

**PAPEL DAS V-ATPases PARA OS PROCESSOS DE ADESÃO,  
INVASÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM LINHAGENS DE MELANOMA  
B16-F0 E B16-F10**

Gildeíde Aparecida Costa

**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF**

**Campos dos Goytacazes-RJ**

**Abril-2013**

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

**PAPEL DAS V-ATPases PARA OS PROCESSOS DE ADESÃO,  
INVASÃO E MIGRAÇÃO CELULAR EM LINHAGENS DE MELANOMA  
B16-F0 E B16-F10**

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia pelo programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha**

**Apoio: FAPERJ/UENF**

Aos meus pais Milton e Neli e irmãos  
Ernany e Gilmar.

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, em primeiro lugar, por ter me iluminado e dado forças para chegar até aqui,

À minha família, meus pais Milton e Neli, meus irmãos Ernany e Gilmar, pelo amor e apoio incondicional, sem os quais não teria conseguido transpor as barreiras do caminho,

Ao meu orientador, Dr. Arnaldo Rocha Façanha, por ter me aceitado no grupo e por todos os ensinamentos e palavras de incentivo ao longo da trajetória,

A todos os amigos do grupo de pesquisa, Brunna, Julianna, Inga, Josimara, Janaína, Luis Alfredo, Camila, Raul, Luis, Amanda, pela ajuda durante os experimentos e por todos os momentos de descontração que tornaram a caminhada menos árdua,

À minha querida amiga Letícia Rocha, pela ajuda com a estatística e com todas as outras coisas que precisei durante este tempo, e principalmente pelo alto astral contagiante,

Aos colegas do LBCT, Luciana Lemos, Fernanda, Laura, Saulo Pireda, Juliana Padrão, Josiana Andrade, Lara Pereira, Lara Meneguelli, Jucimara, Mariana, Bruna Pintor e em especial Gabriel Rabelo pela ajuda com os experimentos,

À Gerusa e Maurício, por todas as vezes que me socorreram em momentos de desespero, mas principalmente pela boa vontade em ajudar,

A toda equipe de técnicos e funcionários do LBCT pelo apoio, ensinamentos e incentivo, em especial à Rose, Darli, Adrianinha, Giovana, Arthur, Luciana, Bia, Marlene e em especial a Bia (PAM) por me transmitir conforto e paz em todos os momentos de aflição,

Às minhas queridas amigas, Aline Gomes e Geisy Lopes pelas palavras de carinho e conforto e por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso,

À amiga de república Juliana Bernardo, pela amizade e por todos os momentos de aventura, choro, riso, enfim por ter tornado a caminhada mais leve,

Ao meu querido Francisco, por todos os ensinamentos, apoio e incentivo,

Aos colegas do LBR, em especial a Daniele Seipel, Tatiana Ventura e Fabrício pela ajuda com protocolos e execução dos experimentos,

À professora Andrea Cristina Vetö Arnholdt pela ajuda com os protocolos e reagentes e por ter aceitado o convite para banca de defesa da dissertação,

Ao professor Renato Augusto DaMatta e a Dr. Camila Ribeiro pela participação em banca de defesa de projeto,

À Dra Darli Grativol pela revisão do trabalho,

À professora Gilma Trindade e Renata Ottes pelo envio da linhagem Melan-A,

As professoras Ana Paula Votto e Fernanda Antunes por aceitarem integrar a banca de defesa da dissertação,

A todos os professores que colaboraram com a minha formação até aqui,

A todos os amigos que ajudaram direta ou indiretamente,

A UENF pela bolsa concedida.

# SUMÁRIO

<b>Abreviações</b> .....	8
<b>Resumo</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	10
<b>Lista de Figuras</b> .....	11
<b>1. Introdução</b> .....	13
<b>2. Revisão de Literatura</b> .....	16
2.1. V- ATPases.....	16
2.2. Funções das V-ATPases específicas na fisiologia das células animais.....	18
2.3. V-ATPases no câncer.....	20
2.4. Inibidores de V-ATPases.....	22
2.5. Invasão .....	25
2.6. Migração celular .....	26
2.7. Melanoma.....	31
<b>3. Hipótese</b> .....	34
<b>4. Objetivos</b> .....	35
4.1. Objetivo Geral.....	35
4.1.1. Objetivos específicos.....	35
<b>5. Materiais e Métodos</b> .....	36
5.1. Linhagens celulares.....	36
5.2. Drogas testadas.....	36
5.3. Ensaio de proliferação celular.....	36
5.4. Testes de citotoxicidade (ensaio MTT).....	37

5.5. Testes de adesão celular.....	38
5.6. Migração celular .....	38
5.6.1. Ferimento em monocamada.....	38
5.6.2. Transwell.....	39
5.7. Invasão Celular .....	39
5.8. Estatística.....	40
<b>6. Resultados.....</b>	<b>41</b>
6.1. Proliferação Celuar.....	41
6.2. Viabilidade.....	42
6.3. Adesão.....	45
6.4. Migração celular.....	47
6.4.1. Ferimento em monocamada.....	47
6.5. Migração celular usando transwell.....	55
6.6. Invasão celular.....	57
<b>7. Discussão.....</b>	<b>59</b>
<b>8. Conclusão.....</b>	<b>64</b>
<b>9. Referências bibliográficas.....</b>	<b>65</b>

## **Abreviações**

BSA- Albumina Sérica Bovina

ECM- matriz extracelular

MTT-(3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

DMEM- meio eagle modificado

DMSO- Dimetilsulfóxido

SFB- Soro fetal bovino

CONC- concanamicina

MIRT- mirtenal

MMPs- metaloproteases

PBS- tampão fosfato salino

F0- linhagem de melanoma B16-F0

F10- linhagem de melanoma B16-10

nm- nanômetro

$\mu$ M- micromolar

pHi- pH intracelular

pHe- pH extracelular

$\mu$ m- micrômetro

nM-nanomolar

## Resumo

As células tumorais sobrevivem em um microambiente extremamente agressivo para as células normais, composto por um meio extracelular ácido e citoplasma alcalino, condição finamente regulada, onde as V-ATPases figuram como um dos principais sistemas indutor e mantenedor de tal ambiente. Este ambiente favorece os eventos de invasão e migração, passos necessários a formação de metástase. Estágio responsável pela maioria das mortes provocadas por tumores sólidos. Por tanto, torna-se relevante o entendimento dos mecanismos de indução do processo metastático. O presente trabalho avaliou o papel das V-ATPases nos processos de adesão, invasão e migração nas linhagens de melanoma B16-F0 e B16-F10. Foram realizados ensaios de proliferação utilizando MTT como indicador, ensaios de migração baseados em ferimento em monocamada e sistema transwell e ensaios de invasão também utilizando o sistema transwell. Os resultados revelaram que a linhagem B16-F10 é significativamente mais proliferativa que B16-F0. Os inibidores de V-ATPase concanamicina 5-10nM e o monoterpene mirtenal 5-15 $\mu$ M não afetaram de forma significativa a adesão das células ao substrato, porém, mostraram-se muito eficientes na inibição da migração celular nos experimentos de ferimento em monocamada e transwell. Os ensaios de invasão mostraram que a linhagem B16-10 é significativamente mais invasiva do que B16-F0 e que a concanamicina inibiu de forma eficaz a invasão de B16-F10 e totalmente a invasão de B16-F0. Já o monoterpene mirtenal inibiu 100% da invasão em ambas as linhagens. Assim, a linhagem B16-F10 mostrou ter maior capacidade de migração e invasão do que a linhagem B1-6F0 e o inibidor de V-ATPase concanamicina e o monoterpene mirtenal mostraram-se muito eficientes na inibição da migração e invasão celular das linhagens utilizadas sem afetar a viabilidade das mesmas em experimentos *in vitro*.

**Palavras-chave:** V-ATPase, células tumorais, motilidade, inibidores de V-ATPase.

## **Abstract**

The tumor cells surviving in an extremely aggressive microenvironment to normal cells, consisting of an extracellular acid and alkaline cytoplasm, finely regulated condition where the V-ATPase appear as a major inducer systems and maintainer of such an environment. This environment favors the events of invasion and migration steps required for metastasis formation. Stage responsible for most deaths from solid tumors. Therefore, it is relevant to the understanding of the mechanisms of induction of the metastatic process. This study evaluated the role of V-ATPases in the processes of adhesion, invasion and migration in melanoma lines B16-F0 and B16-F10. Proliferation assays were conducted using as an indicator MTT, migration tests based monolayer wound and transwell system and invasion assays also using the transwell system. The results revealed that B16-F10 cell line is significantly more proliferative B16-F0. The V-ATPase inhibitors concanamycin 5-10nM and monoterpene mirtenol 5-15 $\mu$ M did not significantly affect cell adhesion to the substrate, however, proved to be very efficient in inhibiting cell migration in wound monolayer experiments and transwell. The invasion assays showed that B16-F10 cell line is significantly more invasive than B16-F0 and the concanamycin effectively inhibited the invasion of B16-F10 and totally the invasion of B16-F0. Already mirtenol monoterpene inhibited 100% of invasion in both cell lines. Thus, the B16-F10 cell line showed the highest migration capability and invasion than the line B16-F0 and V-ATPase inhibitor concanamycin and monoterpene mirtenol proved very effective in inhibiting the migration and cell invasion of the lines cell used, without affecting the viability the same in vitro experiments.

**Keywords:** V-ATPase, tumor cell, motility, inhibitor of V-ATPase

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Comparação estrutural entre e F e V-ATPase.....	17
<b>Figura 2-</b> Modelo estrutural da V-ATPase.....	18
<b>Figura 3-</b> Função das V-ATPases na membrana plasmática.....	20
<b>Figura 4-</b> V-ATPases em células pouco e altamente invasivas.....	21
<b>Figura 5-</b> Estrutura química da bafilomicina A1 e concanamicina.....	22
<b>Figura 6-</b> Estrutura química da difilina.....	24
<b>Figura 7-</b> Superexpressão das pmV-ATPases.....	28
<b>Figura 8-</b> Proliferação celular.....	41
<b>Figura 9-</b> Teste de citotoxicidade.....	43
<b>Figura 10-</b> Porcentagem de células viáveis.....	44
<b>Figura 11-</b> Número de células aderidas ao substrato.....	46
<b>Figura 12-</b> Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F10.....	48
<b>Figura 13-</b> Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F0.....	49
<b>Figura 14-</b> Efeito do mirtenal sobre a migração celular.....	50
<b>Figura 15-</b> Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F10.....	51
<b>Figura 16-</b> Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F0.....	52
<b>Figura 17-</b> Efeito da concanamicina sobre a migração celular.....	53
<b>Figura 18-</b> Porcentagem de inibição da migração celular.....	54
<b>Figura 19-</b> Micrografia da face inferior do transwell.....	55
<b>Figura 20-</b> Ensaio de migração celular usando transwell.....	56

<b>Figura 21-</b> Porcentagem de inibição da migração celular.....	56
<b>Figura 22-</b> Micrografia da face inferior do transwell.....	57
<b>Figura 23-</b> Invasão celular.....	58

## 1. Introdução

As células tumorais normalmente sobrevivem em um microambiente hipóxico com o pH extracelular menor que o das células normais circundantes (Raghunand et al., 1999). Estas condições não são permissivas para o crescimento celular em tecidos saudáveis e estão associados com a indução da apoptose (Gottlieb et al., 1995). Para a sobrevivência e manutenção do pH citosólico alcalino, as células tumorais exibem uma ativação específica dos mecanismos de extrusão de prótons, principalmente de quatro sistemas transportadores: o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , o transportador bicarbonato  $\text{HCO}_3^-$ , co-transportadores próton-lactato e bombas de prótons (Gillies e Martinez-Zaguilan, 1991; Roos e Boron, 1981). Entre as especializações destes sistemas vem sendo demonstrado na carcinogênese o papel determinante da superexpressão de  $\text{H}^+$ -ATPases vacuolares (pm V-ATPase) na membrana plasmática de algumas células tumorais (Martinez-Zaguilan et al., 1999).

As  $\text{H}^+$ -ATPases vacuolares ou V-ATPases são uma família de bombas de prótons dependentes de ATP responsáveis pela acidificação de uma variedade de compartimentos intracelulares em células eucarióticas, incluindo vesículas revestidas por clatrina, endossomos, lisossomos, aparato de Golgi, vesículas secretórias e vacuólos centrais de plantas e eucariotos inferiores (Stevens e Forgac, 1997; Kane e Stevens, 1992; Bowman, et al., 1992; Anraku et al., 1992; Sze et al., 1992; Kibak et al., 1992). São complexos oligoméricos compostos por multisubunidades totalizando até 830 KDa e dividindo-se em dois domínios funcionais, o domínio  $V_1$  envolvido com a hidrólise de ATP e o domínio  $V_0$  com a translocação de prótons. A V-ATPase requer energia proveniente da hidrólise de ATP para bombear prótons através das membranas celulares. Isto cria um gradiente de pH através da membrana, que resulta em condições ácidas dentro do compartimento intracelular e contribui para a manutenção de um pH relativamente neutro no citoplasma (Sennoune et al., 2004a).

Estas bombas estão envolvidas com a endocitose mediada por receptor, tráfego intracelular de membrana, processamento e degradação de proteínas, transporte de pequenas moléculas e íons e manutenção do pH intracelular. Apesar de energizarem geralmente as endomembranas nos mais diversos tipos de células

eucarióticas, também podem estar presentes nas membranas plasmáticas de algumas células especializadas de mamíferos, onde estas enzimas também desempenham importantes funções, tais como sua atuação nos processos de reabsorção óssea pelos osteoclastos (Li et al., 1999), secreção pelas células intercaladas dos rins (Wagner et al., 2004), homeostase do pH em macrófagos e neutrófilos (Nanda et al., 1996), angiogênese pelas células endoteliais (Rojas et al., 2006) e maturação e armazenamento dos espermatozoides no trato reprodutivo masculino. Nas células calciformes dos insetos, criam um potencial de membrana positivo que dirige a secreção de  $K^+$  através de um antiporte eletrogênico (Pastor-Soler et al., 2003). Tem sido hipotetizado que na célula tumoral a V-ATPase seja a principal responsável pelo microambiente extracelular ácido que favoreceria a migração, invasão e metástase.

A habilidade da célula tumoral de migrar de um sítio primário para um sítio distante está associada com a resistência do tumor a terapia. Do ponto de vista das funções biológicas (desenvolvimento embrionário, organogênese e homeostase) a migração celular apresenta papel crucial. Porém, a desregulação deste processo também está envolvida na progressão do câncer (angiogênese tumoral e metástase) (Lecomte et al., 2011). A formação de metástase é responsável por 90% das mortes causadas por tumores sólidos (Gupta e Massagué, 2006). Como a migração celular representa um dos passos da cascata metastática, inibir esta etapa pode ser uma estratégia para retardar ou até mesmo impedir a formação de metástase, o que representaria um grande avanço no tratamento do câncer (Luo e Guan, 2009; Liu et al., 2009).

Sendo assim, as V-ATPases tornam-se alvos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias, uma vez que esta bomba é superexpressa na membrana plasmática de alguns tumores. Alguns estudos já mostraram que o uso dos inibidores específicos da V-ATPase, bafilomicina e concanamicina, reduzem as taxas de migração de linhagens de câncer de mama e de células endoteliais microvasculares as quais compartilham um microambiente extracelular semelhante com as células tumorais (Sennoune et al., 2004b; Rojas et al., 2006).

Embora o câncer de pele seja o mais freqüente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrado no país, o melanoma representa apenas

4% das neoplasias malignas do órgão. Apesar disso, segundo dados do INCA, o melanoma é um tipo de câncer que apesar da baixa incidência, apresenta alta letalidade devido a sua alta capacidade metastática, assim o entendimento dos processos que permeiam este evento se torna de suma importância.

Desta forma, sabendo-se do envolvimento das V-ATPases no processo de invasão e migração, passos essenciais para formação de metástase, este trabalho visa traçar um perfil de proliferação, adesão, invasão, e migração das linhagens de melanoma murino B16-F0 (menos metastática) e B16F-10 (mais metastática), abordando a contribuição dos inibidores de V-ATPases para tais processos.

## 2. Revisão de literatura

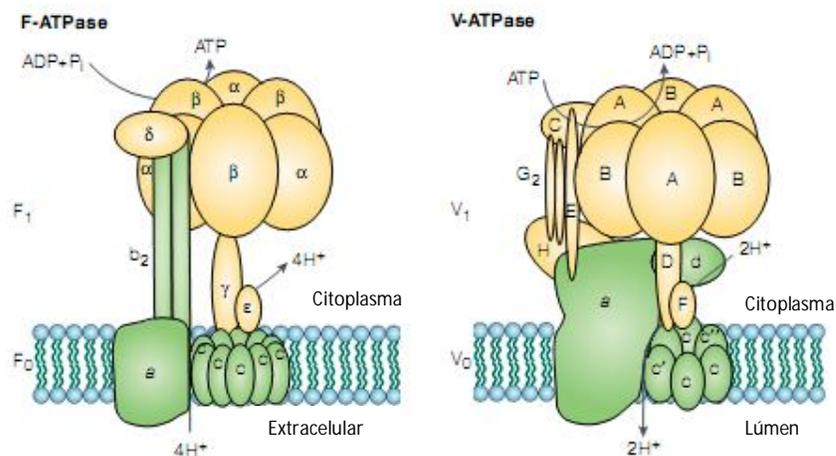
### 2.1. V-ATPases

As V-ATPases são enzimas da classe de bombas de prótons, encontradas inicialmente nas membranas de vesículas ácidas, onde passaram a ser universalmente reconhecidas como a principal bomba eletrogênica das membranas vacuolares (Nelson, 2003) e outras endomembranas. Nos últimos anos estas vêm sendo descritas nas membranas celulares de vários organismos. Estas enzimas participam do controle homeostático, manutenção de um pH citoplasmático adequado e acidificação do interior de muitas organelas das células eucarióticas (Sennoune et al., 2004 b). Para tanto, a V-ATPase mobiliza a energia proveniente da hidrólise de ATP para bombear prótons através das membranas intracelulares. Isto cria um gradiente de pH através da membrana, que resulta em condições ácidas dentro dos compartimentos intracelulares e pH relativamente neutro no citoplasma (Sennoune et al., 2004a). Porém, quando superexpressas na membrana plasmática provocam acidificação do meio extracelular.

