

Renata de Freitas Saito

# **Indução de estresse de retículo endoplasmático como estratégia de quimiossensibilização de melanoma**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de doutor em Ciências.

Programa de Oncologia  
Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas  
Coorientadora: Dra. Andréia Hanada Otake

**(Versão corrigida resolução CoPGr6018/11, de 01 de Nov 2011 a versão original  
está disponível na biblioteca da FMUSP)**

**São Paulo**

**2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Saito, Renata de Freitas

Indução de estresse de retículo endoplasmático como estratégia de  
quimiossensibilização de melanoma / Renata de Freitas Saito. -- São Paulo, 2014.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Coorientadora: Andréia Hanada Otake.

Descritores: 1.Estresse de retículo endoplasmático 2.Resposta a proteínas não  
dobradas 3.Fator de transcrição CHOP 4.Melanoma 5.Cisplatino 6.Autofagia

USP/FM/DBD-117/14

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Akira e Selma*, pelo amor, dedicação, pelo exemplo de honestidade, simplicidade e perseverança que desde cedo nortearam meu caminho.

Ao meu marido, *Celso*, pelo seu amor e companheirismo tão essenciais em minha vida.

À minha avó, *Egydia*, por seu constante carinho transmitido através de orações e ao meu avô, *Jura* (*in memorian*), por ter feito parte de minha vida tão brevemente, mas que sei que sempre me acompanha.

Aos meus avós paternos, "*Ditian e Batian*" (*in memorian*), pelo exemplo de simplicidade, trabalho e persistência.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Roger Chammas**, por ter me dado à oportunidade de fazer parte de seu grupo, por seus valiosos ensinamentos e por partilhar sua “paixão” pela pesquisa, fundamentais para o meu aprimoramento profissional.

À minha co-orientadora, **Dra. Andréia Hanada Otake**, pela sua participação na realização deste trabalho e pela amizade presente em todos os momentos deste aprendizado.

À **Marisol Soengas**, por me receber em seu grupo, por ter possibilitado a experiência de fazer pesquisa em outro país e por ter contribuído para minha formação científica. Aos membros de seu grupo, **David, Direna, Tonan, Takis, Eva, Estela, Metehan, Érica, Angel, Maria e Alicia**, por terem feito minha estadia no CNIO e em Madri uma experiência tão maravilhosa. Em especial à **Lisa**, por ter compartilhado seu projeto, por ter me acolhido e me ensinado de forma tão carinhosa e especial. À **Carol**, pelo seu companheirismo e amizade que foram fundamentais ao longo dos seis meses que vivemos juntas em Madri.

À **Andréia, Luciana Andrade, Silvina e Priscila**, por me ajudarem com a elaboração da tese e discussão do meu trabalho.

Aos integrantes do Grupo de Adesão Celular e Câncer: **Carol, Camila MM, Camila Machado, Flávia, Guilherme, Karina, Luciana Andrade, Luiza, Mayara, Rafael, Silvina, Tharcísio, Priscila, Tuty**, pela fantástica experiência de convivência diária no laboratório, por terem cada um, à sua maneira, me ensinado tantas coisas, pela amizade e pelo apoio em todos os momentos vividos durante este trabalho.

Aos meus pais, **Akira e Selma**, por estarem sempre presentes, participando de cada momento de minha vida, não me deixando desistir, me ajudando a erguer a cabeça e seguir em frente, sempre me inspirando amor, respeito, honestidade e responsabilidade.

Ao meu irmão, **Milton**, por ser meu irmão tão querido, pelo imenso amor e carinho que existe entre nós dois.

Ao meu marido, **Celso**, por me fazer sentir completa e por cuidar de mim desde o primeiro instante em que entrou em minha vida. Companheiro de todos os segundos, cujo amor e incentivo, me ajudaram a finalizar este trabalho e com quem ainda quero dividir muitas conquistas e partilhar a minha vida.

À minha sogra e avó “adotiva”, **Dna Rita e Vó Per**, pelo amor com que me acolheram em sua família e por rezarem por mim constantemente, sempre torcendo pelo meu sucesso.

À **Luciana, Eloísa, Karen, Thereza, Flávia, Aline, Jô e Mari**, minhas amigas queridas de longa data que levo no coração, pelas risadas e pelo apoio mesmo estando longe, graças ao “*whats app*”.

À minha amiga **Tamaya**, por sua amizade sincera, pelas longas conversas no corredor, por me apoiar nos momentos difíceis e por estar sempre presente.

Aos **funcionários do LIM24 / CTO-ICESP**, por todo o suporte que possibilitou a realização deste trabalho.

*À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e a CAPES/CNPq*, as quais disponibilizaram recursos financeiros para a realização deste estudo.

E finalmente, à todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, na elaboração deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica, LIM24 – Oncologia Experimental e Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) - ICESP, Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da USP.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

*Cora Coralina*

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.



## Lista de Abreviaturas

RE	Retículo Endoplasmático
CPD	Dímeros de ciclobutano pirimidina
6-4 PP	Fotoproductos 6-4 pirimidina-pirimidona
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
UV	Ultravioleta
RGP	<i>Radial Growth Phase</i>
VGP	<i>Vertical Growth Phase</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
PD1	<i>programmed death 1 protein</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
RNS	<i>reative nitrogen species</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
IRE1 $\alpha$	<i>Inositol-Requiring Enzyme 1<math>\alpha</math></i>
PERK	<i>Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
GRP78	<i>glucose-regulated protein 78</i>
GADD153	<i>Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene 153</i>
ERAD	<i>ER-associated protein degradation</i>
eIF2 $\alpha$	<i>eukaryotic initiation factor 2<math>\alpha</math></i>
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i>
TRAF2	<i>tumor necrosis factor receptor-associated factor 2</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
ATGs	<i>autophagy-related genes</i>
LC3	<i>light chain of the microtubule-associated protein 1</i>
Hsc70	<i>heat shock cognate 70</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
SFB	soro fetal bovino
PVDF	<i>Hydrophobic polyviniylidene difluoride, Amershan/GE</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
BSA	Bovine serum albumin
CDDP	cisplatina
TMZ	temozolomida
TUNI	tunicamicina
PI	<i>propidium iodide</i>

# SUMÁRIO

**Resumo**

**Summary**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1 Melanoma .....	2
1.2 Quimioresistência em Melanomas .....	7
1.3 Estresse Oxidativo e Melanoma .....	10
1.4 Estresse de Retículo Endoplasmático (RE) .....	12
1.5 Estresse de RE e autofagia .....	19
1.6 Hipótese e Justificativa .....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 Cultivo de Células .....	33
3.2 Análise de Expressão Proteica por Western Blot .....	33
3.2.1 Extrato Celular .....	33
3.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Blotting .....	34
3.3 Ensaio de Morte Celular .....	35
3.4 Marcação de Vacúolos Acídicos com Laranja de Acridina .....	36
3.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio .....	36
3.6 Ensaio Clonogênico .....	37
3.7 Imunofluorescência .....	37
3.8 Experimento <i>in vivo</i> .....	38
3.9 Detecção de GRP78 de Superfície Celular .....	38
3.10 Detecção de L-PHA de Superfície Celular .....	39
3.11 Análise Estatística .....	39

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1 Tunicamicina sensibiliza células de melanoma à morte induzida por cisplatina.....	41
4.2 Avaliação da indução da via de UPR em resposta ao tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina.....	52
4.3 SK-MEL-29 possui GRP78 de superfície enquanto células SK-MEL-147 apresentam maior expressão de oligossacarídeos $\beta$ -1,6-GlcNAc.....	58
4.4 Autofagia pode estar envolvida na sensibilização das células de melanoma à morte induzida por cisplatina.....	67
4.5 Indução de estresse oxidativo em resposta ao tratamento prévio com tunicamicina.....	76
4.6 Avaliação de candidatos a indutores de estresse de RE como alternativa ao uso de tunicamicina in vivo.....	77
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	89
<b>6. FIGURAS SUPLEMENTARES</b> .....	91
<b>7. ANEXO</b> .....	100
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	102

## **APÊNDICE**

**APÊNDICE 1** – DDX46 na manutenção de melanomas. Projeto realizado no Centro Nacional de Investigação em Oncologia (CNIO - Madri/Espanha)

## RESUMO

Embora muitos estudos tenham contribuído para o esclarecimento do processo de tumorigênese em melanomas, ainda não há tratamento eficaz para melanomas metastáticos. Esta ineficácia terapêutica pode estar relacionada com a adaptação e seleção de células de melanoma à indução de estresse de RE. Ultrapassar os níveis sustentados de estresse de RE, interferindo nas vias de adaptação a este estresse, foi o alvo deste estudo na tentativa de propor uma nova estratégia terapêutica para sensibilizar células de melanoma a morte induzida por cisplatina. Mostramos que GADD153, um dos componentes da via de UPR (*Unfolded Protein Response*) responsável por induzir apoptose em resposta ao estresse de RE, está excluída do núcleo em melanomas primários, metástases ganglionares e viscerais. Este dado sugere que a localização citoplasmática do fator de transcrição GADD153 possa estar envolvida na resposta adaptativa de melanomas ao estresse de RE, uma vez que se sabe que GADD153 se acumula no núcleo em resposta a este estresse. Investigamos se a indução de estresse de RE seria capaz de induzir a translocação de GADD153 para o núcleo e resultar na sensibilização de células de melanoma a morte induzida por cisplatina (CDDP). Realizamos o tratamento de células de melanoma (SbCl<sub>2</sub>, Mel85, SK-MEL-29, SK-MEL-28 e SK-MEL-147) com tunicamicina (Tuni), indutor clássico de estresse de RE, previamente ao tratamento com CDDP. Demonstramos que em todas as linhagens exceto em SK-MEL-29, houve um aumento na porcentagem de células hipodiploides (>50%) no tratamento combinado (Tuni>CDDP) comparado ao tratamento com CDDP. As células SK-MEL-147 se mostraram mais sensíveis à indução de estresse de RE e as células SK-MEL-29 mais resistentes. Algumas diferenças entre estas linhagens como a expressão de GRP78 de superfície e presença de oligossacarídeos  $\beta$ 1-6 ligados de superfície podem estar relacionadas com esta resposta diferencial ao estresse de RE. Em todas as linhagens verificamos o acúmulo dos marcadores de UPR, GRP78 e GADD153, após o tratamento com tunicamicina. Além disso, GADD153 foi direcionada para o núcleo em resposta ao tratamento com tunicamicina. O acúmulo de vacúolos ácidos, da proteína autofágica LC3-II e de ROS após o tratamento com Tuni>CDDP, sugerem que tanto a autofagia quanto o estresse oxidativo parecem estar envolvidos na resposta de sensibilização. A inibição de autofagia com cloroquina aumentou a morte induzida por Tuni>CDDP, sugerindo que autofagia desempenha função protetora neste esquema terapêutico. Testamos um

segundo agente genotóxico, temozolomida (TMZ), uma droga equivalente à dacarbazina, e a mesma capacidade de sensibilização foi observada pelo prévio tratamento com tunicamicina. A validação deste conceito *in vivo* foi dificultada pela acentuada toxicidade apresentada por tunicamicina. Avaliamos alguns candidatos a agentes estressores do RE que poderiam apresentar menor toxicidade celular, como swainsonina, atorvastatina, metformina e o composto de cobre  $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2(\text{dpam})](\text{ClO}_4)_4$ . No entanto, não obtivemos resultados promissores com nenhum destes candidatos. Estes resultados mostram que as células tumorais podem ser pré-condicionadas à morte celular se expostas a um prévio estressor de RE, como Tuni, o que leva ao comprometimento da resposta adaptativa a indutores de morte celular como CDDP e TMZ. No entanto, ainda é necessário o estudo de agentes indutores de estresse de RE pouco tóxicos para que esta estratégia terapêutica possa ser utilizada em pacientes com melanoma.

## SUMMARY

Melanoma is among the most aggressive malignancies with increasing worldwide incidence and there is no effective treatment for the metastatic disease. The absence of an effective therapy may be due to adaptation and selection of melanoma cells to endoplasmic reticulum (ER) stress. We showed that GADD153, one of the components of the ER stress-mediated apoptosis pathway, was mostly excluded from the nucleus of primary and metastatic melanoma cells compared to *nevus* cells. These data suggest that the unexpected GADD153 cellular localization could be involved in melanoma cell adaption to ER stress, since GADD153 accumulates in the nucleus during ER stress. Unfolded protein response (UPR) signaling induced in response to ER stress, is a dual process that induces a protective response to restore ER homeostasis or cell death if ER stress is severe or persistent. We investigated if induction of ER stress was a potential strategy to chemosensitize melanoma cells to a second insult by surpassing the adaptive levels to ER stress. We first treated human melanoma cells (SbCl<sub>2</sub>, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 and SK-MEL-147) with tunicamycin (Tuni), an ER stress inducer, before cisplatin (CDDP) treatment. CDDP is a low cost chemotherapeutic drug currently used in Brazil as a second line for melanoma treatment, especially in youngsters. All cell lines, except SK-MEL-29, demonstrated an >50% increase in the percentage of hypodiploid cells with Tuni>CDDP treatment when compared to CDDP only. The same results were obtained with temozolomide (TMZ), equivalent drug to the active form of dacarbazine, the first line of cytotoxic treatment of melanomas. UPR markers, GRP78 and nuclear translocation of GADD153 were induced by Tuni. Differences between SK-MEL-29 and SK-MEL-147 as cell surface GRP78 and  $\beta$ 1-6 oligosaccharides can be related with the differential ER stress sensitization observed in these cells. One of the cellular mechanisms that are regulated by ER stress is autophagy. Accordingly, we observed an increase in the acidic vesicular organelles and accumulation of LC3II in response to Tuni>CDDP treatment. Autophagy inhibition with chloroquine increased Tuni>CDDP induced-cell death, suggesting that autophagy plays a protective role in this response. Oxidative stress can be involved in this scenario since we demonstrated an accumulation of reactive oxygen species in response to Tuni>CDDP. Tunicamycin was cytotoxic *in vivo* and we investigated alternatives to this antibiotic as swainsonine, atorvastatin, metformin and [Cu<sub>2</sub>(apyhist)<sub>2</sub>(dpam)](ClO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> but we did not observed ER stress induction. These results indicate that tumor cells could be preconditioned to cell death if exposed to a first ER stressor, such as Tuni, which would compromise an effective adaptive response to a cell death inducer, as CDDP and TMZ. This combined approach may be a promising strategy for melanoma therapy but further studies are necessary to find noncytotoxic alternatives to tunicamycin.

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Melanoma

Melanoma cutâneo é o tipo de câncer de pele mais agressivo e esta neoplasia maligna é originária a partir da transformação de melanócitos (TSAO H *et al.*, 2012). Na pele, os melanócitos estão situados na camada basal da epiderme e se separam da derme pela membrana basal. Estas células são responsáveis pela produção do pigmento melanina que é produzido em organelas especiais denominadas melanossomos. Estes se organizam em grânulos e são transferidos para os queratinócitos mais próximos onde formam uma capa ao redor do núcleo protegendo o DNA de danos causados pela radiação ultravioleta (COSTIN GE & HEARING VJ, 2007).

O principal agente etiológico ambiental para melanomas é a radiação ultravioleta (UV) (KANAVY HE & GERSTENBLITH MR, 2011). Esta radiação gera danos diretamente no DNA, através da radiação UVB, com a formação de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PP) (MATSUMURA Y & ANANTHASWAMY HN, 2002). No entanto, a radiação UV do tipo A (UVA) pode gerar danos no DNA de forma indireta através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS; do inglês: *Reactive Oxygen Species*) (LUND LP & TIMMINS GS, 2007). Além da radiação UVA e UVB, existe a radiação UVC, no entanto, esta última é retida pela camada de ozônio.

Como citado acima, melanina é um pigmento que atua no bloqueio endógeno dos potenciais danos gerados por esta radiação. No entanto, a exposição excessiva à radiação UV solar pode ultrapassar a capacidade citoprotetora desempenhada pela melanina, resultando em danos a moléculas orgânicas como DNA e proteínas. Além

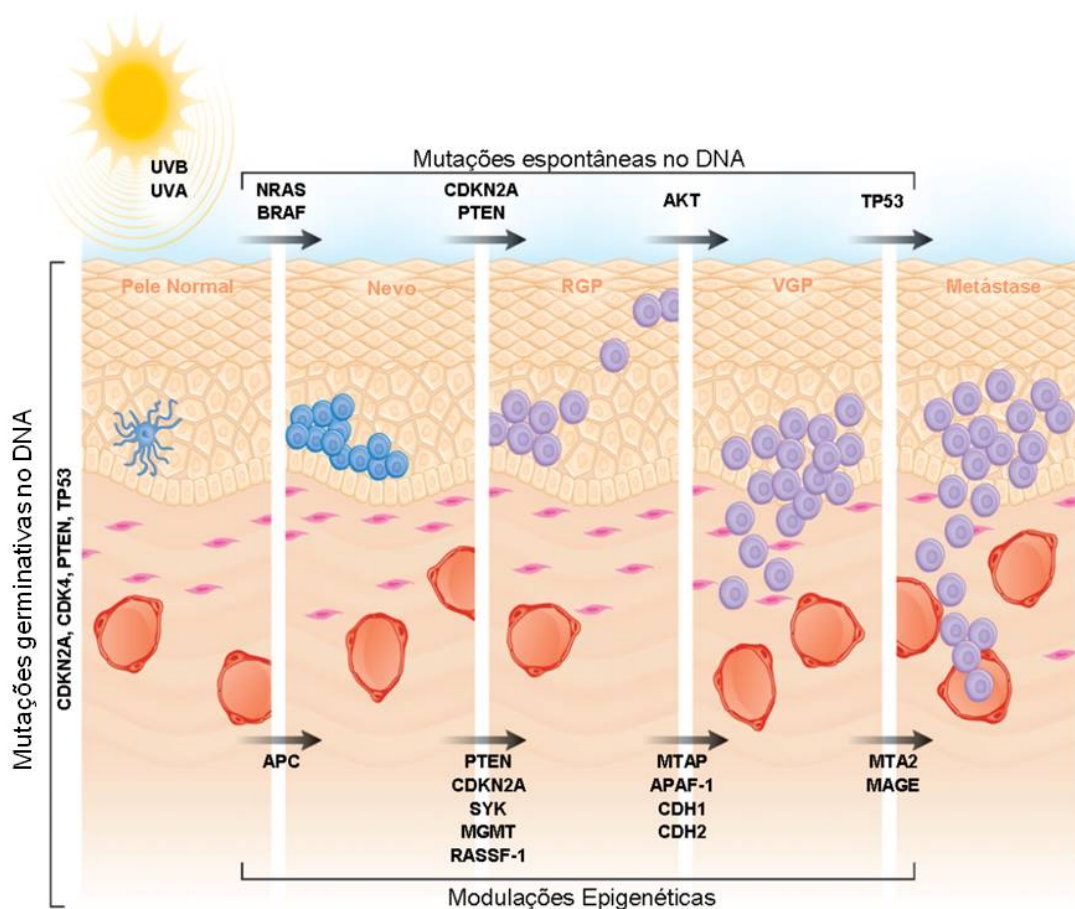


disto, a própria biossíntese de melanina gera a produção de espécies reativas de oxigênio, que são capazes de interagir com o DNA e dar início ao processo de tumorigênese (KVAM E & TYRRELL RM, 1999). Assim, a capacidade de absorção da radiação UV associada ao mecanismo de reparo do DNA, previnem a transformação maligna de melanócitos (RASS K & REICHRATH J, 2008).

O desenvolvimento de melanomas pode ser classificado da seguinte maneira, iniciando com a proliferação descontrolada de melanócitos, em resposta à radiação UV, o que origina o *nevus* benigno ou displásico, que não progridem devido à senescência celular induzida pela ação de produtos de protooncogenes. Eventualmente, alguns destes melanócitos adquirem capacidade de ultrapassar o controle de senescência e progridem para melanoma de crescimento radial (RGP; do inglês: *Radial Growth Phase*), ainda confinados na epiderme e com baixa capacidade de invasão. Finalmente, as células RGP podem adquirir a capacidade de invadir a derme e proliferar (VGP; do inglês: *Vertical Growth Phase*), podendo em seguida metastatizar para órgãos distantes (MILLER AJ & MIHM MC, 2006) (FIGURA 01). É importante ressaltar que apenas 50% dos melanomas são sabidamente originários de *nevus*, e a sua progressão pode ocorrer sem necessariamente passar por todas estas fases descritas acima (ZAIDI MR, DAY CP E MERLINO G, 2008).

Muitas alterações genéticas relacionadas com cada uma das fases da progressão de melanomas já foram identificadas. Melanomas hereditários estão associados principalmente com mutações nos genes *CDKN2A* e *CDK4*, no entanto, a maioria dos melanomas está relacionada com mutações esporádicas em genes supressores de tumor (*TP53* e *PTEN*), reguladores de apoptose (*BCL-2*, *AKT* e *APAF-1*) e membros da via proliferativa RAS/RAF (*BRAF* e *NRAS*) (ZAIDI MR, DAY CP E MERLINO G, 2008). No entanto, o desenvolvimento de melanomas não resulta apenas do acúmulo de

alterações genéticas, mas também está associado a alterações no padrão de interação entre melanócitos e as diferentes células presentes no microambiente tecidual da pele, em parte causadas por alterações epigenéticas que favorecem a sobrevivência e proliferação celular. Portanto, podemos compreender o desenvolvimento do melanoma como resultado da ruptura da homeostasia presente na pele (ALBINI A & SPORN MB, 2007).



Fonte: Adaptado de ZAIDI *et al.* (2008)

**FIGURA 01 - Alterações moleculares associadas à iniciação e progressão de melanomas.** A proliferação anormal de melanócitos em resposta à radiação UV resulta na formação de *nevus* benignos e displásicos. O melanoma de crescimento radial (RGP) apresenta proliferação somente intra-epitelial, enquanto o melanoma de crescimento vertical (VGP) possui capacidade de invadir a derme, culminando em metástase. Todos estes estágios de desenvolvimento tumoral são acompanhados de mutações espontâneas e/ou hereditárias no DNA, além de modificações epigenéticas.

Há um amplo consenso na literatura sobre os mecanismos de iniciação e progressão de melanomas, no entanto, se faz necessário o melhor entendimento dos mecanismos que conferem capacidade metastática a estas células. Contudo, este ainda é um dos principais desafios na pesquisa deste tipo tumoral. Melanomas apresentam baixa incidência, porém estão associados a altos índices de mortalidade. Isto se deve ao fato destas células apresentarem acentuada capacidade de gerar metástases e de serem refratárias às terapias existentes. Quando detectados precocemente, pacientes com melanoma podem ser curados através de ressecção cirúrgica. No entanto, quando o diagnóstico é tardio, a maioria dos pacientes apresentam doença metastática e sobrevida livre de doença de aproximadamente 6 a 9 meses (TENTORI L, LACAL PM E GRAZIANI G. 2013).

A primeira droga aprovada para o tratamento de melanoma pelo *Food and Drug Administration* (FDA) foi o agente alquilante dacarbazina (1975). Duas décadas depois foram aprovados dois agentes imunológicos, interferon- $\alpha$  (INF-  $\alpha$ ) (1995) e interleucina (IL)-2 (1998) (LUKE JJ & SCHWARTZ GK, 2013). A taxa de resposta destas abordagens terapêuticas é inferior a 10% (CROSBY T *et al.*, 2000), o que explica a baixa sobrevida dos pacientes com melanoma metastático. Em 2002 foram descritas mutações oncogênicas no gene *BRAF*, presentes em aproximadamente 50%-60% dos pacientes com melanoma. Dentre os tipos de mutações, 90% foram caracterizadas do tipo *missense* com substituição de valina por ácido glutâmico no códon 600 (V600E) (DAVIES H *et al.*, 2002). A mutação V600E resulta no aumento da atividade quinase de BRAF, levando à ativação constitutiva da via RAS-RAF-MEK-ERK, que promove a proliferação descontrolada da célula tumoral.

A partir da descrição da mutação V600E no gene *BRAF*, o FDA aprovou a utilização de pequenas moléculas inibidoras específicas de proteínas BRAF V600-

mutadas (i.e. vemurafenib, dabrafenib) para pacientes com melanoma que apresentassem a mutação BRAF<sup>V600E</sup> (CHAPMAN PB. *et al.*, 2011). O tratamento com vemurafenib aumentou a sobrevida global de pacientes com melanoma para 13,6 meses, com uma taxa de resposta de 48%. Estes números foram muito superiores aos obtidos em pacientes tratados com dacarbazina, que resultou em 9,6 meses de sobrevida global e uma taxa de resposta de apenas 5% (CHAPMAN PB. *et al.*, 2011).

Recentemente, o FDA aprovou a utilização do anticorpo ipilimumab para o tratamento de melanomas. Este anticorpo inibe o receptor coinibitório de células T, CTLA-4 (CTLA-4, do inglês: *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), inibindo a atividade regulatória das células T e aumentando a resposta imune antitumoral (CALLAHAN MK & WOLCHOK JD, 2013). Um estudo de fase III incluindo pacientes com melanoma de grau avançado (III e IV) tratados com ipilimumab e/ou dacarbazina, revelou que o ipilimumab apresenta taxa de sobrevida superior à dacarbazina após 1 (47,3% vs 36,3%), 2 (28,5% vs 17,9%) e 3 anos (20,8% vs 12,2%) de tratamento. Os autores concluíram que quando combinado com a dacarbazina, o ipilimumab apresenta feito duradouro no tratamento do melanoma metastático (ROBERT C *et al.*, 2011). A nova promessa terapêutica, que ainda está em estudo clínico, é um segundo inibidor de receptor coinibitório de células T, o anticorpo anti-PD1 (PD1, do inglês: *programmed death 1 protein*) e seu ligante anti-PD1L. A hipótese é que a combinação destes dois anticorpos, anti-CTLA-4 e anti-PD1, apresentem um efeito antitumoral ainda maior e mais duradouro (INTLEKOFER AM & THOMPSON CB, 2013).

## 1.2 Quimiorresistência em melanomas

Apesar de promissoras, todas estas novas abordagens terapêuticas descritas acima ainda estão associadas com recidivas tumorais em longo prazo. Uma hipótese discutida para explicar esta resistência adquirida seria a acentuada heterogeneidade tumoral apresentada por melanomas, o que permite a seleção de células tumorais capazes de sobreviver frente aos agravos gerados pelos tratamentos. Estudos mostram que, de fato, uma pequena parcela das células de melanoma tratada com inibidores de BRAF sobrevive e emerge de 3 a 6 meses após o início do tratamento (PARAISO KH *et al.*, 2010; JIANG CC. *et al.*, 2011; BASILE KJ *et al.*, 2012). Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de explicar os mecanismos de resistência aos inibidores de RAF e propor abordagens terapêuticas combinadas para diminuir ou prevenir o surgimento de clones resistentes ao tratamento (LITO P, ROSEN N E SOLIT DB, 2013).

O BRAF é membro da família RAF de serino/treonino quinases que constituem a via MAPK (do inglês: *mitogen activated protein kinase*). A via RAS-RAF-MEK-ERK é responsável por transmitir sinais de proliferação e sobrevivência a partir de receptores de superfície celular para o citoplasma e núcleo. A ativação desta via, em células não transformadas, ocorre com a ligação de fatores de crescimento a seus receptores ativando RAS na membrana plasmática. Uma vez ativado, RAS interage com uma família de quinases RAF (ARAF, BRAF e CRAF) que leva a ativação/fosforilação de MEK1/2 e em seguida ERK1/2. Após sua ativação, ERK interage com diferentes proteínas que promovem proliferação e sobrevivência celular.

Entre os mecanismos de resistência aos inibidores de RAS, podemos destacar a reativação da via RAS-RAF-MEK-ERK ou de outras vias de sobrevivência e/ou

proliferação. A reativação da via MAPK pode ocorrer através de alterações no próprio gene *BRAF*, como amplificação e/ou mecanismos de *splicing* alternativo. O aumento no número de cópias genômicas de *BRAF* foi observado em melanomas após resposta inicial a um inibidor de BRAF, no entanto, esta resistência pode ser revertida com o aumento nas doses do inibidor de BRAF (SHI H *et al.*, 2012). Já o *splicing* alternativo de BRAF produz uma proteína truncada (p61 BRAF) que é capaz de se dimerizar na presença do inibidor de BRAF (POULIKAKOS PI *et al.*, 2011) e neste caso, o aumento na dose do inibidor de BRAF não é suficiente para ultrapassar esta resistência.

