

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE LINHAGENS
E TUMORES DE MELANOMA E CÂNCER DE PRÓSTATA COM
DIFERENTES POTENCIAIS METASTÁTICOS**

JULIANNA MARIA DA CUNHA DE OLIVEIRA SANTOS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO- UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ**

Junho - 2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE-DARCY RIBEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE LINHAGENS
E TUMORES DE MELANOMA E CÂNCER DE PRÓSTATA COM
DIFERENTES POTENCIAIS METASTÁTICOS**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia como parte das exigências para obtenção do grau de Doutor em Biociências e Biotecnologia pelo programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

Apoio: UENF e CAPES

JUNHO- 2014

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DE LINHAGENS
E TUMORES DE MELANOMA E CÂNCER DE PRÓSTATA COM
DIFERENTES POTENCIAIS METASTÁTICOS**

JULIANNA MARIA DA CUNHA DE OLIVEIRA SANTOS

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 24 de Junho de 2014.

Banca Examinadora:

Dra Tatiana de Almeida Simao- IBRAG-UENRJ/INCA

Dr. Renato Augusto DaMatta - LBCT/CBB/UENF

Dra. Livia Marini Palma - LFBM/CBB/UENF

Dr. Arnaldo Rocha Façanha – LBCT/CBB/UENF
Orientador

Dedico este trabalho às pessoas que mais amo na vida: minha família. Em especial meu querido avô João Luiz “in memoriam”, meus pais João Carlos e Giovana, meus irmãos Lucas e Joanna e respectivos sobrinhos, Bia e Pedro, e meu namorado Luciano.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço à Deus por ter me dado forças durante essa caminhada e ter me dado oportunidade de passar por experiências inesquecíveis durante todo esse período;

Ao meu Orientador Dr. Arnaldo Rocha Façanha pelos ensinamentos e apoio oferecido ao longo desses anos;

À minha família, que sempre esteve presente me apoiando e motivando durante toda a trajetória e a cada desafio e obstáculo, que não foram poucos, meus pais João Carlos e Giovana, meus irmãos Lucas e Joanna e cunhados Thaís e Frede, sobrinhos Bia, Pedro, Tias Cecília, Normédia, primo João Victor, avós queridas e meu amigo e namorado Luciano...

Aos colegas do grupo de pesquisa em especial a amiga Josimara e Camila, sempre presentes e ajudando bastante durante toda a trajetória...

Aos colaboradores nacionais Dr. Eulógio Queiroz, Dr. Milton Kanashiro, Dr. Fábio Olivares, Dr. Lev Okorokov, Dra. Anna Okorokova, Dra. Maria Angélica Guzman Silva, Dr. Cláudio Retamal “in memoriam”, Dr. Carlos Logullo e aos colegas doutorandos Layla e William, por toda ajuda, ensinamentos e suporte nos experimentos;

Aos colaboradores internacionais Dr. Raul Martínéz-Zaguilán e Dra. Souad Sennoune pela oportunidade de me receber, todo apoio e incontáveis ensinamentos;

Aos amigos e queridos técnicos do LBCT Márcia Adriana, Bia, Giovana, Adrianinha, Darli, Rose e Arthur

Aos colegas do LBCT, em especial Luciana, Fernanda, Julianas (Azevedo e Padrão), Gabriel, Laura, Letícia e Lara, por todo apoio e conversas...

Às queridas secretárias Luciana e Gersa, por todo suporte e apoio...

À UENF pela concessão da bolsa nos 3 primeiros anos do doutorado;

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche PDSE;

À Dra. Camila Cruz pela revisão da tese e apoio ao longo do trabalho;

À banca examinadora...

Sumário

Lista de Figuras-----	VIII
Abreviaturas-----	X
Abstract-----	XI
Resumo-----	XII
1-Introdução-----	13
2- Revisão Literária-----	16
2.1- Regulação do pH Celular-----	16
2.2- Estrutura e Funcionamento da V-ATPase-----	17
2.3- Ocorrência de V-ATPase na Membrana Plasmática e Inibidores-----	18
2.4- F-ATPase-----	21
2.5- Na ⁺ -K ⁺ -ATPase-----	24
2.6- Hexoquinase-2-----	25
2.7- Aspectos do Metabolismo em Câncer-----	30
2.8- Câncer-----	34
2.9- Progressão Tumoral-----	35
2.10- Melanoma-----	38
2.11- Câncer de Próstata-----	39
3- Hipóteses-----	41
4- Objetivo Geral-----	42
4.1- Objetivos Específicos-----	42
5- Material & Métodos-----	43
Parte 1 – Metodologia aplicada para Linhagens Celulares e Tumores de Melanoma e Linhagem Controle J774 A ₁ -----	43
5.1- Cultura de Células: Linhagens celulares-----	45
5.2- Indução e Obtenção de Tumores Sólidos-----	45
5.3- Microscopia de Contraste de Fase-----	45
5.4- Citologia-----	45
5.4.1- Análise Morfométrica Nuclear-----	45
5.5- Histopatologia-----	46
5.5.1- Análise Morfométrica-----	46
5.6- Microscopia de Fluorescência-----	47
5.7- Microscopia Eletrônica de Transmissão-----	47
5.8- Consumo de O ₂ -----	48
5.9 - Localização HK2-----	48
5.10 - Fracionamento Celular e de Tumores-----	49
5.11.1 - Dosagem de Proteína-----	49
5.11.2- Atividade Hidrolítica-----	50
5.12 - Dot Blot-----	51
5.13- Monitoramento Gradiente de H ⁺ -----	51
Parte 2 Metodologia aplicada nas Linhagens de Câncer de Próstata – LNCAP, PC3, CL1, CL2, DU145 e Controle RWPE-1-----	53
5.14 - Cultura de Células: linhagens de próstata -----	53

5.15- Fracionamento Celular	54
5.15.1- Dosagem de Proteína	55
5.15.2 - Atividade Hidrolítica	55
5.16 - Imunocitoquímica	56
5.17 - Viabilidade Celular após ausência de glicose	56
6- Resultados	57
Parte 1 – Resultados Obtidos em Linhagens Celulares e Tumores de Melanoma e Linhagem Controle J774 A₁	57
6.1- Indução Experimental de Tumores de Melanoma B16F10 e B16F0	57
6.2 - Citologia dos Tumores B16F0 e B16F10	59
6.3- Histopatologia dos Tumores B16F0 e B16F10	60
6.4- Análises Morfométricas Nucleares e Nucleolares	61
6.5- Perfil de Marcação de Mitocôndrias	63
6.6- Ultraestrutura das Linhagens B16F0 e B16F10	64
6.7 - Ultraestrutura dos Tumores derivados de B16F0 e B16F10	68
6.8- Consumo de O₂	70
6.9- Colocalização Mitotracker e Hexoquinase-2	70
6.10- Atividades Enzimáticas	73
6.11- Dot Blot - Na-K-ATPase	78
6.12- Monitoramento de Gradiente de Prótons	79
Parte 2 – Resultados obtidos nas Linhagens de Câncer de Próstata – LNCAP, PC3, CL1, CL2, DU145 e Controle saudável de próstata RWPE	84
7- Discussão	99
8- Conclusão	108
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

Lista de Figuras

Figura 1- Esquema de domínios e subunidades da V-ATPase-----	18
Figura 2 - Esquema da estrutura de inibidores de V-ATPase-----	20
Figura3 - Esquema de célula tumoral com V-ATPase na membrana plasmática-----	21
Figura 4- Esquema dos domínios da F-ATPase-----	22
Figura 5- Esquema comparativo entre V e F-ATPase-----	23
Figura 6- Esquema de estrutura da F-ATPase-----	24
Figura 7- Esquema da Na ⁺ -K ⁺ -ATPase-----	25
Figura 8- Esquema do complexo ATP sintassoma-----	26
Figura 9- Esquema Metabolismo Energético-----	29
Figura 10- Esquema de aspectos metabólicos-----	34
Tabela 1- Especificação das linhagens celulares-----	44
Figura 11- Esquema de Transporte de H ⁺ -----	53
Figura 12- Camundongos após indução de tumores de melanoma-----	58
Figura 13- Tumores de melanoma-----	58
Figura 14- Citologia Tumor B16F0-----	59
Figura 15- Citologia Tumor B16F10-----	59
Figura 16- Histopatologia Tumor B16F0-----	60
Figura 17- Histopatologia Tumor B16F10-----	61
Tabelas 2 e 3 - Mensurações Morfométricas-----	62
Figura 18- Ilustração Morfometria-----	63
Figura 19- Mitotracker-----	64
Figura 20- Ultraestrutura da Linhagem B16F0 MET-----	65
Figura 21- Ultra estrutura da linhagem B16F0 MET-----	66
Figura 22- Ultraestrutura da Linhagem B16F10 MET-----	67
Figura 23- Ultraestrutura da Linhagem B16F10 MET-----	68
Figura 24- Ultraestrutura de Tumor da linhagem B16F0-----	68
Figura 25- Ultraestrutura de Tumor da Linhagem B16F10-----	69
Figura 26- Consumo de O ₂ -----	70
Figura 27- Colocalização entre Mitotracker e HK2-----	72
Figura 28- Atividade F-ATPase em linhagens de Melanoma com e sem glicose-----	73
Figura 29- Atividade de F-ATPase em Tumores de Melanoma-----	74
Figura 30- Atividade de F-ATPase em Tumores de Melanoma com e sem glicose-----	75
Figura 31- Atividade de V-ATPase em Linhagens de Melanoma com e sem glicose-----	76
Figura 32- Atividade de V-ATPase em Tumores de Melanoma com e sem glicose-----	77
Figura 33 - Atividade de Na ⁺ -K ⁺ -ATPase em Tumores de Melanoma com e sem glicose-----	78
Figura 34- Dot Blot Na ⁺ -K ⁺ -ATPase-----	79
Figura 35- Análise de Expressão Dot Blot-----	79
Figura 36- Transporte de H ⁺ pela V-ATPase em Linhagens de Melanoma-----	81
Figura 37 A- Transporte de H ⁺ pela V-ATPase em Tumor B16F0-----	82
Figura 37 B- Transporte de H ⁺ pela V-ATPase em Tumor B16F0-----	82
Figura 38 A - Transporte de H ⁺ pela V-ATPase em Tumor B16F10-----	83

Figura 38B- Transporte de H ⁺ pela V-ATPase em Tumor B16F10-----	83
Figura 39 - Atividade V-ATPase na fração de membrana plasmática ---	84
Figura 40 - Atividade de Na ⁺ -K ⁺ -ATPase na fração de membrana -----	85
Figura 41- Atividade V-ATPase na fração nuclear em linhagem de próstata -----	86
Figura 42- Atividade Na ⁺ -K ⁺ -ATPase na fração nuclear em linhagem de próstata -----	87
Figura 43- Atividade F-ATPase na fração mitocondrial em linhagem de próstata -----	88
Figura 44- Imunocitoquímica V-ATPase subunidade a1-----	89
Figura 45- Imunocitoquímica V-ATPase subunidade a 4-----	90
Figura 46- Imunocitoquímica Na ⁺ -K ⁺ -ATPase subunidade α1-----	91
Figura 47- Imunocitoquímica Na ⁺ -K ⁺ -ATPase subunidade α1-----	92
Figura 48- Imunocitoquímica Na ⁺ -K ⁺ -ATPase subunidade β 1-----	93
Figura 49- Imunocitoquímica Na ⁺ -K ⁺ -ATPase subunidade β 1-----	94
Figuras 50- Imunocitoquímica F-ATPase subunidade α -----	95
Figuras 51 - Imunocitoquímica F-ATPase subunidade α -----	96
Figura 52- Cinética Viabilidade após ausência de glicose-----	97
Figura 53- Gráfico de diminuição de crescimento após 24 horas de ausência de glicose-----	98
Figura 54- Gráfico de diminuição de crescimento após 12 horas de ausência de glicose-----	98

Abreviaturas

ATP - adenosina tri fosfato

GLUT- proteína transportadora de glicose

HIF - fator 1 α induzido por hipóxia

NADH - forma reduzida do dinucleotídeo de nicotinamida adenina

ROS - espécies reativas de oxigênio

DNA - ácido desoxirribonucleico

RNA - ácido ribonucleico

Pcs - pró-proteínas convertases

PSA - antígeno prostático específico (exame)

PHEM - tampão contendo PIPES, HEPES, EGTA e Magnésio

PIPES - Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico)

SFB - soro fetal bovino

DMEM - meio eagle modificado

PBS - tampão fosfato-salino

Rpm - rotações por minuto

Tris - abreviação do composto orgânico (hidroximetil)aminometano

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

PMSF - phenylmethanesulphonylfluoride

EGTA - Ethyleneglycol-bis (β -aminoethyl) tetraacetic Acid.

BSA - soro albumina bovina

Hepes - tampão, (4- (2-hydroxyethyl) - ácido 1-piperazineethanesulfonic)

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LBCT - Laboratório de Biologia Celular e Tecidual

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Ptn - proteína

SE \pm - erro padrão

PPI - inibidores de bombas de prótons

BCRJ - Banco de Células Radovan da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Pi - fosfato inorgânico

ATCC - Banco de Células Americano (American Type Culture Collection)

Abstract

Cancer is the most important health problem in developed country and even in developing countries, being responsible for over 6 million deaths for year that represents 12% of deaths cause in the world. Although the skin cancer is the most frequent in Brazil and 25% of all maligns tumors registred in the country, the melanoma is only 4% of skin malign neoplasia, despite of the malignancy because the ability to metastasize that justifies your high lethality. A global estimate showed the prostate cancer as the second most common type of cancer in men and your progression mechanism and causes still are little known. The V-ATPase as the Na^+ - K^+ -ATPase have been shown like important studies targets in cancer because the V-ATPase is expressed in the plasma membrane of the highly metastatic tumors and is more active and can not only helps the tumor growth and metastasis as also can be involved with signaling and still related with the energy metabolism. Ouar results show that Na^+ - K^+ -ATPase was shown less expressed and with less activity in the melanoma and prostate highly metastatic cell lines. And with respect to energy metabolism the study of glucose effect, because the highly metastatic tumors has the glycolytic metabolism hyperactive, has been crucial and underexplored. Furthermore, is important evaluate the functional role of F-ATPase, that that contrary to what is classically known also was shown more active in highly metastatic tumors. Then, in the tumors and cell lines of melanoma were observed the ultrastructure and morphology that confirmed and elucidated the functional features pertaining to different potential metastatic phenotype of the cell lines and tumors, including several features such as size of nucleus, number of nucleoli, hypoxia and necrosis areas and if is invasive. The glucose activated only the proton transport by V-ATPase in the highly metastatic tumors of melanoma while the Na^+ - K^+ -ATPase was found less active and more expressed in metastatic tumors while the Na^+ - K^+ -ATPase was found less active and less expressed in metastatic tumors. And the F-ATPase was shown more active in the highly metastatic tumors studied that showing that the studied tumors are not exclusively glycolytic. Was detected, in prostate cell line, for the first time activity of V-ATPase and Na^+ - K^+ -ATPase enzymes in the nuclear fraction and also were found by immunocytochemistry in the nucleus of these cells. Considering all data, this work provides important theoretical basis regarding energy metabolism of tumors involving the relationship with proton pumps and Na^+ - K^+ -ATPase.

Key-Word: V-ATPase, F-ATPase, Na^+ - K^+ -ATPase, mitocôndria, melanoma, prostate cancer.

Resumo

O câncer é um dos mais importantes problemas de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos por ano o que representa 12% das causas de morte no mundo. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no País, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase o que justifica sua alta letalidade. Uma estimativa mundial apontou o câncer de próstata como sendo o segundo tipo de câncer mais frequente em homens e seus mecanismos de progressão e causa são pouco conhecidos. A V-ATPase assim como a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ têm sido apontadas como importantes alvos de estudos em câncer visto que a V-ATPase expressa na membrana plasmática de tumores mais metastáticos se encontra bem ativa e pode não só apenas favorecer crescimento tumoral e metástase como também pode estar envolvida com sinalização e ainda tem relação com o metabolismo energético. Nossos resultados mostram que a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ foi achada menos expressa e menos ativa nessas linhagens mais metastáticas de melanoma e próstata. E ainda com relação à energética tumoral o estudo do efeito da glicose, visto que tumores mais metastáticos possuem metabolismo glicolítico hiperativo tem sido crucial e pouco explorado. Além disso, é importante que seja avaliada o papel funcional da F-ATPase, que ao contrário do que é classicamente conhecido também foi encontrada ativa em tumores e ainda detectamos presença de vesículas ricas em mitocôndrias na linhagem de melanoma mais metastático. Então nas linhagens e tumores de melanoma foram evidenciadas ultraestrutura e morfologia confirmando e elucidando as características funcionais pertinentes ao fenótipo de diferentes potenciais metastáticos das linhagens e tumores, tais como tamanho nuclear, número de nucléolos, áreas de hipóxia e necrose e se possui capacidade de invadir. A glicose ativou apenas o transporte de V-ATPase nos tumores mais metastáticos, enquanto a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ foi encontrada menos ativa e expressa no tumor mais metastático. E a F-ATPase se encontrou mais ativa nos tumores mais metastáticos, mostrando que os tumores estudados não são exclusivamente glicolíticos. Foi detectada, nas linhagens de próstata, pela primeira vez, atividade das enzimas V-ATPase e $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na fração nuclear e ainda foram localizadas por imunocitoquímica nos núcleos dessas células. Considerando todos dados obtidos, esse trabalho fornece importantes bases teóricas no que tange metabolismo energético de tumores envolvendo a relação com bombas de prótons e $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.

Palavras-chave: V-ATPase, F-ATPase, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, mitocôndrias, melanoma, câncer de próstata.

1-Introdução

O câncer consiste num dos mais instigantes e enigmáticos problemas que afetam a saúde humana, mobilizando crescentes esforços de pesquisa e vultosos recursos em todo o mundo. Os mais diversos tipos de câncer atingem indiscriminadamente países desenvolvidos e subdesenvolvidos, respondendo por aproximadamente 12% dos óbitos registrados anualmente no Brasil (Guerra *et al.*, 2005). Dentre as estratégias mais promissoras destaca-se a busca por novos alvos celulares para o desenvolvimento de quimioterapias mais efetivas contra o câncer. Neste contexto, alguns estudos têm apontado a V-ATPase como um importante alvo, mostrando que esta enzima transportadora usualmente localizada em endomembranas de todas as células eucarióticas, se expressa na membrana plasmática de vários tipos de células tumorais (Sennoune *et al.*, 2004). Esta expressão parece estar relacionada com uma maior acidificação da matriz extracelular no tecido tumoral, promovendo um fenótipo mais invasivo e metastático.

A V-ATPase é uma enzima oligomérica, da família das bombas de prótons que possuem alta afinidade por ATP, são responsáveis pela acidificação de compartimentos intracelulares como endossomos, lisossomos e vesículas sinápticas; e são compostas por um setor de membrana V_0 e um setor catalítico V_1 (Hille *et al.*, 1993; Forgac, 1998; Torigoe *et al.*, 2002; Nishi e Forgac, 2002; Nishi *et al.*, 2003; Nakamura, 2003; Wilkens *et al.*, 2004; Forgac, 2007). O setor V_0 executa o transporte de prótons enquanto o setor periférico V_1 é responsável pela função catalítica de hidrólise de ATP (Forgac, 1992; Wilkens e Forgac, 2001; Halaban *et al.*, 2002; Chaban *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). A V-ATPase é expressa em todos os eucariontes, de leveduras aos humanos (Kane, 2006). As V-ATPases utilizam energia produzida pela hidrólise de ATP para bombear prótons contra um gradiente de concentração iônico e transformam a energia liberada em potenciais eletroquímicos que energizam a membrana para dirigir alguns processos de transporte (Moriyama, 1996; Forgac, 1999; Izumi *et al.*, 2003; Beyenbach e Wiczorek, 2006; Hille e Walz, 2007). A estrutura das ATPases dos tipos V e F são notavelmente conservadas ao longo da evolução (Gogarten *et al.*, 1992; Harvey e Wiczorek, 1997; Wilkens e Forgac, 2001; Gruber *et al.*, 2001). Entretanto, enquanto as V-ATPases funcionam, fisiologicamente, hidrolisando ATP e bombeando H^+ , contra um gradiente de concentração, em vesículas e organelas ácidas e na membrana plasmática de células especializadas; as F-ATPases (também chamadas ATP-sintases) sintetizam ATP ao

dissipar gradientes de H^+ pré-estabelecidos em membranas mitocondriais de células eucarióticas ou na membrana plasmática de bactérias (Garrido, 2007; Hakulinen *et al.*, 2012).

Uma característica marcante da V-ATPase é que ela está envolvida em diversas funções celulares, como endocitose, transporte intracelular, reabsorção óssea, metástase tumoral e homeostase de pH citoplasmático (Gluck, 1992; Izumi *et al.*, 2003). As V-ATPases são funcionalmente expressas na membrana plasmática de células tumorais humanas e têm funções especializadas no crescimento, diferenciação, angiogênese e metástase, onde desempenha um papel na manutenção do ambiente ácido favorável à invasão (Sennoune *et al.*, 2004; Sennoune *et al.*, 2007; Fais *et al.*, 2007). Tem sido teorizado que a extrusão de prótons mediada por esta enzima pode causar acidificação extracelular levando à ativação de proteases que digerem a matriz extracelular durante o processo de invasão e metástase, o que tem suscitado interesse crescente no estudo do papel da atividade da V-ATPase nos processos de tumorigênese e metástase (Lu *et al.*, 2005).

A Na^+K^+ -ATPase é classificada como uma ATPase tipo P e ubiqüamente de membrana plasmática com função de transportar Na^+ e K^+ através da membrana e assim estabelecer o potencial de membrana. Essa enzima consiste de 2 polipeptídeos, uma subunidade α que possui 112 Kd e uma subunidade β que é uma glicoproteína que possui 35 Kd. As características catalíticas são associadas à subunidade α que possui sítio de ligação para ATP e cátions (Skou e Esman, 1992; Haas *et al.*, 2002).

O presente trabalho visa aprofundar estudos prévios sobre o papel da expressão funcional da V-ATPase, Na^+K^+ -ATPase e F-ATPase, respectivamente na membrana plasmática e mitocondrial de células tumorais, com a atividade enzimática, transporte e localização destas enzimas tanto em linhagens pouco e muito metastáticas de melanoma (B16F10 e B16F0), quanto em tumores sólidos e também em linhagens de câncer de próstata com diferentes potenciais metastáticos. Com isso objetivamos prover evidências contundentes para a hipótese da V-ATPase estar relacionada com a aquisição de um fenótipo mais invasivo e metastático juntamente com a possível ativação da F e supressão da Na^+K^+ -ATPase. Também perseguiremos a confirmação da localização na membrana celular de melanoma e verificação das relações existentes entre a dinâmica das vesículas ácidas endossomais, o processo de migração da V-ATPase para a superfície das células tumorais, e a habilidade

migratória de células metastáticas. Como foi observado em leveduras por Ribeiro *et al.*, 2012, buscamos avaliar a possível ativação das bombas após incubação com meios com glicose, visto que o metabolismo glicolítico em tumores é tão exacerbado. Em um subprojeto, foi avaliada respiração celular e localização de Hexoquinase 2 enzima encontrada ligada à membrana externa da mitocôndria e que tem se mostrado expressa em diversos tipos de câncer associadas também ao fenótipo mais metastático.

De forma geral, tentamos entender melhor os links existentes entre o metabolismo tumoral e as bombas de prótons, que provavelmente não atuam apenas como facilitadores do processo de invasão e mantenedores do ambiente extracelular tumoral ácido, essa ação é mais complexa e tem possível ação de sinalização.

Também buscamos caracterizar de forma mais detalhada e ainda não explorada a morfologia e ultraestrutura como forma de confirmar os fenótipos metastáticos das linhagens de melanoma murino utilizadas caracterizados previamente apenas com base na expressão de catepsinas, marcadores lisossomais.

Esse trabalho provê bases para futuros estudos voltados para testes clínicos e terapêuticos. Foi evidenciada maior ativação e transporte das bombas na linhagem mais metastática, também foi observada maior expressão e nos estudos morfológicos tanto a linhagem mais metastática como o tumor proveniente desta mesma linhagem apresentaram características pertinentes à um tumor mais anaplásico e agressivo ainda não observado anteriormente. E ainda a linhagem mais metastática apresentou maior taxa de transporte de H^+ , como foi visto anteriormente por nosso trabalho maior atividade enzimática por hidrólise tanto nas bombas tipo V e tipo F, e ainda uma menor ativação da $Na^+-K^+-ATPase$, confirmada também pela menor expressão vista por Dot Blot. Observamos também maior respiração e consumo de O_2 na linhagem metastática que condiz com seu perfil de maior ativação metabólica e ainda os dados corroboram com a grande quantidade de mitocôndrias encontradas e que foram vistas também formando grandes “clusters”, não ainda descrito e visualizado por outros grupos.

Nas linhagens mais metastáticas de tumor de próstata observamos maior ativação das bombas tipo V e F e menor ativação da $Na^+-K^+-ATPase$ na linhagem mais metastática. Também detectamos pela primeira vez atividade e observamos a localização das bombas V e Na^+-K^+ ATPase respectivamente na fração nuclear e núcleo das linhagens estudadas. Também foi verificado que as linhagens

metastáticas, com exceção de CL1 foram mais sensíveis à ausência de glicose no experimento que verificou o decréscimo de crescimento celular após ausência de glicose.

2- Revisão Literária

2.1- Regulação do pH Celular

As variações de pH celular são fenômenos importantes para muitos processos biológicos, sendo crucial para a manutenção da homeostase celular (Lu *et al.*, 2005). Entre as principais funções influenciadas pelo pH, descritas para células animais, estão o crescimento e a mobilidade para células normais e carcinogênicas afetando assim, os processos de metástase e resistência a drogas em células tumorais (Perona e Serrano, 1988; Thiebaut *et al.*, 1990; Schlappack *et al.*, 1991; Gottlieb *et al.*, 1995; Helmlinger *et al.*, 1997; Martínéz-Zaguilán *et al.*, 1998; Martínéz-Zaguilán *et al.*, 1999).

Mesmo antes das primeiras bombas iônicas serem descritas, já era bem estabelecido o conhecimento empírico de que os canais transportam íons numa velocidade bem maior que os carregadores. Posteriormente, ficou claro que tal diferença de permeabilidade era devido às mudanças conformacionais específicas associadas ao transporte via carregadores e bombas, sendo que estas últimas seriam sistemas de transporte ainda mais lentos por requererem mudanças conformacionais mais complexas, geralmente envolvendo um processo enzimático de hidrólise de ATP, usado como fonte de energia para o transporte ativo (Martin e Harvey, 1994).

Existem muitas evidências sobre a influência do controle do pH intracelular em respostas relacionadas à proliferação celular, (Gillies *et al.*, 1990; Gillies e Martínez-Zaguilán, 1991) ao crescimento e mobilidade de células específicas (Martínéz-Zaguilán *et al.*, 1998), à tumorigênese, metástase e apoptose (Gottlieb *et al.*, 1995) e à resistência à drogas (Altan *et al.*, 1998). O pH extracelular é usualmente baixo em tumores sólidos, contrastando com o pH intracelular que permanece próximo à neutralidade (Lu *et al.*, 2005). As organelas intracelulares têm características de pH adaptadas para suas funções bioquímicas que são mantidas por balanço entre o funcionamento de bombas de íons, canais e outros sistemas mantenedores do equilíbrio interno iônico (Grabe e Oster, 2001). Foram identificados quatro principais sistemas de regulação de pH citosólico nas células tumorais: trocadores de Na^+/H^+ ,

transportadores de bicarbonato, *symporters* próton-lactato e as bombas de prótons (Gillies *et al.*, 1990; Gillies e Martinez-Zaguilán, 1991; Sennoune *et al.*, 2004).

2.2- Estrutura e Funcionamento da V-ATPase

A V-ATPase é uma enzima oligomérica, com cerca de 13 subunidades, que possui dois domínios sendo um catalítico (V_1) e um de membrana (V_0). O domínio (V_1) é um complexo periférico com 570 kDa e 8 subunidades (A-H), sendo considerado o setor catalítico. O domínio (V_0) é um complexo integral com 260 kDa e 5 subunidades (a-d), sendo responsável pela translocação dos prótons, ilustrada na figura 1 (Forgac, 2007). No setor catalítico está localizado o sítio de alta afinidade para ligação do ATP, onde ocorre a hidrólise deste substrato energético acoplada a mudanças conformacionais do setor V_0 responsáveis pelo transporte ativo de íons H^+ , estabelecendo um gradiente eletroquímico na membrana em que a V-ATPase está inserida (Vitavska *et al.*, 2005; Drory e Nelson, 2006). Foi recentemente descrito que, tal qual ocorre com as F-ATPases, as V-ATPases também funcionam como motores rotatórios que bombeiam prótons através da membrana (Paroutis *et al.*, 2004). Em termos de evolução molecular, a V-ATPase descende de uma família de bombas de prótons de arqueobactérias e ATP-sintases que também deram origem as F-ATPases de mitocôndrias e cloroplastos (Forgac, 1999; Kane, 2006; Qi e Forgac, 2007).

Dentre os principais mecanismos de regulação da V-ATPase já descritos, se destacam a ligação reversível da ponte dissulfeto entre resíduos conservados de cisteína presentes no sítio catalítico da enzima; a dissociação reversível dos domínios V_1 e V_0 e o mecanismo que envolve mudanças no acoplamento entre o transporte de próton e a hidrólise de ATP (Breton e Brown, 2007; Cipriano *et al.*, 2008).

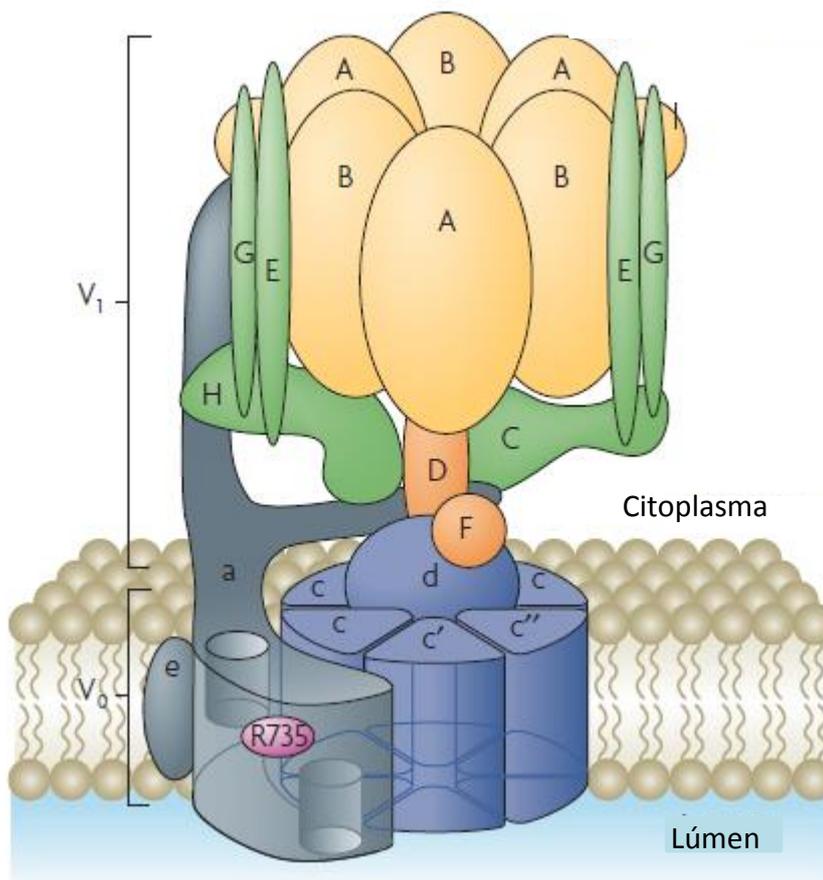


Figura 1- Esquema da V-ATPase mostrando as múltiplas subunidades e os domínios V_0 e V_1 (Adaptada de Forgac 2007).

2.3- Ocorrência de V-ATPase na Membrana Plasmática e Inibidores

Em humanos, a presença de V-ATPases na membrana plasmática tem sido bem documentada em células especializadas como osteoclastos, células intercalares renais e de epidídimo, e tumorais (células angiogênicas e metastáticas), onde estas enzimas são responsáveis, respectivamente, pela reabsorção óssea, acidificação urinária, maturação espermática e invasão tumoral (Cipriano *et al.*, 2008). Também existem evidências da presença de V-ATPases nas plasmalemas de macrófagos, neutrófilos, hepatócitos e células parietais gástricas. Todavia, a caracterização da expressão e da atividade dessas bombas de prótons só tem sido claramente estabelecida para as formas presentes nas membranas das diversas organelas intracelulares, incluindo: endossomos, lisossomos, vesículas de Golgi e vesículas sinápticas (Grinstein *et al.*, 1992; Martínéz-Zaguilán *et al.* 1993; Brisseau *et al.*, 1996; Mattsson e Keeling, 1996; Martínéz-Zaguilán *et al.*, 1998; Vitavska *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2006; Cipriano *et al.*, 2008). As V-ATPases são encontradas nos compartimentos intracelulares de praticamente todos os tipos celulares de eucariotos

(Nelson *et al.*, 2000; Paroutis *et al.*, 2004; Wilkens *et al.*, 2004). A atividade das V-ATPases intracelulares está envolvida em processos vitais como o tráfego de membrana, degradação de proteína, energização de sistemas secundários de transporte de íons e outros metabólicos, na entrada de vírus e toxinas e manutenção de pH de células saudáveis e tumorais (Wang *et al.*, 2007; De Milito *et al.*, 2007).

A V-ATPase exerce um importante papel no controle do pH intra e extracelular em vários tipos de células. Essas bombas de prótons são superexpressas em muitos tipos de câncer e estão relacionadas com a invasão e metástase tumoral (Sennoune *et al.*, 2004). Nos tecidos tumorais, a extrusão de prótons através da V-ATPase provoca acidificação extracelular o que contribui para a manutenção de um gradiente de pH entre o citosol neutro e o meio extracelular ácido (De Milito *et al.*, 2007). O baixo pH do meio extracelular tumoral pode induzir ao aumento na secreção e ativação de proteases o que pode promover a degradação e remodelação da matriz extracelular através da ativação das proteases, o que irá contribuir para os processos de invasão e metástase (Supino *et al.*, 2008). O efeito promovido pela V-ATPase na invasão e metástase tumoral está relacionado principalmente à habilidade da manutenção de um ambiente extracelular com pH ácido e citosol mais alcalino. As proteases necessitam de um pH baixo para ter uma ativação otimizada (Fais *et al.*, 2007).

A mais convincente evidência do papel central da V-ATPase na acidificação de organelas é fornecida pelo uso de um antibiótico do grupo dos macrolídeos, a Bafilomicina A₁, o primeiro inibidor específico desta bomba a ser descrito, atuando em concentrações nanomolares (Mattsson e Keeling, 1996), dissipando rapidamente o gradiente de pH através dos compartimentos das vias secretórias e endocíticas (Paroutis *et al.*, 2004). Além da Bafilomicina A₁ (Figura 2 A), a Concanamicina A (Figura 2 B) também tem sido amplamente reconhecida como um inibidor altamente específico para a V-ATPase, sendo ainda mais potente que a Bafilomicina A₁ (Mattsson e Keeling, 1996).

De acordo com Huss e Wiczorek (2009), o entendimento do funcionamento dos inibidores da V-ATPase pode servir como base para desenvolvimento de algumas drogas e com isso trazer benefícios aos pacientes que sofrem de doenças como osteoporose e câncer.

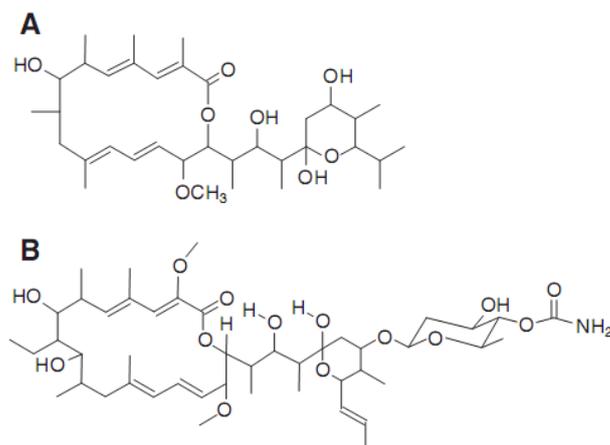


Figura 2- Estrutura química dos Inibidores da V-ATPase Bafilomicina A1 (A) e Concanamicina A (B) (Huss e Wieczorek, 2009).

Estruturalmente a bafilomicina A₁ e a concanamicina A₁ são membros do grupo de antibióticos macrolídeos, isolados de espécies de *Streptomyces*, termo relacionado com a estrutura – um anel de lactona, de vários membros, ao qual se ligam um ou mais desoxi-glicóis (Togashi *et al.*, 1997). Já a destruxina pertence ao grupo dos depsipeptídeos (Togashi *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2006).

Uma característica funcional marcante da V-ATPase é a sensibilidade à bafilomicina A₁ que inibe a reabsorção óssea pelos osteoclastos e esse mecanismo de ação do sítio de ligação da bafilomicina é pouco compreendido (Mattsson e Keeling, 1996). Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas do sistema fagocítico mononuclear, com função de reabsorção óssea durante o crescimento e remodelagem do esqueleto. A reabsorção óssea pelos osteoclastos é dependente da acidificação da superfície do osso que é feita pela H⁺-ATPase do tipo V presente na membrana plasmática destas células (Chatterjee *et al.*, 1992; Mattsson e Keeling, 1996).

Tratamentos com inibidores de bombas de prótons específicos para V-ATPases induzem à sensibilização das células tumorais ao tratamento quimioterápico devido as modificações causadas no pH celular, sendo verificado que o pH ácido citoplasmático cria uma condição mais adequada para ativação desses inibidores. A inibição da atividade de bombas de prótons privaria as células tumorais de um importante mecanismo, que é a regulação do pH, o que causa a morte dessas células, ilustrada na figura 3 (Luciani *et al.*, 2004; De Milito *et al.*, 2007). Como foi observado por Luciani *et al.*, 2004, o tratamento com inibidores de bombas de prótons como Omeprazole e Esomeprazole diminui a capacidade das células tumorais de acidificar

seu meio externo, sendo observada uma maior abundância de vesículas internas nas células tratadas do que nas não tratadas. Chun *et al.*(1995) e Figura *et al.* (1997), descrevem o Lansoprazol como inibidor de bombas de prótons das células parietais gástricas que fisiologicamente expressam a V-ATPase na membrana plasmática semelhantemente como ocorre com as células tumorais, só que estas últimas o fazem devido à patologia.

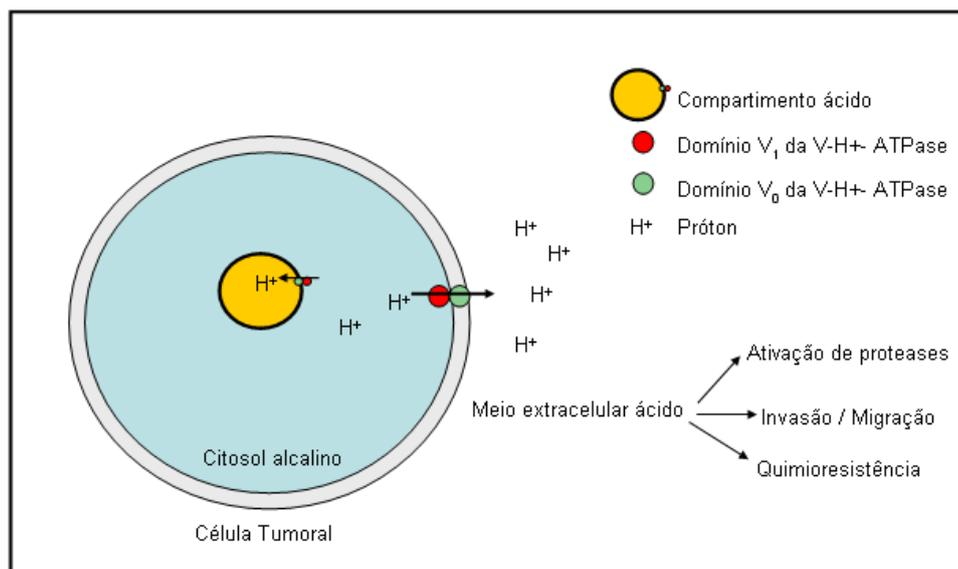


Figura 3 - Esquema mostrando célula tumoral com V-ATPase expressa na membrana plasmática e consequências do fluxo de prótons para o meio extracelular (Santos *et al.*, 2010 – dados não publicados). A figura mostra o esquema de uma célula tumoral com compartimento ácido e V-ATPase na membrana plasmática da célula, sendo que o domínio catalítico está em vermelho e o domínio de membrana em verde, onde os prótons estão saindo e causando acidificação do meio extracelular.

De acordo com Hinton *et al.* (2009), o tratamento com o inibidor específico da V-ATPase, a bafilomicina, provocou uma redução da taxa de invasão na linhagem muito metastática de câncer de mama, enquanto não induziu mudanças significativas sobre uma linhagem pouco metastática do mesmo tipo de câncer de mama.

2.4- F-ATPase

A F-ATPase é estruturalmente semelhante à V-ATPase, possuindo domínios catalítico (F₁), situado na matriz mitocondrial e de membrana (F₀), situado na membrana mitocondrial interna (Boyer, 1998; Jonckheere *et al.*, 2012), ilustrada a estrutura da F-ATPase na figura 4 e a comparação estrutural com V-ATPase na figura 5. Entretanto, enquanto as V-ATPases funcionam fisiologicamente hidrolisando ATP e bombeando H⁺, contra um gradiente de concentração, em vesículas e organelas

ácidas e na membrana plasmática de células especializadas; as F-ATPases (também chamadas ATP-sintases) sintetizam ATP, fosforilando ADP, ao dissipar gradientes de H^+ estabelecidos em membranas mitocondriais de células eucarióticas ou na membrana plasmática de bactérias (Garrido, 2007; Hakulinen *et al.*, 2012; Jonckheere *et al.*, 2012).