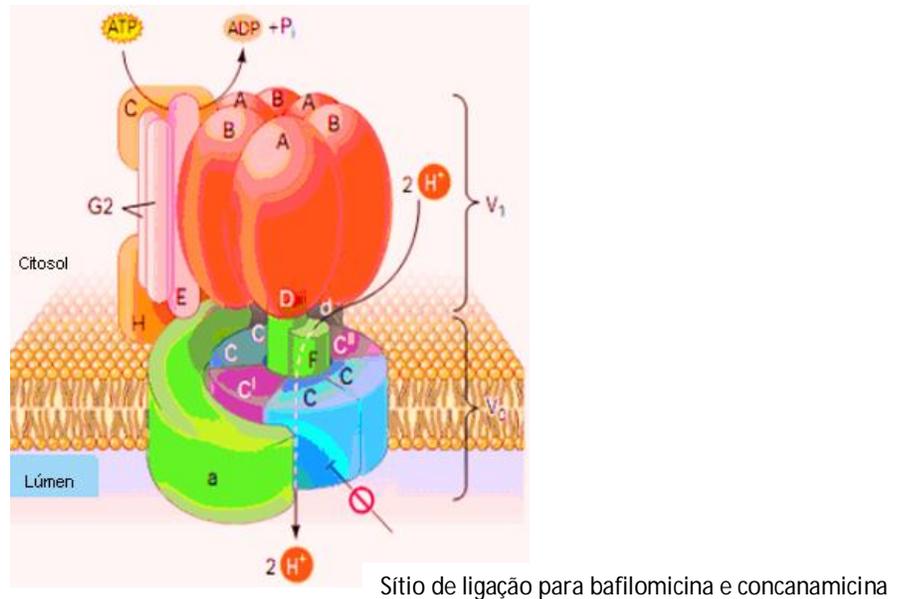
Estruturalmente e evolutivamente as V-ATPases estão relacionadas com as F-ATPases (ou ATP sintases) de mitocôndrias, cloroplastos e bactérias (Fillingame et al., 2000). Ambas são complexos protéicos compostos por multisubunidades, constituídos de setores catalíticos e de membrana. Tanto F- quanto V-ATPases são compostas de setores catalíticos,  $F_1$  ou  $V_1$ , e setores de membrana,  $F_0$  ou  $V_0$ , respectivamente. Apesar de todas as similaridades estruturais sugerirem que a V-ATPase e F-ATPase (Figura 1) usam o mesmo mecanismo básico para hidrólise de ATP, translocação de prótons e acoplamento de energia, elas diferem em muitos aspectos importantes, particularmente em suas funções e regulação (Sennoune et al., 2000). 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).

A holoenzima V-ATPase composta por dois domínios funcionais pesa aproximadamente 830 KDa. O domínio  $V_1$  é um complexo periférico de 570 KDa, composto de oito subunidades (subunidades A-H) cujos pesos moleculares variam de 13-70 KDa, envolvido na hidrólise de ATP. O domínio  $V_0$  é um domínio integral de membrana pesando aproximadamente 260 KDa, composto de cinco subunidades (a, c, c', c'', d) cujos pesos moleculares variam de 17-100 KDa, que proporcionam a translocação dos prótons (Figura 2; Paroutis, Touret e Grinstein, 2004).



**Figura 1-** Comparação estrutural entre e F e V-ATPase. Localização das diferentes subunidades em cada enzima. Adaptado, Nishi e Forgac, 2002.



**Figura 2-** Modelo estrutural da V-ATPase. O modelo mostra as múltiplas subunidades e os domínios  $V_0$  e  $V_1$  (Adaptada de Paroutis, Touret e Grinstein, 2004).

## 2.2. Funções das V-ATPases específicas na fisiologia das células animais

As V-ATPases presentes nos compartimentos intracelulares são importantes para processos celulares normais como: endocitose mediada por receptor, tráfego intracelular de membrana, processamento e degradação de proteínas e transporte de pequenas moléculas e íons. (Wang et al., 2007; De Milito et al., 2007).

As V-ATPases desempenham um papel essencial na endocitose mediada por receptor por fornecer um pH endossomal ácido necessário para ativar a liberação de ligantes internalizados de seus receptores (Forgac, 2007). Estão também implicadas em outros passos no processo endocítico como na formação de vesículas carreadoras endossomais. O brotamento destas vesículas dos endossomos iniciais e a entrega dos ligantes aos endossomos tardios são facilitados pelo pH ácido luminal gerado pelas V-ATPases (Hinton et al., 2009a). Dentro de lisossomos e outras organelas digestivas as V-ATPases fornecem o pH luminal

ácido necessário para a atividade de hidrolases responsáveis pela degradação de proteínas e outras macromoléculas (Forgac, 2007).

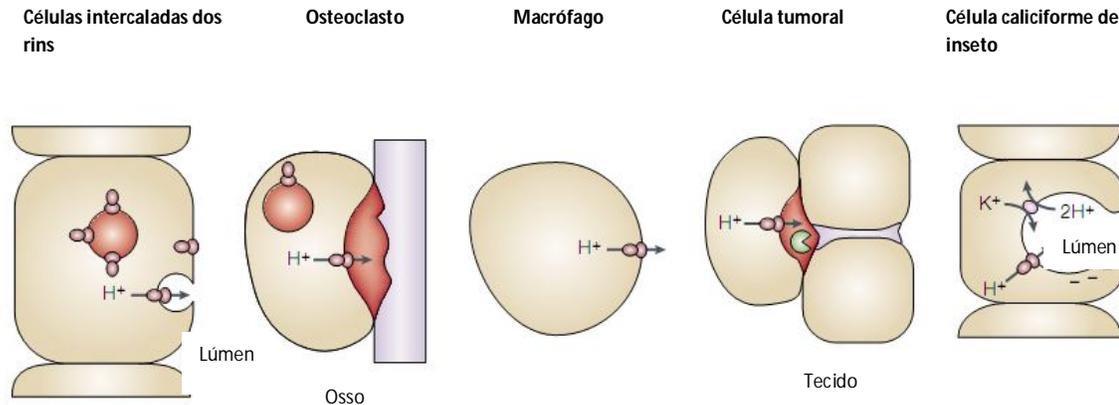
A função mais intrigante das V-ATPases para o tráfego intracelular de membrana não envolve acidificação e sim participação física do domínio  $V_0$  no processo de fusão. Foi visto que as membranas doadoras e aceptoras precisam se unir através de interações de proteínas SNARE cognatas localizadas em cada membrana. O pareamento trans-SNAREs facilita a justaposição do domínio  $V_0$  em membranas adjacentes, as quais juntas com outras proteínas de fusão no complexo catalizam diretamente a fusão através de uma mistura de subunidades proteolípídicas do domínio  $V_0$  (Peters et al., 2001) modelo proposto para leveduras, mas que também se aplica a liberação de insulina pelas células pancreáticas (Sun-Wada et al., 2006).

Em vesículas secretórias, como as vesículas sinápticas e grânulos de cromafin, as V-ATPases fornecem a força motora para o transporte acoplado de pequenas moléculas empregando seu potencial de membrana ou o gradiente de pH gerado (Moriyama e Yahara, 1999). Uma função similar foi observada nos vacúolos de leveduras, onde, por exemplo, o influxo de  $Ca^{2+}$  está associado ao efluxo de prótons (Anraku et al., 1992).

Na membrana plasmática das células de mamíferos, estas bombas desempenham importantes funções: facilitam a reabsorção óssea pelos osteoclastos (Li et al., 1999), secreção pelas células intercaladas dos rins (Wagner et al., 2004), homeostase do pH em macrófagos e neutrófilos (Nanda et al., 1996), angiogênese pelas células endoteliais (Rojas et al., 2006) e maturação e armazenamento dos espermatozóides no trato reprodutivo masculino. Nas células caliciformes dos insetos, criam um potencial de membrana positivo que dirige a secreção de  $K^+$  através de um contra-transporte eletrogênico (Pastor-Soler et al., 2003) (Figura 3).

Estudos realizados por Skinner e Wildeman (1999) provaram que a subunidade c de 16 kDa da V-ATPase se liga ao domínio transmembrana da integrina  $\beta_1$  em mioblastos de rato, e que a superexpressão ou expressão desta subunidade sem a quarta das suas 4 hélices alterou a morfologia de fibroblastos e mioblastos, sugerindo que a interação de 16 kDa com a  $\beta_1$  seja importante para o controle do crescimento celular. Esta mesma subunidade também forma um complexo com a oncoproteína E5 das papilomavíroses, as quais auxiliam E5 a ativar o receptor

PDGF- $\beta$  (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas) envolvido com o crescimento e divisão celular (Andresson et al., 1995).



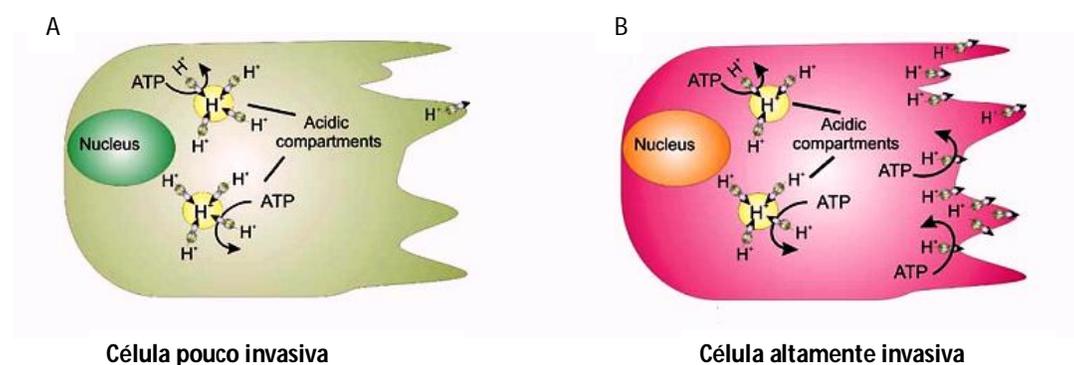
**Figura 3-** Função das V-ATPases na membrana plasmática. Adaptado, Nishi e Forgac, 2002.

### 2.3. V-ATPases no câncer

As V-ATPases desempenham um importante papel no controle do pH intra e extracelular, estando envolvidas com a manutenção de um pH intracelular relativamente neutro, um pH luminal e extracelular ácido através do bombeamento de prótons para o meio extracelular e interior de organelas ácidas (Nishi e Forgac, 2002). As V-ATPases são superexpressas em muitos tipos de câncer metastático e isto está correlacionado positivamente com sua invasão e metástase (Sennoune et al., 2004b; Sennoune et al., 2004a). Em tecidos cancerosos a extrusão de prótons via V-ATPase causa acidificação extracelular e contribui para a manutenção de um gradiente de pH entre o citosol alcalino e meio extracelular ácido.

Quando se comparam células tumorais altamente metastáticas com células tumorais menos metastáticas, observa-se que as primeiras exibem uma densidade

maior de pmV-ATPase (Figura 4). Isto pode ocorrer devido a um aumento da reciclagem de vesículas ou expressão diferenciada de subunidades específicas da V-ATPase que as direcionam para a membrana plasmática. A alta densidade de pmV-ATPase em um dos pólos das células migratórias e invasivas sugere um duplo papel para esta bomba: alcalinização do pH citosólico em um dos pólos e aumento da acidez extracelular favorecendo assim a atividade das proteases e degradação da matriz extracelular (Sennoune e Martinez-Zaguilan, 2007).



**Figura 4-** V-ATPases em células pouco e altamente invasivas. A aquisição do fenótipo invasivo requer a mobilização das V-ATPases de compartimentos ácidos para a membrana plasmática. Adaptado de Sennoune e Martinez-Zaguilan, 2007.

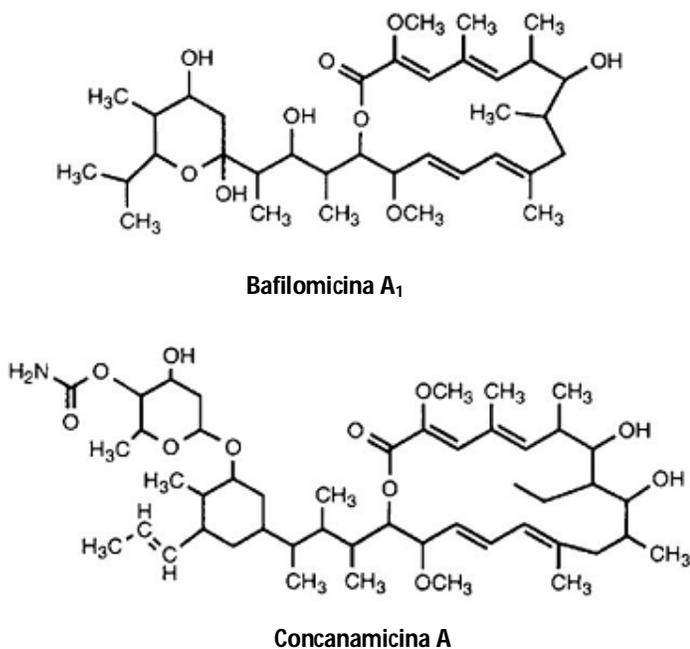
Hinto e colaboradores (2009 b) comprovaram o papel das V-ATPases na invasividade de células de câncer de mama MDA-MB231. Usando RNA de interferência contra as isoformas a4 e a3 da subunidade a, sabidamente responsável pelo direcionamento das V-ATPases para as membranas plasmáticas, foi visto uma redução significativa na expressão da pm-V-ATPase (32% e 18%, respectivamente) e também na invasão celular. A invasão celular estimulada pelas V-ATPases contendo a isoforma a4 se daria pela promoção da acidificação do ambiente extracelular, provocando a ativação de proteases secretadas como as catepsinas e MMPs.

Estas bombas também estão relacionadas à resistência a múltiplas drogas (MDR). Células com fenótipo MDR contêm mais organelas ácidas que as células sensíveis a drogas sugerindo que as organelas ácidas estejam relacionadas à

resistência. Foi visto que drogas antitumorais se acumulam nestas vesículas e são removidas via exocitose, dificultando o tratamento da doença (Willingham et al., 1986).

## 2.4. Inibidores de V-ATPases

Os inibidores de V-ATPases mais estudados e usados são os antibióticos macrolídeos com 18 anéis de lactona, chamados de bafilomicina e concanamicina. (Figura 5). Eles foram isolados de espécies de *Streptomyces* e no início acreditava-se serem inibidores de ATPases do tipo P (Bowman et al., 1988).



**Figura 5-** Estrutura química da bafilomicina A1 e concanamicina A. Adaptado de Bowman e Bowman (2002).

Estudos iniciais mostraram que o sítio de ligação para a bafilomicina A<sub>1</sub>, poderia residir na subunidade *a* da V-ATPase (Zhang et al., 1994). Estudos posteriores,

contudo indicaram a subunidade *c* como sendo parte chave do sítio de ligação para a bafilomicina A<sub>1</sub> (Bowman e Bowman, 2002) e concanamicina A, (Huss et al., 2002) (Figura 2). O mecanismo de ação das drogas consiste na inibição da translocação de prótons pela inibição da rotação do multímero ATP6V0C, o que causa acidose intracitoplasmática (Bowman et al., 2004).

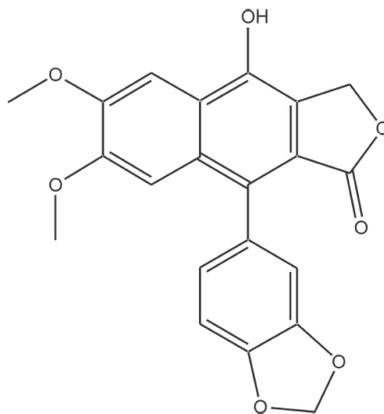
Quando usados em baixas concentrações, bafilomicina e concanamicina são altamente específicos para as V-ATPases. Segundo Teodoro (2004), a concanamicina é mais efetiva que a bafilomicina A<sub>1</sub> com concentrações para inibição das V-ATPases em torno de 1/10 da concentração da bafilomicina A<sub>1</sub>.

A habilidade destas drogas em inibir a acidificação intracelular de organelas ácidas as torna aptas a desenvolver uma ampla gama de atividades biológicas como antiviral, anticâncer e imunossupressora (Guinea e Carrasco, 1994 ; Kataoka et al., 1996; Altan et al., 1998).

Por causa da sua alta eficácia e especificidade *in vivo*, estes inibidores são fortes candidatos ao desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (Keeling et al., 1997; Nelson, 1991), atraindo principalmente atenção como agente terapêutico contra o câncer (Yoshimoto et al., 2002).

Atualmente têm surgido novos inibidores de V-ATPase, entre eles podem-se citar: FR167356, considerado o primeiro inibidor de V-ATPase que pode discriminar entre as V-ATPases de membrana plasmática dos osteoclastos e as V-ATPases lisossomais, destacando-se por ser o primeiro componente a distinguir entre V-ATPases em nível celular (Niikura et al., 2004).

Outro inibidor de V-ATPase que vem sendo estudado é a difilina (Figura 6). Esta droga pode inibir o crescimento e invasão celular e induzir a apoptose em câncer gástrico humano usando a via de sinalização Wnt/  $\beta$  catenina como mecanismo (Shen et al., 2011). Outras moléculas e drogas que inibem as V-ATPases também vem sendo descritos como: NiK12192 (Petrangolini et al., 2006; Bowman et al., 1998; Melikova et al., 2002), FR20126 (Nikura, 2002) e PPI SB242784 (Hesselink et al., 2008).