Alterações em outros componentes da via MAPK podem estar envolvidas nestas respostas de resistência. Por exemplo, a presença da mutação ativadora NRAS (Q61K e Q61R) (NAZARIAN R *et al.*, 2011 e POULIKAKOS PI *et al.*, 2010) ou mutações em MEK1 (EMERY CM *et al.*, 2009) são observadas em tumores resistentes à vemurafenib. A reativação desta via também pode ocorrer em resposta à formação de heterodímeros de RAS (VILLANUEVA J *et al.*, 2010) e superexpressão da quinase COT, a qual pode fosforilar diretamente MEK e/ou ERK (JOHANNESSEN CM *et al.*, 2010).

No entanto, a resistência aos inibidores de RAF pode ser independente da via MAPK, através da indução de outras vias de proliferação e sobrevivência como a via PI3K-AKT. Pacientes não responsivos à terapia com inibidores BRAF apresentam baixa expressão de PTEN (TRUNZER K *et al.*, 2013), proteína que regula negativamente a via PI3K-AKT. A perda de função de PTEN está relacionada com o aumento da atividade serina/treonina quinase de AKT. Além da perda de PTEN, observa-se um aumento da expressão de múltiplos receptores tirosina-quinases em amostras de pacientes e linhagens celulares resistentes a inibidores de BRAF (NAZARIAN R *et al.*, 2010, VILLANUEVA J *et al.*, 2010, SHI H *et al.*, 2011). O aumento destes receptores

não induz a reativação da via MAPK, mas inibe a apoptose através do aumento de ativação da via PI3K-AKT.

A ativação da via de sobrevivência PI3K-AKT também pode ser mediada por fatores produzidos pelo microambiente tumoral. A produção de fatores de crescimento hepatocitário (HGF, do inglês: *hepatocyte growth factor*) produzidos por células do estroma do microambiente tumoral é capaz de mediar resistência a inibidores de BRAF pela ativação de PI3K, e esta resistência pode ser ultrapassada através do bloqueio do receptor de HGF (c-MET) (STRAUSSMAN R *et al.*, 2012, WILSON TR *et al.*, 2012). Este último trabalho mostra que o microambiente tumoral é um modulador do processo de quimioresistência em tumores. Assim, a ineficácia terapêutica e a resistência adquirida em melanomas podem estar relacionadas não somente com estas ativações de vias celulares intrínsecas, mas também com a acentuada adaptação destas células tumorais a condições microambientais desfavoráveis e consequente evasão à morte celular (SATYAMOORTHY K & HERLYN M, 2002).

Melanomas e tumores sólidos em geral apresentam áreas hipóxicas e de privação de nutrientes ao longo do crescimento da massa tumoral devido ao distanciamento de vasos sanguíneos e devido à angiogênese anormal com produção de vasos não funcionais. Este cenário propicia a adaptação e seleção de células tumorais resistentes à privação de oxigênio e de nutrientes, além de dificultar a perfusão de drogas. Melanomas estão intimamente relacionados com adaptação a estresse oxidativo gerado pela privação de oxigênio, pois suas próprias células de origem, os melanócitos, estão situadas na camada basal da epiderme, uma região pouco vascularizada, e são adaptadas para sobreviver e proliferar nestas condições. Além disso, enquanto melanossomos normais funcionam como quelantes de espécies reativas de oxigênio, melanomas apresentam melanossomos alterados, cuja produção de ROS ultrapassa a capacidade de

antioxidantes celulares, levando a um aumento de estresse oxidativo e consequentemente gerando mutações (GIDANIAN S *et al.*, 2008). Portanto, desde o início, as células de melanomas parecem estar adaptadas a condições microambientais desfavoráveis.

### ***1.3 Estresse Oxidativo e Melanoma***

A pele está situada na interface entre o meio ambiente e o corpo, atuando como uma barreira protetora contra injúrias como as causadas pela radiação UV ou agentes químicos. Portanto, a pele está constantemente suscetível à exposição a estas múltiplas fontes exógenas geradoras de estresse oxidativo, que ocorre com o desbalanço entre a produção e a eliminação de radicais livres, como as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (RNS, do inglês: *reactive nitrogen species*). Este estresse pode ser resultado tanto do aumento da formação destas espécies reativas quanto da diminuição da capacidade celular antioxidante e/ou ineficiência dos mecanismos de reparo celular (KLAUNIG JE & KAMENDULIS LM, 2004).

As espécies reativas de oxigênio apresentam dupla função, em baixas concentrações estão envolvidas em respostas fisiológicas (ex. defesa contra agentes infecciosos e sinalização celular). No entanto, o acúmulo de ROS pode resultar em estresse oxidativo (VALKO M *et al.*, 2007). Neste último caso, o estresse oxidativo e acúmulo de ROS podem mediar danos a estruturas celulares como DNA, proteínas e lipídeos, e em última análise, levar a morte celular.

Em melanomas, acredita-se que o estresse oxidativo esteja relacionado ao processo de tumorigênese, pois há o envolvimento de ROS em todos os estágios de



progressão tumoral. A geração de ROS em melanomas pode estar relacionada com mecanismos celulares como: (1) resposta ao ambiente epidérmico hipóxico em que se encontram os melanócitos, (2) o elevado metabolismo das células tumorais, (3) resposta ao processo inflamatório crônico em melanomas, (4) decorrente da própria biossíntese de melanina e (5) em resultado do processo de metástase. Além disto, como citado anteriormente, o principal fator etiológico do melanoma, a radiação UV, além de causar danos diretamente no DNA é capaz de induzir estresse oxidativo através da produção de ROS. Estes podem interagir com o DNA causando danos como quebras nas duplas-fitas e mutações, contribuindo para o processo de iniciação das células de melanócitos (revisado em WITTGEN HG & VAN KEMPEN LC, 2007).

Estudos de proteômica e transcriptômica mostraram que células de melanoma murino apresentam diminuição nos níveis de proteínas envolvidas no processo de degradação de espécies reativas de oxigênio (DE SOUZA *et al.*, 2006), sugerindo que estas células estão em um constante estado pró-oxidativo. Como discutido acima, esta capacidade de sobrevivência a microambientes pró-oxidativos apresentada por melanomas (DE SOUZA *et al.*, 2006) pode estar relacionada com sua célula de origem, os melanócitos. Como a biogênese de melanina é fonte de ROS, células de origem melanocítica, como as células de melanoma, possuem vias de adaptação ao acúmulo de ROS, como sistemas antioxidantes mais eficientes.

Melanomas podem modular o sistema antioxidante para garantir sua sobrevivência celular. O trabalho de LINCOLN DT *et al.* (2003), mostra que as células de melanoma apresentam atividade do sistema antioxidante tioredoxina superior à encontrada em câncer de pele menos agressivos e em melanócitos. Portanto, a aquisição de um sistema antioxidante e de outras adaptações ao estresse oxidativo parecem ser um fator crítico para o desenvolvimento e progressão de melanomas.

O estresse oxidativo também está diretamente relacionado com a quimioresistência em tumores, pois ROS bloqueia a atividade de fosfatase de PTEN, a qual inibe AKT (GROEN A *et al.*, 2005). Assim, a indução de AKT mediada por ROS é uma das vias induzidas pela célula tumoral que pode permitir sua sobrevivência em condições de hipóxia, e ao mesmo tempo torna esta célula mais resistente a abordagens terapêuticas. A acentuada resistência a elevados níveis de estresse oxidativo resulta no comprometimento da eficácia de terapias baseadas em apoptose induzida por este tipo de estresse. Aumentos moderados na geração de ROS podem ativar vias de sobrevivência e inibir a apoptose, comprometendo a eficácia destas terapias. No entanto, induzir aumentos severos nos níveis de ROS, suficientes para ultrapassar os níveis sustentados destas espécies reativas presentes nas células tumorais podem favorecer a apoptose. Muitos reguladores redox encontram-se alterados em células tumorais resistentes a drogas, sugerindo que a alteração na homeostasia redox deva estar relacionada com esta resistência celular (PELICANO H, CARNEY D E HUANG P., 2004). Portanto, manipular o sistema redox pode ser uma terapia alternativa para induzir a morte celular de células tumorais resistentes.

#### ***1.4 Estresse do Retículo Endoplasmático (RE)***

O estresse oxidativo pode estar associado ao estresse de retículo endoplasmático (RE). Esta organela, além de ser o maior reservatório de cálcio celular, é responsável pela síntese de lipídeos, por modificações pós-traducionais e pelo enovelamento proteico.

Como citado anteriormente, as ROS podem interagir não somente com o DNA, mas também com proteínas e lipídeos, levando a uma alteração no estado redox celular. O enovelamento proteico ocorre no lúmen do RE, processo pelo qual cadeias polipeptídicas de proteínas nascentes são submetidas para assumirem sua devida conformação e adquirirem uma estrutura tridimensional específica, a chamada forma nativa. O processo de enovelamento proteico ocorre através da formação de pontes dissulfetos e depende do ambiente oxidativo do RE para que sejam formadas (MALHOTRA JD & KAUFMAN RJ, 2007). O acúmulo de ROS decorrente da indução de estresse oxidativo, causado, por exemplo, pela radiação UV, pode alterar o estado pró-oxidativo do RE, comprometendo o processo de enovelamento proteico e levando ao acúmulo de proteínas mal enoveladas. Este acúmulo compromete a homeostasia do RE e caracteriza o estresse de RE.

Proteínas denominadas chaperonas são responsáveis por catalisar o processo de enovelamento proteico. Estas chaperonas se ligam a sequências hidrofóbicas expostas na proteína nascente, auxiliando no enovelamento proteico e impedindo que estas formem agregados (HAAS IG, 1994). A principal proteína chaperona residente no RE é a GRP78 (do inglês: *Glucose-Regulated Protein 78*) ou Bip, proteína que pertence à família de proteínas *heat-shock* (HSP; do inglês: *Heat Shock Protein*). Além destas proteínas chaperonas, o RE possui proteínas sensoras capazes de detectar proteínas mal enoveladas ou não enoveladas, que são ATF6, IRE1 $\alpha$  e PERK (FIGURA 02). Como o processo de enovelamento proteico é crucial para o funcionamento destas proteínas, a presença de um mecanismo de “controle de qualidade” garante que apenas proteínas enoveladas adequadamente saiam do RE (ELLSGAARD L & HELENIUS A, 2003).

Além da alteração do estado redox causado por estresse oxidativo, outros fatores levam à ruptura da homeostasia do RE, como alteração de níveis intraluminais de

cálcio, alteração no perfil de glicosilação proteica, privação de nutrientes, hipóxia e infecção por patógenos (FAITOVA J *et al.*, 2006). Sabe-se que tumores sólidos como melanomas, distanciam-se de vasos sanguíneos durante o crescimento tumoral, originando regiões hipóxicas e com privação de nutrientes. Estas regiões podem induzir estresse de RE nas células tumorais e eventualmente selecionar células mais adaptadas a este estresse. Além disso, o crescimento tumoral exacerbado em tumores requer um aumento na síntese de proteínas que pode ultrapassar a capacidade da maquinaria de enovelamento proteico, podendo resultar no acúmulo de proteínas mal enoveladas e consequentemente, resultando em estresse de RE.

Em resposta ao estresse de RE, é ativado o mecanismo conhecido como resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês: *Unfolded Protein Response*) (MA Y & HENDERSHOT LM, 2004). A via de UPR é induzida na tentativa de restabelecer a homeostasia desta organela, e é regulada pelas três proteínas sensoras IRE1 $\alpha$ , ATF6 e PERK (FIGURA 02). Estas proteínas encontram-se associadas à chaperona GRP78 quando o RE se encontra em homeostasia. No entanto, em situações de estresse, estas proteínas são ativadas através do desligamento de GRP78 que é recrutada para auxiliar no enovelamento proteico (WELIHINDA AA, TIRASOPHON W E KAUFMAN RJ, 1999). De maneira geral, uma vez ativadas, estas proteínas induzem vias que levam à diminuição global da tradução proteica, aumento da expressão de proteínas responsáveis pelo enovelamento proteico e de proteínas envolvidas no processo de degradação proteossomal de proteínas mal enoveladas, mecanismo denominado ERAD (do inglês: *ER-associated protein degradation*) (MEUSSER B *et al.*, 2005).

Uma vez liberada da inibição mediada pela interação com GRP78, PERK se dimeriza e se autofosforila, ativando a sua função de quinase (BERTOLOTTI A *et al.*, 2000). PERK ativado fosforila e inibe o fator 2 de início de tradução proteica, eIF2 $\alpha$  (do

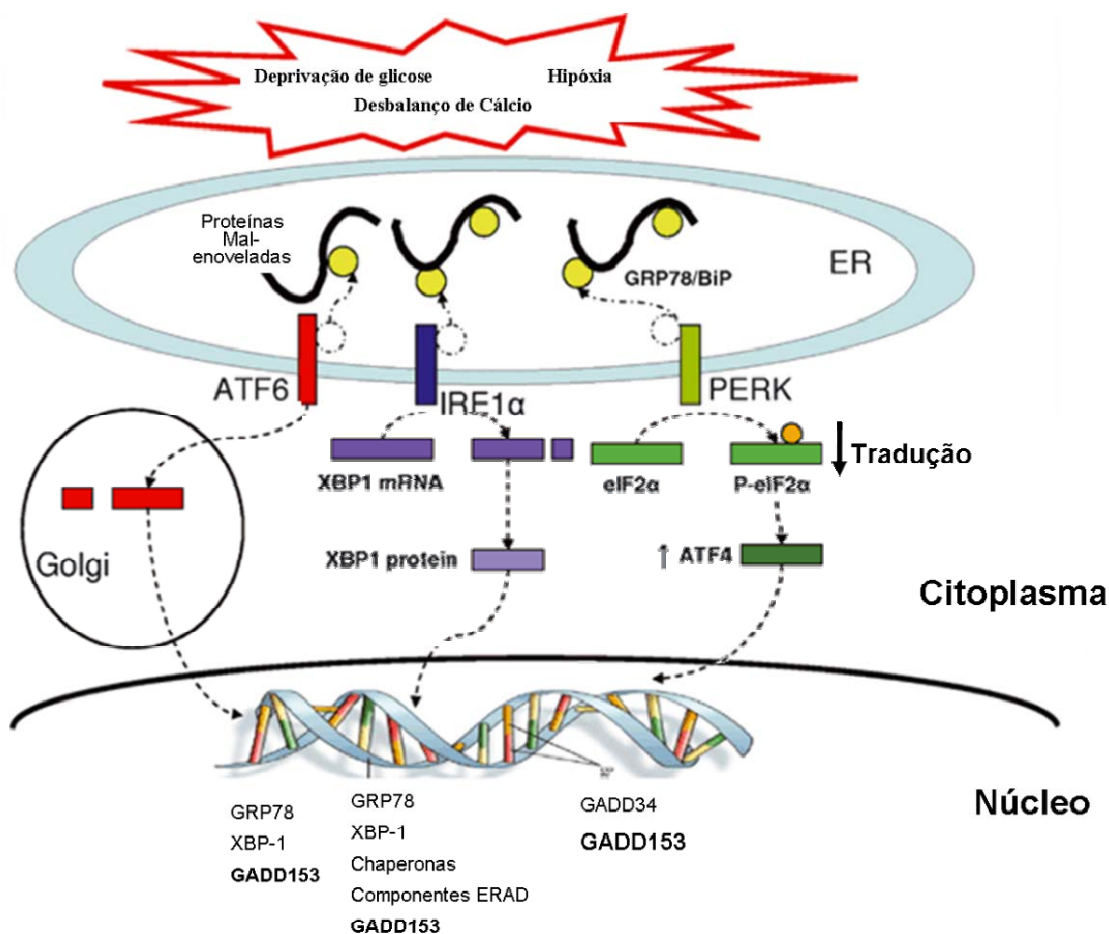
inglês: *eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$* ), conseqüentemente, inibindo a síntese global de proteínas. No entanto, PERK permite a tradução seletiva de ATF4, fator de transcrição responsável pela regulação de genes envolvidos em vias de sobrevivência celular e de GADD153 (do inglês: *Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene 153*), responsável pela indução de morte celular em resposta ao estresse de RE. IRE1 $\alpha$  também se dimeriza e se autofosforila após se desligar de GRP78, o que ativa sua função de endonuclease para processamento de mRNA (HAN D *et al.*, 2009). O principal alvo de IRE1 $\alpha$  é o mRNA que codifica XBP-1 (do inglês: *X-box binding protein 1*) e através de *splicing* alternativo resulta no fator de transcrição XBP-1, o qual regula a expressão de genes envolvidos no enovelamento proteico, controle de qualidade do enovelamento e no processo de ERAD (YOSHIDA H *et al.*, 2001). O desligamento de GRP78 de ATF6 permite que este último seja translocado para o Golgi, onde é clivado e atua como fator de transcrição para aumentar a transcrição de XBP1 e proteínas associadas ao ERAD (YOSHIDA H *et al.*, 2001).

O RE regula a qualidade, o enovelamento e a secreção de proteínas recém-sintetizadas. Em condições normais, uma vez enoveladas adequadamente, as proteínas são transportadas através da via secretória para sua localização celular designada. Se a proteína não for enovelada adequadamente, esta fica retida no RE através de proteínas responsáveis pelo “controle de qualidade” até adquirir a conformação correta para ser secretada. No entanto, se o enovelamento adequado não for atingido, esta proteína mal enovelada é direcionada para degradação proteossomal (ERAD).

As proteínas recém-sintetizadas são direcionadas para dentro do lúmen do RE, através dos translocons, onde se associam à chaperona GRP78 que auxiliará no enovelamento proteico. Em seguida, é adicionado à cadeia polipeptídica nascente um oligossacarídeo precursor (GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub>) e glucosidases presentes no RE

adicionam resíduos de glicose a esta proteína permitindo o reconhecimento das chaperonas calnexina e calreticulina. Com a retirada de resíduos de glicose, calnexina e calreticulina se desligam, liberando a proteína nativa enovelada adequadamente do RE e esta segue a via secretória (ELLGAARD L & HELENIUS A, 2003). No entanto, proteínas mal-enoveladas são reglicosiladas pela glicoproteína UDP-glicose glicosiltransferase. Este ciclo se repete até que a proteína seja enovelada adequadamente e alcance sua forma nativa, ou seja reconhecida como mal-enoveladas irreversíveis por lectinas envolvidas no processo de ERAD (FAGIOLI C & SITIA R, 2001). A remoção de 3 ou 4 resíduos de manoses pelas manosidases do RE, especialmente a manosidade I, marcam as proteínas mal-enoveladas para a degradação ERAD (VEMBAR SS & BRODSKY JL, 2008).

Assim, o processo de ERAD se inicia quando chaperonas reconhecem proteínas mal enoveladas terminais, sinalizadas pela manosidase I, e as direcionam para sítios específicos na membrana do RE onde são transportadas, através da membrana, do lúmen desta organela para o citoplasma. A ubiquitina ligase E3 está associada à membrana do RE onde catalisa a polimerização de cadeias de ubiquitina que são adicionadas ao substrato a ser degradado (YE Y, 2005). Isto permite que o substrato seja retirado da membrana do RE pela AAA ATPase citosólica p97/VCP, que em conjunto com cofatores, direciona o substrato para 26S proteossoma, onde é degradado (MEUSSER B *et al.*, 2005) (VEMBAR SS & BRODSKY JL, 2008).



Fonte: Adaptado de HERSEY e ZHANG (2008).

**FIGURA 02 - Vias ativadas por UPR (*Unfolded Protein Response*) em resposta ao estresse de RE.** A chaperona GRP78 se liga às proteínas de membrana ATF6, IRE1 $\alpha$  e PERK, prevenindo a ativação das mesmas em condições de homeostasia. No entanto, o acúmulo de proteínas mal enoveladas no lúmen do RE resulta na liberação de GRP78 destas proteínas. Ao se desligar de IRE1 $\alpha$  e PERK, estas proteínas se oligomerizam. Uma vez ativada, IRE1 $\alpha$  exerce sua atividade de ribonuclease resultando na produção de XBP1, fator de transcrição que induz a expressão de genes envolvidos no restabelecimento do processo de enovelamento e degradação de proteínas mal-enoveladas (ERAD). A ativação de PERK resulta na fosforilação de eIF2 $\alpha$  e atenuação global da tradução de mRNA. Apenas alguns mRNAs, incluindo *ATF4*, são traduzidos. ATF4 induz genes envolvidos no restabelecimento da homeostasia do RE e indução de autofagia. A liberação de ATF6 permite com que esta proteína se direcione para o Golgi, onde após processos proteolíticos ATF6 ativa é liberada, controlando a expressão de genes envolvidos em UPR e ERAD. A persistência de indução de estresse de RE faz com que todas as vias induzidas por ATF4, XBP1 e ATF6 converjam para a indução de GADD153, o qual controla transcricionalmente a expressão de genes codificadores de BIM e Bcl2 e resulta em morte celular em resposta ao estresse de RE.

A indução severa de estresse de RE ou a persistência deste estresse induz a ativação de vias de morte celular a fim de eliminar as células com comprometimento do RE (KIM R *et al.*, 2006). As principais vias apoptóticas ativadas em resposta ao estresse do RE são a indução transcricional do gene *GADD153/CHOP*, a ativação da quinase JNK e a ativação de caspase 12 (FAITOVA J *et al.*, 2006).

A proteína GADD153 está presente no citoplasma em condições de homeostasia celular, no entanto, situações de estresse induzem o aumento de expressão e o acúmulo de GADD153 no núcleo. A indução de GADD153 está envolvida na resposta ao estresse de RE, onde o aumento da expressão desta proteína pode resultar em parada de ciclo celular e apoptose (OYADOMARI S & MORI M, 2004). As três proteínas sinalizadoras de estresse do RE podem induzir a transcrição de GADD153, no entanto, a via de PERK/eIF2 $\alpha$  através da indução de ATF-4, é dominante sobre as demais. GADD153 está envolvida no processo de morte celular podendo suprimir a ativação de Bcl-2 (McCULLOUGH *et al.*, 2001) e NF $\kappa$ B, resultando na sensibilização da mitocôndria aos efeitos pró-apoptóticos das proteínas BH3-*only* (OYADOMARI S & MORI M, 2004). GADD153 também induz apoptose através de um mecanismo não transcricional, como a interação proteína-proteína. Por exemplo, C/EBP $\alpha$  (do inglês: *CCAAT/enhancer binding protein alpha*), família de proteínas a qual GADD153 pertence, mostra efeito antiproliferativo através da interação com as quinases CDK2 e CDK4, causando parada no crescimento celular pela inativação destas quinases (WANG H *et al.*, 2001).

Outra via de resposta de morte celular em resposta à indução de estresse de RE é mediada pela ativação de JNK. A proteína sensora IRE1 recruta TRAF2 (do inglês: *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) e este através de ASK1 (do inglês:



*apoptosis signal-regulating kinase 1*) ativa as vias de JNK e p38 (URANO F *et al.*, 2000). Uma vez ativa, JNK fosforila membros da família de Bcl-2 (LEI K & DAVIS RJ 2003). A fosforilação de Bcl-2 inibe sua atividade antiapoptótica e sua habilidade de regular a saída de  $Ca^{2+}$  do RE (BASSIK MC *et al.*, 2004), já a fosforilação de Bax e Bim, aumenta seus efeitos pró-apoptóticos (PAPADAKIS ES *et al.*, 2006; PUTCHA GV *et al.*, 2003). Além disso, TRAF2 interage com a caspase-12, formando o complexo IRE1-TRAF2-caspase12 e cliva esta caspase resultando na ativação da mesma (YONEDA T *et al.*, 2001). No entanto, a indução de morte celular em resposta ao estresse de RE pode ocorrer independentemente da via de UPR. Durante o estresse de RE, ocorre a saída de  $Ca^{2+}$  desta organela e uma vez no citoplasma, o  $Ca^{2+}$  é absorvido pela mitocôndria deflagrando apoptose (STRASSER A, O'CONNOR L E DIXIT VM, 2000).

### **1.5 Estresse de RE e autofagia**

Além da via de UPR, o mecanismo de autofagia também pode ser ativado em resposta ao estresse de RE (Yang ZJ *et al.*, 2011). Macroautofagia, um dos três tipos de autofagia, é um processo catabólico de degradação de proteínas e organelas celulares mediado pela formação de vesículas. Estas porções celulares a serem degradadas são direcionadas para dentro de vesículas de dupla membrana chamadas autofagossomos ou vesículas autofágicas. Estes se fundem com lisossomos formando autofagolisossomos, onde o conteúdo é digerido e os componentes reciclados são devolvidos para a célula. A produção de vesículas autofágicas pode ser dividida em 4 fases: iniciação, nucleação,

maturação e fusão com lisossomos, sendo todas estas etapas mediadas por diversas proteínas codificadas por genes ATGs (do inglês: *autophagy-related genes*).

Durante a iniciação ocorre a síntese *de novo* de membrana através do recrutamento de lipídeos de diversas organelas, como lipídeos provenientes do RE, para a formação do autofagossomo. O processo de nucleação é controlado por PI3K de classe II que forma complexo com Beclina-1 e resulta na produção de PIP3, esta última recruta proteínas WIPI/Atg18, o que permite o recrutamento de LC3 (do inglês: *light chain of the microtubule-associated protein 1*) para a continuidade da formação do autofagossomo. Na maturação, ocorre o recrutamento de LC3I, livre no citoplasma, para a membrana do autofagossomo (LC3 II). Antes de fundir com o lisossomo, proteínas adaptadoras direcionam as proteínas a serem degradadas para dentro do autofagossomo em formação, onde estas proteínas são marcadas para degradação. A etapa de fusão é mediada pela proteína motora dineína, que transporta o autofagossomo através dos microtubulos para se fundirem com endossomos ou lisossomos.

Existem também outros dois tipos de autofagia, autofagia mediada por chaperona e a microautofagia. A chaperona Hsc70 (do inglês: *heat shock cognate 70*) se liga especificamente às proteínas a serem degradadas e as transporta diretamente para dentro dos lisossomos (LI W *et al.*, 2011). Já na microautofagia, os componentes celulares a serem degradados são diretamente englobados pelos lisossomos para degradação e reciclagem destes componentes (LI WW *et al.*, 2012).

Os três tipos de autofagia estão presentes nas células em homeostasia para garantir a sobrevivência celular. No entanto, privações de oxigênio e/ou nutrientes, estresse de RE, alterações na degradação proteassomal ou danos causados por drogas ou radiação, podem levar a um aumento da resposta autofágica. Todos estes cenários de

estresse estão presentes em tumores e neste contexto, o processo de autofagia, através da reciclagem de componentes celulares, garante a demanda metabólica das células tumorais mesmo em áreas desfavoráveis ao seu crescimento, como áreas de hipóxia e privação de nutrientes. No entanto, além de favorecer a sobrevivência celular, o processo de autofagia pode induzir morte celular (DEBNATH J, BAEHRECKE EH E KROEMER G, 2005). O mecanismo pelo qual a autofagia induz morte celular ainda é discutido e algumas hipóteses sugerem que deva ocorrer pela digestão excessiva de proteínas citoplasmáticas, ativação de vias apoptóticas ou digestão seletiva de fatores citoprotetores (YU L, STRANDBERG L E LENARDO MJ. 2008). Portanto, autofagia, assim como a via de UPR, é um processo dual podendo garantir tanto a sobrevivência celular quanto induzir morte celular, dependendo da duração e intensidade de estresse ao qual a célula é submetida.

Como citado anteriormente, na vigência do estresse de RE ocorre a degradação de proteínas mal enoveladas através da degradação proteassomal (ERAD) e/ou por autofagia. A indução de autofagia pode ser mediada por PERK e/ou IRE1. A ativação de PERK-eIF2 $\alpha$  aumenta a expressão de Atg12, o qual converte LC3-I em LC3-II, uma das etapas da formação do autofagossomo (KOUROKU Y *et al.*, 2007). Já a ativação de IRE1 resulta no recrutamento de TRAF2 e ASK1 que ativam JNK. Este último ao fosforilar a proteína anti-apoptótica Bcl-2, libera Beclina-1 de sua interação inibitória com Bcl-2 na membrana do RE e uma vez livre, Beclina-1 induz a primeira etapa da autofagia (DING WX *et al.*, 2007). Porém, a autofagia em resposta ao estresse de RE também pode ser induzida de maneira independente da via de UPR, como através da liberação de cálcio durante o estresse de RE, pois o cálcio pode induzir aumento da via PI3K de classe II, a qual é importante nas primeiras etapas do processo autofágico (LIU ZM *et al.*, 2007).

