

CELESTINO PRÓSPERO DE SOUZA SOBRINHO

**ATIVIDADE DA TELOMERASE E
PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DE
MELANOMA HS839.T SUBMETIDAS AO AZT**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências**

SÃO PAULO

2009

CELESTINO PRÓSPERO DE SOUZA SOBRINHO

**ATIVIDADE DA TELOMERASE E PROLIFERAÇÃO
DE CÉLULAS DE MELANOMA HS839.T
SUBMETIDAS AO AZT**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção
do Título de Mestre em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. ALFREDO GRAGNANI FILHO

CO-ORIENTADORES: Prof. Dr. IVAN D. A. OLIVEIRA SANTOS

Profa. MONICA V. NUNES LIPAY

SÃO PAULO

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA**

TITULAR: PROFA. DRA LYDIA MASAKO FERREIRA

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

“Dedico este trabalho a minha esposa Joana Darc, por sua paciência e cumplicidade, minha querida filhinha Yasmin, fonte de luz na minha vida, que não me deixa perder o rumo, meu tio Sidnei Fortunato (in memoriam), que sem sua ajuda, não teria iniciado o caminho da ciência”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pelo apoio, suporte e estrutura a Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM PROFA. **DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA.**

Agradeço pela grande confiança, fé e orientação ao Chefe da Disciplina de Cirurgia Plástica UNIFESP/EPM PROF. DR. **IVAN DUNSHEE DE ABRANCHES OLIVEIRA SANTOS.**

Agradeço pela orientação e tempo investido ao Professor Adjunto Colaborador da Disciplina de Cirurgia Plástica UNIFESP/EPM PROF. **ALFREDO GRAGNANI FILHO.**

Agradeço pelo apoio, orientação e paciência com minhas deficiências à professora Afiada da Disciplina de Genética do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP/EPM PROFA. **MÔNICA VANNUCCI NUNES LIPAY.**

Agradeço pelo inestimável apoio e colaboração a MSC. **ANDRÉA FERNANDES DE OLIVEIRA**, aluna do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

Agradeço pela ajuda e refino nas técnicas laboratoriais de cultura de células a Doutoranda MSC. **SILVANA GAIBA**, aluna do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

Agradeço pela parceria, grande ajuda e colaboração ao Doutorando MSC. **ANTONIO CARLOS ALOISE**, aluno do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

Agradeço pelos esclarecimentos e parceria ao mestrando **JORGE MANUEL**, aluno do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

Agradeço pela ajuda e mestranda **GABRIELA SOARES SILVA BRITO**, aluna do programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP/EPM.

Agradeço pela boa vontade e auxílio sempre que necessário a mestranda **KELLY CRISTINA DE OLIVEIRA**, aluna da Disciplina de Endocrinologia Clínica da UNIFESP/EPM.

Agradeço pela valiosa ajuda e esclarecimentos ao mestrando **ATILA GRANADOS AFONSO DE FARIA**, aluno da Disciplina de Reumatologia da UNIFESP/EPM.

Agradeço por todo inestimável auxílio e apoio as secretarias **SANDRA DA SILVA, SILVANA APARECIDA DA COSTA DE ASSIS E MARTA REJANE DOS REIS SILVA**, funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia plástica UNIFESP/EPM.

Agradeço a **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro fornecido, processo: 07/59225-0.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	VI
LISTAS DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	X
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	06
3. LITERATURA	07
4. MÉTODOS	22
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS	52
NORMAS ADOTADAS	62
ABSTRACT	64
ANEXOS	66
FONTES CONSULTADAS	68

Lista de Figuras

Figura 1.	Descrição dos grupos experimentais	24
Figura 2.	Curva padrão da amostra do extrato protéico	28
Figura 3.	Grupos: controle positivo e concentrações de AZT em μM , detecção da viabilidade celular tempo 24 horas	30
Figura 4.	Grupos: controle positivo e concentrações de AZT em μM , detecção da viabilidade celular tempo 48 horas	31
Figura 5.	Grupos: controle positivo e concentrações de AZT em μM , detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS839.T por PCR- ELISA® tempo 24 horas	32
Figura 6.	Grupos: controle positivo e concentrações de AZT em μM , detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS 839.T por PCR-ELISA® tempo 48 horas	33
Figura 7.	Grupos: controle positivo e concentrações de AZT em μM , detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS 839.T por TRAPEZE RT® tempo 24 horas	34
Figura 8.	Quantificação de amostras 24horas, número de ciclos: Curva de monitoramento de fluorescência que ilustram amplificação em tempo real	35
Figura 9.	Grupos: controle positivo e concentrações de AZT em μM , detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS839.T por TRAPEZE RT® tempo 48 horas	36
Figura 10.	Quantificação de amostras 48horas, número de ciclos: Curva de monitoramento de fluorescência que ilustram amplificação em tempo real	37

Lista de abreviaturas e símbolos

- ATCC Coleção americana de tipo de culturas
- AZT Azidotimidina-trifosfato.
- BSA Albumina sérica bovina
- DMEM Meio eagle modificado por Dulbecco.
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DNTPS Trifosfatos desoxinucleotideo
- EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
- *et al.* e colaboradores.
- HIV Vírus da imunodeficiência em humanos.
- Htert Subunidade catalítica da telomerase em humanos.
- INCA Instituto nacional de Câncer
- mRNA RNA mensageiro.
- MTT Microtitulação colorimétrica.
- NTC Controle negativo
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- RNA Acido ribonucléico.

RESUMO

Introdução: O melanoma é decorrente de um crescimento celular descontrolado, com perda de inibição por contato e alterações no núcleo, afetando a manutenção dos telômeros. A telomerase, responsável pela síntese do telômero, protege o final da molécula de DNA. Sua atividade está ausente na maioria das células somáticas humanas e presente em quase todas linhagens de células tronco, germinativas e em mais de 90% dos tumores humanos. Estudos sugerem que a progressão de doenças malignas depende da reativação da telomerase, e que um agente inibidor dessa enzima poderia ser uma droga antitumoral efetiva, entre elas, o azidotimidina-trifosfato (AZT), sendo provado que o uso dessa droga em algumas neoplasias inibe *in vitro* sua ação. **Objetivo:** Avaliação da atividade da telomerase e da proliferação de células imortalizadas de melanoma Hs839T catalogo CRL-7572 submetidas à ação do AZT. **Métodos:** Foram utilizadas, linhagens de células de melanoma Hs839T catalogo CRL-7572, adquiridas via *American Type Culture Collection*, derivada da pele de um indivíduo caucasiano do sexo feminino de 42 anos. As células foram cultivadas em meio de cultura, suplementadas com diferentes concentrações de AZT em triplicata com 50, 100 e 200 μ M por 24h e 48h e comparados seus efeitos ao grupo controle. A avaliação da proliferação celular foi realizada pela técnica de MTT. A detecção da atividade da telomerase por KIT TRAPEZE® RT s7710 e PCR ELISA. **Resultados:** No tempo de 24 horas, quando comparado ao grupo controle, não houve inibição da proliferação celular e da atividade da telomerase da linhagem de melanoma Hs839T catalogo CRL-7572, embora sugira tendência à diminuição, quando comparados os grupos controle e 200 μ M. No tempo de 48 horas, houve uma diminuição momentânea, seguida de rápida recuperação, sugerindo que as células de linhagem utilizadas neste estudo são sensíveis ao AZT, mas que recuperam a atividade enzimática e proliferativa. **Conclusão:** A ação do AZT em células de melanoma HS839.T catalogo CRL-7572 estudadas nas concentrações e tempos propostos, não inibiu a atividade da telomerase e não afetou a proliferação celular.

Souza Sobrinho, Celestino Próspero

Atividade da telomerase e proliferação de células de melanoma HS839.T submetidas ao AZT. / Celestino Próspero de Souza Sobrinho. -- São Paulo, 2009. -- x, 69f.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica.

Título em inglês: Activity of the telomerase and proliferation of cells of melanoma HS839.Tsubmitted to the AZT.

1. Telomerase. 2. Melanoma. 3. Neoplasias Cutâneas. 4. Azidotimidina. 5. Células. 5. *In Vitro*.

1. INTRODUÇÃO

Uma das neoplasias de pior prognóstico, relatada por Hipócrates no século V AC, o melanoma decorre da proliferação descontrolada dos melanoblastos, de etiologia desconhecida. Vários fatores contribuem para o seu surgimento, como a predisposição genética, exposição solar, traumatismos físicos em nevos já existentes e imunodeficiências, sendo responsável por 3 a 4% das neoplasias malignas da pele (OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2002; GRUBER *et al.*, 2008; DHOMEN *et al.* 2009).

O melanoma desenvolve-se a partir da transformação maligna de melanócitos, as células que produzem pigmento e que se localizam na camada basal da epiderme humana. (BURTON *et al.*, 1993; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; CHUDNOVSKY, KHAVARI, ADAMS, 2005; RACHOU, CURADO, LATORRE 2006; GRUBER *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009).

Nas últimas quatro décadas, a incidência de melanoma aumentou mais rapidamente que qualquer outro tipo de câncer nos Estados Unidos da América com gastos financeiros, em 1997, que ultrapassaram 563 milhões de dólares. Além de ser a sétima neoplasia mais comum em 2008 naquele país, tratando-se da principal doença fatal na pele. Relatos de várias partes do mundo vêm demonstrando aumento em suas taxas de incidência e mortalidade (BURTON *et al.*, 1993; CHUDNOVSKY, KHAVARI, ADAMS, 2005; RACHOU, CURADO, LATORRE 2006; KASHANI-SABET *et al.*, 2009; McCORMACK *et al.*, 2009).

No Brasil, um estudo baseado em relatórios anatomopatológicos revelou que o melanoma cutâneo corresponde a 0,15% de todas as neoplasias malignas e dentre os tumores malignos de pele, responde por cerca de 5%. Gastos totais com assistência oncológica no Brasil em 2006 foram de R\$ 1.159.724.708,00, destes, foram gastos somente com melanoma cutâneo, o total de R\$

8.157.517,19 (SANTOS *et al.*, 1996; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2005; INCA 2006).

Células cancerígenas apresentam alterações no núcleo, que normalmente ocorrem em uma única célula somática, que continua dividindo-se até formar um tumor, seu crescimento é promovido, entre outros, por fatores angiogênicos secretados por estas células, afetando inclusive a manutenção do tamanho do telômero no DNA (CARVALHO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2006; LEJEUNE & RUEGG, 2006; SCHULTZ *et al.*, 2009).

Telômeros são estruturas especializadas, descritas pela primeira vez em 1930, constituídas de nucleoproteínas complexas nas terminações dos cromossomos eucarióticos, essenciais para a estabilidade do genoma (TAYLOR *et al.*, 1996; BLACKBURN & STRAHL, 1996; CANO, 2001; BROWN *et al.*, 2003; SHARPLESS & DEPINHO, 2004; ZIMMERMANN & MARTENS, 2007; CARROL & LY, 2009; MO *et al.*, 2009).

Em células somáticas normais, *in vivo*, os telômeros se encurtam nas sucessivas divisões, sendo natural que diminuam de tamanho durante seu ciclo de vida. Possivelmente, emitem sinais replicativos de senescência, que pode ser iniciada por uma verificação pontual que impede mecanismos de reparo envolvidos com a proteína p53, também detectada em melanomas (TAYLOR *et al.*, 1996; PIATYSZEK, *et al.*, 1995; PARSONS, 2003; BLACKBURN, 2005; AVERY-KIEJDA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009).

Devido às características próprias e às vias em que as células copiam seu DNA, cada vez que ocorre uma divisão, perdem-se entre 50 a 200 nucleotídeos do telômero. Em cultura de fibroblastos foi comprovada uma relação inversa entre o comprimento do telômero e a idade do indivíduo doador (HAYFLICK, 1979; LEHNINGER, NELSON, COX 2002; TAKUBO *et al.*, 2009).

A região telomérica também é a responsável pelo ancoramento dos cromossomos à membrana nuclear, garantindo a estrutura tridimensional do

núcleo, e a correta distribuição espacial dos cromossomos sugerindo função no posicionamento cromossômico para a replicação celular (PARSONS, 2003; ZENG *et al.*, 2009).

Sua disfunção contribui para redução da viabilidade celular, alterando a diferenciação. Na ausência de um mecanismo que mantenha os telômeros, a diminuição progressiva destes a cada replicação leva a um comprometimento da proliferação celular, aberrações e fusionamentos cromossômicos e processos cancerígenos (ZACCAGNINI *et al.*, 2005; ZENG *et al.*, 2009).

