senescência celular induzida por sinvastatina

Células WM9 foram pré-tratadas com 2,5mM de NAC, e posteriormente tratadas com as mesmas doses de sinvastatina utilizadas para experimentos de viabilidade durante 72h. Após este tempo, utilizou-se o protocolo para avaliação de

senescência associada à atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Pode-se verificar visivelmente que as células pré-tratadas com NAC continuam desenvolvendo coloração positiva indicativa de senescência, assim como quando tratadas somente com a sinvastatina (Figura 28).

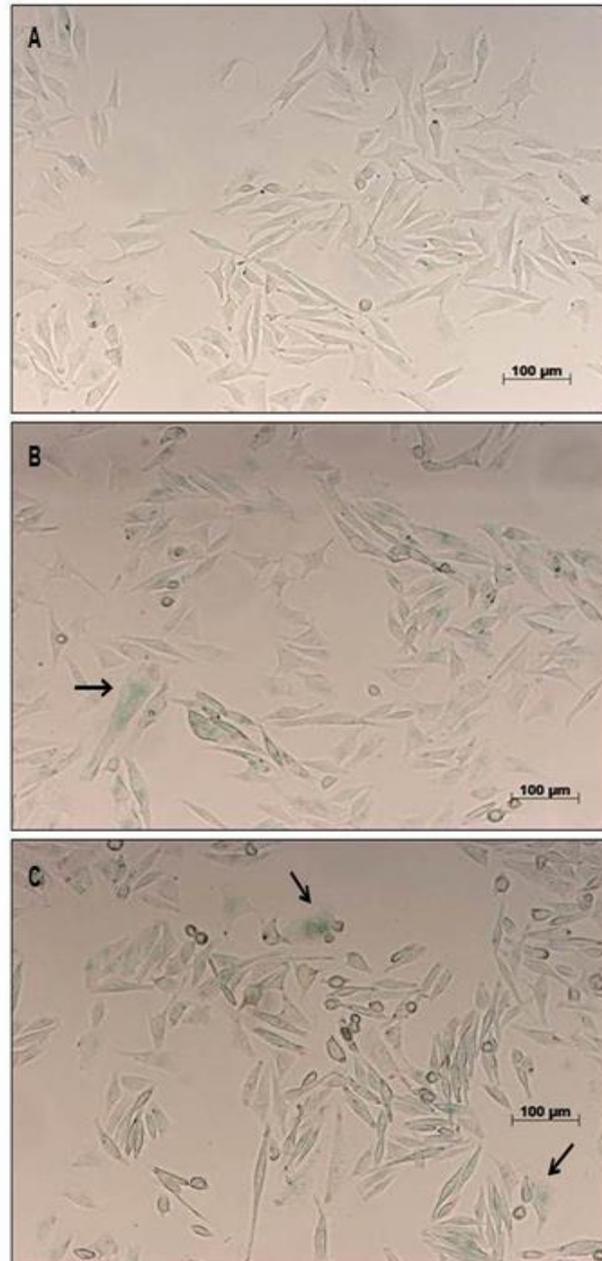


FIGURA 28 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM NAC E SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADA À ATIVIDADE DE  $\beta$ -GAL

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Micrografias representativas de células WM9 após tratamento com sinvastatina por 72h (aumento de 100x). A – Células pré-tratadas com 2,5mmol/L de NAC durante 3h e posteriormente tratadas somente com o veículo da droga (controle), não-coradas. B e C – Células pré-tratadas com

2,5mmol/L de NAC durante 3h e posteriormente tratadas com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina, respectivamente, mostrando o desenvolvimento de coloração azul característica de células senescentes. As setas demonstram a presença de multinucleação.

Visto que a pré-incubação com NAC não foi capaz de restaurar a perda de viabilidade das células WM9 causada pelo tratamento com sinvastatina e também aparentemente não modificou a marcação positiva destas células para o ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase frente ao tratamento, procuramos avaliar a ação de compostos que são capazes de interferir diretamente na ação das proteínas envolvidas na indução de senescência mediada por sinvastatina.

## 7.11 ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE 3-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE (ATZ) EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

### 7.11.1 Avaliação da ação do ATZ na citotoxicidade induzida por sinvastatina

Os resultados da quantificação de RNAm das enzimas antioxidantes medidos por RT-qPCR demonstraram a maior expressão de catalase em células WM9 tratadas com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina (Figura 25). O ATZ (3-amino-1,2,4-triazole) é um inibidor da atividade da catalase (MARGOLIASH e NOVOGRODSKY, 1958) e dados da literatura mostram que o tratamento com ATZ promove apoptose de células tratadas, resposta que é amplificada na presença de EROs (DUNNING *et al.*, 2013). Diante desses dados, procuramos avaliar os efeitos da inibição da catalase mediada por ATZ em células WM9 tratadas com sinvastatina. Para isto, estas células foram cotratadas com 20mM de ATZ e com sinvastatina durante 72h.

Os resultados estão representados na Figura 29. Pode-se observar que a adição de ATZ possui um efeito citotóxico em células WM9, quando se compara a condição controle na ausência de ATZ e a condição controle na presença somente de ATZ e ausência de sinvastatina. A diminuição de viabilidade entre estas condições é de cerca de 22%.

Em relação ao controle na presença de ATZ, células WM9 cotratadas com 0,25 $\mu$ mol/L de sinvastatina demonstram uma redução de 10% de viabilidade. Aqui podemos ressaltar que, para células tratadas somente com 0,25 $\mu$ mol/L de sinvastatina (72h) pode-se observar uma diminuição de 7% da viabilidade celular, resultado que não é estatisticamente significativo (Figura 13). Ainda, para o cotratamento com ATZ na presença de 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina, esta redução é de 30%, sendo que células tratadas com 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina apresentam redução

de viabilidade de 24% (Figura 13). Estes dados sugerem que a adição do ATZ poderia potencializar a perda de viabilidade mediado pela sinvastatina.

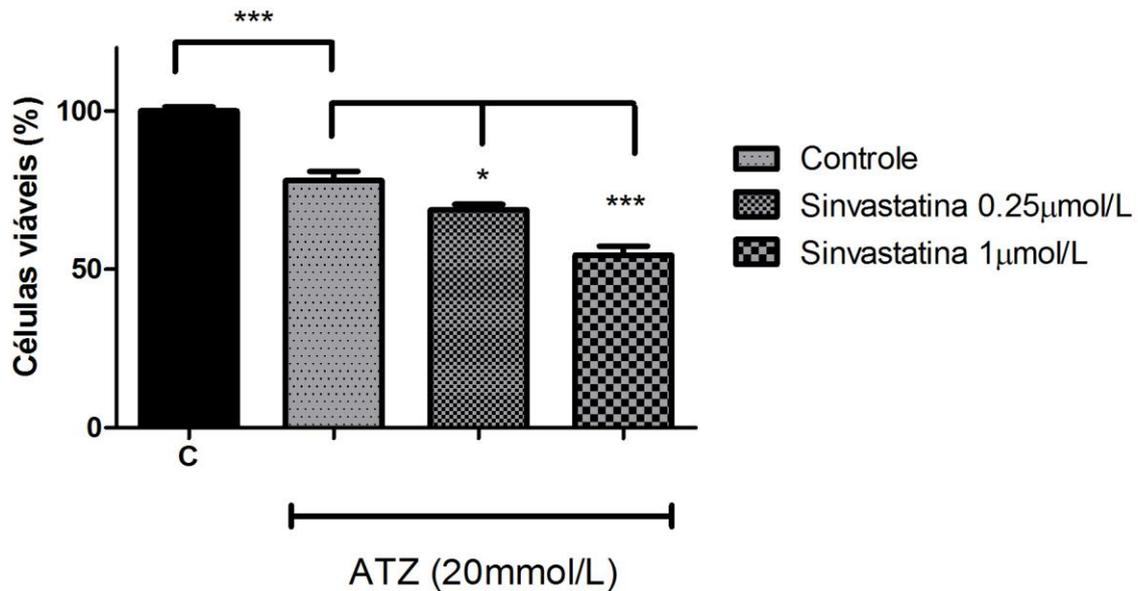


FIGURA 29 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA E COTRATADAS COM ATZ

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 tratadas com 0,25 e 1 μmol/L de sinvastatina após cotratamento com 20mmol/L de ATZ durante 72h. Barra preta: controle (células não cotratadas com ATZ, tratadas somente com o veículo da sinvastatina: etanol); Barras em cinza: células cotratadas com ATZ (controle = somente com ATZ) e sinvastatina durante 72h. O resultado é representado pela média ± SEM das porcentagens de células viáveis de três experimentos independentes realizados em triplicata. O controle cotratado com ATZ foi considerado como 100% de células viáveis (\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 7.11.2 Avaliação dos efeitos do ATZ na indução de senescência celular induzida por sinvastatina

Os efeitos na senescência celular da adição de ATZ em células WM9 tratadas com sinvastatina foram avaliados pela análise da atividade de β-gal associada à senescência.

Os resultados estão representados na Figura 30 e pode-se observar visualmente que o cotratamento com o ATZ não é capaz de reverter a senescência de células WM9 mediada por sinvastatina, visto que ainda é possível observar o aparecimento da coloração azul característica de células senescentes, para ambas as concentrações de sinvastatina testadas na presença de ATZ.

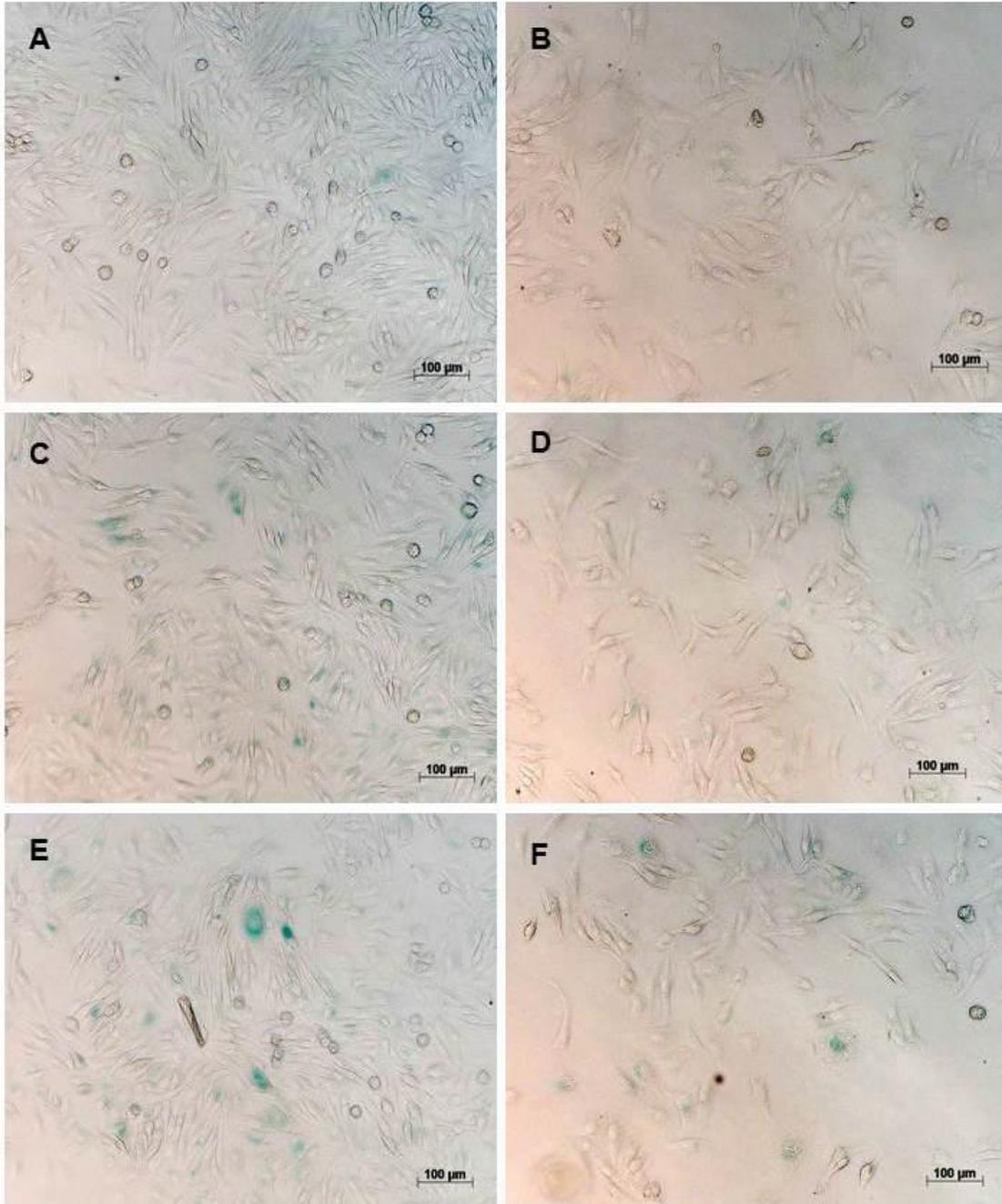


FIGURA 30 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA, COTRATADAS COM ATZ E SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADA À ATIVIDADE DE  $\beta$ -GAL

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Micrografias representativas de células WM9 após tratamento com sinvastatina por 72h (aumento de 100x). A – Células WM9 na ausência de ATZ, tratadas somente com veículo da sinvastatina (etanol); C e E – Células WM9 não cotratadas com ATZ e tratadas durante 72h com 0,25 e 1  $\mu$ mol/L de sinvastatina, respectivamente; B – Células cotratadas com 20mmol/L de ATZ e com o veículo da sinvastatina (etanol), não-coradas. F e H – Células cotratadas com 20mmol/L de ATZ e 0,25 e 1  $\mu$ mol/L de sinvastatina por 72h.