Assim como é observado o acúmulo de marcadores de estresse de RE, como GRP78 (HERSEY P & ZHANG XD, 2008) ao longo da progressão de melanomas, o processo autofágico também parece estar envolvido neste contexto. O trabalho de LAZOVA R, KLUMP V E PAWELEK J. (2010) mostra que melanomas em estágio avançado apresentam expressão aumentada da proteína autofágica LC3 comparado a melanomas *in situ* e melanócitos não transformados. Este trabalho sugere que autofagia pode conferir vantagem adaptativa às células tumorais em estágios avançados da tumorigênese.

Portanto, tanto autofagia quanto a via de UPR podem modular vias de adaptação e sobrevivência celular frente a condições de estresse oxidativo e/ou metabólico. No entanto, as células normais apresentam estas mesmas vias adaptativas, mas quando submetidas a estas condições estressantes deflagram o processo de morte. Esta diferença de resposta frente a condições de estresse, como a ativação de UPR e autofagia em células tumorais, favoreceu a busca de terapias baseadas em agentes moduladores de ambas as respostas celulares. Estas terapias baseiam-se na inibição da atividade basal de vias de resposta ao estresse na tentativa de evitar a adaptação destas células a condições desfavoráveis, ou na indução de estresse para forçar o desbalanço da resposta de estresse para indução de morte celular (HEALY SJ *et al.*, 2009)(LI X, ZHANG K E LI Z. 2011).

Entre as drogas que modulam estresse em estudo podemos destacar: indutores de estresse de RE (inibidor de proteossoma, inibidor da chaperona Hsp90, inibidores da Ca<sup>2+</sup> ATPase sarcoplasmática), inibidores de estresse de RE (inibidor de GRP78), indutores de autofagia (inibidores de mTOR, inibidor de proteossoma, inibidores de tirosina quinase (p.ex. Imatinib), anticorpos monoclonais (p.ex Rituximab), hormônio terapia (p.ex. Tamoxifeno)) e inibidores de autofagia (p. ex cloroquina) (revisado em

SUH DH *et al.*, 2012). Muitos destes agentes antitumorais em estudo apresentam indução de vias de resposta ao estresse secundariamente ao seu mecanismo terapêutico principal. Embora algumas destas drogas ainda estejam em testes clínicos, a indução ou inibição de componentes das vias de resposta a estresse não levam necessariamente a um aumento de resposta destas vias. Além disso, como existe uma estreita correlação entre a via de UPR e autofagia, a resposta terapêutica destas abordagens pode ser comprometida, pois, ao intervir na via de estresse de RE pode-se ativar a via autofágica protetora ao invés de indução de morte celular.

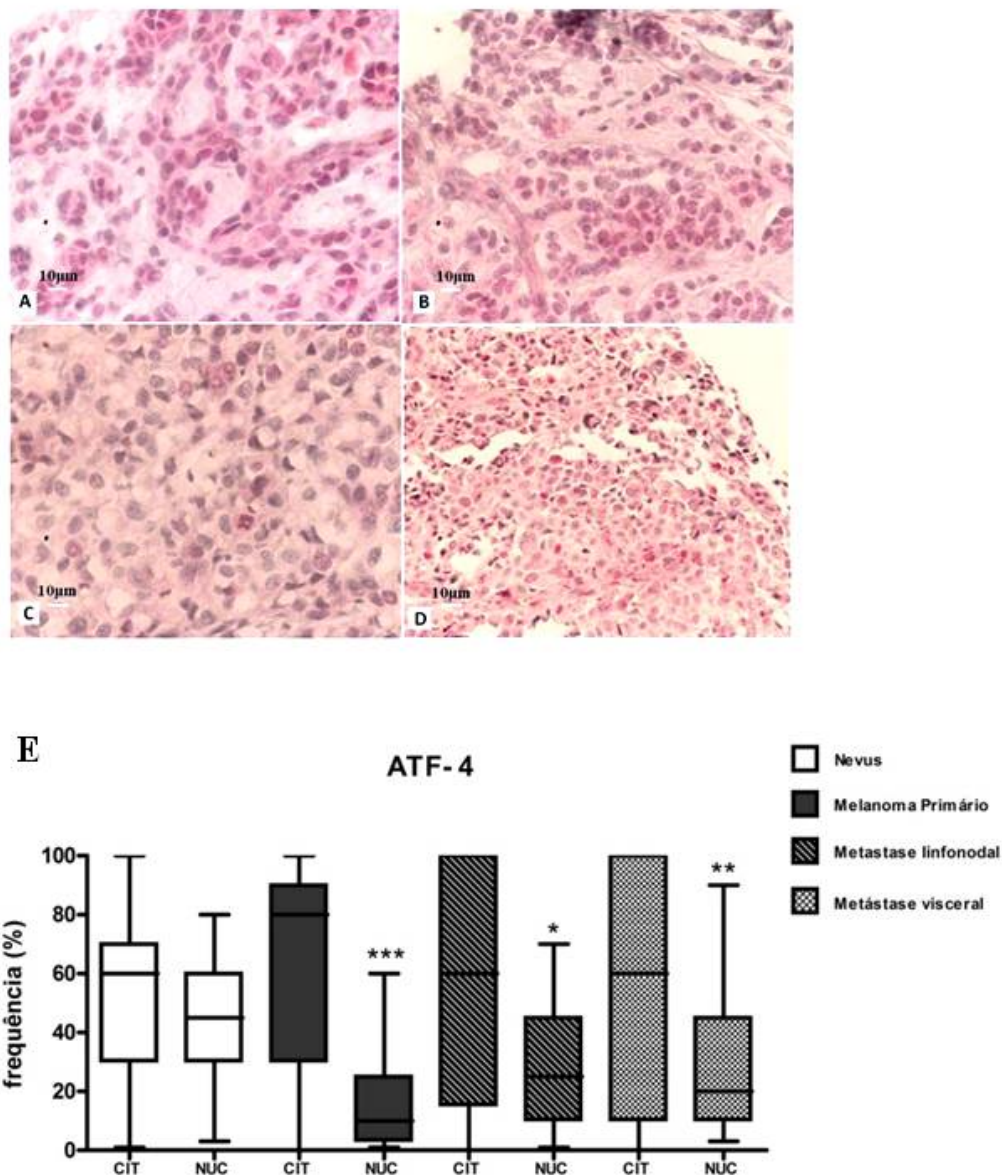
### ***1.6 Hipótese e justificativa***

O mecanismo de estresse do RE pode ter relação direta com a progressão de melanomas através da adaptação e seleção de células tumorais resistentes a este tipo de estresse. Melanomas apresentam acúmulo da chaperona GRP78 em sua progressão tumoral, demonstrando a presença de estresse de RE neste tumor (HERSEY P & ZHANG XD, 2008). Estudo desenvolvido pelo nosso grupo mostra que células de melanoma metastático (LB373) apresentam acúmulo tanto da chaperona GRP78 quanto da chaperona PDI (do inglês: *Protein Disulfide Isomerase*) (R. CHAMMAS, comunicação pessoal). Assim, a indução de estresse de RE parece ser um mecanismo de pressão adaptativa, a qual a célula de melanoma teria que superar para sobreviver, evadindo sinais de morte celular e adquirindo resistência às terapias (RUTKOWSKI DT & KAUFMAN RJ, 2007).

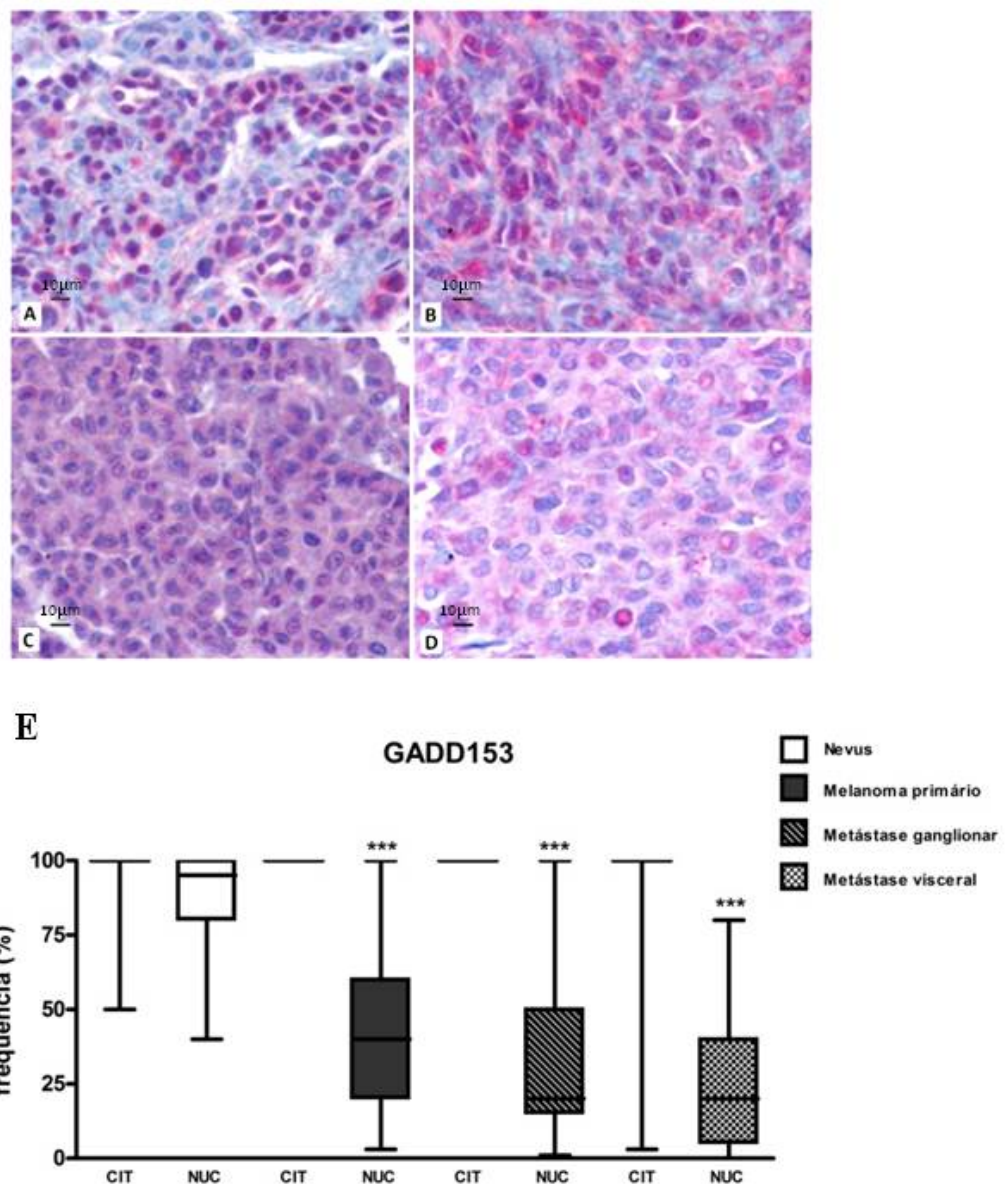
Em células não transformadas a indução de estresse de RE persistente ou severo leva à morte celular. No entanto, como citado acima, apesar da indução de estresse de RE persistente ao longo de sua progressão, as células de melanoma são capazes de sobreviver. Esta vantagem de sobrevivência celular pode estar associada com vias truncadas de indução de morte em resposta à UPR. De fato, avaliação dos transcritos presentes nas células de melanoma murino mostrou uma significativa redução dos níveis do fator transcricional ATF-4, fator de transcrição de GADD153, molécula envolvida no processo de morte celular em resposta à UPR (DE SOUZA *et al.*, 2006).

Em colaboração com um grupo do Centro de Pesquisa “Moffitt Cancer Research Center” em Tampa - Flórida foi realizado um estudo da expressão de ATF-4 e GADD153 em um *tissue microarray* que contém amostras de pacientes com *nevus*, melanoma primário, metástase ganglionar e metástase visceral (R CHAMMAS, comunicação pessoal). A FIGURA 03 mostra que em *nevus* há expressão de ATF-4 tanto no citoplasma quanto no núcleo. No entanto, em melanomas primários, metástases ganglionares e viscerais foi observada uma redução de marcação nuclear. Da mesma forma, GADD153 se mostrou igualmente expresso no núcleo e no citoplasma em *nevus*, no entanto, há uma clara exclusão nuclear em melanomas (FIGURA 04). Este estudo mostra que além da diminuição da expressão de ATF-4 e GADD153, a localização destas proteínas parece sugerir uma via de escape à indução de morte celular em resposta ao estresse de RE. Melanomas parecem desenvolver mecanismos para impedir que a via pró-apoptótica ATF4-GADD153 seja ativada, restando no citoplasma estes fatores de transcrição. Assim, em *nevus*, ATF-4 e GADD153 se encontram no núcleo e desempenham suas funções de fatores de transcrição que resulta em morte celular das células que apresentam persistência de indução de estresse de RE, controlando o crescimento destas células. No entanto, melanomas impedem que estes fatores de

transcrição sejam redirecionados para o núcleo e, portanto, se tornam resistentes ao estresse de RE persistente, sendo capazes de sobreviver e proliferar.



**FIGURA 03 – Exclusão nuclear de ATF-4 ao longo da progressão de melanomas.** *Tissue microarray* de tecido humano mostrando a marcação nuclear de ATF-4 por imunohistoquímica. (A) *Nevus* (média=44,7%) x 400; (B) Melanoma Primário (média =10,2%) x 400; (C) Metástase ganglionar (média =24,7%) x 400; (D) Metástase visceral (média =19,7%) x 400, (E) expressão de ATF-4 representada por gráficos do tipo *box plots*, onde as linhas horizontais mostram a média, a parte superior e inferior das caixas o percentile 25<sup>th</sup> e 75<sup>th</sup> respectivamente, e a barra vertical a dispersão dos dados. \* $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  e \*\*\* $p < 0,0001$ .



**FIGURA 04 – Exclusão nuclear de GADD153 ao longo da progressão de melanomas.** *Tissue microarray* de tecidos humano mostrando a marcação nuclear de GADD153 por imunohistoquímica. (A) *Nevus* (média =87,5%) x400; (B) Melanoma primário (média =45,0%) x400; (C) Metástase ganglionar (média =32,2%) x400; (D) Metástase visceral (média =25,1%) x400; (E) expressão de GADD153 representada por gráficos do tipo *box plots*, onde as linhas horizontais mostram a média, a parte superior e inferior das caixas o percentile 25<sup>th</sup> e 75<sup>th</sup> respectivamente, e a barra vertical a dispersão dos dados. \*p<0,01; p<0,001 e \*\*\*p<0,0001.



A repressão da ativação de GADD153 poderia explicar a ausência de resposta apoptótica ao estresse do RE em melanomas. Assim, induzir a expressão desta proteína nas células tumorais poderia ser uma estratégia para aumentar a eficiência terapêutica de quimioterápicos em melanomas metastáticos. Como discutido anteriormente, as células tumorais apresentam capacidade de adaptação e escape à sinalização de morte celular em resposta ao estresse de RE, pois modulam vias celulares a favor de sua sobrevivência. Portanto, a adaptação e dependência destas vias podem ser alvos terapêuticos (WEINSTEIN IB & JOE A, 2008).

A hipótese do trabalho foi ultrapassar os níveis sustentados de estresse de RE, que favorecem o processo de adaptação, para levar à ruptura da dependência destas vias de adaptação e resultar em morte celular. Esperava-se que ao induzir ainda mais estresse de RE, através do agente indutor de estresse de RE tunicamicina, interferiríamos no sistema de adaptação das células de melanoma e seria desencadeada a indução de GADD153 e seu redirecionamento para o núcleo. Desta forma, esperávamos tornar as células tumorais mais sensíveis a um segundo agravo genotóxico, como o quimioterápico cisplatina, aumentando a eficácia terapêutica desta droga.

Iniciamos o estudo de sensibilização com o quimioterápico cisplatina, pois este é utilizado como segunda linha de tratamento de pacientes com melanoma no nosso país. No entanto, cisplatina é um tratamento com baixa eficácia, além de apresentar acentuada toxicidade aos rins (nefrotoxicidade) e ao trato gastrointestinal do paciente (KELLAND L, 2007). Estudar uma estratégia de sensibilização de células de melanoma à morte induzida por cisplatina é uma tentativa não somente de aumentar o efeito terapêutico desta droga, como também de possibilitar a utilização de menores concentrações desta, visando diminuir os efeitos tóxicos indesejáveis. Além disso, como

cisplatina apresenta baixo custo, torná-la eficaz para o tratamento de pacientes com melanoma também representaria um benefício socioeconômico.

Cisplatina (*cis-Diamineplatinum(II) dichloride*) se torna ativa intracelularmente através da retirada de uma ou duas moléculas de cloro e incorporação de uma molécula de água. Uma vez ativa, cisplatina se liga covalentemente ao DNA formando adutos que causam distorções no DNA e são reconhecidos pelos mecanismos de reparo celular, principalmente por NER (do inglês: *Nucleotide excision repair*). Se não for possível reparar o dano no DNA, o processo de morte celular é induzido. A maior limitação da utilização de cisplatina é o desenvolvimento de resistência a este tratamento apresentado pelos tumores. Dois principais mecanismos têm sido associados com a resistência à cisplatina, a dificuldade desta droga alcançar o DNA e a ausência de indução de morte celular em resposta à formação dos adutos no DNA. As células resistentes ao tratamento com cisplatina apresentam vias alteradas como as envolvidas na captação de drogas, no reconhecimento e reparo de danos no DNA e na apoptose. Apesar de terem sido estudadas diferentes estratégias para modular a resistência à cisplatina, ainda não foi estabelecida uma de fato promissora (KELLAND L, 2007.). Portanto, o estudo de terapias combinadas que favoreçam a resposta terapêutica de cisplatina são de extrema importância.

***OBJETIVO***

---

## 2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a sensibilização de células de melanoma humano a quimioterápicos, através da indução de estresse de retículo endoplasmático *in vitro* e *in vivo*, além de verificar os mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização através da indução de estresse de RE.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o efeito de sensibilização através da indução de estresse de RE por tunicamicina em linhagens de melanoma humano (SbCl<sub>2</sub>, Mel85, SK-MEL-28, SK-MEL29 e SK-MEL-147), à morte induzida por cisplatina através da quantificação de morte celular (incorporação de iodeto de propídio) e avaliação da capacidade de sobrevivência celular em longo prazo (ensaio de clonogenicidade).
- 2) Verificar se o pré-tratamento com tunicamicina induz a via de UPR avaliando a expressão proteica de GRP78 e GADD153 e se este tratamento redireciona GADD153 para o núcleo.
- 3) Verificar se o processo de autofagia está envolvido na resposta de sensibilização por indução de estresse de RE através da quantificação de vacúolos ácidos (marcação com laranja de acridina) e da expressão de proteínas autofágicas (Beclina-1 e LC3-II). Além disso, utilizar inibidores de autofagia, 3-metiladenina e cloroquina, para avaliar o envolvimento de autofagia neste modelo experimental.

- 4) Quantificar espécies reativas de oxigênio através de indicadores gerais de ROS, CM-H<sub>2</sub>DCFDA e DHR123.
- 5) Avaliar o efeito de sensibilização através da indução de estresse de RE por tunicamicina nas linhagens de melanoma humano em estudo à morte induzida por outro agente genotóxico, temozolomida e por PLX4720.
- 6) Avaliar o esquema de sensibilização com tunicamicina e/ou cisplatina *in vivo*, utilizando animais BALB/c nude.
- 7) Estudar candidatos a agentes estressores de RE que apresentem pouca toxicidade celular e que possam ser utilizados na clínica.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 CULTIVO DE CÉLULAS**

As linhagens celulares de melanoma humano utilizadas neste estudo foram, uma linhagem de melanoma de crescimento radial (SbCl2) e quatro linhagens de melanoma metastático: Mel85, SK-MEL-28, SK-MEL29 e SK-MEL-147. As três primeiras linhagens foram cultivadas em meio RPMI 1640 (LifeTechnologies®) e as duas últimas em meio DMEM (LifeTechnologies®), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LifeTechnologies®). As linhagens foram mantidas em estufa úmida a 37 °C e em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O descolamento das células para posterior contagem e subcultivo foi realizado após duas lavagens com PBS-EDTA, seguida de curta exposição à tripsina (Gibco®).

#### **3.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTEN BLOT**

##### **3.2.1 Extrato Celular**

Após tripsinização a suspensão de células foi centrifugada por 3 minutos a 2000 rpm e o *pellet* foi ressuspendido em tampão de lise celular total (NP40 *Cell Lysis Buffer* -Novex®) contendo inibidores de protease (1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2µg/ml aprotinina e 1 mM PMSF). A solução ressuspendida no tampão foi incubada a 4°C por 15 minutos. Após este período, foi centrifugada a 13000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, obtendo-se o lisado total proteico, o qual foi armazenado a -20°C (modificado de WAJIH *et al*, 2004). A dosagem de proteínas obtidas foi realizada de acordo com protocolo modificado do Método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). A dosagem foi realizada pelo kit Ensaio de Proteína BCA, da BioAgency®, conforme

descreve o fabricante, utilizando BSA como padrão protéico. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas (Bio-Rad®), utilizando-se filtro de 592nm.

### **3.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Blotting**

Foram realizadas análises de proteínas separadas de acordo com sua massa molecular aparente (SDS-PAGE). As amostras de extratos protéicos foram separadas em gel de poliacrilamida (10%). Em seguida, os extratos protéicos separados foram transferidos para membrana PVDF (do inglês: *Hydrophobic polyvinylidene difluoride*, Amershan/GE) para a realização do *blotting*, que foi realizado em tampão de transferência contendo 25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% metanol, em água por uma hora a 100 V e a 4°C (BURNETTE, 1981).

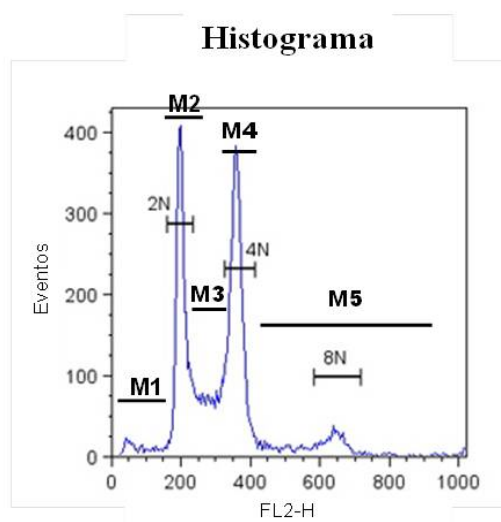
A membrana teve seus sítios inespecíficos bloqueados com leite seco desnatado 5% em TBS–Tween 0,2%, por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a incubação com os anticorpos primários policlonais: anti-GRP78 (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), anti-GADD153 (Santa Cruz Biotechnology, 1:100), anti- $\beta$ -actina (Sigma, 1:5000) e anti-GAPDH (Sigma, 1:5000) em agitação a 4°C *overnight*. Em seguida, após três lavagens de 10 minutos cada com 1% de BSA em TBS-Tween 0,1%, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário, anti-cabra (Sigma, 1:5000) ou anti-coelho (Sigma, 1:5000) conjugado à peroxidase durante 1 hora à temperatura ambiente. Após três lavagens de 10 minutos cada com 1% de BSA em TBS-Tween 0,1%, foi realizada a revelação da membrana utilizando-se o ECL *Western Blotting system* da GE. Como controle da reação, foi utilizado um padrão conhecido de massa molecular.



### 3.3 ENSAIO DE MORTE CELULAR

O protocolo seguido foi adaptado do *Short Protocols in Molecular Biology*, 3th edition, 1995. As células tripsinizadas foram fixadas em etanol 70% e mantidas à -20°C até o momento da análise por citometria de fluxo (citômetro FACScalibur Becton & Dickson®). A avaliação de ciclo e morte celular foi realizada através da marcação com iodeto de propídio (PI, do inglês: *propidium iodide*) na presença de 200µg/mL de RNase A e 1% de Triton-X100. O PI incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA. A análise da citometria de fluxo foi realizada usando-se o programa *Cell Quest Pro* (Becton & Dickson®).

A porcentagem das células nas diferentes fases do ciclo celular foi quantificada e os dados foram expressos em gráficos de histogramas. A porcentagem de células encontrada no primeiro segmento (M1) foi considerada representativa das células em morte celular, pois este segmento contém células com conteúdo de DNA abaixo de 2n (hipodiploides). O segundo segmento (M2) foi definido pelo primeiro pico de eventos, onde havia células com conteúdo de DNA compatível com a fase G0/G1 do ciclo celular. O terceiro segmento (M3) apresentava células que caracterizam a fase S e o quarto segmento (M4) a fase G2/M do ciclo celular. O quinto segmento (M5) representa agregados celulares (Esquema 01). Depois de quantificada a porcentagem das células nas diferentes fases do ciclo celular, os dados foram expressos em gráficos de barras com média e desvio padrão.



Fonte: Adaptado de [www.dundee.ac.uk/lifesciences/FACS/cell\\_cycle.htm](http://www.dundee.ac.uk/lifesciences/FACS/cell_cycle.htm).

**Esquema 01 - Histograma representativo dos dados obtidos com o ensaio de morte celular (PI) e estudo das fases do ciclo celular.**

### 3.4 MARCAÇÃO DE VACÚOLOS ACÍDICOS COM LARANJA DE ACRIDINA

As células de melanoma foram plaqueadas em placas de 12 poços ( $2,5 \times 10^5$  células/poço) e tratadas com tunicamicina ( $0,1 \mu\text{g/ml}$ ) e/ou cisplatina ( $1 \mu\text{M}$ ) de acordo com o esquema de sensibilização ilustrado no Esquema 01, além do diluente de tunicamicina, o DMSO a 1%. Após os tratamentos as células foram incubadas com laranja de acridina ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) em PBS por 30 minutos à  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Em seguida, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur).

### 3.5 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O acúmulo intracelular de ROS foi determinado através do reagente 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM- $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) ou DHR123. Após os tratamentos com tunicamicina ( $0,1 \mu\text{g/ml}$ ) e/ou cisplatina ( $1 \mu\text{M}$ ) de acordo com o esquema de sensibilização, as células de melanoma foram incubadas com CM-

H<sub>2</sub>DCFDA (15µM) ou DHR123 (15 µM) por 30 minutos à 37°C e em seguida por um período de recuperação de 30 minutos à 37 °C incubadas em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após as incubações as células foram tripsinizadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citômetro de fluxo (FACSCalibur).

### **3.6 ENSAIO CLONOGÊNICO**

As células de melanoma foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e após este período foram tratadas com cisplatina (1 µM) por mais 24 horas. Os tratamentos com apenas uma das drogas e o diluente DMSO também foram realizados. Cerca de 200 células de cada condição experimental foram plaqueadas em triplicata (placas de 6 poços) e após 10 dias as colônias foram fixadas com formaldeído (3,7%) e coradas com cristal de violeta. Em seguida, realizou-se a contagem das colônias formadas.

### **3.7 IMUNOFLUORESCÊNCIA**

As células de melanoma foram semeadas em lamínulas contidas em poços de placa de 24 poços, onde foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml) ou com o veículo DMSO, por 3 e 24 horas. Após os tratamentos, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS e posterior permeabilização com TRITON X-100 0,2% por 5 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado através da incubação com PBS/BSA 3% por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-GADD153 (Santa Cruz, 1:20) *overnight* em PBS/BSA 1%. Em seguida

foram feitas 3 lavagens com PBS/BSA 1% e incubação com anticorpo secundário (anti-rabbit conjugado à Alexa 488, 1:200) junto com marcador de núcleo celular, Hoestch 33258 (1:200), por 2h à temperatura ambiente. Após a incubação com o secundários foram realizadas 3 lavagens com PBS/BSA 1% e em seguida a análise de fluorescência em microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss).

### **3.8 EXPERIMENTO IN VIVO**

As células SK-MEL-147 foram inoculadas ( $1 \times 10^6$  células) no subcutâneo de animais BALB/c nude fêmeas (6 a 8 semanas). Após o estabelecimento de um tumor de palpável não mensurável (PMN) foi iniciado o tratamento *i.v.* (intravenoso) dos animais com tunicamicina (0,5 mg/kg) ou cisplatina (1 ou 2mg/kg). Como iniciamos o tratamentos dos animais com tumores PNM, o primeiro tratamento com cisplatina foi realizado com a concentração de (1mg/kg) e os subsequentes com 2mg/kg. Um grupo tratado com tunicamicina recebeu no dia seguinte o tratamento com cisplatina, representando o esquema de prévio tratamento com tunicamicina e posterior tratamento com cisplatina realizado anteriormente *in vitro*. O tratamento com tunicamicina foi realizado a cada 7 dias e o tratamento com cisplatina a cada 3 dias. A medida do volume foi realizada com paquímetro diariamente e o cálculo do volume tumoral foi obtido através da fórmula:  $0,5236 \times D_{\text{maior}} \times (D_{\text{menor}})^2$ .