A enzima responsável pela síntese do telômero é conhecida como telomerase, que protege o final da molécula de DNA contra a degradação enzimática, evitando a ocorrência de fusões das extremidades e garantindo a duplicação correta nas regiões terminais dos cromossomos, podendo ser necessária para a proliferação indefinida das células humanas (KIM *et al.*, 1994; MO *et al.*, 2003; CARROL & LY, 2009; SOUZA SOBRINHO *et al.*, 2009).

Trata-se de uma enzima ribonucleoproteica capaz de adicionar seqüências de nucleotídeos no final dos cromossomos lineares, a partir de uma matriz de RNA. É uma transcriptase reversa especializada que pode ser associada com imortalização celular e câncer. Foi descrita pela primeira vez em 1985, por Greider e Blackburn, sua atividade está ausente na maioria das células somáticas humanas normais e presentes em quase todas linhagens de células tronco, imortais, germinativas e em aproximadamente 90% dos tumores humanos (RAMIREZ *et al.*, 1997; ZHU, FU, MATTSON, 2000; CANO, 2001; MERGNY *et al.*, 2002; MO *et al.*, 2003; VIDAURRETA *et al.*, 2007; SHAWI & AUTEXIER 2008; SAMALECOS *et al.*, 2009).

Estudos sugerem que a progressão de doenças malignas depende da reativação da telomerase, e que um agente inibidor dessa enzima poderia ser uma droga antitumoral efetiva, podendo induzir as células a senescência em

resposta ao encurtamento dos telômeros (CARVALHO *et al.*, 2006; FELDSER & GREIDER, 2007; SAMALECOS *et al.*, 2009).

Como a telomerase funciona como uma transcriptase reversa, os agentes inibidores desta molécula estão sendo testados, entre eles, o azidotimidina-trifosfato, zidovudina (AZT), sendo provado que o uso dessa droga inibe *in vitro* a ação da telomerase com importante redução dos terminais teloméricos (BLACKBURN & STRAHL, 1996; MELANA *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2003; FALCHETTI *et al.*, 2005; GUO *et al.*, 2009).

O AZT é utilizado em tratamento contra o vírus da imunodeficiência em humanos (HIV). Em combinação com outros antimetabólicos podem inibir o crescimento de linhagens celulares cancerígenas tais como: bexiga, colon, mama e adenocarcinomas, independente da atividade da telomerase (BLACKBURN & STRAHL, 1996; MELANA *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2003; FAJKUS *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2007; HUMER *et al.* 2008; GUO *et al.*, 2009).

Devido à importância dos trabalhos descritos acima e ao fato de linhagens celulares imortalizadas ou pré-estabelecidas de melanoma, passarem a ser utilizadas para testar a eficácia das drogas quimioterápicas sobre esse tipo de célula tumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2005), faz-se necessário um estudo sobre o efeito do AZT na atividade da telomerase em cultura de melanoma, visto que a inibição da telomerase poderia levar a célula neoplásica a uma reentrada no ciclo celular normal, consequência da redução das seqüências repetidas de nucleotídeos, que por sua vez, poderia levá-la às constantes erosões teloméricas com evolução para morte celular.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo é a avaliação da atividade da telomerase e da proliferação de células de melanoma HS839.T quando submetidas à ação do AZT.

3. LITERATURA

3. LITERATURA

HAYFLICK (1979) realizou cultivo celular de fibroblastos humanos normais e de animais e afirmou que elas estão predestinadas a sofrer um decréscimo, e que essas mudanças são decorrentes do avanço da idade e ocorrem no organismo inteiro. Constatou que quando fibroblastos humanos são cultivados, acarretam uma população viável de aproximadamente 50%, e que este potencial máximo é diminuído em células derivadas de doadores mais idosos e são inversamente proporcionais as suas idades. É possível que seja uma correlação direta entre o alcance máximo de vida de várias espécies e a população potencial de suas células.

TAYLOR *et al.* (1996) relataram que telômeros são as regiões terminais dos cromossomos lineares, e em células somáticas normais o comprimento dos telômeros encurtam com as divisões sucessivas das células. Afirmaram que as extremidades dos cromossomos, onde se localizam os telômeros, são constituídas de seqüências repetidas de nucleotídeos (TTAGGG) e que são importantes na estabilização do cromossomo durante sua replicação. Descreveram a telomerase como sendo uma enzima ribonucleoproteica, que mantém o comprimento dos telômeros em células imortais e em células germinativas. Embora presente em tecidos humanos fetais, pouco depois do nascimento a atividade da telomerase não é detectável, exceto em células germinativas e hematopoéticas e em tumores primários humanos. Neste estudo foi demonstrado que a atividade da telomerase estava presente em 73 de 77 carcinomas celulares basais, 15 de 18 carcinomas de pele cutâneos não metastáticos, e 6 de 7 melanomas cutâneos, contrastando com níveis extremamente baixos detectados em avaliação de pele protegida do sol. A atividade da telomerase pode ser encontrada em lesões inflamatórias da pele,

isto indicou que sua atividade nem sempre correspondia ao fenótipo maligno. Foi demonstrado que essa atividade estava presente junto à epiderme do prepúcio de recém-nascidos, sugerindo sua expressão na epiderme. Foi encontrado nível mais alto de atividade da telomerase em pele exposta ao sol quando comparada com pele não exposta, sugerindo que fatores ambientais podem modular a atividade da telomerase.

RAMIREZ *et al.* (1997) discutiram sobre a telomerase, afirmando tratar-se de uma enzima ribonucleoproteica capaz de adicionar seqüências de nucleotídeos no final dos cromossomos lineares. Ao passo que células somáticas normais possuem uma capacidade limitada de replicação e não conseguem expressar atividade da telomerase, como células imortais de eucarióticos, as células de tecidos de regeneração exigem uma capacidade maior de proliferação. Algumas células, em tais tecidos de renovação, também expressam atividade da telomerase, sendo bem possível prevenir erosão rápida de seus telômeros durante proliferação da célula. Neste estudo, eles mediram os níveis da atividade da telomerase em compartimentos dissecados do folículo de cabelo humano, no eixo de cabelo, fragmento de glândula, parte superior, fragmento mediano, fragmento intermediário e no fragmento de bulbo. Em folículos na fase anágena, níveis altos de atividade de telomerase foram encontrados quase exclusivamente no fragmento contendo bulbo dos folículos, com conteúdo glandular. Em comparação, folículos na fase catágena (repouso) tiveram níveis baixos da atividade da telomerase nos fragmentos contendo bulbo assim como em outros compartimentos. Com tais observações, eles indicaram que em folículos do couro cabeludo na fase anágena, fragmentos contendo células que se dividem ativamente expressam atividade da telomerase, ao passo que fragmentos contendo células com atividade mitótica baixa, expressaram níveis baixos de atividade da telomerase.

MELANA *et al.* (1998) avaliaram a telomerase como um RNA-dependente da DNA polimerase que mantêm o comprimento dos telômeros em linhagens de células germinativas e células-tronco, e que a redução dos telômeros ocorre durante a diferenciação normal e idade, a atividade da telomerase foi associada com imortalização celular e neoplasias, além de serem consideradas como um marcador para tratamento dessas patologias. Os autores investigaram seu efeito em quatro linhagens celulares cancerígenas de mama, leucemia de células T4 e uma normal de mama *in vitro*, e constataram uma inibição do crescimento de todas linhagens de células tumorais, mas foram realizados em várias concentrações. O crescimento de uma linhagem celular de mama normal também foi inibido, embora exigiu uma concentração ainda maior. Além disso, seus resultados também indicaram que o AZT inibiu a formação de colônias em agar (placa de petri) da atividade da telomerase, indicando que ele pode potencialmente ser usado sozinho ou em combinação com outros antimetabólicos como um agente anticâncer de mama, independente de seu crescimento ou da atividade da telomerase.

ZHU *et al.* (2000) avaliaram a subunidade catalítica da telomerase (TERT) como uma transcriptase reversa especializada que foi associada com imortalização da célula e câncer. Relataram que TERT é expressa em neurônios por todo o cérebro em desenvolvimento pós-natal, mas está ausente em neurônios no cérebro adulto. Eles descreveram essa supressão de níveis de TERT e função em neurônios embrionários do hipocampo de camundongo em cultura, usando a tecnologia anti-senso. O AZT, inibidor de telomerase, aumenta significativamente sua vulnerabilidade a morte celular induzida por amilase β -peptídeo, uma proteína neurotóxica, que se acredita, promova degeneração neuronal em doença de Alzheimer. Os neurônios de TERT foram reduzidos, e os níveis exibidos de tensão oxidativa aumentados e disfunção

mitocondrial seguindo a exposição à amilase β -peptideo. A superexpressão de TERT em células de feocromocitoma resultou na diminuição da vulnerabilidade a apoptose por amilase β -peptideo. Seus resultados demonstraram uma função neuroprotetora de TERT em um modelo experimental relevante à doença de Alzheimer, e sugere a possibilidade do poder dessa restauração da expressão de TERT em neurônios no cérebro adulto contra neurodegeneração.

MERGNY *et al.* (2002) afirmaram que a atividade da telomerase está ausente na maioria das células somáticas humanas normais e acreditam que a senescência do telômero é guiada por um produto com um sistema que fornece uma função de supressão de tumor. Este sistema preventivo pode ser contornado por células cancerígenas por reativação de um mecanismo de manutenção do telômero, a telomerase, que possuem uma estrutura não como a do cromossomo, que permite o DNA da célula reparar a maquinaria e distingui-los do DNA "irregular". Mas estas estruturas especializadas apresentam um problema quando iniciam a duplicação do DNA. O DNA telomérico progressivamente se desgasta a cada seqüência de divisão da célula em células que não expressam telomerase, uma transcriptase reversa especializada necessária para duplicar o DNA telomérico, devido às características as quais a telomerase é expressa em células malignas, mas não em todas células somáticas, os autores indicam que telômeros e telomerase podem ser propostos como atraentes alvos para a descoberta de novos agentes anticâncer.

FIGUEIREDO *et al.* (2003) descreveram o melanoma como a principal doença fatal originada na pele e que relatos de várias partes do mundo vêm demonstrando aumento em suas taxas de incidência e mortalidade, estimando que o melanoma cutâneo represente cerca de 3% dos cânceres, segundo sua

incidência, e um percentual que varia de 1% a 2% das mortes por câncer, e afirmam que o aumento médio anual de incidência dessa neoplasia nos Estados Unidos da América foi de aproximadamente 6%. No Brasil, um estudo baseado em relatórios anatomopatológicos revelou que o melanoma cutâneo corresponde a 0,15% de todas as neoplasias malignas.

BROWN *et al.* (2003) investigaram os efeitos de inibição da telomerase usando AZT em linhagem de células humanas de neoplasia colorretal na presença e ausência de 5-fluorouracil (5-FU) e células HT-29. Os autores mediram a atividade da telomerase usando protocolo de amplificação e repetição da telomerase. O comprimento de telômero foi determinado por análise *Southern*, e o ensaio com kit para análise de microtitulação foi realizado para determinar os efeitos de citotoxicidade do AZT e em combinação com o 5-FU. A presença de AZT-TP inibiu a telomerase de células HT-29, as células foram cultivadas com 125 μ M de AZT por 91 dias. Análise do *Southern* revelou um atrito do telômero ocorrido dentro deste período. A exposição a 125 μ M de AZT resultou em viabilidade levemente reduzida (10%) de células HT-29. No entanto, a presença de AZT aumentou citotoxicidade de 5 FU, sugerindo que os efeitos destas duas drogas são sinérgicos. Os dados são coerentes com a inibição da telomerase, com efeitos de crescimento inibitório, além desses, predisseram a perda da função do telômero.

PARSONS (2003) afirmou que nas células somáticas, é natural que o telômero diminua de tamanho durante seu ciclo de vida, sendo sinal de senescência e que a determinação laboratorial dos níveis da telomerase é feita através de uma reação em cadeia da polimerase (PCR), usando *primers* específicos para o RNA mensageiro (mRNA) da transcriptase reversa em humanos (hTERT), gene ativador da telomerase, permitindo o estudo do grau

de expressão que é diretamente relacionado à quantidade de mRNA sendo possível determinar dosagens de telomerase muito baixas até mesmo em tecidos somáticos adultos. Como a telomerase funciona como uma transcriptase reversa, os agentes inibidores da transcriptase reversa estão sendo testados, entre eles o AZT, sendo constatado que o uso dessa droga inibe *in vitro* a ação da telomerase com importante redução dos terminais teloméricos.