**Figura 6-** Estrutura química da difilina. Sorensen et al., 2007.

Alguns componentes de óleos essenciais como o citral e  $\alpha$ -pineno vêm sendo descritos como inibidores de V-ATPase (Freitas, 2007). O citral é o componente majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, conhecida popularmente como capim-limão, capim cidreira e corresponde a um monoterpênóide (Dudai et al., 2005). O  $\alpha$ -pineno é um dos componentes do óleo essencial de *Lavandula dentata*, conhecida popularmente como lavanda e é classificado como um terpeno cíclico. Outro componente do óleo essencial de *Lavandula dentata* que também mostrou ter poder de inibir a atividade das V-ATPases é o mirtenal (Martins, 2011), que caracteriza-se também por ser um composto cíclico. De acordo com Sikkema e colaboradores, os terpenos são hidrocarbonetos consistindo de múltiplas unidades de isopreno, que podem ser cíclicos ou acíclicos. Estas moléculas de hidrocarbonetos lipofílicos podem se acumular na bicamada lipídica, promovendo uma distorção na interação lipídeo-proteína, ou, ainda, alternativamente, podem ocorrer interações diretas entre os hidrocarbonetos lipofílicos com sítios hidrofóbicos da proteína (Sikkema et al., 1995).

Na literatura existem poucos relatos do uso do mirtenal, contudo Imelouane e colaboradores (2010) extraíram e testaram os principais componentes do óleo essencial extraído de *Lavandula dentata*, entres os quais está o mirtenal, e observaram que células de glioma maligno humano, U373 MG, são sensíveis aos efeitos citotóxicos desse extrato, enquanto linhagens de tumor de mama como MCF7, são menos sensíveis.

A importância do uso de inibidores específicos de V-ATPases consiste no fato de que a reversão do gradiente de pH (pH extracelular alcalino e o pH intracelular ácido) provocada pelos inibidores, sensibiliza as células tumorais ao tratamento quimioterápico. O pH intracelular ácido fruto da reversão do gradiente de pH, cria condição adequada para ativação destes inibidores. A inibição da atividade das bombas de prótons faz com que as células tumorais percam o controle sobre a regulação do pH, o que acaba provocando a morte destas células (Luciani et al., 2004; De Milito et al., 2007).

## **2.5. Invasão**

Segundo Fridl e Wolf. (2003) invasão pode ser definida como a penetração das barreiras teciduais e estroma intersticial pelas células. É um passo que requer adesão, degradação dos componentes da matriz extracelular (ECM) e migração. Ocorre durante a morfogênese das células normais e reparo de feridas e também na migração de células malignas.

Um evento crítico da invasão tumoral que sinaliza o início da cascata metastática é a interação da célula tumoral com a membrana basal. Há no mínimo três passos críticos envolvidos no processo de metástase. O primeiro passo é adesão da célula a matriz extracelular, mediada através de moléculas de adesão como as caderinas e integrinas. O segundo é a degradação dos componentes da matriz extracelular (ECM) envolvendo principalmente as metaloproteases MMPs. A fase final é a migração celular através da matriz alterada proteoliticamente (Pasco et al., 2005).

As membranas basais são matrizes extracelulares finas e amorfas especializadas que desempenham importantes papéis em vários eventos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, manutenção da arquitetura do tecido, remodelamento tecidual durante o desenvolvimento, filtração de macromoléculas,

reparo de feridas e invasão tumoral. São compostas por no mínimo colágeno IV, lamininas, nidogen, proteoglicana heparan sulfato e outras glicoproteínas, colágenos XV, XVIII, XIX, fibulina e distroglicana (Timpl, 1989; Olsen et al., 1973) citado por Pasco et al., 2005.

As metaloproteases (MMPs) desempenham um papel fundamental no processo de invasão. Elas são uma família multigene de endopeptidases dependentes de zinco produzidas por muitos tipos celulares, e que degradam diferentes componentes da ECM. Estão envolvidas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (Curran e Murray, 2000).

Há evidências de que haja uma interação entre as MMPs e moléculas de adesão como as integrinas, por exemplo. Estas, são uma grande família de glicoproteínas transmembranas compostas de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ligadas não covalentemente. São receptores multifuncionais que não medeiam somente a ancoragem celular a ECM e motilidade celular, mas também estariam envolvidas com a modulação da expressão de genes e apoptose (Hynes, 2002). Brooks e colaboradores (1996), demonstraram que as MMP-2 ativas proteoliticamente ligam-se diretamente as integrinas  $\alpha_v\beta_3$  via domínio C-terminal tipo hemopexin (PEX) da enzima, facilitando assim a degradação da matriz e invasão celular (Brooks et al., 1996).

O papel das metaloproteases vai além de induzir invasão tumoral e metástase através da destruição de barreiras protéicas, as MMPs também contribuem para os estágios iniciais do desenvolvimento do tumor através da alteração da sinalização celular, liberação de fatores de crescimento e liberação de proteínas com novas funções (Villano et al., 2006).

## **2.6. Migração Celular**

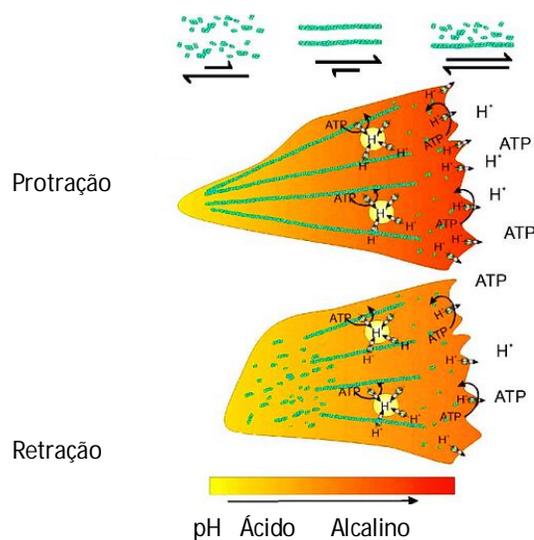
A migração de células tumorais metastáticas de um sítio primário para um sítio distante é de difícil diagnóstico e característica de muitos cânceres. Esta

habilidade também está associada com a resistência a terapia. A migração celular é claramente relevante do ponto de vista das funções biológicas (desenvolvimento embrionário, organogênese e homeostase). Infelizmente a desregulação deste processo também está envolvida na progressão do câncer (angiogênese tumoral e metástase) (Lecomte et al., 2011). A metástase representa um problema de saúde, pois permanece sendo a causa de 90% das mortes provocadas por tumores sólidos (Gupta e Massagué, 2006). Este evento está associado com a habilidade de migração da célula, assim inibindo a migração pode-se diminuir e até mesmo anular a metástase (Luo e Guan, 2009; Liu et al., 2009).

A habilidade da célula tumoral em sofrer migração e invasão permite-lhe mudar de posição dentro dos tecidos. Por exemplo, este processo permite a célula neoplásica entrar nos vasos linfáticos e sanguíneos para disseminação dentro da circulação e crescimento metastático em órgãos distantes do tumor primário (Chambers et al., 2002). Para se espalhar dentro dos tecidos, as células tumorais usam mecanismos de migração que são similares, se não idênticos aqueles que ocorrem nas células normais, não neoplásicas durante processos fisiológicos como morfogênese embrionária, fechamento de feridas e tráfego de células imunes. Estes mecanismos incluem alterações na morfologia, possibilitando interação com as estruturas teciduais circundantes. A migração celular através dos tecidos é resultado de um ciclo contínuo de passos interdependentes (Friedl e Bröcker, 2000).

Mudanças no pH citosólico são críticas para o estabelecimento da polaridade celular necessária para o movimento. Um passo crítico na motilidade e migração é a polimerização assimétrica da actina em um dos pólos da célula. O aumento no pH citosólico, provocado em grande parte pela superexpressão de pmV-ATPases promove o recrutamento de cofilina e remodelamento dinâmico da actina em um das margens da célula migratória (Bernstein et al., 2000). Assim as flutuações de pH necessárias para a montagem e desmontagem dos microtúbulos/microfilamentos permitirão a protusão em uma das margens e a retração na margem oposta pela mudança na rigidez da estrutura do citoesqueleto (Figura 7). Neste contexto, Rojas e colaboradores (2004, 2006) e Sennoune e colaboradores (2004b), mostraram que as pmV-ATPases co-localizam com a actina em um dos pólos da célula.

Os microtúbulos e microfilamentos regulam o transporte de moléculas provenientes de vesículas derivadas do aparato de Golgi (Schmoranzner e Simon, 2003). Segundo Sennoune e Martinez-Zaguilan (2007), a atividade da V-ATPase pode regular proteínas do citoesqueleto necessárias para o movimento dos endossomos e lisossomos para a membrana plasmática, o que poderia contribuir não somente para um aumento da área de superfície necessária para a migração, mas também a inserção da própria V-ATPase na membrana plasmática.



**Figura 7-** Superexpressão das pmV-ATPases. Mecanismo proposto pelo qual a superexpressão das pmV-ATPases em um dos pólos da célula modula migração/ invasão. Adaptado de Sennoune e Martinez-Zaguilan, 2007.

Observações *in vitro* e *in vivo* mostraram que as células tumorais se infiltram nos tecidos vizinhos em diversos padrões. Elas podem se disseminar como células individuais, chamado de 'migração celular individual', ou se expandir como cordões, folhas, agrupamentos chamado de 'migração celular coletiva' (Friedl e Wolf, 2003).

As células que se movem individualmente se originam de estroma intersticial e medula óssea. Entretanto, células que são originárias de compartimentos multicelulares, como epitélio, perdem seus contatos, se desprendem e migram como células individuais através do tecido conectivo (Thiery., 2002). Este tipo de migração

apresenta algumas variantes baseado no tipo celular, envolvimento de integrinas, estrutura do citoesqueleto e produção de proteases. Estas variantes incluem os tipos mesenquimal, amebóide e cadeia de células (Friedl e Wolf., 2003).

A migração mesenquimal representa um mecanismo eficiente de disseminação e metástase da célula tumoral (Tester et al., 2000). As células que sofrem este tipo de migração apresentam uma morfologia semelhante a um fibroblasto e são dependentes de uma dinâmica de adesão mediada pelas integrinas e da presença de altas forças de tração nos pólos da célula (Ballestrem et al., 2001; Cukierman et al., 2001). Apresentam velocidades de migração relativamente baixas e parte da invasividade do fenótipo mesenquimal pode ser atribuída à presença de contatos focais e contratibilidade mediada pela actomiosina, as quais são controladas pelas vias de sinalização RHO e ROCK, ou MLCK (Yoshioka et al., 1999).

O modelo de migração amebóide foi baseado na observação da movimentação da ameba, *Dictyostelium discoideum*. Este organismo se movimenta via ciclos alternados de expansões morfológicas e contração, muito deformáveis cuja ligação ao substrato é de baixa afinidade e independente de integrinas (Yumura et al., 1984; Devreotes e Zigmond, 1988 e Fey et al., 2002) A célula tumoral que sofre migração do tipo amebóide tem baixo grau de adesividade para colágeno (comparada a mesenquimal) devido aos baixos níveis de expressão de integrina  $\beta 1$  e  $\beta 3$  (Rintoul e Sethi, 2002; Falcioni et al., 1994; Jaspars et al., 1996 e Kraus et al., 2002). A disseminação amebóide permite as células cancerígenas se desprenderem de um tumor primário pequeno e sofrerem metástase. Ocorre principalmente em linfomas e carcinomas de pulmão de pequenas células (Rintoul e Sethi, 2002).

A migração em cadeia ocorre em células não neoplásicas da crista neural (Jacques et al., 1998) mioblastos (El Fahime et al., 2000) e melanomas. A cadeia de células tumorais simples se alinha entre as fibras do estroma e enquanto elas se movem formam contatos célula-célula e os mecanismos de comunicação podem ser preservados. Este arranjo representa um mecanismo de penetração particularmente efetivo que confere alta capacidade metastática e pobre diagnóstico (Page e Sakamoto 1987; Seftor et al., 2002).

A migração celular coletiva pode ser determinada por três passos. Primeiro, as células permanecem fisicamente e funcionalmente conectadas (Carmona-Fontaine et al., 2008) de tal forma que a integridade das junções célula-célula é preservada durante o movimento. Segundo, há uma polarização da actina do citoesqueleto que gera força de tração e protrusão para migração e manutenção das junções célula-célula. Em terceiro lugar, na maioria das formas de migração coletiva, os grupos de células em movimento modificam estruturalmente o tecido ao longo da via de migração, seja para limpá-la ou causar modificação secundária na matriz extracelular, incluindo a deposição de membrana basal (Friedl e Gilmour, 2009).

Em contraste com as células que migram individualmente, a adesão célula-célula que ocorre nas células que migram em grupo levam a uma forma específica de montagem de filamento de actina ao longo das junções celulares (Hegerfeldt et al., 2002). Isto permite a formação de grandes corpos multicelulares contráteis.

É bem estabelecido que a coordenação da atividade das integrinas e citoesqueleto na migração coletiva requer não somente adesão célula-célula, mas também comunicação entre elas. Observou-se em cânceres epiteliais e melanomas simples, os quais apresentam interações homotípicas dentro dos cordões e folhas, uma expressão elevada de caderinas, ALCAM (membro da família de imunoglobulina), e conexinas, os quais estão envolvidos na comunicação através das junções comunicantes (Madhavan et al., 2001; Hsu et al., 2000).

O movimento coletivo das células pode ser um mecanismo primário para invasão e metástase por tumores altamente diferenciados. A vantagem para este tipo de migração é que a grande massa celular pode produzir altas concentrações autócrinas de fatores promigratórios e proteases de matriz, e proteger as células que estão mais no interior do aglomerado do ataque imunológico pelos linfócitos e células natural-killer. Pelo fato deste grupo de células heterogêneas se moverem como unidades funcionais, células de diferentes origens clonais e com diferentes habilidades biológicas podem funcionar juntas. Por exemplo, células mais migratórias podem promover a invasão daquelas menos móveis, aumentando assim a eficiência da invasão tumoral e probabilidade de sobrevivência (Friedl e Wolf, 2003).

## 2.7. Melanoma

O melanoma pode ser definido como tumor maligno derivado da transformação e proliferação dos melanócitos que residem na camada de células basais da epiderme. Os melanomas cutâneos podem surgir de uma lesão precursora (ex: maligno lentigo, nevo displásico e nevo congênital) ou diretamente de uma pele normal (Reed, 1985) citado por Braud et al., 2003.

O crescimento dos melanócitos é controlado pelos queratinócitos circundantes que influenciam a comunicação extracelular através da liberação de fatores de crescimento parácrinos, a comunicação intracelular através de mensageiros secundários e transdução de sinal e a comunicação intercelular através de moléculas de adesão célula-célula e célula-matriz, e comunicação intercelular através das junções comunicantes. A perda deste controle é um dos mecanismos que leva a transformação dos melanócitos em melanoma (Haass et al., 2004). Recentemente, muitos estudos têm sugerido que o melanoma escapa do ataque imune através de muitos mecanismos, incluindo supressão imune por qualquer fator inibitório solúvel como as interleucinas (IL)-10 E IL-4, ou down-regulação do complexo principal de histocompatibilidade MHC (Mukherji e Chakraborty., 1995) assim como a imunidade suprimida mediada pelo ligante fas ( Hahne et al., 1996).

As células de melanoma apresentam um aumento na expressão de várias moléculas de adesão (MCAM, Mel-CAM, MUC18, CD146 ALCAM, CD166, L1-CAM, CD171 VCAM-1, CD106 ICAM-1, CD54 CEACAM1, CD66a) e mudança na composição dos receptores de adesão. As funções adesivas das moléculas de adesão celular nas interações homofílicas e heterofílicas estão bem definidas, mas sua contribuição para o fenótipo maligno é menos clara (Haass et al., 2004). A mudança na composição dos receptores de adesão às vezes reflete as propriedades agressivas das células de melanoma como quando elas invadem a derme (Nesbit e Herlyn, 1994). Os melanócitos normais expressam caderinas do tipo E (E-caderinas) que permite a sua associação aos queratinócitos, já nos melanomas esta caderina é substituída por uma do tipo N (N-caderina), que permite ligação do tumor aos fibroblastos e células endoteliais (Hsu et al., 2000).

A manifestação da doença na pele normal se dá após o aparecimento de uma pinta escura de bordas irregulares acompanhada de coceira e descamação. Em caso de lesão pigmentada pré-existente pode ocorrer aumento de tamanho, alteração na coloração e na forma da lesão, que passa a apresentar bordas irregulares (INCA, 2012).

Os fatores de risco para ocorrência do melanoma podem ser divididos entre a genética e o ambiente, com interação entre eles. Estudos mostram que de cada três pacientes, um apresenta mutação no gene CDKN2A, importante no controle do ciclo celular. Indivíduos de pele clara, caucasianos, também estão mais propensos a moléstia. Há indícios de que uma exposição breve e intensa ao sol represente um fator de risco para o aparecimento do melanoma, porém a exposição cumulativa parece ser o maior contribuinte para tal doença (Mackie et al., 2009).

De acordo com o tipo de crescimento, os melanomas são classificados em quatro variantes: melanoma de espalhamento superficial (SSM) 65%, melanoma nodular (NM) 25%, melanoma maligno lentigo (LMM) 5% e melanoma acral lentiginoso 5%. O SSM é o tipo mais comum de melanoma, caracterizado por uma proeminente proliferação intra-epidérmica. LMM é o tipo mais raro, corresponde ao maligno lentigo degenerado. O acral lentiginoso ocorre nas palmas das mãos ou sola dos pés, já o NM é um tumor que inicia sua progressão verticalmente, invadindo camadas mais profundas da pele (Braud et al., 2003).