### **3.9 DETECÇÃO DE GRP78 DE SUPERFÍCIE CELULAR**

As células de melanoma, SK-MEL-29 e SK-MEL-147 ( $1,5 \times 10^5$  células) foram lavadas 1x com PBS gelado e bloqueadas com solução PBS/BSA 3% por 30 min a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos primários anti- GRP78 (Santa Cruz ou AbCam, 1:20), ambos diluídos em PBS/BSA 3%, por 1 hora a 4°C. Após 3

lavagens com PBS gelado, as células foram incubadas com secundário anti-goat conjugado à Alexa 488 (1:200), diluído em PBS/BSA 3%, por 1 hora a 4°C. Em seguida realizou-se 3 lavagens com PBS gelado e foi avaliada intensidade de fluorescência em citômetro de fluxo (FACSCalibur). Os histogramas e as quantificações foram realizados através do programa *Cell Quest Pro* (Becton & Dickson®).

### **3.10 DETECÇÃO DE L-PHA DE SUPERFÍCIE CELULAR**

Foram incubadas  $1,5 \times 10^5$  células em PBS/BSA 1% contendo L-PHA conjugado à Alexa 488 (5µg/ml) por 30 minutos no gelo protegidas da luz. Após incubação, as células foram lavadas 2x PBS/BSA 1% e a intensidade de fluorescência foi avaliada em citômetro de fluxo (FACSCalibur). Os histogramas e as quantificações foram realizados através do programa *Cell Quest Pro* (Becton & Dickson®).

### **3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism versão 4.0 para o Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Os dados foram comparados e analisados com o auxílio de testes paramétricos (*One-way ANOVA/Bonferroni*). Foram consideradas como estatisticamente significantes as comparações cujo valor de p foi menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *4.1 Tunicamicina sensibiliza células de melanoma à morte induzida por cisplatina*

Melanomas em estágios avançados apresentam-se refratários a tratamentos quimioterápicos, portanto, o estudo de estratégias terapêuticas quimiossensibilizantes é fundamental para tentar aumentar a morte celular e diminuir a resistência destas células tumorais. O presente trabalho investigou se a indução de estresse de RE poderia ser uma estratégia de sensibilização de células de melanoma humano à morte induzida por cisplatina.

HERSEY P & ZHANG XD (2008) demonstraram que a chaperona GRP78 se acumula ao longo da progressão de melanomas, sugerindo que estes tumores apresentam vias de adaptação à indução de estresse de RE que permitem a sobrevivência celular mesmo em condições de estresse de RE persistente. Estas vias podem estar envolvidas na quimioresistência tumoral, pois a proteína indutora de morte celular em resposta a estresse de RE severo ou persistente, GADD153, tem sua expressão diminuída com a transformação maligna de *nevus* a melanoma (KORABIOWSKA M *et al.*, 1997, 1999a, 1999b e 2002). Além disso, a análise de um *tissue microarray* contendo amostras de *nevus*, melanomas primários, metástases viscerais e ganglionares demonstrou que GADD153 apresenta-se excluído do núcleo nos casos de melanoma humano. Este dado nos mostra que em *nevus*, GADD153 está presente no núcleo, onde pode exercer sua atividade como fator de transcrição e levar a célula à morte celular em situações de estresse severo ou persistente. Em contrapartida, a exclusão nuclear de GADD153 apresentada por melanomas pode representar uma das

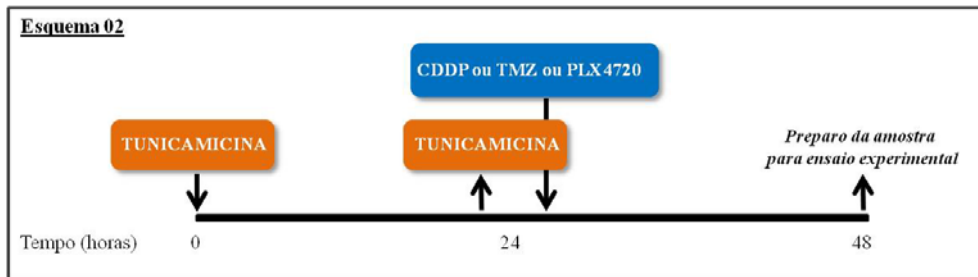
vias de evasão de morte celular induzida por estresse de RE nestes tumores. Assim, avaliamos neste trabalho a capacidade de indução de GADD153 em melanomas através do tratamento com o indutor de estresse de RE, tunicamicina, na tentativa de sensibilizar estas células à morte induzida por cisplatina.

Foi determinada previamente a concentração e tempo de tratamento com tunicamicina (0,1µg/ml e 24 horas) em que há indução de estresse de RE (acúmulo de GRP78 e GADD153), parada em ciclo na fase G0/G1 e pequena indução de morte celular (FIGURA S02, S03 e S04). A inibição do processo de *N*-glicosilação resulta na diminuição de ligações glicosídicas e o tratamento com tunicamicina (0,1µg/ml em 24 horas) levou à diminuição de *N*-oligossacarídeos β-1,6 ligados, comprovando a eficácia deste tratamento (FIGURA S05). Além disso, também foram determinadas a concentração e o tempo de tratamento com cisplatina (1µM e 24 horas) em que não há indução de morte celular (FIGURA S06). Desta maneira, a utilização de concentrações não tóxicas de tunicamicina e cisplatina permitiram avaliar a resposta celular com a combinação de ambos os tratamentos.

Para avaliar a hipótese em estudo foram utilizadas cinco linhagens de melanoma humano (SbCl2, Mel85, SK-MEL-28, SK-MEL29 e SK-MEL-147), a droga tunicamicina (Tun), indutora de estresse de RE (FIGURA S01) e os quimioterápicos cisplatina (CDDP), temozolomida (TMZ) e PLX4720. O esquema de tratamento foi delineado da seguinte maneira: as células de melanoma foram tratadas com 0,1 µg/ml de tunicamicina (Tuni) por 24 horas e depois de retirado o meio de tratamento com tunicamicina, foi adicionado meio de cultivo contendo CDDP, TMZ ou PLX4720 por mais 24 horas. O tratamento com apenas cada uma das concentrações de ambas as drogas, com o diluente da tunicamicina (0,1% de DMSO) e a ausência de tratamento,



foram realizados como controles do experimento (Esquema 2). A quantificação das células em processo de morte foi realizada por incorporação de iodeto de propídio e análise por citometria de fluxo.

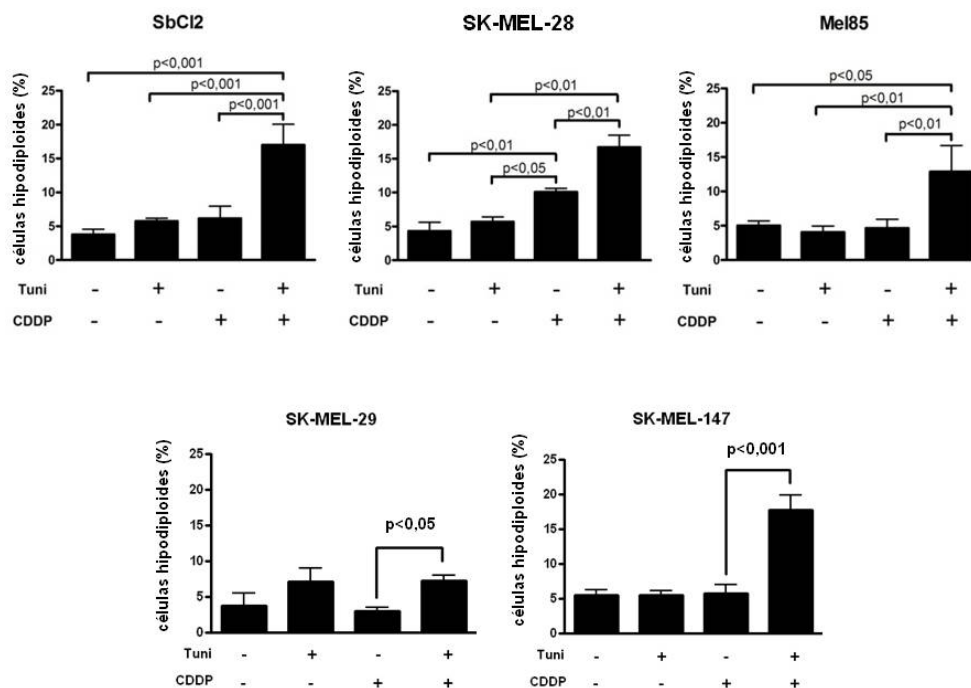


**Esquema 2: Delineamento experimental.**

O tratamento prévio com tunicamicina foi capaz de sensibilizar todas as linhagens de melanoma à morte induzida por cisplatina (FIGURA 05). Em todas as linhagens houve um aumento na porcentagem de células hipodiploides no tratamento combinado (Tuni>CDDP), quando comparado aos tratamentos com apenas tunicamicina ou cisplatina (FIGURA 05A). No entanto, podemos observar que entre todas as linhagens celulares, a célula SK-MEL-29 se mostrou menos sensível à prévia indução de estresse de RE, pois o tratamento com Tuni>CDDP resultou em um aumento muito pequeno na porcentagem de células hipodiploides. A FIGURA 05B mostra que as células SK-MEL-29 não apresentaram alterações morfológicas em resposta ao tratamento com Tuni>CDDP, como observado nas células SbCl2 e SK-MEL-147. Nestas últimas linhagens podemos observar no tratamento Tuni>CDDP, um menor número de células e a presença de células arredondadas indicando possíveis células em processo de morte celular. Nas células SK-MEL-147, no tratamento com apenas tunicamicina já se pode observar uma redução no número de células e a presença de algumas células arredondadas.

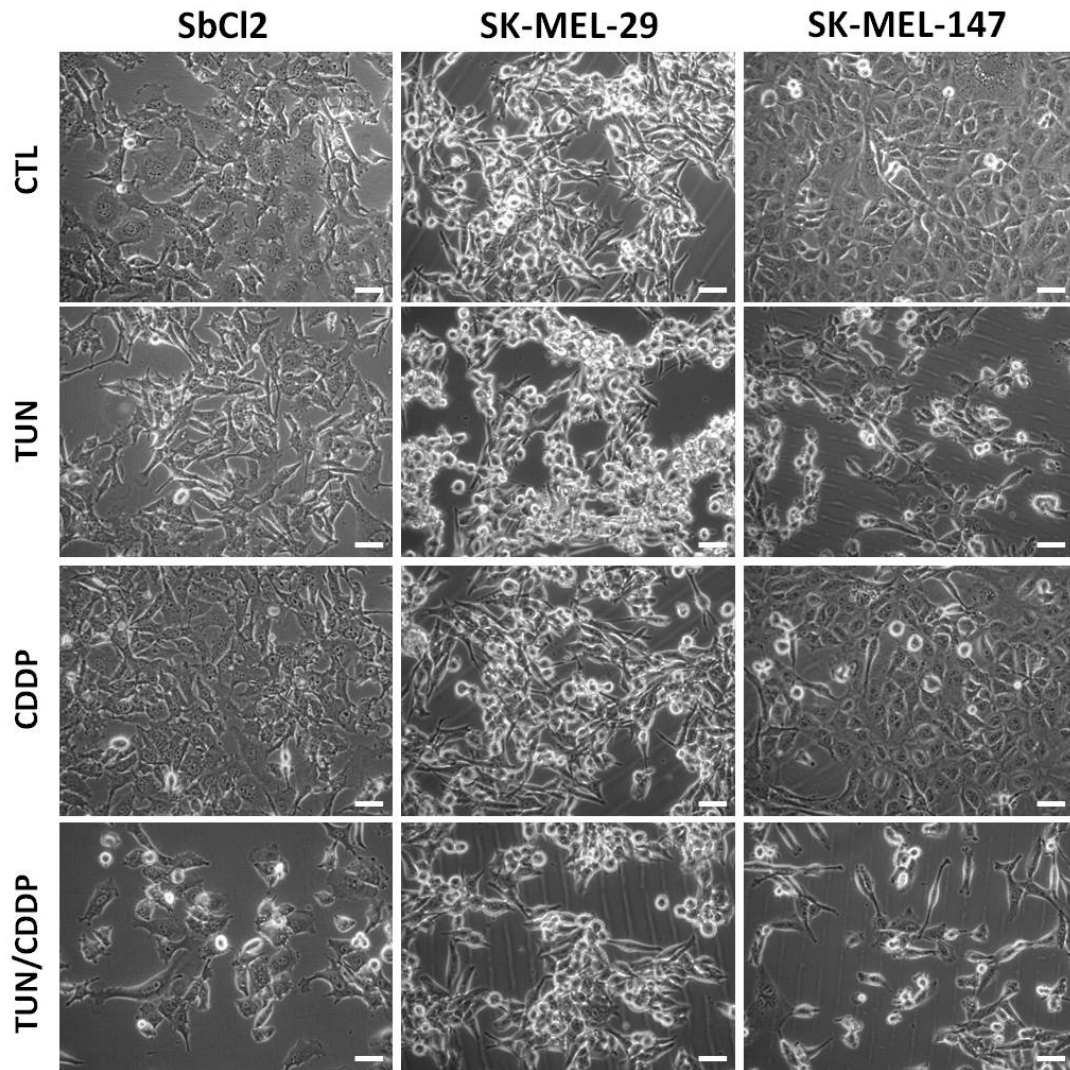
Além disso, verificamos o acúmulo de células na fase G0/G1 do ciclo celular em resposta ao tratamento com tunicamicina e na fase S e/ou G2/M em resposta à cisplatina em todas as linhagens (FIGURA S07). Na célula SK-MEL-29, o acúmulo de células na fase S e/ou G2/M após o tratamento com cisplatina foi menor comparado às demais linhagens. Isto sugere um menor efeito de cisplatina nesta linhagem, que pode estar relacionado com menor captação desta droga, com maior eficiência de reparo celular ou de extrusão de cisplatina. Assim, esta resposta à cisplatina diminuída pode explicar a menor indução de morte celular após Tuni>CDDP observada em SK-MEL-29.

A



**FIGURA 05 – Sensibilização das células de melanoma à morte induzida por cisplatina através do pré-tratamento com tunicamicina.** As células de melanoma (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (1 µM por 24 horas). (A) A quantificação das células hipodiploides foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (One-way ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (Tunicamicina); CDDP (Cisplatina). (continua na próxima página).

B

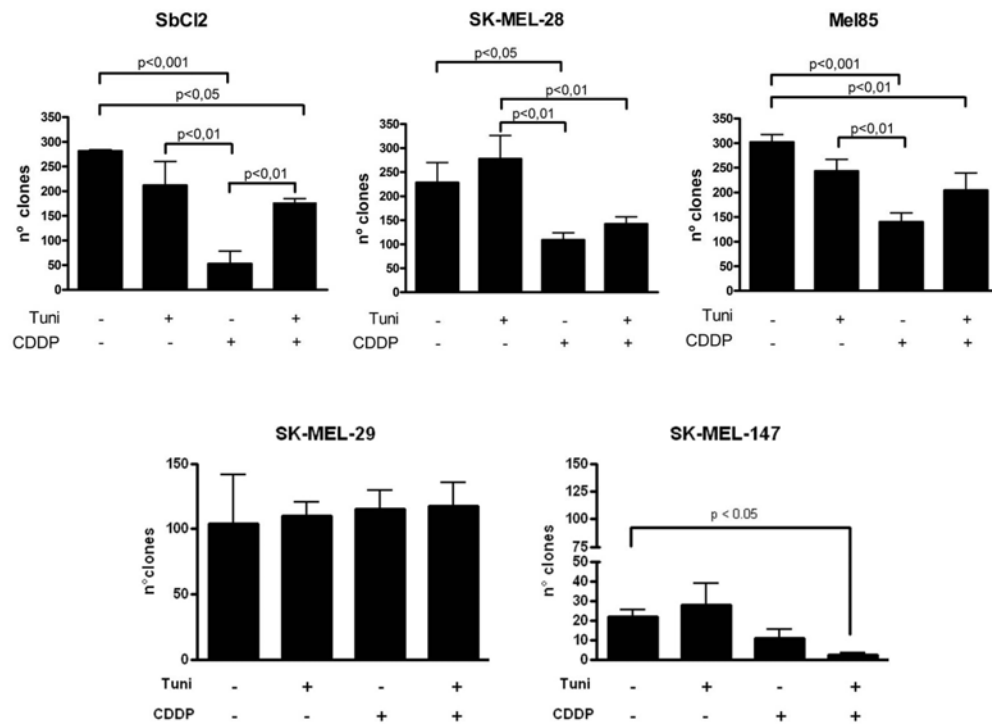


**FIGURA 05 – Sensibilização das células de melanoma à morte induzida por cisplatina através do pré-tratamento com tunicamicina.** As células de melanoma (SbCl<sub>2</sub>, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (1 µM por 24 horas). **(B)** Imagens obtidas em microscópio óptico com contraste de fase (aumento de 10x). Barras representam 100µM. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: TUN (Tunicamicina); CDDP (Cisplatina).

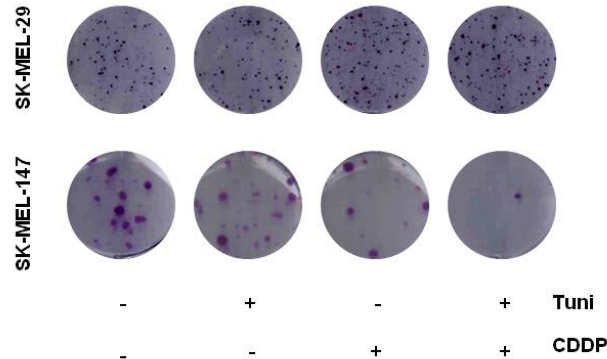
A diferença de sensibilidade à CDDP após indução de estresse de RE observada entre as linhagens se tornou ainda mais evidente com o ensaio de sobrevivência celular avaliada através do ensaio clonogênico (FIGURA 06). Nas células SbC12, SK-MEL-28 e Mel85, o pré-tratamento com tunicamicina não resultou em menor sobrevivência celular quando comparado ao tratamento apenas com cisplatina. Este resultado mostra que embora ocorra acúmulo de células hipodiploides após o tratamento com Tuni>CDDP, em longo prazo, o pré-tratamento com Tuni não resulta em aumento da resposta de cisplatina nestas linhagens. A linhagem SK-MEL-29 não teve alteração em sua capacidade de sobrevivência celular com nenhum dos tratamentos, corroborando com o resultado anterior de que esta linhagem parece ser mais resistente à sensibilização induzida por tunicamicina. Nas células SK-MEL-147, o pré-tratamento com tunicamicina (Tuni>CDDP) resultou em uma maior redução na formação de clones, demonstrando que esta linhagem parece ser mais responsiva ao esquema de sensibilização proposto.

É importante notar que as células SK-MEL-29 apresentam formação de clones de menor diâmetro e em maior quantidade que as células SK-MEL-147. Esta diferença talvez se deva ao comportamento e morfologia das células, pois as células SK-MEL-29 formam agregados com certa facilidade e crescem uma sobre as outras, já as células SK-MEL-147 são mais espalhadas e formam monocamada sem se sobreporem (FIGURA 06B).

A



B

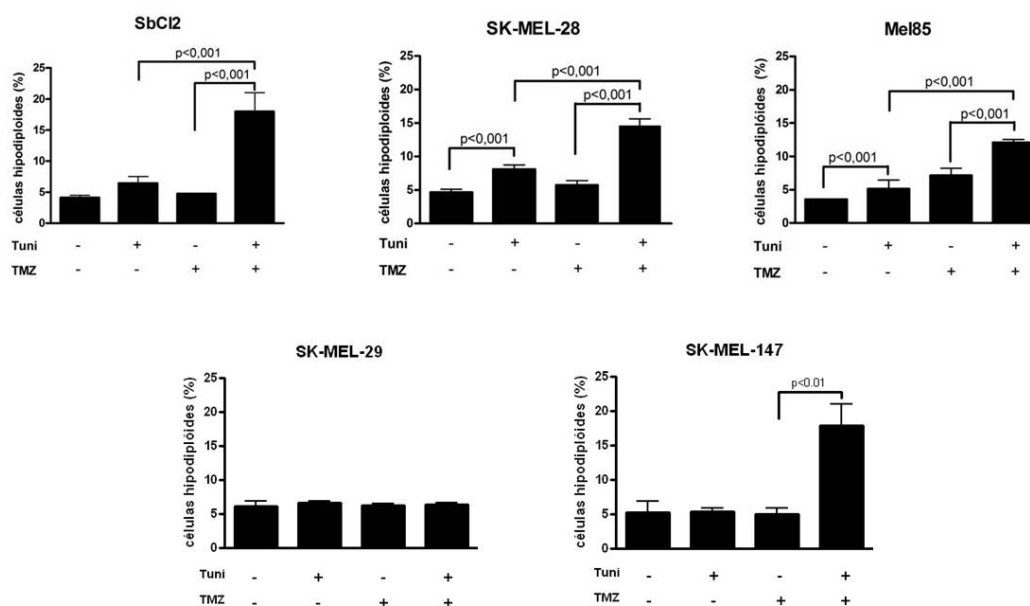


**FIGURA 06 – Sobrevivência celular após sensibilização com tunicamicina é menor na célula SK-MEL-147 quando comparada à célula SK-MEL-29.** As células de melanoma (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e após este período foram tratadas com cisplatina (1 µM) por mais 24 horas. Cerca de 200 células de cada tipo de tratamento foram plaqueadas em triplicata. Após 10 dias as colônias foram coradas com cristal de violeta e foi realizada a contagem das colônias formadas. **(A)** Gráfico de barras com a média e SD (do inglês: *standard deviation*) do número de clones contados em cada condição experimental. **(B)** Imagem representativa do resultado obtido com as linhagens celulares SK-MEL-29 e SK-MEL-147. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way ANOVA/Bonferroni*). Legenda: Tuni (tunicamicina); CDDP (Cisplatina).

Com o objetivo de avaliar se o esquema terapêutico proposto seria eficiente para sensibilizar as células de melanoma a outras drogas terapêuticas, utilizamos este mesmo esquema de sensibilização prévia com tunicamicina e em seguida tratamos as células com temozolomida (TMZ) ou PLX4720 (precursor de vemurafenib (PLX4032)).

Temozolomida é um agente alquilante equivalente à forma ativa do quimioterápico dacarbazina após ser metabolizada. Como dacarbazina necessita de metabolização hepática para se tornar ativa, temozolomida é utilizada *in vitro* para a prova de conceito de estudos em melanoma, pois dacarbazina é a primeira linha com agentes citotóxicos de tratamento de pacientes com esse tumor. Além disso, apesar de ter sido inicialmente indicada para o tratamento de glioblastoma multiforme, estudos mostram que temozolomida pode ser utilizada para o tratamento de pacientes com melanoma e esta droga apresenta eficácia comparada à apresentada por dacarbazina (MIDDLETON MR *et al.*, 2000, KAUFMANN R *et al.*, 2005).

Nossos dados mostram que o pré-tratamento com tunicamicina sensibiliza as células Sbc12, SK-MEL-28, Mel85 e SK-MEL-147 à morte induzida por TMZ (FIGURA 07)(FIGURA S08). Apenas na célula SK-MEL-29 não foi observado efeito de sensibilização. Estes dados mostram que independente do agente estressor secundário, a indução prévia de estresse de RE não sensibiliza as células SK-MEL-29 à morte induzida por diferentes quimioterápicos.



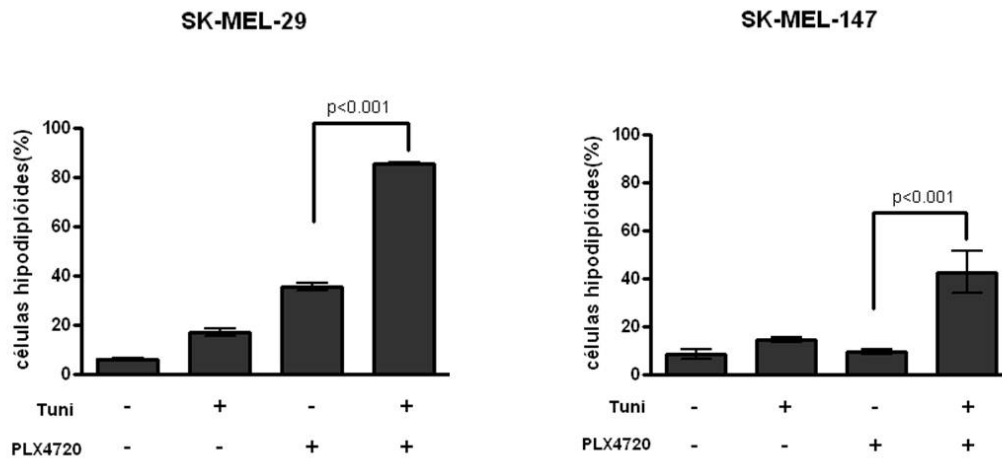
**FIGURA 07- Sensibilização das células de melanoma à morte induzida por temozolomida através do pré-tratamento com tunicamicina.** As células de melanoma (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com tunicamicina (0,1 $\mu$ g/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com temozolomida (50  $\mu$ M por 24 horas). A quantificação das células hipodiploides foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (tunicamicina), TMZ (temozolomida).

Além do tratamento com temozolomida, avaliamos a sensibilização das células de melanoma à droga PLX4720. Esta droga inibe preferencialmente a quinase B-Raf (V600E) e apresenta efeito citostático e citotóxico em células de melanoma B-Raf (V600E) positivas (TSAI J *et al.*, 2008). Realizamos o tratamento com tunicamicina e/ou PLX4720 das células SK-MEL-29, que é portadora da mutação B-Raf (V600E) e das células SK-MEL-147 que são selvagens (WT) para esta mutação. Na FIGURA08 podemos observar que de fato as células SK-MEL-29 (B-Raf<sup>V600E</sup>) são mais responsivas ao tratamento com PLX4720 quando comparadas as células SK-MEL-147 (WT). Embora tenha sido observada sensibilização em ambas as linhagens, o tratamento

apenas com PLX4720 já foi suficiente para levar à morte de aproximadamente 40% das células SK-MEL-29. Ao compararmos o efeito de sensibilização entre as linhagens, verificamos que o tratamento com Tuni>PLX4720 resultou em aproximadamente 80% e 40% de células em processo de morte celular nas células SK-MEL-29 e SK-MEL-14, respectivamente. Além disso, o efeito citostático de PLX4720 também foi mais proeminente em SK-MEL-29 (FIGURA S09).

Interessantemente, este esquema de indução de estresse RE levou a sensibilização ao PLX4720 inclusive das células SK-MEL-147 que são selvagens (WT) para a mutação B-Raf (V600E). Estes dados mostram que PLX4720 parece não ser seletivo apenas para as células que apresentam a mutação B-Raf (V600E). O trabalho de POULIKAKOS PI *et al.* (2010) mostra que PLX4720 inibe a via RAS-RAF-MEK-ERK nas células B-Raf (V600E), no entanto, nas células *wild type* ocorre a indução desta via com ativação de MEK e ERK. Além disso, dados da literatura mostram que vemurafenib induz estresse de RE através do aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico em células B-Raf (V600E) (BECK D *et al.*, 2013). Considerando estas informações, concluímos que nossos dados exploratórios mostram que a prévia indução de estresse de RE é capaz de sensibilizar tanto células B-Raf (V600E), quanto células *wild type*, à morte induzida por PLX4720. No entanto, mais experimentos são necessários para avaliar o padrão de inibição da via RAS-RAF-MEK-ERK e a indução de marcadores de estresse de RE em ambas as linhagens em resposta aos tratamentos Tuni e/ou PLX4720. No geral, estes dados mostram que a estratégia de sensibilização de células de melanomas através da indução de estresse de RE pode ser utilizada com as diferentes drogas utilizadas no tratamento de melanomas.





**FIGURA 08- Sensibilização das células de melanoma à morte induzida por PLX4720 através do pré-tratamento com tunicamicina.** As células SK-MEL-29 e SK-MEL-147 foram tratadas com tunicamicina (0,1 µg/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com PLX4720 (10 µM por 24 horas). A quantificação das células hipodiploides foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (tunicamicina).