MO *et. al.* (2003) descreveram a telomerase como responsável da síntese do telômero, e que ela é expressa em aproximadamente 90% de tumores de células humanas, mas raramente em células somáticas normais. Em seus estudos, avaliaram a hipótese de se encurtar simultaneamente o telômero e a inibição da telomerase resultando em tumores seletivos. Em células humanas positivas para telomerase de faringe, o paclitaxel que é uma droga usada contra alguns tipos de câncer, causou erosão do telômero e apoptose. A expressão anti-senso ao componente hTERT inibiu atividade de telomerase, encurtando o telômero, a taxa de crescimento reduzida da célula, resultando numa sensibilidade mais alta significativa a paclitaxel. Outro inibidor de telomerase, 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), numa concentração que produziu um pequeno ou nenhum desprendimento de célula ou apoptose, inibiram a atividade de telomerase e aumentou o desprendimento induzido por paclitaxel da célula e apoptose. AZT também aumentou a atividade de paclitaxel em camundongos. Estes resultados demonstram que uso combinado de agentes aponta tanto para o telômero como para telomerase, como local de atividade sinérgica seletiva para tumores que dependem da telomerase para manutenção do telômero.

SHARPLESS & DEPINHO (2004) relacionaram o efeito da idade em mamíferos como ocorrência, em parte, da causa de um declínio na capacidade

de restauração de células tronco nos tecidos. Estas células de auto-renovação tornam-se malignas por um número pequeno de mutações oncogênicas, que se sobrepõem a mecanismos de supressão de tumor ARF-p53, p16INK4a-Rb, e os telômeros, que são nucleoproteínas complexas no final dos cromossomos que consistem em muitas cópias repetidas em *tandem*, esses mecanismos desenvolveram-se para evitar estas possibilidades. Estes caminhos benéficos antitumores, no entanto, parecem também limitar o alcance de vida de células tronco, assim contribuindo com os efeitos da idade.

FERNANDES *et al.* (2005) afirmaram que a incidência e a mortalidade por melanoma cutâneo vêm aumentando em todo o mundo e que os registros brasileiros de bases populacionais não refletem precisamente a real dimensão do problema. Melanoma cutâneo primário em amostras estudadas mostraram padrões semelhantes aos classicamente reconhecidos e maior frequência do estágio IA e melanoma *in situ*, e que existem algumas regras básicas que permitem o imediato reconhecimento do melanoma cutâneo em lesões melanocíticas, como as alterações de cor, tamanho, forma e superfície, crescimento rápido, descamação, ulceração, sangramento, prurido, dor e desenvolvimento de áreas nodulares sobre máculas pigmentadas.

CHUDNOVSKY *et al.* (2005) caracterizaram o melanoma como um tipo de câncer derivado de células que fornecem pigmentação. Somente nas últimas quatro décadas, a incidência de melanoma aumentou mais rapidamente que qualquer outra doença maligna nos Estados Unidos. O primeiro relato de melanoma foi localizado nos escritos de Hipócrates (460 AC). Laennec de René (1806) descreveu "*la melnose*" para a *Faculté de Medecine em Paris*, sendo a doença caracterizada em detalhes. William Norris sugeriu em um manuscrito de 1820 que o melanoma seria hereditário tendo descrito uma família com

numerosas pintas e vários membros de família com lesões de metástase. O melanoma se desenvolve a partir da transformação maligna de melanócitos, as células que produzem pigmento que se localizam na camada basal da epiderme humana.

CARVALHO *et al.* (2006), afirmaram que a atividade da telomerase está presente em linhagem de células imortalizadas, como o melanoma, sendo que esta enzima poderia ser utilizada como marcador no próprio tecido tumoral e que está sendo muito estudada nas últimas duas décadas em diversos tipos de tumores. Nesse estudo, concluíram que houve diferença significativa da atividade da telomerase comparada nos grupos de melanoma, pele adjacente, lesão melanocítica benigna e controle, aplicando-se o teste de Kruskal-Wallis, tanto na amostra total quanto nas pareadas, segundo o sexo, a faixa etária e o tipo de pele. Quando foram comparados os grupos dois a dois, houve diferença significativa entre o grupo de melanoma e o de pele adjacente, melanoma e o controle, melanoma e lesão melanocítica benigna e lesão melanocítica e controle. Não foi significativa a comparação entre a pele adjacente e controle, tanto na amostra total como na pareada e entre a lesão melanocítica benigna e pele adjacente na amostra pareada. Houve diferença estatisticamente significativa entre a atividade da telomerase e a presença de ulceração, da permeação vascular e o índice mitótico. Não foi demonstrada diferença significativa na análise da atividade da telomerase com o tipo histopatológico, nível de Clark, regressão, fase de crescimento e neurotropismo.

ZAMOLO *et al.* (2007) propuseram que o alongamento do telômero é um dos primeiros acontecimentos que levam ao processo de transformação e imortalização de células de melanoma cutâneo. Afirmam que a telomerase é uma ribonucleoproteína, uma transcriptase reversa com um componente de

RNA (TERC) e uma transcriptase reversa (TERT), com função associada ao enlogamento do telômero, em células que sobrevivem e proliferam indefinidamente, sendo que a preservação dos telômeros é essencial para o processo de imortalização. Descrevem que células somáticas raramente possuem a telomerase ativa, embora mais de 90% das células tumorais a expressem. Relatam que o aumento da proliferação celular e a desregulação de seu ciclo ocorrem em neoplasias humanas, incluindo melanoma cutâneo. A exata natureza das ligações entre a atividade da telomerase, proliferação celular e apoptose não está extensivamente elucidada. Discorrem em seu artigo de maneira hipotética, relacionar a atividade da telomerase com proliferação celular e melanoma cutâneo sendo o fator chave dessas ocorrências o enlogamento do telômero, que culmina com a imortalização celular. Descrevem que os melanomas possuem recursos que suprimem mecanismos de defesas apoptóticos, o que culmina com a proliferação celular descontrolada.

GAGOS *et al.* (2008) relataram que melanomas cutâneos são caracterizados pelo aumento da complexidade do cariótipo, estendendo com isso a incidência de alterações cromossômicas (aneuploidias e heteroploidias). Informaram sobre a ocorrência de uma metástase de melanoma estável na cavidade peritoneal, com cariótipo alterado, que este tumor de maneira incomum, não teve nenhuma atividade da telomerase detectável. Utilizaram a técnica de bandeamento G e Hibridização *in Situ* Fisch, além de um KIT TRAP para detecção da telomerase. Demonstraram que em preparações mitóticas as células malignas apresentaram telômeros curtos. A instabilidade dos microsátélites foi descartada pela repetição padrão de dois alelos importantes. Em seus dados houve a sugestão que uma combinação entre desigualdades genômicas e melanomas eram suficientes para a progressão fatal do tumor.

HUMER *et al.* (2008) investigaram a inibição do crescimento celular de melanomas *in vitro* e *in vivo* por AZT, discorreram em seu artigo que esta neoplasia além de ser a mais agressiva, em relação a outras da pele, possui um aumento alarmante de incidência mundial. Afirmaram que apesar de progressos recentes no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para tratar o melanoma, o índice de sobrevivência é ainda muito baixo. Descreveram o AZT como uma droga útil no tratamento contra o HIV, que originalmente foi desenvolvida como um agente antineoplásico. Relataram a utilização do AZT e sua combinação com outras drogas em trabalhos descritos na literatura em diversas células tumorais, tais como linfoma, cólon e colorretal, em que foi provado seu efeito antiproliferativo nas células, não havendo nenhum estudo em melanomas humanos. Caracterizaram o AZT como análogo de timidina, que posteriormente é incorporado no DNA e que as células neoplásicas possuem uma elevada atividade de timidina e capacidade proliferativa, sendo mais sensíveis ao AZT além desta droga agir como um inibidor de transcriptase reversa. Selecionaram três linhagens celulares de melanomas e analisaram os ciclos celulares, apoptose e o potencial do efeito inibitório no crescimento celular pelo AZT. A suplementação do AZT variou de 10 a 500 μ M, em triplicata por um período de 72 horas, com indução a apoptose a partir de 300 μ M, e da cisplatina em concentrações variadas. Seus resultados revelam que o efeito inibitório do AZT resulta de uma supressão do ciclo celular na fase S e que concentrações maiores da droga induzem a apoptose e efeitos citotóxicos. Demonstraram em seus estudos que a associação de AZT com cisplatina resultou em maior eficiência na inibição do crescimento celular do que a administração de uma das drogas isoladas. Utilizaram também camundongos imunossupressivos xenotransplantados com células de melanomas, tratados com 40mg/kg de AZT ao dia, por três semanas, aplicados no ombro esquerdo de cada animal, que,

comparados ao grupo controle, que recebeu solução salina, apresentou um crescimento tumoral inferior.

DHOMEN *et al.* (2009) descreveram o melanoma como o mais agressivo dos tumores de pele, derivados de células chamadas melanócitos, células pigmentadas especializadas que são responsáveis pelo tom da pele, cor de cabelo, além de proteção contra radiação ultravioleta. Relataram que a proteína específica Kinase BRAF, (um componente de RAS/RAF/MEK/ ERK) que sinaliza caminhos, é um componente chave em melanomas, visto que é ativado por mutações somáticas em 50 a 70% dos melanomas humanos, tornando-o o oncogene mais freqüente, que sofre mutação nesta doença. Afirma que a substituição do ácido glutâmico por ácido valina na posição 600 (V600E) é a mais comum das mutações no BRAF em melanomas (ocorrendo em mais de 90% dos casos) e que BRAF^{V600E} estimula a sinalização celular, fatores de crescimento independentes e proliferação, além de transformação e imortalização dos melanócitos, permitindo, em experimentos, que estas células crescessem como tumores em camundongos. Os inibidores de BRAF^{V600E} sinalizam a proliferação de melanomas e impedem a indução a apoptose celular *in vitro*. Em experimentos, relataram que *in vitro* e *in vivo* eles diminuem o crescimento de xenoinxertos de melanomas, dados estes que demonstraram que BRAF^{V600E} é necessário para manutenção e progressão de melanomas em seres humanos. Apesar de sua associação clara com a manutenção e progressão do tumor, a superexpressão de BRAF^{V600E} em melanócitos, há uma indução de grupos celulares (nevus-similares) que não evoluem para melanomas, salvo casos em que a p53 também seja anulada, além do fato de que mutações no BRAF^{V600E} são encontradas em 80% dos nevus humanos, lesões benignas de melanócitos que podem permanecer inalteradas durante décadas. Discorreram, que a soma desses dados indicam que a ativação do BRAF^{V600E} não é suficiente

para a transformação de melanócitos em melanoma e que fatores genéticos adicionais são necessários para induzir a transformação plena dos melanócitos, além de que os dados disponíveis neste trabalho não são suficientes para afirmar que BRAF^{V600E} é o responsável principal ou resultado de uma mutação passageira na melanogênese.

CARROL & LY (2009) descreveram a telomerase como uma ribonucleoproteína complexa que possui a principal função de adicionar repetições de seis nucleotídeos no final dos cromossomos utilizando uma transcriptase reversa (hTERT) e um modelo de RNA. A elongação do DNA é necessária para reverter o problema de replicação de células eucarióticas, pelo qual a DNA polimerase não pode duplicar de maneira plena cromossomos lineares. Esse fenômeno, juntamente com o estresse oxidativo e outros efeitos endógenos e exógenos, provocam encurtamento cromossômico na ordem de 50 a 100pb por divisão celular. Afirmaram que a erosão do telômero limita a capacidade replicativa da maioria das células somáticas que não expressam atividade da telomerase e que as células cujo telômeros encurtam a um comprimento crítico e entram em uma etapa conhecida como senescência replicativa. Discorreram que diferentemente destas células, as germinativas, células-tronco e certos tipos de células somáticas contornam essa barreira, expressando a enzima telomerase, permitindo a manutenção do telômero e evitando a senescência, as mutações nesta região geram enzimas que estão cataliticamente ativas *in vitro*, mas biologicamente inertes, em contraste, possui regiões evolutivamente conservadas, importantes para a localização celular do hTERT, interação com RNA, multimerização e função enzimática.