O melanoma metastático é quase sempre incurável, com um tempo de sobrevivência de somente 8-9 meses e somente 10-15% dos atingidos alcançam três anos de vida pós-diagnóstico (Balch et al., 2009). O tratamento contra o melanoma metastático tem se mostrado pouco eficiente, com os pacientes apresentando respostas variáveis. Assim, a morbidade, os custos e a mortalidade durante o tratamento do melanoma em fase avançada, são consideráveis (Edwards et al., 2002).

Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrado no país, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão apesar de ser o mais grave devido a sua alta possibilidade de metástase. Apresenta alta letalidade, mas incidência baixa, segundo as estatísticas do INCA (Instituto Nacional do Câncer), as estimativas para

2010 foram de 2960 novos casos em homens e 2970 novos casos em mulheres, totalizando 5930 novos casos. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontraram-se na região sul e projeções apontaram para 1303 mortes sendo 749 homens e 554 mulheres (INCA, 2012).

### **3. Hipótese**

Aspiramos testar a hipótese de que as linhagens de melanoma murino B16-F10 e B16-F0 apresentem diferenças significativas em suas taxas de proliferação, adesão, invasão e migração. Outra hipótese é a de que o inibidor de V-ATPase concanamicina e o monoterpene mirtenal, o qual em estudos prévios mostrou ter capacidade de inibir a atividade das V-ATPases, afetem drasticamente as taxas de adesão, invasão e migração celular. Etapas fundamentais na formação de metástase, principal causa de morbidade e mortalidade provocada pelo câncer. Assim inibindo-se a bomba poder-se-ia reduzir ou até mesmo inibir a migração celular e conseqüentemente a metástase.

## **4. Objetivos**

### **4.1. Objetivo Geral**

Estudar a dinâmica das linhagens celulares de melanoma B16-F0 e B16-F10, abordando os aspectos de proliferação, adesão, migração e invasão e a consequência do uso de inibidores das V-ATPases sobre tais processos.

#### **4.1.1. Objetivos específicos**

Traçar um perfil de proliferação, adesão, invasão e migração das linhagens celulares B16-F0 e B16F-10, abordando as possíveis diferenças entre elas.

Realizar análises de viabilidade celular para estabelecer as melhores concentrações de concanamicina e mirtenal a serem utilizadas.

Mensurar o potencial dos inibidores de V-ATPase, concanamicina e mirtenal sobre os processos de adesão, invasão e migração das linhagens de melanoma B16-F0 e B16-F10.

## **5. Materiais e Métodos**

### **5.1. Linhagens celulares**

As células tumorais selecionadas para testar as hipóteses propostas são duas linhagens de melanoma murino muito e pouco metastático, respectivamente B16-F10 (Sloane et al., 1982) e B16-F0, adquiridas no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células são mantidas em meio de cultura (DMEM-Sigma D1152), pH 7.0-7.2, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% em estufa a 37°C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. A troca do meio é efetuada duas vezes por semana.

### **5.2. Drogas testadas**

As drogas utilizadas no trabalho foram o inibidor de V-ATPase concanamicina (concanamycin A- Sigma Aldrich C9705) e o monoterpene mirtenal (Myrtenal- Sigma Aldrich W33904). Ambas foram dissolvidas em DMSO (Dimethyl sulfoxide- Sigma Aldrich D8418), o que resultou nas concentrações de 5nM e 10nM para concanamicina e para o mirtenal , 5µM, 10µM e 15µM.

### **5.3. Ensaio de proliferação celular**

A fim de traçar um perfil de crescimento das linhagens celulares utilizadas, foram realizados ensaios com o MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Sigma Aldrich- M5655) (van Golen et al, 2012). As células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^3$  células/ml, incubadas overnight para adesão. As células viáveis foram testadas no dias 1, 2, 3, 4 e 5 depois do plaqueamento. De acordo com protocolo de incubação com MTT (Sigma), os cristais foram reconstituídos em 100 µl de DMSO 100% e os valores de absorbância determinados a 540 nm usando um leitor de placas de 96 poços. A

absorbância foi diretamente relacionada ao número de células. Foram realizados cinco experimentos em triplicata e usada regressão linear para análise estatística.

#### 5.4. Testes de citotoxicidade (ensaio MTT)

O teste de citotoxicidade do inibidor de V-ATPase, concanamicina e o monoterpene mirtenal foram efetuados utilizando o ensaio de MTT. Para o MTT, as células foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/ml, num volume final de 200  $\mu$ l. Após 12 horas em estufa a 37° C, 5% de CO<sub>2</sub> para aderência, as células foram incubadas com os inibidores da bomba por 24 horas. Ao final da incubação, 10  $\mu$ l de MTT (5mg/ml) foram adicionados em cada poço e 2h depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados solubilizados por DMSO. As densidades óticas (D.O) obtidas foram convertidas em percentual de citotoxicidade (Perc<sub>cit</sub>). Foram utilizados como controle positivo as células tratadas com Triton X-100 20% (controle positivo ou D.O.<sub>c+</sub>) e as células não tratadas (controle negativo ou D.O.<sub>c-</sub>). A leitura foi feita por espectrofotômetro de placa a 570nm (Raso et al., 2001) e utilizaram-se as seguintes fórmulas:

$$\text{Perc}_{\text{cit}} = 100 - ((\text{D.O.}_{\text{amostra}} - \text{D.O.}_{\text{c+}}) * 100 / \text{D.O.}_{\text{c-}} - \text{D.O.}_{\text{c+}})$$

$$\text{Perc}_{\text{cel viáveis}} = 100 - \text{Perc}_{\text{cit}}$$

## 5.5. Testes de adesão celular

As células na concentração de  $5 \times 10^4$ /ml foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas overnight para completa adesão. Após, foram tratadas com os inibidor de V-ATPase concanamicina 5 e 10nM e o monoterpeno mirtenal 5,10 e 15  $\mu$ M e incubadas por 24h. O sobrenadante foi removido e a placa lavada 1x com PBS, pH 7.0. Em seguida adicionou-se 200  $\mu$ l de paraformaldeído 1% por 30 minutos, a placa foi lavada novamente com PBS. Adicionou-se cristal violeta 0,05% por 10 minutos, lavou-se novamente a placa com PBS e lisou-se as células com 200  $\mu$ l de ácido acético por 20 minutos. A solução foi então homogeneizada e a leitura foi feita por espectrofotômetro de placa a 540 nm. Para converter os valores de densidade óptica em número de células, foi criada uma curva padrão, usando diluições seriais de número de células conhecido. Todos os experimentos foram repetidos no mínimo cinco vezes e feitos em triplicata, para análise estatística usou-se o teste- *t*.

## 5.6. Migração celular

### 5.6.1. Ferimento em monocamada

As células na concentração de  $1 \times 10^5$ /ml foram plaqueadas em uma placa de 12 poços e incubadas overnight em estufa a 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>. Com um tip de uma pipeta de 10 $\mu$ l foi provocado um ferimento na porção mediana do poço. Os poços foram lavados 2x com PBS, 1ml de DMEM/SFB 1% adicionado e as células tratadas com os inibidor de V-ATPase concanamicina nas concentrações de 5 e 10 nM e o monoterpeno mirtenal nas concentrações de 5, 10 e 15  $\mu$ M e incubadas em estufa a 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>. O ferimento foi fotografado e medido usando o software Axio vision Release 4.8.2 nos tempos 0h e 24 h, para acompanhamento do fechamento da ferida em microscópio óptico invertido Zeiss, usando objetiva de 5 vezes. Para obter a distância percorrida pelas células foi usada a seguinte fórmula: Distância final =

Dist<sub>0h</sub> - Dist<sub>24h</sub>. Foram realizados cinco experimentos em triplicata e escolhidas 3 micrografias de cada linhagem para medida da distância de uma margem a outra do ferimento com o objetivo de verificar a velocidade de fechamento do ferimento. Para análise estatística usou-se o teste- *t*.

### 5.6.2. Transwell

Para esse experimento foram utilizadas placas transwell (6,5 mm diâmetro, 8 µm, membrana de polycarbonato; Cornig Costar ). As células foram mantidas 24 h em DMEM livre de soro fetal bovino em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Na parte inferior do poço foi adicionado 600 µl de DMEM/BSA 0,1% e 6 µl de fibronectina (10µg/ml), esta atuando como quimioatratador. As células na concentração de 5 x 10<sup>4</sup>/ml foram adicionadas na parte de cima de cada membrana em meio livre de soro contendo 0,1% de BSA, incubadas por 16h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Jones et al., 2006) na presença dos inibidor de V-ATPase concanamicina (5 e 10 nM) e do monoterpene mirtenal (5, 10 e 15 µM) e o grupo controle sem nenhum tratamento. As células que migraram foram fixadas em paraformaldeído 2% e coradas usando cristal violeta 0,05%. A membrana foi então cortada e fixada em lâmina para visualização em microscópio óptico Zeiss. Foram realizados três experimentos em triplicata. Cinco campos foram escolhidos randomicamente para contagem das células, para análise estatística usou-se o teste-*t*.

### 5.7. Invasão Celular

Para os ensaios de invasão celular também se usou o sistema transwell. Foi adicionada a parte superior da membrana o Matrigel, composto que mimetiza a matriz extracelular. 50 µl de uma diluição de 1:2 de Matrigel:água gelada foi aplicada no topo da membrana e incubada por 1h para formar uma fina camada de

gel. Após este período, as células na concentração de  $5 \times 10^4$ /ml ressuspensas em DMEM/BSA 0,1% foram aplicadas sobre a camada de matrigel e incubadas por 2h para adesão (Castellone et al., 2011). Após, adicionou-se então os inibidor de V-ATPase concanamicina 5 e 10nM e o monoterpeno mirtenal 5,10 e 15 $\mu$ M e as placas seguiram para incubação overnight. Seguida a invasão, o meio de migração e Matrigel foram removidos com um swab, as células fixadas com paraformaldeído 2%, coradas com cristal violeta 0,05%. A membrana foi então cortada e fixada em lâmina para visualização em microscópio óptico Zeiss usando objetiva de 20x. Foram realizados três experimentos em triplicata, os dados obtidos foram analisados pelo *teste- t*.

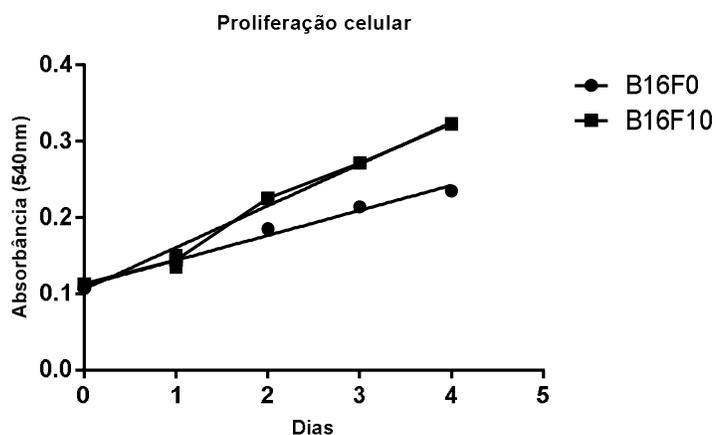
### **5.8. Análise Estatística**

Os resultados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), e o *teste-t* foi feito para comparar as médias, sendo considerado o nível de significância quando  $p < 0,05$ . Para curva de crescimento foi feito teste de *regressão linear*. As análises foram obtidas com o auxílio do programa *GraphPad Prism 6.0*.

## 6. Resultados

### 6.1. Proliferação celular

Os resultados mostraram que a linhagem B16-F10 apresentou taxa de proliferação significativamente maior que B16-F0 (Figura 8), condizente com observações feitas durante a manipulação de ambas as linhagens no decorrer dos experimentos.

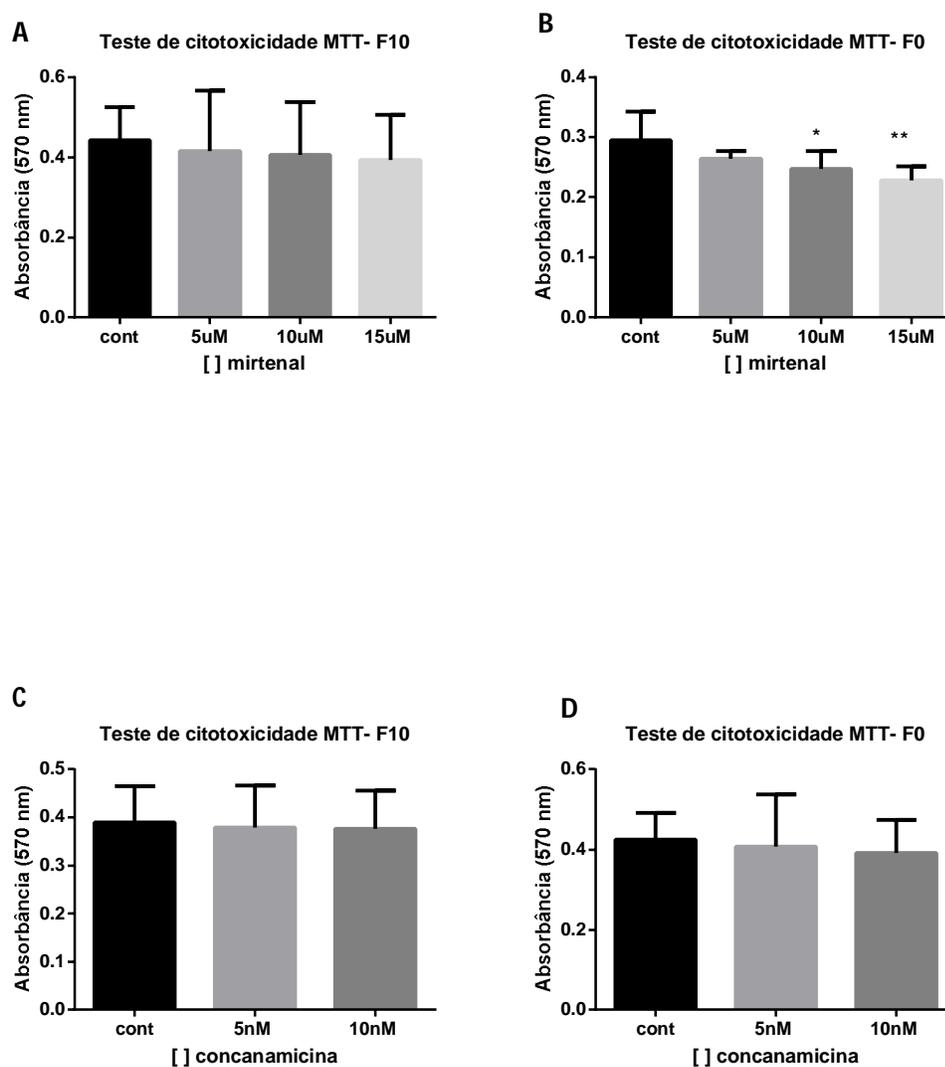


**Figura 8-** Proliferação celular. As células foram plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^3$ , incubadas com MTT por 2h e os cristais formados, solubilizados em DMSO. A densidade óptica da solução foi medida em espectrofotômetro (540nm). Os dados são apresentados como médias de cinco experimentos em triplicata,  $p < 0,0001$ .

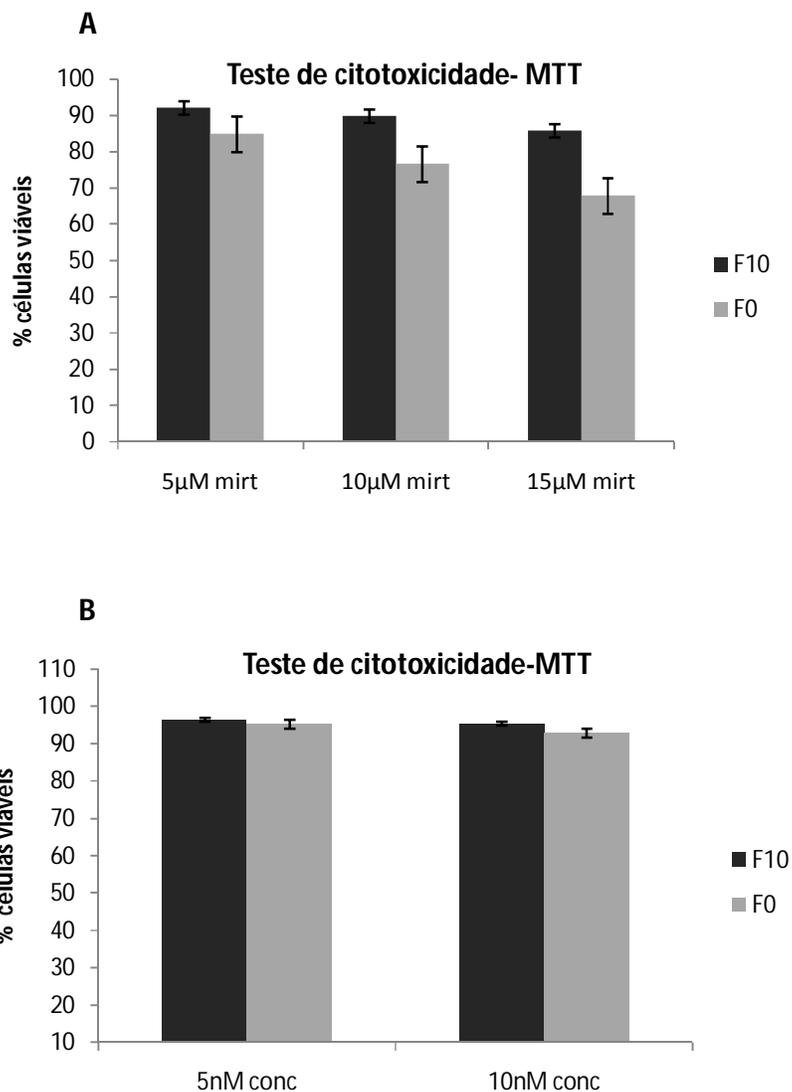
## 6.2. Viabilidade

A fim de se analisar o potencial citotóxico das drogas utilizadas, foram realizados ensaios de viabilidade celular baseado na metabolização do MTT pelas desidrogenases mitocondriais. Os testes de viabilidade revelaram que a linhagem B16-F0 é mais sensível ao tratamento com mirtenal em todas as concentrações testadas quando comparada com a linhagem B16-F10 (Figura 9 A e B). Na linhagem B16-F0 as concentrações de 10 e 15 $\mu$ M de mirtenal mostraram diferença significativa quando comparada com o controle (Figura 9-B). Já a resposta em relação à concanamicina foi bem semelhante nas duas linhagens, sem alteração significativa na viabilidade celular (Figura 9- C e D).