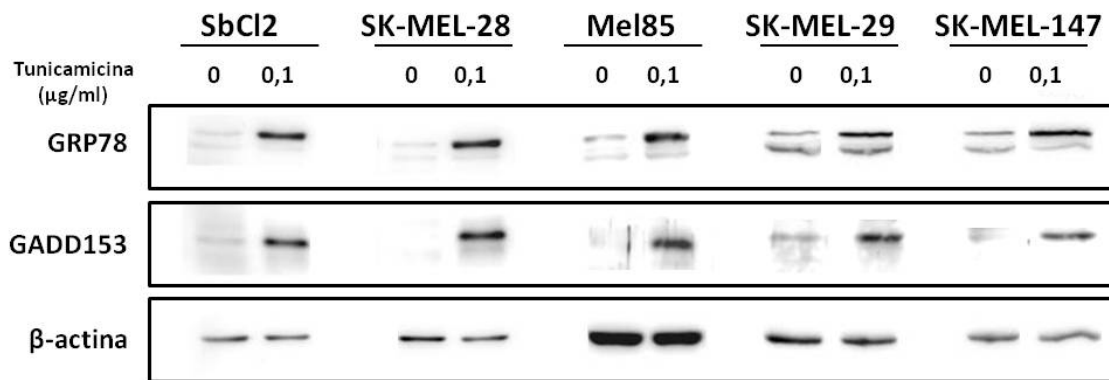
Como observamos a indução de parada de ciclo na fase G0/G1 em resposta ao tratamento com tunicamicina (FIGURA S07), avaliamos se a sensibilização ocorria em resposta à inibição da *N*-glicosilação ou a esta parada em ciclo celular. Para isto, utilizamos o inibidor da DNA polimerase, afidicolina, para induzir parada de ciclo em G0/G1 anteriormente ao tratamento com cisplatina, assim como ocorre em resposta a tunicamicina. O efeito de sensibilização parece não ser dependente da indução de parada de ciclo em G0/G1 resultante do pré-tratamento com tunicamicina, pois o tratamento prévio com afidicolina não resultou em aumento do número de células em morte celular induzida por cisplatina ou temozolamida (FIGURA S10). Este dado sugere que outros mecanismos estão envolvidos neste processo de sensibilização, reforçando a hipótese de que mecanismos ativados em resposta a indução de estresse de

RE, como a indução de GADD153, possam ser responsáveis pela sensibilização das células de melanoma em estudo.

#### ***4.2 Avaliação da indução da via de UPR em resposta ao tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina.***

Além de avaliar se o pré-tratamento com tunicamicina sensibilizaria células de melanoma à morte induzida por cisplatina, verificamos se este pré-tratamento de fato induzia estresse de RE. Para isso, averiguamos a indução de proteínas envolvidas na via de UPR, a chaperona GRP78 e GADD153 em resposta ao tratamento com tunicamicina (0,1µg/ml). A FIGURA 09 mostra que há um acúmulo de proteína GRP78 em resposta ao tratamento com tunicamicina em todas as linhagens de melanoma estudadas. A indução de GRP78 evidencia que há indução de estresse de RE com a ativação da via de UPR durante o pré-tratamento com tunicamicina. Além disso, a utilização da metade da concentração de tunicamicina (0,05µg/ml) foi suficiente para induzir acúmulo de GRP78 nas células SK-MEL-147 e o mesmo não foi observado nas células SK-MEL-29 (FIGURA S11). Este dado sugere que a indução da via de UPR parece ocorrer de forma mais precoce nas células SK-MEL-147. Isso explicaria em parte o perfil de resposta diferencial entre as linhagens celulares SK-MEL-29 e SK-MEL-147, em resposta à tunicamicina.

Como discutido anteriormente, um dos objetivos do estudo seria avaliar dentre as vias induzidas pela UPR, a indução de GADD153 e mais especificamente a sua localização celular. Em todas as linhagens foi possível observar que *downstream* à indução de GRP78 há o acúmulo de GADD153 em resposta ao tratamento com tunicamicina (FIGURA 09).

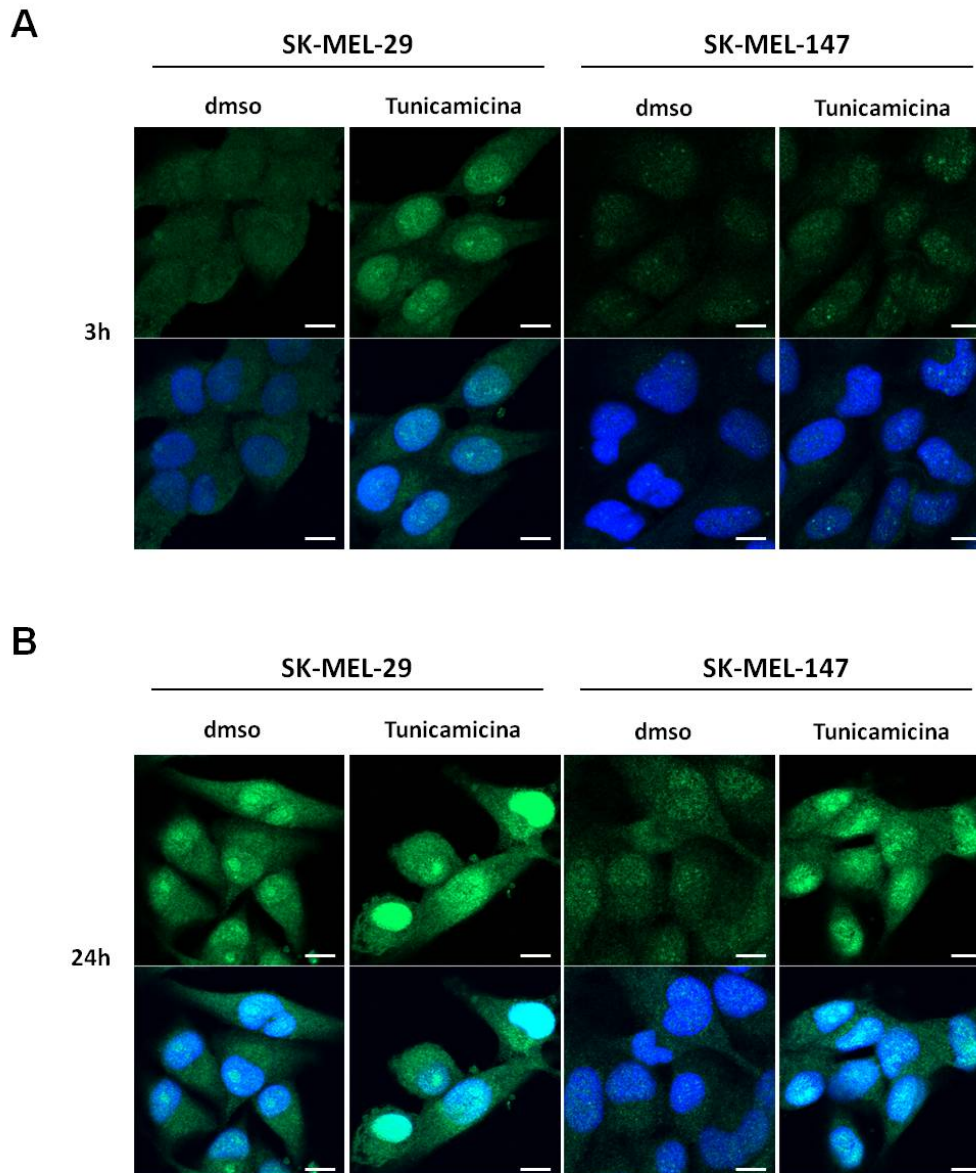


**FIGURA 09 – O tratamento com tunicamicina resulta no acúmulo de duas proteínas envolvidas na via de UPR: GRP78 e GADD153.** Análise por *western blot* de GRP78 e GADD153 nas linhagens de melanoma humano (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147). As células foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas, em seguida foi obtido extrato total protéico para análise por *western blot* das proteínas de interesse. Experimento representativo de três experimentos independentes.

Além de aumentar a expressão proteica de GADD153, para que ocorra a sensibilização das células tumorais a agravos secundários, a localização desta proteína no núcleo é fundamental. Uma vez no núcleo, o fator de transcrição GADD153 pode exercer sua função de indutor de morte celular em resposta à indução de estresse de RE. Assim, avaliamos se após o tratamento com tunicamicina o acúmulo de GADD153 estava acompanhado do seu redirecionamento para o núcleo.

Após 3 horas de tratamento com tunicamicina podemos observar um acúmulo de GADD153 nuclear na linhagem celular SK-MEL-29, enquanto em SK-MEL-147 este aumento é discreto. No entanto, após 24 horas de tratamento com tunicamicina, observamos em ambas as linhagens um claro acúmulo de GADD153 nuclear (FIGURA 10). Portanto, o pré-tratamento com tunicamicina parece ser eficiente em sensibilizar as

células de melanoma a um segundo agravo (cisplatina, temozolomida ou PLX4720), pois induz a expressão de GADD153 e seu direcionamento para o núcleo.



**FIGURA 10 – Presença de GADD153 no núcleo após o tratamento com tunicamicina.** As células de melanoma SK-MEL-29 e SK-MEL-147 foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml) por 3 e 24 horas. O controle com o diluente DMSO foi realizado nos mesmos intervalos de tempo. Após o tratamento foi realizado ensaio de imunofluorescência para visualização de GADD153 (verde) e sua localização sub-celular no núcleo (azul). Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. Barras representam 10µM.

Um dos mecanismos conhecidos de indução de morte celular por GADD153 é a inibição da proteína anti-apoptótica Bcl-2. MCCULLOUGH K D *et al.*, 2001, mostraram que a indução de morte celular em resposta ao estresse de RE mediada por GADD153 está relacionada tanto com a diminuição dos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2, quanto com a alteração do estado redox celular pela depleção de glutathiona.

Verificamos se o aumento de GADD153 nuclear resultava em diminuição de Bcl-2, através da técnica de *western blot*, após o tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina. Em todas as linhagens avaliadas foi observado uma diminuição de Bcl-2 após os tratamentos com Tuni>CDDP (FIGURA 11). É possível observar nas linhagens Sbc12, Mel85 e SK-MEL-28 acúmulo de Bcl-2 em resposta ao tratamento com cisplatina. Este resultado sugere que o aumento de Bcl-2 após o tratamento com cisplatina seja induzido como uma resposta de sobrevivência celular a este tratamento genotóxico (FIGURA 11). Nas células Sbc12, SK-MEL-29 e principalmente em SK-MEL-147, podemos observar diminuição de Bcl-2 em resposta ao tratamento com tunicamicina. A inibição de Bcl-2 talvez seja mais proeminente nesta última linhagem, pois entre todas as linhagens avaliadas, SK-MEL-147 apresenta os menores níveis de expressão basal desta proteína.

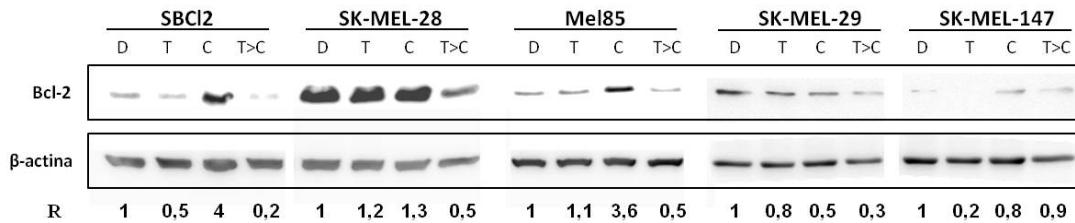
Nas células SK-Mel-28 e Mel85 não observamos diminuição de Bcl-2 em resposta ao tratamento apenas com tunicamicina. Na célula Mel85 o tratamento prévio com tunicamicina pode estar impedindo o aumento de Bcl-2 em resposta ao tratamento com cisplatina, o que favorece a morte celular após os dois tratamentos. Com relação à linhagem SK-MEL-28, esta apresenta níveis basais de Bcl-2 muito elevados comparado às demais linhagens. Como consequência desta elevada expressão basal, talvez não foi

observado aumento da expressão de Bcl-2 em resposta ao tratamento com cisplatina e tampouco diminuição desta proteína em resposta ao tratamento com tunicamicina. No entanto, após o tratamento Tuni>CDDP há diminuição desta proteína anti-apoptótica, o que favorece a morte celular após os dois estímulos.

Embora a inibição de Bcl-2 em resposta à tunicamicina tenha sido variável entre as linhagens, todas apresentaram diminuição desta proteína após o tratamento combinado Tuni>CDDP. Portanto, a diminuição de expressão de Bcl-2 pode ser resultado da ação de uma das vias de sinalização induzidas em resposta ao estresse de RE responsável pela sensibilização das células de melanoma à morte induzida por cisplatina. Estes dados nos indicam que a via GADD153 e Bcl-2 não está relacionada com o perfil diferencial de resposta apresentado pelas linhagens SK-MEL-29 e SK-MEL-147. Além disso, para evidenciar o papel de GADD153 na sensibilização destas linhagens é necessário realizar o silenciamento deste e comparar o perfil de morte celular na ausência/presença da expressão de GADD153.

Se observarmos a expressão proteica das proteínas *upstream* à Bcl2, GRP78 e GADD153, houve uma indução mais proeminente de ambas as proteínas em resposta ao tratamento com apenas tunicamicina, se comparada à indução no tratamento combinado de Tuni>CDDP ou com apenas cisplatina (FIGURA S12). Portanto, o tratamento com cisplatina nas condições em estudo não induz estresse de RE, diferente do observado no trabalho de MANDIC A *et al.*, (2003), o qual mostrou envolvimento de estresse de RE na resposta de morte induzida por cisplatina independente da sua via clássica de interação com o DNA. A ausência de indução de estresse de RE no nosso modelo provavelmente está relacionada com a baixa concentração de cisplatina utilizada (1µM). Esta concentração favorece o estudo da nossa hipótese de sensibilizar as células de

melanoma e ao mesmo tempo diminuir a concentração de cisplatina necessária para induzir morte celular, reduzindo a toxicidade sistêmica deste quimioterápico.



**FIGURA 11- Diminuição de Bcl-2 em resposta ao tratamento Tuni>CDDP.** Análise por *western blot* de Bcl-2 nas linhagens de melanoma humano (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147). As células foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e em seguida com 1µM de cisplatina por mais 24 horas. Após os tratamentos foi obtido extrato celular total para análise por *western blot* das proteínas de interesse. Experimento representativo de três experimentos independentes. Legenda: D (DMSO); T (tunicamicina); C (cisplatina); R (Bcl-2/β-actina).

A utilização de inibidores de *N*-glicosilação como agentes sensibilizadores já foi abordada em trabalhos envolvendo diferentes modelos tumorais e com diversos agentes estressores secundários. Trabalhos publicados mostraram que tunicamicina aumenta a sensibilidade tanto de células de carcinoma de cabeça e pescoço (NODA I *et al.*, 1999) quanto de células de carcinoma nasofaríngeo (SONG L *et al.*, 2012) à morte induzida por cisplatina. Tunicamicina também sensibiliza células de carcinoma não-pequenas células do pulmão à morte induzida por erlotinib, através da inibição da *N*-glicosilação de EGFR, o receptor alvo de erlotinib (LING YH *et al.*, 2009). No entanto, em todos os trabalhos tunicamicina e cisplatina foram administradas concomitantemente, diferente da abordagem deste estudo de sensibilização com a prévia indução de estresse de RE. O pré-tratamento com tunicamicina propicia o estudo da prova de conceito de que a

indução prévia de estresse de RE pode sensibilizar as células de melanoma a drogas terapêuticas.

Como a ativação de UPR apresenta função dual tanto de indução de sobrevivência quanto de morte celular, dados prévios mostram que a ativação da via de UPR, através do pré-condicionamento de células de carcinoma hepatocelular com tunicamicina e o agente redutor DTT, protege estas células à morte induzida por cisplatina, e a ativação de autofagia parece estar envolvida nesta resposta citoprotetora (CHEN R *et al.*, 2011).

O único trabalho envolvendo melanoma e a utilização de tunicamicina como agente sensibilizador foi realizado por Jiang CC *et al.*, (2007), onde a indução de estresse de RE foi utilizado como uma ferramenta para expor o receptor TRAIL (do inglês: *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*) na superfície celular para tornar estas células responsivas à TRAIL. Portanto, não há na literatura trabalhos que mostrem que a inibição de *N*-glicosilação e a indução de estresse de RE podem levar à sensibilização de melanomas a quimioterápicos como cisplatina.

#### ***4.3 SK-MEL-29 possui GRP78 de superfície enquanto células SK-MEL-147 apresentam maior expressão de oligossacarídeos $\beta$ -1,6-GlcNAc.***

Uma vez determinado que o prévio tratamento com tunicamicina foi capaz de sensibilizar células de melanoma à morte induzida por quimioterápicos, foi investigado a diferença observada de sensibilidade à indução de estresse de RE entre as linhagens SK-MEL-29 e SK-MEL-147. Como estas duas linhagens celulares apresentaram



resposta diferencial ao pré-tratamento com tunicamicina, sendo a SK-MEL-29 mais resistente e a SK-MEL-147 mais sensível, utilizamos estas duas linhagens comparativamente para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta ao esquema terapêutico proposto.

Como discutido anteriormente, GRP78 é iniciador da cascata de sinalização de UPR induzida em resposta ao estresse de RE (MA Y & HENDERSHOT LM, 2004). O Acúmulo de GRP78 no RE é aumentado na vigência de estresse de RE para reestabelecer a homeostasia desta organela, além disso, também há a realocação de GRP78 do RE para a membrana celular (ZHANG Y *et al.*, 2010). Sabe-se que alguns tipos tumorais expressam GRP78 de superfície e esta expressão é ausente em células não transformadas, tornando GRP78 um possível alvo dirigido de terapias antitumorais (MINTZ PJ *et al.*, 2003; ARAP MA *et al.*, 2004).

O receptor de superfície GRP78 apresenta diversos ligantes que podem conferir vantagens adaptativas às células tumorais (GONZALEZ-GRONOW M *et al.*, 2009), promovendo proliferação e sobrevivência celular (MISRA UK *et al.*, 2006), aumentando a capacidade de migração (MISRA UK *et al.*, 2005) e induzindo angiogênese (KATANASAKA Y *et al.*, 2010). Melanomas possuem aumento da expressão de GRP78 no tecido tumoral ao longo de sua progressão tumoral e, além disso, pacientes com este tumor apresentam anticorpos anti-GRP78 circulantes no soro (SELIM MA *et al.*, 2011). O perfil de glicosilação dos anticorpos anti-GRP78 circulantes é alterado ao longo da progressão desta doença (SELIM MA *et al.*, 2011) e estes anticorpos estimulam a proliferação de células de melanoma através da sinalização por Akt *in vitro* (DE RIDDER GG *et al.*, 2010). Assim, a expressão de GRP78 de superfície poderia estar envolvida na diferença de resposta à indução de estresse de RE

entre as linhagens, uma vez que a expressão desta proteína na superfície parece estar associada a diferentes vantagens adaptativas.

Avaliamos a expressão de GRP78 de superfície nas duas linhagens, SK-MEL-29 e SK-MEL-147, através da utilização de anticorpo anti-GRP78 e análise de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo. Na FIGURA 12A o histograma mostra um claro aumento de intensidade de fluorescência (verde) tanto no controle quanto com o diluente de tunicamicina (DMSO), somente nas células SK-MEL-29. Este resultado mostra que as células SK-MEL-29 expressam níveis basais de GRP78 na superfície celular.

Como mencionado acima, GRP78 é redirecionado para a superfície durante estresse de RE. Portanto, verificamos se após o tratamento com tunicamicina observaríamos um aumento de expressão desta proteína na superfície celular de ambas as linhagens. Curiosamente, as células SK-MEL-29 deixam de expressar GRP78 de superfície após o tratamento com tunicamicina e as células SK-MEL-147, mesmo após o estímulo de indução de estresse de RE não passam a expressar esta proteína de superfície. Podemos observar na FIGURA 12B a quantificação de intensidade de fluorescência em cada uma das condições de tratamento demonstrada em gráficos de barras.

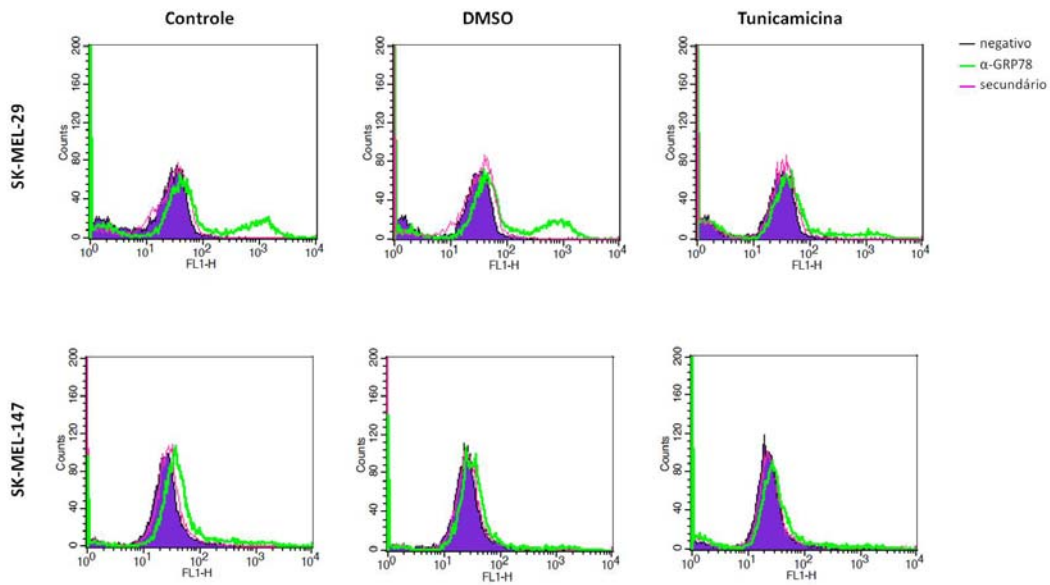
A diminuição da expressão de GRP78 de superfície nas células SK-MEL-29 pode ser explicada através dos mecanismos pelo qual GRP78 é redirecionado para a membrana plasmática. O primeiro é baseado no fato de que em resposta ao estresse de RE há um aumento dos níveis de GRP78 que podem ultrapassar a capacidade de retenção no RE desempenhada pela adição da sequência de aminoácidos KDEL, uma vez que a expressão de KDEL parece não ser aumentada durante o estresse de RE

(LLEWELLYN DH *et al.* 1997). Portanto, nas células SK-MEL-29 o acúmulo de proteínas mal enoveladas em resposta à tunicamicina pode estar resultando no acúmulo de GRP78 no lúmen na tentativa de auxiliar no enovelamento destas proteínas. Provavelmente, a concentração de tunicamicina utilizada neste estudo não tenha gerado um estresse de RE agudo suficiente para ultrapassar os níveis de expressão de KDEL, dificultando a saída de GRP78 do RE. A outra hipótese é que a região KDEL ou regiões próximas a ela podem ser “mascaradas” por glicosilação resultando no escape de GRP78 do RE para a superfície celular (ZHANG Y *et al.*, 2010). Como tunicamicina inibe o processo de *N*-glicosilação, esse tratamento pode ter resultado na exposição da região KDEL antes glicosilada, favorecendo a retenção de GRP78 no lúmen do RE.

Os dados de morte celular (FIGURA 05) mostram que as células SK-MEL-147 são mais sensíveis à morte em resposta ao tratamento combinado Tuni>CDDP, principalmente em longo prazo (FIGURA 06). O fato das células SK-MEL-29 apresentarem níveis basais de GRP78 na superfície celular e as células SK-MEL-147 não, pode contribuir para o perfil de sensibilidade diferenciado entre as linhagens, uma vez que a expressão de GRP78 de superfície está relacionada com células mais resistentes a terapias antitumorais (ZHANG Y *et al.*, 2013). Além disso, a perda de expressão de GRP78 de superfície em resposta ao tratamento com tunicamicina não pareceu ser suficiente para sensibilizar as células SK-MEL-29 ao tratamento com cisplatina.

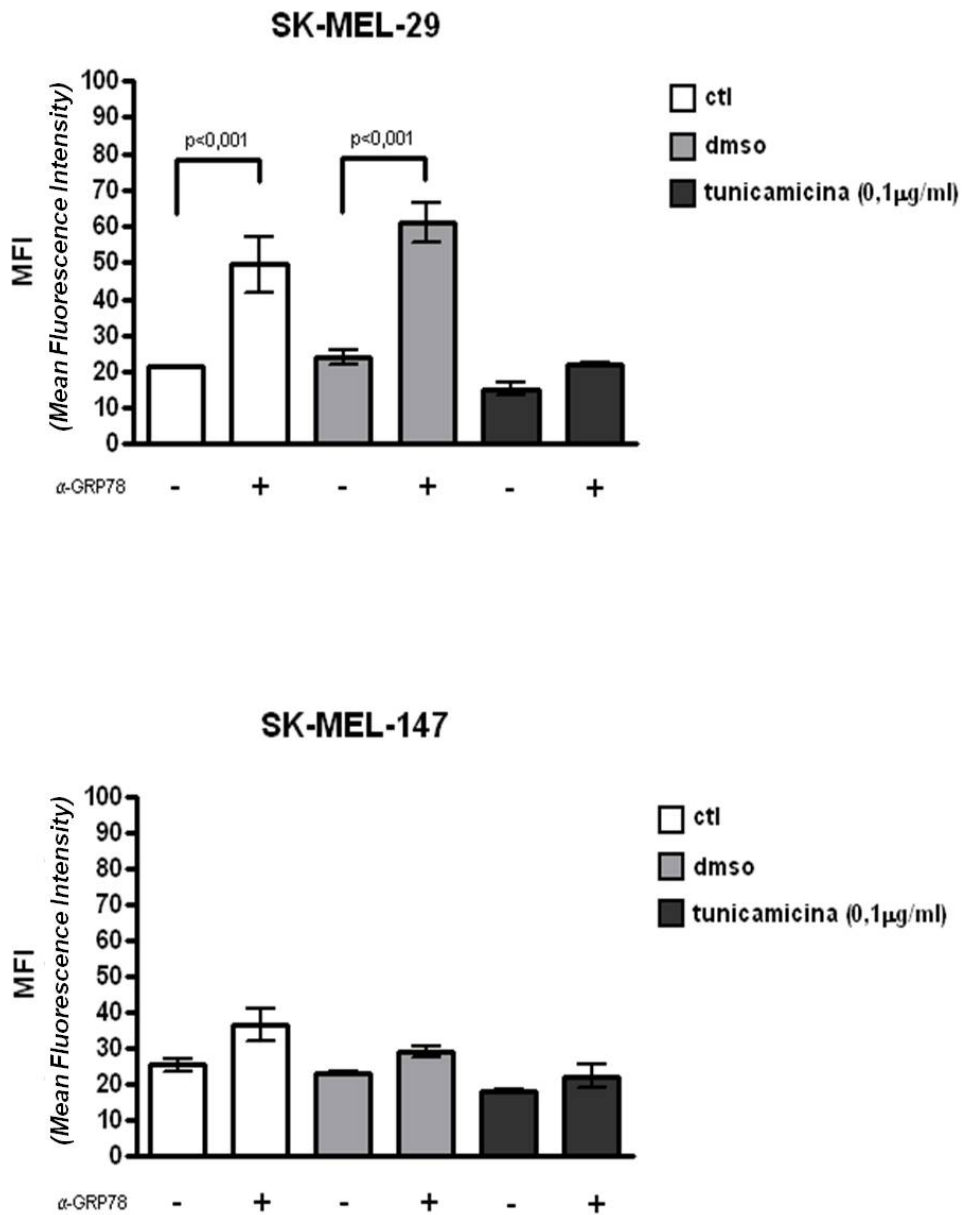
Estes dados mostram que as diferenças observadas entre as linhagens SK-MEL-29 e SK-MEL-147, em relação à expressão de GRP78 de superfície, podem contribuir para a seleção de células mais responsivas ao esquema de sensibilização proposto no nosso estudo.

A



**Figura 12 – GRP78 é expresso na superfície celular das células SK-MEL-29 e sua expressão é reduzida após tratamento com tunicamicina.** As linhagens de melanoma, SK-MEL-29 e SK-MEL-147 foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml) por 24. Após os tratamentos as células foram incubadas com o anticorpo primário  $\alpha$ -GRP78 e em seguida com o anticorpo secundário ( $\alpha$ -coelho conjugado à Alexa 488); ou com apenas o anticorpo secundário como controle. A análise de fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo e expressa através de histogramas (A). A quantificação de intensidade de fluorescência foi obtida pela média geométrica (intensidade média de fluorescência) (B). Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata.