## 7.12 ANÁLISE DOS EFEITOS DA ADIÇÃO DE PIFITRINA- $\alpha$ EM CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

### 7.12.1 Avaliação da ação da pifitrina- $\alpha$ na citotoxicidade induzida por sinvastatina

A pifitrina- $\alpha$  (PFT) é um bloqueador reversível da atividade transcricional de p53, atingindo importantes processos relacionados a ativação desta proteína. É um composto capaz de proteger células normais contra a ação letal de quimioterápicos e radioterapia (KOMAROV *et al.*, 1999).

Visto que ocorre aumento da expressão e da ativação de p53 em células WM9 tratadas com sinvastatina, avaliamos o efeito do pré-tratamento das células de melanoma com pifitrina- $\alpha$ , com posterior tratamento com sinvastatina nas condições já conhecidas.

Os resultados estão representados na Figura 31 e demonstram que o pré-tratamento das células WM9 com pifitrina- $\alpha$  não foi capaz de reverter a perda de viabilidade celular induzida pela sinvastatina após 72h de tratamento, sendo para a dose de 0,25 $\mu$ mol/L não ocorre alteração da viabilidade em relação ao controle, ao passo que há diminuição de 30% de células viáveis para a dose de 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina.

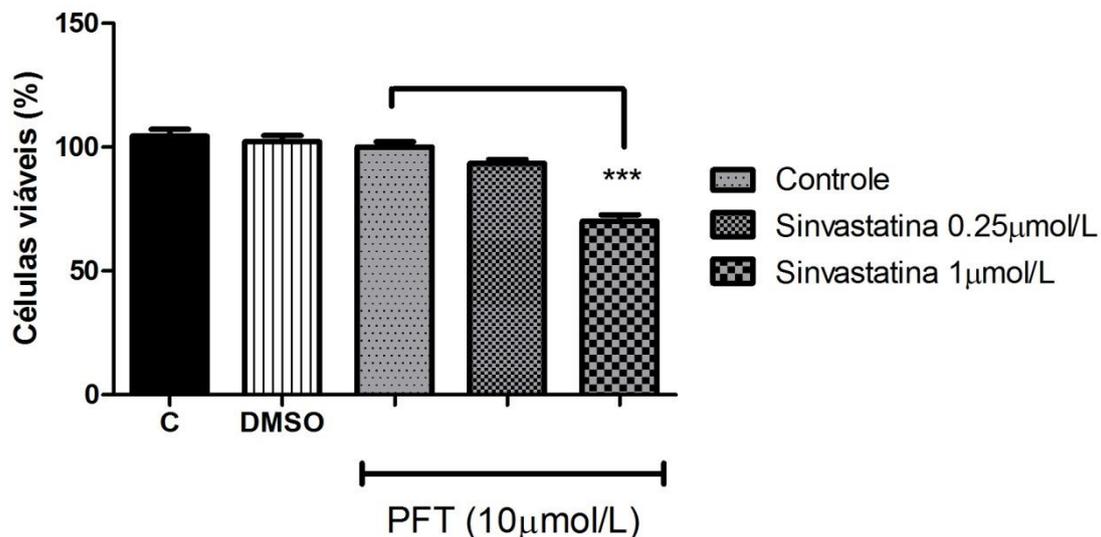


FIGURA 31 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM PIFITRINA- $\alpha$

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Gráfico da viabilidade das células WM9 tratadas com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina após 2h de pré-tratamento com 10 $\mu$ mol/L de pifitrina- $\alpha$ . Barra preta: controle (células não pré-tratadas com pifitrina- $\alpha$ , tratadas somente com o veículo da sinvastatina: etanol); Barra branca: células pré-tratadas com DMSO (veículo da pifitrina- $\alpha$ ) e posteriormente tratadas somente com o veículo da sinvastatina (etanol). Barras em cinza: células pré-tratadas com pifitrina- $\alpha$  e posteriormente tratadas com

sinvastatina durante 72h. O resultado é representado pela média  $\pm$  SEM das porcentagens de células viáveis de três experimentos independentes realizados em triplicata. O controle pré-tratado com pifitrina- $\alpha$  foi considerado como 100% de células viáveis (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

#### 7.12.2 Avaliação dos efeitos da pifitrina- $\alpha$ na indução de senescência celular induzida por sinvastatina

Da mesma forma, foi avaliado se o pré-tratamento com 10 $\mu$ mol/L de pifitrina- $\alpha$  é capaz de alterar a atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência de células WM9 tratadas com sinvastatina.

A Figura 32 mostra as micrografias de células tratadas somente com sinvastatina nas doses de 0,25 e 1 $\mu$ mol/L e células submetidas ao pré-tratamento com pifitrina- $\alpha$  e posterior tratamento com sinvastatina nas mesmas condições. Pode-se observar, como já demonstrado, que o tratamento com sinvastatina induz o aparecimento da coloração azul característica de maior atividade de  $\beta$ -galactosidase, acompanhado das mudanças morfológicas já descritas. Entretanto, em células pré-tratadas com pifitrina- $\alpha$  pode-se observar que, para ambas as concentrações de sinvastatina, não ocorre o desenvolvimento da cor azul, e as células permanecem com aparência translúcida e morfologia habitual, como demonstrado nas condições controle.

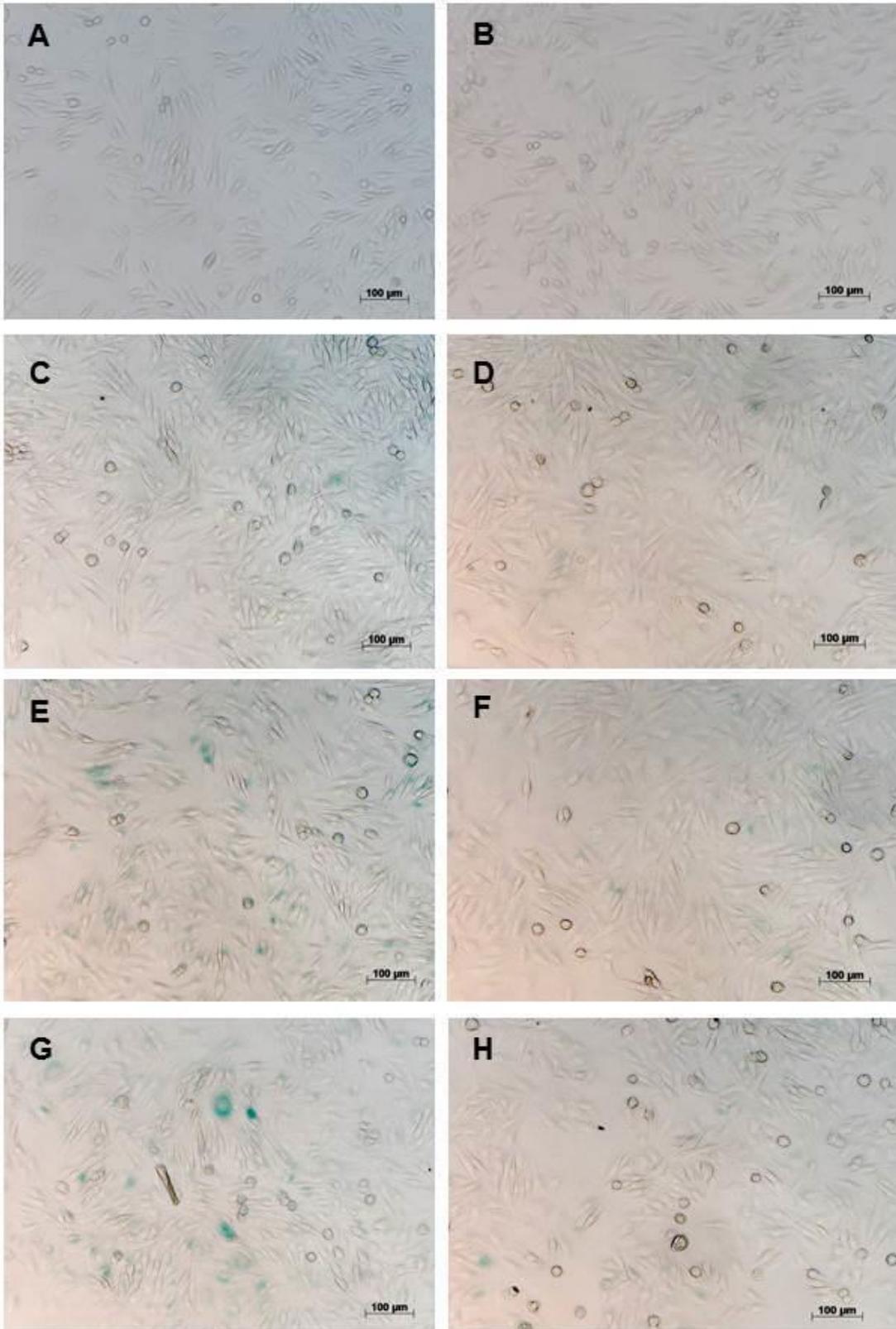


FIGURA 32 – MICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM PIFITRINA- $\alpha$  E SUBMETIDAS A ENSAIO DE SENESCÊNCIA ASSOCIADA À ATIVIDADE DE  $\beta$ -GAL  
FONTE: O autor (2014)

NOTA: Micrografias representativas de células WM9 após tratamento com sinvastatina por 72h (aumento de 100x). A – Células WM9 não pré-tratadas com pifitrina- $\alpha$  e não tratadas com sinvastatina; B – Células WM9 pré-tratadas durante 2h somente com DMSO (veículo da pifitrina- $\alpha$ ) e posteriormente incubadas por 72h com o veículo da sinvastatina (etanol); C – Células WM9 na ausência de pifitrina, tratadas somente com veículo da sinvastatina (etanol); E e G – Células WM9 não pré-tratadas e tratadas durante 72 com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina, respectivamente; D – Células pré-tratadas com 10 $\mu$ mol/L de pifitrina- $\alpha$  durante 2h e posteriormente tratadas somente com o veículo da droga (controle), não-coradas. F e H – Células pré-tratadas com 10 $\mu$ mol/L de pifitrina- $\alpha$  durante 2h e posteriormente tratadas com 0,25 e 1 $\mu$ mol/L de sinvastatina, não coradas.

O pré-tratamento com pifitrina- $\alpha$  é capaz de reverter a indução de atividade de  $\beta$ -gal associada a senescência em células WM9 tratadas com sinvastatina, o que corrobora os dados de expressão, que demonstraram que o fenótipo senescente das células tratadas está relacionado com a maior expressão e ativação de p53.

### 7.13 EFEITOS DA PIFITRINA- $\alpha$ E DO ATZ NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

Visto que a senescência é um processo de parada de proliferação celular, e levando em consideração os resultados obtidos para a atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência com o uso dos inibidores de p53 e catalase, procuramos avaliar a ação destes inibidores na progressão do ciclo celular de células tratadas com sinvastatina.

Como demonstrado anteriormente, a sinvastatina induz o aumento da porcentagem de células em G1-S a partir da concentração de 0,25 $\mu$ mol/L, com concomitante diminuição em G2-M (Figura 17). Além disso, células WM9 tratadas com sinvastatina desenvolvem coloração azul característica de células senescentes (Figura 18), efeito que é revertido pelo pré-tratamento com pifitrina- $\alpha$  (Figura 32), porém não é alterado pela adição de ATZ (Figura 30).

Resultados preliminares indicam que o inibidor de p53 (pifitrina- $\alpha$ ) pode ser capaz de alterar a ação da sinvastatina na progressão do ciclo celular das células WM9 tratadas com sinvastatina. Os resultados estão representados na Figura 33 e pode-se verificar que não há aumento da porcentagem de células em G1-S quando as células WM9 foram pré-tratadas com pifitrina- $\alpha$  seguido do tratamento com sinvastatina, o que estaria de acordo com os resultados da análise de atividade de  $\beta$ -galactosidase após o pré-tratamento com este inibidor. Ainda, ocorre o aumento da porcentagem de células com conteúdo de DNA fragmentado (SubG1) após pré-tratamento com pifitrina na maior dose de sinvastatina (1 $\mu$ mol/L), com concomitante diminuição da porcentagem de células em G2-M.

Por outro lado, a adição do inibidor de catalase (ATZ) é capaz de aumentar de maneira expressiva o conteúdo de DNA fragmentado, o que está de acordo com os resultados dos ensaios de viabilidade celular, que indicam ação citotóxica deste composto para as células WM9. Em células cotratadas com sinvastatina, pode-se notar que a quantidade de DNA fragmentado é diminuída, quando comparada à condição controle (células na presença somente de ATZ). Além disso, na presença de ATZ e sinvastatina ocorre o aumento da porcentagem de células em G1-S, o que corrobora os resultados dos ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência (Figura 30). Não ocorrem alterações, porém, nas porcentagens de células em G2-M.

É importante frisar que estes resultados se referem a um experimento realizado em duplicata, e por se tratar de um resultado preliminar, não foram realizadas análises estatísticas.