A transformação da densidade óptica das soluções obtidas em percentual de células viáveis reforçou a comparação entre as drogas, o que revelou que a concanamicina nas concentrações de 5nM (B16-F10 -96,4% e B16-F0-95,2%) e 10nM (B16-F10- 95,37% e B16-F0-92,85%) possibilitou uma maior porcentagem de células viáveis que o mirtenal em todas as concentrações testadas (Figura 10).



**Figura 9-** Teste de citotoxicidade- As células foram incubadas 24h com a concanamicina e mirtenal, e em seguida com MTT por 2 horas. O sobrenadante foi removido e os cristais solubilizados em DMSO. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro (570nm). Em A (B16-F10) e B (B16-F0) ensaio com o mirtenal 5-15µM, C (B16-F10) e D (B16F0) com concanamicina 5-10nM. Os resultados foram obtidos de três experimentos separados em triplicata e apresentados como desvio padrão, \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .

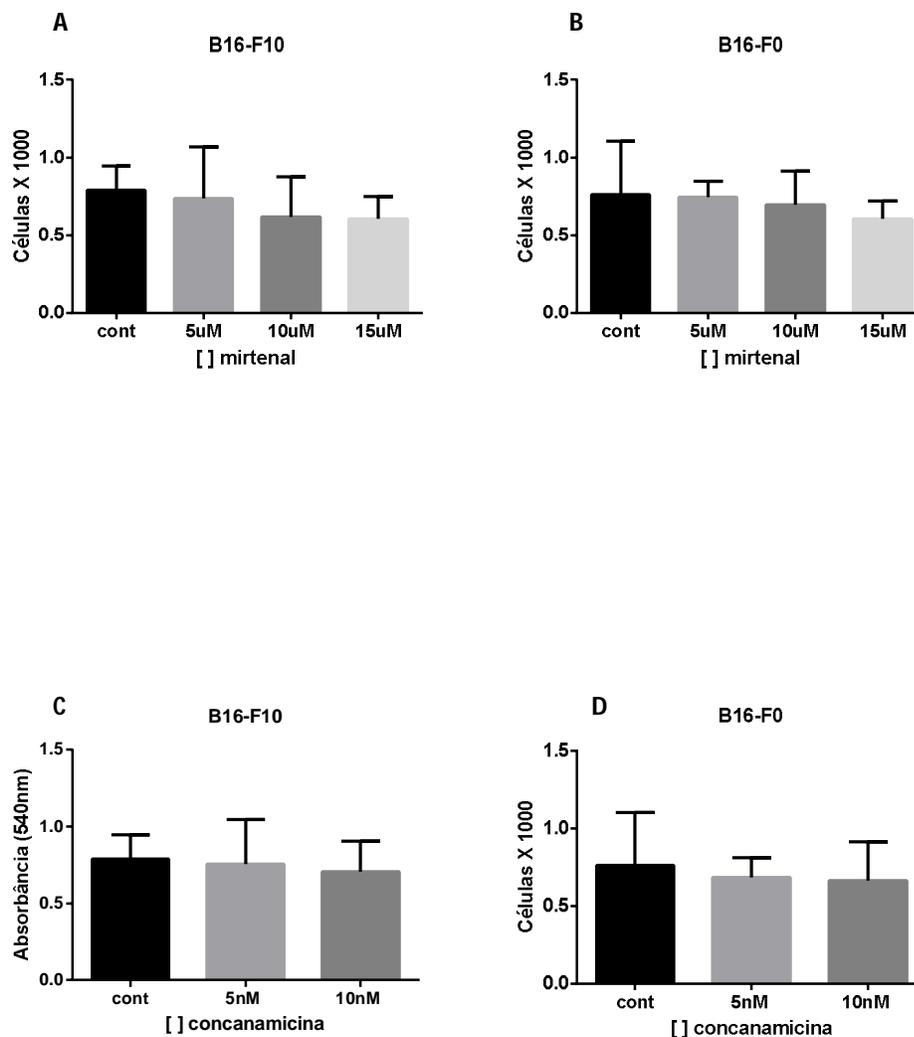


**Figura 10-** Porcentagem de células viáveis. As células foram incubadas por 24 h com mirtrenal 5-15  $\mu$ M (A) e concanamicina 5 -10 nM (B) e em seguida com MTT por 2 horas. O sobrenadante foi removido e os cristais solubilizados em DMSO. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro (570nm) e a densidade óptica transformada em percentual de células viáveis. Os dados foram obtidos a partir da média de três experimentos em triplicata e são apresentados como erro padrão.

### **6.3. Adesão**

#### **6.3. Adesão celular**

Observou-se que as duas drogas concanamicina 5-10nM e o mirtrenal 5-15 $\mu$ M provocaram o desprendimento das células do substrato, porém em nenhuma concentração este desprendimento foi significativo quando comparado com o controle (Figura 11). Analisando os gráficos, percebe-se que os perfis se assemelham ao dos gráficos de viabilidade principalmente no tratamento com o mirtrenal nas duas linhagens. Em relação à concanamicina, as células apresentaram respostas muito semelhantes, desprendimento do substrato com o tratamento com 5nM quando comparado ao controle, porém diferenças sutis entre os tratamentos com a concanamicina, observação válida para ambas linhagens.



**Figura 11-** Número de células aderidas ao substrato. As células foram incubadas por 24h com mirtenol 5-15 $\mu$ M (A e B) e concanamicina 5-10nM (C e D), depois foram fixadas com paraformaldeído 2% e coradas com cristal violeta 0,05%. A Absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540nm e a densidade óptica convertida em número de células. Os resultados são provenientes de três experimentos separados em triplicata e são apresentados como desvio padrão. Não houve diferença significativa em nenhum dos tratamentos.

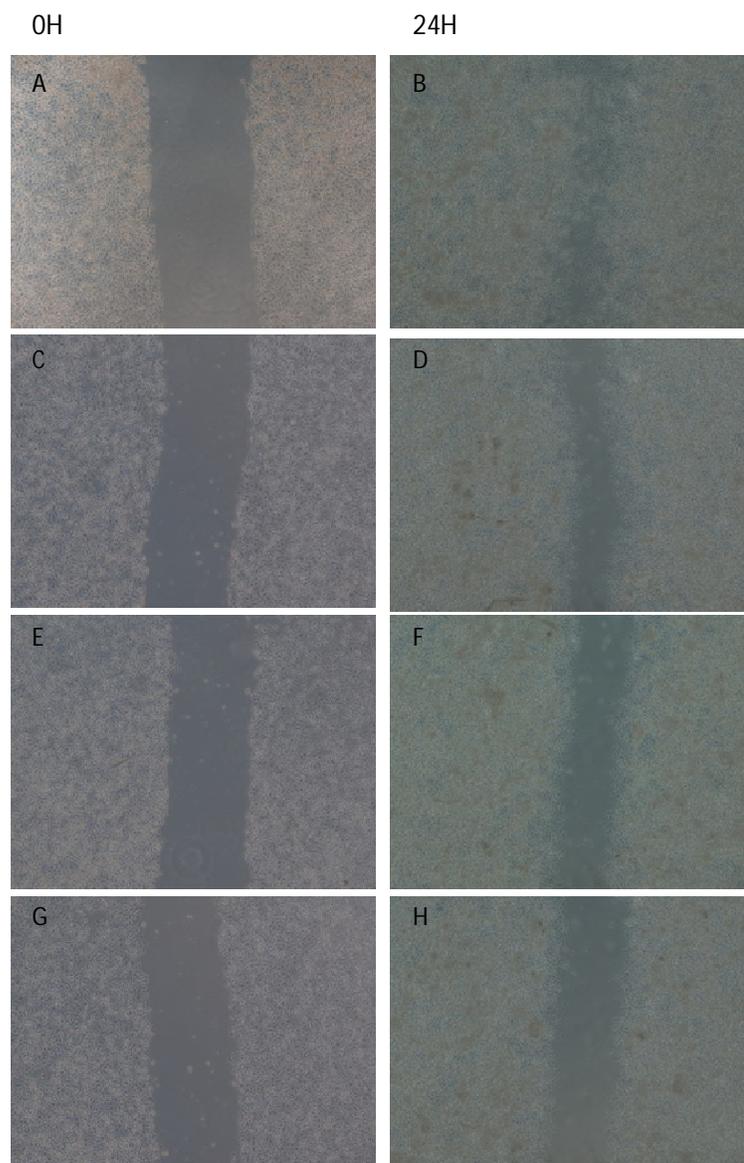
## 6.4. Migração celular

### 6.4.1. Ferimento em monocamada

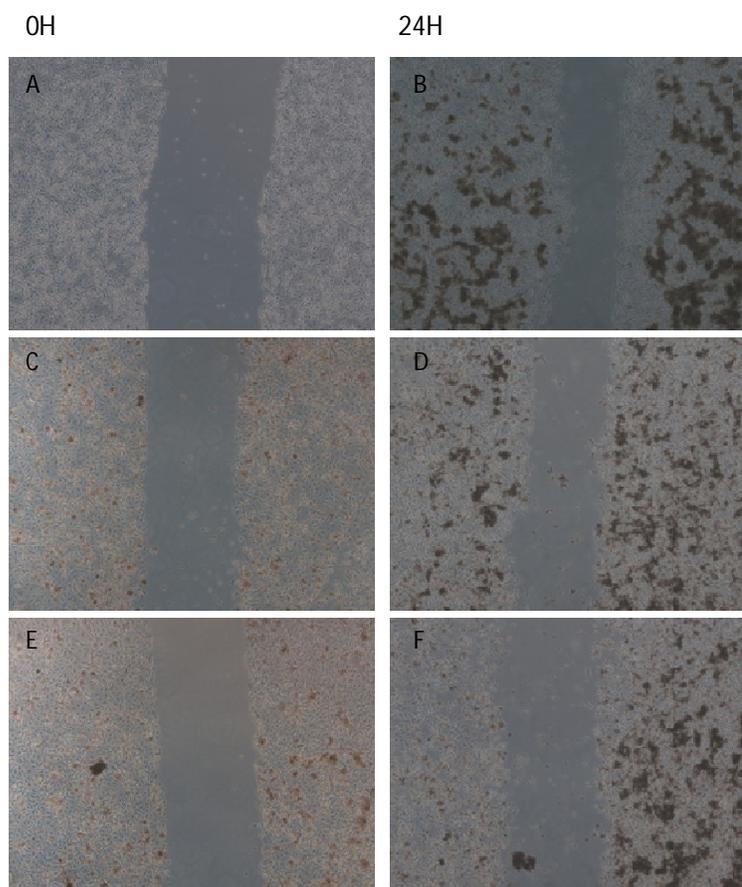
Os resultados mostram que 24 horas após ter sido provocado o “ferimento”, a linhagem B16-F10 (Figura 12 e 15) já havia conseguido fechar por completo o ferimento enquanto B16-F0 não (Figura 13 e 16). Na presença do mirtenal 5-15  $\mu\text{M}$  houve uma inibição desta capacidade (Figura 14), fato também observado para o inibidor específico concanamicina nas concentrações de 5 e 10 nM (Figura 17) em ambas as linhagens. A concentração de 15nM de concanamicina chegou a ser testada, porém em 24h houve grande porcentagem de morte celular em ambas linhagens, principalmente em B16-F0.

Quando se analisa a porcentagem de inibição da migração pelas drogas, observa-se que há uma resposta dose-dependente (Figura 18). Ao comparar as porcentagens de inibição de migração entre as drogas observamos que o mirtenal na concentração de 15 $\mu\text{M}$  foi mais efetivo na inibição da migração celular em B16-F10 (72%) (Figura 18-A). Para a linhagem B16-F0 foram observados resultados semelhantes, porém não houve grande disparidade no tratamento com as duas concentrações 5 $\mu\text{M}$  (27%) e 10 $\mu\text{M}$  (32%) de mirtenal (Figura 18- B), não sendo possível obter resultados na concentração de 15 $\mu\text{M}$ , pela baixa taxa de células viáveis. Já a concanamicina na concentração de 10nM inibiu em 60% a migração de B16-F10 (Figura 18-C) e em 33% a migração de B16-F0 (Figura 18-D).

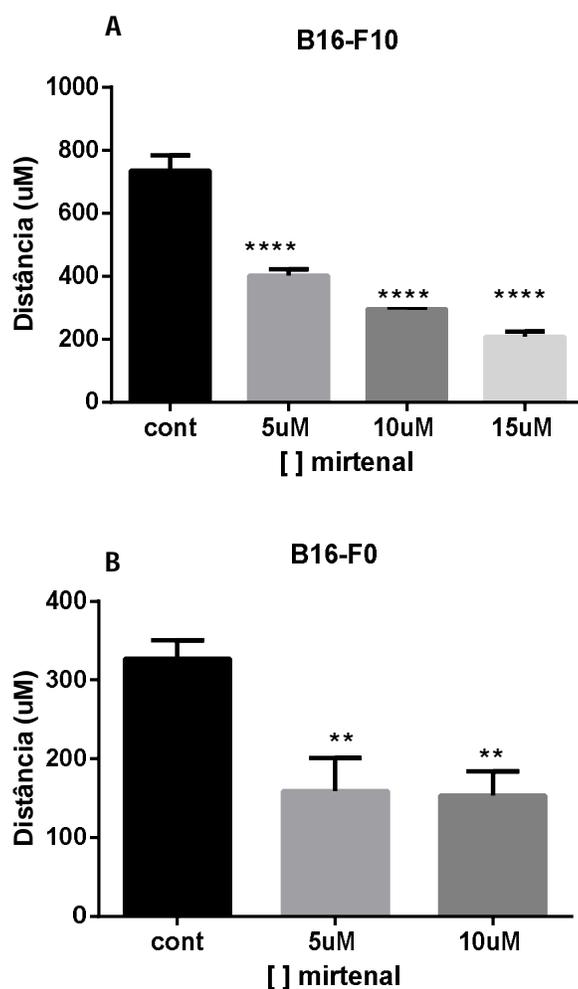
As manchas pretas observadas em todas as micrografias da linhagem B16-F0 representam secreção de melanina, fato observado durante toda a manipulação destas células.



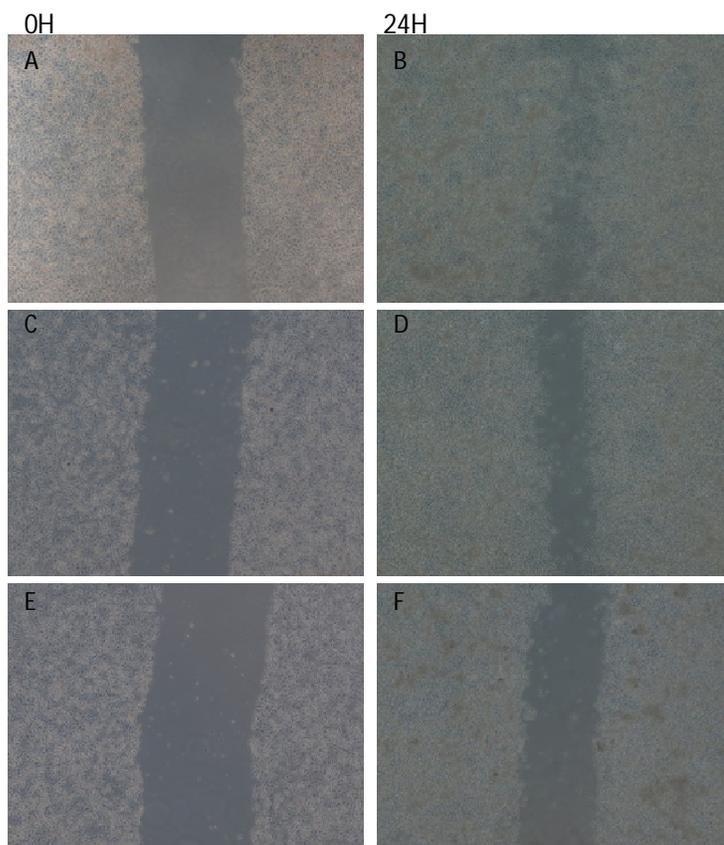
**Figura 12-** Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F10. Controle (A-B), 5  $\mu$ M mirtenal (C-D), 10  $\mu$ M mirtenal (E-F), 15  $\mu$ M mirtenal (G-H) nos tempos 0H e 24H.