FANG & BELANG (2009) avaliaram o papel atual do AZT, que atualmente é usado no tratamento da síndrome de imunodeficiência adquirida, além de discorrer sobre seu potencial com propriedades anticancer. Em seu estudo, foram examinados os mecanismos que contribuem para o aumento da sensibilidade e crescimento de células neoplásicas e o potencial de inibição do AZT. Para isso, como modelo experimental, foram cultivadas células derivadas de linhagem imortal (hepatomas Hepg2) e uma linhagem de cultura primária normal derivada do fígado (ThLE2), com AZT, em cultura contínua por 4 semanas, seguindo-se avaliações do número de células viáveis e necróticas, indução de apoptose, alteração do ciclo celular e atividade da telomerase. Em células Hep2, o AZT causou diminuições significantes dose-dependentes no número de células viáveis no tempo de 24 horas, com concentrações que variavam de (2 a 100 μ M), durante uma semana, houve um período de recuperação, com um leve aumento no número de células viáveis tratadas com AZT. A diminuição de células viáveis foi associada com a indução da apoptose, diminuição da atividade da telomerase, fase S e G/2M do ciclo celular. Durante o período de recuperação, a atividade da telomerase retornou aos controles iniciais, enquanto o dano ao ciclo celular persistia. Os pesquisadores demonstraram através da análise por *Western blot*, que o AZT causou uma diminuição em um ponto de verificação associado a kinase 1 (ChK1) e kinase 2 (ChK2) e um aumento de fosforilação (ChK1- Ser345 e ChK2- Thr68). Efeitos similares, mas em menor escala, foram observados em células THLE2, devido à adição de concentrações muito mais altas, que variavam de 50 a 2500 μ M, esses dados mostram que células Hepg2 são muito mais sensíveis ao AZT que células THLE2. Eles também indicam que uma combinação entre o atraso da progressão do ciclo celular, indução a apoptose e diminuição da atividade da telomerase contribui para a diminuição no número de células viáveis tratadas

com o AZT, e esse ponto de verificação das enzimas Chk1 e chk2 podem ter um papel importante na demora da progressão do ciclo celular.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo sob o número 156/07 (Anexo 1).

Trabalho experimental, *in vitro*, realizado em triplicata.

4.1 CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA HS839.T

No estudo foi utilizada linhagem de células imortalizadas de melanoma isolada e adquirida via *American Type Culture Collection* (ATCC - Manassas, USA) denominada HS 839.T, número de catalogo CRL-7572, derivada da pele com morfologia de fibroblastos de um indivíduo caucasiano do sexo feminino de 42 anos.

Os procedimentos para a utilização da linhagem HS 839.T foram realizados de acordo com as orientações descritas pelo ATCC, sendo as células cultivadas em meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM), (Gibco, USA) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island NY, USA), 0,02 ml de L-glutamina (Sigma Aldrich, St Louis, USA), 4,5 g/L de glicose (Merck, New Jersey, USA), 1,5 g/L de bicarbonato de sódio (Merck, New Jersey, USA), conforme descrito por MYUNG *et al.*, 2004; UMEMOTO *et al.*, 2006.

Após, foram mantidas em garrafas de cultura de 25cm² com 5 ml do meio de cultura, colocadas na incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%, até alcançarem confluência de 80% da garrafa, sendo posteriormente submetidas à ação de tripsina 0,01% (Sigma Aldrich, St Louis, USA), e transferidas para novas garrafas de 25cm², conforme protocolo experimental descrito por OLIVEIRA *et al.*, 2005.

As células foram submetidas a diferentes concentrações de AZT, sendo um grupo controle sem adição da droga, seguida de um grupo com adição de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M, por 24 horas e 48 horas, conforme demonstrado na figura 1.



Figura 1. Descrição dos grupos experimentais.

4.2 VIABILIDADE CELULAR

4.2.1 MTT

Para a determinação da atividade metabólica e do grau de proliferação celular, 10⁴ células/poço foram distribuídas em microplacas de 96 poços com 100 μ L de meio DMEM suplementadas com 10% de SFB, 0,2M L-glutamina, 4,5 g/L de glicose, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio.

As placas foram mantidas em incubadora a 37°C, com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂ por 24 horas para permitir a aderência das células. O meio foi aspirado e substituído por meio DMEM suplementadas com 10% de SFB, 0,2M L-glutamina, 4,5 g/L de glicose, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio

adicionando-se simultaneamente as concentrações descritas anteriormente do AZT.

As células foram incubadas novamente a 37°C, por 24 e 48 horas e posteriormente, foram adicionados em cada poço 10µl de solução de MTT (5mg/ml), mantidas em incubadas por 3 horas, sendo posteriormente, aspirado o meio e acrescentados 100µl isopropanol acidificado (0,04 N; HCl) em cada poço por 10 minutos para dissolução dos cristais de formazano. A análise foi realizada em leitor de placa de Elisa (Labsystem Multiskan EX) a 450 nm de comprimento de onda, com filtro referencial de 590 nm e a atividade metabólica foi obtida utilizando porcentagem em relação ao controle.

4.3 ATIVIDADE DA TELOMERASE

4.3.1 Preparação das células para análise da telomerase

O preparo das células, mistura das reações, amplificação por PCR e análise da expressão enzimática da telomerase foi realizada segundo orientações do fabricante do KIT TELOMERASE PCR-ELISA®, (Roche, Mannheim - Germany) e KIT TRAPEZE® RT (Chemicon, Temecula - USA).

As células foram tripsinizadas e o botão de células lavados com uma solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline* - Sigma Aldrich, St Louis, USA) e ressuspendidas em 200 µL de solução tampão (*CHAPS Lysis Buffer*), o mesmo procedimento foi realizado com o controle positivo de células fornecidas no KIT TELOMERASE PCR-ELISA® e KIT TRAPEZE® RT mantidas em gelo por 30 minutos e armazenadas em freezer -80°C.

4.3.2 KIT TELOMERASE PCR-ELISA®

Os extratos celulares que estavam armazenados no freezer -80°C foram descongelados e alíquotas foram analisadas por método imunoenzimático (hibridação e ELISA), com a utilização do kit Telomerase PCR-ELISA®, conforme descrito por LINCZ *et al.*, (2008).

Em um tubo do tipo *eppendorf*, foram adicionados 20 μl de reagente de desnaturação (hidróxido de sódio a 0,5%) a 5 μl do produto de amplificação e deixou-se incubando durante 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 225 μl de tampão de hibridação a cada tubo, solução contendo uma sonda de detecção marcada com digoxigenina, complementar à seqüência de repetição telomérica, misturado brevemente por agitação. Foram transferidos 100 μl da mistura a cada poço da placa de ELISA, sendo os poços cobertos a seguir com o adesivo para evitar evaporação, e a placa foi incubada a 37°C em um agitador a 9,5 g durante duas horas. Posteriormente, a solução de hibridação foi cuidadosamente aspirada e os poços foram lavados três vezes (250 μl /poço) com tampão de lavagem, durante 30 segundos antes de remover toda a solução. Adicionado a solução antidigoxigenina-peroxidase (100 μl /poço), a placa foi coberta novamente com o adesivo e incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos, sob agitação a 9,5 g. A solução foi removida e os poços foram lavados cinco vezes com tampão de lavagem por no mínimo 30 segundos. A seguir, o tampão foi retirado e adicionados 100 μl /poço do substrato de tetrametil-benzina em temperatura ambiente. A placa foi coberta novamente com o adesivo e incubada à temperatura ambiente por 20 minutos sob agitação 9,5 g.

Adicionaram-se 100 μl de reagente de parada, ácido sulfúrico a 5%, sem que fosse removido o substrato, para interromper o processo de revelação.

Dentro de um prazo de 30 minutos após o último procedimento, foi medida a imunoabsorbância das amostras num leitor de placa ELISA (Labsystem Multiskan EX) a 450 nm de comprimento de onda, com filtro referencial de 690 nm.

Considerou-se a amostra positiva para a atividade da enzima telomerase quando apresentou medida de imunoabsorbância maior que $0,2 A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$ unidades, isto é, medida a 450 nm, com comprimento de onda referencial de 690 nm, segundo o procedimento padrão do kit.

4.3.3 KIT TRAPEZE® RT

4.3.4 Preparo das misturas das reações

Foram produzidas alíquotas de: 0.4µL de *Hot Start Taq Polimerase*, 37.6 µL dH₂O e 10-750 ng/µL de extrato celular e reagentes fornecidos pelo fabricante (Chemicon, Temecula - USA): *CHAPS Lysis Buffer* (13.5 mL), TRAPEZE® RT Reação para mistura (1.12 mL), *primers*, TS, *primers* RP Tailed *primer*, Amplifluor®, *primers* K2 Amplifluor®, molde TSK Tailed *primer*, dA, dC, dG e dTTP diluídos em: 10X reação de tampão S Plus, 10mM MgCl₂, 0.5 mg/mL BSA, PCR - *Grade Water* (8.2 mL), protease, DNase e RNase-free, TSR8* (molde de controle) (45 µL), 0.2 amole/µL TSK molde e controle do botão de célula positiva para telomerase.

Os extratos celulares que estavam armazenados no freezer -80°C foram descongelados e alíquotas foram analisadas com a utilização do KIT TRAPEZE® RT, conforme descrito por FALCE *et al.*, (2008).

Em um tubo tipo *ependorf* contendo esses componentes incluindo a amostra celular, foram levados ao termociclador (Corbett Reserch Rotor Gene 3000, Sidney-Australia) contendo a mistura das reações e submetidos ao

programa de ciclagem de temperatura e incubados em 30°C por 30 minutos, esse é o passo de extensão da telomerase.

No termociclador, a extensão e amplificação por reação em cadeia da polimerase, foi realizada em 5 etapas (30°C por 30 minutos, 95°C por 2 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, 59°C por 60 segundos e 45°C por 10 segundos), estas etapas de amplificação foram descritas por PIATYSZEK *et al.*, (1995), sendo modificadas pelo fabricante do KIT TRAPEZE® RT. Ao término da reação, a análise da expressão enzimática da telomerase foi realizada através da amplificação gênica utilizando PCR em tempo real, sendo duas formas de quantificação: absoluta e relativa.

Para a realização dos experimentos foi necessária a construção de uma curva com proteína padrão (figura 2), utilizando-se o Soro Albumina Bovina (BSA) 99% fração V (Sigma Saint Lois, USA) e o Kit reagente de detecção protéica (Biorad Laboratories, Hercules - USA), baseado na metodologia descrita por BRADFORD (1976).

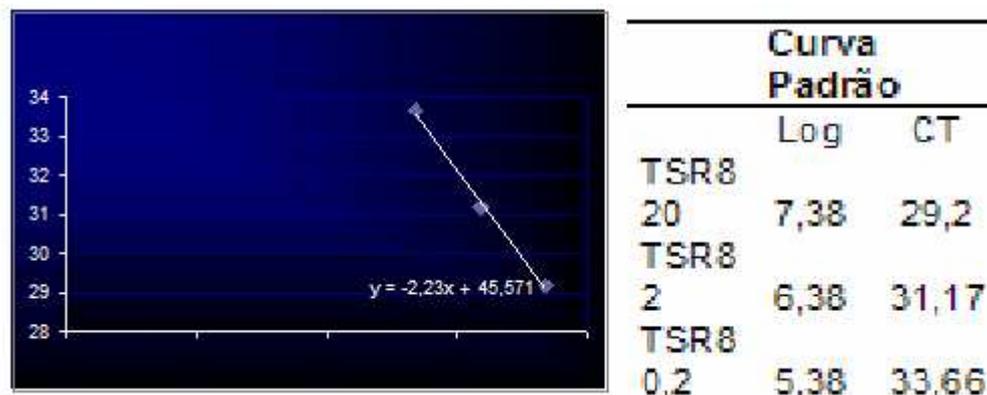


Figura 2. Curva padrão: eixo X, concentração de log [10] da amostra do extrato protéico; eixo Y: valores de CT dos pontos de diluição, na reta, os valores de CT marcados.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR

MTT

Os resultados obtidos dos valores de atividade enzimática das células do grupo 24 horas estão representados na figura 3. Foram observados aumentos graduais da população celular em todos os grupos no tempo de 24 horas (triplicata) quando comparados ao grupo controle, apresentando uma tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.