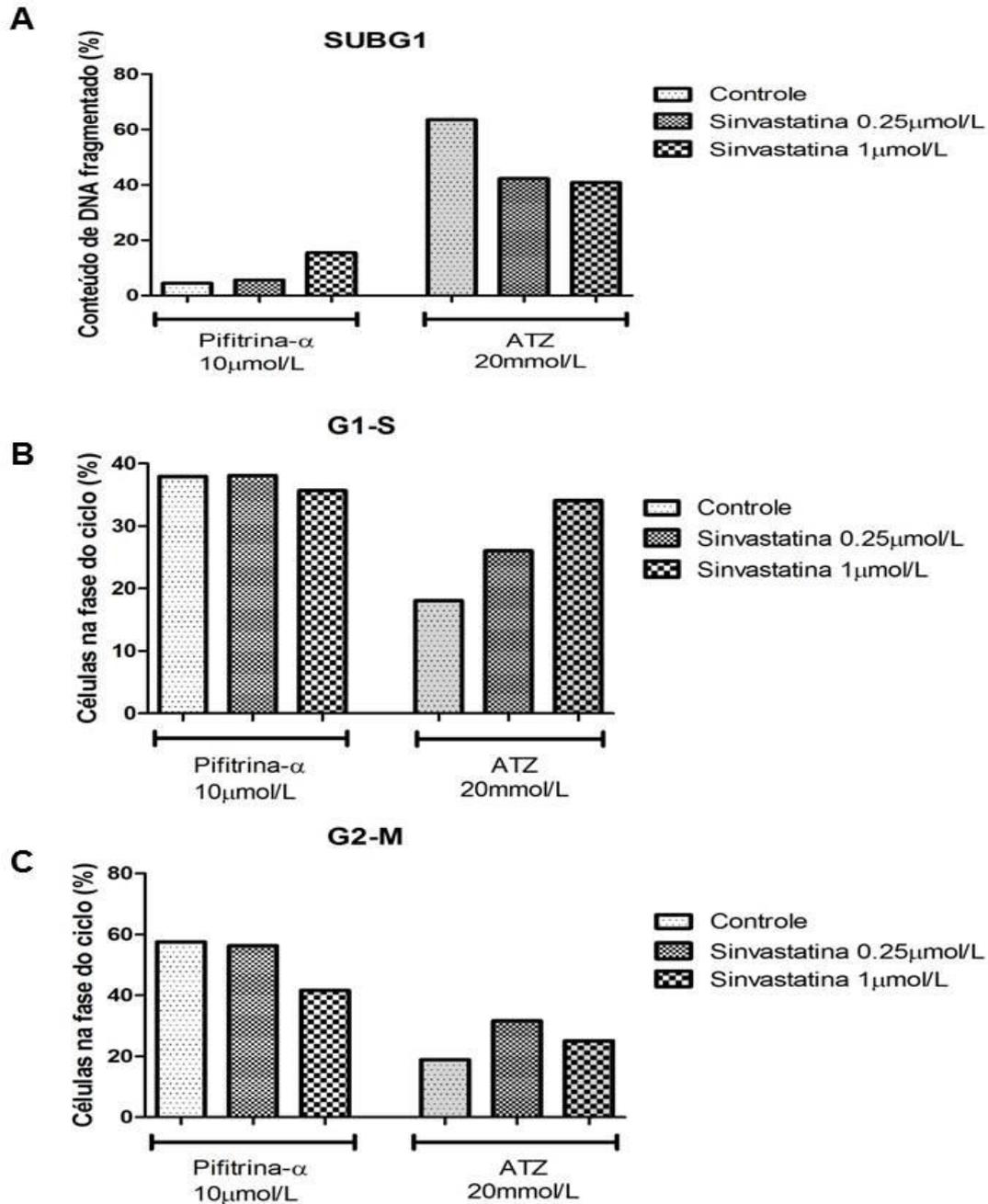


FIGURA 33 – EFEITO DA PIFITRINA- $\alpha$  E DO ATZ NA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: A – Gráfico representativo da porcentagem de conteúdo de DNA fragmentado (SubG1) de células WM9 submetidas a pré-tratamento com 10 μmol/L de pifitrina- $\alpha$  durante 2h, e posteriormente tratadas com simvastatina (72h), e de células WM9 submetidas a cotratamento com simvastatina e ATZ durante 72h. Estas análises foram realizadas através de citometria de fluxo. B e C – Gráfico representativo das porcentagens de células WM9 nas fases G1-S e G2-M, respectivamente, quando na presença de pifitrina- $\alpha$ , ATZ e simvastatina, como mencionado.

#### 7.14 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PIFITRINA- $\alpha$ E DO ATZ NOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

Em razão dos efeitos obtidos com a adição dos inibidores em células WM9 tratadas com sinvastatina para os ensaios de avaliação da senescência celular e da progressão do ciclo celular, procuramos analisar a ação do inibidor de p53 (pifitrina- $\alpha$ ) e do inibidor de catalase (ATZ) nos níveis intracelulares de EROs destas células.

Para avaliar se a adição dos inibidores é capaz de alterar os níveis de EROs intracelulares em células tratadas com sinvastatina utilizamos a medida da fluorescência da sonda DCFH-DA através de citometria de fluxo, como descrito anteriormente. O protocolo para a adição da pifitrina- $\alpha$  e do ATZ foi o mesmo utilizado nos experimentos de viabilidade e de ensaio de atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência.

Os resultados estão representados na Figura 34. A partir dos histogramas obtidos pode-se observar que o pré-tratamento das células WM9 com pifitrina- $\alpha$  é capaz de diminuir os níveis de EROs intracelulares de células tratadas com 0,25 e 1  $\mu$ mol/L de sinvastatina, após 72h de tratamento, em comparação à condição controle, o que indica que a inibição de p53, além de reverter a senescência induzida por sinvastatina, também inibe o acúmulo de EROs intracelular.

Em relação ao cotratamento com ATZ, não foram observadas alterações nas quantidades de EROs de células na presença de ATZ, em relação a células WM9 na presença concomitante de ATZ e sinvastatina em ambas as doses testadas. Estes resultados nos permitem sugerir que a ação da catalase não é fundamental para a indução de senescência de células tratadas com sinvastatina, podendo contribuir apenas em parte para este processo. Ainda, deve-se frisar que o aumento de expressão pode não necessariamente corresponder ao aumento de atividade da catalase em células de melanoma tratadas com sinvastatina.

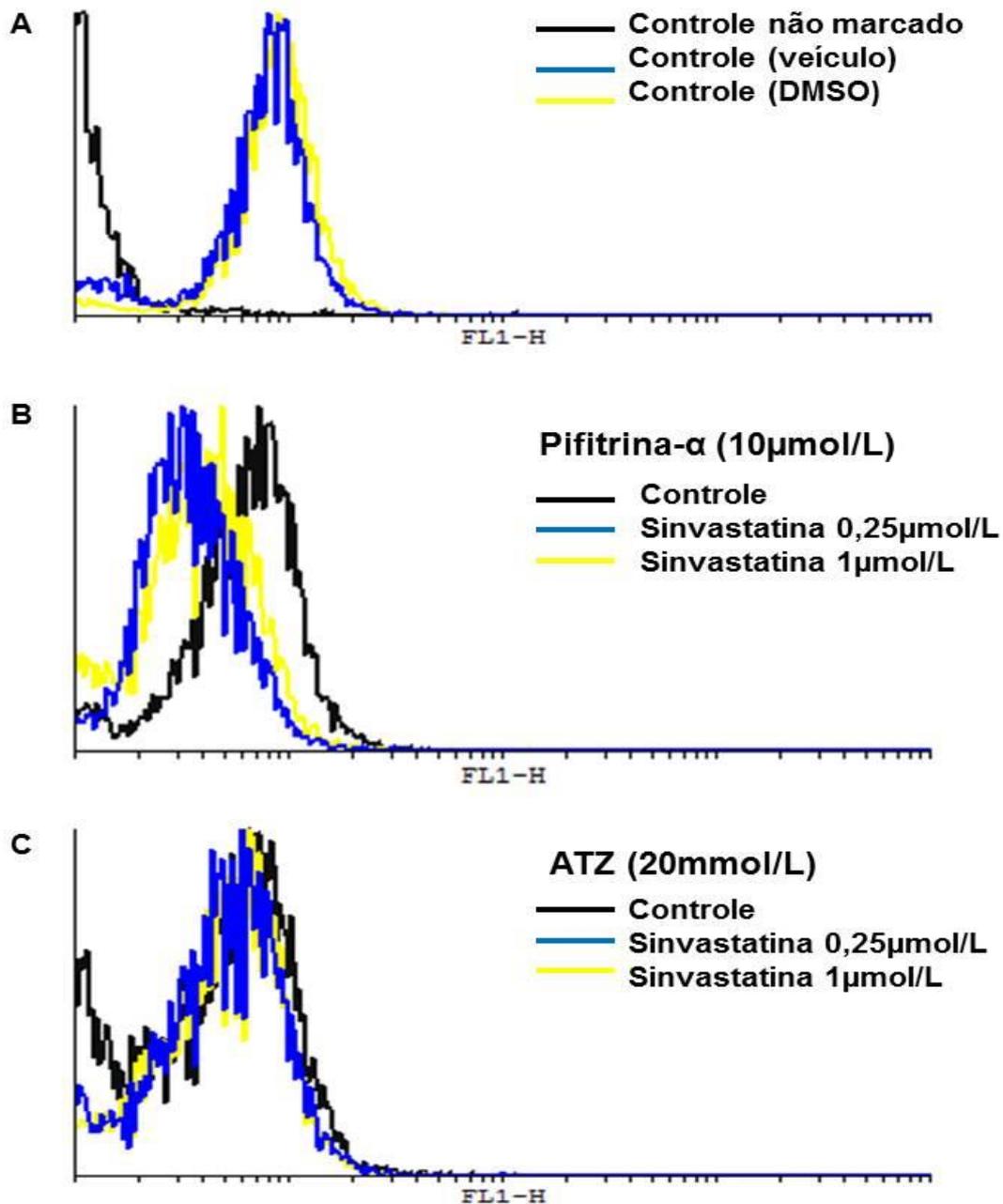


FIGURA 34 – EFEITO DA PIFITRINA- $\alpha$  E DO ATZ NOS NÍVEIS DE EROs INTRACELULARES DE CÉLULAS WM9 TRATADAS COM SINVASTATINA

FONTE: O autor (2014)

NOTA: A avaliação dos níveis de EROs intracelulares foi realizada por citometria de fluxo, utilizando a sonda DCFH-DA. A – Linha preta: controle somente com células WM9 na ausência de sonda DCFH-DA (não marcadas); Linha azul: células WM9 marcadas com sonda DCFH-DA e incubadas somente com o veículo da simvastatina (etanol); Linha amarela: células WM9 pré-tratadas com DMSO (veículo pifitrina- $\alpha$ ) na presença de DCFH-DA. B – Células pré-incubadas com 10 $\mu$ mol/L de pifitrina- $\alpha$  durante 2h, e posteriormente tratadas com simvastatina. Linha preta: controle (somente veículo, células pré-tratadas com pifitrina- $\alpha$ ); Linha azul (0,25 $\mu$ mol/L de simvastatina); Linha preta (1 $\mu$ mol/L de simvastatina). C – Células cotratadas com simvastatina e 20mmol/L de ATZ durante 72h. Linha preta: controle (somente veículo, células na presença de ATZ); Linha azul (0,25 $\mu$ mol/L de simvastatina); Linha preta (1 $\mu$ mol/L de simvastatina). Histogramas representativos de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

## 8 DISCUSSÃO

O melanoma é um tumor de pele originário dos melanócitos que, quando evolui para a forma metastática, torna-se altamente resistente aos tratamentos disponíveis e possui prognóstico ruim (MILLER e MIHM, 2006). Vários estudos caracterizaram as alterações moleculares que levam ao desenvolvimento do melanoma, e outros estão em andamento a fim de identificar e testar compostos que sejam capazes de atingir os componentes alterados que modulam os processos de senescência, controle da proliferação e morte celular dos melanócitos (revisado por PALMIERI *et al.*, 2009; ROTHER e JONES, 2009). As estatinas são fármacos originalmente utilizados para o tratamento da hipercolesterolemia, e possuem um perfil de alta eficácia e segurança. A ação redutora do colesterol destes fármacos se dá pela inibição competitiva da atividade da enzima HMG-CoA redutase, a qual realiza a conversão do HMG-CoA a mevalonato, na etapa limitante da via de síntese do colesterol que acontece no fígado (SCHACHTER, 2005; LENNERNAS e FAGER, 1997).