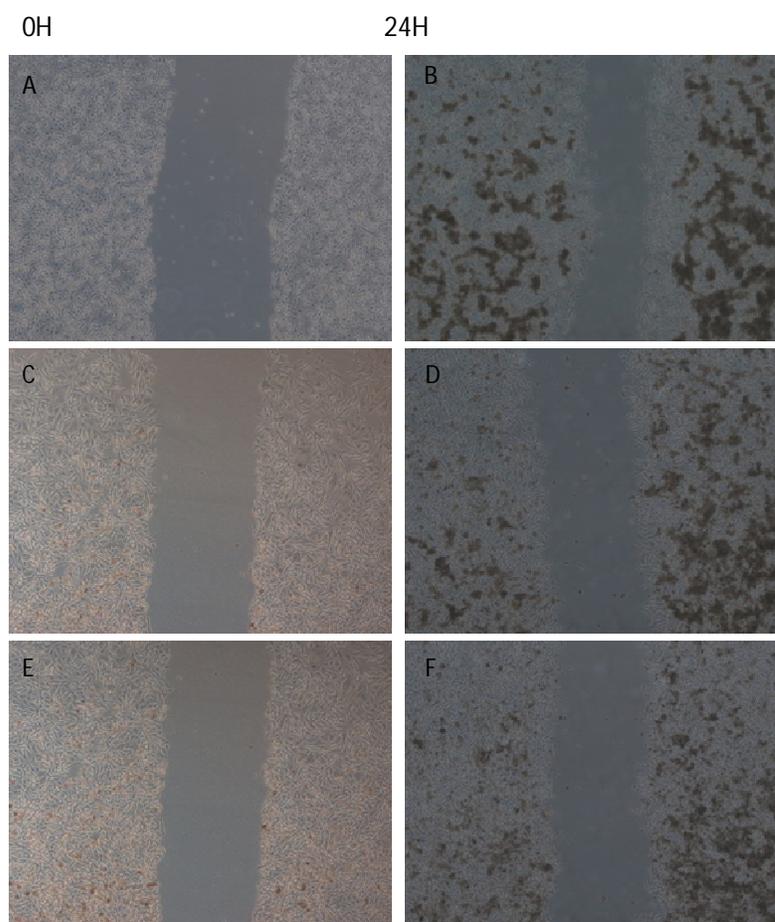
**Figura 13-** Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F0. Controle (A-B), 5  $\mu$ M mirtenol (C-D), 10  $\mu$ M mirtenol (E-F) nos tempos 0H e 24H.



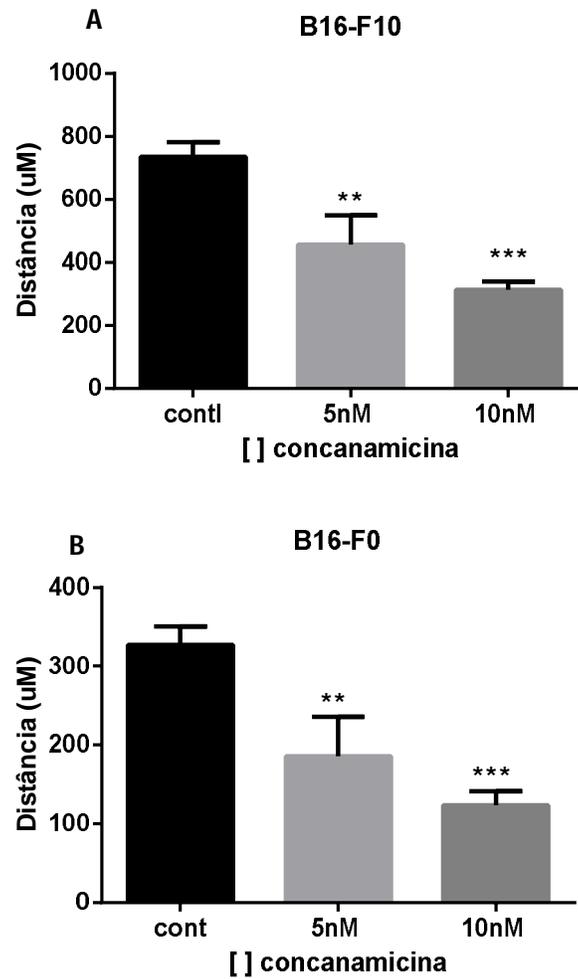
**Figura 14-** Efeito do mirtenol sobre a migração celular. O fechamento da ferida foi quantificado pela distância percorrida pelas células ( $\mu\text{m}$ ) depois de 24h. Não foi possível obter resultados com a linhagem B16-F0 na concentração de  $15\mu\text{M}$  de mirtenol, devido à baixa taxa de células viáveis. Em (A) B16F-10, \*\*\*\* $p < 0,0001$  e (B) B16-F0, \*\* $p < 0,01$ . Os dados são provenientes de três experimentos em triplicata e são apresentados como desvio padrão.



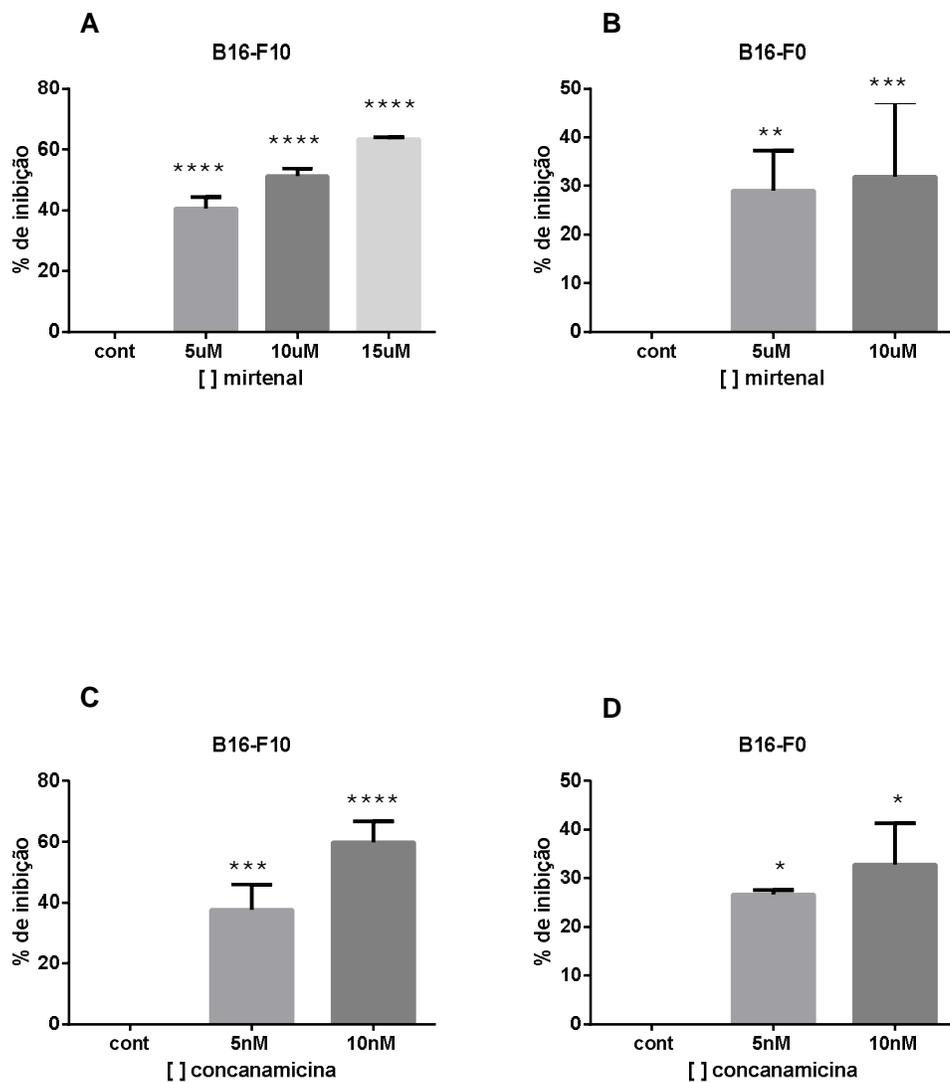
**Figura 15-** Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F10. Controle (A-B), 5nM concanamicina (C-D), 10nM concanamicina (E-F) nos tempos 0H e 24H.



**Figura 16-** Micrografia do ferimento em monocamada da linhagem B16-F0. Controle (A-B), 5nM concanamicina (C-D), 10nM concanamicina (E-F) nos tempos 0H e 24H.



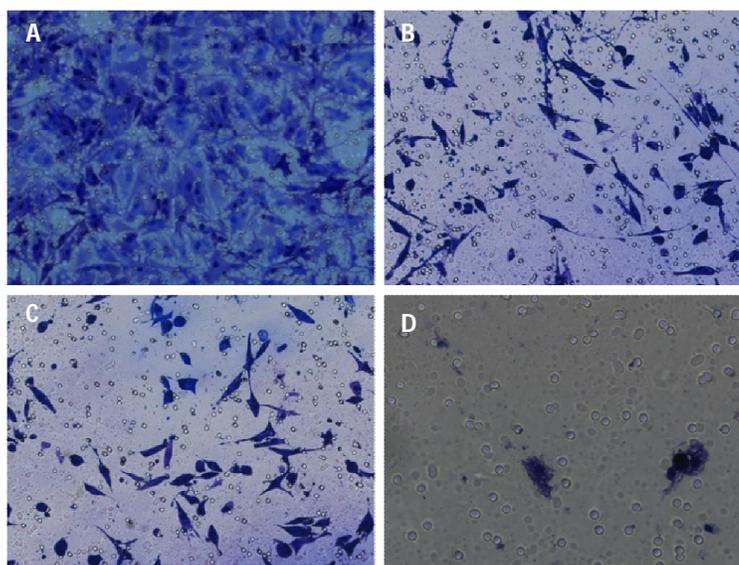
**Figura 17-** Efeito da concanamicina sobre a migração celular. O fechamento da ferida foi quantificado pela distância percorrida pelas células ( $\mu\text{M}$ ) depois de 24h. Em (A)-B16-F10, e (B)-B16-F0. Os dados são provenientes de três experimentos em triplicata. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



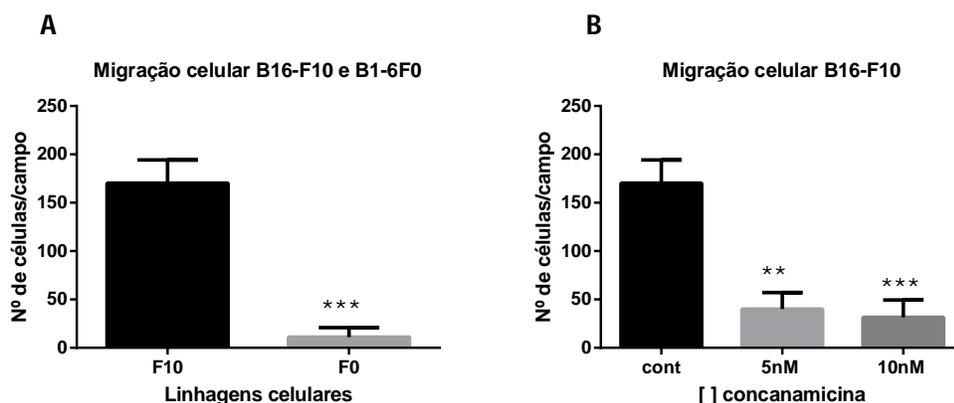
**Figura 18-** Porcentagem de inibição da migração celular. Efeito do monoterpeneo mirtrenal 5-15 $\mu$ M e do inibidor específico de V-ATPase concanamicina 5-10 nM sobre as linhagens B16-F10 (A e C) e B16-F0 (B e D). \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

## 6.5. Migração Celular usando Transwell

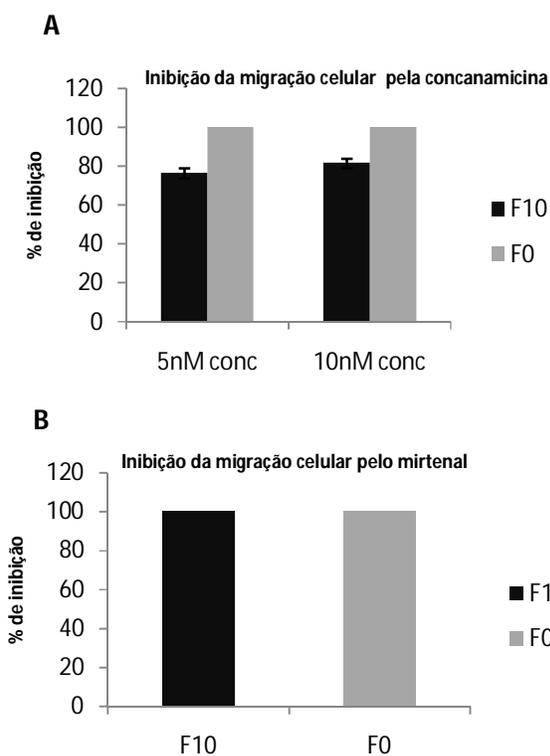
Nos ensaios de migração celular utilizando o modelo transwell, foram observadas altas taxas de migração celular para B16-F10 (Figura 19-A e 20-A). Porém, com o uso do inibidor de V-ATPase concanamicina 5-10 nM houve uma redução significativa da migração celular (Figura 19- B,C, 20- B e 21-A). A linhagem B16-F0 por sua vez, quando tratada com a concanamicina apresentou 100% de inibição da migração (Figura 21-A). Já com o uso do mirtenal, nas concentrações de 5-15 $\mu$ M foi observada uma inibição de 100% da migração em ambas as linhagens (Figura 21-B). A linhagem B16-F0 por sua vez, apresentou níveis significativamente mais baixos de migração quando comparada com B16-F10 (Figura 19-D e 20- A).



**Figura 19-** Micrografia da face inferior do transwell. Migração celular na linhagem B16-F10 em (A) controle, (B) 5nM concanamicina, (C) 10 nM concanamicina e B16-F0 em (D) controle.



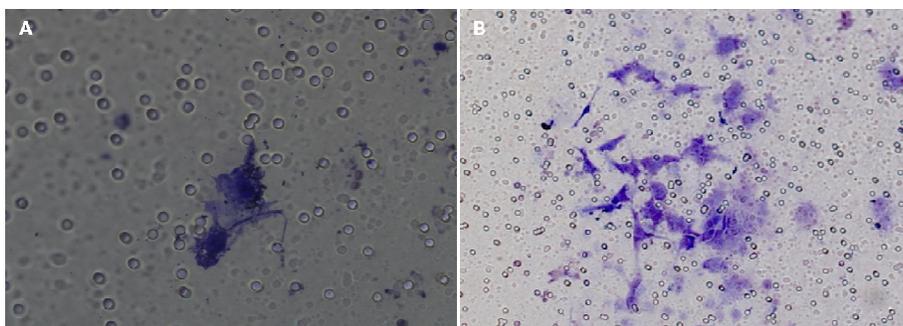
**Figura 20-** Ensaio de migração celular usando transwell. Foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células na parte superior da membrana e incubadas overnight com a concanamicina 5-10nM. O meio da parte de cima da membrana foi retirado, a membrana lavada com PBS, fixada com paraformaldeído 1% e corada com cristal violeta 0,05%. As células foram contadas usando objetiva de 20X em microscópio óptico. Em A comparação de migração entre as linhagens, B- influência da concanamicina sobre a migração de B16-F10. Os resultados são fruto de três experimentos em triplicata, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



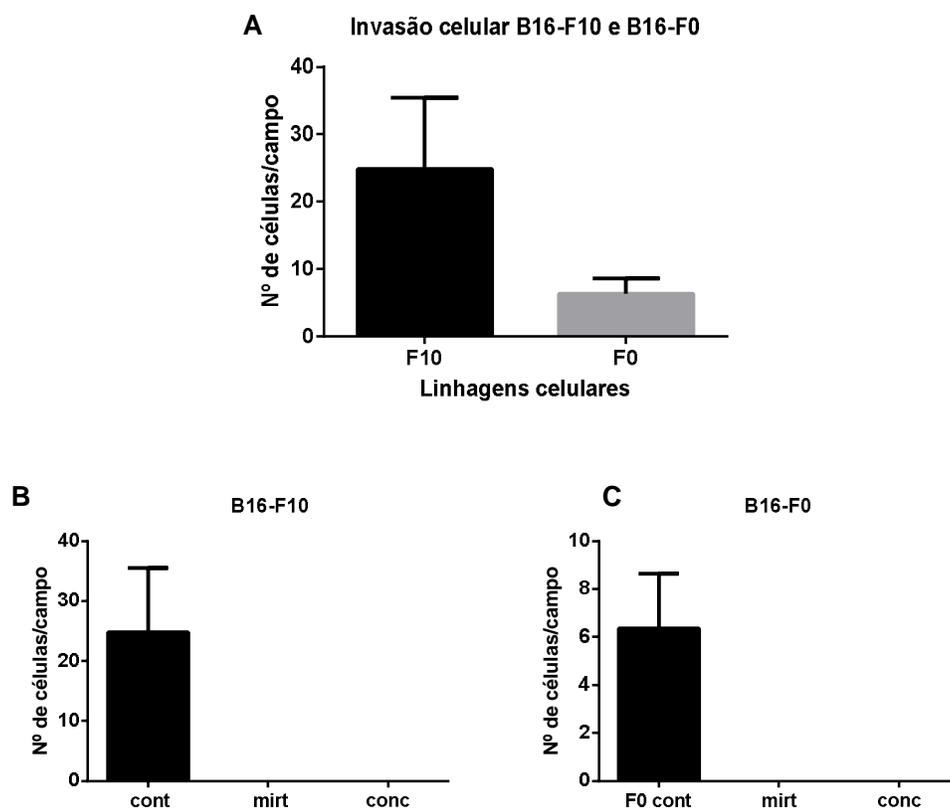
**Figura 21-** Porcentagem de inibição da migração celular. Em (A) concanamicina e (B) mirtenol. Em A os dados são apresentados como erro padrão.