B



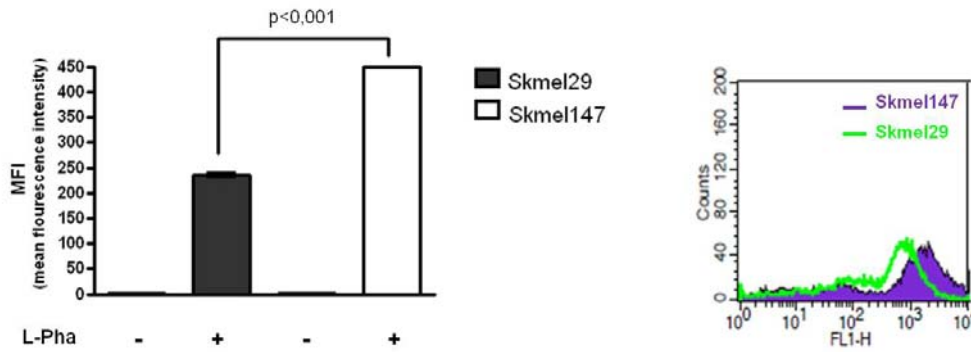
**Figura 12 – GRP78 é expresso na superfície celular das células SK-MEL-29 e sua expressão é reduzida após tratamento com tunicamicina.** As linhagens de melanoma SK-MEL-29 e SK-MEL-147 foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml) por 24h. Após os tratamentos, as células foram incubadas com o anticorpo primário  $\alpha$ -GRP78 (AbCam) e em seguida com o anticorpo secundário ( $\alpha$ -coelho conjugado à Alexa 488); ou com apenas o anticorpo secundário como controle. A análise de fluorescência foi realizada em citômetro de fluxo através de histogramas (A). A quantificação de intensidade de fluorescência foi obtida pela média geométrica (intensidade média de fluorescência) (B). Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni).

Alterações no perfil de glicosilação de glicoproteínas e glicolipídeos são um dos mecanismos que ocorrem ao longo da transformação maligna (DENNIS JW *et al.*, 1999) (PRZYBYŁO M & LITYNSKA A, 2011). Em melanomas, glicoproteínas com ramificações  $\beta$ 1-6 se acumulam ao longo da progressão desta doença e estas estruturas podem estar relacionadas com a aquisição de fenótipo metastático (LITYNSKA A *et al.*, 2001).

Verificamos se havia diferença de expressão de oligossacarídeos  $\beta$ -1-6 ligados na superfície das linhagens em estudo, SK-MEL-29 e SK-MEL-147. Para tal, utilizamos a lectina L-PHA (do inglês: *Phytohemagglutinin-L*) que reconhece especificamente ramificações beta-1,6-*N*-acetilglucosamina ( $\beta$ -1,6-GlcNAc) de *N*-glicanos. As células de melanoma foram incubadas com L-PHA conjugado à FITC, o que permitiu a quantificação de expressão das estruturas  $\beta$ -1,6-GlcNAc através da captação de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo. A FIGURA 13 mostra que as células SK-MEL-147 apresentaram quase o dobro (1,8 vezes) de ramificações  $\beta$ -1,6-GlcNAc reconhecidas por L-PHA comparadas às células SK-MEL-29. Este resultado sugere que as células SK-MEL-147 possam apresentar maior capacidade de se metastatizar do que às células SK-MEL-29. Como estas células se mostraram mais sensíveis à morte induzida por estresse de RE, talvez a estratégia de sensibilização através da prévia indução de estresse de RE possa ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de melanomas metastáticos. De fato, IRIMURA T, GONZALEZ R E NICOLSON GL (1981) demonstraram que o prévio tratamento de células de melanoma murino tanto com baixa (B16-F1) quanto com alta (B16-F10) capacidade de induzir metástase, resultou na diminuição da formação de focos metastáticos pulmonares *in vivo*.

A glicosilação é uma alteração pós-traducional que altera a estrutura de transportadores ABC associados tanto com resistência a drogas, quanto com o desenvolvimento de tumores (FLETCHER JI *et al.*, 2010). A *N*-glicosilação é crucial para a estabilidade dos transportadores ABC, que se não forem enovelados e *N*-glicosilados adequadamente são direcionados para degradação proteossomal ERAD (FLETCHER JI *et al.*, 2010).

NAKAGAWA H *et al.* (2009) demonstraram que tunicamicina reduz os níveis de expressão do transportador ABC do tipo ABCG2 e esta redução resulta na diminuição de resistência ao tratamento com SN-38, um metabólito ativo de irinotecan, quimioterápico utilizado para o tratamento de câncer de pulmão, estômago, cólon, mama, ovário e útero. Portanto, o tratamento prévio com tunicamicina pode diminuir a expressão de transportadores ABC nas células de melanoma, inibindo um dos mecanismos de resistência a quimioterápicos como cisplatina, o que poderia explicar o efeito de sensibilização. Além disso, este mecanismo poderia explicar o perfil diferencial de sensibilidade à indução de estresse de RE entre as linhagens de melanoma, pois eventualmente estas possam apresentar níveis diferentes de expressão de transportadores ABC.



**FIGURA 13 – Células SK-MEL-147 apresentam maior expressão de oligossacarídeos de superfície  $\beta$ 1-6 ligados comparados às células SK-MEL-29.** As células de melanoma foram incubadas com L-PHA conjugada à FITC, a quantificação de intensidade de fluorescência foi realizada através de citometria de fluxo e a intensidade média de fluorescência foi obtida através da média geométrica. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata (*One-way ANOVA/Bonferroni*). Legenda: ctl (controle) e L-PHA (*Phytohemagglutinin-L*).

Uma diferença entre estas linhagens que devemos considerar é o perfil de mutação no gene *B-RAF*, pois as células SK-MEL-29 apresentam a mutação  $BRAF^{V600E}$  e as células SK-MEL-147 não. O trabalho de CROFT A *et al.* (2014) mostrou que a ativação oncogênica da via MEK/ERK leva à adaptação a indução de estresse de RE crônico. A persistência da sinalização de proliferação celular, em resposta a ativação da via RAS-RAF-MEK-ERK, resulta em um aumento na síntese proteica, tornando estas células mais adaptadas a condições de acúmulo de proteínas mal-enoveladas, portanto, mais adaptadas à indução de estresse de RE.

Estes dados mostram que o tratamento prévio com tunicamicina parece ser uma promissora estratégia para sensibilização de células de melanoma. No entanto, a resposta a este esquema terapêutico apresentará amplitudes de resposta diferencial, pois as células de melanoma são mais ou menos sensíveis a indução de estresse de RE, dependendo do perfil celular ou genético.



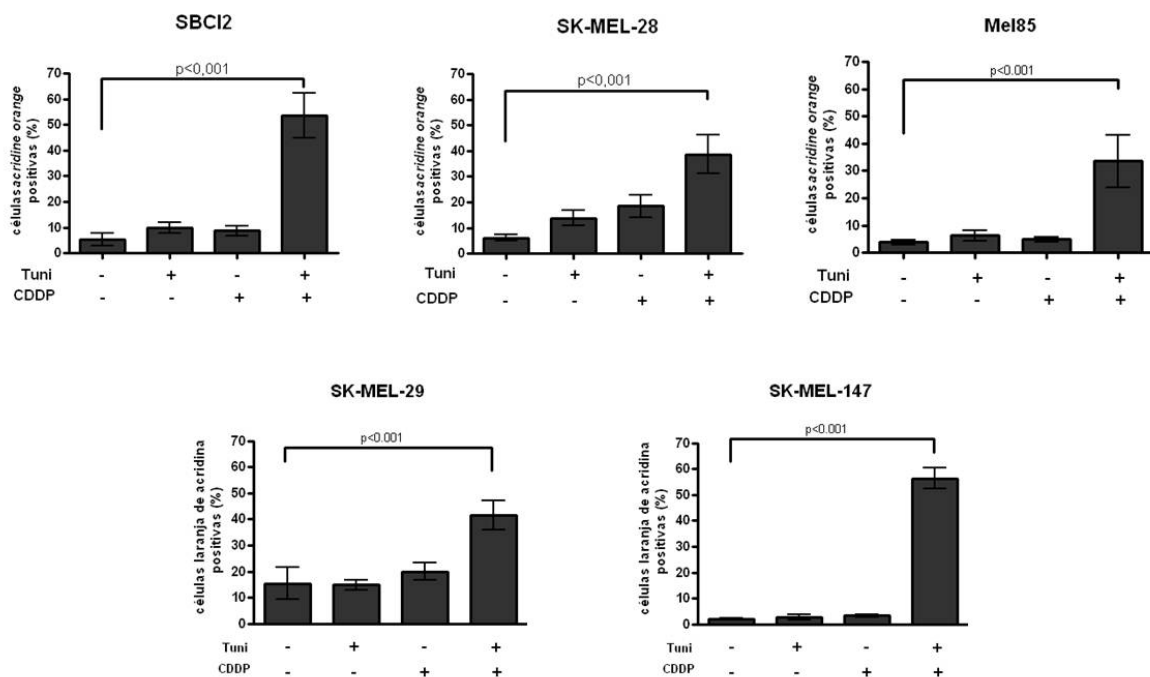
#### **4.4 Autofagia pode estar envolvida na sensibilização das células de melanoma à morte induzida por cisplatina**

Além de ativar a via de UPR, o estresse de RE também pode induzir a ativação de autofagia, que assim como a via de UPR apresenta função dual de indução tanto de sobrevivência quanto de morte celular. A indução de autofagia em resposta ao estresse de RE pode ser dependente da via de UPR, através da ativação de PERK e IRE1, ou independente desta via, pelo aumento de cálcio citosólico (HØYER-HANSEN M & JÄÄTTELÄ M, 2007).

Autofagia é um processo de degradação lisossomal ativado em resposta a condições estressantes, garantindo a sobrevivência celular através da manutenção da homeostasia energética e do sistema de controle de qualidade de proteínas e organelas. O processo de autofagia está intimamente relacionado com o RE, pois a principal fonte de moléculas necessárias para a formação do autofagossomo é a membrana do RE e, além disto, proteínas presentes no RE também são essenciais para a formação desta estrutura de dupla-membrana. A indução de estresse de RE pode levar a indução de autofagia a fim de garantir a sobrevivência celular através da degradação das proteínas mal enoveladas que se acumulam nesta organela e ultrapassam a capacidade de degradação pelo processo de ERAD. Além disso, autofagia serve como um mecanismo de *feedback* negativo ao remover partes do RE expandido após o período de estresse. Ao mesmo tempo, a persistência do estresse de RE e da ativação do mecanismo de autofagia pode levar a indução de morte celular (HEATH-ENGEL HM *et al.*, 2008).

Inicialmente avaliamos a indução de autofagia em resposta aos tratamentos com tunicamicina e/ou cisplatina através da quantificação de vacúolos acídicos (AVOs; do inglês: *acidic vesicular organelles*) após marcação com laranja de acridina e análise por

citometria de fluxo. A FIGURA 14 mostra que em todas as linhagens de melanoma foi observado um acúmulo de AVOs em resposta ao tratamento combinado Tuni>CDDP e o mesmo não ocorreu após os tratamentos com tunicamicina ou cisplatina. Laranja de acridina funciona de maneira pH-dependente, onde em pH neutro é uma molécula hidrofóbica fluorescente verde, enquanto em pH ácido é protonada, forma agregados e emite fluorescência vermelha. Portanto, laranja de acridina é um marcador acidotrópico que pode ser retido não somente em vacúolos autofágicos, como também em outros compartimentos ácidos intracelulares como lisossomos, vesículas endocíticas e porções *trans* do aparato de Golgi (ANDERSON RG & ORCI L, 1988).



**FIGURA 14 – O tratamento prévio com tunicamicina (Tuni>CDDP) resulta no aumento de vacúolos ácidos.** As células de melanoma (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e em seguida com 1µM de cisplatina por mais 24 horas. Após os tratamentos as células foram marcadas com laranja de acridina e a fluorescência foi obtida por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (Tunicamicina); CDDP (Cisplatina).

Na tentativa de confirmar se de fato havia indução de autofagia em resposta aos tratamentos com tunicamicina e/ou cisplatina, investigamos por *western blot* proteínas envolvidas no processo de formação de vacúolos autofágicos, Beclina-1 e LC3-II. Na FIGURA 15A observamos acúmulo de Beclina-1, em diferentes intensidades, após o tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina nas linhagens SbCl2, SK-MEL-28, Mel85 e SK-MEL-147. Nas células SK-MEL-29 parece haver diminuição da expressão de Beclina-1 em resposta aos tratamentos isolados ou combinados (Tuni>CDDP). Diferente do observado nas células SK-MEL-29 com a marcação de laranja de acridina, não observamos aumento da expressão da proteína autofágica Beclina-1 após o tratamento combinado Tuni>CDDP. No entanto, Beclina-1 é uma proteína envolvida na etapa inicial de formação da membrana do vacúolo autofágico, diferente da fusão com lisossomos para formação dos vacúolos acídicos que é uma etapa mais tardia. A indução de autofagia persistente através do tratamento com tunicamicina e em seguida com cisplatina, pode resultar na indução de morte celular autofágica e aumento da sensibilidade das células tumorais.

Após a participação de Beclina-1 no processo inicial de formação da membrana do vacúolo autofágico, a proteína LC3-I (solúvel no citoplasma) é recrutada para realizar o alongamento desta membrana para formação do próprio vacúolo autofágico. Quando associada à membrana do autofagossoma, LC3-I é convertido na forma LC3-II. Avaliamos também a expressão proteica de LC3-II em resposta aos tratamentos em estudo nas linhagens SbCl2, SK-MEL-28, SK-MEL-29 e SK-MEL-147. As células SbCl2 e SK-MEL-147 apresentaram acúmulo de LC3-II em resposta ao tratamento apenas com tunicamicina e ao tratamento combinado Tuni>CDDP. Ao mesmo tempo, observamos na linhagem SK-MEL-28 o acúmulo desta proteína autofágica após o

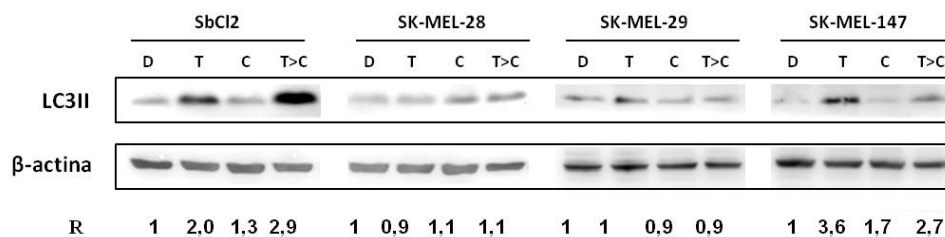
tratamento com cisplatina e com o tratamento combinado Tuni>CDDP. É importante notar que nas células SK-MEL-29, apesar de haver acúmulo de vacúolos ácidos após os tratamentos Tuni>CDDP, não observamos aumento da expressão de LC3-II.

Este resultado mostra que há acúmulo de Beclina-1 e LC3-II após o tratamento com Tuni>CDDP em todas as linhagens, exceto em SK-MEL-29. Isto sugere que o processo de autofagia pode estar envolvido na resposta de sensibilização destas células.

A



B

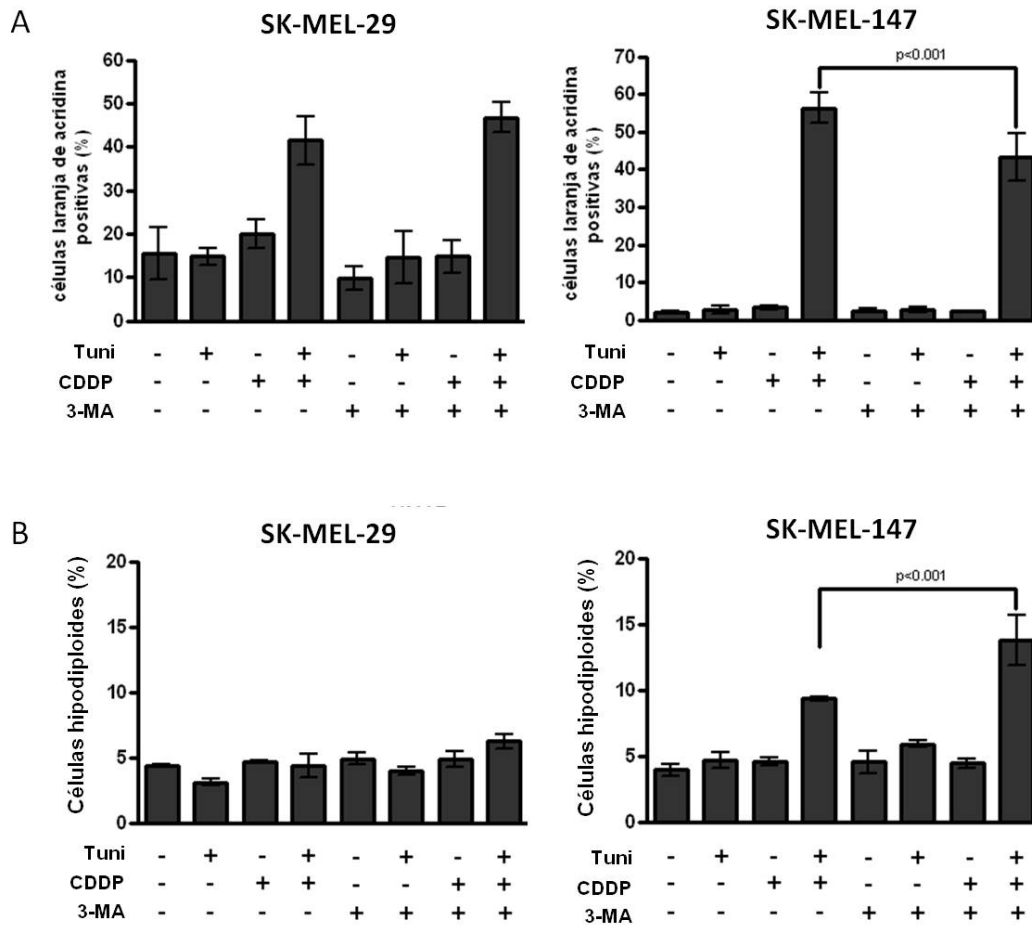


**FIGURA 15 – Acúmulo de proteínas autofágicas, Beclina-1 e LC3-II em resposta ao tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina.** Análise por *western blot* de Beclina-1 (A) e LC3-II (B) nas linhagens de melanoma humano (SbCl2, SK-MEL-28, SK-MEL-29 e SK-MEL-147 e Mel85). As células foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e em seguida com 1µM de cisplatina por mais 24 horas. Após os tratamentos foram obtidos extratos protéicos totais. Experimento representativo de três experimentos independentes. Legenda: D: DMSO; T: tunicamicina; C: cisplatina; R (Beclina-1/β-actina e LC3II/β-actina).

A fim de confirmar o envolvimento do mecanismo de autofagia no nosso modelo de sensibilização, utilizamos o inibidor de fosfatidilinositol-quinase 3 (PI3K) de classe III, 3-metiladenina (3-MA), que está envolvido nas etapas iniciais da formação do autofagossomo. A FIGURA 16A mostra que a presença do inibidor 3-MA durante o tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina foi capaz de inibir o acúmulo de vacúolos ácidos na linhagem SK-MEL-147. Esta pequena inibição resultou em um aumento na porcentagem de células em morte celular em resposta ao tratamento combinado Tuni>CDDP, sugerindo que nesta linhagem (SK-MEL-147) o processo de autofagia

pode estar protegendo as células à indução de morte celular em resposta ao pré-tratamento com tunicamicina (FIGURA 16B). Ao mesmo tempo, na linhagem SK-MEL-29 não observamos nenhuma interferência na quantificação de células hipodiploides, pois o tratamento com 3-MA não foi efetivo ao reduzir o acúmulo de vacúolos acídicos. Estes dados mostram que a indução de autofagia parece estar envolvida na sensibilização das células de melanoma, principalmente, nas células SK-MEL-147.

Como 3-MA inibe a proteína PI3K que faz parte de uma importante via de sobrevivência celular, não podemos concluir se o resultado obtido se deve exclusivamente à inibição de autofagia. Como discutido anteriormente, a via de PI3K é de extrema importância na adaptação de melanomas, com isso, a inibição desta via por si só pode resultar em alterações na resposta celular. Além disso, a utilização de 3-MA como inibidor de autofagia é questionada, pois o trabalho de WU YT *et al.* (2010) mostra que 3-MA inibe autofagia quando as células estão submetidas a privação de nutrientes, mas sem esta condição 3-MA resulta na indução de autofagia.

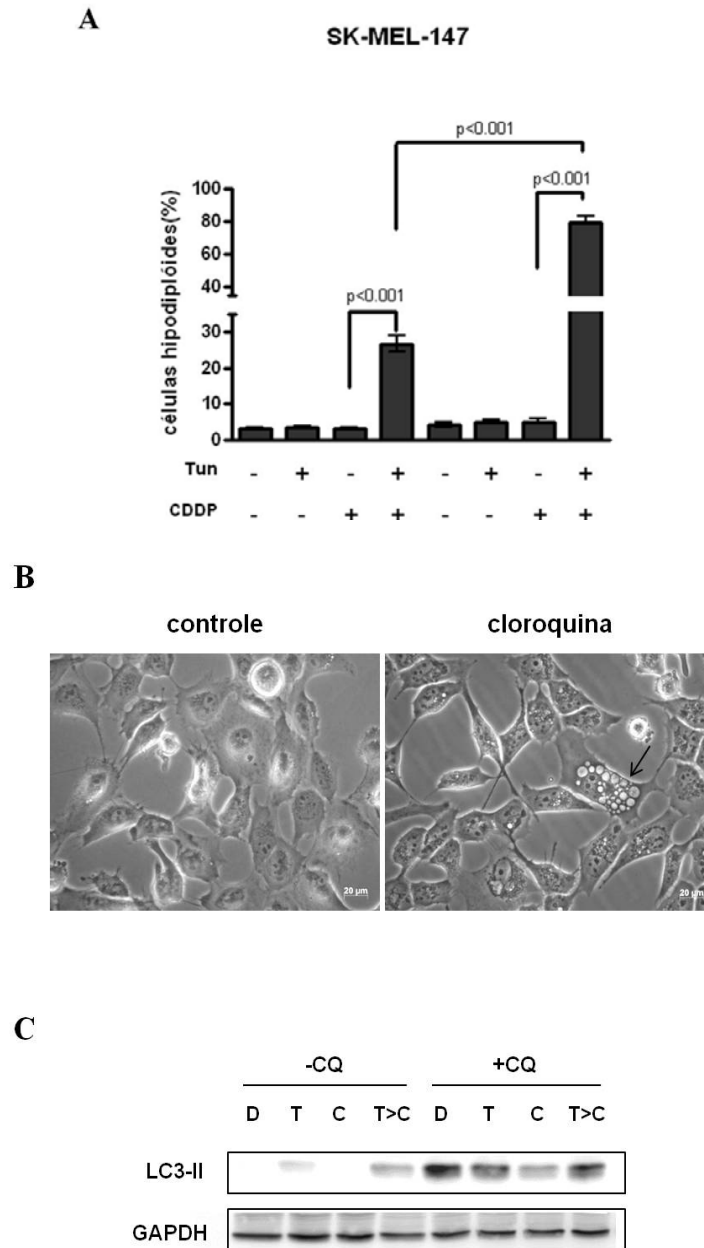


**Figura 16 – Avaliação da sensibilização das células de melanoma na presença e na ausência do inibidor de autofagia 3-MA.** As células foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e em seguida com 1µM de cisplatina por mais 24 horas. Estes tratamentos foram realizados na presença e na ausência do inibidor 3-MA (0,8mM). Em **(A)** o gráfico de barras mostra a quantificação de células positivas para laranja de acridina e em **(B)** as células hipodiploides obtidas por incorporação de iodeto de propídeo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (Tunicamicina); CDDP (Cisplatina); 3-MA (3-metiladenina).

Utilizamos outro inibidor de autofagia, a cloroquina (CQ), na tentativa de esclarecer o envolvimento deste processo celular no esquema de sensibilização estudado. Diferente de 3-MA, cloroquina inibe o mecanismo de autofagia em uma etapa mais tardia. Cloroquina é uma droga antimalárica que se acumula em compartimentos celulares acídicos, como endossomos e lisossomos (SOLOMON VR & LEE H, 2009). Como cloroquina é uma base fraca ela inibe autofagia, pois aumenta o pH lisossomal, o que resulta na inibição tanto da fusão do autofagossomo com o lisossomo, quanto na degradação proteica lisossomal (SHINTANI T & KLIONSKY DJ, 2004).

A FIGURA17A mostra que a sensibilização das células SK-MEL-147 é maior na presença de cloroquina. Em resposta ao tratamento Tuni>CDDP observamos um acúmulo de aproximadamente 30% de células hipodiploides, porém, na presença de CQ esse número aumentou para 80%. O acúmulo de autofagossomos após o tratamento com CQ (FIGURA17B) mostra a interrupção de autofagia no momento da fusão do autofagossomo com o lisossomo para formar o autofagolisossomo. Os níveis de LC3-II estão correlacionados com os níveis de autofagossomos anteriormente a fusão com lisossomos (KABEYA Y *et al.*, 2000). Portanto, o aumento da expressão de LC3-II (FIGURA17C) em resposta ao tratamento com CQ confirma o acúmulo de autofagossomos visualizados após o tratamento com esta droga. Não foi possível avaliar o tratamento com CQ nas células SK-MEL-29, pois estas se apresentaram extremamente sensíveis a este inibidor de autofagia.





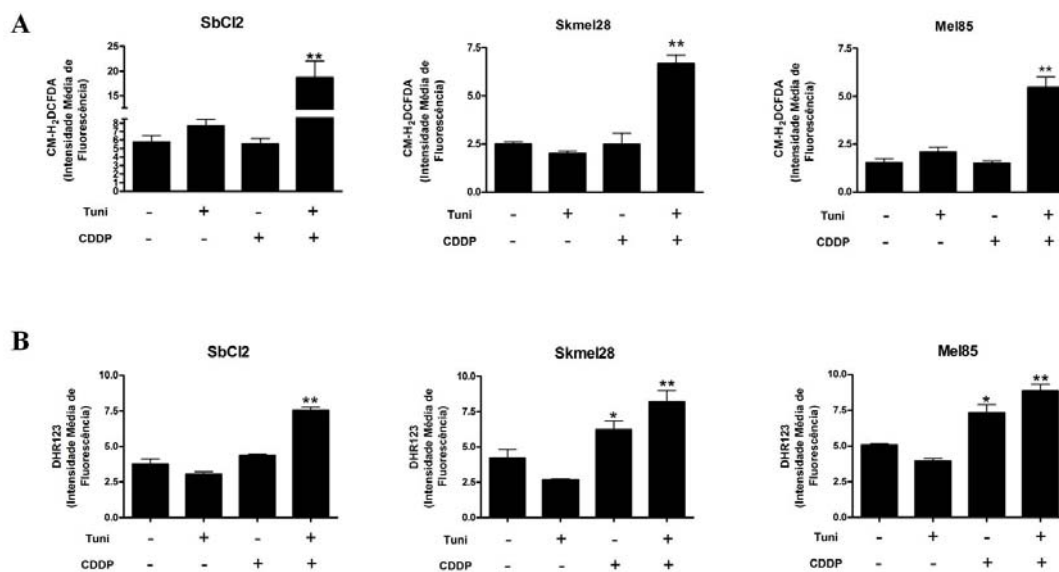
**Figura 17 - Avaliação da sensibilização das células de melanoma na presença e na ausência do inibidor de autofagia cloroquina.** As células foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e em seguida com 1µM de cisplatina por mais 24 horas. Estes tratamentos foram realizados na presença e na ausência do inibidor CQ (10µM). Em **(A)** o gráfico de barras mostra a quantificação de células hipodiploides obtidas por incorporação de iodeto de propídeo. **(B)** Imagens obtidas em microscópio óptico com contraste de fase (aumento de 40x) evidenciam a formação de vacúolos em resposta à CQ e em **(C)** acúmulo de LC3-II. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: D(DMSO); T e Tun (Tunicamicina); C e CDDP (Cisplatina); CQ (Cloroquina).