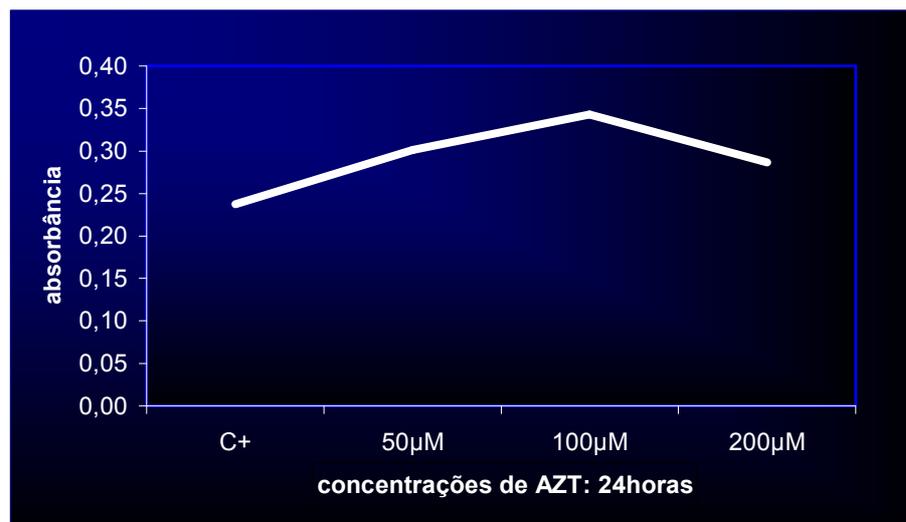


Figura 3. Tratamento no tempo de 24 horas: Controle positivo e concentrações de AZT em μ M, detecção da viabilidade celular por MTT, linhagem celular HS839.T.

Os resultados obtidos dos valores de atividade enzimática das células do grupo 48 horas estão representados na figura 4. Foram observados aumentos graduais da população celular em todos os grupos no tempo de 48 horas (triplicata) quando comparados ao grupo controle, não apresentando tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.

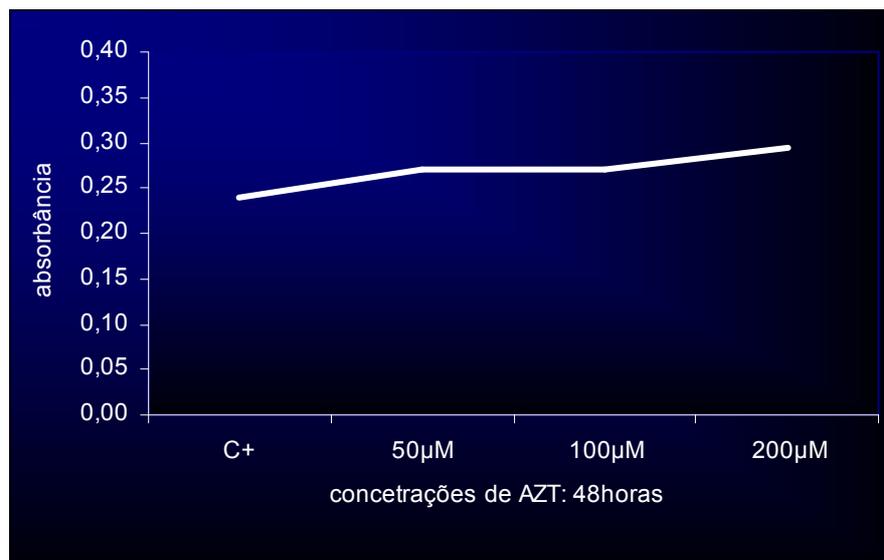


Figura 4. Tratamento no tempo de 48 horas: Controle positivo e concentrações de AZT em μ M, detecção da viabilidade celular por MTT, linhagem celular HS839.T.

5.2 ATIVIDADE DA TELOMERASE

5.2.1 KIT TELOMERASE PCR-ELISA®

A atividade da telomerase foi avaliada pelo Kit Telomerase PCR-ELISA® nos grupos controle e nos grupos tratados com AZT. A distribuição dos valores da imunoabsorbância (OD) referentes à atividade da telomerase está representada na figura 5. Foram observados aumentos graduais da atividade da telomerase em todos os grupos no tempo de 24 horas (triplicata) quando comparados ao grupo controle, apresentando uma tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.



Figura 5. Tratamento no tempo de 24 horas: Controle positivo e concentrações de AZT em μ M, detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS839.T por PCR-ELISA®.

A atividade da telomerase foi avaliada pelo Kit Telomerase PCR-ELISA® nos grupos controle e nos grupos tratados com AZT. A distribuição dos valores da imunoabsorbância (OD) referentes à atividade da telomerase está representados na figura 6. Foram observados diminuição inicial nos grupos 50 μ M e 100 μ M da atividade da telomerase, a partir do qual seguiu-se aumento gradual, quando comparados ao grupo controle, não apresentando tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.

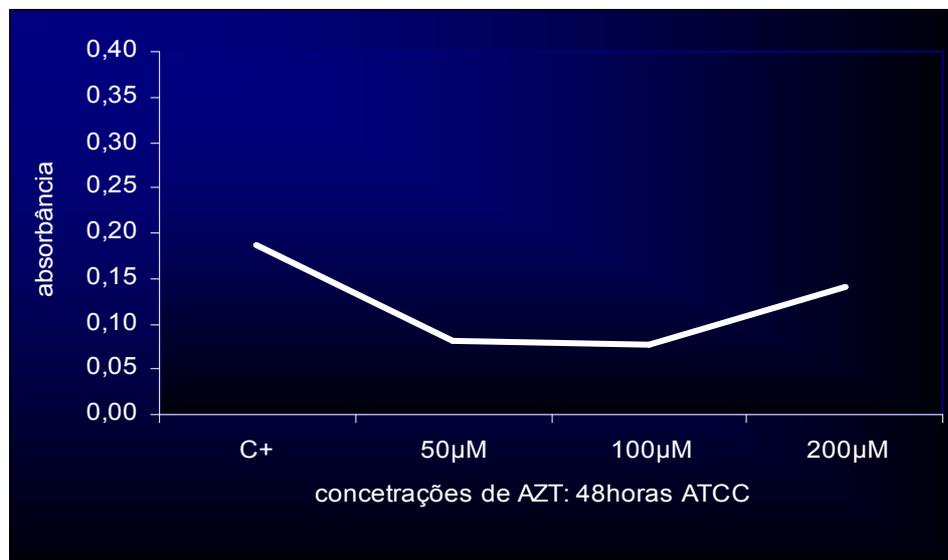


Figura 6. Tratamento no tempo de 48 horas: Controle positivo e concentrações de AZT em μ M, detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS839.T por PCR-ELISA®.

5.2.2 KIT TRAPEZE® RT

A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada utilizando o kit TRAPEZE® RT nos grupos controle e nos grupos tratados com AZT que estão representados nas figuras 7 e 8. Foram observados aumentos graduais da atividade enzimática da telomerase em todos os grupos no tempo de 24 horas (triplicata) quando comparados ao grupo controle, apresentando tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.

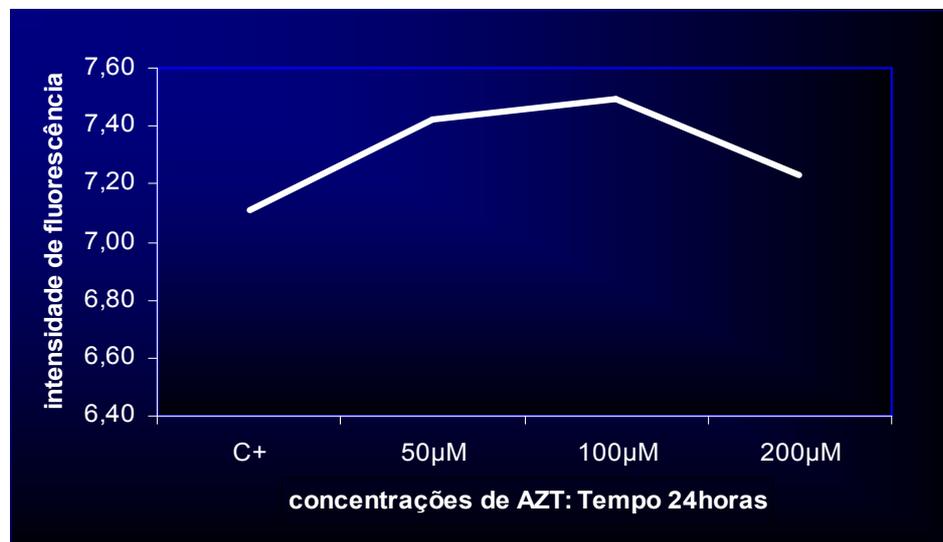


Figura 7. Tratamento no tempo de 24 horas: Controle positivo e concentrações de AZT em μ M, detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS839.T por TRAPEZE RT®.

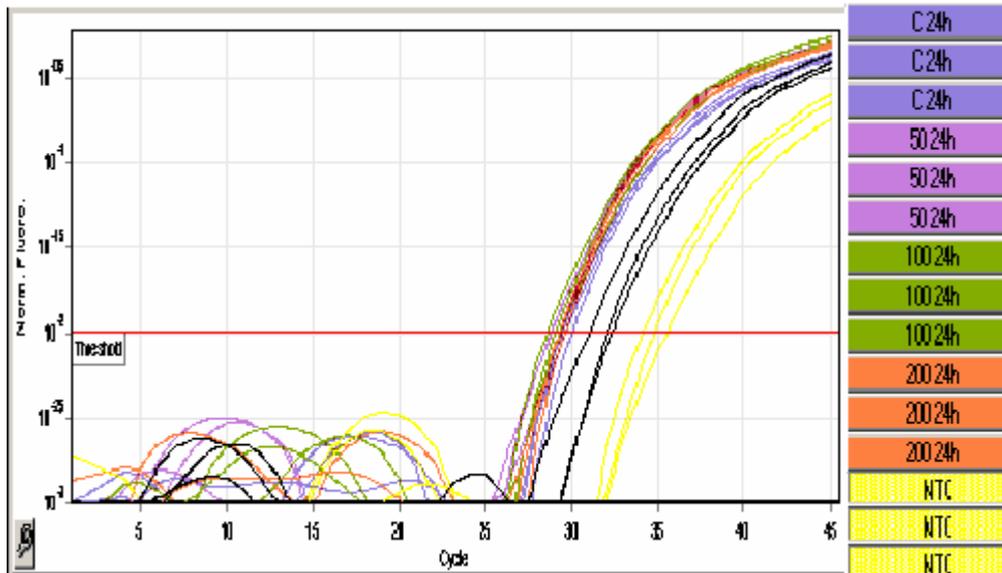


Figura 8. Quantificação de amostras 24horas, número de ciclos: Curva de monitoramento de fluorescência que ilustram amplificação em tempo real.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada utilizando o kit TRAPEZE® RT nos grupos controle e nos grupos tratados com AZT que estão representados nas figuras 9 e 10. Foram observados aumentos graduais da atividade enzimática da telomerase em todos os grupos no tempo de 48 horas (triplicata) quando comparados ao grupo controle, não apresentando tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.

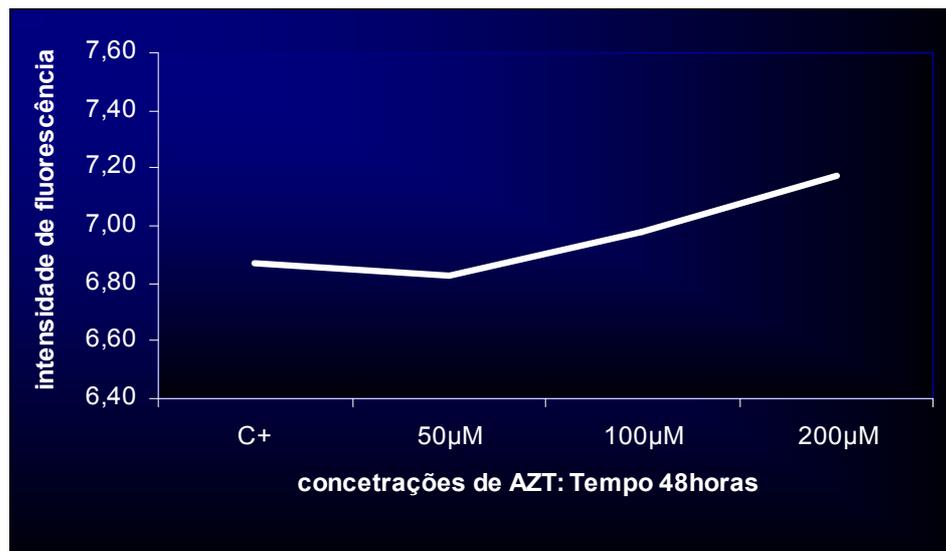


Figura 9. Tratamento no tempo de 48 horas: Controle positivo e concentrações de AZT em μ M, detecção específica da atividade da telomerase em linhagem celular HS839.T por TRAPEZE RT®.