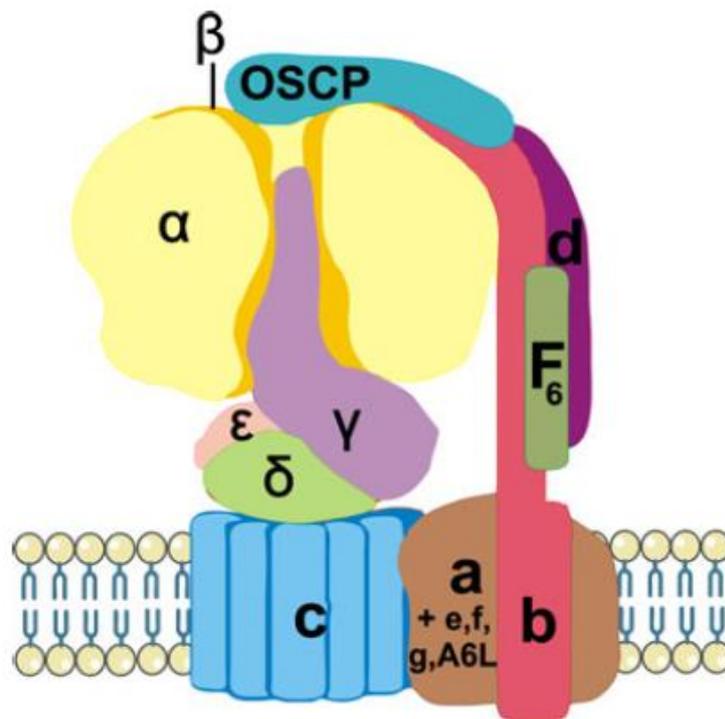


Figura 4- Estrutura da F-ATPase mostrando os domínios e subunidades dos domínios (Jonckheere *et al.*, 2012).

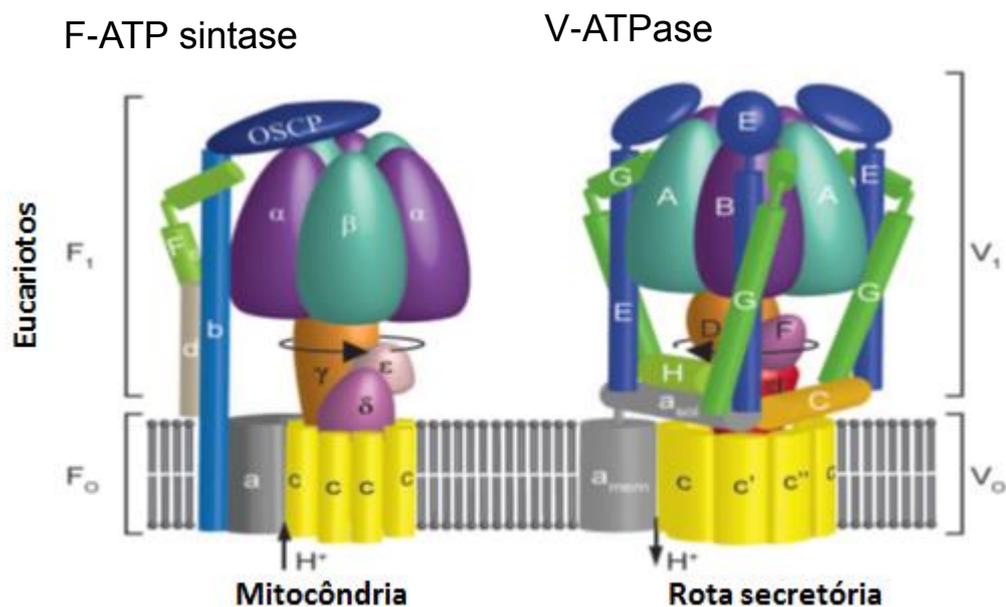


Figura 5 – Comparação estrutural entre V-ATPase e F-ATPase em eucariotos (Adaptada de Stewart *et al.*, 2013).

O domínio F_0 é um complexo protéico integral de membrana que fica inserido na membrana interna mitocondrial e é constituído de uma subunidade a e duas subunidades b que se estendem para cima interagindo com a unidade F_1 , e nove ou mais subunidades c que formam um anel cilíndrico na membrana interna mitocondrial. A unidade F_1 contém sítios de ligação de ATP e ADP, e está envolvida nas reações catalíticas da síntese de ATP. O domínio F_1 é composto pelas subunidades α , β , γ , δ e ϵ (Jonckheere *et al.*, 2012). A figura 6 ilustra a estrutura do domínio F_1 de células animais estudada por Watta *et al.*, 2010.

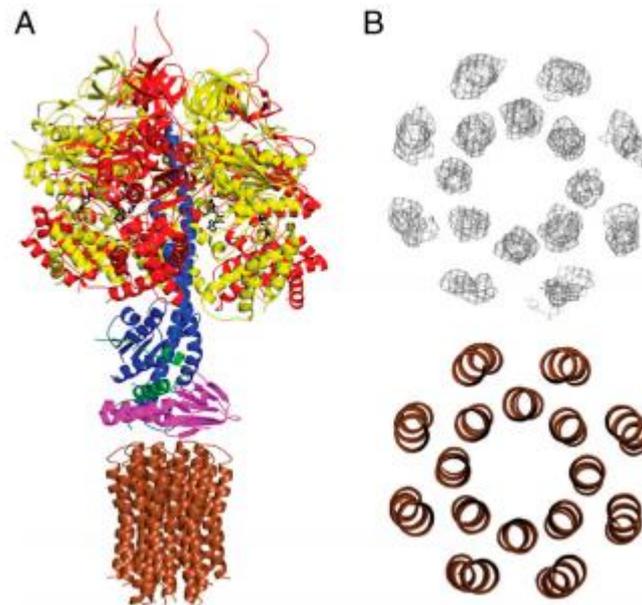


Figura 6- Estrutura do complexo bovino F1-anel c. A parte A mostra subunidades do domínio catalítico F_1 (acima) e do anel c (abaixo). E a parte B mostra uma seção horizontal do anel c (Watta *et al.*, 2010).

2.5- $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ da classe das P-ATPases, é uma enzima presente na membrana plasmática, que é a principal responsável pela energização das membranas plasmáticas das células animais (Tokhtaeva *et al.*, 2012). A manutenção do potencial de membrana é feito com a extrusão de moléculas de Na^+ e entrada de K^+ na célula, como está ilustrado na figura 7. Sendo assim, portanto, uma importante marcadora de membrana plasmática e um parâmetro medidor da qualidade da fração de membrana obtida com a técnica de fracionamento celular e purificação de membrana. É uma enzima antiporte, bombeia sódio (Na^+) para fora da célula enquanto bombeia potássio (K^+) para o interior. Estruturalmente é constituída de subunidades α que pode ter até quatro isoformas e β que pode ter até três isoformas (Tokhtaeva *et al.*, 2012).

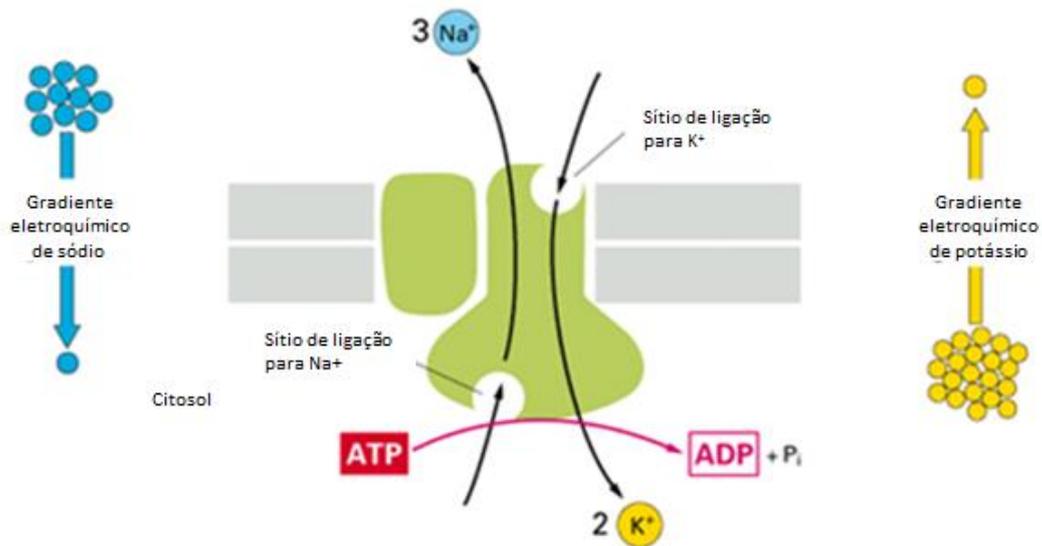


Figura 7- Na⁺-K⁺ ATPase - esquema mostrando funcionamento da Na-K-ATPase em células animais (Adaptado de Alberts *et al.*, 2006).

2.6- Hexoquinase-2

Considerando, os conhecimentos atuais sobre a ocorrência da glicólise aeróbica e de uma possível “falha no metabolismo mitocondrial”, tem sido demonstrado que a produção de ácido láctico a partir da glicose captada é aumentada ainda mais em, por exemplo, células de hepatoma que expressam a isoforma 2 da enzima hexoquinase (HK-2). Esta isoforma sintetiza glicose-6P no citosol e está acoplada à membrana externa da mitocôndria e este acoplamento específico é acompanhado pela colocação da F₁/F_o-ATPase, do carreador de Pi e do complexo carreador de nucleotídeos de adenina pelo lado interno da mitocôndria, formando o chamado mega complexo ATP sintassoma (ilustrado na figura 8). De modo geral, o ATP sintassoma utiliza a energia livre (ATP) gerada na fosforilação oxidativa para impulsionar a produção de glicose-6P no citoplasma, a qual é catalisada pela hexoquinase-2. A glicose-6P recém sintetizada pode servir de substrato tanto para a via glicolítica quanto para os processos de biossíntese na célula tumoral, aumentando seu potencial para se proliferar e invadir outros tecidos. Isto poderia, a princípio, ser contrário à teoria do Efeito Warburg (Pedersen, 2008). Porém a expressão da HK-2 e sua posterior inserção na membrana externa das mitocôndrias dessas linhagens tumorais podem explicar a atividade mitocondrial observada (Pedersen, 2008).

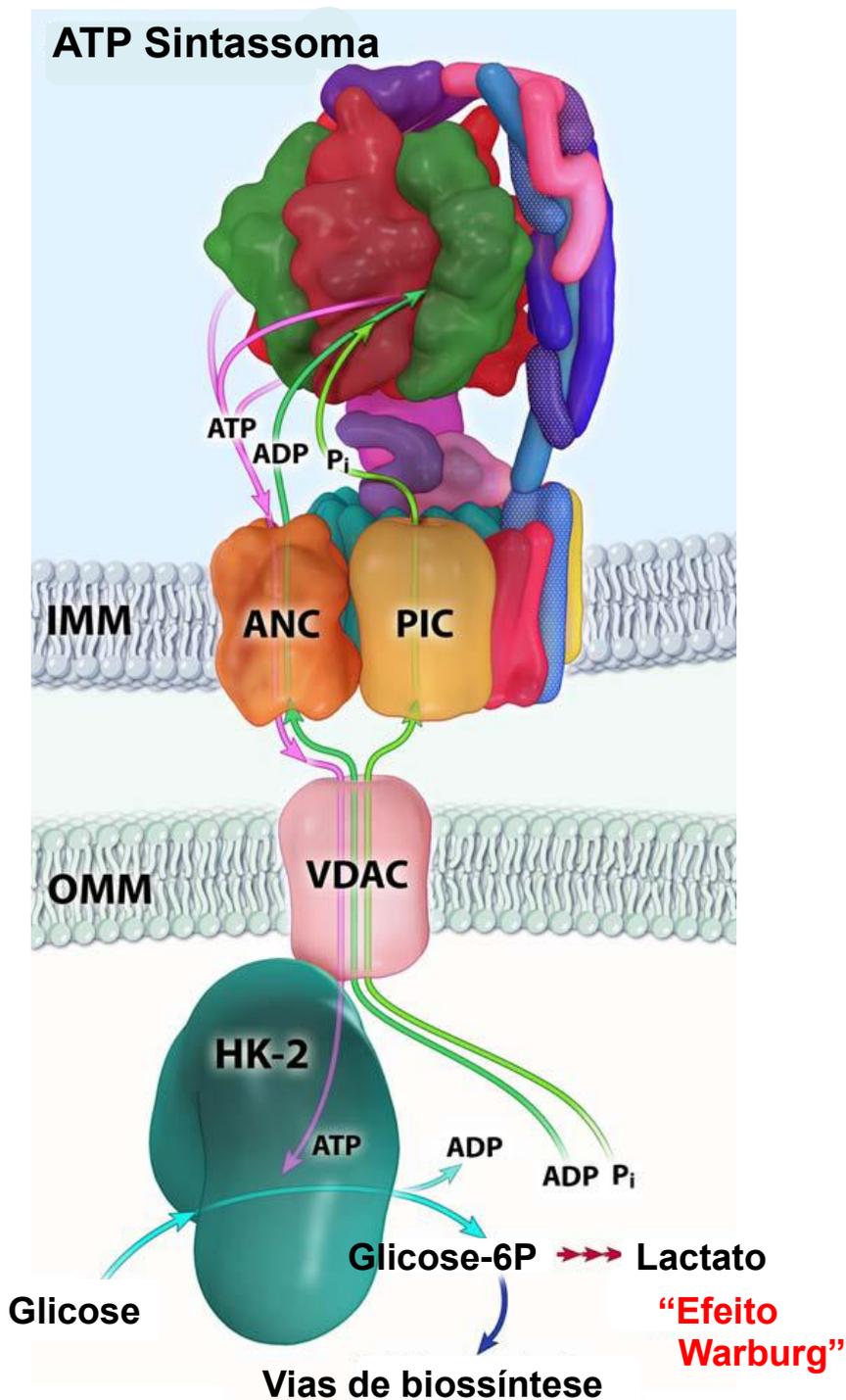


Figura 8- Esquema representando a formação do ATP Sintassoma com a HK-2 (hexoquinase-2), o VDAC (canal de ânions dependente de voltagem), o ANC (canal de nucleotídeos de adenina) e o PIC (canal de P_i) no interior da mitocôndria e o acoplamento da hexoquinase-II na face citosólica da membrana externa (Adaptado de Pedersen, 2008).

De modo geral, os tecidos dos mamíferos possuem quatro isoformas diferentes da hexoquinase (isoformas 1-4). As quatro isoformas apresentam distribuição específica, sendo a hexoquinase tipo 1 expressa principalmente em cérebro e eritrócitos, a tipo 2 e 3 em músculo esquelético, adipócitos e mitocôndrias e a tipo 4,

também chamada glicoquinase expressa em fígado e pâncreas (Nakashima *et al.*, 1988; Thelen e Wilson, 1991; Rempel *et al.*, 1994; Mathupala, *et al.*, 1995; Rho *et al.*, 2007).

Todas as quatro isoformas catalisam o primeiro passo essencialmente irreversível da via glicolítica onde a glicose é fosforilada a glicose-6-P com gasto de uma molécula de ATP (Wilson, 1995). As hexoquinases dos tipos 1-3 possuem um $K_m = \sim 0,02$ mM, enquanto que a isoforma 4, também chamada “glicoquinase”, possui $K_m = \sim 5$ mM (Wilson, 2003). Baseado em análise de sequência primária, foi postulado que as hexoquinases (isoformas 1-3) surgiram a partir de uma duplicação de um gene ancestral similar ao gene que codifica para a glicoquinase (isoforma 4). Sendo assim, a glicoquinase possui uma massa molecular de aproximadamente 50 kDa, enquanto que as hexoquinases possuem massa molecular de 100 kDa (Tsai e Wilson, 1997).

Bustamante *et al.* (1981) mostraram que quando são inseridas mitocôndrias tumorais, as quais possuem a hexoquinase-2 (HK-2) acoplada à membrana externa, em hepatócitos sem mitocôndrias, ocorre a superativação da via glicolítica nestas células não tumorais. Sabe-se que com exceção de algumas condições fisiológicas raras onde a isoforma 2 da hexoquinase pode ser encontrada, em essência, o gene que codifica para a HK-2 se encontra silenciado em tecidos saudáveis (Gillies *et al.*, 2008).

A HK-2, superexpressa em tumores malignos onde desempenha papel essencial no fenótipo de alta atividade glicolítica (Bustamante *et al.*, 1981; Rempel *et al.*, 1996; Katabi *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 2003), é estrategicamente ancorada na proteína Canal de Ânions Dependente de Voltagem (CADV). Com isso, a HK-2 ganha tanto acesso preferencial ao ATP mitocondrial gerado, através do Translocador de Nucleotídeo de Adenina (TNA) (ilustrado na Figura 8), quanto proteção contra a inibição feita pelo seu produto (glicose-6-P) (Nakashima *et al.*, 1986).

Em concordância com estudos prévios, é marcante a presença da hexoquinase ligada à mitocôndria em hepatomas com alta atividade glicolítica. Esse alto nível de hexoquinase ligada à mitocôndrias dos tumores altamente glicolíticos é uma descoberta com profundo significado metabólico para esses tumores (Arora e Pedersen, 1988). Alguns tipos de câncer como carcinomas uterinos de cérvix ou corpo contém hexoquinase tipo 2 tanto hexoquinase tipo 1, diferente das células uterinas normais do epitélio cervical e do endométrio que contém apenas a

hexoquinase tipo 1. E a atividade dessas enzimas nos carcinomas uterinos são maiores do que nos tecidos controle (Kikuchi *et al.*, 1972).

Assim, engenhosamente, tumores têm produzido a enzima HK-2 em larga escala, e neutralizado sua capacidade de ser controlada, forçando a reação entre ATP e a glicose importada para produzir glicose 6 fosfato (G-6-P) numa alta taxa (Pedersen *et al.*, 2002). Isso por sua vez, força a glicólise e a vias metabólicas biossintéticas tumorais a funcionar numa capacidade elevada, fornecendo um ótimo suporte pra a proliferação tumoral descontrolada dentro do tecido do hospedeiro (ilustrado na Figura 9) (Pedersen *et al.*, 2002). Além disso, os metabólitos ácidos secretados pelo tumor ajudam na ocorrência deste processo tanto pela supressão dos ataques feitos pelo sistema imune, quanto preparando os tecidos adjacentes normais para sofrerem a invasão feita pelas células do tumor (Mathupala *et al.*, 2010).

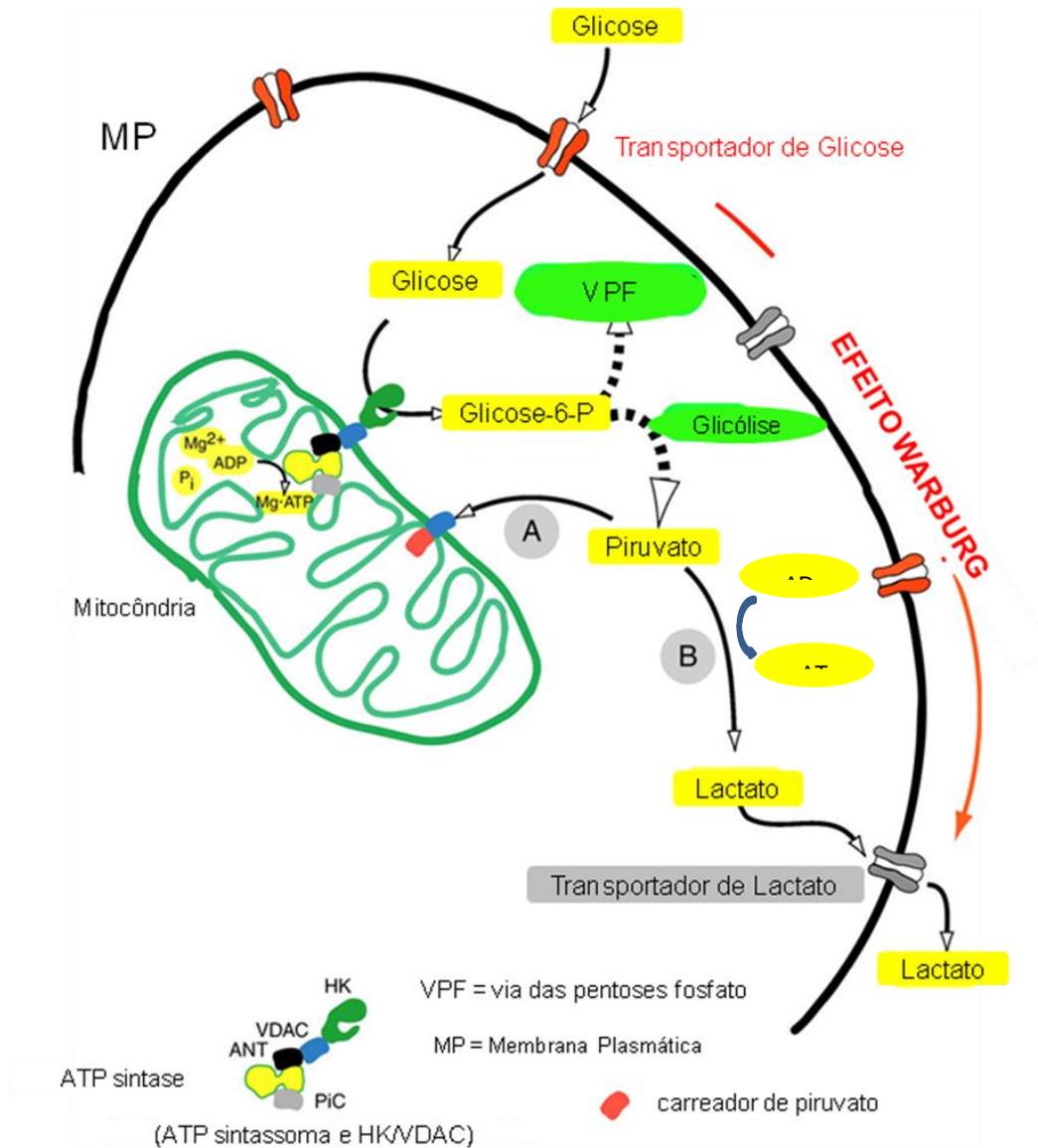


Figura 9- Esquema representando o metabolismo energético de uma célula tumoral, com ênfase no Efeito Warburg, mostrando também o desvio metabólico promovido pela hexoquinase-2 no metabolismo mitocondrial. (Adaptado de Mathupala *et al.*, 2009).

2.7- Aspectos do Metabolismo no Câncer

O fenótipo do efeito Warburg é caracterizado por alta atividade glicolítica como resultado de várias expressões de genes da via glicolítica corroborando para essa condição começando com mudanças mediadas por oncogenes, seguida pelo fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) mediando expressão gênica resultando em supressão de biogênese mitocondrial, esse processo ocorre durante processo de carcinogênese (Smolková *et al.*, 2011). HIF-1 induz expressão de diversos genes da via glicolítica, e então esse aumento da glicólise é necessário para produzir energia quando o suprimento de O₂ não é suficiente para suprir a demanda para ocorrer fosforilação oxidativa na mitocôndria (Papandreou *et al.*, 2006; Godinot *et al.*, 2007). Limitação de O₂ e condição de hipóxia têm papel central no controle de angiogênese, metabolismo glicolítico, sobrevivência e metastáse tumoral (Larson, 2004; Pouyssegur *et al.*, 2006; Hsu e Sabatini, 2008). Esta condição pode aumentar os níveis do transportador de glicose tipo 1 (GLUT-1) e entrada de glicose (Macheda *et al.*, 2005; Pedersen, 2001).

Diversos outros estudos em metabolismo energético de tumores mostraram também o aumento na atividade glicolítica (Robey *et al.*, 2005; Funes *et al.*, 2007) e altas taxas de entrada de glicose nas células tumorais (Dang e Semenza, 1999), mesmo na presença de alta concentração de O₂ (Mazurek *et al.*, 1997; Marín-Hernández, 2006). Desde então tem sido aplicado indiscriminadamente para todos os tipos de tumores que o suprimento de ATP é somente ou principalmente proveniente da via glicolítica usando glicose e em outros casos usando glutamina como substratos (Mares-Perlman e Shrago, 1988; Baggeto, 1992; Guppy *et al.*, 2002). Moreno-Sánchez *et al.*, 2007, mostraram que tumores como de cérvix uterino (Hela), faringe, glândula mamária, astroblastoma, glioma, hepatoma de Ehrlich, Morris e tumor de ascite (AS 30-D) analisados exibiram aumento da atividade glicolítica, mas nem todos apresentaram diminuição da atividade metabólica mitocondrial.

Então, a alta atividade glicolítica em tumores é majoritária em tumores mais metastáticos e desempenha um significativo papel na promoção do crescimento e desenvolvimento tumoral (Gillies *et al.*, 2008). Tem sido proposto que este aumento no fluxo glicolítico é uma estratégia metabólica adotada pelos tumores para garantir a sobrevivência e crescimento em ambientes com condição de hipóxia (Gatenby e Gillies, 2004). O aumento da glicólise que ocorre em tumores, em comparação com células não tumorigênicas, é devido ao aumento da transcrição de diversos genes,

enzimas glicolíticas e transportadores de glicose (Meienhofer *et al.*, 1987; Osthus *et al.*, 2000; Atsumi *et al.*, 2002). O tumor pode trocar seu metabolismo para glicólise como estratégia para prevenir morte celular e nesse caso a respiração aeróbica por fosforilação oxidativa impede essa proteção (Bonnet *et al.*, 2007).

O metabolismo glicolítico é essencial para gerar muitos precursores catabólicos e anabólicos. A função primária da glicose é prover energia para a célula na forma de ATP, como uma alternativa para a respiração mitocondrial. O maior regulador do consumo de glicose é a disponibilidade de O₂, como foi descrito previamente por Pasteur (Racker e Wu, 1958). A capacidade reversível de aumentar a entrada de glicose e seu metabolismo quando as células são expostas à condição de hipóxia é conhecida como efeito Pasteur (Oliveira *et al.*, 2012).

Por outro lado, foi mostrada a inibição da respiração induzida pela adição de glicose às células (Díaz-Ruíz *et al.*, 2008). Esta inibição é chamada de Efeito Pasteur reverso ou Efeito Crabtree, que pode ser descrita como a inibição observada após a adição de qualquer hexose capaz de inibir a respiração em qualquer tipo de tecido (Ibsen, 1961; Díaz-Ruíz *et al.*, 2008). Células de tumor de hepatoma e ascite (AS-30D) são altamente oxidativas e possuem rápido crescimento, apresentaram inibição da via oxidativa induzida por adição glicose e frutose, Efeito Crabtree de 54% e 34%, respectivamente (Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2001).

O transporte de glicose através da membrana plasmática em mamíferos é o primeiro passo limitante da taxa de metabolismo de glicose e é mediado por proteínas transportadoras de glicose chamadas GLUT. As proteínas GLUT transportam glicose e hexoses relacionadas de acordo com o modelo de conformação alternada, que prediz que o transportador expõe um único sítio de ligação para o substrato, no exterior ou interior da célula. A ligação da glicose no sítio provoca mudança conformacional associada com o transporte e com isso a glicose é liberada para o outro lado da membrana (Macheda *et al.*, 2005).

O aumento do transporte de glicose em células malignas tem sido associado com a superexpressão de GLUT-1 e GLUT-3. Estudos indicam que o transporte de glicose em câncer de mama não é totalmente explicado apenas pela expressão de GLUTs 1 e 3, sugerindo o envolvimento de outro transportador de glicose (Macheda *et al.*, 2005). Recentemente, foi descoberta uma nova proteína transportadora de glicose,

GLUT-12, que foi achada em câncer de mama e próstata, localizado intracelular e na superfície celular. Diversos fatores têm sido implicados na regulação da expressão do transportador de glicose em câncer de mama. Usar como alvo o GLUT-12, pode prover novos métodos de detecção e tratamento para câncer de mama e próstata. Em diversos estudos, altos níveis de GLUT-1 têm sido associados à baixa sobrevivência. A condição de hipóxia pode aumentar níveis de GLUT-1 e consumo de glicose (Macheda *et al.*, 2005). Estradiol e fator de crescimento epidermal (EGF), podem desempenhar importante papel no crescimento e aumento de consumo de glicose em câncer de mama. A expressão de GLUT-1 é regulada por diversos hormônios incluindo estrogênio que por sua vez induzem mudanças na glicólise (Rivenzon-Segal *et al.*, 2003).

A hipóxia é um fator geral que regula o metabolismo de glicose (Rajendran *et al.*, 2004). Diversos estudos mostram que o consumo de glicose é alto em tecidos em condições de hipóxia (Racker e Wu, 1958; Busk *et al.*, 2008). Células tumorais desenvolvem resistência à toxicidade por acidez, durante processo de carcinogênese, permitindo que elas sobrevivam e proliferem em microambientes com baixo pH, que permite invasão de tecidos normais adjacentes (Gatenby *et al.*, 2006). A condição de hipóxia induz um fenótipo agressivo, aumentando o potencial metastático, promovendo progressão tumoral e então limitando a efetividade de radioterapia e alguns agentes quimioterápicos (Robey *et al.*, 2005; Teicher, 1994, Sartorelli, 1988; Brown, 1999; Bristow e Hill, 2008). Os tumores mais agressivos são aqueles mais hipóxicos e também mais angiogênicos (Guppy, 2002). Foi demonstrado que hipóxia e acidose desenvolvem um microambiente pré-maligno em tumores epiteliais tais como carcinoma *in situ* (Gillies *et al.*, 2008; Gatenby *et al.*, 2007).

Mitocôndrias são organelas dinâmicas que desempenham importante papel no metabolismo e possuem duas distintas membranas, uma externa que é moderadamente seletiva e uma interna que é altamente seletiva e rica em proteínas (Oliveira *et al.*, 2012). A função metabólica primária da mitocôndria é a fosforilação oxidativa, um processo que gera energia acoplando a oxidação respiratória de substratos para sintetizar ATP (Modica-Napolitano e Singh, 2004). O principal substrato para a cadeia respiratória NADH é fornecido por glicose, ácidos graxos e aminoácidos. A síntese de ATP é usada para numerosas rotas celulares e também para funcionamento das bombas de prótons (Brown, 1992).

As mitocôndrias também participam no controle do processo de apoptose. Antes, as células exibem características comuns de apoptose nuclear como condensação da cromatina e fragmentação do DNA mediado por endonuclease, são submetidos a uma redução do potencial transmembranar mitocondrial possível devido à abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PT). A indução de permeabilidade mitocondrial por diversos agentes farmacológicos aumenta a indução de apoptose da mitocôndria (Beyenbach e Wieczorek, 2006). No entanto, a mitocôndria provê uma importante contribuição para regulação de diversos aspectos de biologia celular, produção de energia, metabolismo molecular, status redox, sinalização de cálcio e morte celular programada (Preston *et al.*, 2001).

Mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS), requeridas para sobrevivência celular. A elevada produção de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) associadas com câncer podem causar danos à proteínas assim como DNA, RNA e de membrana (Oliveira *et al.*, 2012). O aumento do nível de ROS pode resultar de uma deficiência no sistema antioxidante que tem sido associado à diversas doenças e processos degenerativos como câncer, envelhecimento, diabetes e doenças cardiovasculares (Park *et al.*, 2011; Balliet *et al.*, 2011).

A figura 10 sumariza aspectos abordados em relação ao metabolismo celular e mostra a comparação entre célula saudável e célula tumoral. O esquema foi desenvolvido por nosso grupo para ilustrar o que tem sido mostrado na literatura sobre esse tema e ainda o que mostramos em nossos trabalhos.

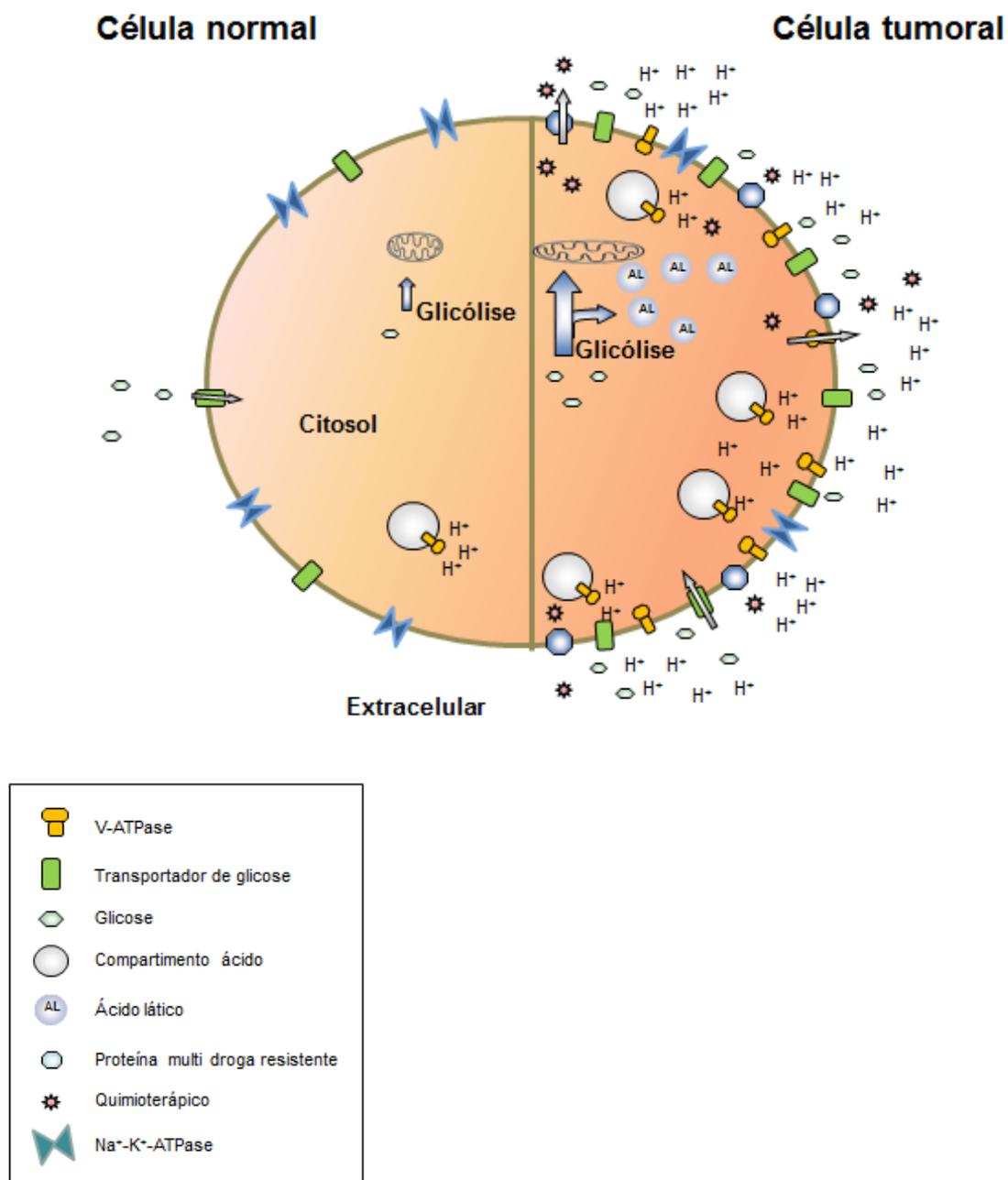


Figure 10- Aspectos metabólicos da célula- mostrando comparação entre célula normal e célula tumoral, mostrando expressão de bombas de prótons, transportadores de glicose, proteínas multi droga resistente, fluxo glicolítico e produção de ácido láctico (Santos e cols, 2012 – dado não publicado).

2.8- Câncer

O câncer é um dos mais importantes problemas de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos por ano o que representa 12% das causas de morte no mundo. No Brasil, os tumores mais frequentes nos homens são de próstata, pulmão, estômago, esôfago, cólon e reto; e nas mulheres são de mama, colo uterino, cólon e reto, pulmão e estômago (Guerra *et al.*, 2005). O Brasil se destaca tanto como uma

área de interesse potencial para monitoramento e controle das tendências de incidência de câncer quanto para estudo de variações geográficas nos padrões desta doença (Guerra *et al.*, 2005). O câncer se mostra também como o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos onde a cada quatro mortes, uma é por câncer (Jemal *et al.*, 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 serão válidas também para o ano de 2013 e apontam a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma que reforça a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2012). Sem os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos.

Clinicamente, o câncer se manifesta através da formação de uma massa tumoral pela proliferação celular descontrolada, causando dor e sangramento pela compressão/ invasão de nervos e vasos e através de distúrbios funcionais causados pela pressão nos tecidos e também pela substituição/invasão destes. Porém, esses sintomas não são específicos de câncer e o diagnóstico é feito através de exames histológicos em amostras do tumor que incluem origem, tipo, crescimento e potencial de invasão do câncer (Mareel e Leroy, 2003). Um grande obstáculo para um tratamento efetivo do câncer é o fenômeno de resistência a multidroga que se desenvolve durante o tratamento quimioterápico em muitas células tumorais (Altan *et al.*, 1998). As drogas que geralmente estão envolvidas nessa resistência são produtos naturais ou derivados sintéticos destes. Alterações no equilíbrio do pH celular também têm sido implicadas no processo de resistência a drogas, mas não é clara sua relação com a expressão de glicoproteínas P nas membranas, que atuam como bombas de efluxo de moléculas integrantes do princípio ativo dos quimioterápicos (Martínez-Zaguilán *et al.*, 1999).

2.9- Progressão Tumoral

A malignidade do câncer está diretamente relacionada à capacidade de invadir tecidos vizinhos e se proliferar nesses sítios destruindo a organização funcional do tecido invadido. O termo invasão indica a penetração e ocupação de tecidos vizinhos ou de órgãos distantes alcançados via circulação ou sistema linfático. Este processo de proliferação e disseminação de tumores secundários é denominado metástase. A invasão e metástase não são exclusivas de câncer, esses processos também

ocorrem em tecidos embrionários em desenvolvimento, em adultos saudáveis e em algumas doenças não cancerosas (Mareel e Leroy, 2003).

A metástase tumoral é uma das principais causas da mortalidade por câncer o que torna a inibição desse processo uma possível estratégia para controle da progressão tumoral. E a cascata de eventos desencadeados na metástase envolve várias etapas como a fuga de células do local do tumor primário para circulação ou sistema linfático e o extravasamento das células da circulação ou sistema linfático em locais secundários (Cuvier *et al.*, 1997; Gupta e Massagué, 2006).

Em geral, células tumorais têm o metabolismo glicolítico hiperativo uma vez que produzem muitos metabólitos ácidos, como o ácido láctico (Gatenby e Gawlinski, 2003). Assim o efluxo de prótons previne a apoptose por acidose celular e conseqüentemente produzem um ambiente extracelular ácido o que favorece proliferação. A progressão maligna é acompanhada por nova expressão de genes e uma mudança de estado de metilação do DNA. A manutenção do pH extracelular ácido é crucial para o desenvolvimento dos tumores sólidos, e são ativados vários sistemas reguladores de pH, expressos pelas células tumorais, o que evita a apoptose (Boyd *et al.*, 2001; Izumi *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2005; Petrangolini *et al.*, 2006).

De acordo com Fais *et al.* (2007), algumas evidências sugerem que hipóxia e acidificação estão envolvidas na progressão do câncer e na sensibilidade do tumor à quimioterapia. Esse ambiente hipóxico e ácido permite que células tumorais invasivas sobrevivam nesse ambiente desfavorável no qual as células normais perecem, e assim contribui para progressão da malignidade do tumor. Porém ainda não se sabe o mecanismo bioquímico pelo qual a acidificação desempenha um papel na resistência à quimioterapia, na proliferação e no comportamento metastático. De acordo com Walenta *et al.* (2000), parâmetros como pressão de oxigênio, perfusão sanguínea e perfil energético de concentração de metabólitos também podem influenciar o crescimento tumoral e a sensibilidade à terapia.

Um importante fator determinante da acidificação tumoral é o metabolismo anaeróbico que permite a seleção de células com habilidade para sobreviver num ambiente hipóxico e anóxico através de uma regulação aumentada do fator 1 α de hipóxia induzida e uma adaptação do fenótipo glicolítico com geração de lactato como produto. Tumores podem gerar um ambiente ácido mesmo com uma redução da

produção de lactato pela via glicolítica, sugerindo então que o metabolismo glicolítico não é o principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento de um ambiente ácido em tumores sólidos (Fais *et al.*, 2007).

A hipóxia nos tecidos resulta de um suprimento inadequado de O₂ que compromete as funções biológicas (Vaupel *et al.*, 2001). Estudos clínicos e experimentais mostram evidências do papel fundamental da hipóxia nos tumores sólidos que primariamente é uma consequência de distúrbios estruturais e funcionais na microcirculação e na deterioração das condições de difusão e está fortemente associada à propagação do tumor, progressão maligna e resistência ao tratamento (Hoeckel e Vaupel, 2001).

De acordo com Graham *et al* (1999), a hipóxia nos tumores sólidos pode ter um grande impacto sobre a progressão maligna (Hoeckel *et al.*, 1996), com base nas evidências que sugerem que a habilidade de invadir a matriz extracelular *in vitro* e sofrer metástase *in vivo* pode ser estimulada pela hipóxia de alguns tumores como melanoma de camundongo, de carcinoma de células escamosas e sarcoma (Hoeckel *et al.*, 1996) . De acordo com Hoeckel *et al.* (1999), evidências de trabalhos experimentais mostram que a hipóxia induz a apoptose de células neoplásicas sensíveis e que essa sensibilidade é perdida durante a progressão maligna.

Segundo Khatib *et al.* (2002), as pro-proteínas convertases (Pcs) participam na ativação de um amplo espectro de proteínas. Sendo que essas proteínas são sintetizadas como precursores inativos antes de sua conversão a forma totalmente ativa e madura. A grande maioria dessas proteínas ativas, como por exemplo, as metaloproteases da matriz, fatores de crescimento e de adesão molecular, são cruciais nos processos de transformação celular e na aquisição de fenótipo metastático. A inibição das Pcs afeta, de forma significativa, o fenótipo maligno de vários tipos de tumores. Também de acordo com Khatib *et al.* (2002), várias abordagens como expressão gênica e inibição enzimática sustentam a hipótese que as Pcs desempenham um papel na gênese e progressão de diversas desordens proliferativas, incluindo câncer.

2.10- Melanoma

O melanoma é um tipo de neoplasia que tem origem nas células produtoras de melanina, os melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele), e predomina em adultos brancos (Guerra *et al.*, 2005). Quando essas células sofrem a transformação neoplásica, tornando-se malignas, ocorre, então, o melanoma. A maioria dos melanócitos está na pele, o que dá origem ao melanoma cutâneo, podendo, porém, ocorrer nos olhos, meninge, trato digestivo, linfonodos e em outras áreas (Sober e Kho, 1995).

Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no País, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase o que justifica sua alta letalidade (Guerra *et al.*, 2005).

O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor. As novas estatísticas do Instituto Nacional do Câncer no Brasil mostra uma estimativa de 6.230 novos casos para o ano de 2012, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres. Em relação ao número de mortes por melanoma no ano de 2010, no Brasil, o total foi 1.507, sendo 842 homens e 665 mulheres (INCA, 2014). Em geral, para o melanoma, um maior risco inclui história pessoal ou familiar de melanoma. Outros fatores de risco para todos os tipos de câncer da pele incluem sensibilidade da pele ao sol, doenças imunossupressoras e exposição ocupacional. Pacientes imunocomprometidos (como os transplantados renais) têm um maior risco para o desenvolvimento do câncer da pele não melanoma, por apresentarem uma diminuição no controle carcinogênico da pele (INCA, 2014).

O número de novos casos de melanoma diagnosticados nos EUA tem aumentado muito, de modo que a incidência do melanoma foi mais que o dobro (5,7 para 14,3 o número de novos casos diagnosticados por cem mil pessoas por ano), apresentando-se como a neoplasia com aumento mais expressivo (Ries *et al.*, 2000).