#### **4.5 Indução de estresse oxidativo em resposta ao tratamento prévio com tunicamicina.**

Além de estar relacionado com o processo de autofagia, o estresse de RE e a via de UPR também estão associados com estresse oxidativo (MALHOTRA JD & KAUFMAN RJ, 2007). Altos níveis de espécies reativas de oxigênio podem alterar o ambiente oxidativo do lúmen do RE, que é fundamental para o processo de enovelamento proteico. Por outro lado, o aumento do processo de enovelamento proteico durante o estresse de RE está associado ao aumento da produção de ROS.

Os indicadores inespecíficos de ROS, CM-H<sub>2</sub>DCFDA e DHR123, foram utilizados para verificar se o estresse oxidativo estava sendo induzido em resposta aos tratamentos em estudo. O tratamento combinado de Tuni>CDDP resultou em um acúmulo de ROS nas linhagens de melanoma avaliadas SbCl<sub>2</sub>, SK-MEL-28 e Mel85, com ambos os indicadores de ROS (FIGURA 18). No entanto, os tratamentos individuais, tunicamicina ou cisplatina não resultaram no acúmulo de ROS, sugerindo que a sensibilização através da indução de estresse de RE não parece ser dependente da indução de estresse oxidativo, mas a formação de ROS pode ser consequência deste regime de tratamento.

A amplificação da resposta autofágica pode estar associada à indução de estresse oxidativo. A indução do processo autofágico também pode ocorrer em resposta ao estresse oxidativo. Embora não se saiba ainda o mecanismo exato pelo qual ROS induz morte celular autofágica, há evidências de que ROS induz a oxidação do resíduo de cisteína de Atg4, processo requerido para indução de autofagia (SCHERZ-SHOVAL R *et al.*, 2007). Assim, o acúmulo de ROS observado no tratamento Tuni>CDDP pode favorecer a indução de morte celular por autofagia, além de induzir diretamente morte celular.



**FIGURA 18 – Aumento da produção de ROS no tratamento combinado (Tuni>CDDP) através da detecção por CM-H<sub>2</sub>DCFDA e DHR123.** As células SbCl2, Skmel28 e Mel85 foram tratadas com tunicamicina (1µg/ml) e/ou cisplatina (1 µM) e posteriormente foram incubadas com CM-H<sub>2</sub>DCFDA(15 µM) ou DHR123 (15 µM) por 30 minutos à 37 °C. Em seguida, foram incubadas em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino por um período de recuperação de 30 minutos à 37 °C. Após este período de incubação as células foram analisadas por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. (*One-way ANOVA/Bonferroni*). Legenda: Tuni (Tunicamicina); CDDP (Cisplatina). \**p*<0,01 e \*\**p*<0,001 em relação ao controle.

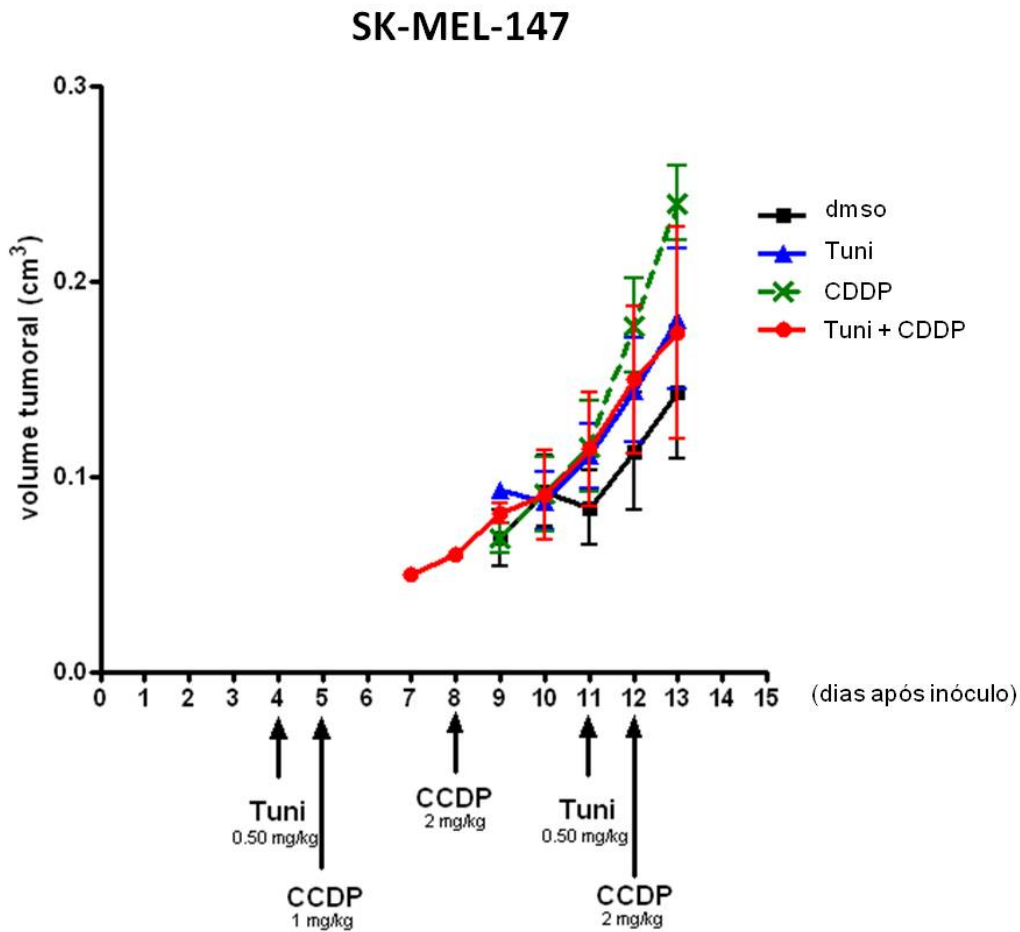
#### 4.6 Avaliação de candidatos a indutores de estresse de RE como alternativa ao uso de tunicamicina *in vivo*.

Os dados mostrados até o momento revelam a prova de conceito da estratégia de sensibilização de células de melanoma humano à morte induzida por cisplatina, através da prévia indução de estresse de RE por tunicamicina. O próximo passo foi a validação deste esquema terapêutico *in vivo*.

Como o processo de *N*-glicosilação é de extrema importância tanto para a formação estrutural quanto funcional de muitas proteínas (aproximadamente 90% das glicoproteínas são *N*-glicosiladas), havia a possibilidade de tunicamicina apresentar-se

tóxica *in vivo*. No entanto, alguns trabalhos da literatura têm mostrado o uso de tunicamicina em baixas concentrações, diminuindo o crescimento tumoral de gliomas em animais atímicos e evitando a formação de vasos em modelo de carcinoma de mama (BANERJEE A *et al.* 2011). Em nosso modelo utilizamos as células SK-MEL-147, que se apresentaram mais responsivas ao esquema de tratamento proposto, para induzir tumores nos animais que foram posteriormente tratados com tunicamicina e/ou cisplatina.

A proposta do desenho experimental foi realizar o tratamento com tunicamicina uma vez a cada sete dias e cisplatina a cada três dias. Como demonstrado na FIGURA19, foi possível realizar somente duas doses de tunicamicina, e o experimento foi interrompido, pois após a segunda dose de tunicamicina os animais apresentaram efeitos colaterais severos em resposta a este tratamento. Entre os efeitos adversos observados estavam caquexia, protrusão ocular e focos hemorrágicos no subcutâneo. Provavelmente estes efeitos devam-se às alterações hemorrágicas que a tunicamicina pode induzir ao inibir o processo de *N*-glicosilação, pois tunicamicina altera a formação de fatores coagulantes como o fator VII, cuja estabilidade e função dependem desse processo de modificação proteica (MATTHEW P *et al.*, 2009). Contudo, a acentuada toxicidade apresentada por tunicamicina impossibilitou a validação *in vivo* do esquema de sensibilização em estudo. No entanto, este fato motivou a busca de indutores de estresse de RE que não apresentassem esta acentuada toxicidade.



**FIGURA 19 – Tratamento de animais BALB/c nude com tunicamicina e/ou cisplatina.** Foram inoculados no subcutâneo dos animais  $10^6$  células de melanoma humano, SK-MEL-147. Após a formação de uma massa tumoral palpável não mensurável, os animais foram tratados *i.v.* com tunicamicina (0,5 mg/kg) ou cisplatina (1 ou 2 mg/kg) e no dia seguinte um dos grupos que haviam recebido o tratamento com tunicamicina foram tratados com cisplatina (1 ou 2 mg/kg). O tratamento com tunicamicina foi realizado a cada 7 dias e o tratamento com cisplatina a cada 3 dias. A medida do volume foi realizada diariamente com paquímetro e o cálculo do volume tumoral foi obtido através da fórmula:  $0,5236 \times D_{\text{maior}} \times (D_{\text{menor}})^2$ . Legenda: Tuni (tunicamicina) e CDDP (cisplatina).

Um trabalho realizado em colaboração com o Instituto Butantã mostrou que a proteína recombinante Amblyomin-X induz estresse de RE (MARIA DA *et al.*, 2013). Amblyomin-X é obtida na forma de proteína recombinante, sendo um inibidor do tipo *Kunitz* identificado pelo transcriptoma do carrapato *Amblyomma cajennense* (BATISTA IF *et al.*, 2012). O trabalho de MARIA DA *et al.* (2013) mostrou que a atividade antitumoral de Amblyomin-X em células de adenocarcinoma renal murina (RENCA), estava relacionada com a inibição da degradação proteossomal, alteração da função mitocondrial e indução da produção de ROS. Todos estes mecanismos celulares podem levar à indução de estresse de RE e de fato, mostramos neste trabalho que o tratamento das células RENCA com Amblyomin-X resultava na indução da via de UPR. Um estudo do mesmo grupo mostrou que em modelo murino *in vivo* de tumores originários de células de melanoma murino B16F-10, o tratamento destes animais com Amblyomin-X resultou na diminuição da massa tumoral e do número de focos metastáticos pulmonares (CHUDZINSKI-TAVASSI AM *et al.* 2010). Assim, seria interessante avaliar a resposta *in vivo* de Amblyomin-X e cisplatina.

Na busca por possíveis agentes indutores de estresse de RE, avaliamos outro inibidor do processo de *N*-glicosilação, a swainsonina (SW). Este composto inibe a glicosil hidrolase  $\alpha$ -mannosidase II, residente no Golgi, responsável pela continuidade do processo de *N*-glicosilação iniciado no RE (ELBEIN AD *et al.*, 1981). O trabalho de XU XY *et al.* (2010) mostra que interferências no processo de glicosilação, através do bloqueio de transportadores de açúcar, no Golgi podem diminuir o fluxo de glicoproteínas do RE-Golgi, resultando em indução da via de UPR. Estes dados tornam swainsonina um candidato para a indução de estresse de RE. No entanto, o estudo com duas linhagens de melanoma humano, SK-MEL-29 e SK-MEL-147 com diferentes

concentrações de swainsonina (1, 5 e 10 µg/ml) utilizadas por 24 horas, mostrou que nestas linhagens não houve indução de estresse de RE, pois não observamos acúmulo de GRP78 em resposta a estes tratamentos (FIGURA 20A).

O estudo de drogas já utilizadas na clínica para tratar outras patologias poderia ser uma abordagem interessante de investigação neste estudo para o uso de drogas não tóxicas e que seriam possíveis indutores de estresse de RE. Dados da literatura têm mostrado que a inibição da enzima HMG-CoA redutase, como as estatinas, pode levar a indução do estresse de RE. Estatinas são fármacos utilizados no tratamento de hipercolesterolemia e na prevenção de aterosclerose, atuando como inibidores da enzima HMG-CoA redutase pertencente à via do mevalonato, a via metabólica que produz o colesterol. Esta mesma via também produz dolicol, molécula que desempenha importante função no processo de *N*-glicosilação, pois esta molécula ancora a formação do oligossacarídeo precursor que é adicionado à cadeia polipeptídica nascente. A inibição da via do mevalonato por estatinas além de inibir a síntese de colesterol também inibe a produção de dolicol, interferindo em etapas iniciais do processo de *N*-glicosilação. Alguns trabalhos da literatura mostram que a inibição da enzima HMG-CoA redutase resulta em indução da via de UPR em células de fibroblasto atrial humano, *C. elegans* e macrófagos (GHAVAMI S *et al.*, 2012; MORCK C *et al.*, 2009; CHEN JC *et al.*, 2008).

Avaliamos se o uso de uma estatina, a atorvastatina, levaria a indução de estresse de RE em células tumorais. A FIGURA 20B mostra que o tratamento de células SK-MEL-29 e SK-MEL-147, com duas concentrações de atorvastatina (100 e 200µM) por 24 horas, não resultou no acúmulo de GRP78, mostrando que esta estatina não resulta na indução de estresse de RE nestas linhagens de melanoma. O uso de estatinas para

indução de estresse de RE pode ser controverso, pois em células do miocárdio de ratos com infarto do miocárdio, o tratamento com atorvastatina teve efeito anti-apoptótico mediado pela diminuição da expressão de GRP78, caspase-12 e CHOP (SONG X J *et al.*, 2011).

Outro medicamento já utilizado na clínica e com potencial de indução de estresse de RE é a metformina, droga amplamente utilizada em pacientes diabéticos. A atividade hipoglicemiante desta droga está relacionada com a redução da produção de glicose no fígado e aumento da absorção de glicose no trato gastrointestinal, além de induzir a enzima AMPK (AMPK; do inglês: *AMP-activated protein kinase*), responsável pelo metabolismo de lipídeos e glicose (ZHOU G *et al.*, 2001). AMPK é um dos reguladores centrais do metabolismo celular sendo ativado principalmente pela diminuição da produção de ATP. Esta via pode estar relacionada com a indução de estresse de RE, pois na vigência do mesmo ocorre a saída de  $Ca^{2+}$  do lúmen do RE para o citoplasma, o que leva à ativação da via AMPK e resulta na indução de autofagia (XI H *et al.* 2013).

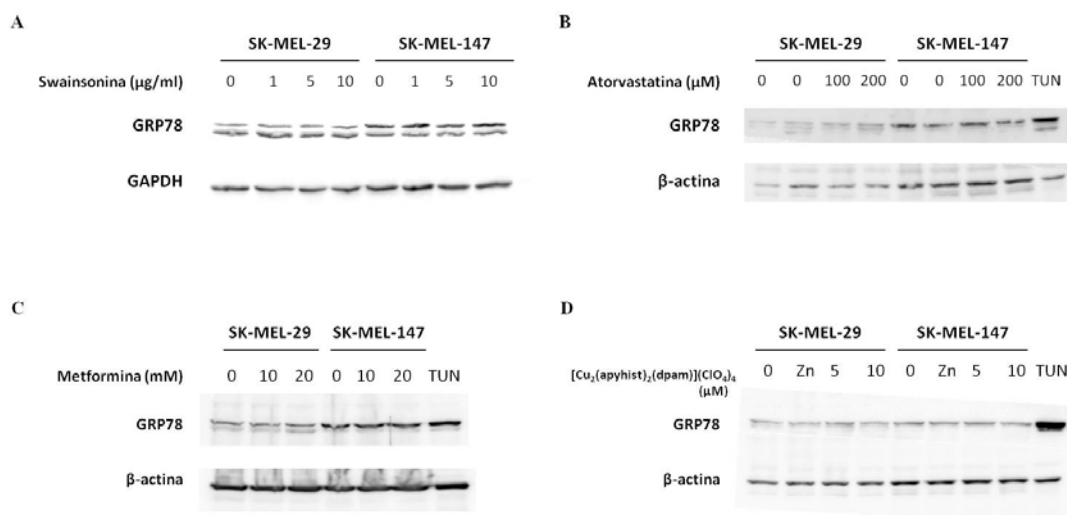
As células tumorais SK-MEL-29 e SK-MEL-147 foram tratadas com metformina (10 e 20nM) por 24 horas e avaliamos a expressão proteica de GRP78. A FIGURA 20C mostra que o tratamento com metformina não levou ao acúmulo de GRP78, mostrando que nestas células não houve indução de estresse de RE. O trabalho de QUENTIN T *et al.* (2012) mostra que metformina induz a via de UPR, exclusivamente a via PERK-ATF4-GADD153, no entanto, não há indução de morte celular, o que questiona o papel de GADD153 como indutor de morte celular em resposta à indução de estresse de RE. Ao contrário do proposto no estudo de QUENTIN T *et al.* (2012), o tratamento com metformina inibiu a ativação de proteínas envolvidas



na via de UPR (GRP8, ATF6, PERK e XBP-1), protegendo hepatócitos da morte induzida pelo excesso de ácidos graxos (KIM DS *et al.*, 2010).

O estudo de ambos inibidores metabólicos, atorvastatina e metformina, nos mostrou que interferir em vias metabólicas talvez não seja a melhor alternativa para induzir estresse de RE. A dificuldade em interferir em vias metabólicas talvez se deva ao fato destas vias desempenharem papel crucial na sobrevivência celular e serem muito robustas, onde a ativação de vias alternativas parece ser inevitável.

Um trabalho recente do grupo mostrou que um composto com base em cobre [bis-(2-oxindol-3-yl-imino)-2-(2-aminoethyl) pyridine-N,N'] copper (II) perchlorate ([Cu(isaepy)]) induz a produção de ROS e altera o potencial de membrana mitocondrial em células de melanoma murino (BORGES BE *et al.*, 2013). Outro composto, [Cu<sub>2</sub>(apyhist)<sub>2</sub>(dpam)](ClO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>, com base em cobre tem sido utilizado no nosso grupo e temos mostrado que também induz a produção de ROS em linhagens de melanoma murino. Como discutido anteriormente, o estresse oxidativo está intimamente relacionado com o estresse de RE, portanto, este composto de cobre poderia levar à indução de estresse de RE nas linhagens em estudo. Assim, avaliamos se esse composto poderia induzir estresse no RE. No entanto, o tratamento das células SK-MEL-29 e SK-MEL-147 com esse composto não resultou no acúmulo de GRP78 (FIGURA 20D).



**FIGURA 20 – Avaliação da indução de GRP78 em resposta a candidatos a agentes estressores do RE.** As células SK-MEL-29 e SK-MEL-147 foram tratadas por 24 horas com: swainsonina (1,5 e 10µg/ml), atorvastatina (100 e 200µM), metformina (10 e 20mM) e  $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2(\text{dpam})](\text{ClO}_4)_4$  (5 e 10µM). O tratamento com tunicamicina (0,1µg/ml) por 24 horas foi realizado como controle positivo e o tratamento com  $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$  (10 µM) foi realizado como controle do composto  $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2(\text{dpam})](\text{ClO}_4)_4$ . Após os tratamentos, foi obtido extrato proteico total e a quantificação de GRP78 foi feita através de *western blot*. Experimento representativo de três experimentos independentes. Legenda: TUN (tunicamicina); Zn ( $[\text{Zn}(\text{isaepy})\text{Cl}_2]$ ).

Estes resultados mostraram que a eficácia da sensibilização das células de melanoma com a utilização de tunicamicina está relacionada com a especificidade deste antibiótico em induzir diretamente estresse de RE. Utilizar alternativas indiretas e pouco específicas não parece ser a melhor abordagem, principalmente pelo fato das células tumorais apresentarem-se extremamente adaptadas a condições de estresse, como o próprio estresse de RE. Portanto, o uso de moléculas que interfiram diretamente na via de UPR ou na homeostasia do RE e que apresentem seletividade para as células tumorais, seriam mais efetivas como agentes sensibilizadores.

Eeyarestatina I (EerI) inibe o processo de degradação proteossomal de proteínas mal enoveladas, o ERAD. Esta inibição ocorre pois EerI inibe a ATPase p97 situada na

membrana do RE responsável por retirar as proteínas mal enoveladas marcadas para degradação (WANG Q, LI L E YE Y, 2008). Além de inibir o processo de ERAD, EerI inibe a translocação de proteínas nascentes para o lúmen do RE ao se ligar ao complexo Sec61 que forma a membrana do poro do translocon do RE (CROSS BC *et al.*, 2009).

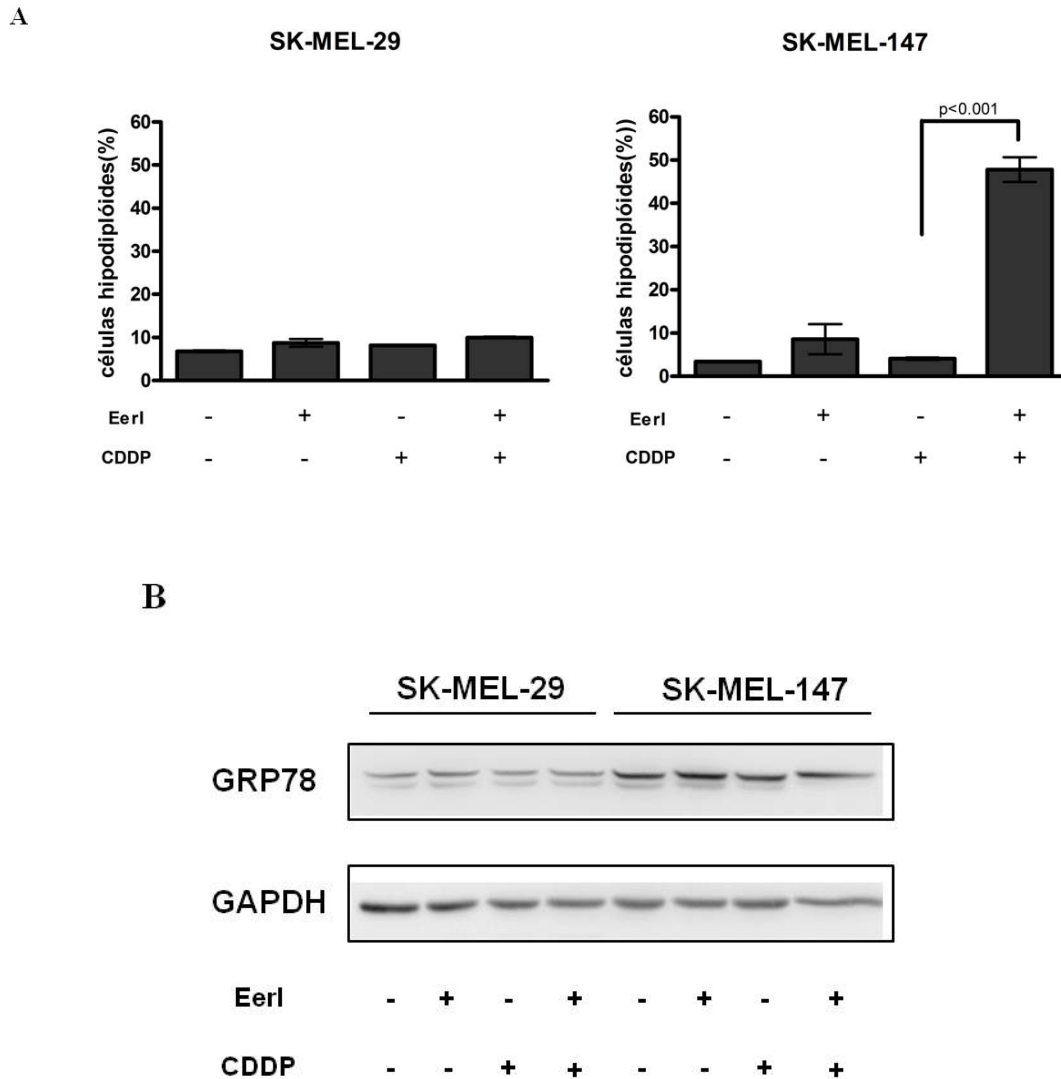
Ao inibir o ERAD, EerI pode gerar o acúmulo de proteínas mal enoveladas no RE, induzindo estresse de RE. Os trabalhos de SHINJO S *et al.* (2013) e MCKIBBIN C *et al.* (2012) mostraram que existe ativação da via de UPR em resposta ao tratamento com EerI. Além disso, a atividade citotóxica de Bortezomib pode ser aumentada pelo tratamento com EerI através da indução de UPR em leucemias (WANG Q *et al.*, 2009) e em tumores cervicais (BREM GJ *et al.*, 2013). A associação destes dois inibidores de proteassoma mostrou-se eficiente no aumento da eficácia de Bortezomib, o que permite a utilização de menores doses desta droga, favorecendo a diminuição da toxicidade apresentada por este último inibidor já utilizado na clínica. Neste mesmo sentido, verificamos se o tratamento prévio com EerI também aumentaria a eficácia de cisplatina e se este efeito seria mediado pela ativação de UPR.

A FIGURA 21A mostra que o pré-tratamento com EerI sensibiliza as células de melanoma SK-MEL-147 à morte induzida por cisplatina, mas assim como os dados mostrados até agora, as células SK-MEL-29 não responderam da mesma forma. No entanto, não observamos acúmulo de GRP78 em resposta ao tratamento com EerI em ambas as linhagens (FIGURA 21B). Embora o tratamento com EerI tenha aumentado a expressão de GRP78 em outros tipos tumorais, o mesmo não foi observado nas nossas linhagens de melanoma. Como este tipo tumoral apresenta acentuada adaptação a indução de estresse de RE, estas células podem possuir uma maquinaria de

enovelamento proteico muito eficiente, assim, o tratamento apenas com EerI não pareceu acumular proteínas mal enoveladas suficiente para induzir a via de UPR.

Um agente estressor poderia favorecer o acúmulo de proteínas mal-enoveladas no RE na vigência do inibidor de ERAD. Embora o tratamento apenas com CDDP não tenha mostrado acúmulo de GRP78 (FIGURA S11), a ação desta droga combinada com a inibição do processo de ERAD poderia resultar em indução de estresse de RE. No entanto, não observamos aumento de expressão de GRP78 em EerI>CDDP, pois neste desenho experimental EerI não foi mantido junto ao tratamento com CDDP. Como o tratamento com CDDP foi de 24 horas, talvez neste período a inibição de ERAD pode ter sido revertida. Portanto, seria necessário realizar o mesmo experimento onde o tratamento com CDDP deve ser feito na vigência do inibidor EerI.

Além disso, o mecanismo exato de indução de morte celular por EerI ainda não foi completamente esclarecido. O trabalho de BREM GJ *et al.* (2013) mostra que a morte por EerI é mediada pela via de UPR com a ativação de GRP78 e GADD153. No entanto, WANG Q *et al.* (2009) mostra o envolvimento de NOXA induzido pela ativação de ATF3 e ATF4 na morte induzida por EerI em células de leucemia. Isso nos sugere que outros braços da via de UPR podem ser ativados em resposta a EerI no nosso modelo experimental. Assim, são necessários mais experimentos para melhor entender o mecanismo envolvido na sensibilização observada pelo prévio tratamento com EerI.



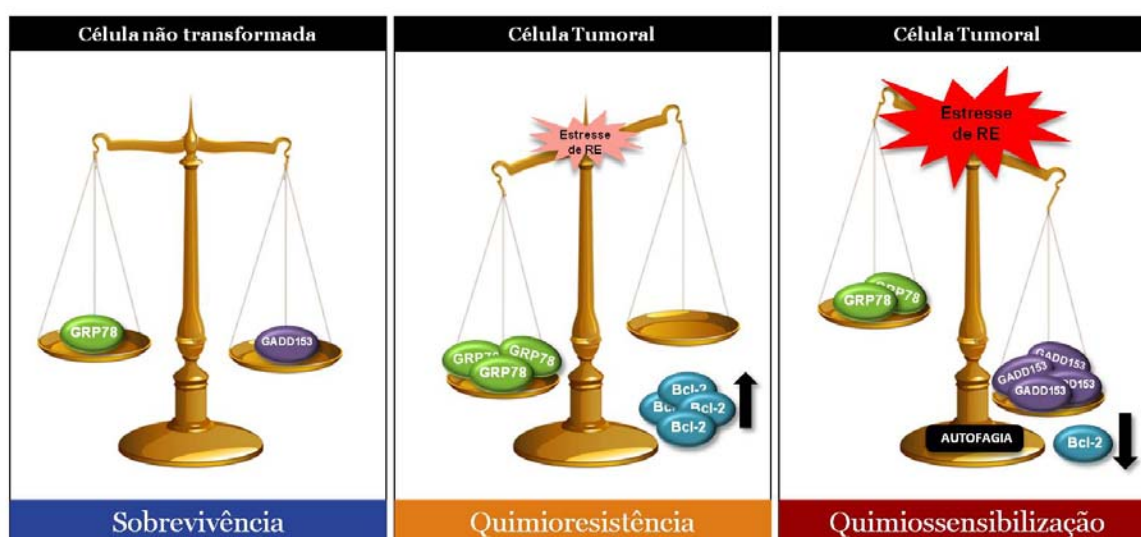
**FIGURA 21 – Eeyarestatina I sensibiliza as células SK-MEL-147 à morte induzida por CDDP.** As células SK-MEL-29 e SK-MEL-147 foram tratadas com Eeyarestatin (4 $\mu$ M) por 24 horas e em seguida foram tratadas com CDDP por mais 24 horas. **(A)** A quantificação das células hipodiploides foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo e **(B)** a expressão de GRP78 foi avaliada por *western blot*. (*One-way ANOVA/Bonferroni*). Experimento representativo de três experimentos realizados em triplicata. Legenda: CDDP (cisplatina), EerI (Eeyarestatina I).