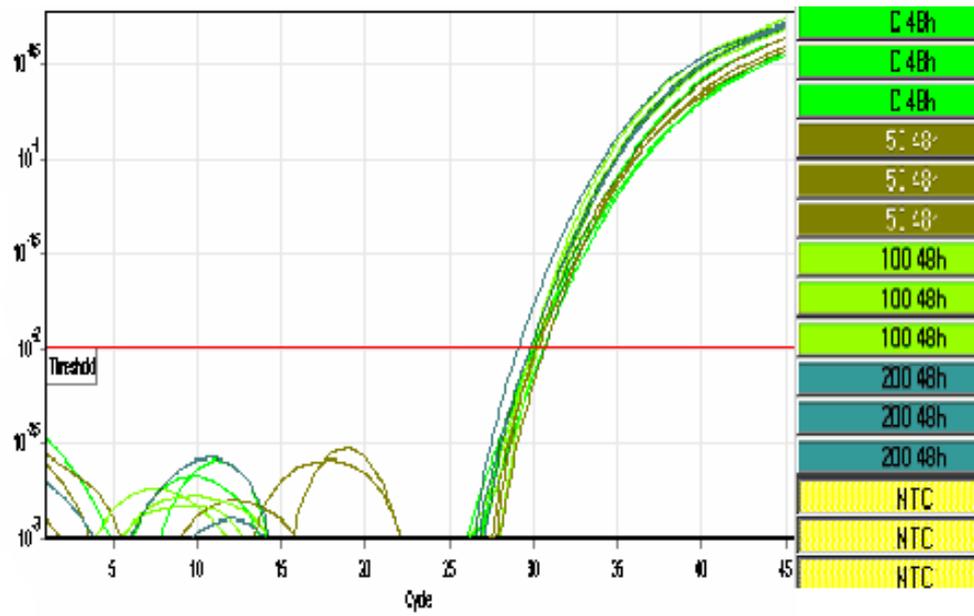


Figura 10. Quantificação de amostras 48 horas, número de ciclos: Curva de monitoramento de fluorescência que ilustram amplificação em tempo real.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O melanoma desenvolve-se a partir da transformação maligna de melanocitos, as células que produzem pigmento e que se localizam na camada basal da epiderme humana. Tais células sofrem um crescimento descontrolado, com perda de inibição por contato e alterações no núcleo. (BURTON *et al.*, 1993; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; CHUDNOVSKY *et al.*, 2005; RACHOU *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2009).

Nas últimas quatro décadas, a incidência de melanoma aumentou mais rapidamente que qualquer outro tipo de câncer nos Estados Unidos da América (EUA) com gastos financeiros, em 1997, que ultrapassaram 563 milhões de dólares, além de ser a sétima neoplasia mais comum em 2008 naquele país, tratando-se da principal doença fatal na pele. Relatos de várias partes do mundo vêm demonstrando aumento em suas taxas de incidência e mortalidade (BURTON *et al.*, 1993; FIGUEIREDO *et al.*, 2003; CHUDNOVSKY *et al.*, 2005; RACHOU *et al.*, 2006; KASHANI-SABET *et al.*, 2009; MCCORMACK *et al.*, 2009).

Vários fatores contribuem para o seu surgimento, como mutagênicos ambientais, decorrentes da exposição solar, traumatismos físicos em nevos já existentes, imunodeficiências e predisposição de fatores gênicos. Duas classes de genes têm papel chave no desenvolvimento do melanoma, e em suas configurações normais, elas dirigem o ciclo celular em uma intrincada seqüência de eventos, pelos quais as células crescem e se dividem. Os proto-oncogenes estimulam, enquanto genes supressores inibem os processos de divisão celular. Coletivamente, essas duas classes de genes estão relacionadas com a proliferação celular descontrolada, encontrada nos cânceres em humanos (WEINBERG 1996; OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2005).

Estudos recentes indicam que o gene Braf^{V600E} possui papel fundamental no desenvolvimento de melanomas, devido ao fato de sua expressão induzir a severos danos em tipos de melanocitos (DHOMEN, *et al.*, 2009).

A busca incessante para vencer a batalha da proliferação celular causada por neoplasias diversas, assim como o melanoma, tem mobilizado muitos cientistas a dedicarem suas pesquisas na compreensão desse mecanismo e tentar através de administração de novas drogas combatê-lo *in vitro* e posteriormente *in vivo*, analisando os possíveis modos de ação destas, criando estratégias para inibir esse avanço e proliferação (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A ocorrência de acúmulo de erros decorrentes destes fatos afetam a manutenção dos telômeros nos cromossomos, que são complexos nucleoprotéicos que formam as extremidades físicas dos cromossomos, constituídos por seqüências conservadas e repetitivas de DNA de dupla fita seguida de uma extremidade de fita simples rica em guanina. Trata-se de um substrato para telomerase e para proteínas teloméricas envolvidas na manutenção dos telômeros, impedindo fenômenos como degradações de regiões teloméricas, fusionamentos e perda de informações genômicas (CANO, 2001; LEHNINGER *et al.*, 2002; VENTURI *et al.*, 2004 BLACKBURN, 2005; BELLON *et al.*, 2008).

A telomerase é uma enzima ribonucleoproteica que sintetiza as repetições nos telômeros. Sua ativação permite que as células adquiram capacidade proliferativa irrestrita tendo como consequência, a imortalização celular (GABRIEL *et al.*, 2004). Trata-se de uma enzima com uma característica única: possui no seu interior uma fita de RNA, que serve de molde para a extensão dos telômeros, contém um componente de RNA que sintetiza repetições de DNA teloméricos, compensando a perda dos telômeros durante a divisão celular (VENTURI, CABRAL, LOURENÇO 2004; BLACKBURN 2005; BELLON *et al.*, 2008).

A telomerase é abundante em células embrionárias, mas está ausente na maioria dos tecidos somáticos adultos. Entretanto, em células tumorais, há uma franca atividade de sua expressão (WONG & COLLINS, 2003). De certo modo essa enzima faz uma "transcrição reversa" pois, a partir do molde de RNA constrói um novo segmento de DNA na extremidade do cromossomo (KIM *et al.*, 1994; MO *et al.*, 2003).

O conhecimento dos mecanismos de regulação desta enzima em humanos é extremamente importante para um melhor entendimento dos processos que levam a tumorigenese (SHARPLESS & DEPINHO 2004; SHAWI & AUTTEXIER, 2008; SAMALECOS *et al.*, 2009).

Fortes evidências indicam associação entre telômeros e o desenvolvimento da maioria dos diversos tipos de câncer em humanos, inclusive em neoplasias de pele como o melanoma (DAVIES *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2006). O alongamento do telômero é um dos primeiros acontecimentos que levam ao processo de transformação e imortalização de células de melanoma cutâneo (ZAMOLO *et al.*, 2007).

Como a telomerase funciona como uma transcriptase reversa, os agentes inibidores desta estrutura estão sendo testados, entre eles, o azidotimidina-trifosfato, zidovudina (AZT), sendo provado que o uso dessa droga inibe *in vitro* a ação da telomerase com importante redução dos terminais teloméricos (BLACKBURN & STRAHL, 1996; MELANA *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2003; PARSONS, 2003; FALCHETTI *et al.*, 2005; FANG & BELANG, 2009; GUO *et al.*, 2009).

O estudo *in vitro* utilizando técnicas de cultura de células é importante para a padronização biológica de materiais e drogas, permitindo melhor controle das condições experimentais. Dessa forma essas técnicas têm sido empregadas para estudar o efeito citotóxico de materiais e drogas.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade da telomerase e da proliferação de células imortalizadas de melanoma hs839.T submetidas à ação do AZT por MTT, KIT Telomerase PCR ELISA e KIT telomerase Trapeze RT.

Para análise dos dados resultantes destas combinações de metodologias distintas, optou-se pela triangulação. O emprego de métodos diferentes de coleta dos mesmos dados e comparação entre os resultados, ou seja, convergência ou corroboração das informações coletadas e interpretadas a respeito do mesmo fenômeno, visto que a validade e confiabilidade, são medidas de consistências (GLAZIER, 1992, DRIESSNACK *et al*, 2007). Os dados resultantes dos experimentos são comparados e relacionados entre si para ressaltar padrões, temas e conceitos (BRADLEY 1993), organizando com isso, unidades básicas descritivas e interpretações que envolvem atribuição de significado a análises, explicando padrões encontrados e procurando por relacionamentos entre as dimensões descritivas (PATTON, 1980).

O referencial teórico primário neste estudo é qualitativo devido à amostra ser tipicamente pequena e selecionada propositalmente (MORSE, 2003).

Para isso, foi selecionado uma linhagem de células imortalizadas de melanoma isolada e adquirida via *American Type Culture Collection* (ATCC) denominada HS 839.T, derivada da pele com morfologia de fibroblastos de um indivíduo caucasiano do sexo feminino de 42 anos.

Essa escolha foi a mais indicada no desenho desse estudo devido à qualidade de procedência e a certeza que a linhagem escolhida continha as características determinantes para estudar o efeito do AZT sobre a telomerase em células humanas, como a própria hiperatividade da enzima.

Isso evitou o trabalho de isolamento e purificação de células extraída de paciente, que poderia conter alguns vieses, decorrentes de fatores pertinentes à própria fisiologia e particularidades gênicas do indivíduo, assim como possíveis

alterações ambientais, que poderiam causar alguma interferência no padrão de divisões das células.

O subcultivo ocorreu em diversas passagens, o que não interferiu na expressão gênica, visto que é sabido que em células imortais, não há o risco de serem alteradas expressões protéicas, o processo de divisão celular é contínuo, e as alterações decorrentes de proteínas sintetizadas a partir da transcrição de sua respectiva seqüência gênica contida na molécula de DNA nuclear precederam durante o processo de transformação das células em linhagens neoplásicas (PINHO, 2005).

O aspecto morfológico de todas as células não sofreu alterações, com grande semelhança aos fibroblastos. As células proliferaram de uma maneira homogênea nas garrafas, sendo precedidas por aglomerados celulares, após certa confluência, característica de células tumorais (PALMA *et al.*, 2001).

A princípio, as trocas de meio de cultura ocorreram a cada 48 horas, ocasionando um crescimento lento. Foi observado que o tempo de confluência não estava de acordo com o tipo celular, ou seja, da linhagem tumoral.

Essa situação foi corrigida com troca parcial do mesmo meio a um volume de 2,5ml, (50%) pelo mesmo período, devido a fatores de crescimento, entre outros, liberados no meio via matriz extracelular, possibilitando um melhor desenvolvimento das células.

Foi constituído um banco de células armazenado em nitrogênio líquido com a referida linhagem. Quatorze microtubos contendo 1×10^6 cada foram descongeladas posteriormente e utilizados dessa mesma linhagem para um novo cultivo e rodada de experimentos.

Os testes com suplementação do AZT sobre o meio de cultura seguiu conforme trabalhos publicados, tendo como foco outras neoplasias, com dosagens diferenciadas. Optou-se pelas concentrações mais citadas na literatura, (BLACKBURN & STRAHL, 1996; MELANA *et al.*, 1998;

BROWN *et al.*, 2003; PARSONS, 2003; FALCHETTI *et al.*, 2005), concentrações essas que foram administradas diretamente ao meio de cultura a ser utilizado, respeitando o tempo de ação de 24 horas e de 48 horas. Os respectivos grupos foram distribuídos em triplicata, sendo grupo controle, sem adição do AZT, seguido de 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M (MELANA *et al.*, 1998; BROWN *et al.*, 2003; FALCHETTI *et al.*, 2005).

Realizada a semeadura das células em microplacas de 96 poços, e levadas a um leitor de placa de Elisa para análise da viabilidade.

A avaliação seguiu conforme a técnica de Microtitulação Colorimétrica *Methyl Thiazolyl Blue* (MTT), que consiste em uma das formas de se obter uma estimativa da viabilidade celular através da redução metabólica dos sais de tetrazolium para uma substância solúvel denominada formazano. O MTT (brometo (3-[5,4-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) de coloração amarela age liberando no meio de cultura, cristais de formazano que apresentam uma coloração púrpura (MOSMANN, 1983, SALLAY *et al.*, 2000; MOMOTA *et al.*, 2005; COUTINHO *et al.*, 2007)).

Os sais de tetrazolium são especialmente utilizados para ensaios de quantificação da viabilidade celular devido à possibilidade de mensurar por espectrofotometria a mudança de coloração no sobrenadante da cultura celular, que consiste em uma das formas de se obter uma estimativa da viabilidade celular através da redução metabólica dos sais de tetrazolium para uma substância solúvel denominada formazano.