Por sua alta letalidade, o melanoma é considerado uma neoplasia agressiva que, em estado disseminado, possui poucas opções eficazes de tratamento e péssimo prognóstico quando não detectado precocemente. Com isso, a sobrevida média do

paciente com melanoma metastático é de 6 a 9 meses e a terapia quimioterápica sistêmica atual apresenta resposta significativa na menor parte dos pacientes (Wack *et al.*, 2001; Lotze *et al.*, 2001).

2.11- Câncer de Próstata

O adenocarcinoma de próstata é o tipo mais comum de câncer em homens, nos EUA, sendo responsável por um em cada quatro novos casos de câncer diagnosticados (Jemal *et al.*, 2010). De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, é estimado para o ano de 2010, aproximadamente 217.730 novos diagnósticos e desse número 32.050 devem morrer por essa causa, então a estimativa é de um em seis homens diagnosticados provavelmente irão morrer com a doença. A causa e mecanismo de progressão do câncer de próstata ainda são pouco compreendidos, mas existem fatores de riscos que podem ajudar na detecção precoce. Entre eles, o que mais se destaca é a idade, seguido por etnia e histórico familiar (Jemal *et al.*, 2010).

Segundo dados do INCA (2012), no Brasil, para o ano de 2012, são estimados cerca de 60.180 novos casos de câncer da próstata, valores esses que correspondem a um risco estimado de 62 novos casos a cada 100 mil homens. Foi feita estimativa de incidência por região do país onde a região Sudeste aparece com maior incidência (78/100 mil), seguida pela região Centro-oeste (75/100 mil), seguida pela região Sul (68/100 mil), região Nordeste (43/100 mil) e região Norte (30/100 mil).

Uma estimativa mundial apontou o câncer de próstata como sendo o primeiro tipo de câncer mais frequente em homens, cerca de 915 mil novos casos foram detectados no ano de 2008. Aproximadamente 75% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em países desenvolvidos. A taxa de incidência mundial cresceu cerca de 25 vezes, sendo as mais altas observadas na Austrália, Nova Zelândia, Europa Ocidental e América do Norte. Parte desse aumento pode ser reflexo das práticas de rastreamento por meio do teste Antígeno Prostático Específico (PSA) (INCA, 2014).

No Brasil, o aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação do país podem explicar o aumento das taxas de incidência ao longo dos anos. O único fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do câncer da próstata

é a idade. Aproximadamente 62% dos casos de câncer da próstata diagnosticados no mundo acometem homens com 65 anos ou mais. Com o crescimento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de casos novos aumente cerca de 60% até o ano de 2015 (INCA, 2014).

O câncer da próstata é aproximadamente 1,6 vezes mais comum em homens negros do que em homens brancos. Os americanos, jamaicanos e caribenhos com descendência africana apresentam as mais altas taxas de incidência desse câncer do mundo, o que pode ser atribuído, em parte, à susceptibilidade genética (cerca de 5% a 10%) (American Cancer Society, 2010). Todavia, é possível que essa diferença explique-se pela heterogeneidade do acesso, bem como pelos diferentes estilos de vida. Outro fator importante na etiologia desse tipo de câncer é a dieta (INCA, 2012). Dietas com base em gordura animal, carne vermelha, embutidos e cálcio têm sido associados ao aumento no risco de desenvolver câncer da próstata. Além disso, também contribui como fator de risco a obesidade, em especial para aquelas neoplasias de comportamento mais agressivo. Em contrapartida, dietas ricas em vegetais, vitaminas D e E, licopeno e ômega-3 aparecem como fatores protetores (INCA, 2012). Recentemente, a síndrome metabólica, caracterizada pela resistência ao hormônio insulina, vem sendo apontada como potencial fator de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. Em geral, os homens com *diabetes mellitus* tipo dois possuem deficiência com relação ao hormônio testosterona. Estudos recentes sugerem que a terapia de reposição hormonal (testosterona) possa inverter alguns aspectos da síndrome metabólica, embora a correlação entre essa reposição e o surgimento do câncer da próstata ainda não seja compreendido (INCA, 2012).

A mortalidade por esse tipo de neoplasia apresenta um perfil ascendente semelhante ao da incidência no Brasil, embora sua magnitude seja mais baixa. Pode ser considerado um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente. Programas de controle da doença são aplicáveis para a redução da mortalidade, entretanto, os métodos de rastreamentos atuais, como o PSA, não mostraram, até o momento, sucesso na redução da mortalidade (INCA, 2014).

3- Hipóteses

- Nas células tumorais a V-ATPase possivelmente encontrada super-expressa na membrana plasmática pode não só promover a acidificação do meio extracelular, mas também exercer um controle do pH extra e intracelular participando de eventos de sinalização que induzem mudanças na via secretória de proteínas inerentes ao processo de metástase.
- A linhagem mais metastática apresenta metabolismo mais acelerado e com isso pode apresentar maior quantidade e variação no formato de mitocôndrias e maior expressão e ativação da enzima Hexoquinase II encontrada associada na membrana externa de mitocôndrias, pois já foi observada maior ativação da ATPase mitocondrial, F-ATPase em trabalho prévio do nosso grupo.
- A linhagem mais metastática B16F10 provavelmente possui características morfológicas e histomorfométricas mais anaplásicas em comparação a linhagem menos metastática B16F0.
- A glicose pode estimular a ativação das bombas de prótons principalmente na linhagem mais metastática, como foi observado em leveduras por Ribeiro *et al.*, 2011.
- As linhagens mais metastáticas podem ser mais sensíveis à ausência de glicose comparando com as menos metastáticas, por sua maior demanda energética.

4- Objetivo Geral

A presente tese teve como objetivo elucidar o papel da expressão funcional da V-ATPase na membrana plasmática de células tumorais e também da F-ATPase, HKII e Na⁺-K⁺-ATPase, comparando entre tumores com diferentes potenciais metastáticos e ainda implementar a caracterização da cinética e função destas enzimas e de suas distribuições nos diferentes compartimentos celulares, tanto em células metastáticas de melanoma e próstata em cultura quanto em tumores sólidos de melanoma, visando fundamentar futuras estratégias terapêuticas que tenham a V-ATPase carcinogênica como alvo.

4.1- Objetivos Específicos

- Verificar as atividades de hidrólise de ATP e transporte de prótons das frações de membranas isoladas por fracionamento celular para identificar possíveis alterações na cinética das enzimas expressas em diferentes linhagens metastáticas de melanoma e próstata e em tumores sólidos de melanoma;
- Verificar atividades de V e Na⁺-K⁺ nas frações nucleares e de F-ATPase na fração mitocondrial das linhagens tumorais de próstata e controle;
- Comprovar por meio de análises ultraestruturais a expressão diferencial da V-ATPase na membrana plasmática das células tumorais;
- Verificar a ultraestrutura e detalhes morfológicos das linhagens e tumores;
- Analisar atividade hidrolítica em vitro de F-ATPase em tumores com diferentes potenciais metastáticos de melanoma;
- Analisar expressão e localização da Na⁺-K⁺ ATPase, V-ATPase e F-ATPase nas linhagens tumorais de melanoma e próstata;
- Verificar respiração celular e consumo de O₂ nas linhagens mais e menos metastática de melanoma;
- Verificar a localização e perfil de marcação com uso de sonda específica para mitocôndrias (Mitotracker) e ainda colocalizar com HK 2;
- Verificar as características morfológicas e morfométricas nas linhagens e tumores de melanoma B16.

5- Material & Métodos

Parte 1 - Metodologia aplicada para Linhagens Celulares e Tumores de Melanoma e Linhagem Controle J774 A₁

O projeto, para desenvolvimento desta tese, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de uso de Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (CEUA-UENF- protocolo nº 144).

5.1- Cultura de Células: Linhagens celulares

As linhagens de células tumorais selecionadas para testar as hipóteses propostas são duas linhagens murinas de melanoma muito e pouco metastático, respectivamente B16F10 (Sloane *et al.*, 1982) e B16F0, adquiridas no banco de células Radovan, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ). Como controle bioquímico foram utilizadas culturas de células de linhagem de macrófago transformado (J774 A₁). As células são mantidas em meio de cultura DMEM com soro fetal bovino (SFB) a 10% em garrafas de cultura tpp e a troca do meio foi feita 2 vezes por semana. Abaixo segue uma tabela com detalhamento de todas as linhagens utilizadas tanto na parte 1 (macrófago e melanoma) quanto na parte 2 (linhagens de próstata).

Tabela 1 – Especificação das Linhagens Celulares utilizadas para parte experimental da tese

Linhagem Celular	Especificação	Espécie de origem	Tipo Celular	Fenótipo Metastático
J774 A1	Macrófago transformado (Controle)	murino	Macrófago de ascite	Não tumoral
B16F0	Melanoma	murino	melanócito	Pouco metastático
B16F10	Melanoma	murino	melanócito	Muito metastático-maior expressão de catepsina L (Sloane, 1982)
RWPE-1	Próstata (Controle)	humana	epitelial	Não tumoral (ATCC, 2013)
LNCAP	Câncer de próstata	humana	epitelial	Pouco metastática e possui receptor de androgênio (Sobel e Sabar, 2005 e ATCC, 2013)
CL1	Câncer de próstata	humana	epitelial	Muito metastática, parental de LNCAP com receptor de androgênio retirado e cresce em meio de cultura com carvão (Sobel e Sabar, 2005, Tso <i>et al</i> , 2000)
CL2	Câncer de próstata	humana	epitelial	Potencial metastático intermediário, parental de LNCAP, foi estabelecida crescendo CL1 com receptor de androgênio (Sobel e Sabar, 2005, Tso <i>et al</i> , 2000)
DU145	Câncer de próstata	humana	epitelial	Proveniente de metástase cerebral (ATCC, 2013)
PC3	Câncer de próstata	humana	epitelial	Proveniente de metástase óssea (Sober e Kho, 2005, ATCC, 2013)

5.2- Indução e Obtenção de Tumores Sólidos

A indução de tumores sólidos de melanoma, com diferentes potenciais metastáticos (B16F10 e B16F0), foi feita em camundongos C57BL/6, através de injeção de 100 µl de solução com 1×10^5 de células viáveis/mL no dorso do animal. A cada indução foram utilizados 6 animais e foram feitas, aproximadamente, 4 experimentos, totalizando o uso de 24 animais durante os 4 anos de trabalho. Antes da indução, os animais foram anestesiados com 10% de Ketamina e Xilazina, numa dose de 70 mg/kg. Após aproximadamente 21-35 dias da indução, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tumor foi retirado e macerado para fracionamento celular. Os camundongos tipo *black* são mantidos, no biotério do LBCT, em caixas próprias com ração e água *ad libitum*. A indução foi realizada com a colaboração do Dr. Milton Kanashiro (LBR-CBB-UENF) e seus alunos de doutorado Layla Hissa Borges e William Freitas (Adaptado de Guimarães *et al.*, 2010).

5.3- Microscopia de Contraste de Fase

Microscopia de Contraste de fase foi realizada em microscópio invertido Zeiss Axiovert 135 M, para observar a morfologia das células em cultura antes e após a troca do meio e antes de serem utilizadas para experimentos de contagem e microscopia. As células são observadas em suas respectivas garrafas com aumentos de 20 e 40 vezes, com um filtro verde.

5.4- Citologia dos Tumores

Depois que os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, foi feita retirada dos tumores derivados das linhagens B16F10 e B16F0, e para o estudo da citologia de cada tipo de tumor foi feito um *imprint* com as lâminas nos tumores frescos recém-retirados. Depois as amostras foram imediatamente fixadas com etanol, marcadas com corante panótico, observadas no microscópio Zeiss Axioplan e fotografadas no sistema Axiovision.

5.4.1- Análise Morfométrica Nuclear

Utilizando as lâminas obtidas por *imprint* dos tumores das linhagens B16F10 e B16F0, será feita contagem nas quatro lâminas de cada tipo de tumor até totalizar 150-200 núcleos, sob aumento de 200 x ou em 25 campos microscópicos. Serão analisados os seguintes parâmetros: área em micrômetros quadrados (μm^2), perímetro em micrômetros (μm), diâmetro mínimo em micrômetros (μm), diâmetro

máximo em micrômetros (μm), fator elíptico, fator de regularidade e fator de circularidade (adaptado de Karbowniczek *et al.*, 1999).

Para tanto, serão usadas imagens digitalizadas em formato TIF, que serão posteriormente analisadas pelo programa Image-Pro Plus 4.5. O sistema de captura digital consiste de um microscópio de luz Nikon Eclipse E400 acoplado a uma câmera digital CCD Evolution MP 5.0 de alta resolução da Media Cybernetics, que transmite a imagem a um computador tipo PC.

5.5- Histopatologia dos Tumores

Os tumores derivados das linhagens B16F10 e B16F0 foram retirados, fixados em paraformaldeído 10% tamponado, depois foram clivados, desidratados em série crescente de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clarificados com xilol, impregnados e incluídos em parafina e as seções foram obtidas no micrótomo. Depois as lâminas foram montadas e marcadas com hematoxilina e eosina. As amostras foram observadas no microscópio Zeiss Axioplan e fotografadas no sistema Axiovision.

5.5.1- Análise Morfométrica Nuclear e Nucleolar

Utilizando as lâminas obtidas dos tumores derivados das linhagens B16F10 e B16F0, processados para histopatologia, será feita análise nuclear, em 25 campos em cada tipo de tumor, sob aumento de 400 x, além de medição da área nucleolar das células tumorais. O maior nucléolo e o maior núcleo de cada campo microscópico (não necessariamente na mesma célula) serão usados para obter os 10 maiores em cada tumor sendo usados para calcular a média dos 10 maiores nucléolos (MTLNI) e a média dos 10 maiores núcleos (MTLN) (Grossniklau *et al.*, 1995 ;Pereira *et al.*, 2001). Para tanto, serão usadas imagens digitalizadas em formato TIF, que serão posteriormente analisadas pelo programa Image-Pro Plus 4.5. O sistema de captura digital consiste de um microscópio de luz Nikon Eclipse E 400 acoplado a uma câmera digital CCD Evolution MP 5.0 de alta resolução da Media Cybernetics, que transmite a imagem a um computador tipo PC. Serão calculados também fator de forma nuclear (FFN) = diâmetro mínimo/ diâmetro máximo e que também é chamado de fator elíptico (Oda e Tsuneyoshi, 1995), fator de circularidade nuclear (FCN) = $4\pi \times \text{área} / \text{perímetro}^2$, também chamado de PE form fator (Abdalla *et. al*, 2008), fator de regularidade nuclear (FRegN)= $\text{área}/(\pi/4) \times \text{diâmetro máximo} \times \text{diâmetro mínimo}$ e fator de redondeza nuclear (FRedN)= $(\text{perímetro}/2\pi) / (\text{área}/\pi)^{0.5}$.

5.6- Microscopia de Fluorescência (MitoTracker)

Para o experimento de Mitotracker, as células foram plaqueadas 24hs antes do experimento em lamínulas na placa de 24 poços com meio de cultura DMEM com 10% SFB. Então, o meio de cultura foi retirado e as células foram incubadas em solução de mitotracker a 100 nM em meio DMEM sem soro por 40 minutos em estufa a 37°C e 5% de atmosfera de CO₂. Após incubação, a sonda foi retirada e as células foram lavadas em DMEM sem soro e depois as lâminas foram montadas em DMEM sem soro, observadas e fotografadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axiovision.

5.7- Microscopia Eletrônica de Transmissão

5.7.1- Preparação das Linhagens e Tumores

- Preparação das Células em resina LR *white*

O meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com tampão PBS, depois fixadas por 2 hs com paraformaldeído 4% e glutaraldeído grau 1 0,2% em tampão fosfato 50 mM (TPO₄), lavadas com tampão fosfato 50 mM (TPO₄) por 3 vezes de 10 minutos. Depois foi iniciada a série de desidratação em etanol 30%, 50%, 70%, 90% e por 2 vezes 100%, por 10 minutos para cada etapa. Depois foi iniciada a inclusão gradual em resina, que consiste em adicionar etanol 100% e resina (2:1) por 2 horas, etanol 100% e resina (1:2) *overnight*, primeira resina pura por 6 horas e depois as células foram raspadas e colocadas em cápsulas de gelatina e foi adicionada a segunda resina pura por 24 horas e a polimerização foi feita em estufa a 50°C por 12hs. Depois da polimerização, foram feitas pirâmides nos blocos de resina para serem obtidos os cortes ultrafinos que foram colocados em grades de níquel para imuno marcação e em grades de cobre para avaliação da morfologia. As grades de cobre foram contrastadas de forma convencional por 20 minutos em acetato de uranila e 5 minutos em citrato de chumbo. Depois as grades foram observadas, no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900.

- Preparação dos Tumores em Resina LR *White* - Os tumores sólidos foram fixados em paraformaldeído 4% e glutaraldeído grau 1 0,2% em tampão fosfato (TPO₄), clivados e lavados em tampão fosfato 50 mM (TPO₄) por 3 vezes de 10 minutos, depois foram pós fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora e desidratados em série de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 2 vezes de 100% por 10 minutos cada etapa. Depois as amostras foram incluídas gradualmente em resina que

consiste de inclusão em etanol 100% e resina (2:1) por 2 horas, etanol 100% e resina (1:1) por 2 horas, etanol 100% e resina (1:2) *overnight*, primeira resina pura por 6 horas e segunda resina pura por 24 horas. A polimerização foi feita em estufa a 50°C por 12 horas. Depois da polimerização, foram feitas pirâmides nos blocos de resina para serem obtidos os cortes ultrafinos que foram colocados em grades de cobre para avaliação da morfologia dos tumores, observadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900. Os experimentos de Microscopia Eletrônica de Transmissão foram feitos em colaboração com o Prof. Fábio Lopes Olivares (LBCT-CBB-UENF) (Adaptado de Guimarães *et al.*, 2010).

5.8- Consumo de O₂

As taxas de consumo de oxigênio foram medidas polarograficamente em um oxímetro com um eletrodo de Clark (Oxytherm, Hansatech Instruments). O experimento foi realizado usando-se o próprio meio de cultura no qual as células cresceram (DMEM). Foi feita a troca do meio pouco antes da medição. Primeiramente o aparelho foi zerado (calibrado) adicionando-se ditioneto no meio de cultura. Em seguida a cubeta fixa do aparelho foi lavada 3x com água destilada. As células foram raspadas das garrafas, contadas (~10⁶ células) e cuidadosamente colocadas íntegras na cubeta do aparelho juntamente com o meio de cultura recém-trocado. Após os registros do consumo, os gráficos foram trabalhados no Excel.

5.9- Localização da HK-2 nas linhagens tumorais

As células mantidas em cultura como previamente mencionado foram jateadas das garrafas e colocou-se 150 uL na lamínula no fundo em placa de 24 poços. Deixou-se 1 hora para aderir e então o meio foi trocado. A placa ficou na estufa a 37°C a 5% de CO₂ *overnight*. Em seguida, as células foram fixadas com formaldeído 4% em tampão PHEM 0,1 M. Lavou-se 3 x com PHEM. Depois, as células foram permeabilizadas com Triton X-100 3% em PHEM por 15 min. Lavou-se 3 x com PHEM. Depois as células ficaram 30 min em PHEM com cloreto de amônio 50 mM. Lavou-se 2 x com PHEM e 1x com PHEM-BSA 3%. Incubou-se as células com a sonda Mitotracker (diluída em PHEM-BSA 3%) 1:100 durante 1h. Lavou-se 2 x com PHEM e 1 x com PHEM-BSA 3%. As células foram incubadas com o anticorpo primário anti HK-2 (abcam) 1:50 (diluído em PHEM-BSA 3%) por 1h. Lavou-se 2 x com PHEM e 1 x com PHEM-BSA 3%. As células foram incubadas com o anticorpo secundário anti *mouse* conjugado com Alexa 546 (vermelho) 1:100 (diluído em

PHEM-BSA 3 %) por 1 h. Lavou-se 6 x com PHEM. Montou-se as lâminas com Prolong Gold (com DAPI) com 8 uL. Selou-se as lamínulas com esmalte. No dia seguinte as lâminas foram observadas no microscópio confocal a laser (LSM 710 Carl Zeiss - Sistema Zen) (Adaptado de Fletcher *et. al*, 2010).

5.10- Fracionamento Celular e Purificação da Membrana Plasmática

As células raspadas de garrafas de culturas e os tumores sólidos, obtidos por meio de colaboração o professor Milton Kanashiro do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR), foram centrifugados a 1200 rpm por 10 min, o precipitado foi lavado com tampão de ressuspensão e centrifugados a 1200 rpm por 10 min, então no gelo os precipitados são divididos em duas partes e ressuspensos em tampão com (Tampão com glicose pH 7,2, 330 mM Sorbitol, 50 mM tris, 100 mM glicose, 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4) e sem glicose (Tampão sem glicose pH 7,2, 430 mM Sorbitol, 50 mM tris, 2 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4) incubados 20 min à 37 °C. Depois foram centrifugados a 1200 rpm por 10 min e 4 °C, coletando o precipitado ressuspensão em tampão de lise (20 mM MOPS, 12,5% de sacarose pH 7,2 + 0,03%BSA, 1 mM PMSF, 1 mM Benzaminidina e Coquetel de inibidores na concentração de 1 mg/ml (leupeptina, aprotinina, quimiostatina, pepstatina A e antipaina). O precipitado foi então rompido em Potter 50 vezes e centrifugado 500 rpm por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado na microultracentrífuga a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C para isolar a fração mitocondrial. O sobrenadante resultante foi então centrifugado a 100.000 x g 30 minutos para isolar a fração microssomal ambos ressuspensos em tampão de ressuspensão com inibidores e congelados em N_2 líquido e estocados a -70°C. Foram coletadas as frações mitocondriais brutas e microssomal (vesículas totais).

5.11 – Dosagem de Proteína e Atividade ATPásica

5.11.1 – Dosagem de Proteína

A fração de vesículas purificadas teve o seu conteúdo de proteínas totais dosado pelo método de Bradford (1976). A solução de Bradford foi confeccionada com 100 mg de comassie blue, 50 mL de etanol sobre agitação durante 1 hora, depois foi adicionado 100 mL de ácido ortofosfórico e o volume foi completado para 1000 mL de H_2O destilada, a solução foi filtrada em papel filtro 4 vezes. A curva padrão foi obtida utilizando solução de BSA 1 mg/mL diluída a concentrações variando de 2 a 18 μg , completando o volume para 100 μL de H_2O milique e adicionando 900 μL da solução

de Bradford. Nas amostras são colocados 90 μL de H_2O Milique, padrão de BSA, amostra e 900 μL de Bradford e após 15 minutos foi feita a leitura a 595 nm no espectrofotômetro.

5.11.2 – Atividade hidrolítica da V-ATPase, F-ATPase e $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

O meio de reação contém: Hepes-Tris pH 7,0 10mM, MgSO_4 1 mM, e ATP 1 mM; levado ao volume final com adição da apropriada quantidade de H_2O milique para cada condição de ensaio, as quais podem conter requerer ainda a adição de inibidores de F-ATPase (Azida sódica 0,5 mM), P-ATPases (Vanadato 0,1 mM), ATP 1 mM, fosfatases (Molibdato de Na 0,2 mM), ou V-ATPases (Concanamicina A 5 nM). A reação é disparada com a adição de proteína da fração microssomal (vesículas totais) na concentração de 0.05 mg/ml e parada após 0, 9, 12, 15 e 30 minutos de tempo de incubação, pela retirada de alíquotas que são imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA gelado a 5 %.

Para o ensaio de atividade da F-ATPase, a atividade também foi avaliada por hidrólise de ATP, já que essa enzima *in vitro* é capaz de realizar hidrólise. Para tal, o meio de reação contém Tris-HCl pH 8.0, MgSO_4 1 mM, e ATP 1 mM, com adição de inibidores de F-ATPase (Azida sódica 0,5 mM) para detectar atividade sensível, P-ATPases (Vanadato 0,1 mM), fosfatases (Molibdato de Na 0,2 mM) e V-ATPases (Concanamicina A 5 nM). A reação é disparada com a adição de proteína da fração mitocondrial bruta na concentração de 0,05mg/ml e parada após 0, 9, 12, 15 e 30 minutos de tempo de incubação, pela retirada de alíquotas que são imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA gelado a 5 %.

Para o ensaio de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, a atividade seguiu a mesma metodologia, com o seguinte meio de a reação: Hepes-Tris pH 7,0 10 mM, MgSO_4 1 mM, e ATP 1 mM; levado ao volume final com adição da apropriada quantidade de H_2O milique para cada condição de ensaio, as quais podem conter requerer ainda a adição de inibidores de F-ATPase (Azida sódica 0,5 mM), P-ATPases (Vanadato 0,1 mM), ATP 1 nM, fosfatases (Molibdato de Na 0,2 mM), V-ATPases (Concanamicina A 5 nM) e para detectar a atividade específica foi utilizado o inibidor de Na-K-ATPase Ouabaína (1 mM). A reação é disparada com a adição de proteína da fração microssomal (vesículas totais) bruta na concentração de 0,05mg/ml e parada após 0, 9, 12, 15 e 30 minutos de tempo de incubação, pela retirada de alíquotas que são imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo TCA gelado a 5 %.

Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP, foi utilizado o método clássico de Fiske e Subbarow, 1925, utilizando molibdato de amônio e ácido ascórbico e a leitura foi feita no leitor de Elisa a 750 nm (Adaptado de Summer *et al.*, 1995).

5.12- Dot Blot da Na⁺-K⁺-ATPase

Foram utilizadas membranas isoladas das linhagens celulares J774 A1, B16F10 e B16F0 de, utilizamos um conteúdo de 10 ug para realizar o ensaio que foi feito com o anticorpo específico para subunidade $\alpha 1$ da Na²⁺/K⁺-ATPase de células animais, conforme Samarão *et al.*, 2009. Primeiro a membrana de nitrocelulose é umidecida e permanece secando *overnight*, depois amostras de membranas totais isoladas das linhagens celulares J774 A1, B16F10 e B16F0 foram aplicadas, espera-se secar completamente e depois a membrana é bloqueada com solução de leite 3% em PBS, incubada com anticorpo primário para subunidade $\alpha 1$ da Na²⁺/K⁺-ATPase, por 30 min em agitação e foi deixado *overnight* a 2-8°C, depois mais 30 minutos de agitação e a membrana foi lavada consecutivamente com solução de leite 3% em PBS e depois foi incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 1 hora em agitação, depois passou por série de lavagem em PBS e foi revelada com solução reveladora contendo imidazol, H₂O₂ e DABI.

5.13 – Monitoramento do gradiente de prótons

O gradiente de prótons gerado pelas H⁺-ATPases foi medido fluorimetricamente por meio da sonda sensível a pH 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente metacromática, excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro.

O ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, e assumindo-se que quando não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica da membrana. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar. Então a sonda distribui-se através da membrana em função da diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas.

A determinação do gradiente de H⁺ foi feita seguindo o protocolo de Okorokov e Lichko (1983) e foi realizada no fluorímetro (Hitachi F 45000 ou Shimadzu RF-5301 PC) com abertura de 5/10 nm no comprimento de onda de excitação 415 nm e de emissão 485 nm.

Foi utilizada uma solução contendo: 20 mM KCl; 2,5 mM MgSO₄; 30 ug de vesículas de membranas; quantidade suficiente de tampão de MOPS-KOH (Sacarose 12,5%; MOPS-KOH 20 mM, pH 7,4) para completar o volume final para 2,0 mL. Foi adicionado ACMA 1 mM. Esta reação foi preparada direto na cubeta e incubada diretamente no fluorímetro a 30 °C por 5 min. Após esta incubação, foi inicializada a reação no aparelho aguardando-se aproximadamente 50 s (tempo de estabilização do platô da fluorescência) e adicionando-se imediatamente 1 mM de ATP-NaOH pH 7,2. A cinética da extinção da fluorescência (*quenching*) foi observada até o tempo de aproximadamente 600 segundos (ou tempo necessário para atingir a completa extinção da fluorescência), sendo então adicionados 20 mM NH₄Cl a fim de refazer a fluorescência inicial, ou seja, desfazer o gradiente de H⁺ formado. Para avaliar o transporte específico via V-ATPase foi utilizada Concanamicina (110 nm).

A determinação da velocidade inicial (V_0) e da fluorescência máxima ($\Delta F_{\text{máx}}$) na suspensão de vesículas de membranas foi feita utilizando-se os dados do gráfico obtido nas análises (Figura 11).

Utilizamos a seguintes fórmulas:

$$V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * t)] * 100, \text{ onde:}$$

V_0 : velocidade inicial de formação do ΔpH (%);

F_0 : fluorescência dependente de V_0 num tempo t , determinado pela extrapolação da maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

$F_{\text{máx}}$: fluorescência máxima (total);

t : tempo em minutos;

$$\Delta F_{\text{máx}} = F_{\text{eq}} / F_{\text{máx}} * 100$$

F_{eq} : fluorescência de equilíbrio, determinada como fluorescência do platô que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de H⁺ nas vesículas.

Sample :delta pH 1 grad isol 22/08/00
 Comment :ATP 1,0mM NH4Cl 20mM fr9

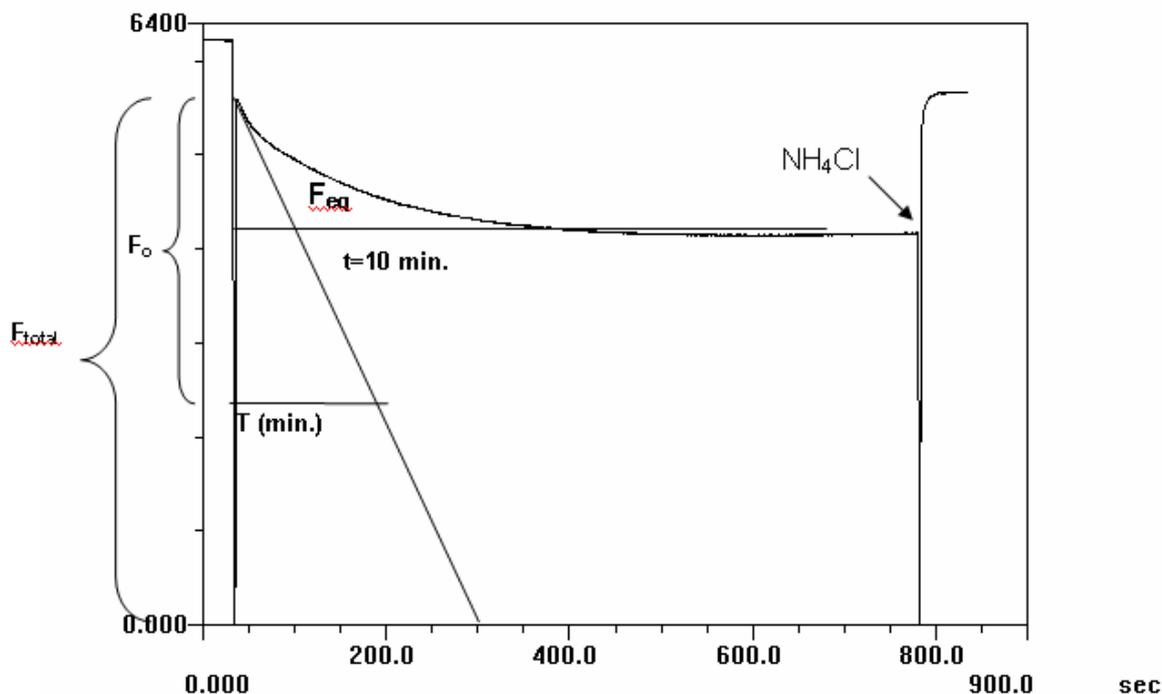


Figura 11- Representação esquemática da determinação de velocidade inicial e amplitude máxima do transporte de H^+ por membranas de *S. cerevisiae*, cepa X2180, MT e separadas em gradiente de sacarose. **Velocidade inicial** ($V_o = [F_o / (F_{total} * T)] * 100$); **Amplitude máxima** ($\Delta F_{max} = (F_{eq} / F_{total}) * 100$) (Adaptado de Samarão *et al.*, 2009).

Parte 2 - Metodologia aplicada nas Linhagens de Câncer de Próstata – LNCAP, PC3, CL1, CL2, DU145 e Controle RWPE-1

Essa parte do projeto foi desenvolvida na Texas Tech University Health Science Center, em Lubbock - Texas - USA, com a supervisão do Dr. Raul Martínez-Zaguilán e Dra. Souad Sennoune e do orientador Dr. Arnaldo Rocha Façanha, e foi possível através da concessão de bolsa de doutorado sanduíche pela CAPES-PDSE.

5.14 - Cultura de Células: Linhagens celulares

Então das linhagens estudadas, RWPE-1 é célula prostática normal usada como controle, LNCAP é tumor epitelial de próstata não metastático, DU145 é tumor epitelial de próstata metastático, seguido de PC3 que é mais metastática e CL1 e CL2 são consideradas mais metastáticas.

As linhagens celulares LNCAP, DU145 e PC3 foram cultivadas em meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (solução de streptomina). A linhagem CL1 foi cultivada em meio RPMI suplementado com 5% de soro charcoal, 1% de L-glutamina, 1% de sódio piruvato,

1% de solução de aminoácidos e 1% de antibiótico (solução de streptomicina). A linhagem CL2 foi cultivada com meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina, 1% de sódio piruvato, 1% de solução de aminoácidos e 1% de antibiótico (solução de streptomicina). A linhagem RWPE-1 foi cultivada com meio de cultura especial contendo fatores de crescimento e equivalente ao soro. Para cada passagem, as células foram tratadas com tripsina a 37°C por 2 minutos. As células foram cultivadas em garrafas de cultura tipo T-75, passadas semanalmente numa concentração em torno de $2-3 \times 10^5$ para estoque e para experimentos em torno de $3-5 \times 10^5$ e mantidas em incubadoras a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂.

5.15- Fracionamento Celular

As linhagens celulares de câncer de próstata foram cultivadas em placas de petri de cultura, raspadas e centrifugadas a 1200 rpm para que precipite as células. O precipitado foi ressuspensão em tampão de lavagem (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.38) contendo cocktail de inibidores (Roche, lote 14692300, contendo inibidores de serinas, cisteínas e metaloproteases em bactérias, mamíferos, fungos e extratos de plantas) e as células foram mantidas por 10 minutos no gelo após serem homogeneizadas em “póter”. Depois, foram centrifugadas a 500 rpm, 4°C por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado e mantido no gelo e o precipitado foi novamente ressuspensão em tampão de lavagem contendo cocktail de inibidores, homogeneizado em “póter” e centrifugados novamente a 500 rpm, 4°C por 5 minutos, depois o sobrenadante foi coletado e colocado juntamente com o primeiro em tubo próprio para ultracentrifuga (Beckman), foi retirada pequena alíquota armazenado como homogenato e completado o volume do tubo para centrifugar por 15 minutos a 7400 rpm e 4°C em ultracentrifuga (Beckman). E o precipitado foi ressuspensão em tampão homogeneizante (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 250 mM Sacarose, pH 7.38) com cocktail de inibidores (Roche, lote 14692300, contendo inibidores de serinas, cisteínas e metaloproteases em bactérias, mamíferos, fungos e extratos de plantas) como fração nuclear. Após os 15 minutos de centrifugação, o precipitado é ressuspensão em tampão homogeneizante como fração mitocondrial bruta e o sobrenadante é centrifugado por 45 minutos a 4°C 23500 rpm em ultracentrifuga (Beckman). O precipitado contendo membranas totais é ressuspensão em tampão homogeneizante e aplicado no topo do gradiente de sacarose 40% e 20% (em tampão 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.3) e centrifugado a 23500 rpm, 4°C por 60 minutos com desaceleração

de 0 e depois a banda entre as duas concentrações de sacarose é coletada contendo fração pura de membrana plasmática e é colocada em tubo de centrifugação, o volume deve ser completado para 15 ml com tampão homogeneizante e é centrifugado por 30 minutos, 4°C a 23500 rpm e depois o precipitado contendo fração de membrana plasmática purificada é ressuspenso em tampão homogeneizante e armazenado em freezer -80°C.

5.15.1 - Dosagem de Proteína

Após o fracionamento celular o conteúdo de proteína foi quantificado pelo método de Lowry, utilizando uma curva com concentrações crescentes de BSA iniciando com 0, 10, 20, 30 40 e 50 µl, o volume é ajustado completando com água para 100 µl. São utilizadas as seguintes soluções de Lowry: solução A contendo 2% de Na₂CO₃ em 0,1 M de NaOH, solução B contendo 1% CuSO₄ em H₂O destilada e solução C contendo 2% de sódio tartarato. A solução de trabalho é preparada usando 49 ml da solução A, 0,5 ml da solução B e 0,5 ml da solução C e em cada tubo é colocado 900 µl da solução contendo soluções A+B+C. Nas amostras são utilizados 5 µl de proteína isolada para 95 µl de água. Após é adicionada em cada tubo 50 µl do reagente Folin e homogeneizado em vórtex, depois incubado 20 minutos em banho maria a 37°C e é feita a leitura em espectrofotômetro a 550 nm (Adaptado de Lowry *et al.* , 1951).

5.15.2 - Atividade Hidrolítica

Para ensaio de atividade hidrolítica de V, F e Na-K ATPase foram utilizados entre 10-20 µg de proteína. Para verificar atividade da V-ATPase e Na-K-ATPase foram utilizadas frações de membrana plasmática e de fração nuclear. Para detectar atividade de V-ATPase o meio de reação contém 3 mM ATP, 3 mM MgSO₄, 25 mM Tris-SO₄ pH 8,0, 5 mM NaN₃, 1 mM Ortovanadato de sódio, 3 mM MgCl₂, 10 µM oubaína e como inibidor específico para detectar atividade sensível foi utilizada 10 µM bafilomicina e água milique. Para detectar atividade de Na-K ATPase o meio de reação contém 3 mM ATP, 3 mM MgSO₄, 25 mM Tris-SO₄ pH 8,0, 5 mM NaN₃, 3 mM MgCl₂, 10 µM bafilomicina, 60 mM NaCl, 10 mM KCl e como inibidor específico para detectar atividade sensível 10 µM oubaína e água.

Para verificar atividade de F-ATPase foi utilizada fração mitocondrial bruta. Para detectar atividade de F-ATPase o meio de reação contém 3 mM ATP, 3 mM MgSO₄, 25 mM Tris-SO₄ pH 8,0, 1 mM Ortovanadato de sódio, 10 µM oubaína, 10 µM bafilomicina e como inibidor específico para detectar atividade sensível 5 mM NaN₃ e água.

Para parar a reação foi adicionada solução de SDS 24%. O protocolo de detecção de fosfato inorgânico foi adaptado do método proposto por Chifflet. A curva padrão possui concentrações crescentes de KH_2PO_4 de 0 a 100 μM e para revelar são usadas solução B contendo 12% de ácido ascórbico em HCl 1 N e 200 μM EDTA e solução C contendo 2% de molibdato de amônio em HCl 1 N, a solução B e C é usada com diluição 1:1 e foram aplicados 300 μl em cada tubo de reação e por fim é adicionada 450 μl de solução E contendo 2% de citrato de sódio, 2% de metarsenato de sódio e 2% de ácido acético em água destilada, depois de 20 minutos de incubação em temperatura ambiente as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 850 nm (Chifflet *et al.*, 1988; Gonzalez-Romo *et al.*, 1992).

5.16 - Imunocitoquímica

As células foram plaqueadas em lamínulas redondas de 12 mm e colocadas em placas de petri de 60 mm e após aproximadamente 48 horas de plaqueamento e em torno de 60% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos, lavadas 2 vezes com PBS, lavadas com Cloreto de amônio e permeabilizadas com 0,1% de Triton em PBS. Foram utilizados os anticorpos primários para isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 4$ do domínio V_0 da V-ATPase, para isoforma $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase (1:200) e para subunidade α da F-ATPase (1:500) e secundário conjugado à FITC. As amostras foram visualizadas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X (Adaptado de Fletcher *et al.*, 2010).

5.17 - Mensuração de densidade celular após ausência de glicose

As células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços e após 48 horas de plaqueamento e quando alcançam confluência, foi trocado o meio de cultura para DMEM sem glicose e as células do tempo 0 foram fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos e depois lavadas 2 vezes com PBS, permanecendo em PBS e assim ocorreu após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas com incubação com meio sem glicose, e depois as placas foram coradas com Cristal Violeta por 40 minutos, lavadas extensivamente com água e deixadas secando overnight. Depois as placas foram lidas em leitor de placas a 454 nm e foi quantificada a densidade celular após ausência de glicose através da absorbância das células coradas presentes.

6- Resultados

Parte 1 – Resultados Obtidos em Linhagens Celulares e Tumores de Melanoma e Linhagem Controle J774 A₁

6.1- Indução Experimental de Tumores de Melanoma B16F10 e B16F0

As figuras 12 e 13 mostram que foi possível a indução de tumor em camundongos a partir das linhagens de melanoma, com diferentes potenciais metastáticos, mantidas em cultura. Na prática, observamos diferentes consistências sendo o tumor da linhagem B16F10 (Fig. 12 e 13 A) de consistência menos densa o que pode ocorrer devido ao seu fenótipo mais metastático e potencial mais invasivo e também observamos, nas induções realizadas ao longo de 2011, presença de tumor com úlcera, que a linhagem mais metastática B16F10 apresentou úlcera seca e tumor de coloração negra (Fig. 12 A) e a linhagem menos metastática B16F0 apresentou mais tardiamente úlcera com tumor de aparência úmida e tumor com coloração mais clara (12 B). A partir dessas observações, passamos a investigar a localização das enzimas estudadas nesses tecidos e fazer uma caracterização morfológica detalhada para apontar possíveis diferenças entre estas linhagens e tumores.

A Figura 13, mostra o tumor mais metastático (13 A) maior, mais escuro, com consistência menos densa, rico em vascularização e o tumor menos metastático (13 B) menor, mais claro e com consistência mais firme. E em todas as induções foi observado um crescimento maior e mais rápido nos tumores da linhagem mais metastática B16F10, retirado em média em torno de 14-21 dias após indução, enquanto o menos metastático foi retirado em torno de 35-45 dias após a indução. É importante ressaltar que todos os animais continuavam ativos e que a indução não comprometeu funções vitais e que os animais não apresentaram sinais de metástase pulmonar e em outros órgãos, como é observado quando a indução é feita pela veia da cauda.