## 6.6. Invasão Celular

Os ensaios de invasão da linhagem B16-F10 revelaram baixa quantidade de células na face inferior do transwell no grupo controle (Figura 22-B) quando comparado com o ensaio de migração (Figura 19-A), onde não houve adição de matrigel. Contudo, esta linhagem mostrou-se mais invasiva que a linhagem B16-F0 (Figura 22 e 23-A). Em B16-F0 os níveis de invasão (Figura 22-A) continuaram baixos assim como nos ensaios de migração (Figura 19-D). Houve 100% de inibição da invasão com o uso da concanamicina e do mirtenal em ambas as linhagens (Figura 23-B e C).



**Figura 22-** Micrografia da face inferior do transwell. Ensaio de invasão utilizando Matrigel para mimetizar a matriz extracelular. Em (A) B16-F0 e (B) B16-F10 sem tratamento.



**Figura 23-** Invasão celular. Número de células invasoras nas linhagens celulares B16-F10 e B16-F0 (A) e inibição da invasão celular provocada pela concanamicina e mirtenol em B16-F10 (B) e B16-F0 (C). Os dados são frutos de três experimentos e são apresentados como desvio padrão.

## 7. Discussão

Apesar de ser uma doença bastante estudada, o câncer preocupa pelo aumento da incidência e ausência de cura. É definido como um conjunto de doenças que levam as células a perderem o controle do ciclo celular, ganharem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e migrarem para sítios distantes, o que caracteriza a metástase. Como estágio final da progressão da doença a metástase é responsável por 90% das mortes provocadas por tumores sólidos (Gupta e Massagué, 2006) e é constituída por várias etapas, como adesão das células tumorais aos componentes da ECM, degradação destes, invasão e migração. Há relatos na literatura de que a acidificação do microambiente extracelular de tumores sólidos desempenhe um papel crítico na estimulação da motilidade, invasão e angiogênese (Harguindey et al., 2005). Esta acidificação por sua vez é atribuída há um aumento da expressão das V-ATPases na membrana plasmática das células tumorais (Sennoune et al., 2004b; Sennoune et al., 2006), o que torna esta enzima um alvo viável de estudos no combate ao câncer.

Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Santos, 2010) no que se refere à atividade hidrolítica das V-ATPases revelaram que a linhagem B16-F10 (muito metastática) apresenta uma maior atividade e sensibilidade aos inibidores da bomba, como a concanamicina, do que a linhagem B16-F0 (pouco metastática). Estudos com o monoterpene mirtenal na concentração de 11,4 $\mu$ M revelaram que nesta concentração há a inibição da atividade da enzima em cerca de 20% em B16-F0 e cerca de 50% em B16-F10 (Martins, 2011).

Visto que a concanamicina e o monoterpene mirtenal diminuem a atividade das V-ATPases nas linhagens utilizadas no trabalho B1-6F10 e B1-6F0, começamos a investigar a influência destas drogas nos eventos de adesão, migração e invasão, etapas chaves para formação de metástase e que se mostram influenciáveis pelo pH intracelular e pH extracelular (Supino et al., 2008).

A perda do controle do ciclo celular, que leva as células a crescerem de modo acelerado é uma das características da célula tumoral, e tem uma relação estreita com a metástase. No trabalho investigamos as taxas de proliferação das linhagens

de melanoma B16-F10 e B16-F0. Os resultados do trabalho mostraram que a taxa de proliferação da linhagem B16-F10 é significativamente mais alta do que a taxa de proliferação de B16-F0. Um dos parâmetros utilizados para descrever a linhagem B16-F10 como muito metastática é a presença e atividade de catepsina B (Sloane 1982). Na literatura existe uma relação entre a presença desta enzima e crescimento. Poste, (1971) descreveu que a presença de catepsina B e D em células neoplásicas contribui para modificações na superfície celular que resultam na supressão do mecanismo de inibição do crescimento por contato.

Para averiguar se as concentrações utilizadas eram tóxicas ou não para as células, foram realizados ensaios de viabilidade usando MTT. Os testes mostraram que o mirtenal nas concentrações testadas foi mais tóxico para as células que a concanamicina. Na concentração de 15 $\mu$ M, o mirtenal deixou ao fim dos experimentos 68% de células viáveis na linhagem B16-F0. Já o tratamento com a concanamicina nas concentrações de 5 e 10nM manteve uma porcentagem considerável de células viáveis em ambas linhagens, em B16-F10 (96% e 95%) e em B16-F0 (95% e 93%) o que nos leva a concluir que esta droga nestas concentrações é pouco tóxica para as células.

Os resultados dos ensaios de adesão revelaram que há um desprendimento das células tratadas do substrato quando comparadas ao controle, porém as drogas não influenciam de forma significativa este evento. Supino e colaboradores (2008) utilizando o inibidor de V-ATPase NiK-12192 em células de câncer de pulmão H460 observaram que o inibidor provocou modificações no citoesqueleto, incluindo agregação dos microfilamentos de actina e tubulina bem como a redução dos pseudópodes. Este inibidor mostrou-se capaz também de modular a distribuição de moléculas de adesão como a integrina  $\alpha\beta3$ . Há relatos na literatura de uma interação física da subunidade de 16K da V-ATPase com a integrina  $\beta1$  o que ajudaria a direcionar e estabilizar estas integrinas na membrana, influenciando assim a ligação das células aos componentes da matriz (Skinner e Wildeman, 1999).

A perda de motilidade celular gerada pelos tratamentos com a concanamicina e mirtenal foi observada nos experimentos de migração celular. A comparação das linhagens, nos experimentos de ferimento em monocamada revelou que a linhagem B16-F10 após 24h fechou 100% do ferimento enquanto que B16-F0

aproximadamente 52%, resultado compatível com o potencial metastático de cada linhagem. Assim como Supino e colaboradores (2008) observaram uma redução do fechamento da ferida usando o inibidor de V-ATPase NiK-12192 em linhagem de célula tumoral de pulmão NCI-H460 (Supino et al.,2008) e Rojas e colaboradores (2006) usando modelo de células endoteliais macro e microvasculares, as quais apresentam um microambiente extracelular ácido assim como as células tumorais, utilizando o inibidor de V-ATPase bafilomicina, o mesmo foi observado no presente trabalho usando a concanamicina nas linhagens de melanoma murino B16-F0 e B16-F10.

Quando comparamos os inibidores de V-ATPase concanamicina e mirtenal quanto ao poder de inibição da migração celular no experimento de ferimento em monocamada usando B16-F10, observamos que na concentração de 15  $\mu$ M, o mirtenal foi mais efetivo do que a concanamicina nas concentrações testadas (5- 10 nM) permitindo aproximadamente 72% de inibição da migração. Já em B16-F0 observou-se uma maior inibição da migração celular nas concentrações de 10  $\mu$ M de mirtenal (32%) e 10nM de concanamicina (33%), não sendo possível obter resultados na concentração de 15  $\mu$ M de mirtenal. Estes resultados mostram que estas drogas tem alta capacidade de inibir a migração *in vitro*.

Em relação aos experimentos de migração usando transwell o trabalho mostrou que B16-F10 é significativamente mais migratória que B16-F0. Porém as taxas de migração obtidas foram menores, por exemplo, do que as obtidas por Chalkiadaki et al, (2009), usando a linhagem de melanoma M5 e a mesma metodologia do presente trabalho, onde o grupo controle apresentou mais de 1500 células na face inferior do transwell. Contudo, o número de células encontradas na face inferior do transwell no atual trabalho, aproximadamente 180 células/campo foi maior do que as encontrada por Guo et al, (2011), usando a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 no que se refere ao controle, aproximadamente 7células/campo. O inibidor de V-ATPase concanamicina mostrou-se muito eficaz na inibição da migração celular assim como resultados obtidos por Sennoune e colaboradores (2004 b) usando bafilomicina em células de câncer de mama.

Há muitas evidências que indicam uma relação entre funções celulares envolvendo sistemas de transporte, citoesqueleto e moléculas de adesão (Vitavska et al., 2003, Zuo et al., 2006). Estas funções, as quais podem ser moduladas pelo pHi e pHe, desempenham um papel crítico na interação das células com a matriz extracelular. Holliday e colaboradores (2000) e Zuo e colaboradores, (2006) já descreveram a presença de um sítio de ligação para filamentos de actina na subunidade B da V-ATPase e sítios de ligação para actina F e G na subunidade C da V-ATPase (Vitavska et al., 2005) controlando a dinâmica da actina do citoesqueleto passo necessário para o ganho de motilidade.

Entre as funções atribuída à acidificação do ambiente extracelular em tumores sólidos, provocada principalmente pela superexpressão de pmV-ATPases, está a ativação de proteases ácidas como as catepsinas e MMPs responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular bem como a locomoção celular (Glunde et al., 2003; Stock et al., 2005; Rofstad et al., 2006; Martinez-Zaguilan et al., 1996). Contudo, a inibição da ativação das MMPs pode afetar mais do que somente a degradação das barreiras teciduais. Uma vez que estas enzimas estão envolvidas com alteração da sinalização celular, liberação de fatores de crescimento e de proteínas com novas funções (Villano et al., 2006). Sendo assim, com base nas suas funções é concebível que a inibição da expressão/função das V-ATPases afete o comportamento invasivo e migratório das células tumorais de forma contundente.

A capacidade de invasão das células foi testada utilizando as membranas do transwell revestidas com matrigel. Os ensaios mostraram que a linhagem B16-F10 é significativamente mais invasiva que a linhagem B16-F0. O tratamento com as duas drogas em todas as concentrações inibiu 100% da invasão nas duas linhagens. Sennoune e colaboradores (2004 b) usando o inibidor de V-ATPase bafilomicina em células de câncer de mama observou uma redução da invasão. Assim como estudos de Thomsen e colaboradores (1999) que mostra que a bafilomicina inibe a motilidade em fibroblasto NIH3T3 A31 murino, possivelmente devido a alterações de gradiente de pH em estruturas endocíticas, ricas em V-ATPase. Em trabalho realizado por Kubota e Seyaman (2000), onde a subunidade de 16kDa da V-ATPase foi superexpressa em fibroblastos 10T1/2, foi observado um aumento na secreção da metaloprotease-2, enzima necessária para a degradação de componentes da matriz durante o processo de invasão. Juntos, estes dados apontam a

superexpressão da V-ATPase como um dos mecanismos chave para o processo de invasão.

Os mecanismos envolvidos na diminuição da migração e invasão mediante tratamento com os inibidores de V-ATPase não estão muito claros. Contudo sabe-se que um passo crítico na motilidade direcionada e migração é o estabelecimento de polaridade celular, caracterizado pela polimerização assimétrica da actina em um dos pólos da célula. O aumento do pH citosólico, estaria envolvido com o recrutamento e ligação da actina a cofilina em um dos pólos da célula (Bernstein et al., 2000). Assim, o rompimento do mecanismo regulatório do pH citosólico pode afetar a polimerização da actina e conseqüentemente o ganho de motilidade pela célula. Outro ponto é o fato dos inibidores de V-ATPase suprimirem o tráfego de vesículas secretórias para a membrana plasmática (Lang et al., 2000). Pelo fato dos endossomos e lisossomos serem compartimentos endomembranares com alto tráfego em direção a membrana plasmática e ricos em V-ATPase, é possível que a inibição desta enzima altere o trafego destas organelas para a membrana plasmática, inibindo assim o aporte de componentes e proteínas para a superfície celular, necessários para o ganho de motilidade (Mcneil, 2002).

O inibidor de V-ATPase concanamicina e o monoterpene mirtenal mostraram-se eficientes inibidores de migração e invasão celular, etapas importantes da cascata metastática. Porém, serão necessários mais estudos para a exata compreensão dos mecanismos pelos quais estas drogas provocam estes efeitos.

## 7. Conclusões

- A linhagem B16-F10 apresenta níveis significativamente mais altos de proliferação do que B16-F0, o que é compatível com o seu maior potencial metastático.
- A concanamicina e o mirtrenal não afetam a viabilidade das células testadas, porém o mirtrenal na maior concentração testada (15 $\mu$ M) mostrou-se mais tóxico que a concanamicina.
- As drogas testadas concanamicina 5-10nM e mirtrenal 5-15 $\mu$ M não afetam a adesão das células ao substrato.
- Quando comparadas, B16-F10 mostrou ser mais migratória e invasiva do que B16-F0.
- A migração e invasão celular foram eficientemente inibidas pela concanamicina e mirtrenal, mostrando que estas drogas são alvos potenciais para estudos e tratamento do câncer.

## 8. Referências bibliográficas

- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M., Simon, S. M. (1998) Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *J. Exp. Med.* 187:1583-1598.
- Andresson, T., Sparkowski, J., Goldstein, D. J., Schlegel, R. (1995) Vacuolar H(+)-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 270: 6830–6837.
- Anraku, Y., Umemoto, N., Hirata, R., Ohya, Y. (1992) Genetic and cell biological aspects of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 395-406.
- Balch, C. M., Gershenwald, J. E., Soong, S-J., Thompson, J.F., Atkins, B. M., Byrd, D. R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., Eggermont, A.M., Flaherty, K.T., Gimotty, P.A., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm Jr, M.C., Donald L. Morton, D. L., Ross, M. I. , Sober, A. J., Sondak, V. K. (2009) Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of clinical oncology.* 27(36): 6199-6206.
- Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B. A., Wehrle-Haller, B. (2001) Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J. Cell Biol.* 155, 1319–1332.
- Bernstein, B. W., Painter, W. B., Chen, H., Minamide, L. S., Abe, H., Bamburg, J. R. (2000) *Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins Cell Motil Cytoskelet.* 47:319–336.
- Bowman, B. J., Bowman, E. J. (2002) Mutations in subunit c of the vacuolar ATPase confer resistance to bafilomycin and identify a conserved antibiotic binding site. *J. Biol. Chem.* 277:3965–3972.
- Bowman, E. J., Graham. L. A., Stevens, T. H., Bowman, B. J. (2004) The bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279(32):33131–8.
- Bowman, E.J, Siebers, A., Altendorf, K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci.* 85(21):7972–6.
- Bowman, B. J., Vazquez-Laslop, N., Bowman, E. J. (1992) The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 361-370.
- Braud, F., Khayat, D., Bin, B. R., Kroon, B. B. R., Valdagni, R., Bruzzi, P., Cascinelli, N. (2003) Malignant melanoma. *Oncology/Hematology.* 47: 35-63

- Brooks, P. C., Strömblad, S., Sanders, L. C., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler, W. G., Stevenson. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. *Cell*. 85:683–693.
- Carmona-Fontaine, C. Matthews, H. K., Kuriyama, S., Mauricio, M., Dunn, G. A., Parsons, M., Stern, C. D., Roberto Mayor, R. (2008) Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*. 456:957–961.
- Castellone, R. D., Leffler, N. R., Dong, Yang, L. V. (2011). Inhibition of tumor cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. *Cancer Letters*. 312:197-208.
- Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Sifaki, M., Kostantinos, K., Katonis, P., Karamanos, N.K., George, N., Tzanakakis, G. N. (2009) Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41: 1323–1331.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., MacDonald, I. C. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Rev. Cancer*. 2:563–572.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., Yamada, K. M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 294:1708–1712.
- Curran, S., Murray, G.I. (2000). Matrix metalloproteinases: molecular aspect of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur. J. Cancer*. 36:1621–1630.
- 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. (2007) Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cells tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Research*. 5408-5417.
- Devreotes, P. N. e Zigmond, S. H. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 649–686.
- Dudai, N., Weistein, Y., Krup, M., Rabinski, T., Ofir, R. (2005) Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell line. *Plant med.* 71: 484-488
- Edwards, B. K., Howe, H. L., Ries, L. A. G., Schrag, D., Jamison, P. M., Jemal, A., Wu, X. C., Friedman, C., Harlan, L., Warren, J., Anderson, R. N., Pickle, L. W. (2002) Annual report to the nation on the status of cancer, 1999 featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. *Cancer* 94(10):2766–92.
- El Fahime, E., Torrente, Y., Caron, N. J., Bresolin, M. D., Tremblay, J. P. (2000) In vivo migration of transplanted myoblasts requires matrix metalloproteinase activity. *Exp. Cell Res.* 258: 279–287.
- Falcioni, R. *et al.* (1994) Expression of beta 1, beta 3, beta 4, and beta 5 integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes. *Exp. Cell Res.* 210: 113–122.

- Fey, P., Stephens, S., Titus, M. A., Chisholm, R. L. SadA. (2002). A novel adhesion receptor in *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 159:1109–1119.
- Fillingame, R. H., Jiang, W., Dmitriev, O. Y. (2000). Coupling H<sup>+</sup> transport to rotary catalysis in F-type ATP synthases. *J. Exp. Biol.* 203:9–17.
- Forgac, M. (1998). Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases. *Federation of European Biochemical Societies.* 440: 258-263.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 8:917–929.
- Freitas, F.P. (2007). Efeito de monoterpenos de óleos essenciais presentes em *Alpinia speciosa*, *Cymbopogon citratus* e *Rosmarinus officinalis* sobre ATPases de larvas de *Aedes aegypti*. Dissertação (mestrado em biociências e biotecnologia) - Campos dos Goytacazes-RJ , UENF, 74p.
- Friedl, P., Bröcker, E. B. (2000) The biology of cell locomotion within three dimensional extracellular matrix. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57: 41–64
- Friedl, P., Gilmour, D. (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature*.10:445-457.
- Friedl, P., Wolf, K. (2003). Tumor-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature.* 3:362-374.
- Garrido, R. G. (2007). 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,. Disponível em [www.ia.ufrjr.br](http://www.ia.ufrjr.br).
- Gillies, R. J., Martinez-Zaguilan, R. (1991). Regulation of intracellular pH in BALB/c-3T3 cells: bicarbonate raises pH via NaHCO<sub>3</sub>/HCl exchange and attenuates the activation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by serum. *J Biol Chem.* 266: 1551–1556.
- Glunde, K. Guggino, S.E., Solaiyappan, M., Pathak, A.P., Ichikawa, Y., Bhujwalla, Z.M. (2003) Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells, *Neoplasia* 5 : 533–545
- Gottlieb, R. A., Giesing, H. A., Zhu, J. Y., Engler, R. L., Babior, B. M. (1995). Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed cell death in neutrophils by up-regulating the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA.*92: 5965–5968.
- Guinea, R.; Carrasco, L. (1994) Concanamycin A blocks influenza virus entry into cells under acidic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349(3):327-330.