Muitos dos efeitos das estatinas, entretanto, não estão relacionados à redução dos níveis de colesterol. Estudos de triagem randomizada controlada para avaliação de doença cardiovascular indicaram que as estatinas poderiam exercer uma função importante na prevenção de tumores, reduzindo a incidência de câncer colorretal e de melanoma, por exemplo (DEMIERRE e SONDAK, 2005). Além disso, há evidências de que o uso regular de estatinas pode atuar de forma benéfica na progressão do melanoma, estando associado com a redução da densidade de Breslow. A densidade de Breslow é um índice de massa tumoral calculado a partir da medida de profundidade e diâmetro da lesão, que está relacionado ao prognóstico da doença (KOOMEN *et al.*, 2007; BRESLOW, 1970). Estudos *in vitro* demonstraram que a sinvastatina, bem como outras estatinas, possuem ação antitumoral em vários tipos de linhagens celulares, e que esta ação ocorre através de diversos mecanismos. Em células de melanoma, a lovastatina, a atorvastatina, a mevastatina e a sinvastatina são capazes de reduzir a viabilidade celular, induzir alterações morfológicas, apoptose, parada de proliferação e inibição da invasão celular (GLYNN *et al.*, 2008; SHELLMAN *et al.*, 2005; COLLISSON *et al.*, 2003). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com estes estudos, sendo que a redução de viabilidade das células de melanoma humano WM9 após o tratamento com sinvastatina ocorreu em todos os tempos testados, que variaram de 72 a 168h

(Figura 13). Além disso, as análises microscópicas demonstraram a ocorrência de alterações morfológicas, e com o uso de maiores concentrações de sinvastatina as células demonstram-se desaderidas e arredondadas (Figura 14). Estas alterações ocorrem devido à indução de apoptose, como demonstrado para células WM9 tratadas com 1 e 5 $\mu$ mol/L de sinvastatina (Figura 15 – A). Nossos resultados, portanto, estão de acordo com dados previamente publicados que confirmam que a sinvastatina é capaz de induzir apoptose em uma ampla variedade de linhagens celulares, e este efeito está relacionado ao uso de concentrações mais altas deste fármaco (CAFFORIO *et al.*, 2005; HOQUE *et al.*, 2008; RELJA *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2009).

Além da indução da morte celular por apoptose, também há indícios de efeitos de inibição do crescimento de células de melanoma pela sinvastatina. SAITO e colaboradores (2008) demonstraram para diversas linhagens celulares de melanoma (A375M, G361, C8161, GAK e MMac) que o uso de uma dose relativamente alta de sinvastatina (10 $\mu$ mol/L) induz a parada do ciclo celular na fase G1, e que este efeito parece ser mediado pelo aumento da expressão de p21 e p27. Neste trabalho demonstramos que após o tratamento com sinvastatina ocorreu o aumento da porcentagem de células WM9 na fase G1 do ciclo celular, sendo que este aumento ocorreu a partir da concentração de 0,25 $\mu$ mol/L (Figuras 16 e 17). Este aumento foi acompanhado pela redução da quantidade de células nas fases G2-M, o que de fato indica a parada de proliferação. Desta forma, e levando em consideração os resultados obtidos para a marcação com PI (Figura 15 – B), podemos sugerir que após o tratamento com sinvastatina a proporção de células WM9 que param de proliferar é maior do que a de células mortas.

A parada de proliferação é o principal indício da ocorrência de senescência celular. Este processo foi originalmente descrito por HAYFLICK e MOORHEAD (1961) como a perda de capacidade replicativa das células em cultura, e assim foi denominado “senescência replicativa” (RS). O principal mecanismo de indução da senescência replicativa é o encurtamento telomérico (BLASCO, 2005). Recentemente, a aplicação clínica da senescência na terapia contra tumores entrou em evidência, especialmente para o melanoma (GIULIANO *et al.*, 2011). A denominada “senescência induzida por terapia” (TIS) compartilha a maioria dos aspectos fenotípicos demonstrados na RS e na senescência induzida por oncogene (OIS). Por exemplo, células senescentes demonstram alterações na expressão de

genes específicos, estritamente relacionados à regulação do crescimento celular, tais como p16, p53, p21. Além disso, estas células também apresentam alterações morfológicas características, que incluem o aumento de tamanho celular, o aparecimento de multinucleações e a atividade aumentada da enzima lisossomal  $\beta$ -galactosidase (MULLER, 2009; ZHANG e YANG, 2011; GIULIANO *et al.*, 2011). Após o tratamento das células WM9 com sinvastatina durante 72h foram evidenciados o aumento da porcentagem de células na fase G1-S do ciclo celular (a partir de 0,25 $\mu$ mol/L) (Figura 17) e a marcação positiva das células tratadas para atividade de  $\beta$ -gal (Figura 18) em todas as concentrações testadas, aspectos que são típicos da ocorrência de senescência celular. Ainda, pôde-se observar o achatamento das células e o surgimento de multinucleações, principalmente nas maiores concentrações de sinvastatina (0,5 e 1 $\mu$ mol/L) (Figura 18). Resultados similares foram observados quando a atividade de  $\beta$ -gal associada à senescência foi avaliada em células WM35 após o tratamento com sinvastatina (Figura 19), o que indica que estes efeitos não são específicos para as células WM9.

Recentemente, alguns estudos começaram a investigar o papel das estatinas na senescência celular, e foi demonstrado que o tratamento de células de câncer de próstata humanas tratadas durante 5 dias com 0,3 $\mu$ mol/L de lovastatina induz senescência e parada do ciclo celular em G1 (LEE *et al.*, 2006). Além disso, a ocorrência do fenótipo senescente nestas células foi relacionada à translocação defeituosa da proteína RhoA para a membrana celular, e pôde ser revertida pela adição de GGPP ou mevalonato.

Embora outro estudo tenha demonstrado que a sinvastatina em concentrações terapêuticas (100nmol/L) é capaz de induzir senescência em células epiteliais prostáticas após 5 dias de tratamento, com expressão aumentada de p21 (MURTOLA *et al.*, 2011), nossos resultados demonstraram pela primeira vez que o uso de uma estatina induz senescência em células de melanoma.

O uso de fármacos quimioterápicos para indução de senescência celular começou com a doxorubicina e a cisplatina (ELMORE *et al.*, 2002; CHANG *et al.*, 1999). Estes e outros trabalhos indicaram que a senescência ocorre geralmente quando são utilizadas baixas concentrações do composto, enquanto que concentrações mais altas levam à morte celular por apoptose (GIULIANO *et al.*, 2011). Considerando os dados destes estudos e nossos resultados, a sinvastatina pode ser inserida neste perfil, pois está bem caracterizado que seu uso em

concentrações mais elevadas causa apoptose, e a relação da administração de concentrações mais baixas com a indução de senescência está sendo estabelecida.

Desta forma, com o objetivo de esclarecer o mecanismo molecular da senescência induzida por sinvastatina, investigamos os níveis de RNAm dos principais componentes regulatórios envolvidos na progressão do ciclo celular. A proteína p16, codificada por *INK4A/ARF*, bloqueia a progressão do ciclo na fase G1 através da inibição do complexo CDK4/6-ciclina D, e está ativada na OIS após estímulo oncogênico (ROMAGOSA *et al.*, 2011). Este mecanismo está envolvido na senescência dos melanócitos, levando à formação do *nevus* melanocítico (MOOI e PEEPER, 2006). Nossos resultados mostram que os níveis de RNAm de p16 em células WM9 foram aumentados pelo tratamento com sinvastatina, mas somente para a menor concentração testada (0,25µmol/L) (Figura 20), o que poderia indicar que a sinvastatina é capaz de induzir senescência através do conhecido mecanismo de inativação de Rb (HA *et al.*, 2008; ENGLAND *et al.*, 1996). Este aumento, entretanto, não foi detectado para a proteína p16. É importante notar que, embora a transcrição deste gene esteja aumentada, este efeito pode não se refletir imediatamente na expressão proteica. Além disso, a atividade de p16 na regulação do ciclo celular ocorre no núcleo (ROMAGOSA *et al.*, 2011), e o extrato de proteínas totais pode não refletir o status de expressão desta proteína no núcleo, visto que também contém p16 citoplasmática. Os níveis de RNAm de p14 (ARF), produto alternativo de *INK4A/ARF* não foram alterados pelo tratamento das células WM9 com sinvastatina (Figura 20). A proteína p14/ARF estabiliza os níveis de p53 através da inibição de HDM2, ubiquitina ligase responsável pelo endereçamento de p53 à degradação proteossomal (KIM e SHARPLESS, 2006).

A proteína p53 é extremamente importante para o estabelecimento da senescência replicativa e para a senescência induzida por estresse, pois é ativada em resposta a danos ao DNA. Já está estabelecido que a indução de senescência celular ligada a estresse pode estar relacionada à ativação de duas vias principais: a via da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38<sup>MAPK</sup>) e a via de p53/p21 (MULLER, 2009). Não foi observado o aumento dos níveis de proteína p38 fosforilada e total em células WM9 tratadas com sinvastatina, quando comparadas à condição controle (Figura 26). Por outro lado, os níveis de expressão de RNAm de p53 e da proteína p53 fosforilada estão significativamente aumentados em células WM9 tratadas com ambas as doses testadas de sinvastatina (0,25 e 1µmol/L)

(Figura 21), o que sugere que a indução de senescência pela sinvastatina ocorre de maneira direta via p53, sem a necessidade de ativação da proteína p38 para posterior ativação de p53.

De fato, a senescência induzida por terapia (TIS) em resposta a agentes quimioterapêuticos, tais como a doxorrubicina e a cisplatina, está relacionada a ativação de p53 e a danos ao DNA (CHANG *et al.*, 1999). De fato, neste trabalho a avaliação da ativação de p53 em células WM9 tratadas com sinvastatina foi realizada pela detecção da fosforilação da serina 15 (Tabela 3, Materiais e Métodos 6.6.2), que ocorre após o DNA sofrer dano (SHIEH *et al.*, 1997). Recentemente, o fenótipo senescente induzido pelo sunitinib (inibidor de tirosina quinases considerado promissor no tratamento do câncer) em células de carcinoma renal também foi associado à ativação de p53 (ZHU *et al.*, 2013b). De maneira similar, a temozolomida (TMZ), um conhecido agente alquilante de DNA, também foi capaz de induzir parada de ciclo celular na fase G2/M e senescência dependentes de p53 em células de melanoma. De maneira interessante, após a exposição à TMZ, a porcentagem de células senescentes foi maior para linhagens celulares expressando p53 do tipo selvagem, do que para células com p53 mutante (MHAI DAT *et al.*, 2007).

É sabido que a ativação de p53 inicia uma série de eventos transcricionais que induzem resposta citostática e senescência. Um destes eventos é o acúmulo de proteína p21, um inibidor de CDKs de amplo espectro que causa parada de proliferação (HASTY e CHRISTY, 2013). De fato, os níveis de RNAm e proteína p21 encontram-se aumentados em células WM9 após o tratamento com sinvastatina (Figuras 20 e 21), o que reforça o papel da via de p53 no estabelecimento do fenótipo senescente mediado por este fármaco.

Um dos fatores de estresse envolvidos no desenvolvimento da senescência é o aumento dos níveis de EROs intracelulares, que foi primeiramente descrito em fibroblastos, e está relacionado ao aumento de p53 (CHEN *et al.*, 1998). Nossos resultados demonstram um aumento dependente de concentração dos níveis de EROs intracelulares em células WM9 após 72h de tratamento com sinvastatina (Figuras 22 e 23). É interessante notar que os níveis aumentados de EROs podem ser percebidos após 24h de tratamento com sinvastatina (1 $\mu$ mol/L) (Figura 24), o que nos permite sugerir que o desequilíbrio redox é um efeito precoce para células de melanoma tratadas com sinvastatina. Vários estudos têm demonstrado os efeitos pró-oxidantes desta droga. Por exemplo, células HepG2 tratadas com altas

concentrações de sinvastatina demonstraram níveis diminuídos de coenzima Q (CoQ), o que foi correlacionado com a morte celular e aumento de danos ao DNA (TAVINTHARAN *et al.*, 2007). Além disso, foi observada a maior geração de EROs em células de câncer de mama tratadas com sinvastatina, o que foi diretamente relacionado à síntese diminuída de DNA, parada de ciclo celular em G1 e em G2-M e morte celular por apoptose e necrose (SANCHEZ *et al.*, 2008). Efeitos parecidos foram observados para células de carcinoma de cólon murinas (QI *et al.*, 2010). Como mencionado, nossos resultados mostram que a senescência induzida por sinvastatina não está relacionada à ativação de p38, porém está diretamente associada à ativação de p53, ocorrendo, possivelmente em resposta a danos ao DNA induzidos por EROs.

A detecção de níveis elevados de EROs pode ser causada pelo aumento da produção de espécies reativas por si só ou pela diminuição da ação dos sistemas antioxidantes (VALKO *et al.*, 2007). Células de melanoma podem produzir EROs em todos os estágios de sua progressão, pela aceleração de seu metabolismo e em resposta a estímulos imunológicos, porém a principal causa de níveis intracelulares de EROs aumentadas em células de melanoma é a síntese de melanina (WITTGEN e VAN KEMPEN, 2007). Assim sendo, estas células desenvolveram sistemas antioxidantes mais apurados e podem evitar o estresse oxidativo, sendo menos sujeitas à apoptose. Quando comparado à pele normal ou até mesmo a outros cânceres de pele, o melanoma possui níveis de expressão aumentados de catalase, Mn-SOD, Cu,Zn-SOD e aumento da relação GSH/GSSG (SANDER *et al.*, 2004). Devido a estas características, a expressão dos sistemas antioxidantes em células de melanoma deve ser analisada com cautela.