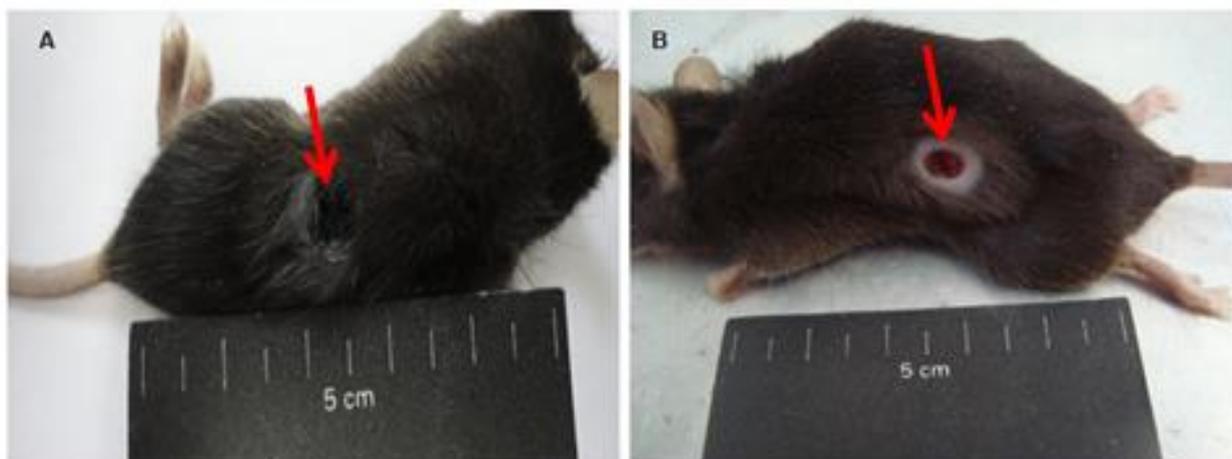


Figura 12 – Camundongos após indução de tumores. Em A, tumor induzido com a linhagem de melanoma B16F10 e em B, tumor induzido com a linhagem de melanoma B16F0. A presença de úlceras está indicada pelas setas vermelhas em ambos os tumores.

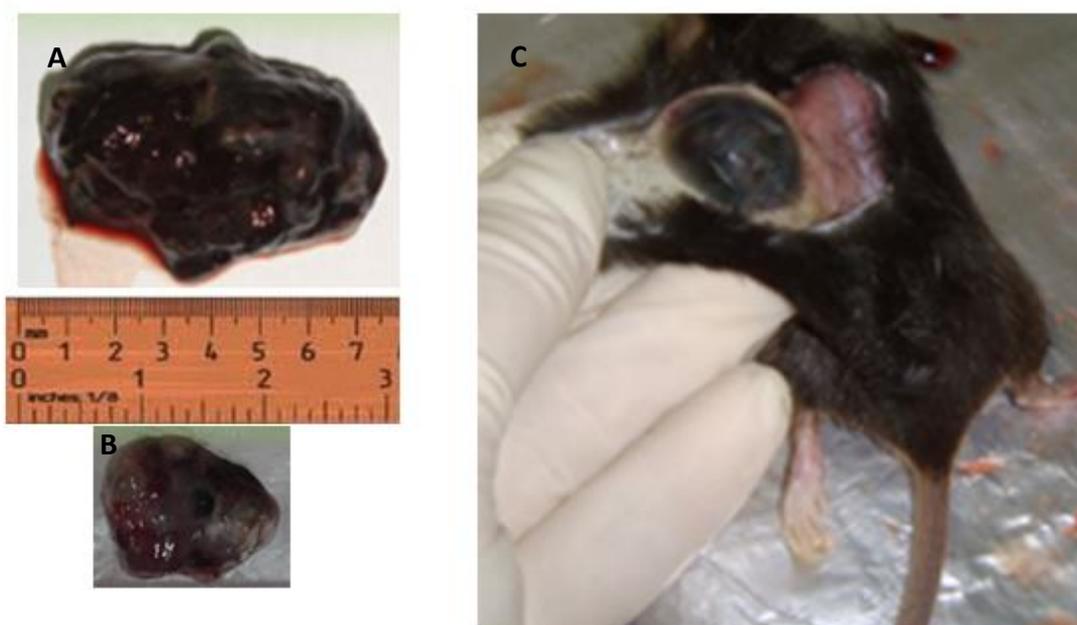


Figura 13- Tumores derivados das linhagens de melanoma, em A o mais metastático B16F10, maior e bem escuro e em B, o menos metastático B, B16F0 menos metastático, menor e mais claro e em C ilustração do tumor no animal.

6.2- Citologia dos Tumores B16F0 e B16F10

Para observar os detalhes e padrões das células dos tumores induzidos foi feita técnica de citologia. A Figura 14 mostra as células com núcleos aumentados, sem grandes variações de tamanhos e imagem monótona, que condiz com fenótipo menos metastático do tumor derivado da linhagem menos metastática de melanoma B16F0.

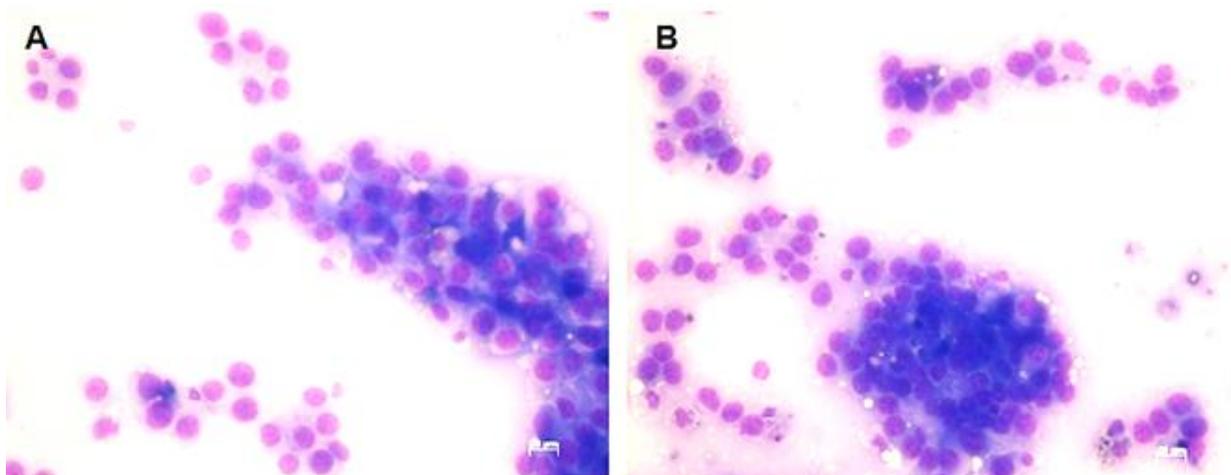


Figura 14- Fotomicrografias de citologia do melanoma epitelióide cutâneo ulcerativo em camundongos C57Bl (B16F0), após 35 dias de indução do tumor. O animal apresentou úlcera úmida + tumor. Em A e B, imagem monótona, células sem notáveis variações de tamanho, mais organizadas e com núcleos grandes e vários nucléolos. Corante panótico.

A Figura 15 mostra fotomicrografias de citologia de tumor derivado da linhagem de melanoma mais metastático B16F10, mostrando, em A, grandes variações de tamanho, com células com grandes núcleos e vários nucléolos e células em apoptose e em B presença de células multi vesiculadas, o que confirma que este tumor derivado da linhagem mais metastática é mais anaplásico em comparação à ao tumor B16F0 (Figura 14). Esse dado confirma o perfil mais anaplásico desse tumor mais metastático de melanoma, uma vez que os tumores mais agressivos e metastáticos mostram ser mais anaplásicos e mostram variações e heterogenia entre as células no mesmo tecido.

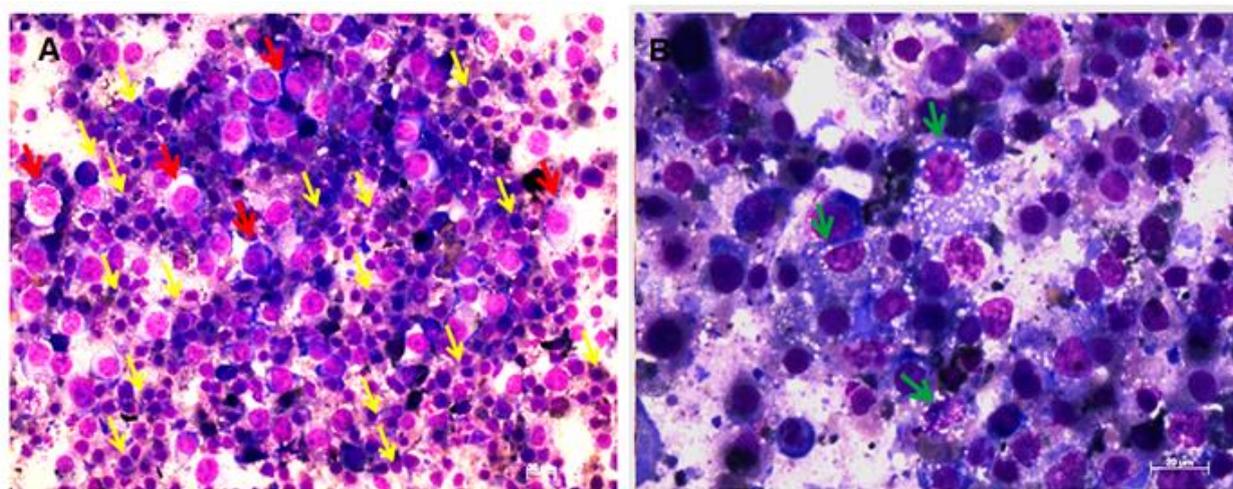


Figura 15- Fotomicrografias do melanoma epitelióide cutâneo ulcerativo em camundongos C57Bl (B16F10), após 21 dias de indução. O animal apresentou úlcera seca + tumor. Em A, presença de células com núcleos grandes e algumas delas com vários nucléolos (setas vermelhas) e também áreas

com células necrosadas (setas amarelas) e em B, presença de células multi vesiculadas (setas verdes). Corante panótico.

6.3- Histopatologia dos Tumores B16F0 e B16F10

Para avaliação dos tecidos dos tumores induzidos foi realizada a técnica de histopatologia de cada um dos tumores induzidos. A Figura 16 mostra fotomicrografias do tumor derivado da linhagem menos metastática B16F0 e as setas pretas mostram que o tumor formado possui uma tênue cápsula, ou seja, é um tumor contido o que corrobora dados anteriores obtidos e com o fenótipo de menos metastática, anteriormente visto apenas com classificação baseado na expressão de catepsina.

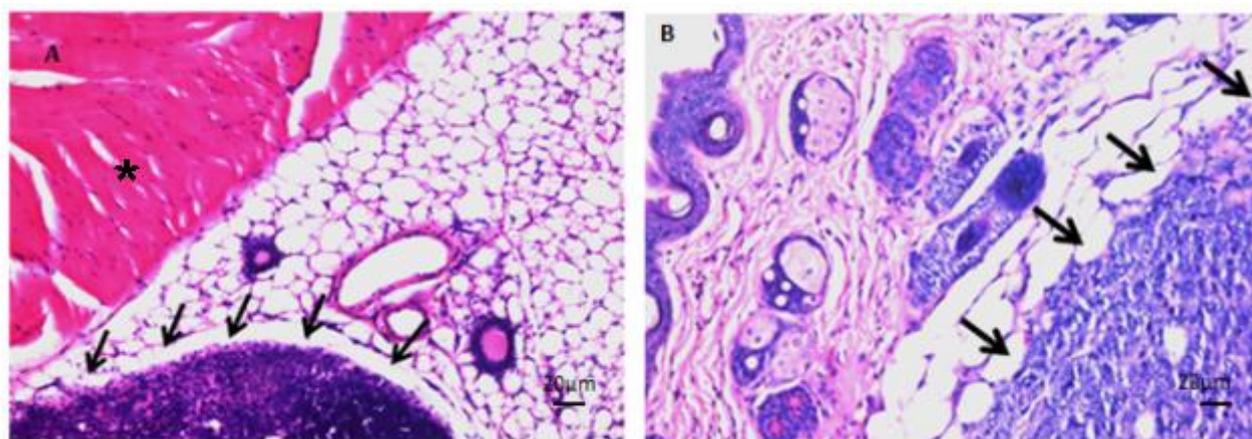


Figura 16- Fotomicrografias do melanoma epitelióide cutâneo ulcerativo em camundongos C57Bl (B16F0), após 35 dias de indução do tumor. O animal apresentou úlcera úmida + tumor. Em A e B, seção transversal mostrando anexos e o tumor da linhagem B16F0 subcutâneo bem delimitado (setas pretas), sem mostrar sinais de invasão de tecidos vizinhos. Em A, evidenciado tecido muscular (asterisco).

A Figura 17 mostra fotomicrografias do tumor derivado da linhagem mais metastática B16F10, em A seção longitudinal com a seta vermelha indicando tumor subcutâneo e em B seção transversal mostrando fibras musculares entremeadas no tumor, mostrando traços de invasão e confirmando o perfil fisiológico mais metastático desse tumor e mostrando mais uma característica anaplásica.

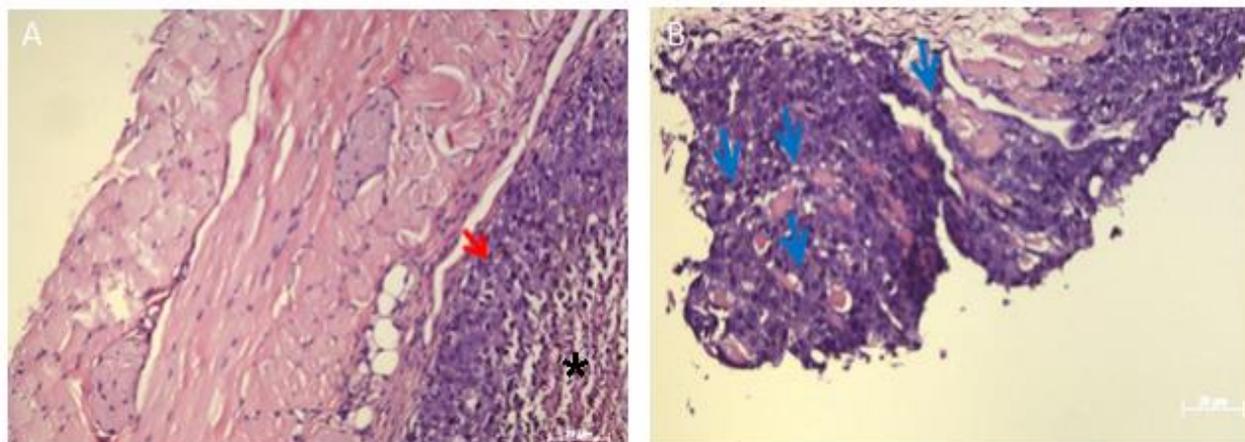


Figura 17- Fotomicrografias do melanoma epitelióide cutâneo ulcerativo em camundongos C57Bl/6J (B16F10), após 21 dias de indução. O animal apresentou úlcera seca + tumor. Em A, seção longitudinal mostrando as camadas do tecido muscular com tumor localizado na região subcutânea (seta vermelha), tumor mostra área com necrose (asterisco) e em B, seção transversal do tumor de B16F10 subcutâneo com fibras musculares entremeadas (setas azuis), mostrando que parte do músculo foi invadida pelo tumor.

6.4- Análises Morfométricas Nucleares e Nucleolares

Para complementar dados de Citologia e Histopatologia obtidos dos Tumores induzidos das linhagens mais metastática B16F10 e menos metastática B16F0, foram feitas mensurações morfométricas nucleares e nucleolares de ambos os tumores. Alguns dos parâmetros analisados podem ser observados na Tabela 2 e Tabela 3, e o tumor derivado da linhagem mais metastática B16F10 apresentou valores bem superiores em relação ao tumor da outra linhagem menos metastática B16F0, o que confirma o que foi observado na Citologia e Histopatologia, características mais anaplásicas no que tange tamanho nuclear e nucleolar e ainda na histopatologia foram achados traços de invasão (Figura 17 B). A figura 18 ilustra uma das formas de mensuração utilizadas.

Tabela 2- Resumo de Parâmetros de Mensurações Morfométricas de Tumores B16F10 e B16F0

Tumor	B16F10	B16F0
Área Núcleo	104,22 ± 2,19	74,18 ± 4,16
Diâmetro (máx.) Núcleo	12,99 ± 0,18	11,37 ± 0,30
Diâmetro (mín.) Núcleo	9,76 ± 0,14	7,70 ± 0,27
Perímetro Núcleo	37,04 ± 0,39	31,36 ± 0,84
Área Nucléolo	7,47 ± 0,25	6,15 ± 0,19

Tabela 3 - Análise detalhada de parâmetros de mensurações morfométricas nos núcleos de Tumores B16F10 e B16F0

Nucleus Measurements	Tumor B16F10	Tumor B16F0
Area	104,22 SE± 2,196 *	74,18 SE± 4,169 **
Hole Area	0,00027 SE± 0,00027	0,00055 SE± 0,00036
Hole Ratio	0,99999 SE± 3,1777	0,99999 SE± 5,3494
Diameter (max)	13,00031 SE± 0,18070 *	11,37779 SE± 0,3077 **
Diameter (min)	9,81976 SE± 0,1560 *	7,86876 SE± 0,2562 **
FFN	0,75631 SE± 0,013	0,69128 SE± 0,0102
Diameter (mean)	11,37436 SE± 0,1344 *	9,45692 SE± 0,2794 **
Radius (max)	6,763907 SE± 0,0958	5,93142 SE± 0,1559
Radius (min)	4,703801 SE± 0,0835	3,74328 SE± 0,1310
Holes	0,04 SE± 0,01634	0,07 SE± 0,0366
Perimeter	37,04994 SE± 0,3964 *	31,36912 SE± 0,8435 **
FCN	0,953463 SE± 0,0062	0,94052 SE± 0,0046
FRegN	1,039622 SE± 0,00340	1,04903 SE± 0,0057
Radius Ratio	1,466306 SE± 0,03705	1,61763 SE± 0,0352
Roundness	1,058178 SE± 0,00728	1,07539 SE± 0,0006
FRedN	1,024268 SE± 0,00346	1,03121 SE± 0,0025
Cluster	1 SE± 0	1 SE± 0
IOD	15933,2 SE± 303,9761	11263,11 SE± 725,7545
Feret (min)	10,0986 SE± 0,15098	8,16680 SE± 0,24212
Feret (max)	13,12179 SE± 0,179486	11,49787 SE± 0,30561
Feret (mean)	11,72303 SE± 0,12374	9,96958 SE± 0,2650
Margination	0,331181 SE± 0,00214	0,32975 SE± 0,0036
Heterogeneity	0,309498 SE± 0,01793	0,30783 SE± 0,0281
Clumpiness	0,349468 SE± 0,01784	0,30419 SE± 0,0322

Valores com diferença estatística * e **, $p < 0.05$. T- test para Area, Diameter Max e Diameter min. Mann-Whitney Rank Sum Test para Diameter mean e Tukey para perimeter.

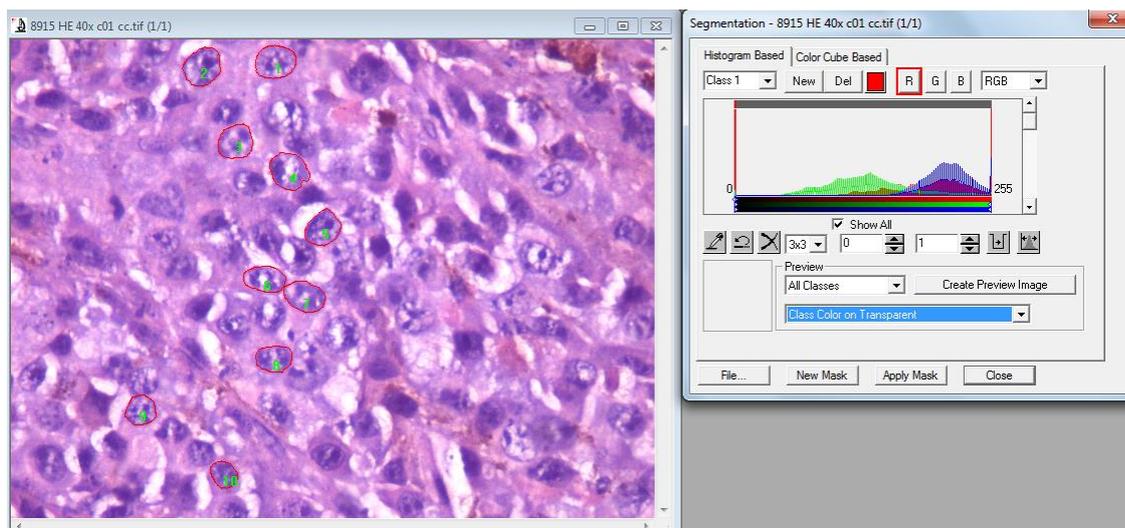


Figura 18 - Ilustração de uma das abordagens para mensuração morfométrica no Image Plus, do campo 01 da linhagem mais metastática B16F10.

6.5 – Perfil de Marcação de Mitocôndrias Através da sonda Mito-Tracker Green

Considerando resultados iniciais, do nosso grupo, que mostraram ativação das bombas V e F ATPase, principalmente na linhagem mais metastática e o interesse de investigar de forma mais profunda o perfil do metabolismo das linhagens e tumores de melanoma com diferentes potenciais metastáticos, buscamos inicialmente verificar o padrão de marcação de mitocôndrias nas linhagens de macrófago transformado J774 A₁, usado como controle bioquímico positivo por expressar fisiologicamente a V-ATPase na membrana plasmática, e ainda as linhagens de melanoma murinho B16F10, mais metastática, e B16F0, menos metastática. Com a utilização da sonda Mito Tracker Green, podemos observar na figura 19, o perfil de marcação de mitocôndrias nas linhagens controle J774 A₁ (A), onde observamos sinal menos intenso e de forma mais pontual, na linhagem de melanoma mais metastático B16F10 (B) observamos um sinal mais evidente e disseminado, corroborando, preliminarmente, com dados iniciais de atividade enzimática aumentada da F-ATPase e ainda com as características de mais metastática e com metabolismo mais acelerado, e na linhagem de melanoma menos metastático B16F0 (C) observamos também sinal disseminado, porém menos intenso comparado com a linhagem mais metastática B16F10 (B). A partir desses resultados, buscamos aprofundar as investigações em relação à morfologia e atividade enzimática mitocondrial das linhagens e também dos tumores induzidos.

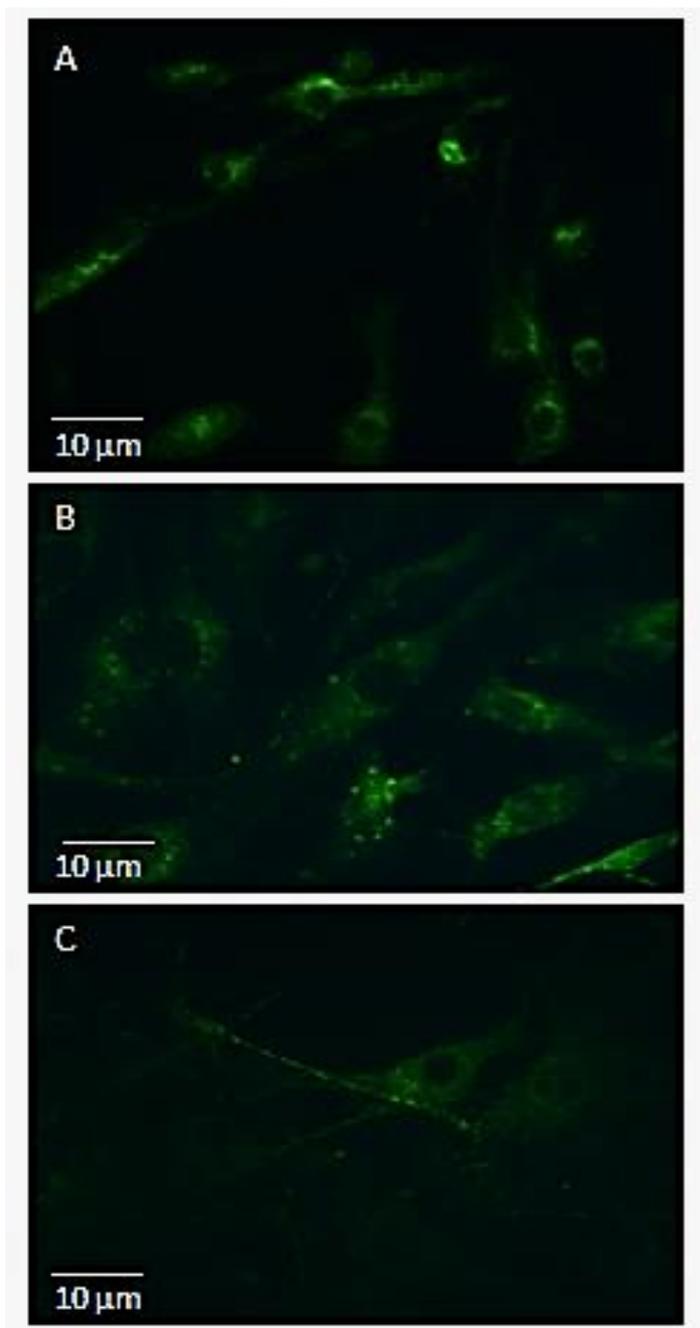


Figura 19- Fotomicrografias das linhagens celulares estudadas após incubação de 40 minutos com sonda mito-tracker a 100 nM em DMEM sem soro. Observamos, em A linhagem de macrófago transformada J774 A₁, em B linhagem de melanoma murino mais metastática B16F10 e em C linhagem de melanoma murinho menos metastática B16F0.

6.6-Ultraestrutura das Linhagens B16F0 e B16F10

A partir dos resultados do perfil de marcação mitocondrial, buscamos investigar a morfologia das linhagens estudadas, para tentar elucidar diferenças morfológicas que possam refletir nas diferenças funcionais, bioquímicas e metabólicas de forma geral, assim como buscamos elucidar os mecanismos de funcionamento, sinalização e localização destas bombas de prótons nas linhagens e tumores induzidos.

A Figura 20 mostra fotomicrografias de ultraestrutura da linhagem menos metastática B16F0, em A, observamos duas células com presença de mitocôndrias, em B e F, células com presença de mitocôndrias próximas ao núcleo da célula, em C e D, observamos presença abundante de melanossomos e em E, observamos maior detalhe das mitocôndrias, podendo ver as cristas.

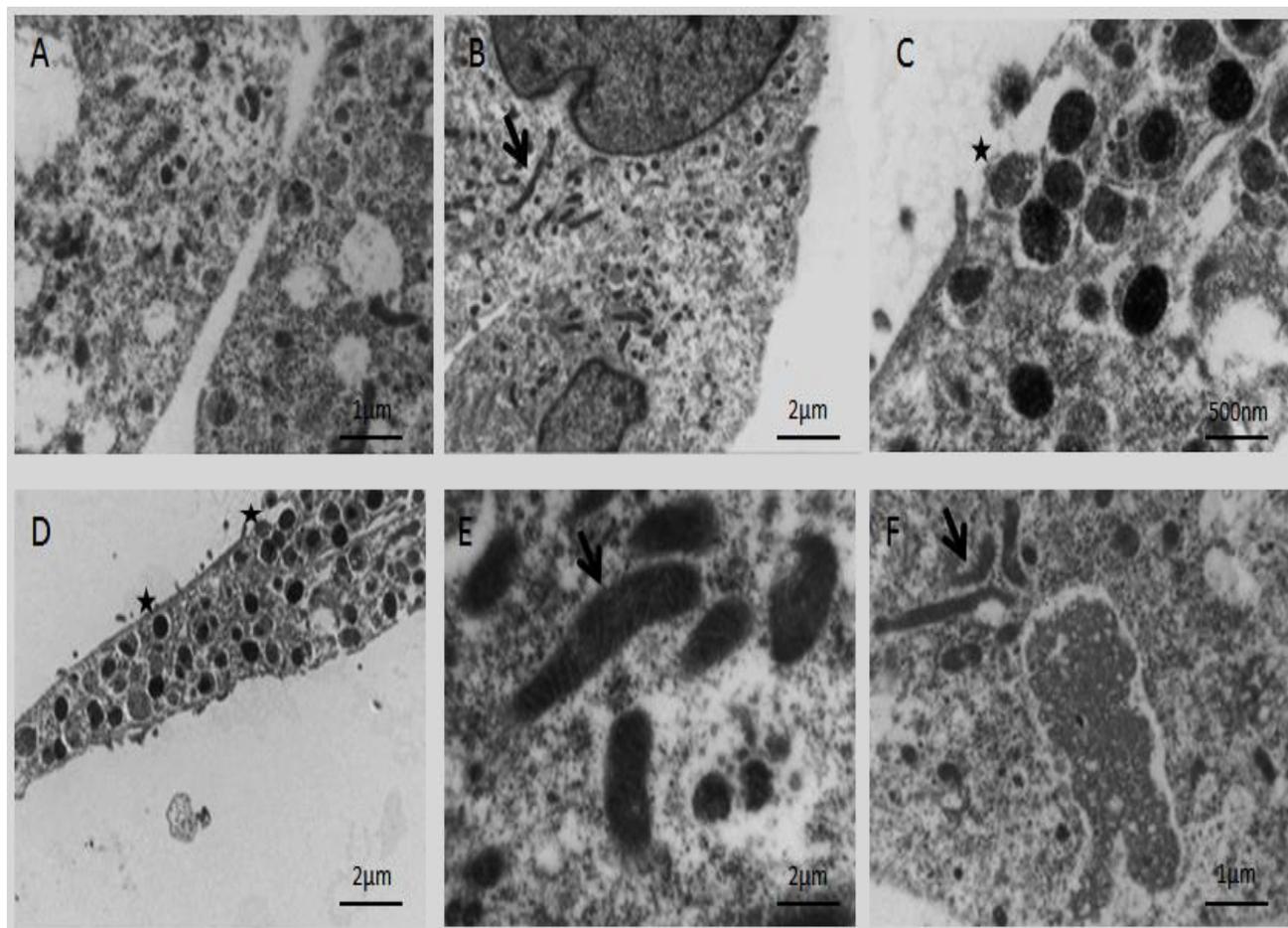


Figura 20- Fotomicrografias da linhagem celular de melanoma murino B16F0 (MET) – em A, B e F células mitocôndrias que se encontram com diferentes formatos e próximas ao núcleo (B e F, indicadas pela seta preta), em B e F as mitocôndrias estão próximas ao núcleo (setas pretas). Em C e D, presença abundante de melanossomos (estrelas) e em E detalhes das mitocôndrias, evidenciando suas cristas (seta preta).

A figura 21 mostra, com maiores detalhes, a presença de melanossomos ao longo do citoplasma da linhagem B16F0, em A, e em B podemos observar a presença de algumas mitocôndrias.

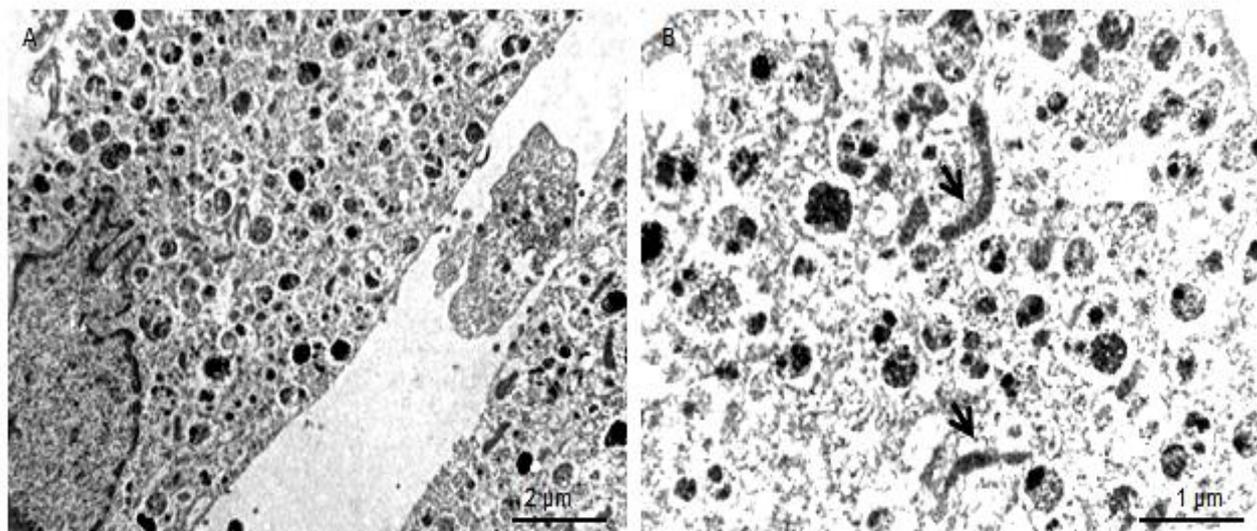


Figura 21- Fotomicrografias da linhagem celular de melanoma murino B16F0 mostrando maiores detalhes da célula. Em A, inúmeros melanosossomos no citoplasma e em B, melanosossomos e também algumas mitocôndrias vermiformes (setas pretas). Em A, aumento de 3000X e em B aumento de 7000 X.

A figura 22 mostra fotomicrografias de ultraestrutura da linhagem mais metastática B16F10, em que observamos em A célula com grande núcleo, em B presença de mitocôndrias e abundância de polirribossomos, o que condiz com o perfil de alta atividade metabólica desta linhagem, em C acúmulo de vesículas ricas em mitocôndrias, não ainda visto na literatura, em D acúmulo de vesículas sendo englobado pela célula, em E, fímbrias emitidas por essa linhagem envolvendo vesículas na periferia e em F detalhes da célula emitindo fímbrias.

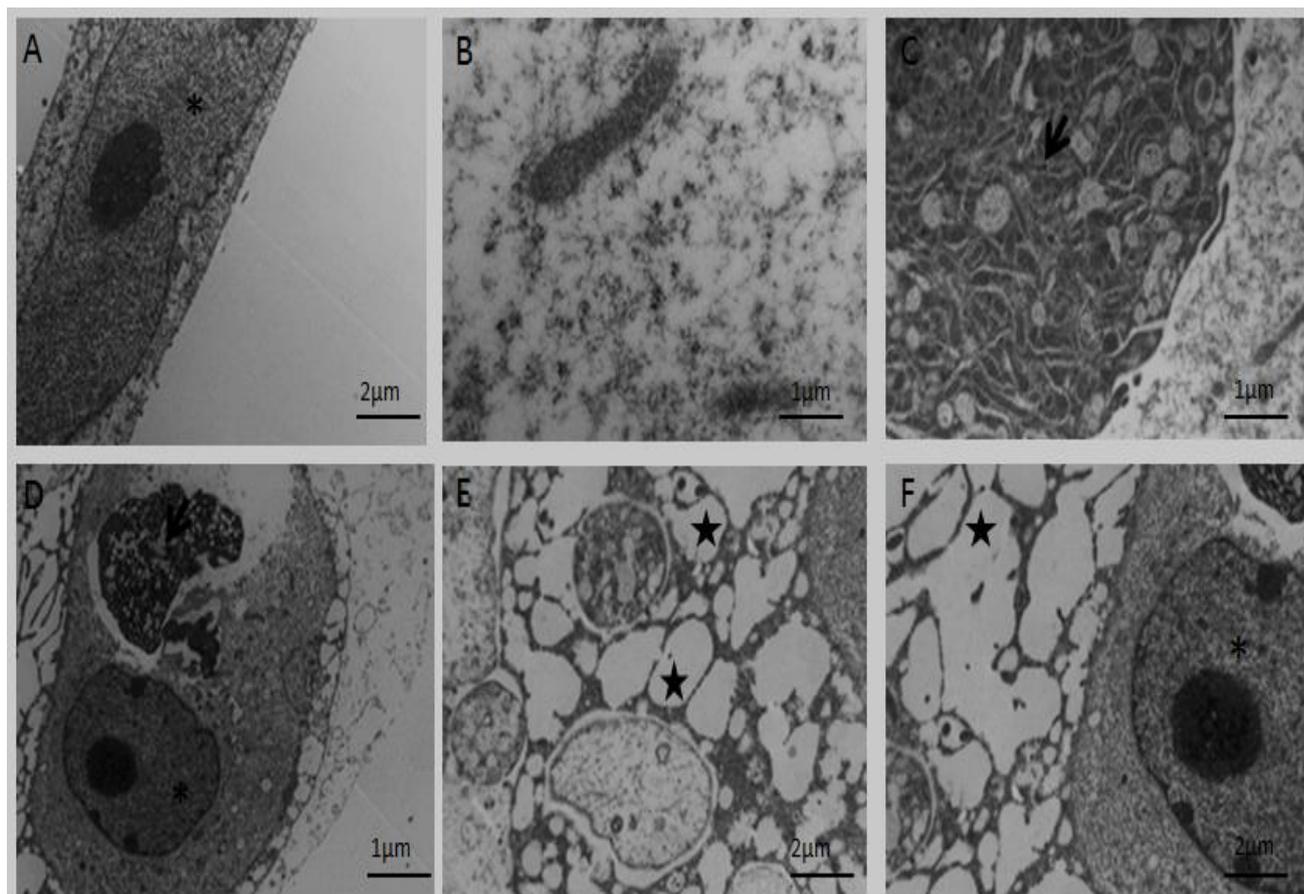


Figura 22- Fotomicrografias da linhagem de melanoma murino B16F10 (MET)- em A célula com núcleo bastante aumentado (asterisco), em B mitocôndrias e presença abundante de polirribossomos, em C e D aglomerados de vesículas ricas em mitocôndrias (setas pretas), em F fímbrias emitidas de uma das células e em E essas fímbrias envolvendo vesículas (estrelas).

A figura 23 mostra, em A, mitocôndrias e polirribossomos na linhagem mais metastática B16F10 e em B detalhes maiores das mitocôndrias que possuem formatos variados e grande tamanho com as cristas evidenciadas, e presença abundante de microfilamentos dispersos no citoplasma, essa micrografia sugere hiperplasia mitocondrial que foi observada apenas na linhagem mais metastática B16F10.

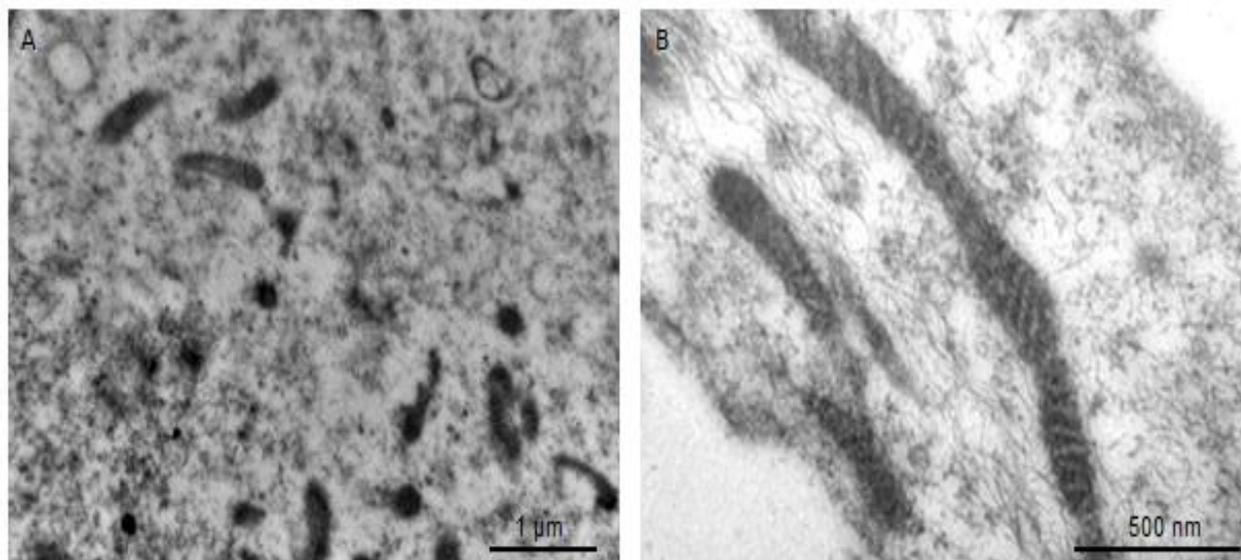


Figura 23- Fotomicrografias da linhagem de melanoma murino B16F10 mostrando maiores detalhes da célula. Em A, muitas mitocôndrias com diferentes formatos e em B microfilamentos ao longo de todo citoplasma celular e a presença de mitocôndrias vermiformes e bem aumentadas.

6.7- Ultraestrutura dos Tumores das Linhagens B16F0 e B16F10

Para avaliar a morfologia dos tumores e comparar com os achados observados na microscopia óptica e na ultraestrutura das linhagens em cultura, foi feita preparação para microscopia eletrônica de transmissão dos tumores. A Figura 24 mostra fotomicrografias da linhagem menos metastática B16F0, onde observamos várias células com núcleos aumentados e presença de vesículas pigmentadas, melanossomos, na periferia tanto em A quanto em B, assim como observamos na linhagem B16F0 presença de melanossomos presentes na periferia das células.

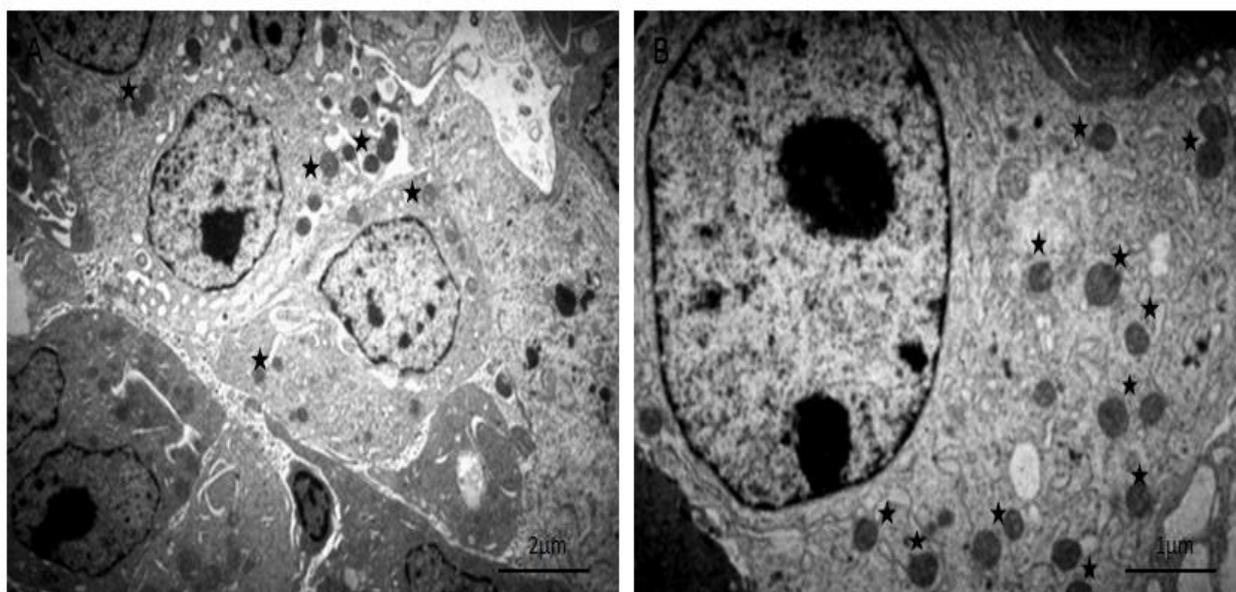


Figura 24- Fotomicrografias do melanoma epitelióide cutâneo ulcerativo em camundongos C57Bl

(B16F0), em A e B, células com núcleos aumentados e também presença de melanossomos próximos da periferia.