Os testes demonstraram um aumento gradual da população celular em todos os grupos no tempo de 24 horas, quando comparado aos grupos controle, com uma tendência à diminuição na concentração de 200 μ M. Quando analisado os grupos no tempo de 48 horas, observou-se na análise do metabolismo celular o mesmo resultado que o grupo tratado no tempo de 24 horas, com um aumento

gradual da população de células, sem tendência à diminuição com o aumento da concentração do AZT na dosagem máxima de 200 μ M.

A detecção da atividade telomérica foi realizada através do KIT Telomerase PCR ELISA, metodologia descrita por KIM *et al.* 1994 e modificada pelo fabricante do KIT.

Foram adicionadas seqüências de primers TS sintéticos ao final das fitas homologas no sentido 5' 3' da DNA polimerase, em seguidas esses produtos são amplificados por PCR, utilizando primers *P1 Ts e P2*, fornecidos no KIT, gerando *amplicons*, que são produtos de amplificação da PCR, esta combinação de técnicas promove seqüências otimizadas de *primers*, eliminado com isso a necessidade de utilização de *TAQ Telomerase Hotstart*, evitando amplificações de dímeros, que são macromoléculas que se ligam aos ácidos nucléicos.

Uma alíquota do produto da PCR é desnaturada e hibridizada com digoxigenina, obtida pela hidrólise de digoxina, droga utilizada no tratamento de problemas cardíacos, juntamente com uma sonda de detecção específica de repetições teloméricas contida na hibridização do tampão do KIT.

O produto amplificado é detectado através de anticorpos anti-digoxigenina conjugados a peroxidase, grupos de enzimas que oxidam substratos orgânicos, que são metabolizados e formam um produto com coloração, resultante da reação da membrana, que pode ser detectado com métodos apropriados.

A atividade da telomerase foi avaliada nos grupos controle e nos grupos tratados com AZT no tempo de 24 e 48 horas.

Todos os grupos foram tratados em triplicata, visto ser um desenho ideal de estudo *in vitro*, pois uma mesma linhagem tem a mesma carga genética, sem outros vieses, resultando em média e desvio padrão dos resultados, dependendo do tipo de avaliação.

Foram observados aumentos graduais da atividade da telomerase em todos os grupos no tempo de 24 horas quando comparados ao grupo controle, apresentando uma tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M, quando analisado os resultados dos grupos no tempo de 48 horas, foram observados aumentos graduais da atividade da telomerase quando comparado ao grupo controle, não apresentando tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.

A análise da atividade da telomerase também foi medida utilizando um KIT comercial TRAPEZE® RT (Chemicon, Temecula - USA), que após um MIX (mistura de tampão, extrato celular, nucleotídeos, *primers* e DNAs polimerase) promove a detecção da enzima telomerase, em tempo real, após a amplificação de fragmentos no termociclador, que podem ser visualizados através de monitor no computador, com auxílio de software apropriado.

A técnica da PCR vem sendo aplicada ao longo dos últimos anos, favorecendo o desenvolvimento de métodos de amplificação quantitativos. A primeira documentação da PCR quantitativa foi publicada por HIGUCHI *et al.*, 1993. Esta técnica requer o uso de marcador fluorescente que tenha características de se intercalar ou anelar ao alvo da amplificação. A cinética do acúmulo de fluorescência durante a amplificação é diretamente proporcional ao número inicial de cópias de DNA ou DNA complementar-cDNA.

A detecção fluorométrica de atividade da telomerase realizada pelo uso de *primers* Amplifluor®, baseados no conceito de transferência de energia (ET), um processo no qual a energia muda de uma molécula que absorve e redireciona energia excitada para um meio receptor que resulta na saturação de emissão de fluorescência.

Em ordem para esta saturação ocorrer, moléculas do doador e do receptor devem estar próximas, os *primers* Amplifluor®, que contêm metade da transferência de energia, são projetadas para emitir um sinal de fluorescência só

quando são incorporados em produtos de PCR. Portanto, o aumento de fluorescência no recipiente de reação é diretamente correlacionada à quantidade de DNA amplificado produzido na reação.

Os *primers* Amplifluor® consistem de uma seqüência 3' final complementar à seqüência 5'. O fluoroforo, doador de energia e o DABSYL 4-dimethylamine, ácido sulfônico de benzina, estão em proximidade com o 5'.

Como o *primer* é incorporado num produto de PCR, a ligação é revelada pela atividade da polimerase, nesta extensa conformação, à distância entre o fluoroforo e sua dispersão é aumentada e um sinal de fluorescência é gerado, que é verificado, sendo verificado de várias maneiras, inclusive com a tecnologia *PCR Real Time*.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada utilizando um termociclador Rotor Gene 3000, (Corbett Research, Sidney-Australia). A atividade da telomerase variou em todas as amostras de extratos celulares neste estudo.

Na quantificação relativa, foi avaliada a relação do *Threshold Cycle* (CT), que se trata do primeiro aumento significativo na quantidade de amplificado de PCR, que se correlaciona com a quantidade inicial de amostra alvo. Na quantificação absoluta, os números de cópias das amostras do estudo são determinados baseando-se na curva de número de cópias padrão.

A curva de amplificação é uma representação gráfica do sinal de fluorescência versus o número de ciclos durante a fase exponencial da PCR, um ponto de corte (*threshold*) no sinal de fluorescência é determinado, a partir do qual as amostras podem ser comparadas. O *threshold* é uma função de quantidade de fluorescência acumulada, que está abaixo do limite de detecção.

O ciclo de PCR no qual a amostra ultrapassa o *threshold* e alcança o quadrante de detecção é denominado *cycle threshold* (CT). O valor de CT é

proporcional à quantidade de amostra inicial e é a base para as mensurações de quantidades de transcritos ou DNA (GINZINGER, 2002).

Neste estudo, a curva foi construída utilizando-se o Soro Albumina Bovina (BSA) 99% fração V, como proteína padrão e um Kit reagente de detecção protéica, baseado na metodologia descrita por BRADFORD (1976).

Os resultados no tempo de 24 horas sugerem que quando comparado ao grupo controle da linhagem com as diferentes concentrações de AZT, 50 μ M, 100 μ M e 200 μ M, não houve inibição da atividade da telomerase, embora sugira uma tendência à diminuição da atividade enzimática em 200 μ M.

Quando analisados os resultados no tempo de 48 horas, o mesmo padrão foi encontrado, há uma indicação que neste tempo, houve uma leve diminuição, quando se comparou a atividade da telomerase do grupo controle a concentrações de 50 μ M, embora, após, seguiu-se um aumento gradual da atividade desta enzima, talvez relacionada a concentrações que deveriam ser maiores, como apontado nos experimentos realizados por HUMER *et al.*, 2008.

Estes dados corroboram com os achados por HUMER *et al.*, (2008) que estudaram a inibição do crescimento celular de células de melanoma *in vivo* e *in vitro*, verificaram que em concentrações de AZT abaixo 200 μ M não foram medidos efeitos de citotoxicidade nas células, mas que a partir dessa concentração até 500 μ M por uma exposição prolongada de até 72 horas, as células de linhagens 518A2 e A375 ATCC testadas mostraram aumento substancial de apoptose, sugerindo uma relação de dose dependência.

Esses dados sugerem que as células de linhagem HS839.T utilizadas neste estudo são sensíveis ao AZT, mas que novamente, recuperam a atividade enzimática e proliferativa, com uma possível neutralização do nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa proveniente do AZT.

Como perspectivas, devem ser realizados novos experimentos com células provenientes de pacientes portadores de melanoma, com aplicação a

partir de 200 μM de AZT para cada grupo com tempo superior a 48 horas, tempos e concentrações propostas por HUMER *et al.*, (2008) que servirão de base para novos estudos.

Com a aplicação da técnica de PAAF (Punção aspirativa por agulha fina) de isolamento e purificação na coleta.

8. CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

A ação do AZT em células de melanoma HS839.T nas concentrações e tempos propostos não inibiu a atividade da telomerase, nem afetou a proliferação celular.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Bellon M, Nicot C. Regulation of telomerase and telomeres: Human tumor viruses take control. *J Nat. Cancer Inst.* 2008; 100(2): 98-08.
2. Blackburn EH. Telomerase and cancer. *Mol. Cancer Res.* 2005; 3(9): 477-82.
3. Blackburn EH, Strahl C. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol.* 1996; 16(1): 53-65.
4. Bradley J. Methodological issues and practices in qualitative research. *Library Quartely.* 1993; 63(4): 431-49.
5. Bedford MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 1976; 72: 248-54.
6. Brown T, Sigurdson E, Rogatko A, Brocoli D. Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol.* 2003; 10(8): 910-15.
7. Burton RC, Coates MS, Hersey P, Roberts G, Chetty MP, Chen S. An analysis of melanoma epidemic. *Int J Cancer* 1993; 55: 765-70.
8. Cano MIN. Telomere biology of tripanossomatids: More questions than answers. In *Trends Parasitol.* 2001; 17(9): 425-29.
9. Carrol KA & Ly H. Telomere dysfunction in human diseases: The long and Short of it! *Int J Clin Exp Pathol.* 2009; 2: 528-43.
10. Carvalho L, Lipay M, Belfort F, Santos IDAO, Andrade J, Haddad A, et al. Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2006; 59(9): 961-68.

11. Chen YC, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(1): 45-54.
12. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *The J Clin Invest*. 2005a; 115(4): 813-24.
13. Coutinho EL, Andrade LN, Chammas R, Morganti L, Schor N, Bellini MH. Anti-tumor effect of endostatin mediated by retroviral gene transfer in mice bearing renal cell carcinoma. *FASEB J*. 2007; 21(12): 3153-61.
14. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens C, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417: 949-54.
15. Dhomen N, Reis-Filho JS, Dias SR, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell*. 2009; 15: 294-03.
16. Driessnack M, Sousa VD, Mendes IAC. Revisão dos desenhos de pesquisa relevantes para enfermagem: Parte 3: Métodos mistos e múltiplos. *Rev. Latino-Am Enferm*. 2007; 5: 179-82.
17. Ezashi T, Telugo BPVL, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Poberts RM. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Applied Biological Sciences*. 2009; 106(27): 10993-98.
18. Falce SR, Jamielson BD, Chin AC, Mitsuyasu RT, Parish ST, Hween LN, et al. Telomerase-Based Pharmacologic Enhancement of Antiviral Function of Human CD8⁺ T Lymphocytes. *J. Immunology*. 2008; 181: 7400-06.
19. Falchetti A, Franchi A, Bordi C, Mavilia C, Mais L, Cioppi F, et al. Azidothymidine induces apoptosis and inhibits cell growth and telomerase activity of human parathyroid cancer cells in culture. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(3): 410-18.

20. Fang JL & Beland FA. Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes. *Toxicol Sci.* 2009; 18.
21. Feldser DM & Greider CW. Short telomeres limit tumor progression *in vivo* by inducing senescence. *Cancer Cell.* 2007; 11(5): 461-69.
22. Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cizzu T, Silva CSC. Estudo prospectivo de 65 casos. *An. Bras. Dermatol.* 2005; 80(1): 25-34.
23. Figueiredo LC, Cordeiro LN, Arruda AP, Carvalho MDF, Ribeiro EM, Coutinho HDN. Câncer de pele: Estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. *Rev. Bras. Cancerologia.* 2003; 49(3): 179-83.
24. Gabriel JG, Amenabar JM, Figueiredo MA. Bases genéticas do carcinoma espinocelular da cavidade bucal. *Sci. Med.* 2004; 14(3): 272-77.
25. Gagos S, Papaioannou G, Chiourea M, Merk-Loretti S, Jefford CE, Mikou P, et al. Unusually stable abnormal karyotype in a highly aggressive melanoma negative for telomerase activity. *Mol Cytogenet.* 2008; 1(20): 1-7.
26. Ginzinger DA. Gene quantification using real-time quantitative: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology.* 2002; 30(6):503: 12.
27. Glazier JD & Powell RR. Qualitative research in information management. Englewood: libraries Unlimited. 1992; 238p.
28. Guo XL, Ma NN, Zhou FG, Zhang L, Bu XX, Sun K, et al. Up-regulation of hTERT expression by low-dose cisplatin contributes to chemotherapy resistance in human hepatocellular Cancer Cells. 2009; 22(3): 549-56.