Embora a responsividade do gene *SOD-2* a vários estímulos tenha sido descrita (MIAO e ST CLAIR, 2009), não foi observada alteração dos níveis de transcrito de Mn-SOD em células WM9 após o tratamento com sinvastatina (Figura 25). Os níveis de RNAm de Cu,Zn-SOD também não foram afetados pela sinvastatina nestas células, mas sabe-se que maior expressão do gene *SOD-1* não é facilmente induzida. Além disso, não foram observadas alterações nos níveis de expressão de GPx e GRed após o tratamento com sinvastatina (Figura 25). Por outro lado, pôde-se constatar o aumento dos níveis de RNAm de catalase em células WM9 tratadas com sinvastatina para ambas as concentrações avaliadas (0,25 e 1  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figura 25). Isto pode estar ocorrendo como um mecanismo de

*feedback*, o qual pode estar sendo desencadeado em resposta aos níveis elevados de EROs intracelulares, como uma forma de proteção contra danos induzidos por EROs (GECHEV *et al.*, 2002). O aumento dos níveis de expressão do RNAm de catalase nos permite sugerir que a principal espécie reativa envolvida no surgimento da senescência induzida por sinvastatina em células de melanoma humano seja o peróxido de hidrogênio. O aumento da quantidade de transcrito de peroxirredoxina-1 em células WM9 após o tratamento com sinvastatina (Figura 25) reforça a hipótese de que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode exercer um importante papel na senescência mediada por sinvastatina. É interessante notar que o aumento dos níveis de RNAm de peroxirredoxina-1 em células WM9 ocorre somente para a menor concentração de sinvastatina testada (0,25µmol/L), o que sugere que as enzimas antioxidantes envolvidas na remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> constituem um importante mecanismo de detoxificação das células WM9, o que poderia estar levando estas células à senescência, em vez de apoptose, através da detoxificação parcial das EROs produzidas. Além disso, é sabido que células senescentes são resistentes a estímulos apoptóticos (MULLER, 2009), e esta resistência pode ser importante quando células WM9 são expostas a concentrações menores de sinvastatina.

De maneira interessante, o aumento dos níveis de RNAm de p16 e peroxirredoxina-1 foi observado somente em células WM9 tratadas com 0,25µmol/L de sinvastatina, o que é consistente com o fenótipo de parada de proliferação e também corrobora a hipótese de que, quando expostas a baixas concentrações de sinvastatina, as células WM9 estão mais propensas a entrar em senescência. Porém, o aumento dos níveis de EROs pode exercer uma função decisiva em células WM9 tratadas com 1µmol/L de sinvastatina, levando estas células à morte celular por apoptose. Não se pode descartar a hipótese que a ausência de aumento da expressão de peroxirredoxina-1 em células WM9 tratadas com 1µmol/L de sinvastatina pode ser um reflexo da ação do tempo na resposta antioxidante celular. Assim sendo, nesta condição, poderia-se sugerir que a expressão de peroxirredoxina-1 seria equivalente à condição controle pelo fato de que esta enzima já teria realizado sua função em um momento anterior ao ponto de 72h, resultando no retorno de sua transcrição a níveis basais.

Para avaliar a extensão da relação entre o estresse oxidativo e a indução de senescência mediada por sinvastatina procuramos analisar se a adição de compostos moduladores do equilíbrio redox seriam capazes de modificar a resposta

das células WM9 à sinvastatina. Não foi possível observar a reversão do fenótipo senescente (Figura 28), ou recuperação de viabilidade (Figura 27) em células WM9 tratadas com sinvastatina na presença do antioxidante *N*-acetilcisteína. O uso de NAC para reverter o fenótipo senescente relacionado ao aumento de EROs é bem documentado (LI *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2013), porém há indícios de que sua ação (considerada não-seletiva) tenha uma menor magnitude em parâmetros relacionados ao contexto do envelhecimento *in vivo* (KOLOSOVA *et al.*, 2012). Além disso, deve-se considerar que NAC é um precursor da glutatona, e que não foram observadas alterações nos níveis de RNAm das enzimas GPx e GRed após o tratamento com sinvastatina, o que poderia sugerir que a detoxificação de EROs via glutatona não seja determinante para a senescência das células WM9 induzida por este fármaco. Como perspectiva para a avaliação de possíveis alterações nos níveis de EROs intracelulares em resposta à adição de NAC, poderiam ser realizados ensaios utilizando a sonda DCFH-DA, bem como a medida dos níveis de GSH e GSSG, para avaliação de seu papel na senescência mediada pela sinvastatina.

Em relação aos dados obtidos para os ensaios utilizando o inibidor de catalase ATZ, pôde-se observar que este é citotóxico, causando perda de viabilidade das células WM9 em relação à condição controle na ausência de ATZ (Figura 29). Resultados preliminares sobre os efeitos deste inibidor na progressão do ciclo celular sugerem que ele aumenta substancialmente o conteúdo de DNA fragmentado das células WM9, porém este aumento é parcialmente revertido pela ação da sinvastatina (Figura 33), o que sugere um efeito protetor desta droga neste contexto; estes efeitos, entretanto, precisam ser melhor investigados. Assim sendo, é importante lembrar que o tratamento com ATZ promove a apoptose de células hepáticas (modelo de fibrose hepática murino), efeito que é potencializado pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na doença fibrótica do fígado, as células hepáticas ativadas produzem altas concentrações de EROs, tamponadas eficientemente por sistemas antioxidantes altamente funcionais. Somente a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a estas células não promove apoptose, porém a inibição da catalase as torna suscetíveis à morte (DUNNING *et al.*, 2013).

É possível perceber que, na presença de ATZ e de sinvastatina ocorre a diminuição da viabilidade das células WM9, e sugerimos uma possível potencialização do efeito citotóxico da sinvastatina pelo ATZ. Entretanto, as diferenças de viabilidade observadas na presença deste inibidor em relação ao

tratamento com sinvastatina somente precisam ser melhor analisadas. Esta diminuição de viabilidade pode não estar ocorrendo pelo aumento da morte celular – como observado pela diminuição da porcentagem de células em SubG1 (Figura 33) – e sim pelo aumento da quantidade de células em G1-S, o que a princípio está de acordo com a marcação positiva no ensaio de atividade de  $\beta$ -gal (Figura 32). Desta forma, podemos sugerir que o ATZ possui principalmente ação citotóxica em células de melanoma e que a adição de sinvastatina, porém, poderia estar direcionando estas células à senescência.

De maneira geral, os resultados sugerem que os possíveis efeitos mediados por estes agentes podem exercer um papel secundário na senescência de células de melanoma. Deve-se considerar, entretanto, que a ação – tanto do NAC quanto do ATZ – em células de melanoma tratadas com sinvastatina, entretanto, deve ser melhor avaliada para a maior compreensão dos efeitos destes compostos neste modelo de estudo. Uma sugestão seria realizar a medida de atividade de catalase, visando estabelecer se o aumento dos níveis de RNAm observado após o tratamento com sinvastatina se reflete na atividade enzimática, e se a adição do ATZ é eficiente em bloquear esta atividade quando administrado em conjunto com a sinvastatina.

Por outro lado, o pré-tratamento das células com o inibidor de p53 pifitrina- $\alpha$  foi capaz de reverter a senescência induzida por sinvastatina, impedindo a coloração positiva das células para ensaio de  $\beta$ -galactosidase (Figura 32), não alterando a porcentagem de células na fase G1-S do ciclo celular (Figura 33). Estes resultados estão de acordo com os resultados de estudos anteriores, nos quais a adição de pifitrina inibiu com sucesso a parada em G2-M mediada pela temozolomida em células de melanoma (MHAIDAT *et al.*, 2007); também inibiu a senescência induzida por indoxil sulfato em células musculares lisas de aorta humana e a senescência induzida pelo sunitinib em células de câncer renal (MUTELIEFU *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2013b). Além disso, é interessante observar que a adição de pifitrina- $\alpha$  é capaz de diminuir os níveis de EROs intracelulares de células tratadas com sinvastatina (Figura 34), quando comparadas à condição controle. De fato, a ação da pifitrina- $\alpha$  na reversão do estresse oxidativo foi descrita em modelo animal de doença hepática (DERDAK *et al.*, 2013). *In vitro*, células de câncer de mama expostas a cobre e zinco sofrem apoptose mediada por p53, com aumento dos níveis de EROs intracelulares. Neste contexto, o uso da pifitrina foi capaz de reverter o aumento de EROs induzido

por cobre e zinco (OSTRAKHOVITCH e CHERIAN, 2005). Efeitos semelhantes de diminuição dos níveis de EROs pela pifitrina também foram descritos por BRAGADO *et al.*, (2007) na avaliação da apoptose de células de câncer de cólon após tratamento com cisplatina, e também por SHUKLA e GUPTA (2008) para células de câncer prostático expostas à apigenina.

A adição da pifitrina, entretanto, não foi capaz de reverter a perda de viabilidade causada pela sinvastatina, o que indica que este processo pode não ser fundamentalmente mediado pela ativação de p53. BONINI *et al.*, (2004) relataram a ineficiência da pifitrina- $\alpha$  em reverter a apoptose causada pelo estresse oxidativo em células da glia, apesar de bloquear a atividade transcricional de p53. Este estudo relacionou a ocorrência de apoptose à ativação de p53, e a baixos níveis de expressão de MDM2. Foi demonstrado que, de maneira surpreendente, a pifitrina não foi capaz de prevenir a formação de nucleossomos e a condensação da cromatina, não impediu a ruptura das mitocôndrias e a liberação de citocromo c, e, principalmente, não foi capaz de impedir a degradação de MDM2 em células da glia submetidas a estresse oxidativo. Todos estes efeitos, entretanto foram revertidos com sucesso por zVAD-fmk, um inibidor de caspases de amplo espectro utilizado com o objetivo de prevenir a degradação de MDM2 causada pela clivagem de um sítio semelhante à caspase-3. A inibição da degradação de MDM2 resultou em diminuição da atividade de p53 e impediu sua translocação até a mitocôndria, impedindo a apoptose, neste caso mediada principalmente pela ação de MDM2, independentemente da função transcricional de p53. De fato, a ação da pifitrina- $\alpha$  na prevenção da apoptose pode ter um caráter independente da presença de p53, como demonstrado por SOHN *et al.*, (2009). Neste estudo, foi demonstrado que a pifitrina é capaz de proteger células p53-negativas (através de deleção ou de siRNA) da apoptose causada por radiação ionizante (IR) e por agentes químicos causadores de danos ao DNA (etoposídeo e camptotecina). O efeito protetor mediado pela pifitrina foi causado principalmente pela inibição das caspases 3 e 9 e pela falha de formação do apoptossomo.

Além disso, várias evidências tem demonstrado que a apoptose mediada por estatinas pode ocorrer de maneira independente de p53. Os estudos de KOYUTURK *et al.*, (2007) demonstram que a apoptose de células de câncer de mama tratadas com sinvastatina está relacionada à ativação de JNK, e independe da ativação de p53. Já a lovastatina também é capaz de induzir apoptose mitocondrial em células

de câncer mamário murinas portadoras de mutação para p53 (SHIBATA *et al.*, 2004). Além disso, evidências indicam que a indução de apoptose pela sinvastatina em células de câncer colorretal está relacionada com a atividade das proteínas RhoA e Rac1, de maneira dependente de geranilgeranilação, constituindo uma via de ativação não-canônica da via mitocondrial (ZHU *et al.*, 2013a). Por último, demonstrou-se que a apoptose de células de câncer de próstata após o tratamento com sinvastatina está relacionada à diminuição da atividade de NF- $\kappa$ B, e de outros componentes regulados por esta via (PARK *et al.*, 2013).

Podemos inferir, de acordo com estes dados, que a apoptose mediada pela sinvastatina não necessariamente ocorre pela mediação exclusiva de p53, e que outros fatores (a serem esclarecidos) podem estar envolvidos na morte celular mediada pela sinvastatina em células de melanoma.

Considerados em conjunto, nossos resultados demonstraram que baixas concentrações de sinvastatina são capazes de induzir a senescência celular em células de melanoma humano através da ativação da via de p53/p21. Além disso, a sinvastatina pode induzir o surgimento de modificações fenotípicas nas células WM9, as quais estão relacionadas com o desenvolvimento da resposta senescente. Níveis de EROs intracelulares aumentados e modificações na expressão de enzimas antioxidantes sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido na indução do fenótipo senescente mediado por sinvastatina nas células de melanoma humano metastático WM9. Os mecanismos envolvidos na indução de apoptose mediada pela sinvastatina permanecem a ser esclarecidos. Estes dados revelam importantes novos aspectos do mecanismo de ação da sinvastatina em células de melanoma, os quais podem contribuir para a compreensão de sua função como potencial agente para a terapia deste tumor. Um modelo da ação da sinvastatina em células de melanoma está proposto na Figura 35.