A Figura 25 mostra fotomicrografias da linhagem mais metastática de melanoma B16F10, em A podemos observar presença abundante de mitocôndrias próximas ao núcleo e em formato vermiforme, e em A e B, células com núcleos bem aumentados, característica típica de células carcinogênicas e mais anaplásicas e ainda presença de vários nucléolos.

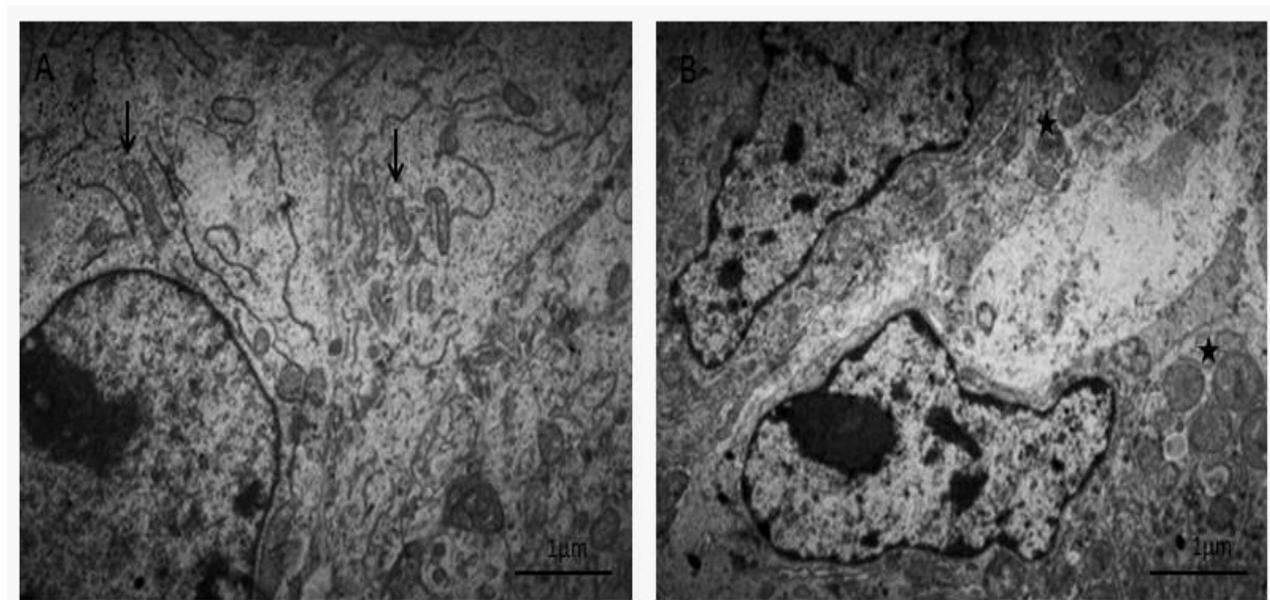


Figura 25- Fotomicrografias do melanoma epitelióide cutâneo ulcerativo em camundongos C57Bl (B16F10), em A presença de mitocôndrias próximas ao núcleo (setas) e em A e B, núcleo aumentado com vários nucléolos. Em B, presença de vesículas próximas à periferia (estrelas).

6.8- Consumo de O₂

Para continuar avaliando a participação ativa das mitocôndrias na energética tumoral e começar a estabelecer a idéia de que o modelo de melanoma em estudo não é um tumor extritamente glicolítico pelo fato de apresentar número bem aumentado de mitocôndrias principalmente na linhagem mais metastática, foram medidas as taxas de consumo de oxigênio, já que a respiração também é um importante marcador da atividade mitocondrial. O gráfico apresentado abaixo, na figura 26, representa a taxa de consumo de oxigênio feito pelas linhagens J774A₁, B16F0 e B16F10, respectivamente.

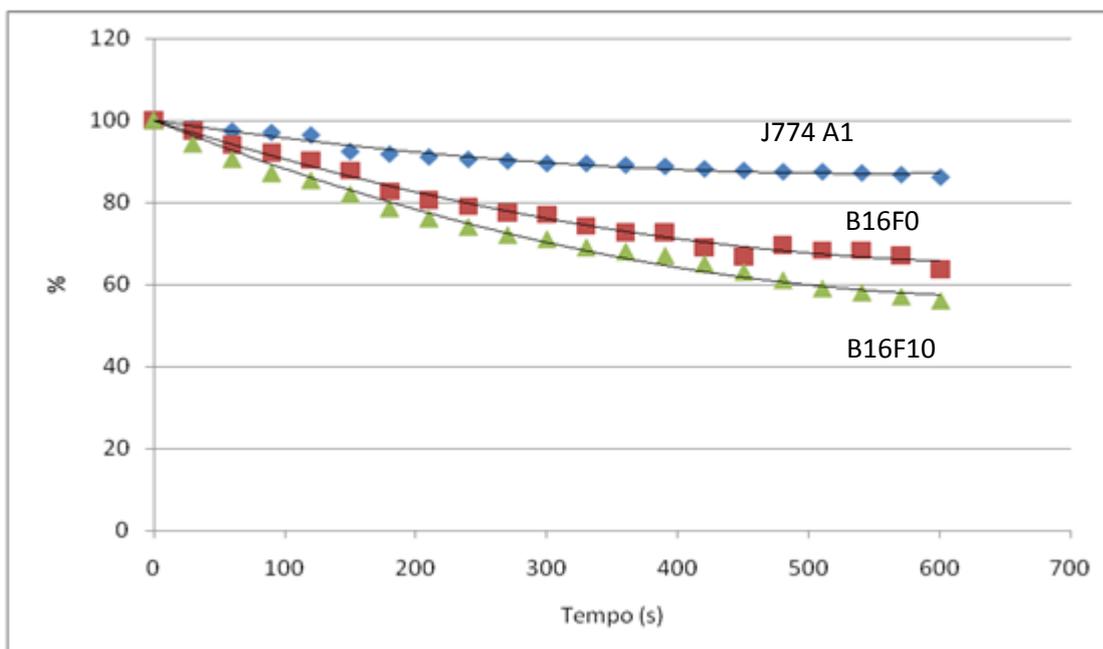


Figura 26- Gráfico representando os registros do consumo de oxigênio feito por células da linhagem controle não tumoral J774A₁ (losangos azuis), pela linhagem tumoral menos metastática B16F0 (quadrados vermelhos) e pela linhagem tumoral mais metastática B16F10 (triângulos verdes). Cada ponto do gráfico representa a porcentagem de queda na concentração de oxigênio (Y) a cada 30 segundos (X), a partir do tempo 0 (n=3).

A partir deste gráfico, foram feitos cálculos para se obter a taxa de consumo aproximado de oxigênio na base de porcentagem por minuto. Os valores obtidos de cada linhagem são: 2%/min pela J774A₁, 7%/min pela B16F0 e 9%/min pela B16F10.

6.9- Colocalização de mitocôndrias e Hexoquinase-2

Com base nesse aumento do número de mitocôndrias e ainda considerando que alguns tipos de tumores possuem expressão aumentada da Hexoquinase-2, que se encontra acoplada à membrana externa da mitocôndria, permitindo otimização da utilização dos metabolismos glicolítico e oxidativo, buscamos investigar se esta isoforma está expressa no modelo de melanoma e ainda colocalizar com a marcação de mitocôndria usando a sonda Mitotracker. Então, na figura 27 podemos observar a presença da hexoquinase-2 e sua colocalização com as mitocôndrias das linhagens de melanoma murino menos metastática B16F0 e mais metastática B16F10. Em A e D, podemos observar as células B16F10 (A) e B16F0 (D) em DIC, em B e E, podemos observar a colocalização entre Hexoquinase-2 e Mitotracker em fluorescência e o núcleo das células é evidenciado em azul pela marcação do DAPI, onde vemos a linhagem mais metastática B16F10 (B) e menos metastática B16F0 (E)

e em C e F, observamos a colocalização em fluorescência, onde vemos a linhagem mais metastática B16F10 (C) e menos metastática B16F0 (F). Em ambas as linhagens (B16F10 em C) e (B16F0 em F) o sinal de fluorescência emitido em sobreposição (mitocôndrias com hexoquinase-2) se encontra concentrado ao redor do núcleo destas células, assim como observamos por MET presença de mitocôndrias ao redor do núcleo. Com base nisto, levantamos a hipótese de que existem mitocôndrias nestas células que possuem a hexoquinase-2 ligada e mitocôndrias que não possuem. Logo, ainda deve, possivelmente, haver expressão da isoforma 1 da hexoquinase nestas células. Como vemos nas imagens supracitadas, as mitocôndrias que possuem a hexoquinase-2 ligada à sua membrana estão concentradas ao redor do núcleo e as demais que não possuem a enzima, estão dispersas por todo o citoplasma. Sugerimos então que as mitocôndrias que possuem a hexoquinase-2 ligada, são mitocôndrias especializadas na produção de ATP e subsequentemente de glicose-6-P (sintetizados pelo megacomplexo ATP Sintassoma) para alimentarem as vias de biossíntese no interior do núcleo e dos retículos liso e rugoso, nestas células que se encontram em constante proliferação.

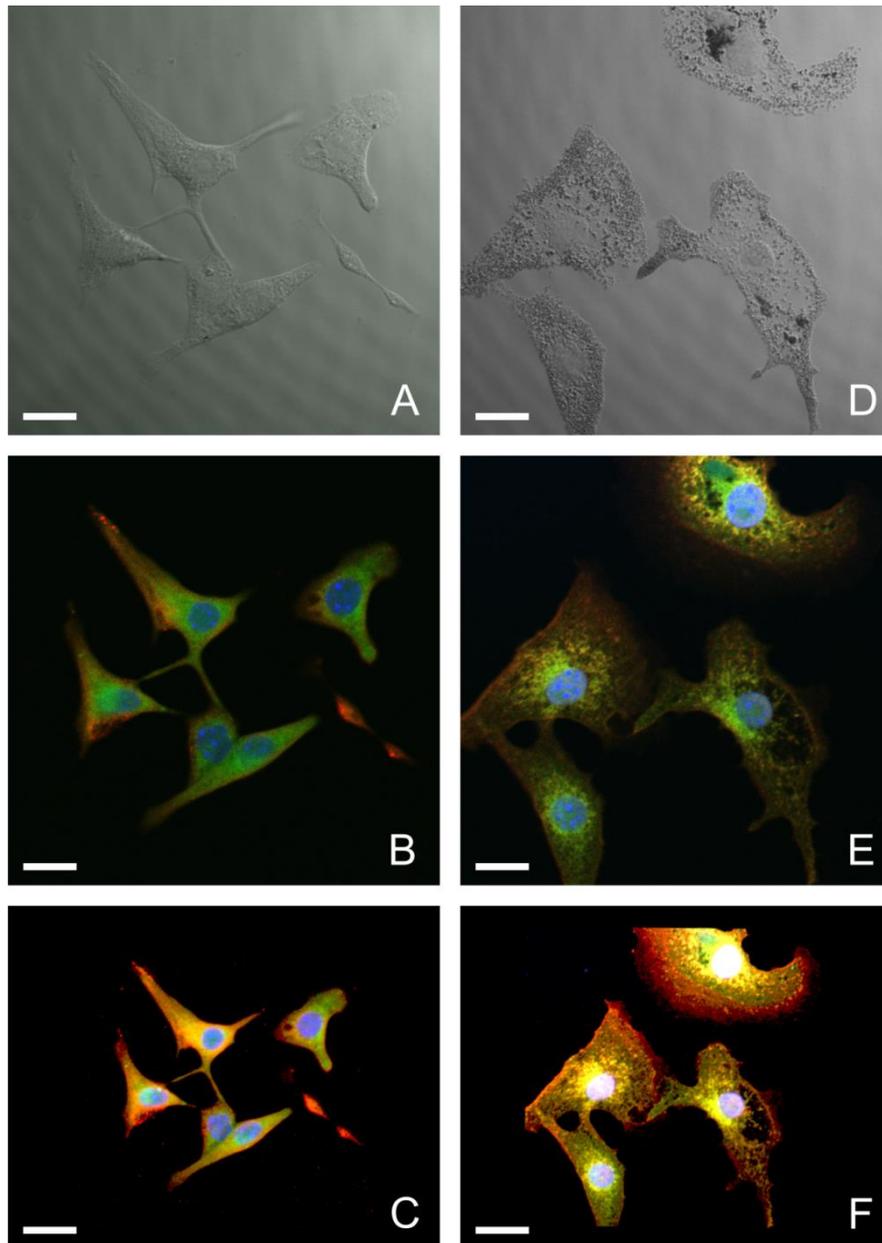


Figura 27- Células marcadas com anticorpo primário monoclonal anti hexoquinase-2 ligado a um anticorpo secundário anti mouse com Alexa 546 nm (vermelho) e com mitotracker 488 nm (verde). Em (A) e (D), os DICs da B16F10 e da B16F0, respectivamente. Em (B) e (E), a fluorescência da B16F10 e da B16F0, respectivamente. Em (C) e (F), a fluorescência da B16F10 e da B16F0, respectivamente. As regiões amarelo-alaranjadas são resultantes da sobreposição do vermelho com o verde, evidenciando a colocalização da HK-2 com as mitocôndrias. Barra de 10 μ m.

6.10- Atividades Enzimáticas

Foram feitos fracionamentos celulares das linhagens celulares J774 A₁, B16F10 e B16F0 e também dos tumores das linhagens de melanoma com diferentes potenciais metastáticos B16F10 e B16F0, após incubação com meios de incubação com e sem glicose. Nessa seção o foco foi estudar a atividade de V e F-ATPase tanto nas linhagens quanto em tumores e avaliar se a glicose promove ativação. E também a Na⁺-K⁺-ATPase nos tumores das linhagens menos metastática B16F0 e mais metastática B16F10.

A figura 28 mostra o gráfico da média das velocidades iniciais da F-ATPase comparando as linhagens de macrófago J774 A₁, melanoma muito metastático B16F10 e melanoma pouco metastático B16F0, após incubação com meios com e sem glicose, onde podemos observar ativação da F-ATPase por glicose apenas na linhagem controle de macrófago transformado J774 A₁, o que à princípio pode sugerir que as linhagens tumorais podem estar trabalhando com glicose num limiar de saturação, e com isso para a hidrólise a glicose não estimulou a bomba nas linhagens tumorais, como ocorreu na linhagem de macrófago controle.

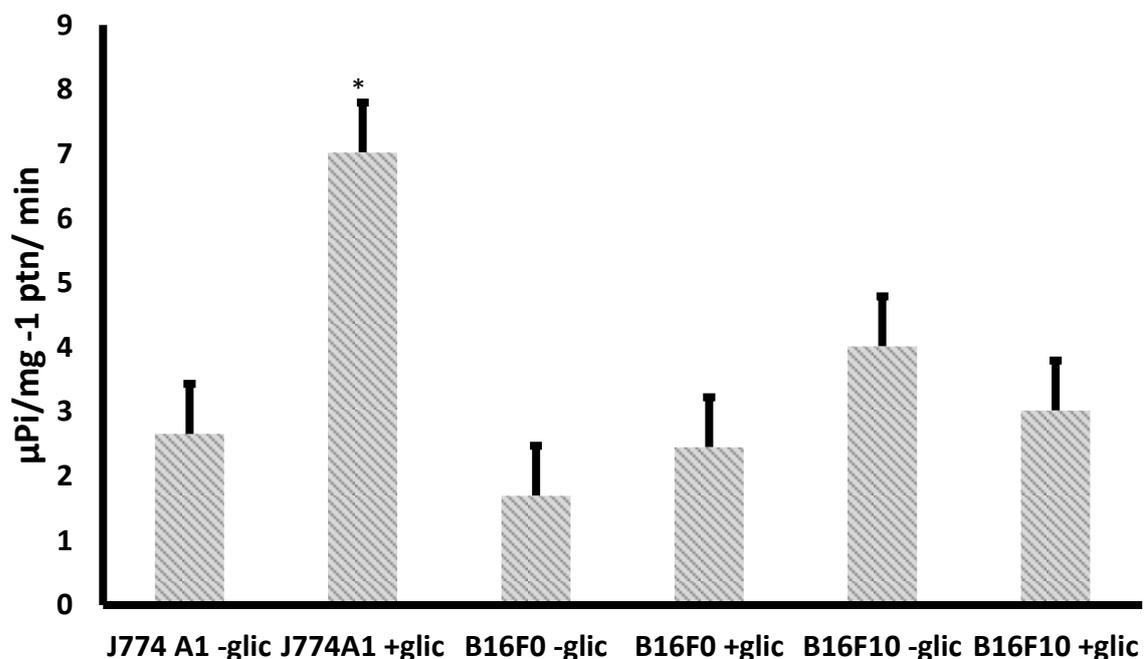


Figura 28 - Média das velocidades iniciais da atividade específica de F-ATPase azida sódica (0,5 mM) sensível, com incubação com meios com e sem glicose, nas linhagens controle de macrófago transformado J774 A₁, melanoma murino mais metastático B16F10 e melanoma murinho menos metastático B16F0.

metastático (B16F0). \pm SE. $n= 4$. Meio de reação contendo: Tampão Tris-HCl pH 8,0, Sulfato de Magnésio 1mM, Vanadato 0,1 mM, Molibdato de Sódio 0,2 mM, ATP 1 mM e 0,05 mg/mL de proteína da fração mitocondrial bruta, * $p=0,03$.

A Figura 29, mostra a média da velocidade inicial da atividade específica azida sensível, de F-ATPase em tumores das linhagens de melanoma mais metastático B16F10 e melanoma menos metastático B16F0, onde observamos uma atividade hidrolítica de F-ATPase bem superior no tumor da linhagem mais metastática B16F10, sendo a diferença maior que 50% de ativação, em relação ao tumor menos metastático B16F0. Esse dado confirma resultados prévios do grupo que mostram ativação da F-ATPase na linhagem mais metastática de melanoma.

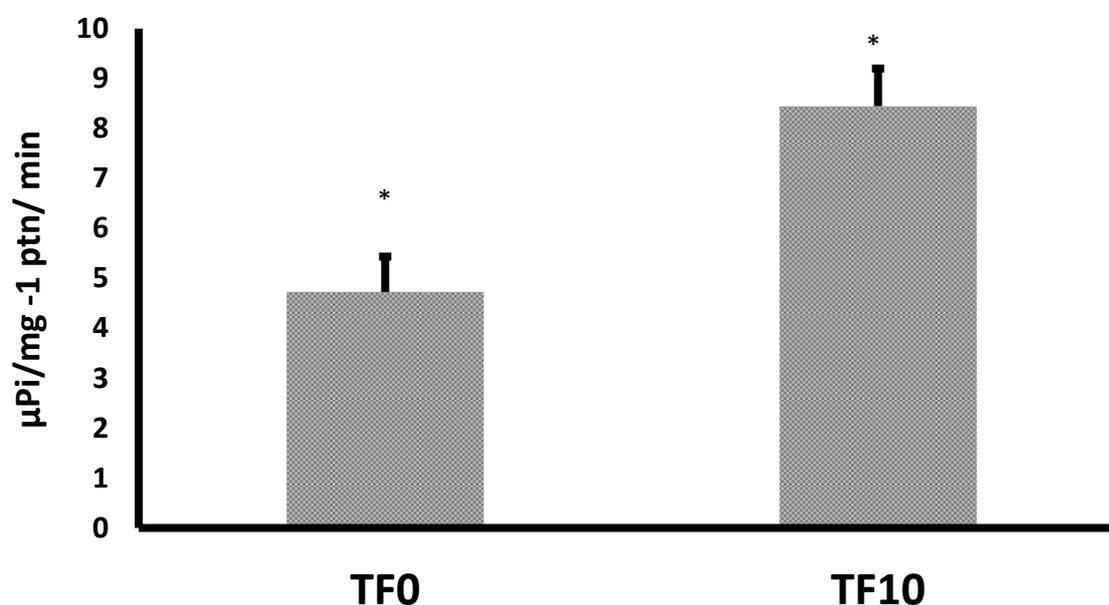


Figura 29- Média das velocidades iniciais da atividade específica de F-ATPase azida sódica (0,5 mM) sensível nos tumores das linhagens de melanoma mais metastático B16F10 (TF10) e menos metastático B16F0 (TF0). \pm SE. $n= 5$ (B16F10) e $n=3$ (B16F0). Meio de reação contendo: Tampão Tris-HCl pH 8,0, Sulfato de Magnésio 1mM, Vanadato 0,1mM, Molibdato de Sódio 0,2mM, ATP 1mM e 0,05 mg/mL de proteína da fração mitocondrial bruta. Dunn's Method * $p< 0.05$.

Para avaliarmos se em tumores ocorre ativação da F-ATPase pela glicose, foi feito fracionamento com incubação com meios com e sem glicose. E a figura 30, mostra o gráfico da média da velocidade inicial da atividade específica de F-ATPase azida sensível em tumores de melanoma murino das linhagens mais metastática B16F10 e menos metastática B16F0, após incubação com meios com e sem glicose. Onde foram avaliados três tumores de cada tipo celular (B16F10 e B16F0), e podemos observar que a glicose mais uma vez, assim como aconteceu com as

linhagens tumorais, não estimulou a atividade hidrolítica da F-ATPase em tumores, o que sugere que pode estar ocorrendo o mesmo que ocorreu na cultura de a glicose estar no limiar de saturação e com isso não haver estímulo com adição dela.

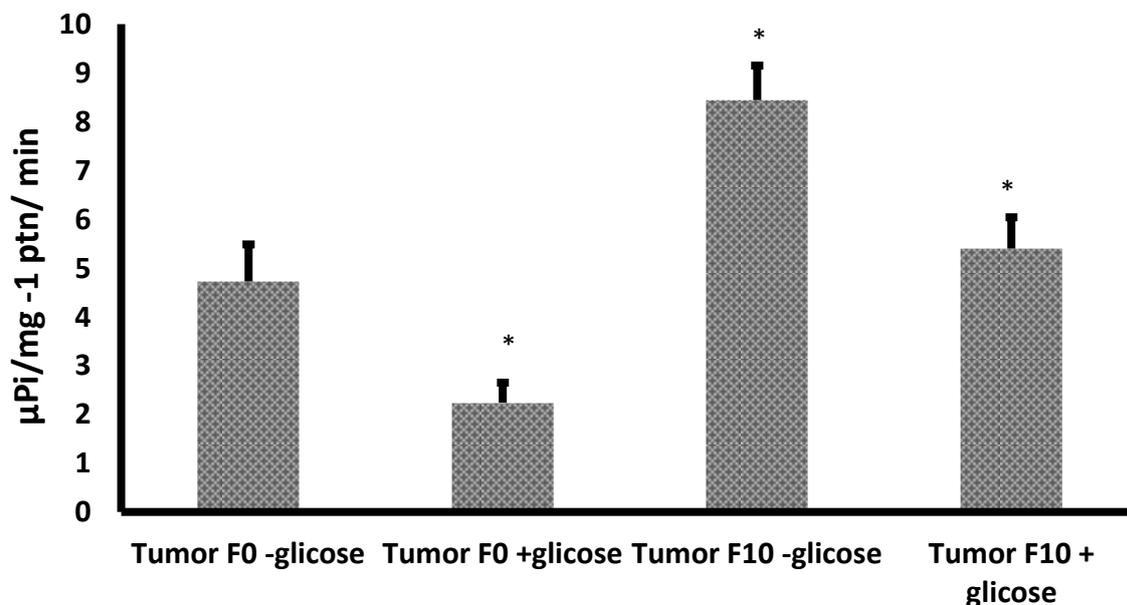


Figura 30- Média das velocidades iniciais da atividade específica de F-ATPase azida sódica (0,5mM) sensível, com incubação com meios com e sem glicose, dos tumores de melanoma murinho mais metastático B16F10 e menos metastático B16F0. \pm SE. n= 3. Meio de reação contendo: Tampão Tris-HCl pH 8,0, Sulfato de Magnésio 1mM, Vanadato 0,1 mM, Molibdato de Sódio 0,2 mM, ATP 1 mM e 0,05 mg/mL de proteína da fração mitocondrial bruta. ANOVA, * p<0.05.

E para investigar se ocorre ativação da V-ATPase por glicose nas linhagens estudadas foi feita incubação, pré-fracionamento, com meios com e sem glicose. A figura 31 mostra o gráfico da média de velocidade inicial da atividade específica de V-ATPase, concanamicina sensível, comparando as linhagens controle J774 A₁ e de melanoma mais metastático B16F10, onde podemos ver uma ativação por glicose em mais de 50% na linhagem controle de macrófago J774 A₁ e na linhagem de melanoma mais metastático B16F10 a atividade se manteve e não ocorreu ativação.

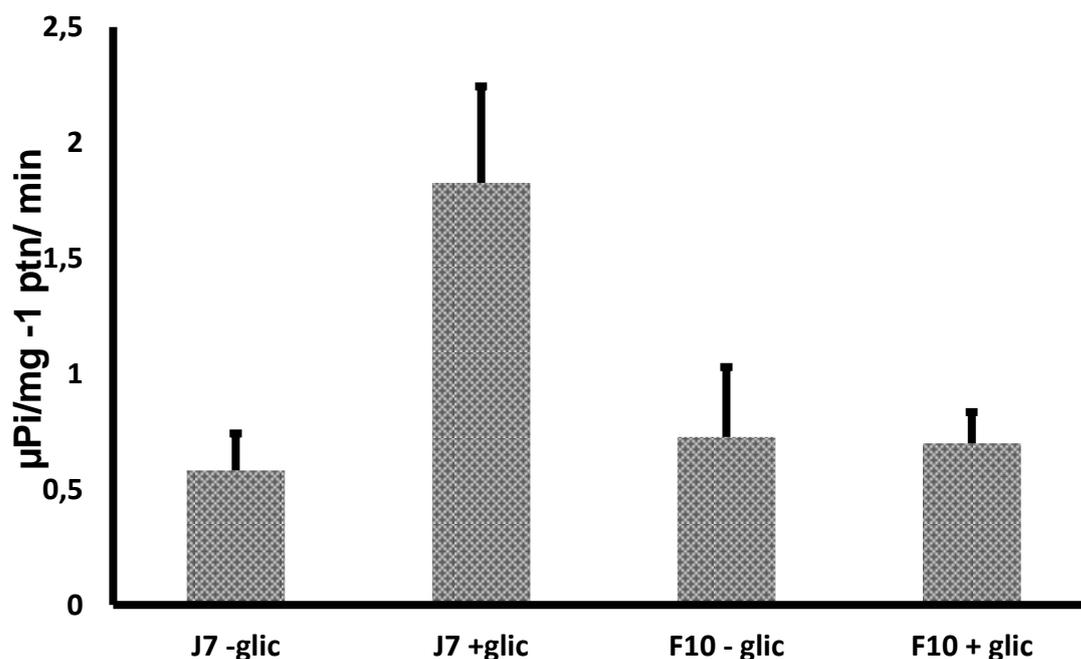


Figura 31 - Média das velocidades iniciais da atividade específica de V-ATPase, concanamina (5nm) sensível nas linhagens controle de macrófago J774 A₁ e na linhagem de melanoma mais metastático B16F10 (F10), após incubação com meios sem e com glicose. Meio de reação contendo: Tampão Hepes pH 7,0, Sulfato de Magnésio 1 mM, Azida 0,5 mM, Vanadato 0,1 mM, Molibdato de Sódio 0,2 mM, ATP 1mM e 0,05 mg/mL de proteína de membrana plasmática. ±SE. n= 3.

Também foi feita atividade de V-ATPase, após incubação com meios sem e com glicose, nos tumores derivados das linhagens de melanoma, para avaliar se a glicose ativa a bomba nos tumores. E a figura 32 mostra o gráfico da média de velocidade inicial da atividade específica de V-ATPase, concanamina sensível, nos tumores derivados das linhagens de melanoma murino menos metastático B16F0 e mais metastático B16F10, após incubação com meios sem e com glicose, onde podemos observar que o tumor menos metastático B16F0 sem glicose apresentou atividade superior em torno de 50% em relação ao tumor mais metastático B16F10, porém não apresentou ativação por glicose. E o tumor mais metastático B16F10 apresentou uma ativação por glicose superior a 50%, o que sugere que a glicose ativa a V-ATPase e esse mecanismo se mostrou mais pronunciado e mais relevante para o tumor mais metastático que possui metabolismo geral aumentado e também foi superior à atividade encontrada na célula mais metastática.

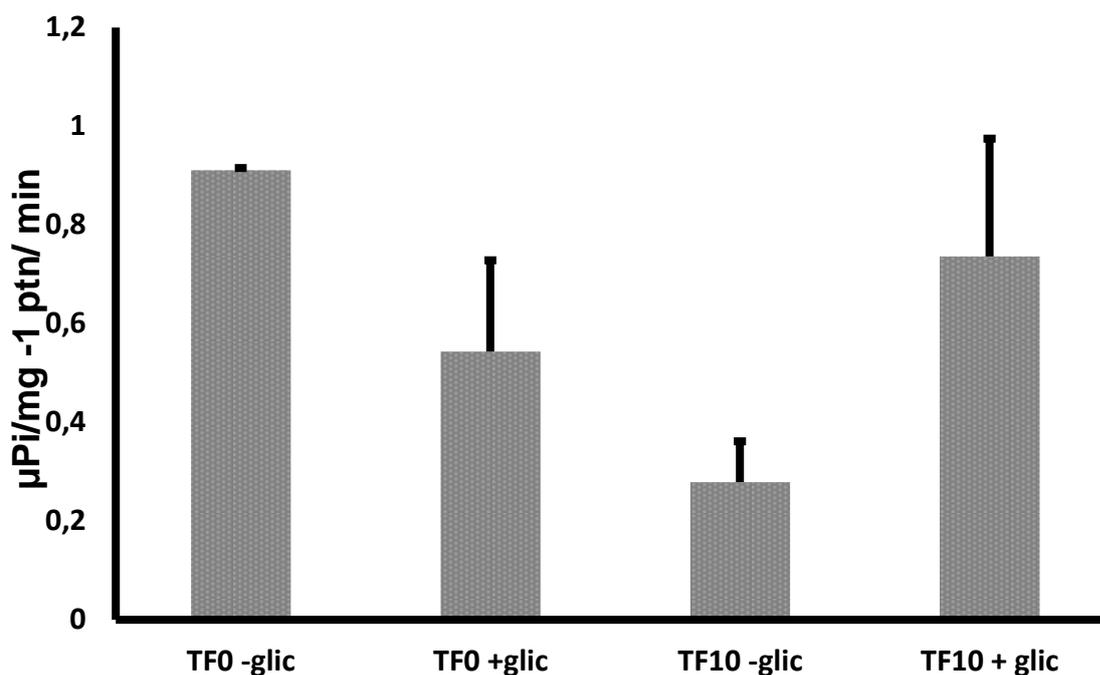


Figura 32- Média das velocidades iniciais da atividade específica de V-ATPase, concanamina sensível (5nm) nos tumores derivados das linhagens de melanoma murino menos metastático B16F0 e mas metastático B16F10, após incubação com meios sem e com glicose. Meio de reação contendo: Tampão Hepes pH 7,0, Sulfato de Magnésio 1 mM, Azida 0,5 mM, Vanadato 0,1 mM, Molibdato de Sódio 0,2 mM, ATP 1mM e 0,05 mg/mL de proteína de membrana plasmática. \pm SE. n=3.

Também foi avaliada a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nos tumores derivados das linhagens de melanoma menos metastático B16F0 e mais metastático B16F10, após incubação com meios sem e com glicose. E a figura 33 mostra o gráfico com a média da velocidade inicial da atividade específica da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ouabaína sensível, onde podemos ver uma atividade bem superior no tumor menos metastático B16F0 em comparação com a baixa atividade encontrada no tumor mais metastático B16F10 e ainda a glicose estimulou a atividade em ambos os tipos de tumores sendo que mesmo assim o tumor menos metastático continua com atividade superior comparado com o mais metastático. Esse resultado corrobora resultados prévios do grupo, nas linhagens estudadas, que mostram menor atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na linhagem menos metastática enquanto as linhagens controle e menos metastática possuem maior atividade desta enzima, o que reforça a hipótese de balanço inverso entre $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e V-ATPase nos tumores mais metastáticos, já que a V-ATPase tem se mostrado mais expressa e ativa e possivelmente assumindo o principal papel de

enzima mantenedora do potencial de ação nos tumores mais metastáticos, enquanto a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ tem se mostrado menos expressa e menos ativa.

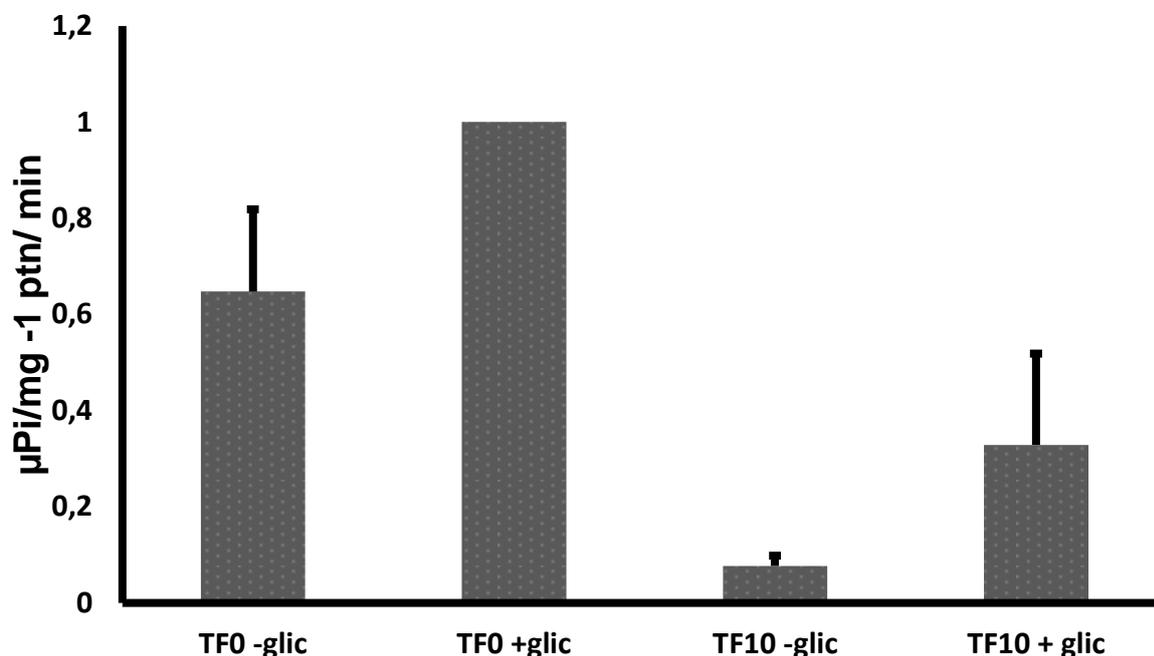


Figura 33- Média das velocidades iniciais da atividade específica da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, ouabaína sensível (1 mM) nos tumores derivados das linhagens de melanoma murino menos metastático B16F0 e mais metastático B16F10, após incubação com meios sem e com glicose. Meio de reação contendo: Tampão HEPES pH 7,0, Sulfato de Magnésio 1 mM, Azida 0,5 mM, Vanadato 0,1 mM, Molibdato de Sódio 0,2 mM, ATP 1 mM e 0,05 mg/mL de proteína de membrana plasmática. \pm SE. n=2.

6.11- Dot Blot – $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

Para dar continuidade às análises enzimáticas de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, onde encontramos maior atividade no controle J774A₁ e menor atividade na linhagem mais metastática de melanoma, foi feito um Dot Blot aplicando 10 μg de proteína de membranas totais das linhagens J774 A1, B16F0 e B16F10 (Figura 34), e em seguida foi feita análise quantitativa da expressão (Figura 35) e foi encontrado o mesmo padrão da atividade enzimática, com maior expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na linhagem controle J774 A1, expressão intermediária na linhagem menos metastática B16F0 e menor expressão na linhagem mais metastática B16F10. O dado mais uma vez confirma dados anteriores do grupo que mostram menor ativação da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na linhagem mais metastática enquanto foi observada maior ativação de V-ATPase nessa mesma linhagem.

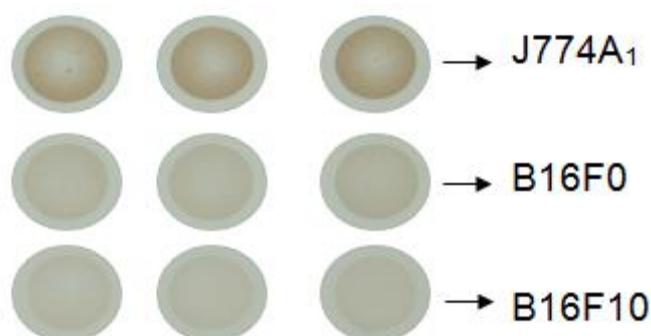


Figura 34- Dot Blot para subunidade α 1 da Na⁺-K⁺-ATPase - utilizando 10 μ g de proteína de membranas totais das linhagens J774 A1 macrófago transformado como controle, B16F0 melanoma murino pouco metastático e B16F10 melanoma murinho mais metastático. N=3.

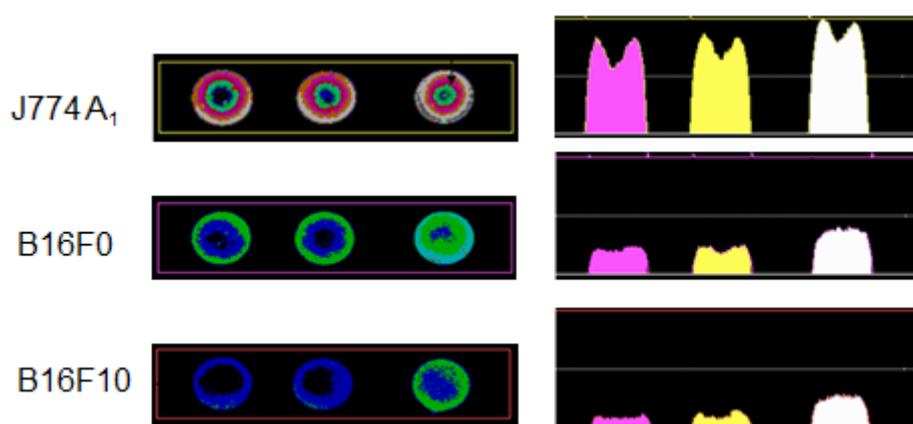


Figura 35 - Análise de expressão do Dot Blot para subunidade α 1 da Na⁺-K⁺-ATPase - utilizando 10 μ g de proteína de membranas totais das linhagens J774 A1 macrófago transformado como controle, B16F0 melanoma murino pouco metastático e B16F10 melanoma murinho mais metastático. N=3.

6.12- Monitoramento de Gradiente de Prótons

A partir da fração microsomal isolada, foi feito o experimento de monitoramento de gradiente de prótons para verificar o transporte de prótons pela V-ATPase das linhagens e tumores induzidos de B16F10, com e sem incubação com glicose (Figuras 36 a 38). Avaliamos o transporte de H⁺ realizado pela V H⁺-ATPase nas células mais metastáticas de melanoma (B16F10) e menos metastática (B16F0). Podemos ver na Figura 36 , a comparação entre as linhagens e como esperado a linhagem mais metastática (B16F10), teve uma atividade de transporte de H⁺ pela V H⁺-ATPase maior que 50% quando comparada a linhagem menos metastática (B16F0). Essa estimulação pode ser explicada, talvez pela capacidade altamente

agressiva dessas células visto que há uma maior demanda energética, de nutrientes e um aumento na capacidade de crescimento dessa linhagem. Ainda quando comparamos apenas o crescimento de ambas às linhagens, podemos notar que a linhagem mais metastática possui uma maior capacidade e velocidade de crescimento quando comparada a linhagem menos metastática. E esse maior transporte de prótons corrobora outros dados da literatura que mostraram ativação da V-ATPase em outros tipos de tumores, como câncer de mama, e esse maior transporte não só gera maior acidificação extracelular como pode estar colaborando como sinalização para rota metabólica.

Cerca de 45 - 60 dias após a inoculação da células no animais retiramos o tumores dos animais e fizemos o isolamento de membranas, a Figura 37 A mostra o transporte de H^+ realizado pela V H^+ -ATPase nas células do tumor da linhagem menos metastática (B16F0). Nas membranas isoladas desses tumores vemos que a glicose extracelular foi capaz de estimular a atividade realizada por essa enzima em 30% e 60% nas frações pesadas, que contém membrana plasmática e mitocôndrias, e leves que contém lisossomos, respectivamente (Figura 37 A).

Observamos a mesma tendência quando avaliamos a Velocidade Inicial realizada por essa enzima (Figura 37 B), onde a glicose estimulou 10% e 60% a atividade nas frações pesadas e leves, respectivamente.

Realizamos o isolamento de membranas dos tumores que foram induzidos por células da linhagem mais metastáticas (B16F10), e pudemos observar que a glicose assim como no isolamento de células foi capaz de estimular as atividades das V H^+ -ATPases apenas na fração pesada 50% (Figura 38 A).

Vemos a mesma tendência quando avaliamos a Velocidade Inicial realizada por essa enzima (Figura 38 B), onde a glicose estimulou 30% a atividade na fração pesada.

Então, com base nesses dados podemos observar que o transporte de prótons pela V-ATPase tanto na linhagem quanto no tumor mais metastático foi bem maior comparado à linhagem e tumor menos metastático e a glicose mostrou estimulação em ambos os casos tanto nos parâmetros de fluorescência máxima como no de velocidade inicial e também em ambas as frações estudadas, pesada e leve.