Guo, H., Li, M., Chen, P., Blake, D. J., Kong, X., Hao, X., Niu, R., Zhang, N. (2011). 4-Methyl-3-nitro-benzoic acid, a migration inhibitor, prevents breast cancer metastasis in SCID mice. *Cancer Letters* 305: 69–75.

Gupta, G. P. e Massagué, J. (2006). Câncer metastasis: Building a Framework. *Cell*. 127:679-695.

Imelouane, B. Elbachiri, A., Wathelet, J-P., Dubois, J., Amhamdi, H. 2010. Chemical composition, cytotoxic and antioxidant activity of the essential oil of *Lavandula dentata*. *World Journal of Chemistry*. 5 (2): 103-110.

INCA:

[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/sintomas](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/sintomas). Disponível em 26 de outubro de 2011.

Haass, N. K., Smalley, K. S. M., Herlyn, M. (2004). The role of altered cell–cell communication in melanoma progression. *J. Mol. Histol.* 35:309–318.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreiter, M., French LE, et al. (1996) Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*. 274:1363–6.

Hegerfeldt, Y., Tusch, M., Brocker, E. B., Friedl, P. (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res*. 62: 2125-2130.

Hesselink, R.W., Fedorov, A., Hemminga, M.A., Prieto, M.( 2008). Membrane-bound peptides from V-ATPases subunit a do not interact with an indole-type inhibitor. *J. Pept. Sci.* 14: 383–388.

Hinton, A., Bond, S., Forgac, M. (2009)b. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 457:589–598.

Hinton, A., Sennoune, S. R., Bond. S., Fang, M., Reuveni, M., Sahagian, G. G., Jay, D., Martinez-Zaguilan, R., Forgac, M. (2009)a Function of a Subunit Isoforms of the V-ATPase in pH Homeostasis and *in Vitro* Invasion of MDA-MB231 Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* (284) 24: 16400-16408.

Holliday, L.S., Lu, M., Lee, B.S., Nelson, R.D., Solivan, S., Zhang, L, e Gluck, S.L (2000) The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H<sub>+</sub>-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J Biol Chem* 275:32331–32337.

Hsu, M.Y., Meier, F.E., Nesbit, M., Hsu, J.Y., Van Belle, P., Elder, D.E., Herlyn, M. (2000). E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am.J. Pathol.* 156:1515–1525.

Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gassel, M., Drose, S., Zeeck, A., Altendorf, K. and Wiczorek, H. (2002) Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to the  $V_0$  subunit c. *J. Biol. Chem.* 277:40544 -40548.

Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110: 673–687.

Jacques, T. S. et al (1998) Neural precursor cell chain migration and division are regulated through different beta1 integrins. *Development.* 125:3167–3177.

Jaspars, L. H., Bonnet, P., Bloemena, E, Meijer, C. J (1996) Extracellular matrix and beta 1 integrin expression in nodal and extranodal T-cell lymphomas. *J. Pathol.* 178: 36–43.

Jones, D. H., Nakashima, T., Sanchez, O.H., Koziaradzki, I., Komarova, S.V., Sarosi, I., Morony, S., Rubin, E., Sarao, R., Hojilla, C.V., Vukoslav Komnenovic, V., Kong, Kaneko, K., Satoh, K., Masamune, A., Satoh, A., Shimosegawa, T. (2002) Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreas.* 24:34–41.

Kane, P. M., e Stevens, T. H. (1992). Subunit composition, biosynthesis, and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 383-394

Kataoka, T., Shinohara, N., Takayama, H., Takaku, K., Kondo, S., Yonehara, S., Nagai, K. (1996) Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 156(10)3678-3686.

Keeling, D. J., Herslof, M., Ryberg, B., Sjogren, S., Solvell, L. (1997) Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases Targets for Drug Discovery? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 834:600–608.

Kibak, H., Taiz, L., Starke, T., Bernasconi, P., Gogarten, J. P. (1992). Evolution of structure and function of V-ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24:415-424.

Kraus, A. C. et al. (2002) *In vitro* chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways. *Oncogene.* 21: 8683–8695.

Kubota, S. e Seyama, Y. (2000) Overexpression of Vacuolar ATPase 16-kDa Subunit in 10T1/2 Fibroblasts Enhances Invasion with Concomitant Induction of Matrix Metalloproteinase-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 278: 390–394.

Lang, T., Wacker, I., Wunderlich, I., Rohrbach, A., Giese, G., Soldati, T., e Almers, W. (2000) Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys J* 78: 2863–2877.

Lecomte, N. Njardarson, J. T., Nagorny, P. Yang, G., Downey, R., Ouerfelli, O., Moore, M. A. S., Danishefsky, S.J. (2011). Emergence of potent inhibitors of metastasis in lung cancer via syntheses based on migrastatin. *PNAS*.108(37):15074-15078.

Li, Y. P., Chen, W., Liang, Y., Li, E., Stashenko, P. (1999). Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nature. Genet.* 23:447–451.

Liu, Y., Wang, B. Wang, J., Wan, W., Sun, R., Zhao, Y. Zhang, N. (2009). Down-regulation of PKC zeta expression inhibits chemotaxis signal transduction in human lung cancer cells. *Lung Cancer.* 63: 210–218.

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.(2004). Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *Journal of the National Cancer Institute,* (96): 22.

Luo, M. e Guan, J. L. (2009). Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett.* 13: 779-808.

MacKie, R. M. ,Hauschild, A., Eggermon, A. M. M. (2009) Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology.* (20) 6:1–7.

Madhavan, M. Srinivas P, Abraham E., et al. (2001) Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. *Mod. Pathol.* 14:423–427. ;

Martinez-Zaguilan R, Seftor, E. A, Seftor, R.E.B., Chu, Y., Gillies, R. J, e Hendrix, M.J.C (1996) Acidic pH enhances the invasive behaviour of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 14:176–186.

Martinez-Zaguilan, R., Raghunand, N., Lynch, R. M., Bellamy, W., Martinez, G.M., Rojas, B., Smith, D., Dalton, W.S., Gillies, R.J. (1999). pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H<sup>+</sup>-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol.* 57: 1037–1046.

Martins, B. X. (2011) Monoterpenóides como inibidores de bombas de prótons e possíveis indutores de morte celular programada em células tumorais. (Monografia) – Campos dos Goytacazes – Rj, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 45p.

McNeil, P.L. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to rescue. (2002) *J Cell Sci* 115: 873–879.

Melikova, M.S., Blagoveshchenskaia, A.D., Nikol'skii, N.N., Kornilova, E.S. (2002) Effect of an vacuolar proton pump inhibitor bafilomycin A1 on the intracellular processing of markers for receptor-mediated and liquid phase endocytosis. *Tsitologiya* 44: 807–816.

- Moriyama, K. e Yahara, I. (1999) Two activities of cofilin, severing and accelerating directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations around the actin-binding helix. *EMBO J.* 18:6752-6761.
- Mukherji, B., Chakraborty, N.G.(1995) Immunobiology an immunotherapy of melanoma. *Curr Opin Oncol.* 7:175–84.
- Nanda, A., Brumell, J. H., Nordstrom, T., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Borregaard, N., Rotstein, O. D., Grinstein, S. (1996) Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H<sup>+</sup>- ATPases. *J Biol Chem.* 271:15963–15970.
- Nelson, N. (1991) Trends Pharmacol. *Sci.* 12:71–75.
- Nelson, N. (2003) A journey from mammals to yeast with vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase). *J.Bioenerg. Biomembr.* 35: 281–289
- Nesbit, M., Herlyn, M. (1994) Adhesion receptors in human melanoma progression. *Invasion Metastasis.* 14:131–146.
- Niikura, K. (2002). Effect of a V-ATPases inhibitor, FR202126, in syngeneic mouse model of experimental bone metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60: 555–562.
- Niikura, Y., Abe, K., Misawa, M. (2004) Involvement of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in the induction of long-term potentiation in the basolateral amygdala-dentate gyrus pathway of anesthetized rats. *Brain Res.* 1017:218-221.
- Nishi, T., Forgac, M. (2002) The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases -nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Cell Mol Biol.* 3:94–103.
- Page, D. L., Anderson, T. J., Sakamoto, G. (1987) in Diagnostic Histopathology of the Breast. 219–222 (ChurchillLivingstone, New York).
- Paroutis, P., Touret, N., Grinstein, S. (2004) The pH of the Secretory Pathway: Measurement, Determinants, and Regulation. *Physiology.* 19: 207-215.
- Pasco, S., Brassart, B., Laurent Ramont, L., Maquart, F. X., Jean-Claude Monboisse, J.C. (2005). Control of melanoma cell invasion by type IV collagen *Cancer Detection and Prevention.* 29:260–266.
- Pastor-Soler, N., Beaulieu, V., Litvin, T. N., Da Silva, N., Chen, Y., Brown, D., Buck, J., Levin, L. R., Breton, S. (2003) Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J Biol Chem.* 278:49523–49529.
- Peters, C, Bayer, M.J., Buhler, S., Andersen, J.S., Mann, M., Mayer, A. (2001) Transcomplex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature.* 409:581–588

Petrangolini, G., Supino, R., Pratesi, G., Bo, L. D., Dal Bo, L., Tortoreto, M., Croce, A.C., Missiano, P., Belfiore, P., Farina, C., Zunino, F. (2006). Effect of a novel vacuolar-H<sup>+</sup> ATPase inhibitor on cell and tumor response to camptothens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318: 939-946.

Poste, G. (1971) Sub-lethal autolysis: modification of cell periphery by lysosomal enzymes. *Exp. Cell Res.*, 67: 11-16.

Raghunand, N., Martinez-Zaguilan, R., Wright, S., Gillies, R.J. (1999) pH and drug resistance II: turnover of acidic vesicles and resistance to weakly basic chemotherapeutic drugs. *Biochem Pharmacol* 57: 1047–1058.

Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M. e Di Carlo, R. (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sciences*, 68: 921–931.

Rintoul e Sethi, T. (2002) The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2: 437–442

Rofstad, E.K., Mathiesen, B., Kindem, K., and Galappathi K (2006) Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res* 66:6699–6707.

Rojas, J. D., Sennoune, S. R., Maiti, D., Bakunts, K., Reuveni, M., Sanka, S. C., Martinez, G. M., Seftor, E. A., Meininger, C. J., Wu, G., Wesson, D. E., M. Hendrix, J. C., Martinez-Zaguilan, R. Vacuolar-type H-ATPases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. (2006). *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291: 1147–1157.

Rojas, J.D., Sennoune, S., Martinez, G.M., Bakunts, K., Meininger, C.J., Wu, G., Wesson, D.E., Seftor, E.A., Hendrix, M.J.C., Martínez-Zaguilán, R. (2004) *J Cell Physiol.* 201:190–200.

Roos, A., Boron, W.F. (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev.* 61:296–434.

Santos, J. M. C. O. (2010) Ativação diferencial de V-ATPases na membrana plasmática em linhagens de melanoma. Dissertação. (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 70p.

Schmoranzler, J., Simon, S.M. Role of microtubules in transport and fusion of post-Golgi vesicles at the plasma membrane. (2003) *Mol Biol Cell.* 14:1558–1569.

Seftor, E. A., Meltzer, P.S., Kirschmann, D.A., Pe'er, J., Maniotis, A.J., Trent, J.M., Folberg, R., Hendrix, M.J. (2002) Molecular determinants of human uveal melanoma invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis.* 19:233–246.

- Shen, W., Zou, X., Chen, M., Liu, P., Shen, Y., Huang, S., Guo, H., Zhang, L. (2011) Effects of diphyllin as a novel V-ATPase inhibitor on gastric adenocarcinoma. *European Journal of Pharmacology*. 667 : 330–338.
- Sloane, B .F., Honn. K. V., Sadler, J. G., Turner, W. A., Kimpson, J. J., Taylor, J. D. (1982) Catepsin B activity in B16 melanoma cells: A possible marker for metastatic potential. *Cancer Research*. 42:980-986.
- Senoune, S. R., Bakunts, K., Martinez, G. M., Chua-Tuan, J. L., Kebir, Y., Attaya, M. N., Martinez-Zaguilan, R. (2004b) Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286: 1443–1452.
- Senoune, S. R., Gerbi, A., Duran, M .J., Grillasca, J. P., Compe, E., Pierre, S., Planells, R., Bourdeaux, M., Vague, P., Pieroni, G., Maixent, J. M. (2000) Effects of streptozotocin-induced diabetes on rat liver Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Eur. J. Biochem*. 267: 2071–2078.
- Senoune, S. R., Luo, D., Martínez-Zaguilán, R. (2004a) Plasmalemmal Vacuolar-Type H<sup>+</sup>-ATPase in Cancer Biology. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 40:185-206.
- Senoune, S. R., Martinez-Zaguilan, R. (2007). Plasmalemmal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases in angiogenesis, diabetes and cancer. *J Bioenerg Biomembr*. 39:427–433.
- Skinner, M.A., Wildeman, A.G. (1999)  $\beta$ 1 Integrin Binds the 16-kDa Subunit of Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase at a Site Important for Human Papillomavirus E5 and Platelet-derived Growth Factor Signaling. *The journal of Biological Chemistry*. 274:(33) 23119–23127.
- Sikkema, J., De Bont, J.A.M.(1995) Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Res*, (59) 2:201-222.
- Sorensen, M. G., Henriksen, K., Neutzsky-Wulff, A. V., Dziegiel, M. H., Karsdal, M. A. (2007) A novel and naturally potent V-ATPases inhibitor, abrogates acidification of the osteoclastic resorption lacunae and bone resorption. *J. Bone Miner. Res*. 22: 1640–1648.
- Stevens, T. H., Forgac, M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 13:779–808.
- Stock, C., Gassner, B., Hauck, C.R., Arnold, H., Mally, S., Eble, J.A., Dieterich, P. e Schwab, A (2005) Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J Physiol* (567)1:225–238.
- Sze, H., Ward, J.M., Lai, S. (1992.) Vacuolar H(+)-translocating ATPases from plants: structure, function, and isoforms. *J. Bioenerg. Biomembr*. 24: 371-382.

Supino, R., Petrangoli, G., Pratesi, G., Tortoreto, M., Favini, E., Bo, D. L., Casalini, P., Radaelli, E., Croce, A. C., Bottiroli, G., Misiano, P., Farina, C., Zunino, F. (2008) Antimetastatic effect of a small-molecule vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor in in vitro in vivo preclinical studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 324(1) 15-22.

Sun-Wada, G.H., Toyomura, T., Murata, Y., Yamamoto, A., Futai, M., Wada, Y. (2006) The  $\alpha 3$  isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic beta cells. *J Cell Sci* 119:4531–4540.

Teodoro, C. E. de S. (2004) Bombas protônicas de organelas da via secretória: Comparação entre leveduras e plantas. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia)- Campos dos Goytacazes-RJ , UENF,151p.

Thiery, J. P. (2002) Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev. Cancer*. 2:442–454.

van Golen, K. L., K., Zhi-Fen Wu, Z. F., Xiao Tan Qiao, X. T., Bao, L. W. e Merajver, S. D. 2012. RhoC GTPase, a Novel Transforming Oncogene for Human Mammary Epithelial Cells That Partially Recapitulates the Inflammatory Breast Cancer Phenotype. *Cancer Res* . 2000 (60):5832-5838.

Villano, C. M., Murphy, K. A, Akintobi, A., White, L. A. (2006) 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 210:212 – 224.

Vitavska, O., Merzendorfer, .H, e Wieczorek, H. (2005) The V-ATPase subunit C binds to polymeric F-Actin as well as to monomeric G-actin and induces cross-linking of actin filaments. *J Biol Chem* 280:1070–1076.

Vitavska, O., Wieczorek, H., e Merzendorfer, H. (2003) A novel role for subunit C in mediating binding of the H<sup>+</sup>-V-ATPase to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 278:18499–18505.

Zhang, V.J., Feng, Y., Forgac, M. (1994) Proton conduction and bafilomycin binding by the domain of the coated vesicle V-ATPase. *J. Biol. Chem*. 269: 23518–23523

Zuo, J., Jiang, J., Chen, S.H., Vergara, S., Gong, Y., Xue, J., Huang, H., Kaku M., e Holliday, L.S. (2006) Actin binding activity of subunit B of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase is involved in its targeting to ruffled membranes of osteoclasts. *J Bone Miner Res* 21:714–721.

Wagner, C. A., Finberg, K. E., Breton. S., Marshansky, V., Brown, D., Geibel, J. P. (2004). Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Physiol Rev*. 84:1263–1314.

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

Willingham, M. C., Cornwell, M. M., Cardarelli, C. O., Gottesman, M. M., Pastan, I. (1986) Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrugresistant and -sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs. *Cancer Res.* 46: 5941–5946.

Yoshimoto, Y., Jyojima, T., Arita, T., Ueda, M., Masaya Imoto, M., Matsumuraa, S., Toshimaa, K. (2002) Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase Inhibitory Activity of Synthetic Analogues of the Concanamycins: Is the Hydrogen Bond Network Involving the Lactone Carbonyl, the Hemiacetal Hydroxy Group, and the C-19 Hydroxy Group Essential for the Biological Activity of the Concanamycins? *Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters* 12: 3525–3528

Yoshioka, K., Nakamori, S., Itoh, K. (1999) Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res.* 59: 2004–2010.

Yumura, S., Mori, H., Fukui, Y. (1984) Localization of actin and myosin for the study of ameboid movement in *Dictyostelium* using improved immunofluorescence. *J. Cell Biol.* 99: 894–899.