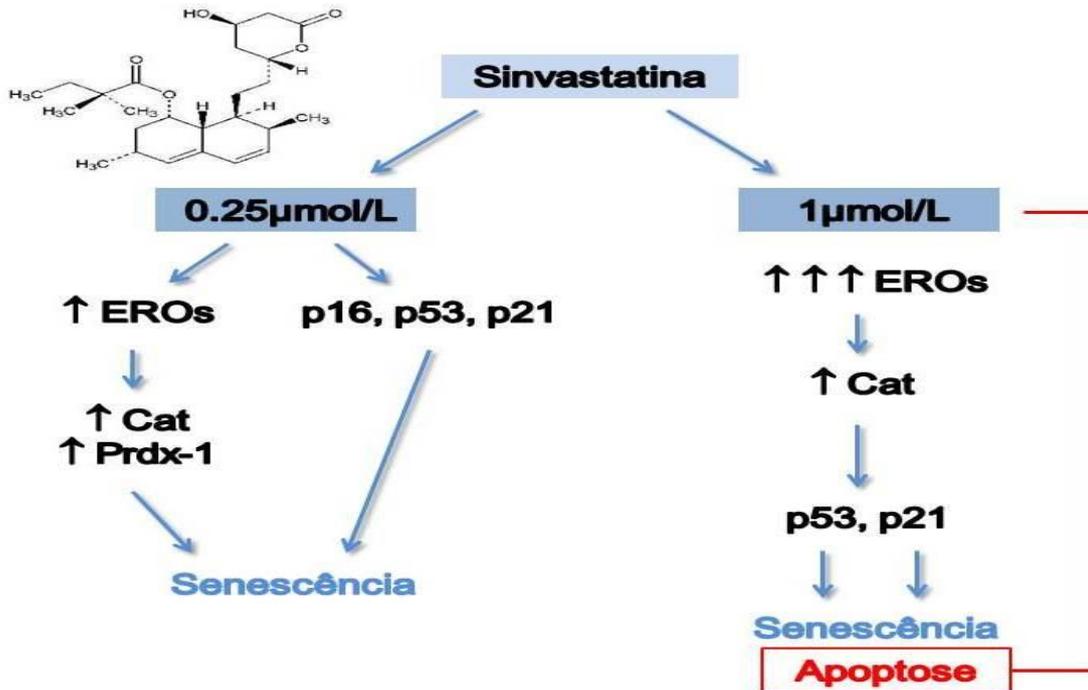


FIGURA 35– ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS EFEITOS DA SINVASTATINA EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO WM9

FONTE: O autor (2014)

NOTA: Dois mecanismos são sugeridos: 1) células tratadas com baixas concentrações de sinvastatina possuem altos níveis de expressão de catalase e peroxirredoxina-1, e apresentam discreto aumento nos níveis de EROs intracelulares. Ainda, estas células desenvolvem fenótipo senescente caracterizado pelo aumento da expressão de p16, p53 e p21; 2) células tratadas com concentrações mais altas de sinvastatina demonstram altos níveis de EROs intracelulares, apesar do aumento dos níveis de expressão de catalase. Estas células apresentam-se mais suscetíveis à morte celular por apoptose, além da senescência. O mecanismo da indução de apoptose mediado pela sinvastatina em células de melanoma WM9 permanece a ser esclarecido.

## 9 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- O uso de menores concentrações de sinvastatina foi capaz de causar o estabelecimento do fenótipo senescente em células de melanoma metastático, como pôde ser verificado através do aumento da porcentagem de células na fase G1-S do ciclo celular e da coloração positiva para ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência;
- O estudo da expressão dos principais marcadores envolvidos no estabelecimento da senescência revelou que o mecanismo de indução de senescência mediado pela sinvastatina se dá através do aumento da expressão (RNAm) de p53, p16 e p21, bem como do aumento da ativação de p53, que resulta na expressão proteica aumentada de p21;
- Na maior concentração de sinvastatina avaliada neste estudo (1 $\mu$ mol/L) foi possível observar, além da indução de senescência, a ocorrência da perda de viabilidade das células de melanoma, sendo que a marcação positiva para Anexina V evidenciou a ocorrência de morte celular por apoptose;
- A senescência e a morte celular induzidas por sinvastatina estão relacionadas ao aumento dos níveis de EROs intracelulares. Análises da expressão (RNAm) das enzimas antioxidantes demonstraram o aumento dos níveis de catalase e peroxirredoxina-1, o que pode exercer influência sobre os níveis de EROs observados quando utilizamos baixas e altas concentrações de sinvastatina, desta forma contribuindo para o direcionamento das respostas de senescência e morte celular observadas. O surgimento do fenótipo senescente, entretanto, não está associado à ativação da proteína p38;
- A adição de um antioxidante e do inibidor da catalase não foram capazes de reverter a perda de viabilidade e a senescência das células de melanoma tratadas com sinvastatina. Por outro lado, a adição do inibidor de p53 causou a reversão da senescência e do aumento dos níveis de EROs causados por sinvastatina nestas células, o que sugere que a senescência mediada por sinvastatina é dependente da ativação de p53.

## 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, J. C.; GIL, J. **Senescence: a new weapon for cancer therapy**. Trends Cell Biol, v. 22, p. 211-219, 2012.

ADAMS, P. D. **Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence**. Molecular cell, v. 36, p. 2-14, 2009.

AGARWAL, B.; HALMOS, B.; FEOKTISTOV, A. S.; PROTIVA, P.; RAMEY, W. G.; CHEN, M.; (...) HOLT, P. R. **Mechanism of lovastatin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells**. Carcinogenesis, v. 23, p. 521-528, 2002.

AIKENS, J.; DIX, T. A. **Perhydroxyl radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides**. J Biol Chem, v. 266, p. 15091-15098, 1991.

BALL, N. J.; YOHN, J. J.; MORELLI, J. G.; NORRIS, D. A.; GOLITZ, L. E.; HOFFLER, J. P. **Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression**. J Invest Dermatol, v. 102, p. 285-290, 1994.

BARREIRO, E. J.; FRAGA C. A. M. **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BATAILLE, V. **Genetics of familial and sporadic melanoma**. Clin Exp Dermatol, v. 25, p. 464-470, 2000.

BISHAYEE, K.; PAUL, A.; GHOSH, S.; SIKDAR, S.; MUKHERJEE, A.; BISWAS, R.; (...) KHUDA-BUKHSH, A. R. **Condurango-glycoside-A fraction of Gonolobus condurango induces DNA damage associated senescence and apoptosis via ROS-dependent p53 signalling pathway in HeLa cells**. Mol Cell Biochem, v. p. 2013.

BLASCO, M. A. **Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond**. Nat Rev Genet, v. 6, p. 611-622, 2005.

BONINI, P.; CICONI, S.; CARDINALE, A.; VITALE, C.; SERAFINO, A. L.; CIOTTI, M. T.; MARLIER, L. N. **Oxidative stress induces p53-mediated apoptosis in glia: p53 transcription-independent way to die**. Journal of neuroscience research, v. 75, p. 83-95, 2004.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal Biochem, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAGADO, P.; ARMESILLA, A.; SILVA, A.; PORRAS, A. **Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation**. Apoptosis: an international journal on programmed cell death, v. 12, p. 1733-1742, 2007.

BRESLOW, A. **Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma**. Ann Surg, v. 172, p. 902-908, 1970.

BURKE, J. P.; WATSON, R. W.; MURPHY, M.; DOCHERTY, N. G.; COFFEY, J. C.; O'CONNELL, P. R. **Simvastatin impairs smad-3 phosphorylation and modulates transforming growth factor beta1-mediated activation of intestinal fibroblasts.** Br J Surg, v. 96, p. 541-551, 2009.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. **Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.** Free Radic Biol Med, v. 29, p. 222-230, 2000.

CAFFORIO, P.; DAMMACCO, F.; GERNONE, A.; SILVESTRIS, F. **Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells.** Carcinogenesis, v. 26, p. 883-891, 2005.

CAMPISI, J. **Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective.** Curr Opin Genet Dev, v. 21, p. 107-112, 2011.

CAMPISI, J.; DI FAGAGNA, F. D. **Cellular senescence: when bad things happen to good cells.** Nat Rev Mol Cell Bio, v. 8, p. 729-740, 2007.

CEN, D.; GONZALEZ, R. I.; BUCKMEIER, J. A.; KAHN, R. S.; TOHIDIAN, N. B.; MEYSKENS, F. L., JR. **Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells: a redox-related process.** Mol Cancer Ther, v. 1, p. 197-204, 2002.

CHAN, K. K.; OZA, A. M.; SIU, L. L. **The statins as anticancer agents.** Clin Cancer Res, v. 9, p. 10-19, 2003.

CHANG, B. D.; BROUDE, E. V.; DOKMANOVIC, M.; ZHU, H. M.; RUTH, A.; XUAN, Y. Z.; (...) RONINSON, I. B. **A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents.** Cancer Research, v. 59, p. 3761-3767, 1999.

CHEN, Q. M.; BARTHOLOMEW, J. C.; CAMPISI, J.A; COSTA, M.; REAGAN, J. D.; AMES, B. N. **Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication.** Biochem J, v. 332 (Pt 1), p. 43-50, 1998.

CHENE, P. **Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy.** Nature reviews. Cancer, v. 3, p. 102-109, 2003.

CHKHOTUA, A. B.; GABUSI, E.; ALTIMARI, A.; D'ERRICO, A.; YAKUBOVICH, M.; VIENKEN, J.; (...) GRIGIONI, W. F. **Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy.** Am J Kidney Dis, v. 41, p. 1303-1313, 2003.

CHUDNOVSKY, Y.; KHAVARI, P. A.; ADAMS, A. E. **Melanoma genetics and the development of rational therapeutics.** J Clin Invest, v. 115, p. 813-824, 2005.

CLARK, E. A.; GOLUB, T. R.; LANDER, E. S.; HYNES, R. O. **Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC.** Nature, v. 406, p. 532-535, 2000.

CLARK, W. H., JR.; ELDER, D. E.; GUERRY, D. T.; EPSTEIN, M. N.; GREENE, M. H.; VAN HORN, M. **A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.** Hum Pathol, v. 15, p. 1147-1165, 1984.

COHEN, C.; ZAVALA-POMPA, A.; SEQUEIRA, J. H.; SHOJI, M.; SEXTON, D. G.; COTSONIS, G.; (...) ARBISER, J. L. **Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression.** Clin Cancer Res, v. 8, p. 3728-3733, 2002.

COLAVITTI, R.; FINKEL, T. **Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence.** IUBMB Life, v. 57, p. 277-281, 2005.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. **Cellular senescence in cancer and aging.** Cell, v. 130, p. 223-233, 2007.

COLLISSON, E. A.; KLEER, C.; WU, M.; DE, A.; GAMBHIR, S. S.; MERAJVER, S. D.; KOLODNEY, M. S. **Atorvastatin prevents RhoC isoprenylation, invasion, and metastasis in human melanoma cells.** Mol Cancer Ther, v. 2, p. 941-948, 2003.

COULTHARD, L. R.; WHITE, D. E.; JONES, D. L.; MCDERMOTT, M. F.; BURCHILL, S.A. **p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics.** Trends in molecular medicine, v. 15, p. 369-379, 2009.

DABROWSKA, M.; MOSIENIAK, G.S; KIERSKI, J.; SIKORA, E.; RODE, W. **Methotrexate-induced senescence in human adenocarcinoma cells is accompanied by induction of p21(waf1/cip1) expression and lack of polyploidy.** Cancer Lett, v. 284, p. 95-101, 2009.

DAVIES, H.; BIGNELL, G. R.; COX, C.; STEPHENS, P.; EDKINS, S.; CLEGG, S.; (...) FUTREAL, P. A. **Mutations of the BRAF gene in human cancer.** Nature, v. 417, p. 949-954, 2002.

DAVIES, K. J. **Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems.** IUBMB Life, v. 50, p. 279-289, 2000.

DECOURSEY, T. E.; LIGETI, E. **Regulation and termination of NADPH oxidase activity.** Cell Mol Life Sci, v. 62, p. 2173-2193, 2005.

DEMIERRE, M. F.; SONDAK, V. K. **Cutaneous melanoma: pathogenesis and rationale for chemoprevention.** Crit Rev Oncol Hematol, v. 53, p. 225-239, 2005.

DENOYELLE, C.; ALBANESE, P.; UZAN, G.; HONG, L.; VANNIER, J. P.; SORIA, J.; SORIA, C. **Molecular mechanism of the anti-cancer activity of cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, on aggressive human breast cancer cells.** Cell Signal, v. 15, p. 327-338, 2003.

DENOYELLE, C.; VASSE, M.; KORNER, M.; MISHAL, Z.; GANNE, F.; VANNIER, J. P.; (...) SORIA, C. **Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, inhibits the signaling pathways involved in the invasiveness and metastatic properties of**

**highly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study.** *Carcinogenesis*, v. 22, p. 1139-1148, 2001.

DERDAK, Z.; VILLEGAS, K. A.; HARB, R.; WU, A. M.; SOUSA, A.; WANDS, J. R. **Inhibition of p53 attenuates steatosis and liver injury in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease.** *Journal of hepatology*, v. 58, p. 785-791, 2013.

DI MICCO, R.; FUMAGALLI, M.; CICALESSE, A.; PICCININ, S.; GASPARINI, P.; LUISE, C.; (...) D'ADDA DI FAGAGNA, F. **Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication.** *Nature*, v. 444, p. 638-642, 2006.

DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; (...) *ET AL.* **A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 92, p. 9363-9367, 1995.

DOBOS, J.; TIMAR, J.; BOCSI, J.; BURIAN, Z.; NAGY, K.; BARNA, G.; (...) LADANYI, A. **In vitro and in vivo antitumor effect of 2-methoxyestradiol on human melanoma.** *Int J Cancer*, v. 112, p. 771-776, 2004.

DUNNING, S.; UR REHMAN, A.; TIEBOSCH, M. H.; HANNIVOORT, R. A.; HAIJER, F. W.; WOUDEBERG, J.; (...) MOSHAGE, H. **Glutathione and antioxidant enzymes serve complementary roles in protecting activated hepatic stellate cells against hydrogen peroxide-induced cell death.** *Biochimica et biophysica acta*, v. 1832, p. 2027-2034, 2013.