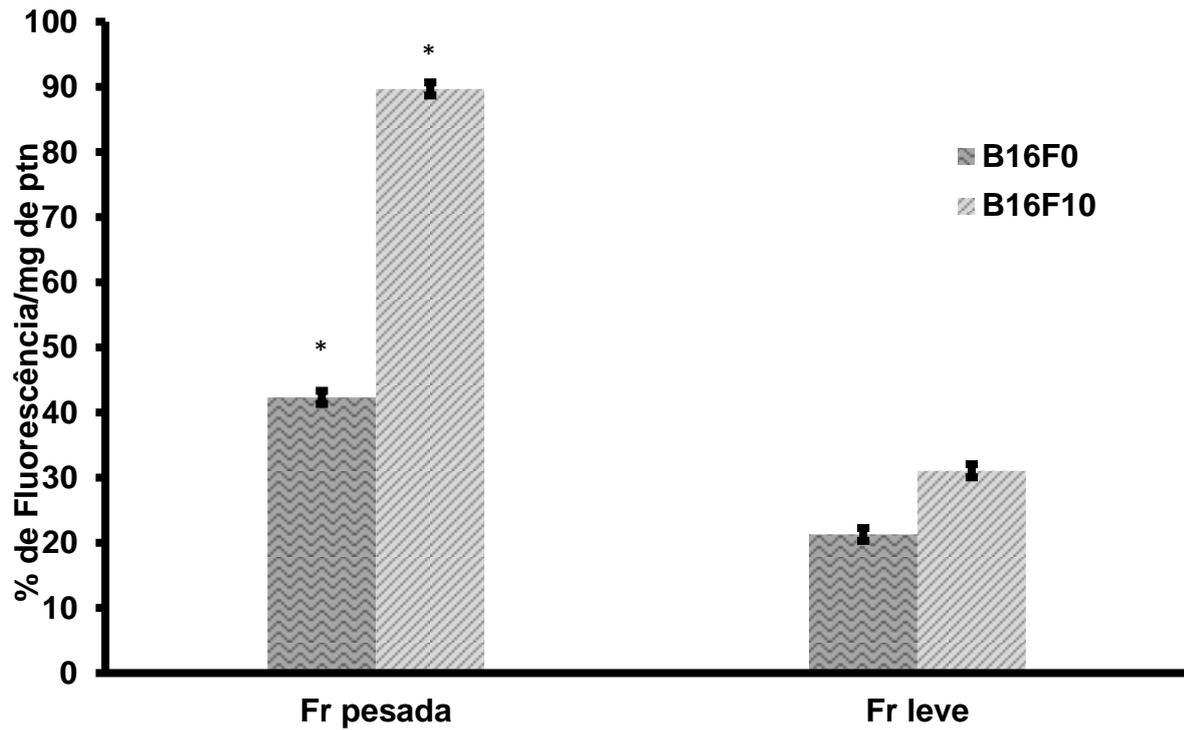


Figura 36- Transporte de H^+ em células de melanócito B16F0 e B16F10 sobre as $V H^+$ -ATPases. Atividade feita na presença de 1 mM ATP. Análise da Fluorescência Máxima (F_{max}). A atividade de V -ATPase foi determinada com 110 nM de concanamicina A (inibidor específico da $V H^+$ -ATPase). $n=3$, * $p<0,001$.

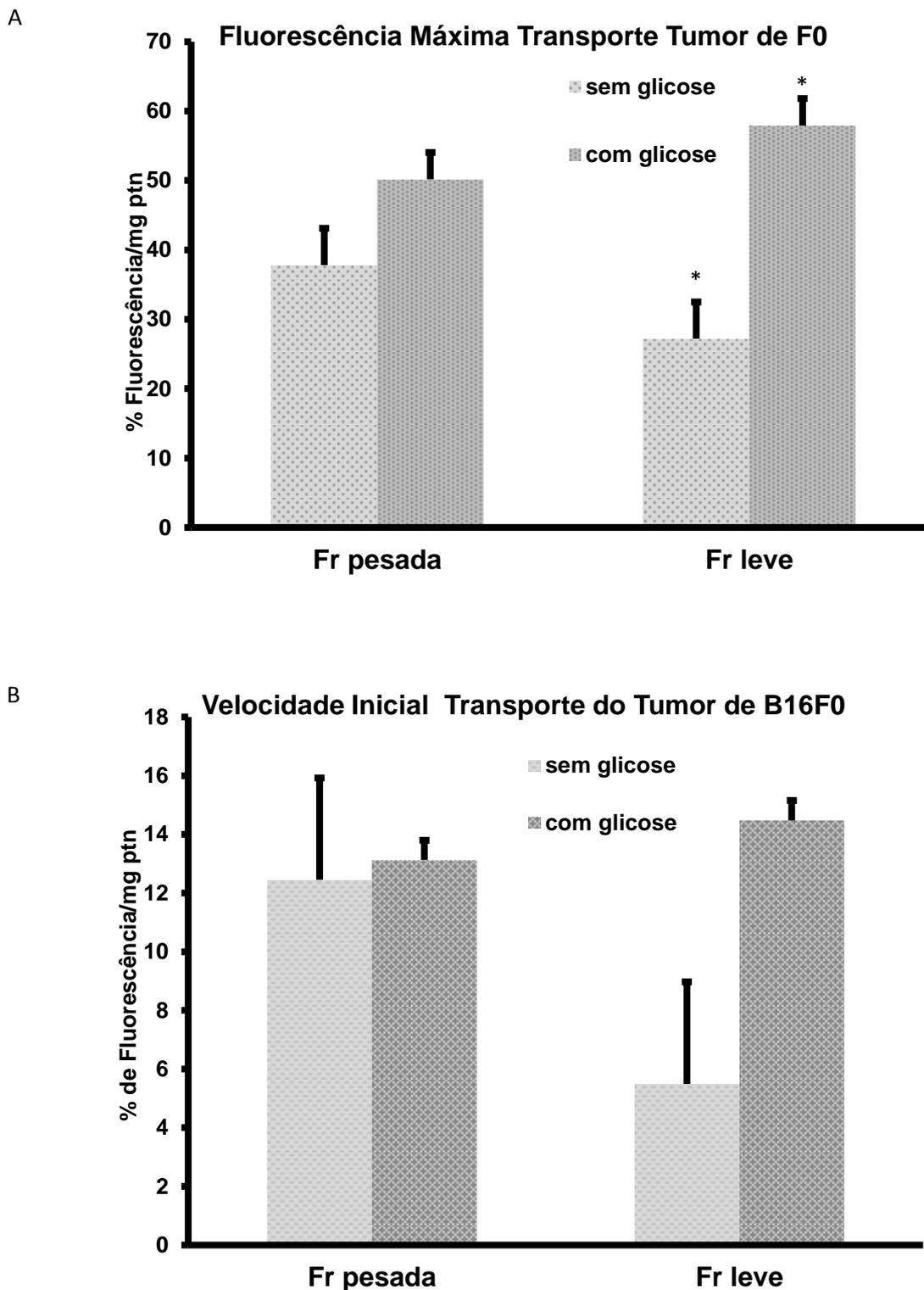


Figura 37- Transporte de H^+ em tumor sólido de melanoma menos metastático B16F0 e efeito da glicose extracelular sobre as $V H^+$ -ATPases. Atividade feita na presença de 1 mM ATP. Análise da A - Fluorescência Máxima (F_{max}) e B - Velocidade Inicial (V_0). A atividade de V -ATPase foi determinada com 110 nM de concanamina A (inibidor específico da $V H^+$ -ATPase). (Média de 2 experimentos). Em A * $p= 0,02$.

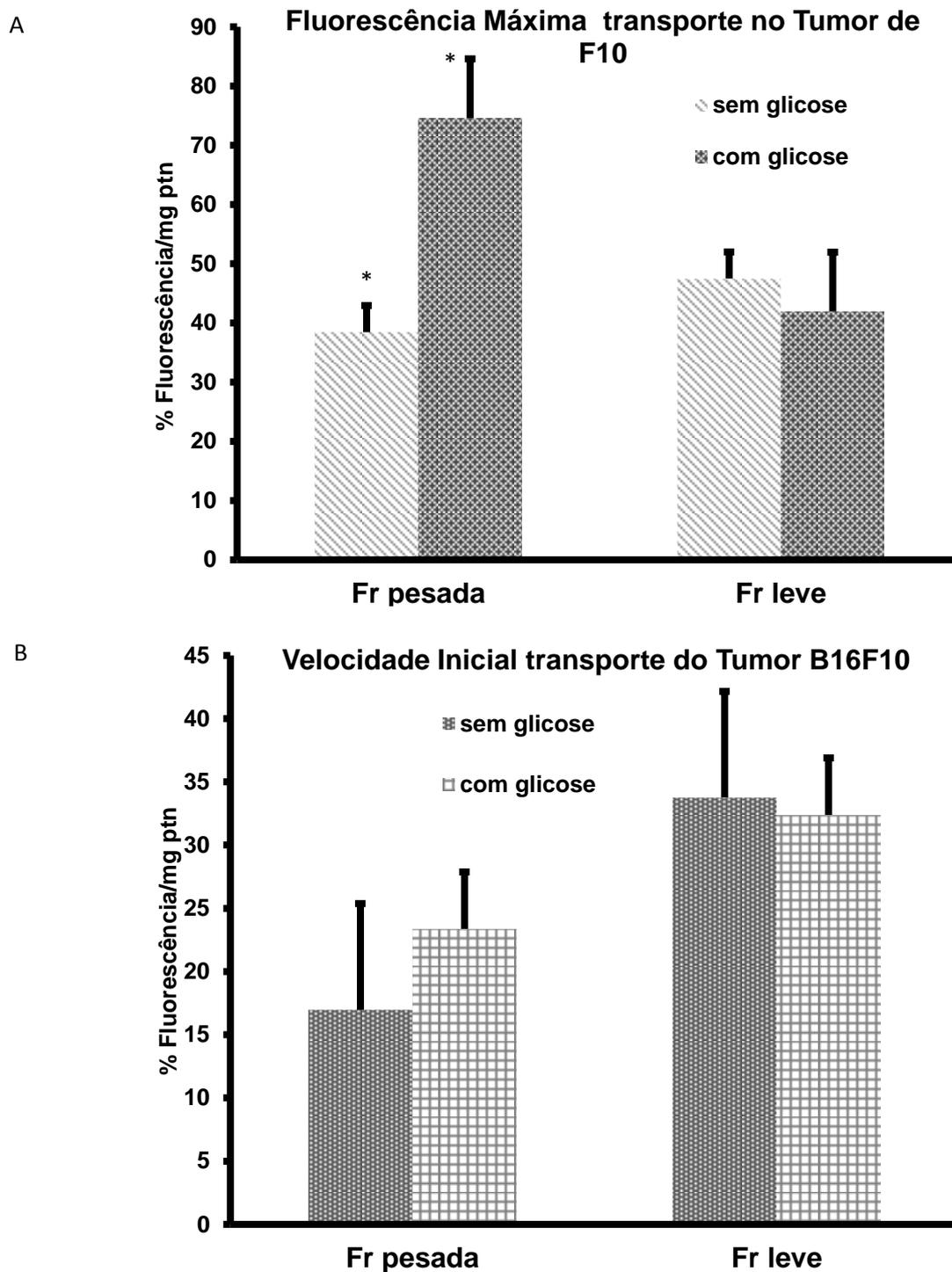


Figura 38- Transporte de H^+ de tumor sólido de melanoma mais metastático B16F10 e efeito da glicose extracelular sobre as $V H^+$ -ATPases. Atividade feita na presença de 1 mM ATP. Análise da A - Fluorescência Máxima (F_{max}) e B - Velocidade Inicial (V_0). A atividade de V -ATPase foi determinada com 110 nM de concanamina A (inibidor específico da $V H^+$ -ATPase). (Média de 4 experimentos). Em A * $p=0,02$.

Parte 2 – Resultados obtidos nas Linhagens de Câncer de Próstata – LNCAP, PC3, CL1, CL2, DU145 e Controle saudável de próstata RWPE-1

Primeiramente buscamos avaliar nas linhagens de próstata com diferentes potenciais metastáticos a atividade das bombas V-ATPase e Na⁺-K⁺-ATPase na fração purificada de membrana plasmática. No gráfico da figura 39 observamos a atividade específica bafilomicina sensível das linhagens de próstata estudadas e assim como foi observado em melanoma a linhagem mais metastática CL1 apresentou maior ativação desta bomba comparada com as outras linhagens estudadas, principalmente comparada à linhagem não metastática LNCAP que apresentou baixa atividade.

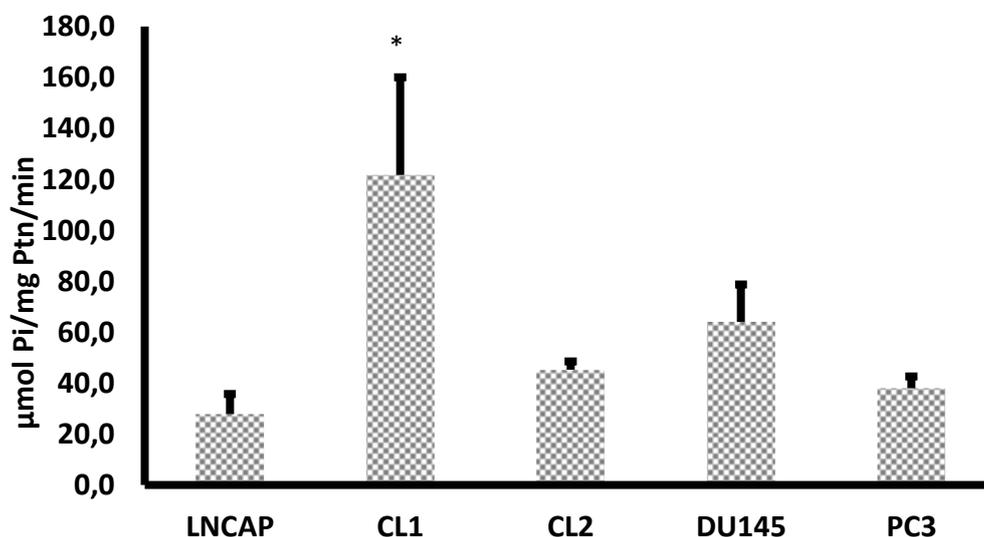


Figura 39- Atividade da V-ATPase na fração purificada de membrana plasmática, bafilomicina sensível (1 µM), por hidrólise de ATP, nas linhagens celulares de próstata onde temos CL1 como mais metastática, LNCAP como não metastática, DU145, PC3 e CL2 também metastáticas porém de forma intermediária e RWPE como controle saudável de próstata. O meio de reação contendo 3 mM ATP, 3 mM MgSO₄, 25 mM Tris-SO₄ pH 8,0, 5 mM NaN₃, 1 mM Ortovanadato de sódio, 3 mM MgCl₂, 1 µM ouabaína, água milique e como inibidor específico para detectar atividade sensível foi utilizada 1 µM bafilomicina. n=4, * p< 0,001.

No gráfico da figura 40, podemos observar a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase, ouabaína sensível, nas linhagens de próstata estudadas. E diferentemente do que observamos em melanoma não houve diferença entre ativação desta bomba na linhagem não metastática LNCAP e linhagem mais metastática CL1. Porém os níveis de ativação desta bomba foram menores comparados à atividade encontrada pela V-ATPase, o que corrobora dados obtidos em melanoma onde esta bomba mostra-se

menos ativa enquanto V-ATPase está mais ativa e parece ser a principal mantenedora de potencial de membrana e reguladora de pH nas linhagens tumorais.

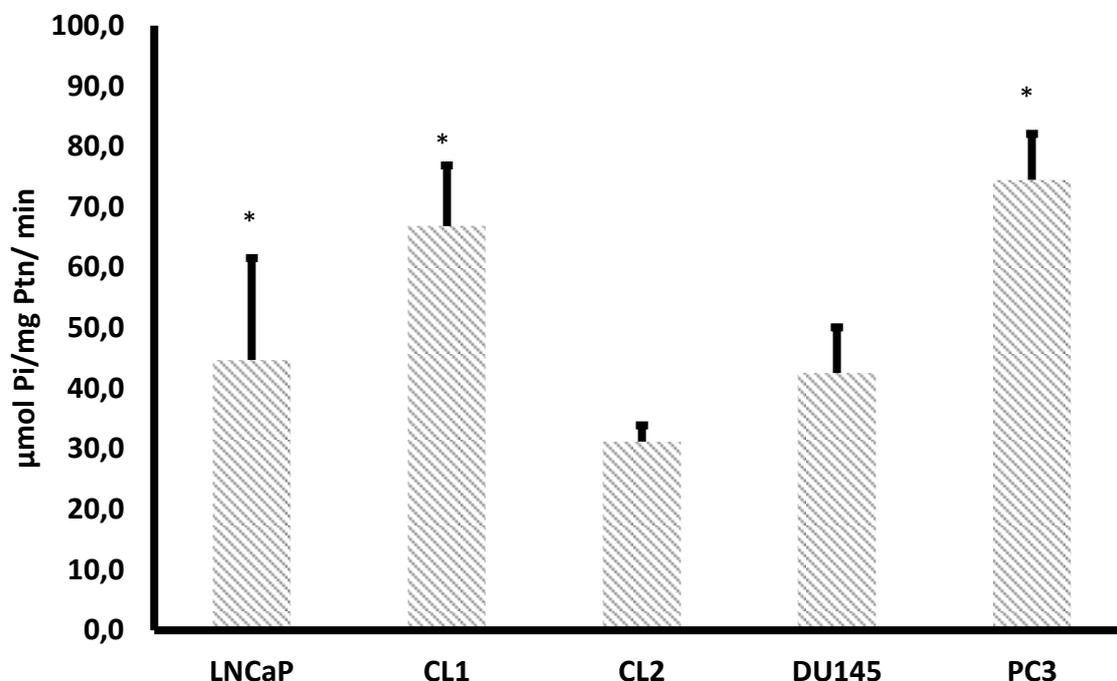


Figura 40- Atividade da Na-K-ATPase na fração de membrana plasmática purificada, ouabaína sensível, por hidrólise de ATP, nas linhagens celulares de próstata onde temos CL1 como mais metastática, LNCAP como não metastática, DU145, PC3 e CL2 também metastáticas porém de forma intermediária e RWPE como controle saudável de próstata. O meio de reação contendo 3 mM ATP, 3 mM MgSO₄, 25 mM Tris-SO₄ pH 8.0, 5 mM NaN₃, 1 mM Ortovanadato de sódio, 3 mM MgCl₂, 1 μM bafilomicina, água milique ouabaína.n=4, * p=0,03.

Buscamos também avaliar a atividade enzimática em diferentes frações, tais como a fração nuclear. E de forma inovadora, detectamos atividade de V-ATPase e Na⁺-K⁺-ATPase nessa fração e podemos observar o resultado da atividade de V-ATPase no gráfico mostrado na figura 41, onde observamos grande atividade na linhagem mais metastática de próstata CL1 e baixa atividade de V-ATPase, bafilomicina sensível, nas linhagens de tumor de próstata não metastático LNCAP e no controle não tumoral RWPE-1. E as linhagens DU145, PC3 e CL2 não mostram grandes diferenças na atividade que também foram menores comparando com CL1. E a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase é mostrada no gráfico da figura 42 onde observamos as linhagens metastáticas CL1, CL2 e DU145 com baixa atividade equivalente ao nível de atividade obtida no controle de célula saudável de próstata RWPE-1 e foi observada atividade pouco maior nas linhagens não metastática LNCAP e metastática

PC3. Esses dados confirmam o mesmo padrão observado nas frações de membrana plasmática em melanoma mostrando maior ativação de V-ATPase na linhagem mais metastática e menor ativação da Na⁺-K⁺-ATPase nas linhagem mais metastática. Tendo sido esse balanço de menor ativação da Na⁺-K⁺-ATPase mais pronunciado nas linhagens e tumores de melanoma em comparação às linhagens de próstata estudadas. É importante ressaltar que o achado de atividade e localização destas enzimas na fração nuclear, respectivamente é completamente inédita.

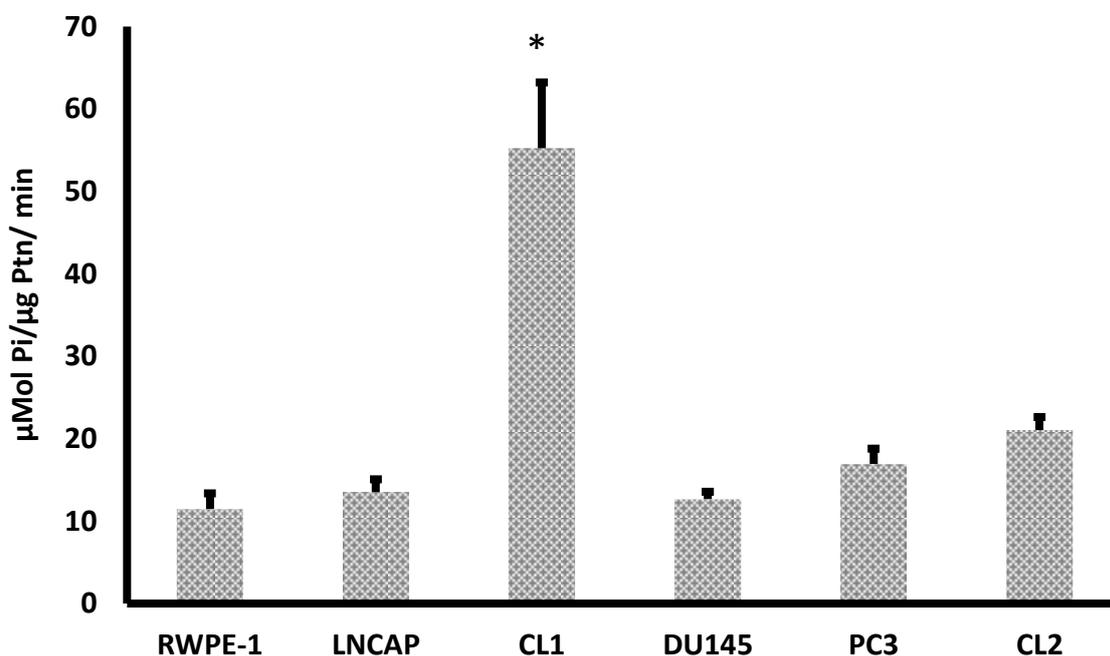


Figura 41- Atividade da V-ATPase na fração nuclear, bafilomicina sensível, por hidrólise de ATP, nas linhagens celulares de próstata onde temos CL1 como mais metastática, LNCAP como não metastática, DU145, PC3 e CL2 também metastáticas porém de forma intermediária e RWPE como controle saudável de próstata. O meio de reação contendo 3 mM ATP, 3 mM MgSO₄, 25 mM Tris-SO₄ pH 8.0, 5 mM NaN₃, 1 mM Ortovanadato de sódio, 3 mM MgCl₂, 1 µM oubaína, água milique e como inibidor específico para detectar atividade sensível foi utilizada bafilomicina. T test *p< 0,001. n=4.

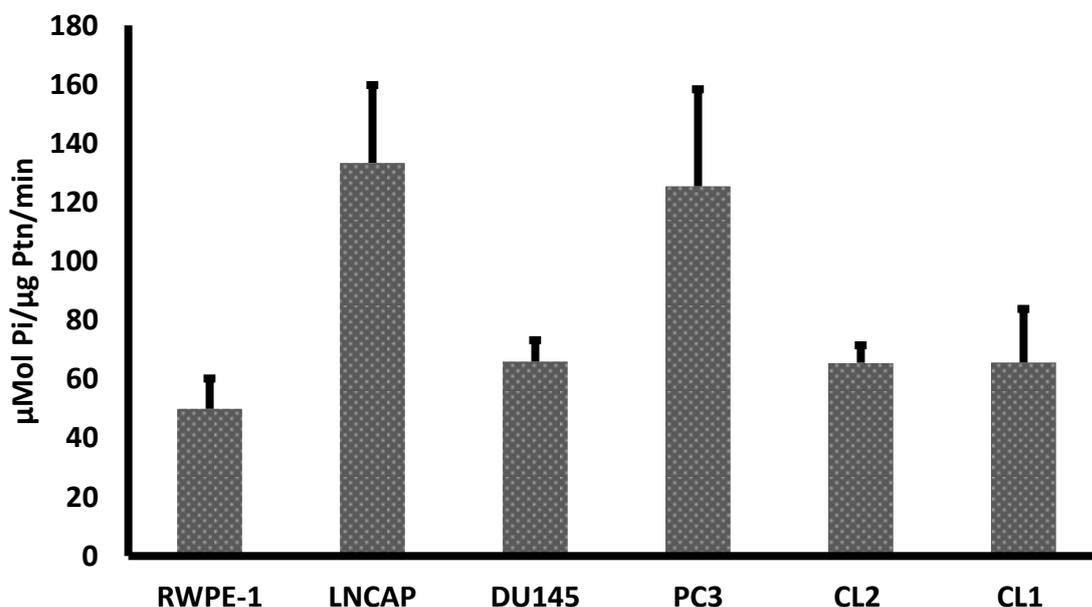


Figura 42 - Atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na fração nuclear, ouabaína sensível, por hidrólise de ATP, nas linhagens celulares de próstata onde temos CL1 como mais metastática, LNCAP como não metastática, DU145, PC3 e CL2 também metastáticas porém de forma intermediária e RWPE como controle saudável de próstata. O meio de reação contendo 3 mM ATP, 3 mM MgSO_4 , 25 mM Tris- SO_4 pH 8.0, 5 mM NaN_3 , 1 mM Ortovanadato de sódio, 3 mM MgCl_2 , 1 μM bafilomicina, água milique e como inibidor específico para detectar atividade sensível foi utilizada ouabaína. $n=4$.

E utilizando a fração mitocondrial bruta detectamos atividade de F-ATPase, azida sódica sensível, por hidrólise de ATP, que ocorre *in vitro* nas linhagens controle e tumorais de câncer de próstata. Observamos o resultado no gráfico da figura 43 onde vemos baixa atividade na célula controle saudável de próstata RWPE-1 e alta atividade nas linhagens tumorais de próstata sendo que não observamos diferença entre as linhagens com diferentes potenciais metastáticos como foi visto na atividade enzimática de V-ATPase. Esse dado demonstra que as linhagens tumorais de forma geral possuem demanda energética maior e por isso precisam ter maior ativação de F-ATPase e possibilidade de uso do metabolismo mitocondrial para suprir o aporte energético mesmo que a maior utilização continue sendo fonte proveniente do metabolismo glicolítico.

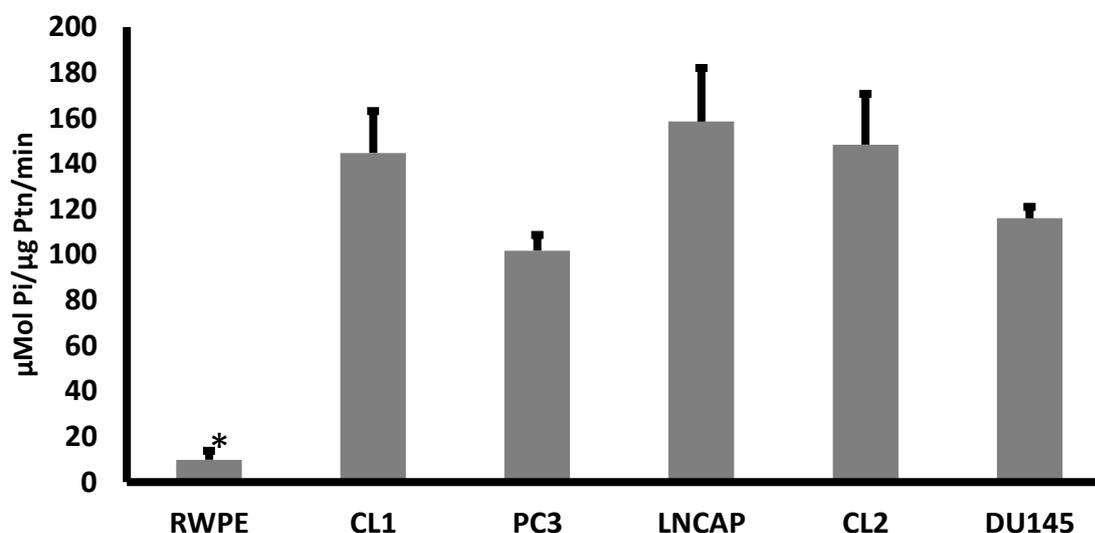


Figura 43- Atividade da F-ATPase na fração mitocondrial bruta, azida sensível, por hidrólise de ATP, nas linhagens celulares de próstata onde temos CL1 como mais metastática, LNCAP como não metastática, DU145, PC3 e CL2 também metastáticas porém de forma intermediária e RWPE como controle saudável de próstata. O meio de reação contendo 3 mM ATP, 3 mM MgSO₄, 25 mM Tris-SO₄ pH 8, 1 μM Ouabaína e 10 μM Bafilomicina, 1 mM Ortovanadato de sódio, 3 mM MgCl₂ e como inibidor específico para detectar atividade sensível foi utilizada 5 mM NaN₃ e água milique. Dunn Test * e **p< 0,05.n=4.

Para verificar a localização da V-ATPase nas linhagens estudadas, foi aplicada a técnica de imunocitoquímica utilizando anticorpos primários para duas diferentes isoformas do domínio V₀ da V-ATPase nas linhagens celulares de próstata estudadas. O resultado é mostrado na Figura 44, onde observamos fotomicrografias obtidas em microscópio confocal Nikon, e vemos a marcação da subunidade a1 nas linhagens CL1, CL2, DU145, LNCAP e PC3, para essa isoforma, a marcação ocorre principalmente nas rotas endocíticas e isso foi bem evidente nas linhagens metastáticas CL1, CL2, DU145 e PC3, principalmente em CL1 e DU145, onde é mais pronunciada. E em LNCAP, linhagem não metastática, a marcação é menos evidente em relação às outras linhagens observadas. E a figura 45, mostra a marcação da isoforma a4 do domínio V₀ da V-ATPase, para essa isoforma a marcação é mais disseminada para todas as linhagens estudadas. E principalmente para essa isoforma destacamos a marcação bem evidente no núcleo das células, que também ocorreu para a isoforma a1 principalmente nas linhagens metastáticas CL1, DU145, CL2 e PC3 e de forma menos evidente e perinuclear na linhagem não metastática LNCAP.

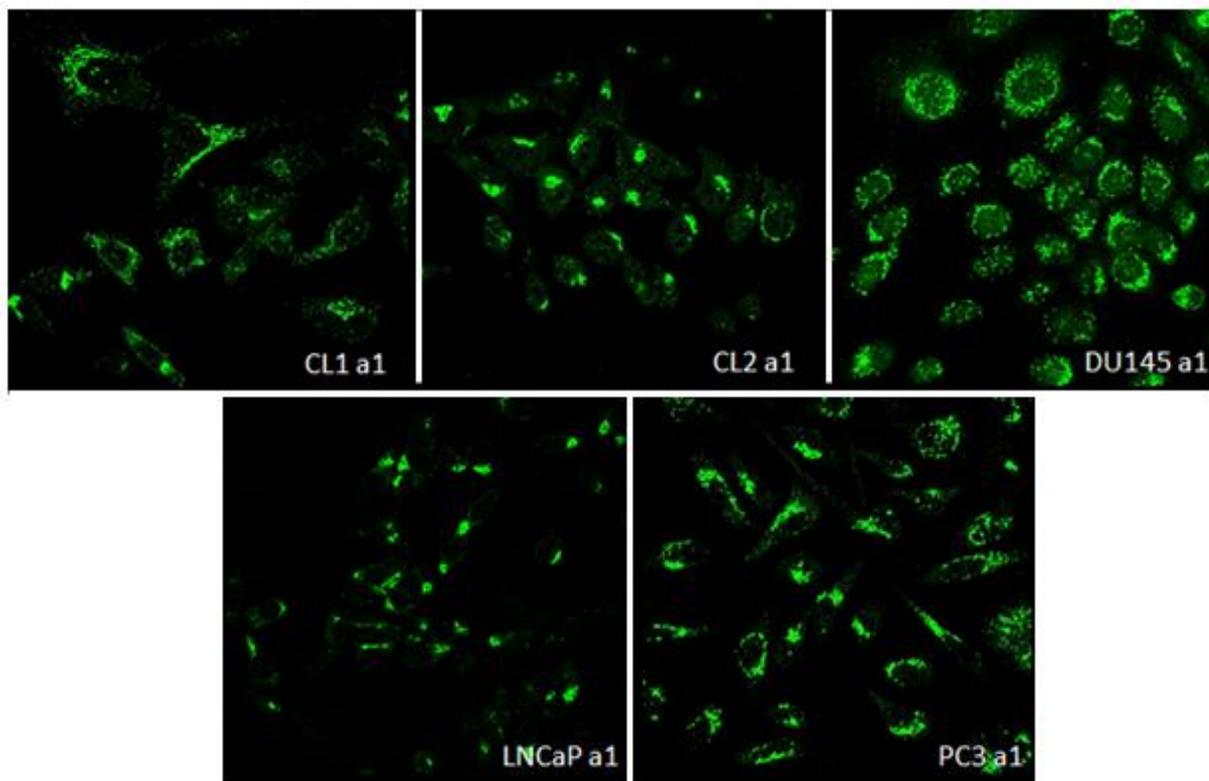


Figura 44- Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X, detectando localização da isoforma a1 do domínio V₀ da V-ATPase.

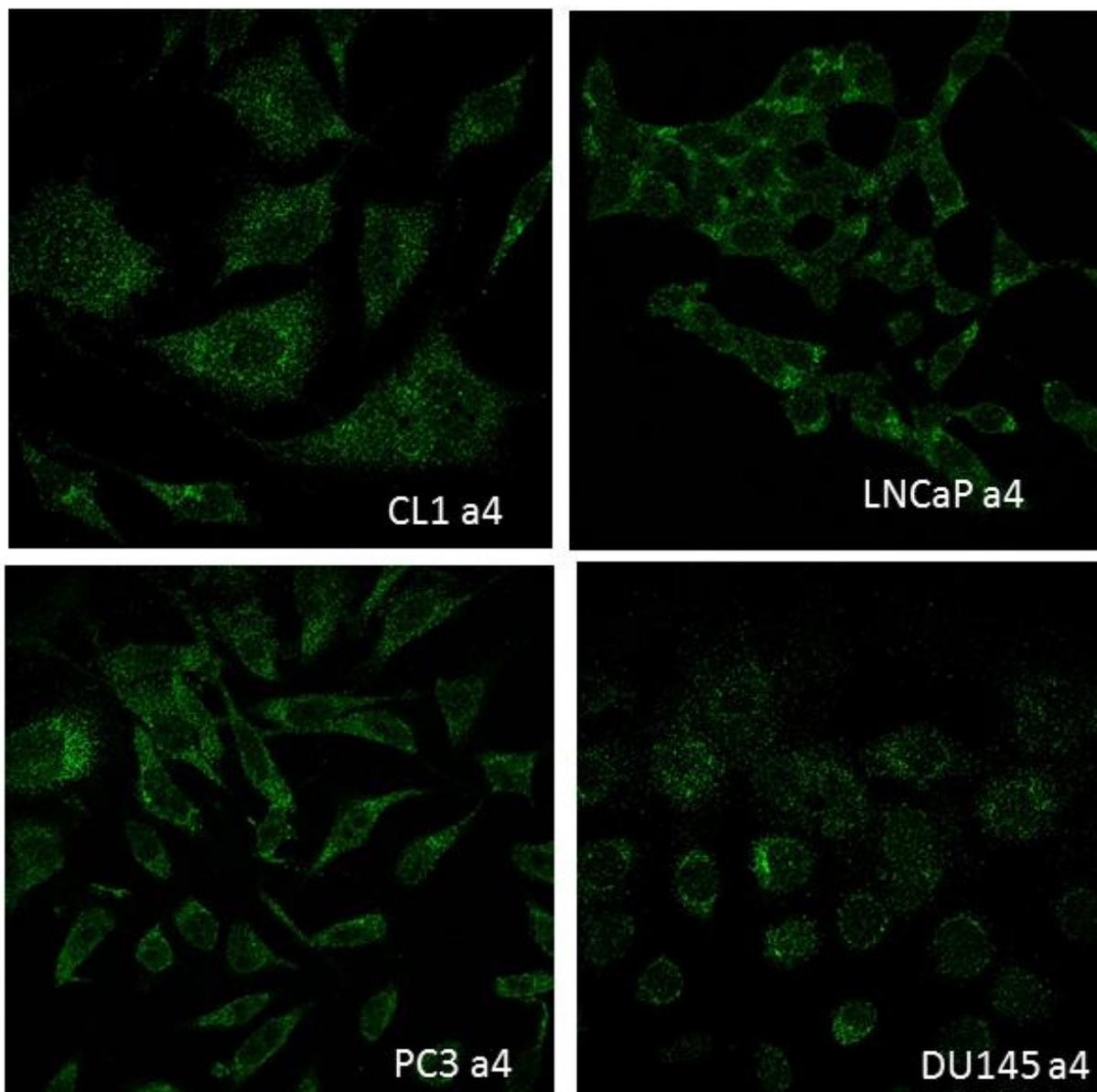


Figura 45- Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X, detectando localização da isoforma $\alpha 4$ do domínio V_0 da V-ATPase.

Para detectar a localização das subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas linhagens tumorais foi feita imunocitoquímica utilizando anticorpos específicos para estas subunidades com a colocalização com DAPI para visualização de núcleos e confirmação de que estas subunidades foram localizadas no núcleo. A figura 46 mostra a colocalização de actina em verde, com subunidade $\alpha 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em vermelho e os núcleos em azul marcados com DAPI, onde observamos com mais detalhes a superfície e contorno celular e o mesmo padrão de distribuição dessa subunidade no citoplasma. A figura 47 mostra a marcação da subunidade $\alpha 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, onde podemos observar a localização desta subunidade bem evidente

principalmente dispersa no citosol em todas linhagens como também no núcleo mais evidente nas linhagens CL2, DU145 e PC3.

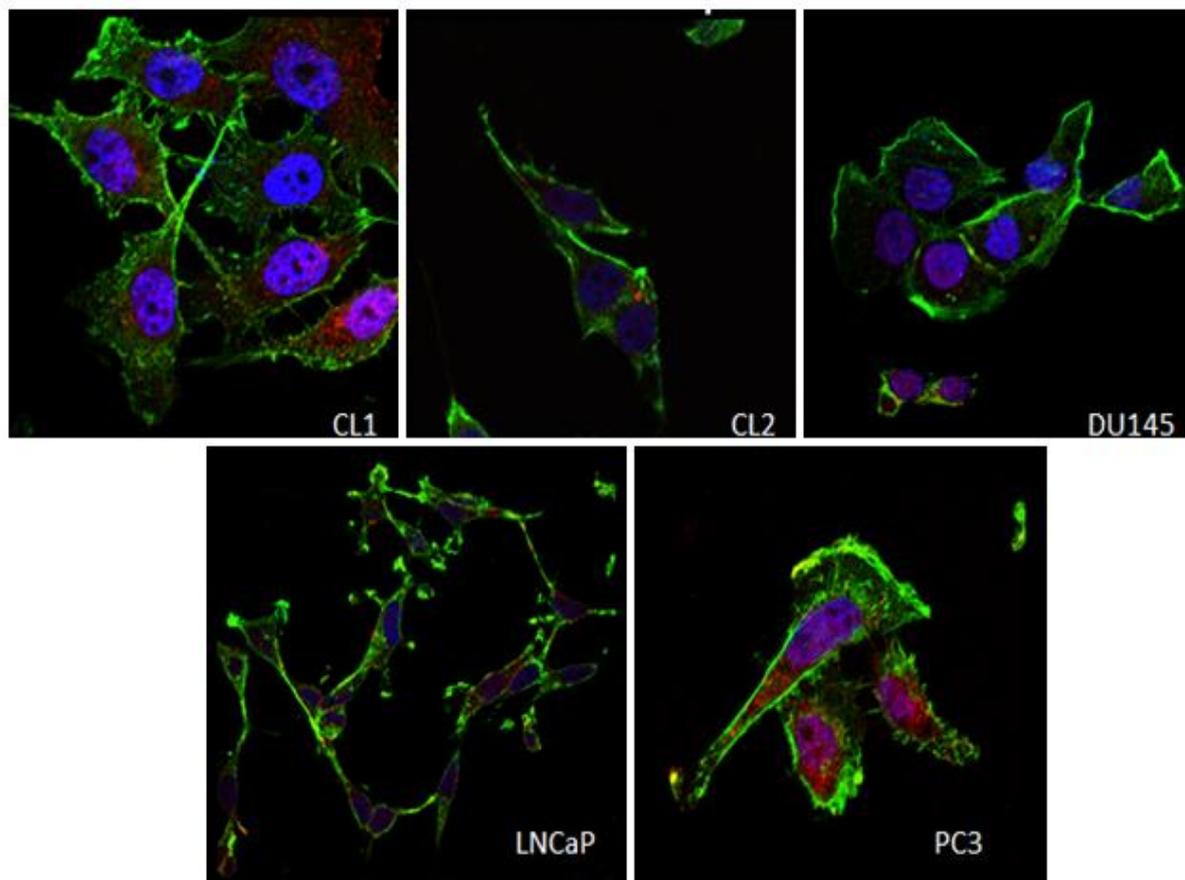


Figura 46 - Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X, detectando colocalização de actina em verde, da isoforma $\alpha 1$ da enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ em vermelho e DAPI marcando núcleos em azul.

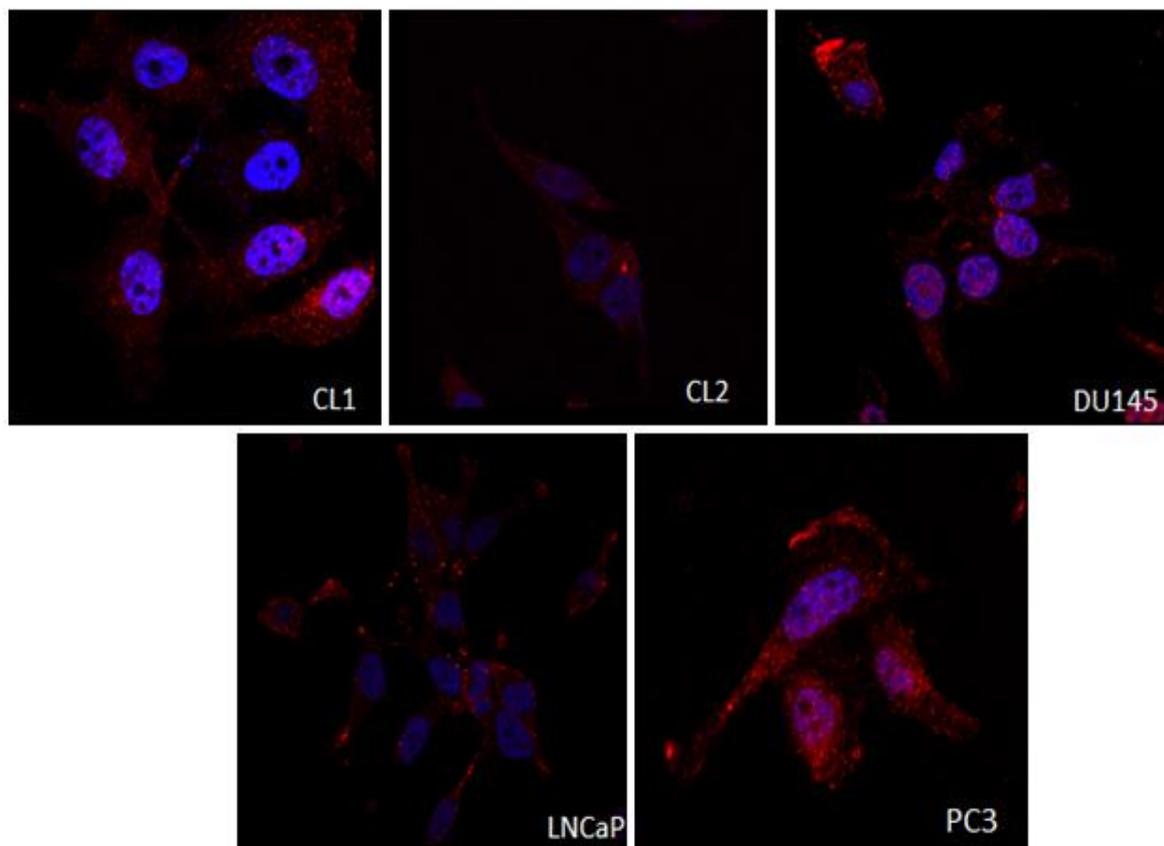


Figura 47 - Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X, detectando localização da isoforma α da enzima $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$. Onde observamos em vermelho a subunidade α_1 da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ e em azul os núcleos marcados com DAPI.