29. Gruber F, Kastelan M, Brajac I, Safitic M, Peharda V, Cabrijan L, et al. Molecular and genetic mechanism in melanoma. *Coll Antropol.* 2008; 2: 147-52.
30. Hayflick L. The cell biology of aging. *J Invest Dermatol.* 1979; 73(1): 8-14.
31. Higushi R, Focker C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology.* 1993; 9: 1026-30.
32. Humer J, Ferko B, Waltenberg, Rapberger R, Pehamberger H, Muster T. Azidothymidine inhibits melanoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Melanoma Reserch.* 2008; 18(5): 314-21.
33. Kashani-Sabet M, Rangel J, Torabian S, Nosrati M, Simko J, Jablons DM, et al. A multi-marker assay to distinguish malignant melanomas from benign nevi. *PNAS.* 2009; 106(15): 6268-72.
34. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266: 2011-15.
35. Lee JH, Park H, Chung H, Choi S, Kim Y, Hoo, et al. Syndecan-2 regulates the migratory potential of melanoma cells. *J Biol Chem.* 2009; 1-18.
36. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios da bioquímica.* 3ª Ed. São Paulo: Sarvier. 2002; 975p.
37. Lejeune FJ & Ruegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: An efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer.* 2006; 93(8): 90-00.

38. Lima JM, Serafim PVP, Silva IDCG, Forones NM. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq Gastroenterol.* 2006; 43(1): 8-13.
39. Lincz LF, Mudge LM, Scorgie FE, Sakoff CSH, Seldon M. Quantification of hTERT splice variantes in melanoma by SYBR Green Real-Time polymerase chain reaction indicates a negative regulatory role for the β deletion variant. *Neoplasia.* 2008; 10: 1131-37.
40. Liu X, Takahashi H, Harada Y, Ogawara T, Ogimura Y, Mizushima Y, et al. 3'-Azido-2',3'-dideoxynucleoside 5'-triphosphates inhibit telomerase activity in vitro, and the corresponding nucleosides cause telomere shortening in human HL60 cells. *Nucleic Acids Research.* 2007; 35 (21): 7140-49.
41. McCormack D, Al-Shaer M, Goldschmidt BS, Dale PS, Henry C, Papageorgio C. et al. Photoacoustic detection of melanoma micrometastasis in sentinel lymph nodes. *J Biomech Eng.* 2009; 131(7): 074519.
42. Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3-Azido-3'-Deoxythymidine. *Clin Cancer Res.* 1998; 4(3): 493-96.
43. Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Fichou MPT, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(4): 839-65.
44. Mo J, Xia Y, Ning Z, Wade TJ, Mumford JL. Elevated human telomerase reverse Transcriptase gene expression in blood cells associated with chronic arsenic exposure in Inner Mongolia, China. *Environmental Health Persp.* 2009; 117: 354-60.

45. Mo Y, Gan Y, Song S, Johnston X, Wientjes MG, Jessie LS. Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as cancer therapeutic approach. *Cancer Res.* 2003; 63: 579-85.
46. Momota H, Nerio E, Holland EC. Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas *in vivo*. *Cancer Res.* 2005; 65 (16): 7429-35.
47. Morse J. Principles of mixed methods and multimethod research design. Thousand. Paks: Sage Publication; 2003; 189-08.
48. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65(1-2): 55-63.
49. Myung JK, Afjehi-Sadat L, Felizardo-Cabatic M, Slave I, Lubec G. Expressional patterns of chaperones in ten human tumor cell lines. *Proteome Science.* 2004; 2 (8): 1-21.
50. Oliveira AF, Gragnani A, Oliveira Filho RS, Santos IDAO, França SG, Enokihara MMSS, Ferreira LM. Modelo experimental de cultura primária de melanoma metastático por punção aspirativa de agulha fina. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(5): 390-03.
51. Oliveira, CF, Nascimento, JLM, Muller, AH, Arruda MSP. Avaliação *in vitro* do efeito antiproliferativo das drogas BSA-1 e 32/26/2-B em linhagens cancerígenas de retinoblastoma Y79. *Rev. Virt. Inic. Acad. UFPA.* 2001(1): 1-9.
52. Oliveira Filho RS, Paiva GR, Ferreira LM, Alves MCA, Santos IDAO, Enokihara MMSS. Linfonodo sentinela em melanoma em criança: Relato de caso. *J Pediatr.* 2002; 78(5): 429-32.

53. Palma RT, Waisberg J, Simões AB, Bromberg SH, Appolonio. Significado prognóstico das micrometástases nos linfonodos do carcinoma colorretal: Detecção imunoistoquímica com anticorpos anticitoqueratina AE1/AE3. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2002; 29(3): 131-37.
54. Parsons HA. Telômeros, telomerase e câncer. *Rev. Fac. Ciênc. Med. Sorocaba* 2003; 5(1): 54-59.
55. Patton MQ. Qualitative evaluation methods. Belerly Hills: Sage; 1980.381p.
56. Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama K, Hiyama E, Wright WE, et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods Cell Sci.* 1995; 17:1-15.
57. Pinho, MSL. Estadiamento molecular do câncer colorretal: O futuro se aproxima. *Rev Bras Coloproct.* 2005; 25(3): 279-84.
58. Rachou AM, Curado MP, Latorre MRDO. Melanoma cutâneo: Estudo de base populacional em Goiânia, Brasil, de 1988 a 2000. *An Bras Dermatol.* 2006; 81(5): 449-55.
59. Ramirez RD, Wright E, Shay JW, Taylor RS. Telomerase activity concentrates in the mitotically active segments of human hair follicles. *J Invest Dermatol.* 1997; 108: 113-17.
60. Sallay I, Morimoriwaki S, Nakamura O, Yasuda S, Kimura M, Yamasaki N. et al. Interaction of the hemolytic lectin, cell-III, with cultured human leukemic cell lines. *J Hematother & Stem Cell Research.* 2000; 9: 877-83.
61. Samalecos A, Reimann K, Wittmann S, Schulte HM, Brosens JJ, Bammerger, AM, et al. Characterization of a novel telomerase-immortalized human endometrial stroma cell line, St-Tib. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7(1): 76.

62. Santos IDAO, Brunstein F, Minami E, Carvalho C, Filho EFA, Ferreira LM. Neoplasias malignas de pele: análise epidemiológica de 1.242 pacientes operados. *JBM* 1996; 71(2): 61-63.
63. Schultz J, Ibrahim SM, Vera J, Kunz M. 14-3-3 σ sigma gene silencing during melanoma progression and its role cycle control an cellular senescence. *Mol. Cancer*. 2009; 8(1): 53.
64. Sharpless EN & Depinho RA. Telomeres stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest*. 2004; 113(2): 160-68.
65. Shawi M & Autexier C. Telomerase, senescence and ageing. *Science Direct*. 2008; 129: 3-10.
66. Souza Sobrinho CP, Gragnani A, Santos IDAO, Oliveira AF, Garcia JE, Ferreira LM. Melanoma Cutâneo e Telomerase. *Applied Cancer Research*. 2009; 29(2): 1-18.
67. Takubo K, Nakamura K, shimomura N, Ishikawa N, Aida J. Telomere. *Nippon Rinsho*. 2009; 67(7): 1293-97.
68. Taylor RS, Ramirez RD, Ogoshi M, Chaffins M, Piatyszek MA, Shay JW. Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin condition. *J Invest Dermatol*. 1996; 106(4): 759-65.
69. Umemoto T, Yamato M, Nishida K, Yang J, Tano Y, Okano T. Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state. *Stem Cell*. 2006; 24: 86-84.
70. Venturi, BRM, Cabral, MG, Lourenço SQC. Carcinoma de células escamosas orais - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. 2004; 70(3): 385-92.

71. Vidaurreta M, Maestro ML, Rafael S, Vezanzones S, Sanz-Casla MT, Cerdan J, et al. Telomerase activity in colorectal cancer, prognostic factor and implications in the microsatellite instability pathway. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(28): 3868-72.
72. Wang C, Jurk D, Maddick M, Nelson G, Martins-Ruiz C, Von Zqlinicki T. DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. 2009; 8(3): 311-23.
73. Weinberg RA. How cancer arises. *Sci Am.* 1996; 275: 62-70.
74. Wong JMY & Collins K. Telomere maintenance and disease. *Lancet.* 2003; 62(9388): 983-88.
75. Zaccagnini G, Gaetano SC, Pietra LD, Nanni S, Grasselli A, Mangoni A, et al. Telomerase mediates vascular endothelial growth factor-dependent responsiveness in a rat model of hind limb ischemia. *J Biol Chem.* 2005; 280(15): 14790-98.
76. Zamolo G, Coklo M, Bosnar A, Batinac T. The relationship between telomerase activity and proliferation in cutaneous melanoma. *Medical Hypotheses.* 2007; 68(1): 125-27.
77. Zeng YL, Loffredo CA, Shields PG, Selim SM. Chromosome 9 arm-specific telomere length and breast cancer risk. *Carcinogenesis.* 2009; 8: 1380-86.
78. Zimmermann S & Martens UM. Telomeres and Telomerase as targets for cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007; 64: 906-21.
79. Zhu H, Fu W, Mattson MP. The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid β -peptide-induced apoptosis. *J Neurochem.* 2000; 75(1): 117-24.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

- ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.

- Ministério da Saúde - Conselho Nacional de Saúde - Resolução no. 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília – D.F.; 1996.24p.

- Consulta ao DeCS - Descritores em Ciências da Saúde. <http://decs.bvs.br/> – terminologia em saúde.

- Goldenberg S. Orientação Normativa para Elaboração e Difusão de Trabalhos Científicos. São Paulo: 2001. Disponível em: <http://www.metodologia.org>.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Melanoma is caused by an uncontrolled cell growth, with loss of inhibition contact and changes in the nucleus, affecting the maintenance of telomeres. Telomerase, responsible for telomere synthesis, protects the end of the DNA molecule. Its activity is absent in most human somatic cells and present in almost all lines of stem cells, germinatives, and in more than 90% of human tumors. Studies suggest that the malignancy progression depends on the telomerase reactivation, and that an inhibitor of this enzyme could be an effective antitumor drug, including the Azidothymidine-triphosphate (AZT) and proved that the use of this drug in some neoplasms inhibits their action “in vitro”. **Objective:** Evaluation of telomerase activity and proliferation of melanoma cells immortalized Hs839T catalog CRL-7572 subjected to the AZT action. **Methods:** We used melanoma cell lines of Hs839T catalog CRL-7572, acquired through American Type Culture Collection, derived from the skin of a 42-year-old Caucasian female person. The cells were grown in culture environment supplemented with different AZT concentrations in triplicate (50, 100 and 200 μ M) within 24 and 48 hours and its effects compared to the control group. The cell proliferation evaluation was performed by MTT. Detection of telomerase activity by KIT S7710 TRAPEZE[®] RT and PCR ELISA. **Results:** In 24 hours time, when compared to the control group, there was no inhibition of proliferation cell and telomerase activity, although there was tendency to decrease when compared to the control group and 200 μ M. In 48 hours time, there was a momentary decrease, followed by rapid recovery, suggesting that the cell lines used in this study are sensitive to AZT, but they recover the enzyme activity and proliferation. **Conclusion:** The action of AZT in melanoma cells HS839.T studied in the proposed concentrations and times did not inhibit telomerase activity and did not affect cell proliferation.

ANEXO 1



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisas
Hospital São Paulo

São Paulo, 16 de fevereiro de 2007.
CEP 0156/07

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) CELESTINO PROSPERO DE SOUZA SOBRINHO
Co-Investigadores: Alfredo Gagnani Filho; Ivan Dunshee de Abranches Oliveira Santos
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "Atividade da telomerase e proliferação de células de melanoma submetidas ao AZT".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo de cultura de células.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Inibição do crescimento celular e da atividade da telomerase por AZT em culturas de células de melanoma.

RESUMO: As amostras serão de linhagens de células imortalizadas de melanoma, adquiridas via ATCC e preparadas no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica. Estas linhagens celulares, após sua multiplicação, serão conservadas em nitrogênio líquido, sendo utilizadas no decorrer dos estudos e experimentos práticos de inibição enzimática da telomerase por Ziduvudina. As células após sua multiplicação em cultura devem ser separadas e adicionadas concentrações diferentes de AZT para serem comparados os graus de inibição. Será realizado o ensaio TRAP e amplificação por PCR para detecção de TRAPEZE XL Telomerase. O preparo do gel e comparação da atividade em concentrações variadas de AZT. Nos slots acrescentar controle negativo para inibição por AZT, que pode ser a própria atividade da enzima no melanoma e em outros slots colocar o produto com adição de AZT em concentrações variadas.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: efeito do AZT na atividade da telomerase em culturas de melanoma.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos que serão realizados.

TCLE: não se aplica.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento específico.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: .

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 16/2/2008 e 15/2/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil: estimativa 2006. Rio de Janeiro: INCA; 2006.