ELMORE, L. W.; REHDER, C. W.; DI, X.; MCCHESENEY, P. A.; JACKSON-COOK, C. K.; GEWIRTZ, D. A.; HOLT, S. E. **Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 35509-35515, 2002.

ENGLAND, N. L.; CUTHBERT, A. P.; TROTT, D. A.; JEZZARD, S.; NOBORI, T.; CARSON, D. A.; NEWBOLD, R. F. **Identification of human tumour suppressor genes by monochromosome transfer: Rapid growth-arrest response mapped to 9p21 is mediated solely by the cyclin-D-dependent kinase inhibitor gene, CDKN2A (p16(INK4A)).** *Carcinogenesis*, v. 17, p. 1567-1575, 1996.

ETIENNE-MANNEVILLE; S.HALL, A. **Rho GTPases in cell biology.** *Nature*, v. 420, p. 629-635, 2002.

EWALD, J. A.; DESOTELLE, J. A.; WILDING, G.; JARRARD, D. F. **Therapy-induced senescence in cancer.** *J Natl Cancer Inst*, v. 102, p. 1536-1546, 2010.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular.** Atheneu: São Paulo, 2004.

FREEMAN, S. R.; DRAKE, A. L.; HEILIG, L. F.; GRABER, M.; MCNEALY, K.; SCHILLING, L. M.; DELLAVALLE, R. P. **Statins, fibrates, and melanoma risk: a systematic review and meta-analysis.** *J Natl Cancer Inst*, v. 98, p. 1538-1546, 2006.

FRIDOVICH, I. **Superoxide radical and superoxide dismutases.** Annu Ver Biochem, v. 64, p. 97-112, 1995.

FRUEHAUF, J. P.; MEYSKENS, F. L., JR. **Reactive oxygen species: a breath of life or death?** Clin Cancer Res, v. 13, p. 789-794, 2007.

FRUEHAUF, J. P.; TRAPP, V. **Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma?** Expert Rev Anticancer Ther, v. 8, p. 1751-1757, 2008.

GARBE, C.; PERIS, K.; HAUSCHILD, A.; SAIAG, P.; MIDDLETON, M.; SPATZ, A.; (...) EGGERMONT, A. **Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus based interdisciplinary guideline.** Eur J Cancer, v. 46, p. 270-283, 2010.

GECHEV, T.; GADJEV, I.; VAN BREUSEGEM, F.; INZE, D.; DUKIANDJIEV, S.; TONEVA, V.; MINKOV, I. **Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes.** Cell Mol Life Sci, v. 59, p. 708-714, 2002.

GIULIANO, S.; OHANNA, M.; BALLOTTI, R.; BERTOLOTTO, C. **Advances in melanoma senescence and potential clinical application.** Pigm Cell Melanoma R, v. 24, p. 295-308, 2011.

GLYNN, S. A.; O'SULLIVAN, D.; EUSTACE, A. J.; CLYNES, M.; O'DONOVAN, N. **The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors, simvastatin, lovastatin and mevastatin inhibit proliferation and invasion of melanoma cells.** BMC Cancer, v. 8, p. 9, 2008.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. **Melanoma biology and new targeted therapy.** Nature, v. 445, p. 851-857, 2007.

GUTIERREZ-UZQUIZA, A.; ARECHEDERRA, M.; BRAGADO, P.; AGUIRRE-GHISO, J. A.; PORRAS, A. **p38 $\alpha$  mediates cell survival in response to oxidative stress via induction of antioxidant genes: effect on the p70S6K pathway.** J Biol Chem, v. 287, p. 2632-2642, 2012.

HA, L. N.; MERLINO, G.; SVIDERSKAYA, E. V. **Melanomagenesis – Overcoming the barrier of melanocyte senescence.** Cell Cycle, v. 7, p. 1944-1948, 2008.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. **Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma.** The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research, v. 10, p. 153-163, 2005.

HAASS, N. K.; SMALLEY, K. S.; HERLYN, M. **The role of altered cell-cell communication in melanoma progression.** J Mol Histol, v. 35, p. 309-318, 2004.

HALLIWELL, B. **Biochemistry of oxidative stress.** Biochemical Society transactions, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HALLIWELL, B. **Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease.** Am J Med, v. 91, p. 14S-22S, 1991.

HANDAYANINGSIH, A. E.; TAKAHASHI, M.; FUKUOKA, H.; IGUCHI, G.; NISHIZAWA, H.; YAMAMOTO, M.; (...) TAKAHASHI, Y. **IGF-I enhances cellular senescence via the reactive oxygen species-p53 pathway.** Biochem Biophys Res Commun, v. 425, p. 478-484, 2012.

HASTY, P.; CHRISTY, B. A. **p53 as an intervention target for cancer and aging.** Pathobiology of aging & age related diseases, v. 3, p. 2013.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. **The serial cultivation of human diploid cell strains.** Exp Cell Res, v. 25, p. 585-621, 1961.

HOQUE, A.; CHEN, H.; XU, X. C. **Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v. 17, p. 88-94, 2008.

INCA (Instituto Nacional do Câncer) – **Ministério da Saúde: Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em 14 de outubro de 2013.

INGRAFFEA, A. **Melanoma.** Facial plastic surgery clinics of North America, v. 21, p. 33-42, 2013.

IWASA, H.; HAN, J.; ISHIKAWA, F. **Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway.** Genes Cells, v. 8, p. 131-144, 2003.

JUNG, M. S.; JIN, D. H.; CHAE, H. D.; KANG, S.; KIM, S. C.; BANG, Y. J.; (...) SHIN, D. Y. **Bcl-xL and E1B-19K proteins inhibit p53-induced irreversible growth arrest and senescence by preventing reactive oxygen species-dependent p38 activation.** J Biol Chem, v. 279, p. 17765-17771, 2004.

KAMINSKY, Y. G.; KOSENKO, E. A. **Molecular mechanisms of toxicity of simvastatin, widely used cholesterol-lowering drug. A review.** Cent Eur J Med, v. 5, p. 269-279, 2010.

KARG, E.; ODH, G.; WITTBGER, A.; ROSENGREN, E.; RORSMAN, H. **Hydrogen peroxide as an inducer of elevated tyrosinase level in melanoma cells.** J Invest Dermatol, v. 100, p. 209S-213S, 1993.

KIM, J. E.; JIN, D. H.; LEE, S. D.; HONG, S. W.; SHIN, J. S.; LEE, S. K.; (...) LEE, W. J. **Vitamin C inhibits p53-induced replicative senescence through suppression of ROS production and p38 MAPK activity.** Int J Mol Med, v. 22, p. 651-655, 2008.

KIM, W. Y.; SHARPLESS, N. E. **The regulation of INK4/ARF in cancer and aging.** Cell, v. 127, p. 265-275, 2006.

KING, S. **The best selling drugs of all time; Humira joins the elite.** Forbes. Disponível em: <<http://www.forbes.com/sites/simonking/2013/01/28/the-best-selling-drugs-of-all-time-humira-joins-the-elite/>> Acesso em: 28 de novembro de 2013.

KOLOSOVA, N. G.; STEFANOVA, N. A.; MURALEVA, N. A.; SKULACHEV, V. P. **The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 but not N-acetylcysteine reverses aging-related biomarkers in rats.** Aging, v. 4, p. 686-694, 2012.

KOMAROV, P. G.; KOMAROVA, E. A.; KONDRATOV, R. V.; CHRISTOV-TSELKOV, K.; COON, J. S.; CHERNOV, M. V.; GUDKOV, A. V. **A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy.** Science, v. 285, p. 1733-1737, 1999.

KOOMEN, E. R.; JOOSSE, A.; HERINGS, R. M.; CASPARIE, M. K.; BERGMAN, W.; NIJSTEN, T.; GUCHELAAR, H. J. **Is statin use associated with a reduced incidence, a reduced Breslow thickness or delayed metastasis of melanoma of the skin?** Eur J Cancer, v. 43, p. 2580-2589, 2007.

KOYUTURK, M.; ERSOZ, M.; ALTIOK, N. **Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK.** Cancer Lett, v. 250, p. 220-228, 2007.

KRISHAN, A. **Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining.** J Cell Biol, v. 66, p. 188-193, 1975.

KRISHNAMURTHY, J.; TORRICE, C.; RAMSEY, M. R.; KOVALEV, G. I.; AL-REGAIEY, K.; SU, L.; SHARPLESS, N. E. **Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging.** J Clin Invest, v. 114, p. 1299-1307, 2004.

KUDCHADKAR, R. R.; SMALLEY, K. S.; GLASS, L. F.; TRIMBLE, J. S.; SONDAK, V. K. **Targeted therapy in melanoma.** Clinics in dermatology, v. 31, p. 200-208, 2013.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. **Quantification of cells cultured on 96-well plates.** Anal Biochem, v. 182, p. 16-19, 1989.

KURATA, S. **Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress.** Journal of Biological Chemistry, v. 275, p. 23413-23416, 2000.

LAWENDA, B. D.; KELLY, K. M.; LADAS, E. J.; SAGAR, S. M.; VICKERS, A.; BLUMBERG, J. B. **Should supplemental antioxidant administration be avoided during chemotherapy and radiation therapy?** J Natl Cancer Inst, v. 100, p. 773-783, 2008.

LEE, A. C.; FENSTER, B. E.; ITO, H.; TAKEDA, K.; BAE, N. S.; HIRAI, T.; (...) FINKEL, T. **Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species.** J Biol Chem, v. 274, p. 7936-7940, 1999.

LEE, J.; JUNG, K. H.; PARK, Y. S.; AHN, J. B.; SHIN, S. J.; IM, S. A., (...) KANG, W. K. **Simvastatin plus irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin (FOLFIRI) as first-line chemotherapy in metastatic colorectal patients: a multicenter phase II study.** *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 64, p. 657-663, 2009.

LEE, J.; LEE, I.; PARK, C.; KANG, W. K. **Lovastatin-induced RhoA modulation and its effect on senescence in prostate cancer cells.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 339, p. 748-754, 2006.

LEIKAM, C.; HUFNAGEL, A.; SCHARTL, M.; MEIERJOHANN, S. **Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence.** *Oncogene*, v. 27, p. 7070-7082, 2008.

LENNERNAS, H.; FAGER, G. **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences.** *Clin Pharmacokinet*, v. 32, p. 403-425, 1997.

LEVINE, A. J. **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell*, v. 88, p. 323-331, 1997.

LI, Y. B.; GAO, J. L.; ZHONG, Z. F.; HOI, P. M.; LEE, S. M.; WANG, Y. T. **Bisdemethoxycurcumin suppresses MCF-7 cells proliferation by inducing ROS accumulation and modulating senescence-related pathways.** *Pharmacological reports: PR*, v. 65, p. 700-709, 2013.

LIOCHEV, S. I. ;FRIDOVICH, I. **The role of O<sub>2</sub>- in the production of HO.: in vitrom and in vivo.** *Free Radic Biol Med*, v. 16, p. 29-33, 1994.

LUO, H.; YANG, A.; SCHULTE, B. A.; WARGOVICH, M. J.; WANG, G. Y. **Resveratrol induces premature senescence in lung cancer cells via ROS-mediated DNA damage.** *PloS one*, v. 8, p. e60065, 2013.

MARGOLIASH, E.; NOVOGRODSKY, A. **A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1,2,4-triazole.** *Biochem J*, v. 68, p. 468-475, 1958.

MARINI, A.; MIRMOHAMMADSADEGH, A.; NAMBIAR, S.;GUSTRAU, A.; RUZICKA, T.; HENGGE, U. R. **Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma.** *J Invest Dermatol*, v. 126, p. 422-431, 2006.

MENDES, G. L.; KOIFMAN, R. J.; KOIFMAN, S. **Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005.** *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, v. 73, p. 850-857, 2010.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. **Genetic risk factors for melanoma.** *Hum Genet*, v. 126, p. 499-510, 2009.

MHAIDAT, N. M.; ZHANG, X. D.; ALLEN, J.; AVERY-KIEJDA, K. A.; SCOTT, R. J.; HERSEY, P. **Temozolomide induces senescence but not apoptosis in human melanoma cells.** *Br J Cancer*, v. 97, p. 1225-1233, 2007.

MIAO, L.; ST CLAIR, D. K. **Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease.** Free Radic Biol Med, v. 47, p. 344-356, 2009.

MILLER, A. J.; MIHM, M. C., JR. **Melanoma.** N Engl J Med, v. 355, p. 51-65, 2006.

MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. **Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions.** Free Radic Biol Med, v. 8, p. 95-108, 1990.

MIYAUCHI, H.; MINAMINO, T.; TATENO, K.; KUNIEDA, T.; TOKO, H.; KOMURO, I. **Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway.** EMBO J, v. 23, p. 212-220, 2004.

MOOI, W. J.; PEEPER, D. S. **Oncogene-induced cell senescence - Halting on the road to cancer.** New Engl J Med, v. 355, p. 1037-1046, 2006.

MULLER, M. **Cellular Senescence: Molecular Mechanisms, In Vivo Significance, and Redox Considerations.** Antioxid Redox Sign, v. 11, p. 59-98, 2009.

MURTOLA, T. J.; SYVALA, H.; PENNANEN, P.; BLAUER, M.; SOLAKIVI, T.; YLIKOMI, T.; TAMMELA, T. L. J. **Comparative effects of high and low-dose simvastatin on prostate epithelial cells: The role of LDL.** Eur J Pharmacol, v. 673, p. 96-100, 2011.