E a figura 48 mostra colocalização de actina em verde com subunidade β_1 da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ e núcleos marcados com DAPI, onde podemos observar o mesmo padrão com localização dispersa pelo citosol e também no núcleo das linhagens. A figura 49 mostra a marcação da subunidade β_1 da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$, onde podemos observar padrão similar encontrado para subunidade α_1 com a localização desta subunidade bem evidente principalmente dispersa no citosol em todas linhagens como também no núcleo mais evidente nas linhagens CL1, CL2, DU145 e PC3

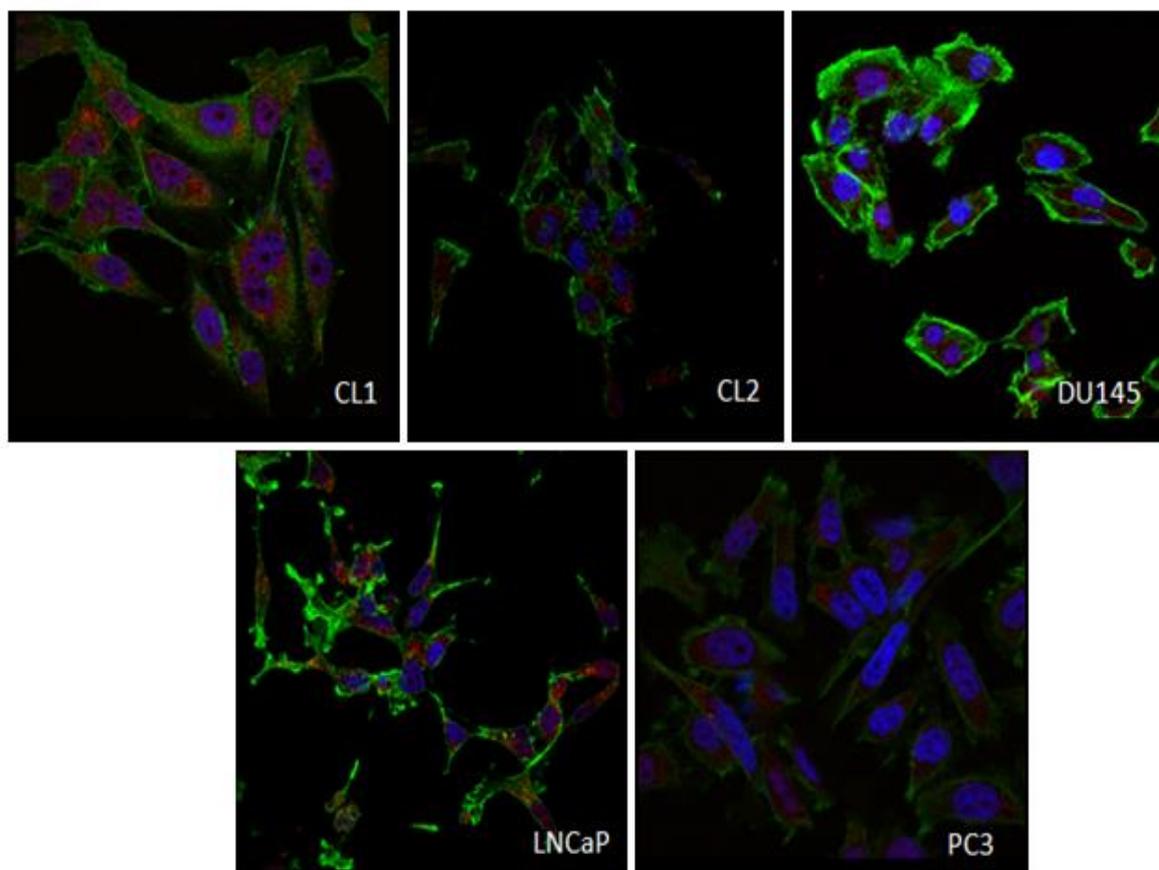


Figura 48- Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60 X, detectando colocação de actina em verde, da isoforma β da enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ em vermelho e núcleos em azul marcados com DAPI.

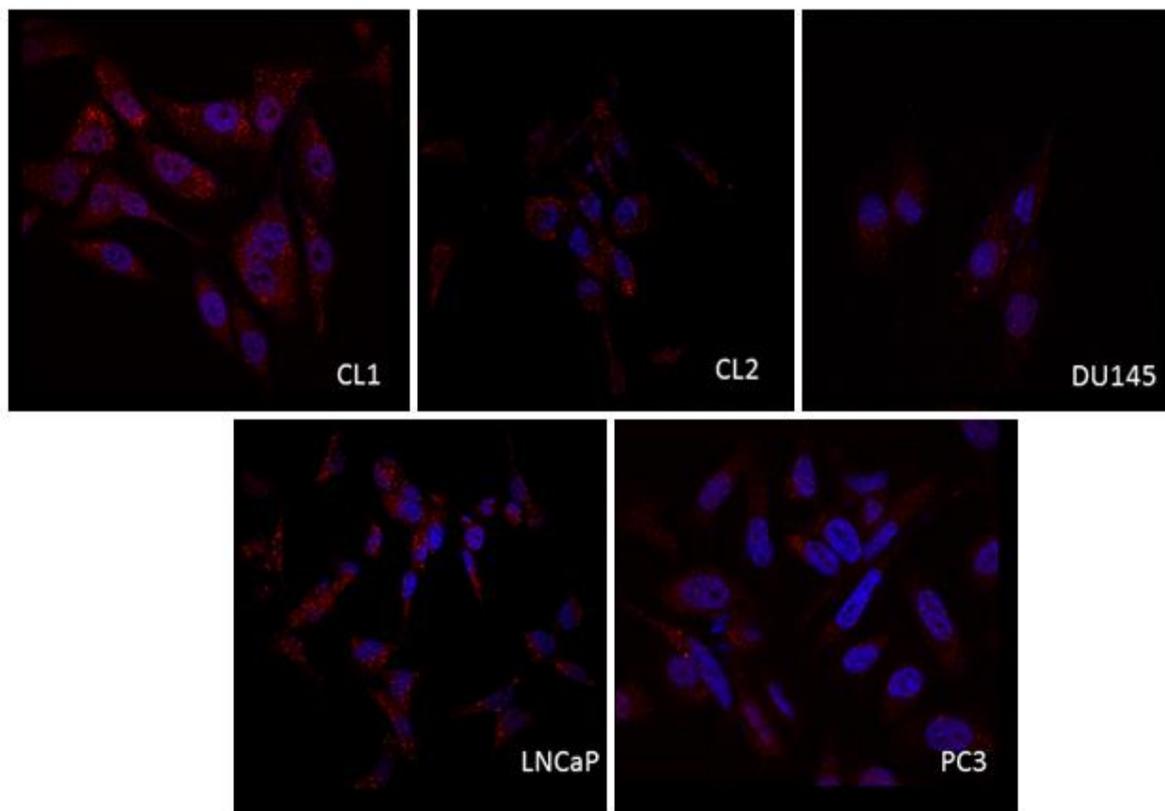


Figura 49- Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X, da isoforma β da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em vermelho e núcleos em azul marcados com DAPI.

E a figura 50 mostra colocalização de actina, subunidade α da F-ATPase e núcleos marcados com DAPI em azul. Esse dado corrobora os dados que mostraram ativação de F-ATPase nas linhagens tumorais de próstata em comparação com o controle não tumoral o que condiz com a necessidade de possuir uma fonte a mais para suprir a demanda energética. E a figura 51 mostra a localização da subunidade α da F-ATPase nas linhagens tumorais de próstata e podemos ver uma marcação evidente em todas as linhagens e sem grandes variações entre elas

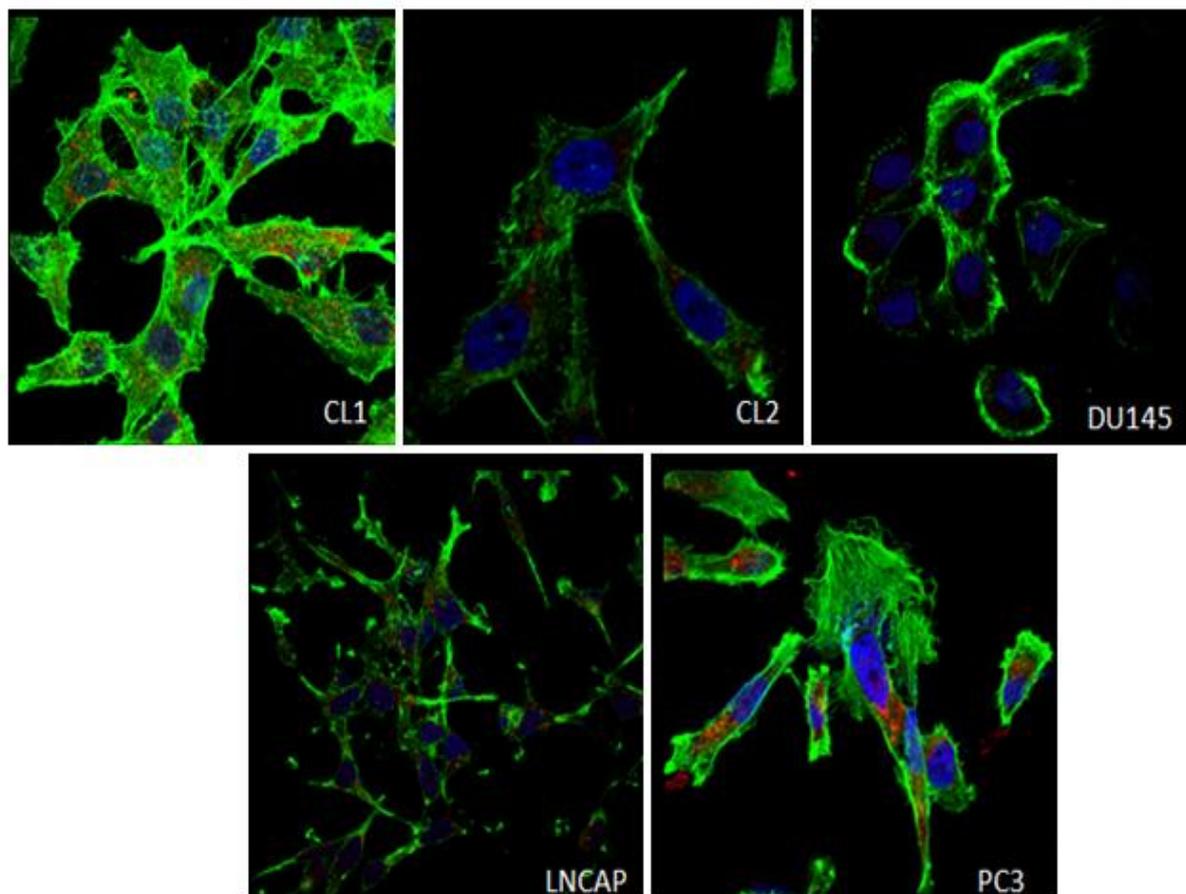


Figura 50-. Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X, detectando colocação de actina em verde, da isoforma α da enzima F-ATPase em vermelho e em azul os núcleos marcados com DAPI.

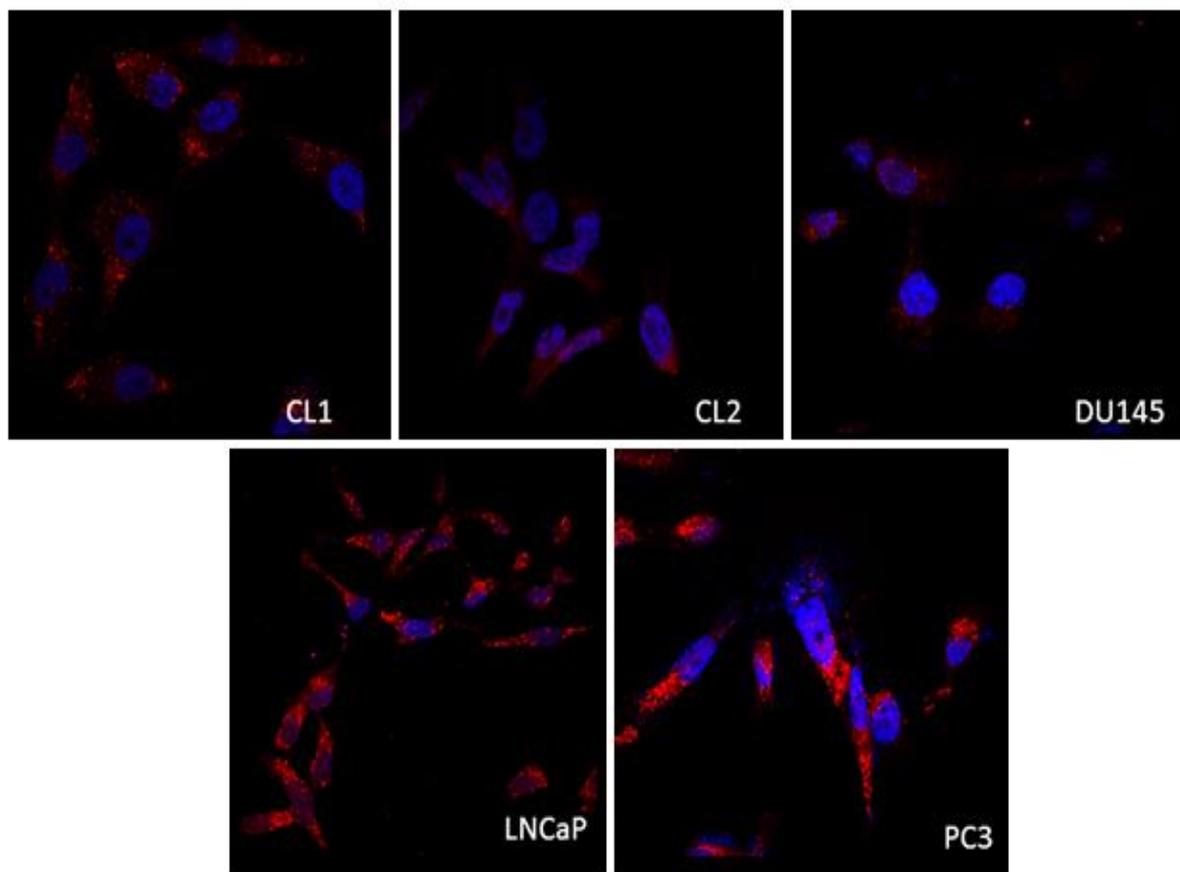


Figura 51- Fotomicrografias de Imunocitoquímica das linhagens celulares de próstata obtidas em microscópio confocal Nikon com aumento de 60X, detectando localização da isoforma α da enzima F-ATPase em vermelho e em azul os núcleos marcados com DAPI

Para testarmos o efeito da ausência de glicose na viabilidade e crescimento das células, as células foram plaqueadas e o meio de cultura foi trocado por DMEM sem glicose e assim as células foram fixadas no tempo 0 e após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas com meio de cultura com ausência de glicose. E observamos o resultado na forma de cinética temporal no gráfico mostrado na figura 52, podemos observar que a linhagem controle RWPE (mostrada em vermelho), não foi afetada pela ausência de glicose após 24 horas tendo apenas 0,25% de diminuição de crescimento, e a linhagem CL1 (mostrada em rosa), também foi pouco afetada com diminuição de 4% do crescimento. A linhagem CL2 (mostrada em azul claro), foi também menos afetada tendo 12,5% de diminuição do crescimento enquanto as linhagens mais metastáticas PC3 (mostrada em verde) apresentou 36,09% do crescimento e a linhagem DU145 (mostrada em azul escuro) apresentou 42,30% de diminuição do crescimento e a linhagem não metastática LNCaP (mostrada em preto) se mostrou sensível apresentando 45,91% de diminuição do crescimento. E para detectarmos de forma

mais precisa os valores de diminuição de crescimento após 24 horas e 12 horas com meio de cultura com ausência de glicose. A figura 53 mostra o gráfico de diminuição de crescimento das células após 24 horas com ausência de glicose e a figura 54 mostra o gráfico de diminuição de crescimento das células após 12 horas com meio de cultura na ausência de glicose. O que observamos que as linhagens LNCAP, PC3 e DU145 com crescimento mais afetado já começaram ser afetadas de forma considerável após 12 horas na ausência de glicose. Entretanto, a linhagem controle de próstata saudável RWPE-1 e metastática CL1 mostraram mais resistentes à retirada de glicose após 24 horas, o que sugere principalmente para CL1 que foi encontrada marcante presença de mitocôndrias e atividade de F-ATPase que o metabolismo oxidativo está bem ativo e supre essa diminuição de glicose sem afetar muito o crescimento refletido e mensurado através da densidade óptica após até o tempo máximo de 24 horas na ausência de glicose no meio de cultura.

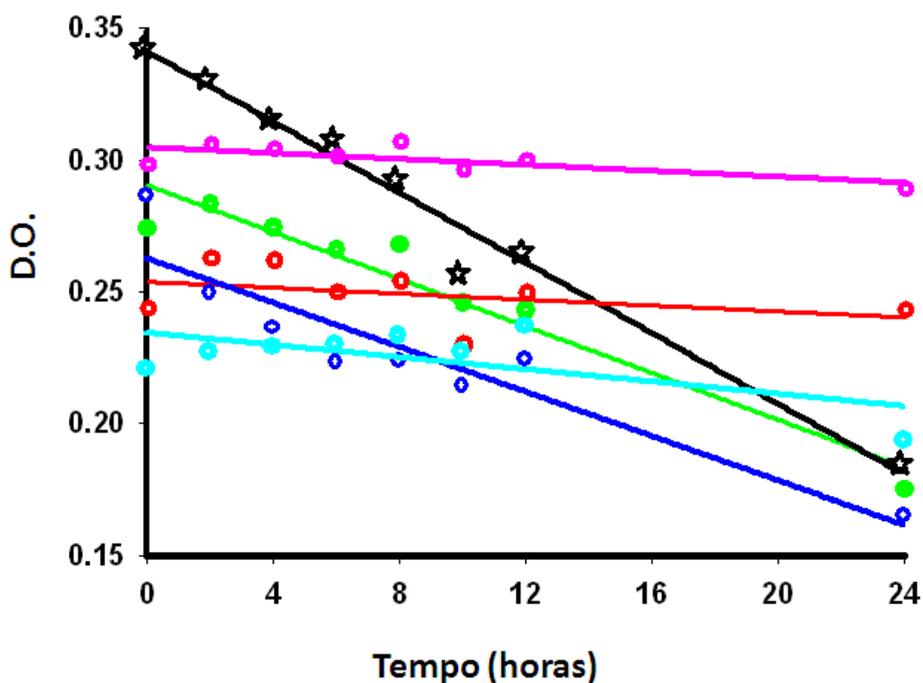


Figura 52- Gráfico de cinética temporal da viabilidade das células após 0,2, 4, 6, 8,10,12 e 24 horas com meio de cultura com ausência de glicose. Mostrando densidade das células em função do tempo em meio de cultura com ausência de glicose. Em preto a linhagem não metastática LNCAP, em rosa a linhagem mais metastática CL1, em vermelho a linhagem controle RWPE, em verde a linhagem PC3, em azul claro a linhagem CL2 e em azul escuro a linhagem DU145.

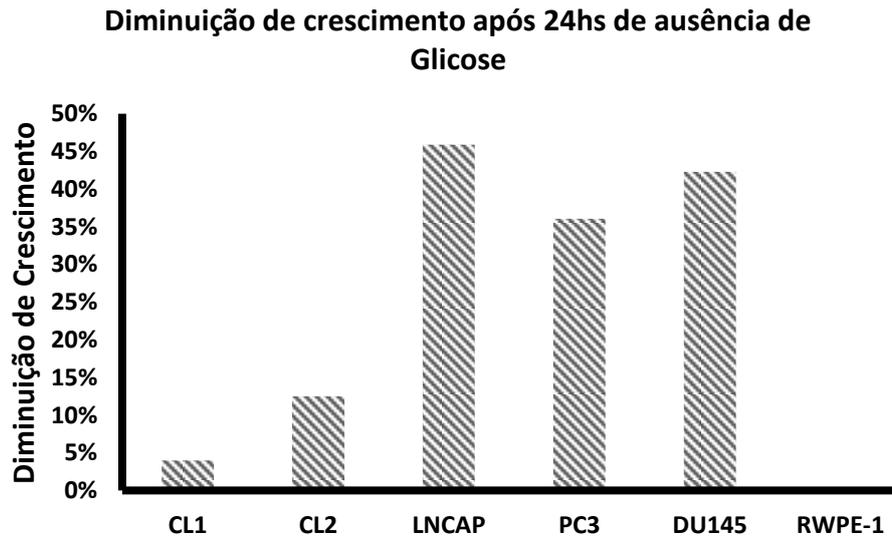


Figura 53- Gráfico mostrando diminuição de crescimento, das linhagens de próstata, após 24 horas com meio de cultura com ausência de glicose.

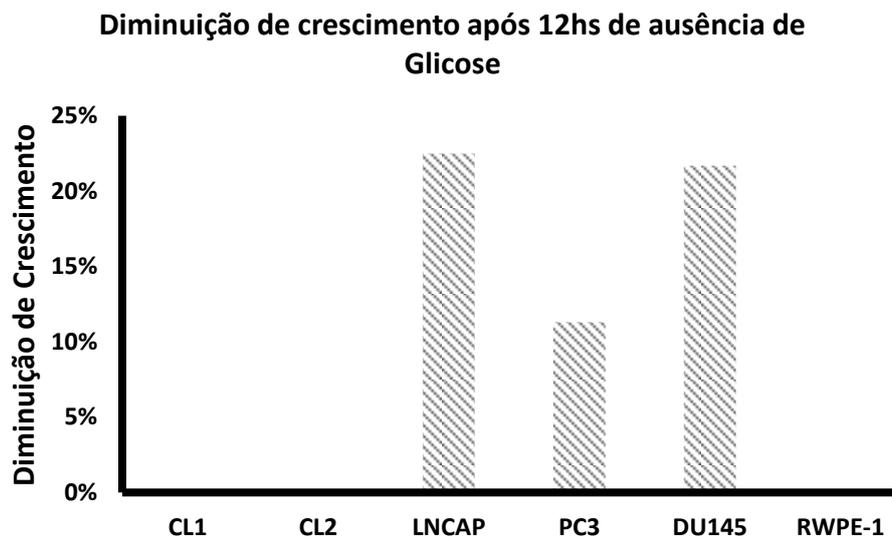


Figura 54 - Gráfico mostrando diminuição de crescimento, das linhagens de próstata, após 12 horas com meio de cultura com ausência de glicose.

7- Discussão

De acordo com dados do INCA do ano de 2012, apesar do câncer de pele do tipo melanoma não ser dos mais incidentes continua sendo altamente agressivo pela sua letalidade consequência da grande capacidade de metastatizar. Segundo Miller e Mihn (2006), o melanoma é responsável por 80% das mortes por câncer de pele e somente cerca de 14% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivem por aproximadamente 5 anos. Além disso, o tratamento contra o avanço do melanoma se mostra bem difícil e é importante que sejam entendidos os processos de mudanças que promovem o crescimento vertical e invasão do melanoma e também os mecanismos que bloqueiam a quimioterapia efetiva. Nos EUA, o número de novos casos de melanoma têm aumentado muito, de modo que a incidência do melanoma foi maior que o dobro, apresentando-se, então, como a neoplasia com aumento mais expressivo (Ries *et al.*, 2000).

Segundo a Sociedade Americana de Câncer, o adenocarcinoma de próstata é o tipo mais comum de câncer em homens, sendo responsável por um em cada quatro novos casos de câncer diagnosticados. A causa e mecanismo de progressão do câncer de próstata ainda são pouco compreendidos, mas existem fatores de riscos que podem ajudar na detecção precoce. Entre eles, o que mais se destaca é a idade, seguido por etnia e histórico familiar (Jemal *et. al*, 2010). No Brasil, o câncer de próstata é apontado como o segundo tipo de câncer mais incidente em homens, o que torna importante realizar estudos de ciência básica, em ambos os tipos de câncer abordados, e com isso fornecer novos alvos para futuras terapias.

A presente tese mostrou evidências bioquímicas, morfológicas, ultraestruturais em relação ao papel fisiológico da ativação, expressão e localização das bombas de prótons tipo V e F e da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em linhagens de câncer de próstata e linhagens e tumores de melanoma com diferentes potenciais metastáticos. Também foi mostrado link com o metabolismo energético detectando colocalização da HK2 e Mitotracker, uma vez que foi elucidada por Pedersen (2008) em diversos tipos de câncer a presença do complexo ATP sintassomo que atua como ajudador no metabolismo energético em tumores mais agressivos.

Para tal, foram induzidos tumores das linhagens de melanoma murino com diferentes potenciais metastáticos através de injeção subcutânea no dorso de camundongos C57Bl, sendo B16F10 a linhagem mais metastática e B16F0 a menos

metastática. Em cultura a linhagem menos metastática apresenta maior acúmulo de melanina em comparação com a linhagem mais metastática B16F10 e após a indução é observado o inverso, pois o tumor derivado da linhagem mais metastática é mais escuro (preto), maior, cresce mais rápido (em torno de 14-21 dias), possui odor fétido que remete à necrose, consistência mole e presença abundante de vasos enquanto o tumor derivado da linhagem menos metastática B16F0 apresenta coloração avermelhada, consistência firme, demora mais tempo para crescer (em torno de 35-45 dias) e em geral é menor que o mais metastático.

De acordo com Tannock e Rotin (1989) e Gatenby e Gawlinski (2003), as células tumorais apresentam metabolismo glicolítico hiperativo, produzindo metabólitos ácidos. Fais *et al.* (2007), destacam que os tumores podem gerar um ambiente ácido mesmo quando há redução da produção de ácido láctico pela via glicolítica, sugerindo então que o metabolismo glicolítico não é o principal mecanismo responsável pelo desenvolvimento de um ambiente ácido em tumores sólidos.

Dados anteriores do nosso grupo mostraram que a velocidade inicial de atividade hidrolítica da F-ATPase nas linhagens de células de melanoma (B16F0 e B16F10) é superior à velocidade inicial de atividade da F-ATPase de uma linhagem de macrófago usada como controle bioquímico não tumoral (J774A₁). Como a F-ATPase é um dos principais marcadores da atividade mitocondrial, esses dados indicam que as mitocôndrias do melanoma estudado estariam funcionando mais intensamente que as mitocôndrias das células controle, gerando mais energia livre (ATP) para ser utilizada na progressão desse tumor (Santos, 2009). Isto poderia, a princípio, ser contrário à teoria do Efeito Warburg que diz que enquanto o metabolismo de células normais se sustenta principalmente utilizando a via da fosforilação oxidativa, células tumorais apresentam uma superativação da via glicolítica em detrimento da atividade mitocondrial (Koppenol *et al.*, 2011). Todavia, estudos mais recentes demonstram que para alguns tipos de câncer, em geral, com grande potencial invasivo, o suplemento extra de energia é derivado principalmente de uma ativação específica do metabolismo das mitocôndrias (Koppenol *et al.*, 2011). E a expressão da HK-2 e sua posterior inserção na membrana externa das mitocôndrias dessas linhagens tumorais poderiam explicar a atividade mitocondrial observada (Pedersen, 2008). Kaway *et al.* (2013), apresentaram a ativação da F₁/F₀ ATP sintase induzida pela estimulação tensão de cisalhamento de fluxo dependente que contribui para o desenvolvimento do microambiente ácidos em tecidos tumorais mediada pelo fluxo intersticial.

Detectamos marcação de mitocôndrias através da sonda Mitotracker que mostrou uma marcação mais evidente na linhagem de melanoma mais metastático B16F10 em relação à linhagem controle de macrófago J774 A₁ e à linhagem de melanoma pouco metastático B16F0. E foi feita a colocalização de mitotracker e HK 2 utilizando anticorpo específico, onde foi possível observar que as linhagens de melanoma muito e pouco metastático possuem mitocôndrias com HK2 acopladas à membrana mitocondrial externa, formando o chamado complexo ATP sintassomo descrito previamente por Pedersen (2008), porém não foi possível determinar diferença entre maior marcação na linhagem mais metastática em relação à menos metastática para esse parâmetro. Esta hipótese agrega a idéia de uma especialização de mitocôndrias e seu direcionamento para regiões estratégicas dentro das células do melanoma, tornando a energética deste tumor muito mais refinada. Porém, a linhagem mais metastática (B16F10) não apresentou maior sinal de fluorescência em sobreposição quando comparada com a linhagem menos metastática (B16F0), indicando que não é sintetizado mais ATP Sintassoma na B16F10 que na B16F0.

Ainda observamos mitocôndrias de forma mais detalhada através da ultraestrutura das linhagens e tumores de melanoma, que mostrou intensa presença de mitocôndrias com variados formatos e ainda mostrando hiperplasia mitocondrial na linhagem e tumor mais metastático B16F10 em comparação ao menos metastático B16F0. E foi detectada presença de clusters, não vistos previamente, ricos em mitocôndrias, o que corrobora o fato desta linhagem ter uma demanda energética maior e com isso precisar contar não só com metabolismo glicolítico como alguns tumores preferencialmente utilizam como também podem utilizar o metabolismo oxidativo que energeticamente é mais eficiente. A caracterização morfológica detalhada destas linhagens celulares e tumores de melanoma ainda não tinha sido feita e é de grande relevância para fornecer bases para futuras pesquisas clínicas. Até então estas linhagens tinham sido classificadas por Sloane et al (1982), apenas pela expressão de catepsina B, marcador lisossomal, que está mais expresso na linhagem mais metastática B16F10.

Os resultados de atividade enzimática de F-ATPase em melanoma, por hidrólise *in vitro*, mostraram maior ativação na linhagem e tumor mais metastático B16F10 em comparação com o menos metastático B16F0. Mas a linhagem de macrófago J774 A₁ mostrou ativação por glicose, o que não ocorreu nas linhagens tumorais de

melanoma. E nas linhagens tumorais de próstata também foi encontrada atividade de F-ATPase, azida sensível, maior em relação ao controle saudável de próstata RWPE-1, que apresentou baixa atividade desta bomba. Esse resultado corrobora com dados que mostram que tumores apresentam de forma geral metabolismo mais acelerado e que o metabolismo não é exclusivamente glicolítico (Koppenol *et al.*, 2011).

Também foi mensurada a taxa de respiração celular na linhagem de macrófago controle e de melanoma mais metastático B16F10 e menos metastático B16F0, que tem relação direta com metabolismo energético mitocondrial. E os dados obtidos mostraram maior taxa de respiração celular na linhagem mais metastática de melanoma B16F10 e menor taxa de consumo de oxigênio na linhagem menos metastática de melanoma B16F0 e linhagem controle de macrófago J774 A₁ o que corroboram os resultados obtidos mostrando maior presença de mitocôndrias e ativação de F-ATPase nas linhagens e tumores de melanoma mais metastático. Sugerindo então, que o melanoma possui também um metabolismo oxidativo bem ativo para juntamente com o metabolismo glicolítico suprir a alta demanda energética requerida. O resultado obtido corrobora os dados de atividade da F-ATPase, das mesmas linhagens celulares, gerados pelo nosso grupo (Santos, 2009). Logo, podemos observar que, de fato, o metabolismo mitocondrial das linhagens tumorais está sendo ativado, quando comparado com o metabolismo mitocondrial da linhagem controle. Este dado vai de encontro com o que tem sido defendido na literatura, a qual diz que tumores utilizam menos suas mitocôndrias (50 – 70% dos tumores) e confiam mais na conversão de glicose em lactato, feita pela via glicolítica e subsequente fermentação láctica (Pedersen, 1978).

Nós detectamos a localização da subunidade α da F-ATPase em linhagens tumorais de próstata que se mostrou evidenciada nas linhagens tumorais de próstata o que corrobora dados obtidos na linhagem e tumor mais metastático de melanoma e ainda dados de atividade hidrolítica de F-ATPase *in vitro* nas linhagens tumorais de próstata que mostraram atividade bem superior em relação ao controle saudável de próstata.

Moreno-Sánchez *et al.*, 2007, mostraram que tumores como de cérvix uterino (Hela), faringe, glândula mamária, astroblastoma, glioma, hepatoma de Ehrlich, Morris e tumor de ascite (AS 30-D) analisados exibiram aumento da atividade glicolítica, mas

nem todos apresentaram diminuição da atividade metabólica mitocondrial, o que corrobora nossos dados que mostraram sinais que o metabolismo oxidativo nos tumores estudados provavelmente é bem ativo visto pela massiva presença de mitocôndrias, a casa de força da célula, e ainda ativação e localização de F-ATPase que é grande indicador de atividade mitocondrial na célula.

Em relação à morfologia a linhagem e tumor mais metastático B16F10 mostrou características mais anaplásicas como núcleos aumentados, inúmeros nucléolos, sinais de invasão vistos na histopatologia, algumas células necrosadas mediando o tumor na citologia que indica sinais de hipóxia, variação nos formatos celulares e maior heterogeneidade, o que não foi observado na citologia do melanoma menos metastático B16F0, apresentou células sem grandes variações e imagem monótona. Foram elucidados nos resultados de ultraestrutura, de forma pioneira, clusters de vesículas ricas em mitocôndrias e ainda hiperplasia mitocondrial na linhagem mais metastática B16F10 e o tumor desta mesma linhagem apresentou número aumentado de mitocôndrias em diferentes formatos e assim como foi visto na linhagem B16F10, o tumor também apresentou núcleos aumentados o que é mais um indício de células com características mais anaplásicas.

Utilizando dados obtidos da citologia e histopatologia dos tumores de melanoma com diferentes potenciais metastáticos foram feitas algumas análises morfométricas onde foi possível mais uma vez confirmar o fenótipo metastático, ressaltando características anaplásicas presentes no tumor mais metastático B16F10, que apresentou área de núcleos e nucléolos, perímetro, diâmetro mínimo e máximo de núcleo de tamanhos bem superiores ao tumor menos metastático B16F0.

De forma geral, em células tumorais ocorre uma mudança na produção de energia. A ativação da via glicolítica favorece o crescimento tumoral tão bem como os processos de invasão e metastase. Como consequência dessa mudança para metabolismo glicolítico mais ativo, células tumorais podem rapidamente internalizar glicose e converter a maior parte dela a lactato e esses prótons no citosol o tornam mais ácido e mudanças no pH citosólico são críticas para função e sobrevivência celular (Sennoune e Martínéz-Zaguilán, 2012). Uma vez que a V-ATPase é sensível à disponibilidade de glicose, pode-se dizer que o pH age como sinalizador de glicose através da V-ATPase. A proteína acessória da V-ATPase, ATP6ap2, pode ser o

sensor de pH e conseqüentemente participar da montagem da V-ATPase e direcioná-la para compartimentos específicos para regular o gradiente de pH e iniciar vias de sinalização. Diversas questões interessantes emergem sobre a relação entre V-ATPase a vias de sinalização, e os fatores de montagem que regulam transportadores de prótons ou vice versa. Outros estudos sobre a relação da V-ATPase e a via de sinalização podem ajudar a compreender o câncer (Sennoune e Martín-Zaguilán, 2012).

No entanto, a V-ATPase tem mostrado executar mais papéis além de manter ambiente favorável para invasão como também sinalização, defesa e ainda exerce função de principal mantenedora do potencial de ação em tumores e ainda auxilia no aumento da demanda metabólica diminuindo a acidificação no interior das células, temas ainda pouco explorados na pesquisa do câncer.

Foi mostrado de forma inovadora atividade enzimática e localização da V-ATPase e Na⁺-K⁺-ATPase, respectivamente na fração nuclear isolada e núcleos das linhagens tumorais de próstata com diferentes potenciais metastáticos. A atividade enzimática por hidrólise da V-ATPase na fração nuclear das linhagens de próstata foi maior na linhagem mais metastática (CL1) o que sugere ser mais uma estratégia fisiológica para manter a homeostase do pH nuclear, visto que essa linhagem tem uma maior demanda energética e de síntese no núcleo o que gera maior presença de compostos ácidos e H⁺ e com isso a V-ATPase estaria bem ativa na membrana nuclear fazendo extrusão destes prótons e em conjunto a V-ATPase na membrana plasmática também é encontrada ativa para realizar a extrusão dos H⁺ do citosol garantindo um citosol neutro e meio extracelular ácido, ambiente propício para os tumores invadirem e metastatizarem.

Estruturalmente, as ATPases do tipo V e F são bem conservadas ao longo da evolução (Gogarten *et al.*, 1992; Harvey e Wieczorek, 1997; Wilkens e Forgac, 2001; Gruber *et al.*, 2001). Portanto, assim como ocorreu em relação à F-ATPase azida sensível foi encontrada também maior atividade da V-ATPase na linhagem e tumores de melanoma mais metastático em relação às outras linhagens utilizadas de melanoma pouco metastático e a linhagem controle de macrófago transformado; esse dado corrobora os dados de outros grupos de que as células tumorais apresentam metabolismo bem acelerado (Koppenol *et al.*, 2011).

Cho *et al.*, 2006, mostraram a expressão de HK1 no núcleo de Arabidopsis, como sensor de glicose integrado a sinais de nutrição e hormonal nas plantas. E ainda mostraram o acoplamento não convencional entre a HK1, a subunidade B1 do domínio catalítico V_1 da V-ATPase e a partícula regulatória do proteossomo 19S, formando um complexo sinalizador de glicose que diretamente modula especificamente transcrição de genes alvos do metabolismo glicolítico. Nas linhagens de próstata, localizamos as subunidades a1 e a4 do domínio de membrana V_0 da V-ATPase no núcleo das células, sendo que a subunidade a4 se mostrou mais disseminada e marcante no núcleo principalmente nas linhagens mais metastáticas CL1, PC3, DU145 e CL2, e foi menos evidente e mais perinuclear na linhagem não metastática LNCAP. A marcação da subunidade a1 foi mais evidente na rota secretória e bem marcante nas linhagens metastáticas CL1, PC3 e Du145 e foi menos marcante também na linhagem não metastática LNCAP.

Em relação à atividade enzimática da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na fração nuclear das linhagens de próstata, também encontrada de forma inédita, foi maior na linhagem não metastática LNCaP e metastática PC3, enquanto as linhagens mais metastáticas CL1, CL2 e DU145 apresentaram menor atividade no mesmo nível encontrado no controle de próstata saudável RWPE-1. Esse dado corrobora o dado mostrando menor ativação da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ na linhagem mais metastática de melanoma e maior ativação no controle e linhagem menos metastática, tendo sido mais pronunciado em melanoma.

Li *et al* ,2011, mostraram que a expressão da isoforma $\alpha 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ está significativamente reduzida em carcinoma humano de próstata assim como em outras linhagens tumorais. E esta expressão baixa prejudica a habilidade de regular processo de sinalização relacionado à Tirosina Proteína Quinase (Src). Foi mostrada também a existência de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ com função de não bombeamento que participam de transdução de sinal. Liang e colaboradores, 2006, também mostraram que a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e Tirosina Proteína Quinase (Src) formam um complexo receptor de sinalização e ainda determinaram como alterações em quantidade e propriedades da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ afetam a atividade basal da Tirosina Proteína Quinase (Src) e a transdução de sinal induzida por ouabaína. O nocaute da subunidade $\alpha 1$ da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ resultou em diminuição significativa da atividade da

Na⁺-K⁺-ATPase e aumento da atividade basal Src e da fosforilação de tirosina de quinase de adesão focal, efetor da tirosina proteína quinase (Src).

Foi avaliada expressão da subunidade $\alpha 1$ nas linhagens celulares de macrófago transformado e de melanoma mais metastático B16F10 e menos metastático B16F0, e foi observada maior expressão na linhagem de macrófago controle J774 A1, expressão intermediária na linhagem menos metastática B16F0 e menor expressão na linhagem mais metastática B16F10. Esses dados corroboram os dados prévios, do grupo, de atividade hidrolítica de Na⁺-K⁺-ATPase nas frações de membrana plasmática que mostrou maior atividade no macrófago, atividade intermediária na linhagem menos metastática B16F0 e menor atividade na linhagem mais metastática B16F10.

E para localização da Na⁺-K⁺-ATPase nas linhagens de próstata foram utilizados anticorpos para subunidades $\alpha 1$ e $\beta 1$, foi mais evidente a marcação nos núcleos das linhagens metastáticas CL1, CL2, DU145 e PC3, enquanto na linhagem não metastática LNCAP foi menos evidente. Esse resultado mostrou que na linhagem não metastática LNCAP ambas subunidades foram localizadas de forma menos evidente apesar de a enzima ter se mostrado mais ativa no ensaio de atividade por hidrólise, enquanto as outras tiveram marcação mais evidente e se mostraram menos ativas na atividade enzimática. Esse dado reforça a questão de sinalização e participação na manutenção de homeostase no núcleo em conjunto com a V-ATPase. Pois enquanto a V-ATPase estaria mais ativa extruindo H⁺ e evitando acidificação no núcleo da linhagem mais metastática de próstata, a Na⁺-K⁺-ATPase estaria menos ativa ajudando na regulação de potencial de membrana e já na não metastática LNCAP que possui menos demanda energética, menor atividade da V-ATPase, a maior ativação da Na⁺-K⁺-ATPase possivelmente se faz necessária para regulação de potencial de membrana.

Ribeiro *et al*, 2012 mostraram ativação da V-ATPase por glicose extracelular e que a regulação desta enzima pela glicose extracelular não pode ser adequadamente explicada pela dissociação dos complexos V₀ e V₁ da enzima. Sugerindo que a modificação bioquímica das subunidades da enzima e a dinâmica de interação entre as subunidades dos dois domínios e outras enzimas e complexos moleculares podem ser considerados como fator chave afetando a modulação seletiva do transporte de H⁺

e atividades da ATPase. Os resultados após incubação com meios com e sem glicose mostraram que a glicose estimulou atividade de V-ATPase apenas no transporte de prótons, principalmente no tumor mais metastático. Provavelmente para os tumores e linhagens mais metastáticos o transporte de H^+ pela V-ATPase se mostra mais crucial e ainda podendo ser estimulado pela glicose, o que reforça ainda mais o link existente entre ativação desta bomba e o metabolismo glicolítico que se mostra pronunciado de forma geral em diversos tipos de tumores. Essa variação encontrada, onde vimos que a glicose estimulou mais o transporte em comparação à hidrólise e também os maiores níveis detectados em relação ao transporte da linhagem e tumor mais metastático sugere uma importante estratégia que é o acoplamento da V-ATPase. Por apresentar maior transporte em relação à hidrólise de ATP, a bomba parece estar mais acoplada e essa característica corrobora dados em que o transporte das bombas nas linhagens tumorais é primordial para manutenção do pH extracelular ácido e o intracelular mais neutro com tendência para alcalino de forma que garanta o pH ótimo das enzimas glicolíticas. E essa adaptação mostra-se crucial não só para facilitar os processos de invasão e metástase através do baixo pH do meio extracelular, ativando assim proteases, como também como parte de uma grande e complexa rota de sinalização, ainda não completamente desvendada.