MUTELIEFU, G.; SHIMIZU, H.; ENOMOTO, A.; NISHIJIMA, F.; TAKAHASHI, M.; NIWA, T. **Indoxyl sulfate promotes vascular smooth muscle cell senescence with upregulation of p53, p21, and prelamin A through oxidative stress.** American journal of physiology. Cell physiology, v. 303, p. C126-134, 2012.

NEWTON BISHOP, J. A.; HARLAND, M.; BENNETT, D. C.; BATAILLE, V.; GOLDSTEIN, A. M.; TUCKER, M. A.; (...) BISHOP, D. T. **Mutation testing in melanoma families: INK4A, CDK4 and INK4D.** Br J Cancer, v. 80, p. 295-300, 1999.

NIELSEN, S. F.; NORDESTGAARD, B. G.; BOJESEN, S. E. **Statin use and reduced cancer-related mortality.** N Engl J Med, v. 367, p. 1792-1802, 2012.

O'SULLIVAN, J. N.; BRONNER, M. P.; BRETNALL, T. A.; FINLEY, J. C.; SHEN, W. T.; EMERSON, S.; (...) RABINOVITCH, P. S. **Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening.** Nat Genet, v. 32, p. 280-284, 2002.

OSMAK, M. **Statins and cancer: current and future prospects.** Cancer Lett, v. 324, p. 1-12, 2012.

OSTRAKHOVITCH, E. A.; CHERIAN, M. G. **Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells.** Apoptosis: an international journal on programmed cell death, v. 10, p. 111-121, 2005.

PALMIERI, G.; CAPONE, M.; ASCIERTO, M. L.; GENTILCORE, G.; STRONCEK, D. F.; CASULA, M.; (...) ASCIERTO, P. A. **Main roads to melanoma**. Journal of translational medicine, v. 7, p. 86, 2009.

PARK, M. T.; LEE, S. J. **Cell cycle and cancer**. Journal of biochemistry and molecular biology, v. 36, p. 60-65, 2003.

PARK, Y. H.; SEO, S. Y.; LEE, E.; KU, J. H.; KIM, H. H.; KWAK, C. **Simvastatin induces apoptosis in castrate resistant prostate cancer cells by deregulating nuclear factor-kappaB pathway**. The Journal of urology, v. 189, p. 1547-1552, 2013.

PEYSSONNAUX, C.; EYCHENE, A. **The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation**. Biol Cell, v. 93, p. 53-62, 2001.

POLLOCK, P. M.; HARPER, U. L.; HANSEN, K. S.; YUDT, L. M. STARK, M. ROBBINS, C. M., (...) MELTZER, P. S. **High frequency of BRAF mutations in nevi**. Nat Genet, v. 33, p. 19-20, 2003.

POZNIC, M. **Retinoblastoma protein: a central processing unit**. Journal of biosciences, v. 34, p. 305-312, 2009.

QI, X. F.; KIM, D. H.; YOON, Y. S.; KIM, S. K.; CAI, D. Q.; TENG, Y. C.; (...) LEE, K. J. **Involvement of oxidative stress in simvastatin-induced apoptosis of murine CT26 colon carcinoma cells**. Toxicol Lett, v. 199, p. 277-287, 2010.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Rang & Dale: Farmacologia**. Elsevier: Rio de Janeiro, 2006.

REBECCA, V. W.; SONDAK, V. K.; SMALLEY, K. S. **A brief history of melanoma: from mummies to mutations**. Melanoma Res, v. 22, p. 114-122, 2012.

RELJA, B.; MEDER, F.; WILHELM, K.; HENRICH, D.; MARZI, I.; LEHNERT, M. **Simvastatin inhibits cell growth and induces apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest in hepatic cancer cells**. Int J Mol Med, v. 26, p. 735-741, 2010.

RESSLER, S.; BARTKOVA, J.; NIEDEREGGER, H.; BARTEK, J.; SCHARFFETTER-KOCHANEK, K.; JANSEN-DURR, P.; WLASCHEK, M. **p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin**. Aging Cell, v. 5, p. 379-389, 2006.

RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. **Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling**. Free Radical Bio Med, v. 38, p. 1543-1552, 2005.

RHEE, S. G.; CHANG, T. S.; JEONG, W.; KANG, D. **Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells**. Molecules and cells, v. 29, p. 539-549, 2010.

ROMAGOSA, C.; SIMONETTI, S.; LOPEZ-VICENTE, L.; MAZO, A.; LLEONART, M. E.; CASTELLVI, J.; RAMON Y CAJAL, S. **p16(Ink4a) overexpression in cancer: a**

**tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors.** *Oncogene*, v. 30, p. 2087-2097, 2011.

ROTHER, J; JONES, D. **Molecular markers of tumor progression in melanoma.** *Current genomics*, v. 10, p. 231-239, 2009.

RUSSO, A. E.; TORRISI, E.; BEVELACQUA, Y.; PERROTTA, R.; LIBRA, M.; MCCUBREY, J. A.; (...) MALAPONTE, G. **Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review).** *Int J Oncol*, v. 34, p. 1481-1489, 2009.

RUTH, M. C.; XU, Y.; MAXWELL, I. H.; AHN, N. G.; NORRIS, D. A.; SHELLMAN, Y. G. **RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway.** *J Invest Dermatol*, v. 126, p. 862-868, 2006.

SAITO, A.; SAITO, N.; MOL, W.; FURUKAWA, H.; TSUTSUMIDA, A.; OYAMA, A.; (...) YAMAMOTO, Y. **Simvastatin inhibits growth via apoptosis and the induction of cell cycle arrest in human melanoma cells.** *Melanoma Res*, v. 18, p. 85-94, 2008.

SAMANI, N. J.; BOULTBY, R.; BUTLER, R.; THOMPSON, J. R.; GOODALL, A. H. **Telomere shortening in atherosclerosis.** *Lancet*, v. 358, p. 472-473, 2001.

SANCHEZ, C. A.; RODRIGUEZ, E.; VARELA, E.; ZAPATA, E.; PAEZ, A.; MASSO, F. A.; (...) LOOPEZ-MARURE, R. **Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress.** *Cancer Invest*, v. 26, p. 698-707, 2008.

SANDER, C. S.; CHANG, H.; HAMM, F.; ELSNER, P.; THIELE, J. J. **Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis.** *Int J Dermatol*, v. 43, p. 326-335, 2004.

SATYANARAYANA, A.; GREENBERG, R. A.; SCHAETZLEIN, S.; BUER, J.; MASUTOMI, K.; HAHN, W. C.; (...) RUDOLPH, K. L. **Mitogen stimulation cooperates with telomere shortening to activate DNA damage responses and senescence signaling.** *Mol Cell Biol*, v. 24, p. 5459-5474, 2004.

SCHACHTER, M. **Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update.** *Fundam Clin Pharmacol*, v. 19, p. 117-125, 2005.

SERRANO, M.; LIN, A. W.; MCCURRACH, M. E.; BEACH, D.; LOWE, S. W. **Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a.** *Cell*, v. 88, p. 593-602, 1997.

SHARPLESS, E.; CHIN, L. **The INK4a/ARF locus and melanoma.** *Oncogene*, v. 22, p. 3092-3098, 2003.

SHAW, R. J.; CANTLEY, L. C. **Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth.** *Nature*, v. 441, p. 424-430, 2006.

SHELLMAN, Y. G.; RIBBLE, D.; MILLER, L.; GENDALL, J.; VANBUSKIRK, K.; KELLY, D.; (...) DELLAVALLE, R. P. **Lovastatin-induced apoptosis in human melanoma cell lines.** *Melanoma Res*, v. 15, p. 83-89, 2005.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. **CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression.** *Genes Dev*, v. 13, p. 1501-1512, 1999.

SHIBATA, M. A.; ITO, Y.; MORIMOTO, J.; OTSUKI, Y. **Lovastatin inhibits tumor growth and lung metastasis in mouse mammary carcinoma model: a p53-independent mitochondrial-mediated apoptotic mechanism.** *Carcinogenesis*, v. 25, p. 1887-1898, 2004.

SHIEH, S. Y.; IKEDA, M.; TAYA, Y.; PRIVES, C. **DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2.** *Cell*, v. 91, p. 325-334, 1997.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. **Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation.** *Free Radic Biol Med*, v. 44, p. 1833-1845, 2008.

SMALLEY, K. S. **Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy.** *J Invest Dermatol*, v. 130, p. 28-37, 2010.

SOHN, D.; GRAUPNER, V.; NEISE, D.; ESSMANN, F.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; JANICKE, R. U. **Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53.** *Cell death and differentiation*, v. 16, p. 869-878, 2009.

SOLOMON, K. R.; FREEMAN, M. R. **Do the cholesterol-lowering properties of statins affect cancer risk?** *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, v. 19, p. 113-121, 2008.

STAHL, J. M.; SHARMA, A.; CHEUNG, M.; ZIMMERMAN, M.; CHENG, J. Q.; BOSENBERG, M. W.; (...) ROBERTSON, G. P. **Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma.** *Cancer Res*, v. 64, p. 7002-7010, 2004.

STEWART, S. A.; WEINBERG, R. A. **Telomeres: cancer to human aging.** *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 22, p. 531-557, 2006.

TAKEDA, I.; MARUYA, S.; SHIRASAKI, T.; MIZUKAMI, H.; TAKAHATA, T.; MYERS, J. N.; (...) SHINKAWA, H. **Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells.** *Cancer Sci*, v. 98, p. 890-899, 2007.

TAVINTHARAN, S.; ONG, C. N.; JEYASEELAN, K.; SIVAKUMAR, M.; LIM, S. C.; SUM, C. F. **Reduced mitochondrial coenzyme Q10 levels in HepG2 cells treated with high-dose simvastatin: a possible role in statin-induced hepatotoxicity?** *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 223, p. 173-179, 2007.

THORNTON, T. M.; RINCON, M. **Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival**. International journal of biological sciences, v. 5, p. 44-51, 2009.

TURNER-IVEY, B.; MANEVICH, Y.; SCHULTE, J.; KISTNER-GRIFFIN, E.; JEZIERSKA-DRUTEL, A.; LIU, Y.; NEUMANN, C. A. **Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer**. Oncogene, v. 32, p. 5302-5314, 2013.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence**. Mol Cell Biochem, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease**. Int J Biochem Cell Biol, v. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. **Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**. Chem Biol Interact, v. 160, p. 1-40, 2006.

VAN ENGELAND, M.; RAMAEKERS, F. C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. **A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture**. Cytometry, v. 24, p. 131-139, 1996.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes**. Genome Biol, v. 3, p. 34, 2002.

WIEMANN, S. U.; SATYANARAYANA, A.; TSAHURIDU, M.; TILLMANN, H. L.ZENDER, L.; KLEMPNAUER, J.; (...) RUDOLPH, K. L. **Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis**. FASEB J, v. 16, p. 935-942, 2002.

WINTERBOURN, C. C. **Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species**. Nat Chem Biol, v. 4, p. 278-286, 2008.

WITTGEN, H. G.; VAN KEMPEN, L. C. **Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications**. Melanoma Res, v. 17, p. 400-409, 2007.

WU, C.; MILOSLAVSKAYA, I.; DEMONTIS, S.; MAESTRO, R.; GALAKTIONOV, K. **Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1**. Nature, v. 432, p. 640-645, 2004.

WU, H.; GOEL, V.; HALUSKA, F. G. **PTEN signaling pathways in melanoma**. Oncogene, v. 22, p. 3113-3122, 2003.

WU, H.; JIANG, H.; LU, D.; XIONG, Y.; QU, C.; ZHOU, D.; (...) CHOPP, M. **Effect of simvastatin on glioma cell proliferation, migration, and apoptosis**. Neurosurgery, v. 65, p. 1087-1096; discussion 1096-1087, 2009.

YAMAGUCHI, H.; CALADO, R. T.; LY, H.; KAJIGAYA, S.; BAERLOCHER, G. M.; CHANOCK, S. J.; (...) YOUNG, N. S. **Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia.** N Engl J Med, v. 352, p. 1413-1424, 2005.

YANG, Y. C.; XIAO, D. W.; LIU, H.; CHUAN, L. M.; ZENG, Y. L.; ZHOU, D. A.; (...) HUANG, W. F. **Mechanism of simvastatin-induced K562 cell apoptosis.** Pharmacology, v. 84, p. 191-195, 2009.

ZAFARULLAH, M.; LI, W. Q.; SYLVESTER, J.; AHMAD, M. **Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions.** Cell Mol Life Sci, v. 60, p. 6-20, 2003.

ZHANG, Y.; YANG, J. M. **The impact of cellular senescence in cancer therapy: is it true or not?** Acta Pharmacol Sin, v. 32, p. 1199-1207, 2011.

ZHAO, W.; DIZ, D. I.; ROBBINS, M. E. **Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury.** The British journal of radiology, v. 80 Spec No 1, p. S23-31, 2007.

ZHU, Y.; CASEY, P. J.; KUMAR, A. P.; PERVAIZ, S. **Deciphering the signaling networks underlying simvastatin-induced apoptosis in human cancer cells: evidence for non-canonical activation of RhoA and Rac1 GTPases.** Cell death & disease, v. 4, p. e568, 2013a.

ZHU, Y.; XU, L.; ZHANG, J.; HU, X.; LIU, Y.; YIN, H.; (...) LIN, Z. **Sunitinib induces cellular senescence via p53/Dec1 activation in renal cell carcinoma cells.** Cancer Sci, v. p. 2013b.