Ainda para avaliar o efeito da glicose nas linhagens estudadas, nas linhagens de próstata foi testada a viabilidade das células na ausência de glicose em até 24 horas, onde o controle saudável de próstata se mostrou mais resistente, ou seja, a ausência de glicose não afetou crescimento das células após as 24 horas, o que sugere que não possui grande demanda energética para fazer com que as células sejam mais afetadas. Em seguida, a linhagem mais metastática CL1 se mostrou menos afetada com ausência de glicose após 24hs o que reforça que o metabolismo destas células não é extritamente glicolítico e que nesse tempo o metabolismo oxidativo refletido pela ativação de F-ATPase e presença marcante de mitocôndrias supre a alta demanda energética durante esse período de ausência de glicose. E as linhagens metastáticas PC3 e CL2 e não metastática LNCAP foram mais afetadas pela ausência de glicose, sugerindo que para essas linhagens o metabolismo glicolítico se mostra pronunciado e que elas não são tão eficientes em relação à adaptação de combinar bem o acoplamento dos dois metabolismos energéticos como CL1 mostrou ser mais eficaz.

De forma a completar os resultados de atividade enzimática, morfológicos, ultraestruturais, localização e expressão das bombas nos tumores estudados. Foi mensurado o transporte de H^+ nas linhagens e tumores de melanoma onde a linhagem mais metastática B16F10 apresentou o transporte bem superior em relação à linhagem menos metastática B16F0. Em relação ao transporte dos tumores após incubação com meios com e sem glicose, ambos os tumores apresentaram ativação por glicose sendo que o tumor derivado da linhagem menos metastática apresentou menor transporte e a estimulação por glicose foi mais efetiva na fração de membranas leves enquanto o tumor derivado da linhagem mais metastática apresentou maior transporte de H^+ pela V-ATPase e a estimulação por glicose foi mais efetiva na fração de membranas pesada. A detecção de atividades e localização da V-ATPase e Na^+ - K^+ -ATPase no núcleo das linhagens tumorais de próstata é muito interessante e mostra que realmente existe o link direto em relação ao metabolismo energético e que funcionam como instrumentistas de uma grande orquestra, pois o sistema energético e de regulação de homeostase no tumor mais metastático mostra ser complexo e ainda não foi completamente desvendado.

8- Conclusão

De fato, as bombas tipo V mostram ser cruciais não só nos aspectos relacionados à acidificação do meio extracelular, manutenção da homeostase celular, favorecimento dos processos de invasão e metástase como tem relação direta com processos de sinalização e relação direta com metabolismo influenciando na expressão e podendo ser deslocado juntamente com enzimas glicolíticas para diversos compartimentos celulares.

As bombas tipo F são indicadores de atividade mitocondrial e foram encontradas assim como a V-ATPase, mais ativas nas linhagens e tumores mais metastáticos de melanoma e em linhagens tumorais de próstata. Então, a F-ATPase das linhagens e tumores derivados de B16F10 apresenta uma atividade mitocondrial superior a de uma célula sadia. Este fato é, a princípio, contrário à literatura, a qual diz que as mitocôndrias sofrem perda de função em tumores. As marcações com o mitotracker e os dados de ultraestrutura mostram que a linhagem mais metastática e o tumor derivado desta linhagem (B16F10) possuem mais mitocôndrias, o que sugere que no câncer mais invasivo ocorre uma biogênese mitocondrial ativa.

O metabolismo mitocondrial está ativado nas linhagens tumorais de melanoma e próstata como mostram os dados de atividade da F-ATPase, as taxas de consumo de oxigênio e a marcação das mitocôndrias com mitotracker. A isoforma 2 da hexoquinase está presente e participa da energética das linhagens de melanoma estudadas. Porém, nem sempre foi encontrada associada às mitocôndrias, podendo estar na periferia das células, associadas a vesículas ácidas, com o possível papel de fornecer ADP e Pi para induzir a reversibilidade das V-ATPases contidas nas vesículas. Quando associada às mitocôndrias, estas se encontram ao redor do núcleo. Ambas as linhagens (B16F0 e B16F10) apresentam mitocôndrias com a hexoquinase-2 em níveis e localização muito parecidos, não sendo possível distinguir e determinar que uma possua mais que a outra. Assim, sugerimos que as mitocôndrias que possuem a hexoquinase-2 ligada, são mitocôndrias especializadas na produção de ATP e subsequentemente de glicose-6-P (sintetizados pelo megacomplexo ATP Sintassoma) para alimentarem as vias de biossíntese pelo núcleo e pelos retículos, liso e rugoso, nestas células que se encontram em constante proliferação e possuem alta demanda energética.

Assim, podemos concluir que o fenótipo relacionado ao potencial metastático foi confirmado, de forma ainda não explorada previamente, mostrando que a linhagem mais metastática possui também características mais anaplásicas e abundância de mitocôndrias vistas em diferentes tamanhos e formatos e ainda dispostas de forma inédita na forma de clusters, o que sugere que o metabolismo desta linhagem de melanoma não é exclusivamente glicolítico, o que foi confirmado também pela maior ativação de F-ATPase e maior taxa de respiração celular. E também que ocorre ativação enzimática de V-ATPase e de transporte também em tumores derivados das linhagens de melanoma mais metastático e que a glicose foi capaz de estimular o transporte de H^+ nesse mesmo tipo tumoral. E que a presença e atividade de V e Na^+ - K^+ -ATPase no núcleo das linhagens tumorais de próstata mostram o quão importante e íntima é a relação desta bomba com a energética tumoral, até então um tema bem pouco explorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, F.; Boder, J.; Buhmeida, A.; Hashm, H.; Elzagheid, A.; Collan, Y. Nuclear Morphometry in FNABs of Breast Disease in Lybians. *Anticancer Research*, 28, 3985-3990, 2008.

Arora, K. K.; Pedersen, P. L. Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 263 17422-17428, 1988.

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Fundamentos da Biologia Celular*, 2 ed., artmed, 2006.

Altan, N.; Chen, Y.; Schindler, M.; Simon, S. M. Deffective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *Journal of Experimental Medicine* Vol 187, n 10, 1583- 1598, 1998.

American Cancer Society. *Cancer facts & Figures 2010*, Atlanta: American Cancer Society, 1-62, 2010.

ATCC. Cell lines and Hybridomas. Disponível em: <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1435&Template=cellBiology> (acessado 30 de Novembro de 2013).

Atsumi, T.; Chesney, J.; Metz, C.; Leng, L. Donnelly, S.; Makita, Z.; Mitchell, R. Bucala, R. High expression of inducible 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2;PFKFB3) in human cancers. *Cancer Research*, 62 5881-5887, 2002.

Baggeto, L. G. Deviant metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie*, 74, 959-974, 1992.

Balliet, R. M.; Capparelli, C.; Guido, C.; Pestell, T. G.; Martinez-Outschoorn, U. E.; Lin, Z.; Whitaker-Menezes, D.; Chiavarina, B.; Pestell, R. G.; Howell, A.; Sotgia, F.; Lisanti, M. P. Mitochondrial oxidative stress in cancer-associated fibroblasts drives lactate production, promoting breast cancer tumor growth: understanding the aging and cancer connection. *Cell Cycle*, 10, 4065-4073, 2011.

Beyenbach, K. W.; Wieczorek, H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 209, 577-589, 2006.

Bonnet, S.; Archer, S. L.; Allalunis-Turner, J.; Haromy, A.; Beaulieu, C.; Thompson, R.; Lee, C. T.; Lopaschuk, G. D.; Puttagunta, L.; Harry, G.; Hashimoto, K.; Porter, C. J.; Andrade, M. A.; Thebaud, B.; Michelakis, E. D. A Mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*, 11, 37-51, 2007.

Boyd, M.; Farina, C.; Belfiore, P.; Gagliardi, S.; Kim, J. W.; Hayakawa, Y.; Beutler, J. A.; Mckee, T.; Bowman, B. J.; Bowman, E. J. Discovery of a Novel Antitumor Benzolactone Enamide Class that Selectively Inhibits Mammalian Vacuolar-Type H⁺-ATPases. *The Journal of Pharmacology experimental Therapeutics*, 297, 114-120, 2001.

Boyer, P. D. ATP synthase past and future. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365, 3-9, 1998.

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

Breton, S.; Brown, D. New insights into the regulation of V-ATPase-dependent proton secretion. *American Journal Physiology Renal Physiology* 292, 1-10, 2007.

Brisseau, G. F. ; Grinstein, S.; Hackam, D. J.; Nordström, T.; Manolson, M. F.; Khine, A. A.; Rotstein, O. D. Interleukin-1 Increases Vacuolar-type H⁺-ATPase Activity in Murine Peritoneal Macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 4, 2005-2011, 1996.

Bristow, R. G.; Hill, R. P. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Hypoxia and Metabolism*, 8, 180-192, 2008.

Brown, G. C. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochemical Journal*, 284, 1-13, 1992.

Brown, J. M. The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy- eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, 59, 5863-5870, 1999.

Busk, M.; Horsman, M. R.; Kristjansen, P. E. G.; Van der Kogel, A. J.; Bussink, J.; Overgaard, J. Aerobic glycolysis in cancers: implications for the usability of oxygen-responsive genes and fluorodeoxyglucose-PET as markers of tissue hypoxia. *International Journal of Cancer*, 122, 2726-2734, 2008.

Bustamante, E., Morris, H.P., Pedersen, P.L. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem*; 256, 8699-8704, 1981.

Chaban, Y. L. ; Coskun, U.; Keegstra, W.; Oostergetel, G. T.; Boekema, E. J.; Gruber, G. Structural Characterization of ATPase Active F₁-V₁ – ATPase Hybrid Complex,. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 46, 47866-47870, 2004.

Chatterjee, D.; Chakraborty, M.; Leit, M.; Neff, L.; Jamsa-Kellokumpu, S.; Fuchs, R.; Bartkiewicz, M; Hernando, N.; Baron, R. The osteoclast proton pump differs in its pharmacology and catalytic subunits from other vacuolar H⁺-ATPases. *Journal of Experimental Biology*, 172, 193-204, 1992.

Chifflet, S.; Torriglia, A.; Chiesa, R.; Tolosa, S. A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPase. *Anal Biochem*, 168, 1-4, 1988.

Cho, Y. H.; Yoo, S. D.; Sheen, J. Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase 1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127, 579-589, 2006.

Chun, A. H. C.; Eason, C. J.; Shi, H. H.; Cavanaugh. Lansoprazole: An Alternative Method of Administration of a capsule dosage formulation. *Clinical Therapeutics*, 17, 3,441-447, 1995.

Cipriano, D. J.; Wang, Y.; Bond, S.; Hinton, A.; Jefferies, K. C.; Qi, J.; Forgac, M. Structure and Regulation of the Vacuolar ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1-6, 2008.

Cuvier, C.; Jang, A.; Hill, R. P. Exposure to hypoxia, glucose starvation and acidosis effect on invasive capacity of murine tumor cells and correlation with cathepsin (L+B) secretion. *Clinical Experimental Metastasis*, 19-25, 1999.

Dang, C.V.; Semenza, G.L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochemical Sciences*, 24, 68-72, 1999.

De Milito, A.; Iessi, E.; Logozzi, M.; Lozupone, F.; Spada, M.; Marino, M. L.; Federici, C.; Perdicchio, M.; Matarrese, P.; Lugini, L.; Nilsson, A.; Fais, S. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cells tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Research*, 5408- 5417, 2007.

Díaz-Ruíz, R.; Avéret, N.; Araiza, D.; Pinson, B.; Uribe-Carvajal, S.; Devin, A.; Rigoulet, M. Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. *The Journal of biological Chemistry*, 283, 26948-26955, 2008.

Drory, O.; Nelson, N. The Emerging Structure of Vacuolar ATPases. *Physiology*, 21, 317-325, 2006.

Fais, S.; Milito, A. D.; You, H.; Qin, W. Targeting Vacuolar H⁺- ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Research*, 67, 10627- 10630, 2007.

Figura, N.; Crabtree, J. E.; Dattilo, M. In-vitro activity of lansoprazole against *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, 585-590, 1997.

Fiske, C. H.; Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, 66, 375-400, 1925.

Fletcher, P. A.; Scriven, D. R.; Schulson, M. N.; Moore, E. D. Multi-Image colocalization and its statistical significance. *Biophys Journal*, 99, 1996-2005, 2010.

Forgac, M. Structure, Function and Regulation of the Coated Vesicle V-ATPase. *Journal of Experimental Biology* 172, 155-169, 1992.

Forgac, M. Structure, function and regulation of the vacuolar H⁺-ATPases. *FEBS Letters*, 258-263, 1998.

Forgac, M. Structure and Properties of Vacuolar (H⁺)-ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 19, 12951-12954, 1999.

Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotatory proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 917-929, 2007.

Funes, J. M.; Quintero, M.; Henderson, S.; Martinez, D.; Qureshi, U.; Westwood, C.; Clements, M. O.; Bourboulia, D.; Pedley, R. B.; Moncada, S.; Boshoff, C. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *PNAS*, 104 6223-6228, 2007.

Garrido, R. G. Tese de Doutorado: Absorção e Assimilação de Amônio em Duas Variedades de Arroz: uma Integração entre o Metabolismo de Nitrogênio e de Carbono. Curso de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. Disponível em www.ia.ufrj.br.

Gatenby, R. A.; Gawlinski, E. T. The glycolytic phenotype in carcinogenesis and tumor invasion: insights through mathematical models. *Cancer Research*, 3847-3854, 2003.

Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4, 891-899, 2004.

Gatenby, R. A.; Gawlinski, E. T.; Gmitro, A. F.; Kaylor, B.; Gillies, R. J. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Research*, 66, 5216-5223, 2006.

Gatenby, R. A.; Smallbone, K. Maini, P. K.; Rose, F., Averill, J.; Nagle, R. B.; Worrall, L.; Gillies, R. J. Cellular adaptations to hypoxia and acidosis during somatic evolution of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 97, 646-653, 2007.

Gillies, R. J.; Martínez-Zaguilán, R.; Martínez-Zaguilán, G. M.; Serrano, R.; Perona, R. Tumorigenic 3T3 cells maintain an alkaline intracellular pH under physiological conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol 87, 7414-7418, 1990.

Gillies, R. J.; Martínez-Zaguilán, R. Regulation of Intracellular pH in Balb/c 3T3 Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 3, 1551-1556, 1991.

Gillies, R. J.; Robey, I.; Gatenby, R. A. Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *The Journal of Nuclear Medicine*, 49, 24-41, 2008.

Gluck, S. V-ATPase of the Plasma Membrane. *Journal of Experimental Biology*, 172, 29-37, 1992.

Godinot, C.; Laplanche, E.; Hervouet, E.; Simonnet, H. Actually of Warburg's views in our understanding of renal cancer metabolism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39 , 235-241, 2007.

Goel, A. Mathupala, S. P.; Pedersen, P. L. Glucose metabolism in cancer: evidence that demethylation events play a role in activating type II hexokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 15333-15340, 2003.

Gogarten, P. J.; Starke, T.; Kibak, H.; Fishmann, J.; Taiz, L. Evolution and isoforms of V-ATPase subunits. *Journal of Experimental Biology*, 172, 137-147, 1992.

Gonzalez-Romo, P. Sanchez-Nieto, S.; Gavilanes-Ruiz, M. A modified colorimetric method for determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem*, 200, 235-238, 1992.

Gottlieb, R. A.; Giesing, H. A.; Zhu, J. Y.; Engler, R.L.; Babior, B. M. Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H⁺-ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 5965-5968, 1995.

Graham, C. H.; Forsdike, J.; Fitzgerald, C. J.; Macdonald-Goodfellow, S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via up regulation of urokinase receptor expression. *International Journal of Cancer*, 80, 617-623, 1999.

Grinstein, S.; Nanda, A.; Lukacs, G.; Rotstein, O. V-ATPases in Phagocytic Cells.. *Journal of Experimental Biology*, 172, 179-192, 1992.

Grossniklau, H. E.; Oakman, J. H.; Cohen, C.; Calhoun Jr., P.; DeRose, P. B.; draws-Botsch, C. Histopathology, Morphometry, and Nuclear DNA Content of Iris Melanocytic Lesions. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38, 745-750, 1995.

Gruber, G.; Wieczorek, H.; Harvey, W. R.; Muller, V. Structure- Function Relationships of A-,F- and V-ATPases. *The Journal of Experimental Biology*, 204, 2597-2605, 2001.

Guerra, M. R.; Gallo, C. V. M.; Mendonça, G. A. S. The risk of Cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies, 2005. Disponível em www.inca.gov.br.

Guimarães, F. S. F.; Andrade, L. F.; Martins, S. T.; Abud, A. P.R.; Sene, R. V.; Wanderer, C.; Tiscornia, I.; Bollati-Fogolín, M.; Buchi, D. F.; Trindade, E. S. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcearia carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. *BMC Cancer*, 10, 113, 1-14, 2010.

Gupta, G. P.; Massagué, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127, 679-695, 2006.

Guppy, M.; Leedman, P.; Zu, X.; Russell, V. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical Journal*, 364, 309-315, 2002.

Guppy, M. The hypoxic core: a possible answer to the cancer paradox. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299 , 676-680, 2002.

Hakulinen, J.K.; Klyszejko, A. L.; Hoffman, J.; Eckhardt-Strelau, L.; Brutschy, B.; Vonck, J.; Meier, T. Structural study on the architecture of the bacterial ATP synthase Fo motor. *PNAS*, 10, 1-7, 2012.

Halaban, R.; Patton, R. S.; Cheng, E.; Svedine, S.; Trombetta, E. S.; Wahl, M. L.; Ariyan, S.; Hebert, D. N. Abnormal Acidification of Melanoma Cells Induces Tyrosinase Retention in the Early Secretory Pathway.. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 17, 14821-14828, 2002.

Haas, M.; Wang, H.; Tian, J.; Xie, Z. Src-mediated Inter-receptor Cross-talk between the Na⁺-K⁺-ATPase and the Epidermal Growth Factor Receptor relays the signal from Ouabain to mitogen-activated Protein Kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 18694-18702, 2002.

Helmlinger, G.; Yuan, F.; Dellian, M.; Jain, R. K. Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo : high resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature Medicine*, 3, 1284-1291, 1997.

Hille, B. V.; Richener, H.; Evans, D. B.; Green, J. R.; Bilbe, G. Identification of Two Subunit A Isoforms of the Vacuolar H⁺-ATPase in Human Osteoclastoma. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 10, 7075-7080, 1993.

Hille, C.; Walz, B. A vacuolar-type H⁺-ATPase and a Na⁺/H⁺ exchanger contribute to intracellular pH regulation in cockroach salivary ducts. *The Journal of Experimental Biology*, 210, 568- 576, 2007.

Hinton, A.; Sennoune, S. R.; Bond, S.; Fang, M.; Reuveni, M.; Sahagian, G. G.; Jay, D.; Martínéz-Zaguilán, R.; Forgac, Michael. Function of a subunit isoforms of the V-ATPase in pH homeostasis and in vitro invasion of MDA-MB231 human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 16400-16408, 2009.

Hoeckel, M.; Schlenger, K.; Aral, B.; Mitze, M.; Schaffer, U.; Vaupel, P. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Research*, 4509-4515, 1996.

Hoeckel, M.; Schelenger, K.; Hoeckel, S.; Vaupel, P. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer research*, 4525-4528, 1999.

Hoeckel, M.; Vaupel, P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 266- 276, 2001.

Hsu, P. P.; Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134, 703-707, 2008.

Huss, M.; Wieczorek, H. Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *The Journal of Experimental Biology*, 212, 341-346, 2009.

INCA - Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2012.

INCA - Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil 2014.

Ibsen, K. H. The Crabtree effect: a review. *Cancer Research*, 21, 829-841, 1961.

Izumi, H.; Torigoe, T.; Ishiguchi, H.; Uramoto, H.; Yoshida, Y.; Tanabe, M.; Ise, T.; Murakami, T.; Yoshida, T.; Nomoto, M.; Kohno, K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 29, 541-549, 2003.

Jemal, Ahmedin; Siegel, Rebecca; Ward, Elizabeth; Hao, Yongping; Xu, Jiaquan, Murray, Taylor; Thun, Michael J. *Cancer Statistics. CA Cancer Journal Clinic*, 2, 58, 71-96 2008.

Jemal, A.; Siegel, R.; Xu, J.; Ward, E. *Cancer Statistics, CA Cancer Journal Clinical*, 60, 277-300, 2010.

Jonckheere, A. I.; Smeitink, J. A. M.; Rodenburg, R. J. T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *Journal Inherit Metabolic Disease*, 35, 211-225, 2012.

Kane, Patricia. The Where, When and How of Organelle Acidification by the Yeast Vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 70, 1, 177-191, 2006.

Karbowniczek, M.; Chosia, M.; Domagala, W. Nuclear morphometry of MIB-1 positive and negative tumor cells in primary and metastatic malignant melanoma of the skin. *Polish Journal of Pathology*, 50, 235-241, 1999.

Katabi, M. M.; Chan, H. L. B.; Karp, S. E.; Batist, G. Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Human Gene Therapy*, 10, 155-164, 1999.

Kawai, Y.; Kaidoh, M.; Yokoyama, Y.; Ohhashi, T. Cell surface F₁/F_o ATP synthase contributes to interstitial flow-mediated development of the acidic microenvironment in tumor tissues. *American Journal Physiology Cell Physiology*. Article in Press. doi:10.1152/ajpccell.00199.2013, 2013.

Khatib, A. M.; Siegfried, G.; Chrétien, M.; Metrakos, P.; Seidah, N. G. Proprotein convertases in tumor progression and malignancy. *American Journal of Pathology*, 160, 6, 1921-1935, 2002.

Kikuchi, Y.; Sato, S.; Sugimura, T. Hexokinase isozyme patterns of human uterine tumors. *Cancer*, 30, 444-447, 1972.

Koppenol, W. H.; Bounds, P. L.; Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11, 325-337, 2011.

Larson, S. M. Positron emission tomography-based molecular imaging in human cancer: exploring the link between hypoxia and accelerated glucose metabolism. *Clinical Cancer Research*, 10, 2203-2204, 2004.

Li, Z.; Zhang, Z.; Xie, J. X.; Li, X.; Tian, J.; Cai, T.; Cui, H.; Ding, H.; Saphiro, J. I.; Xie, Z. Na/K-ATPase mimetic pNaKtide inhibits the growth of human cancer cells. *The Journal of Biological Biochemistry*, 286, 37, 32394-32403, 2011.

Liang, M.; Cai, T.; Tian, J.; Qu, W.; Xie, Z.J. Functional characterization of Src-interacting Na/K-ATPase using RNA interference assay. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 28, 19709-19719, 2006.

Lim, J. H.; Park, J. W.; Kim, M. S.; Park, S. K.; Johson, R. S., Chun Y. S. Bafilomycin induces the p21-mediated growth inhibition of cancer cells under hypoxic conditions by expressing hypoxia-inducible factor-1 α . *Molecular Pharmacology*, 70, 6, 1856-1865, 2006.

Lotze, M.T.; Dallal, R.M.; Kirkwood, J.M.; Flickinger, J.C. Melanoma: Cutaneous melanoma. Devita, V.T.Jr; Hellman, S.; Rosenberg, S.A. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6 ed. Lippincott and Williams & Wilkins, 2001.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A.; Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1951.

Lu, X.; Qin, W.; Li J.; Tan N.; Pan, D.; Zhang, H.; Xie, L.; Yao, G.; Shu, H.; Yao, M.; Wan, D.; Gu, J.; Yang, S. The Growth and Metastasis of Human Hepatocellular Carcinoma Xenografts are Inhibited by Small Interfering RNA Targeting to the Subunit ATP6L of Proton Pump. *Cancer Research*, 65, 6843- 6849, 2005.

Luciani, F.; Spada, A. D. M.; Molinari, A.; Rivoltini, L.; Montinaro, A.; Marra, M.; Lugini, L.; Logozzi, M.; Lozupone, F.; Federici, C.; Lessi, E.; Parmiani, G.; Arancia, G.; Belardelli, F.; Fais, S. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 22, 1702-1713, 2004.

Macheda, M. L.; Rogers, S. Best, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 202, 654-662, 2005.

Mareel, M.; Leroy, A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiology Review*, 83, 338- 376, 2003.

Mares-Perlman, J. A.; Shrago, E. Energy substrate utilization in freshly isolated Morris Hepatoma 7777 cells. *Cancer Research*, 48, 602-608, 1988.

Marín-Hernández, A.; Rodríguez-Enríquez, S.; Vital-González, P. A.; Flores-Rodríguez, F. L.; Macías-Silva, M.; Sosa-Garrocho, M.; Moreno-Sánchez, R. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells: Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *FEBS Journal*, 273, 1975-1988, 2006.

Martin, F. G.; Harvey, W. R. Ionic Circuit Analysis of K^+/H^+ Antiport and Amino Acid/ K^+ Symport Energized by a Proton-Motive Force in *Manduca sexta* Larval Midgut Vesicles. *Journal of Experimental Biology*, 196, 77-92, 1994.

Martínez-Zaguilán, R. ; Lynch, R. M.; Martínez, G. M.; Gillies, R. J. Vacuolar-type H^+ -ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *American Physiological Society*, 1015-1029, 1993.

Martínez-Zaguilán, R.; Martínez, G. M.; Gomez, A.; Hendrix, M. J. C.; Gillies, R. J. Distinct Regulation of pH and Ca^{+2} in Human Melanoma Cells with Different Metastatic Potential. *Journal of Cellular Physiology*, 176, 196-205, 1998.

Martínez-Zaguilán, R.; Raghunand, N.; Lynch, R. M.; Bellamy, W.; Martínez, G. M.; Rojas, B.; Smith, D.; Dalton, W. S.; Gillies, R. J. Ph and drug Resistance. I. Functional Expression of Plasmalemmal V-type H^+ -ATPase in Drug-Resistant Human Breast Carcinoma Cell Lines. *Biochemical Pharmacology*, 57, 1037-1046, 1999.

Mattsson, J. P.; Keeling, D. J. Bafilomicin as a probe for the transmembrane proton channel of the osteoclast vacuolar H^+ -ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1280, 98- 106, 1996.

Mathupala, S. P.; Rempel, A.; Pedersen, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 16918-16925, 1995.

Mathupala, S. P., Ko, Y. H., Pedersen, P. L.: Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the "Warburg effect" and a pivotal target for effective therapy. *Seminars Cancer Biology*, 19,1, 17-24, 2009.

Mathupala, S. P., Ko, Y. H., Pedersen, P. L.: The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 1225-1230, 2010.

Mazurek, S.; Michel, A.; Eigenbrod, E. Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 4941-4952, 1997.

Meienhofer, M.; Medicis, E.; Cognet, M.; Kahn, A. Regulation of genes for glycolytic enzymes in cultured rat hepatoma cell lines. *European Journal of Biochemistry*, 169, 237-243, 1987.

Miller, A. J.; Mihm, M. C. Mechanisms of disease. *The New England Journal of Medicine*, 51-65, 2006.

Modica-Napolitano, J. S.; Singh, K. K. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*, 4, 755-762, 2004.

Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S.; Marín-Hernández, A.; Saavedra, E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal*, 274, 1393-1418, 2007.

Moriyama, Y. Membrane Energization by Proton Pumps is Important for Compartmentalization of Drugs and Toxins: a New Type of Active Transport. *The Journal of Experimental Biology* 199, 1447-1454, 1996.

Nakamura, S. Glucose activates H⁺-ATPase in kidney epithelial cells. *American Journal Physiology Cell Physiology*, 287, 97-105, 2003.

Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N' dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore forming protein VDAC. *Biochemistry*, 25,1015-21, 1986.

Nakashima, R. A.; Paggi, M. G.; Scott, L. J.; Pedersen, P. L. Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from highly glycolytic AS-30D rat hepatoma cell line. *Cancer Research*, 48, 913-919, 1988.

Nishi, T.; Forgac, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases-nature's most versatile proton pumps. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 2, 94-103, 2002.

Nishi, T.; Kawasaki-Nishi, S.; Forgac, M. Expression and Function of the Mouse V-ATPase d Subunit Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 47, 396-46402, 2003.

Nelson, N.; Perzov, N.; Cohen, A., Hagai, K.; Padler, V.; Nelson, H. The Cellular Biology of Proton-Motive Force Generation By V-ATPases. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 89-95, 2000.

Oda Y, Tsuneyoshi M. A comparative study of nuclear morphometry and proliferating activity in neuroectodermal tumors of bone and Ewing's sarcoma of bone. *General & Diagnostic Pathology*, 141, 2, 121-129, 1995.

Oda, Y; tsuneyoshi, M. A comparative study of nuclear morphometry and proliferating activity in neuroectodermal tumors of bone and Ewing's sarcoma of bone.

Okorokov, L. A. & Lichko, L. P. The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carsbergensis*; ATPases is electrogenic H⁺ translocate. *FEBS Letters*, 155, 102-106, 1983.

Oliveira, M. F.; Amoêdo, N. D.; Rumjanek, F. D. Energy and redox homeostasis in tumor cells. *International Journal of Cell Biology*, 1-15, 2012.

Osthus, R. C.; Shim, H.; Kim, S.; Li, Q.; Reddy, R.; Mukherjee, M.; Xu, Y.; Wonsey, D. Lee, L. A.; Dang, C. V. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *Journal Biological Chemistry*, 275, 21797-21800, 2000.

Papandreou, I.; Cairns, R. A.; Fontana, L.; Lim, A. L.; Denko, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metabolism*, 3, 187-197, 2006.

Park, S.; Ozden, O.; Jiang, H.; Cha, Y. I.; Pennington, D.; Aykin-Burns, N.; Spitz, D. R.; Gius, D.; Kim, H. Sirt3, mitochondrial ROS, ageing and carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 6226-6239, 2011.

Paroutis, P.; Touret, N.; Grinstein, S. The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation. *Physiology*, 19, 207-215, 2004.

Pedersen, P.L., Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Progress in Experimental Tumor Research*; 22, 190-274, 1978.

Pedersen, M. W. B.; Holm, S.; Lund, E. L.; Hojgaard, L.; Kristjansen, P. E. G. Coregulation of glucose uptake and vascular endothelium growth factor (VEGF) in two small-cell lung cancer (SCLC) sublines in vivo and in vitro. *Neoplasia*, 3, 80-87, 2001.

Pedersen, P.L., Mathupala S, Rempel A, Geschwind JF, Ko YH. Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1555, 14-20, 2002.

Pedersen, P.L.: Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40, 123-126, 2008.

Pereira, F. B.; Burnier Jr., M. N.; Shibata, H.; Wang, B.; Carey, W. Cytomorphometric Parameters and the Metastatic Potential of Cutaneous and Uveal Melanoma. *The American Journal of Dermatology*, 23, 304-307, 2001.

Perona, R.; Serrano, R. Increased pH and tumorigenicity of fibroblasts expressing a yeast proton pump. *Nature*, 334, 438-440, 1988.

Petrangolini, G.; Supino, R.; Pratesi, G.; Dal Bo, L.; Tortoreto, M.; Croce, A. C. ; Misiano, P.; Belfiore, P.; Farina, C.; Zunino, F. Effect of a Novel Vacuolar-H⁺-ATPase Inhibitor on Cell and Tumor Response to Camptothecins. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*, 318, 3, 939-946, 2006.

Pouyssegur, J.; Dayan, F.; Mazure, N. M. Hypoxia signaling in cancer and approaches to enforce tumor regression. *Nature*, 441, 437-443, 2006.

Preston, T. J.; Abadi, A.; Wilson, L. Singh, G. Mitochondrial contributions to cancer cell physiology: potential for drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49, 45-61, 2001.

Qi, J.; Forgac, M. Cellular Environment is Important in Controlling V-ATPase Dissociation and Its Dependence on Activity. *The Journal of Biochemistry*, 282, 34, 24743-24751, 2007.

Racker, E.; Wu, R. Limiting factors in glycolysis of ascites tumour cells and the Pasteur effect. *Regulation of Cell Metabolism*, 205-229, 1958.

Rajendran, J. G.; Mankoff, D. A.; O'Sullivan, F.; Peterson, L. M.; Schwartz, D. L.; Conrad, E. U.; Spence, A. M.; Muzi, M.; Farwell, D. G.; Krohn, K. A. Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [^{18}F] fluoromisonidazole and [^{18}F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging. *Clinical Cancer Research*, 10, 2245-2252, 2004.

Rempel, A.; Bannasch, P.; Mayer, D. Differences in expression and intracellular distribution of hexokinase isoenzymes in rat liver cells of different transformation stages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219, 660-668, 1994.

Rempel, A. Mathupala, S. P.; Griffin, C. A.; Hawkins, A. L.; Pedersen, P. L. Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type II hexokinase. *Cancer Research*, 56, 2468-2471, 1996.

Rho, M.; Kim, J.; Jee, C.; Lee, Y. M.; Lee, H. E.; Kim, M. A.; Lee, H. S.; Kim, W. H. Expression of type 2 hexokinase and mitochondria-related genes in gastric carcinoma tissues and cell lines. *Anticancer Research*, 27, 251-258, 2007.

Ribeiro, C. C.; Monteiro, R. M.; Freitas, F. P.; Retamal, C.; Teixeira, L. R. S.; Palma, L. M.; Silva, F. E.; Facanha, A. R.; Okorokova-Facanha, A. L.; Okorokov, L. A. Extracellular glucose increases the coupling capacity of the yeast V H⁺-ATPase and the resistance of its H⁺ transport activity to nitrate inhibition. *Plos one*, 7, 11, 1-11, 2012.

Ries, L. A. G.; Eisner, M. P.; Kosary, C. L.; Hankey, B. F.; Miller, B. A.; Clegg, L.; Edwards, B. K. (eds). *Seer Cancer Statistics Review*, 2000.

Rivenson-Segal, D.; Boldin-Adamsky, S.; Seger, D.; Seger, R. Degani, H. Glycolysis and glucose transporter 1 as markers of response to hormonal therapy in breast cancer. *International Journal Cancer*, 107, 177-182, 2003.

Robey, I. F.; Lien, A. D.; Welsh, S. J.; Bagget, B. K.; Gillies, R. J. Hypoxia-inducible factor-1 α and the glycolytic phenotype. *Neoplasia*, 7, 324-330, 2005.

Rodríguez-Enríquez, S.; Juárez, O.; Rodríguez-Zavala, J. S.; Moreno-Sánchez, R. Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *European Journal of Biochemistry*, 268, 2512-2519, 2001.

Rojas, J. D. ; Sennoune, S. R.; Maiti, D.; Bakunts, K.; Reuveni, M.; Sanka, S. C.; Martínéz, G. M.; Seftor, E. A.; Meininger, C. J.; Wu, G.; Wesson, D. E.; Hendrix, M. J. C.; Martínéz-Zaguilán, R. Vacuolar-type H⁺-ATPases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. *American Journal Physiology Heart Circulation Physiology*, 291, 1147- 1157, 2006.

Samarão, S.S.; Teodoro, C. E.S.; Silva, F. E.; Ribeiro, C. C; Bernardes, N. R.; Retamal, C. A.; Okorokova-Facanha, A.; Facanha, A. R.; Okorokov, L. A. V H⁺-ATPase along the yeast secretory pathway: energization of the ER and Golgi membranes. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1788, 303-313, 2009.

Sartorelli, A. C. Therapeutic attack of hypoxic cells of solid tumors: presidential address. *Cancer Research*, 48, 775-778, 1988.

Schlappack, O. K.; Zimmerman, A.; Hill, R. P. Glucose starvation and acidosis: effect on experimental metastatic potential, DNA content and MTX resistance of murine tumor cells. *British Journal of Cancer*, 64, 663-670, 1991.

Sennoune, S. R.; Bakunts, K.; Martínéz, G. M.; Chua-Tuan, J. L.; Kebir, Y.; Attaya, M. N.; Martínéz-Zaguilán, R. Vacuolar H⁺-ATPase in Human Breast Cancer Cells with Distinct Metastatic Potential: Distribution and Functional Activity. *American Journal Physiology Cell Physiology*, 1443-1452, 2004.

Sennoune, S. R.; Martínéz-Zaguilán, R. Plasmalemmal vacuolar H⁺-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39, 427-433, 2007.

Sennoune, S. R.; Martínéz-Zaguilán, R. Vacuolar H⁺-ATPase signaling pathway in cancer. *Current Protein and Peptide Science*, 13, 152-163, 2012.

Skou, J. C.; Esmann, M. The Na,K-ATPase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 24, 3, 249-261, 1992.

Sloane, B. F.; Honn, K. V.; Sadler, J. G.; Turner, W. A.; Kimpson, J. J.; Taylor, J. D. Cathepsin B Activity in B16 Melanoma cells: A possible marker for metastatic potential. *Cancer Research* 42, 980-986, 1982.

Smolková, K.; Plecítá-Hlavatá, L.; Bellance, N.; Bernard, G.; Rossignol, R.; Jezek, P. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43, 950-968, 2011.

Sobel, R. E.; Sadar, M. D. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines - part 1. *Journal of Urology*, 173, 342-359, 2005.

Sober, A.J.; Kho, H.K. Melanoma e outras lesões cutâneas pigmentadas. In: Isselbacher K.J.; Braunwald, E.; Wilson, J.D.; Martin, J.B.; Fauci, A.S.; Kasper, D.L. Harrison: Medicina Interna. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1958-1962, 1995.

Stewart, A. G.; Sobti, M. Harvey, R. P.; Stock, D. Rotatory ATPases models, machine elements and technical specifications. *BioArchitecture*, 3, 1, 2-12, 2013.

Summer, J.P.; Dow, J. A. T.; Earley, F. G. P.; Klein, U.; Jager, D.; Wieczorek, H. Regulation of Plasma Membrane V-ATPase activity by dissociation of peripheral subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 10, 1995.

Supino, R.; Petrangolini, G.; Pratesi, G.; Tortoreto, M.; Favini, E.; Dal Bo, L.; Casalini, P.; Radaelli, E.; Croce, A. C.; Bottiroli, G.; Misiano, P.; Farina, C.; Zunino, F. Antimetastatic Effect of a small-molecule vacuolar H⁺-ATPase inhibitor in vitro and in vivo preclinical studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324, 15-22, 2008.

Supino, R.; Scovassi, A. I.; Croce, A. C.; DalBo, L.; Favini, E.; Corbelli, A.; Farino, C.; Misiano, P.; Zunino, F. Biological effects of a new vacuolar-H⁺-ATPase inhibitor in colon carcinoma cell lines. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1171, 606-615, 2009.

Teicher, B. A. Hypoxia and drug resistance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 13, 139-168, 1994.

Thelen, A. P.; Wilson, J. E. Complete amino acid sequence of the type II isozyme of rat hexokinase, deduced from the cloned cDNA: comparison with a hexokinase from Novikoff ascites tumor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 286, 645-651, 1991.

Thiebaut, F.; Currier, S. J.; Whitaker, J.; Haugland, R. P.; Gottesman, M. M.; Pastan, I.; Willingham, M. C. Activity of the multidrug transporter results in alkalinization of the cytosol: measurement of cytosolic pH by microinjection of a pH- sensitive dye. *Journal Histochemical Cytochemical*, 28, 685- 690, 1990.

Togashi, K.; Kataoka, T.; Nagai, K. Characterization of a series of vacuolar type H⁺-ATPase inhibitors on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunology Letters*, 55, 139-144 , 1997.

Tokhtaeva, E.; Clifford, R. J.; Kaplan, J. H.; Sachs, G.; Vagin, O. Subunit isoform selectively is assembly of Na,K-ATPase α - β heterodimeros. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 26115-26125, 2012.

Torigoe, T.; Izumi, H.; Ishiguchi, H.; Uramoto, H.; Murakami, T.; Ise, T.; Yoshida, Y.; Tanabe, M.; Nomoto, M.; Itoh, H.; Kohno, K. Enhanced Expression of the Human Vacuolar H⁺-ATPase c subunit Gene (ATP6L) in Response to Anticancer Agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 39, 36534-36543, 2002.

Tsai HJ, Wilson JE. Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of the rat type III isozyme and its chimeric forms, constructed with the N- and C-terminal halves of the type I and type II isoenzymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 338,183-192, 1997.

Tso, C.; McBride, W.; Sun, J.; Patel, B.; Tsui, K.; Paik, S. H.; Gitlitz, B.; Caliliw, R.; Ophoven, A. V.; Wu, L.; deKernion, J.; Belledegrin, A. Androgen Deprivation induces selective outgrowth of aggressive hormone-refractory prostate cancer clones expressing distinct cellular and molecular properties not present in parental androgen-dependent cancer cells. *Cancer Journal*, 6, 220-233, 2000.

Vaupel, P.; Thews, O.; Hoeckel, M. Treatment Resistance of solid tumors. *Medical Oncology*, 18, 243-259, 2001.

Vitavska, O.; Wieczorek, H.; Merzendorfer, H. A Novel Role for subunit C in Mediating Binding of the H⁺-V-ATPase to the Actin Cytoskeleton. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 20, 18499-18505, 2003.

Vitavska, O.; Merzendorfer, H.; Wieczorek, H. The V-ATPase Subunit C Binds to Polimeric F-actin as Well as to Monomeric G-actin and Induces Cross-linking of Actin Filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 2, 1070-1076, 2005.

Wack, C.; Becker, J.C.; Brocker, E.B.; Lutz, W.K.; Fischer, W.H. Chemoimmunotherapy for melanoma with dacarbazine and 2,4 dinitrochlorobenzene: results from a murine tumor model. *Melanoma Research*, 11, 247-253, 2001.

Walenta, S.; Wetterling, M.; Lehrke, M.; Schwickert, G.; Sundfer, K.; Rofstad, E. K.; Mueller-Klieser, W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Research*, 916-921, 2000.

Wang, Y; Cipriano, D. J.; Forgac, M. Arrangement of Subunits in the Proteolipid Ring of the V-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 47, 34058- 34065, 2007.

Watta, I. N.; Montgomery, M. G.; Runswick, M. J.; Leslie, A. G. W.; Walkera, J. E. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *PNAS*, 107, 10, 16823-16827, 2010.

Wilkins, S.; Forgac, M. Three-dimensional Structure of the Vacuolar ATPase Proton Channel by Electron Microscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 47, 44064-44068, 2001.

Wilkins, S.; Inoue, T.; Forgac, M. Three-Dimensional Structure of the Vacuolar ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 40, 41942-41949, 2004.

Wilson JE. Hexokinases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 126, 65–198, 1995.

Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 206, 2049-57, 2003.

Zhan, H.; Yokoyama, K.; Otani, H.; Tanigaki, K.; Shirota, N.; Takano, S. Ohkuma, S. Different roles of proteolipids and 70-kDa subunits of V-ATPase in growth and death of cultured human cells. *Genes to Cells*, 8, 501-513, 2003.