***CONCLUSÃO***

---

## 5. CONCLUSÃO

Estes resultados mostram que o tratamento prévio com tunicamicina resulta na sensibilização de células de melanoma à morte induzida por diferentes drogas terapêuticas (cisplatina, temozolomida e PLX4720). Além disso, autofagia parece estar envolvida neste processo de sensibilização. Estes achados mostram que as células tumorais parecem ser pré-condicionadas a morte celular quando expostas primeiramente a um indutor de estresse de RE, como a tunicamicina, o que pode levar ao comprometimento da resposta adaptativa a morte celular induzida por cisplatina (Esquema 03). No entanto, é necessária a investigação de novos agentes indutores de estresse de RE, que apresentem pouca toxicidade celular, a fim de permitir a utilização desta estratégia de sensibilização *in vivo*.



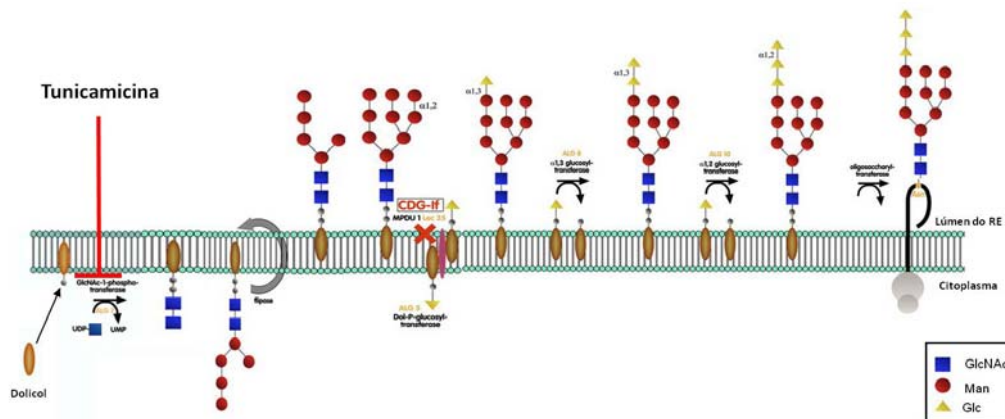
Esquema 3: Sumário dos resultados encontrados.

***FIGURAS SUPLEMENTARES***

---

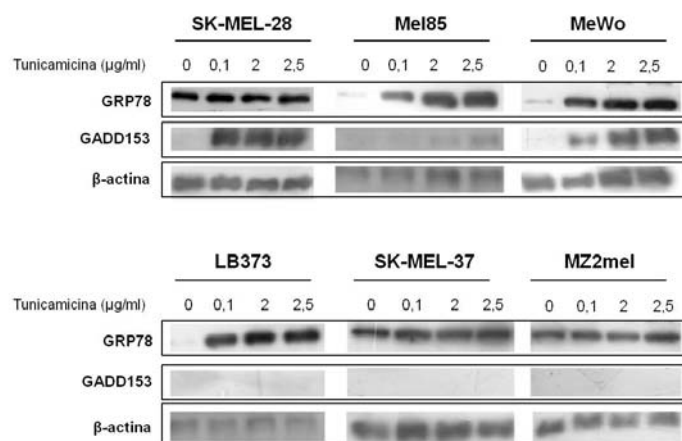


6. FIGURAS SUPLEMENTARES

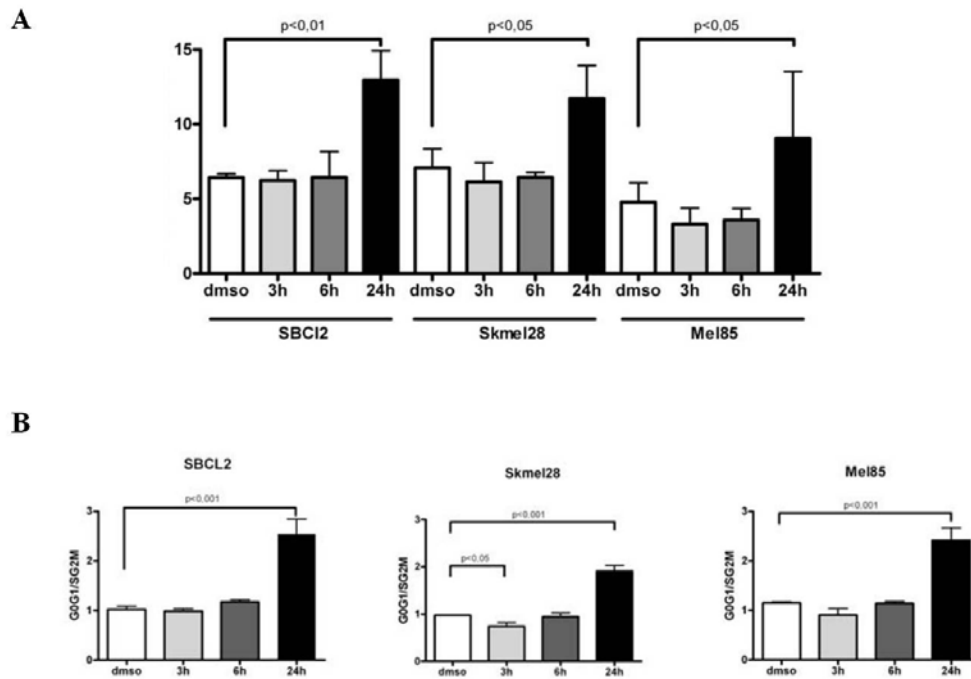


Fonte: Adaptado de DENECKE e MARQUARDT (2003).

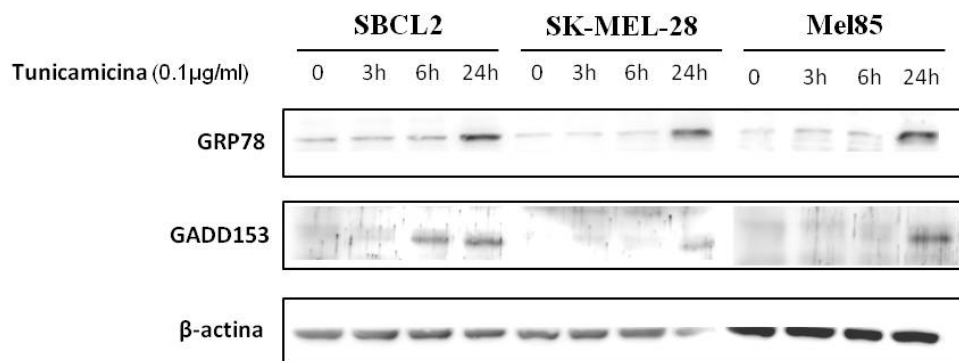
**Figura S01- Bloqueio da N-glicosilação pelo antibiótico tunicamicina.** No processo de N-glicosilação é sintetizado o oligossacarídeo que será adicionado à proteína nascente. Este oligossacarídeo é formado a partir da adição de moléculas de glicose, manose e N-acetil glucosamina (GlcNAc) à molécula carreadora Dolicol fosfato. A primeira etapa desta sequência de reações é catalizada pela enzima GlcNAc fosfotransferase (GPT), molécula alvo da tunicamicina. A adição do oligo precursor à proteína nascente é fundamental para que esta seja enovelada adequadamente, portanto, o bloqueio de sua síntese resulta no acúmulo de proteínas mal-enoveladas no retículo endoplasmático resultando na indução de estresse de RE.



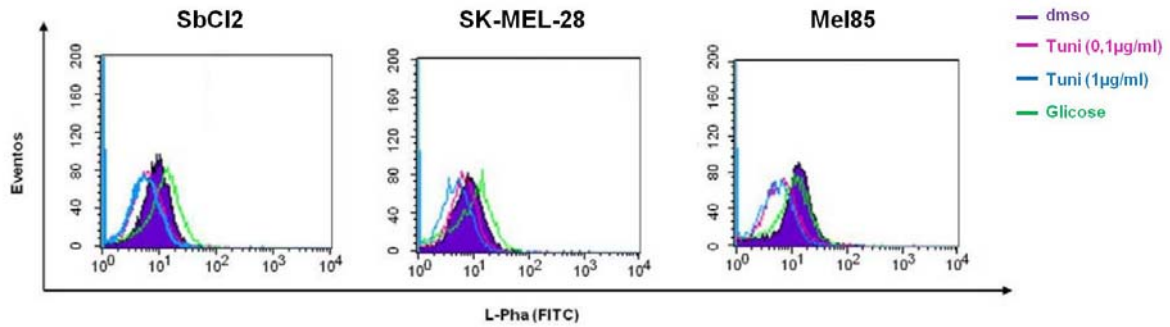
**Figura S02- Indução das proteínas GRP78 e GADD153, membros da via UPR, em resposta ao tratamento com tunicamicina em células de melanoma humano.** Análise por *Western blot* da expressão proteica de GRP78 e GADD153 nas linhagens de melanoma humano (LB373, Mel85, MeWo, Skmel28, Skmel37 e MZ2mel) após 24 horas de tratamento com 0,1 ; 1 e 2,5 µg/ml de tunicamicina.



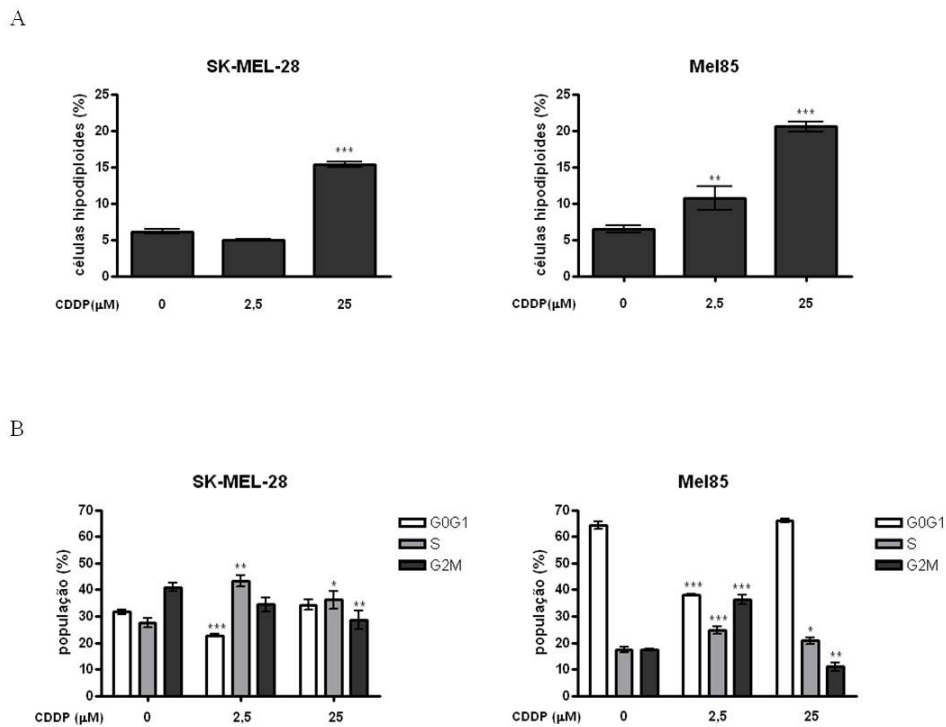
**Figura S03- Tunicamicina induz morte celular e parada em ciclo na fase G0G1 de células de melanoma após 24 horas de tratamento.** As células de melanoma SbCl2, Skmel28 e Mel85 foram tratadas 0,1µg/ml de tunicamicina por 3, 6 e 24 horas. A quantificação das células em processo de morte celular (A) e avaliação de ciclo celular (B) foram realizadas através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e obtidas por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni).



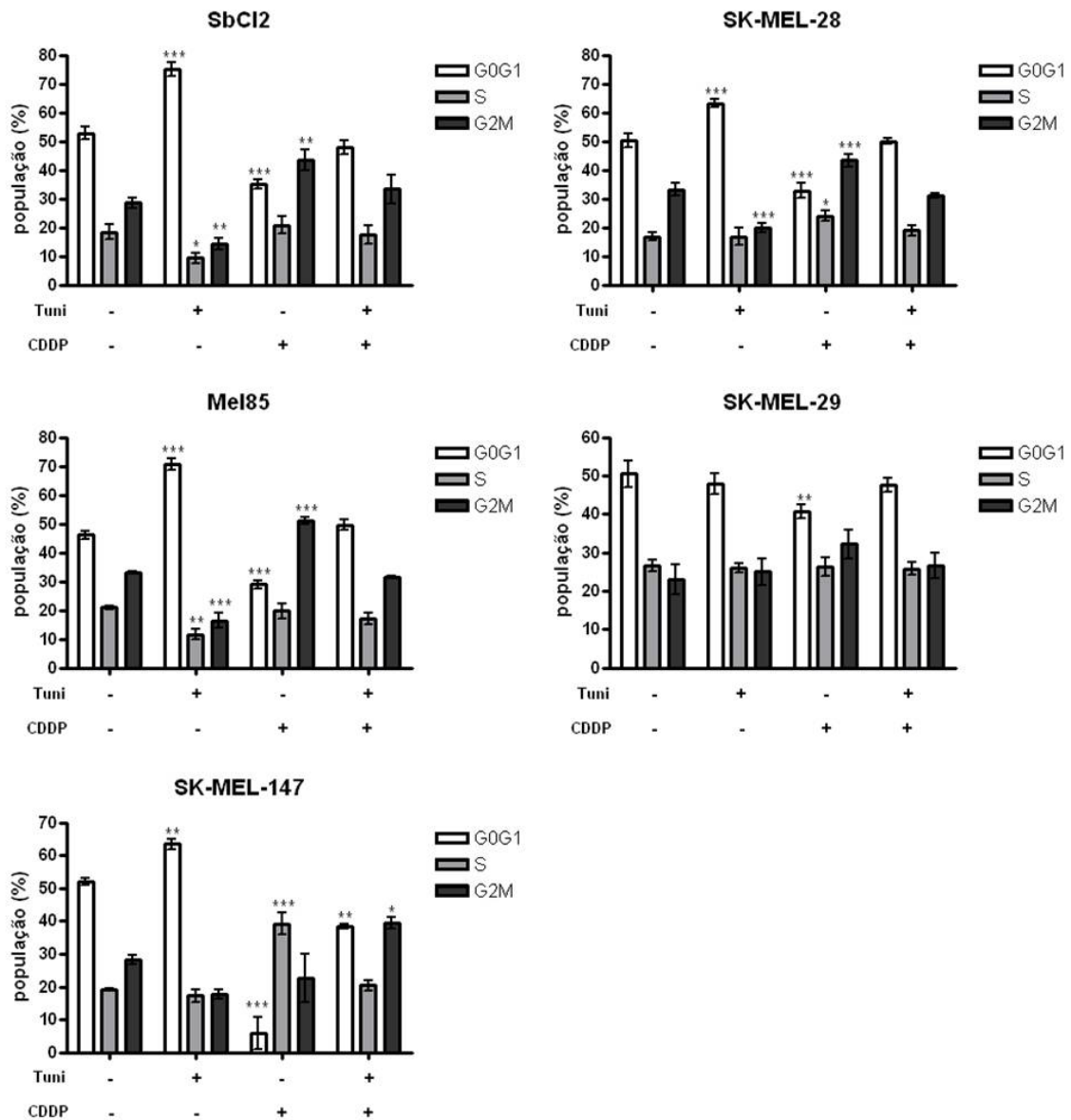
**Figura S04 – Tunicamicina induz expressão proteica de GRP78 e GADD153 após 24 horas de tratamento.** Análise por *Western blot* da expressão proteica de GRP78 e GADD153 nas linhagens de melanoma humano (SbCl2, Skmel28 e Mel85) após 3, 6 e 24 horas de tratamento com tunicamicina.



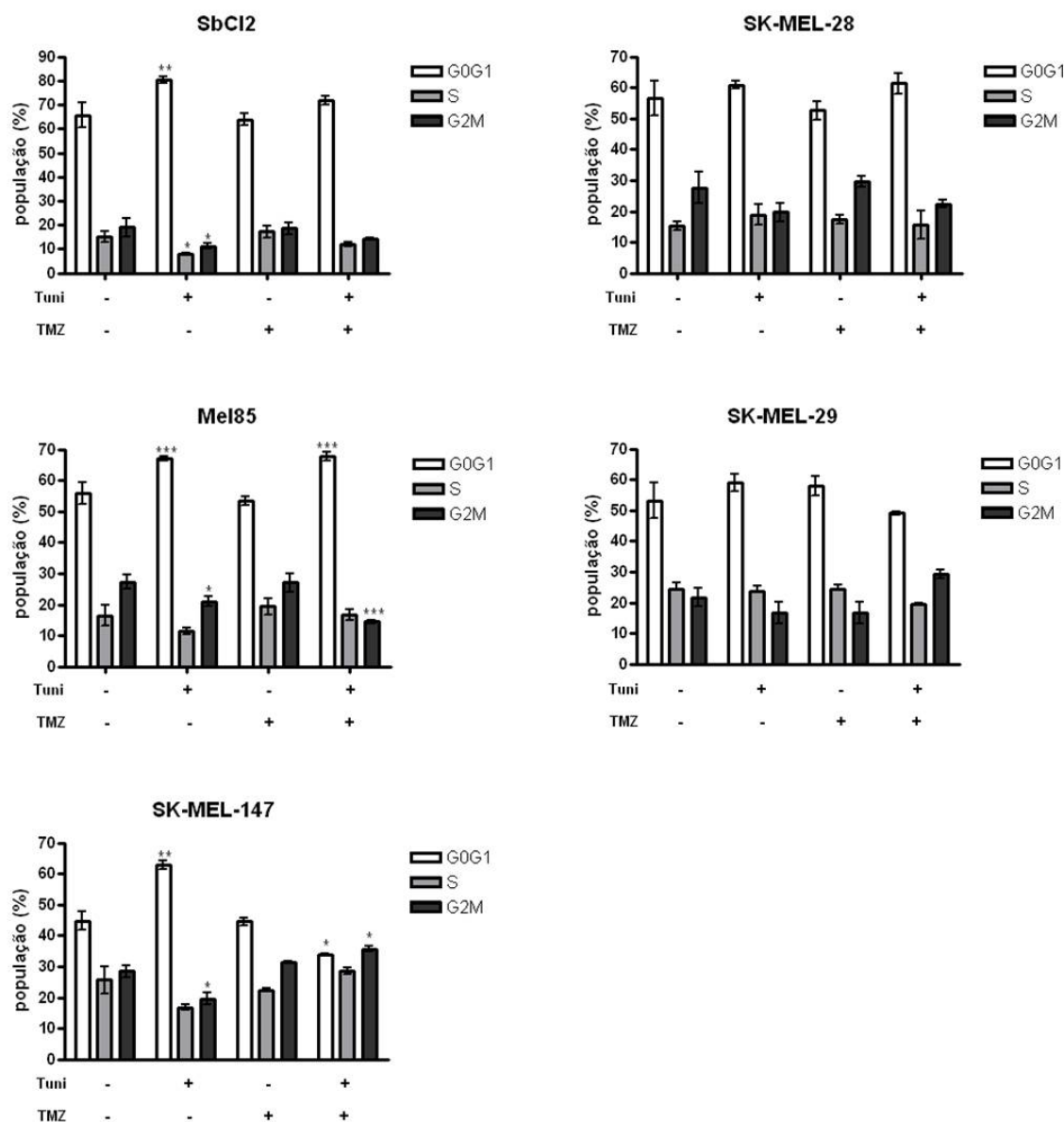
**Figura S05 – Diminuição de ligações glicosídicas (*N*-oligossacarídeos  $\beta$ -1,6 ligados) após o tratamento com tunicamicina.** As células de melanoma humano (SbCl2, Skmel28 e Mel85) foram tratadas com tunicamicina (0,1 e 1  $\mu$ g/ml) por 24 horas e após este período foi avaliada a presença de ligações glicosídicas presentes na superfície celular através da marcação de lectinas L-Pha conjugadas à FITC. A leitura de fluorescência foi realizada através de citometria de fluxo. A glicose foi utilizada como um controle para induzir aumento de ligações glicosídicas. Legenda: Tuni (tunicamicina)



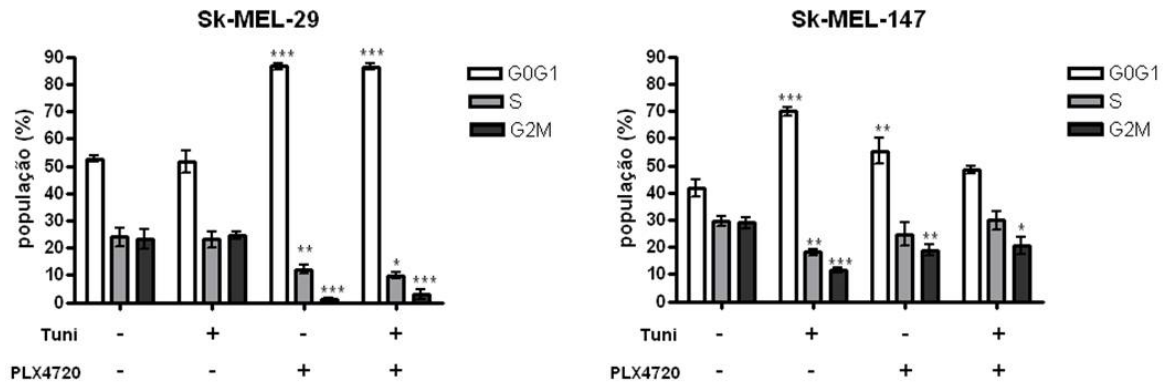
**Figura S06- Tratamento de células de melanoma com cisplatina.** As células de melanoma (SK-MEL-28 e Mel28) foram tratadas com 2,5 e 25 $\mu$ M de cisplatina por 24 horas. A quantificação das células em processo de morte celular (A) e avaliação de ciclo celular (B) foram realizadas através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e obtidas por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni).



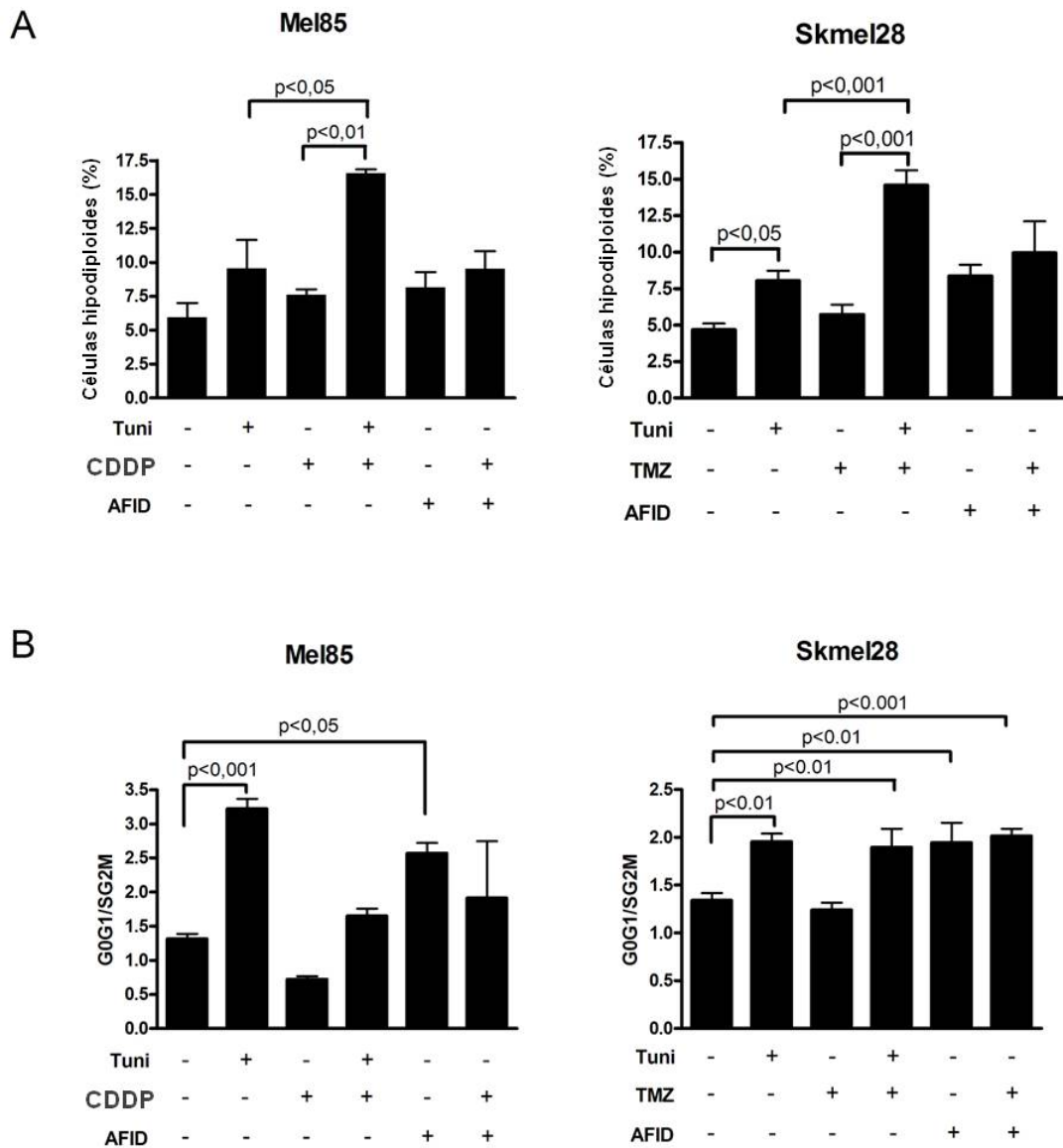
**Figura S07: Análise de ciclo celular em resposta ao tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina.** As células de melanoma (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (1 µM por 24 horas). A avaliação de ciclo celular foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e obtida por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (tunicamicina) e CDDP (cisplatina). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.



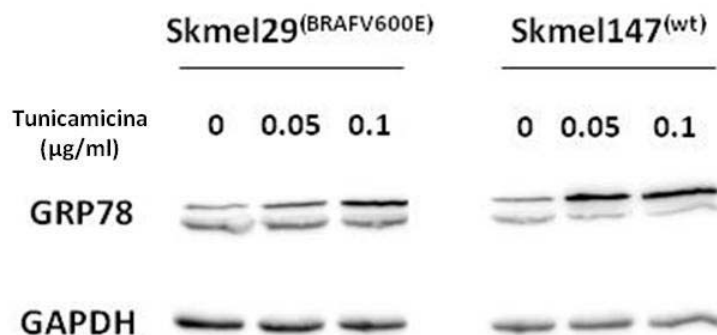
**Figura S08: Análise de ciclo celular em resposta ao tratamento com tunicamicina e/ou temozolomida.** As células de melanoma (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com temozolomida (50 µM por 24 horas). A avaliação de ciclo celular foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e obtida por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (tunicamicina) e TMZ (temozolomida). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.



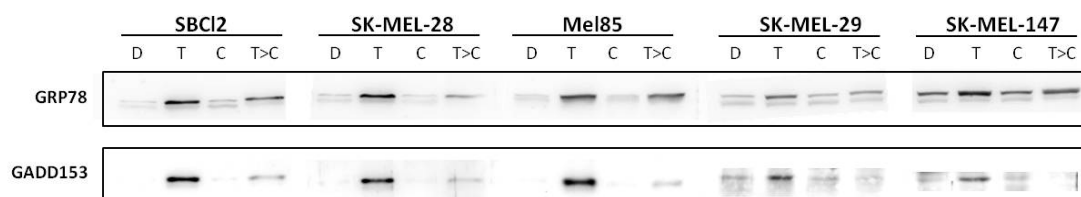
**Figura S09: Análise de ciclo celular em resposta ao tratamento com tunicamicina e/ou PLX4720.** As células de melanoma (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147) foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml por 24 horas) previamente ao tratamento com PLX4720 (10µM por 24 horas). A avaliação de ciclo celular foi realizada através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e obtida por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata. (*One-way* ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (tunicamicina). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.



**Figura S10 - A sensibilização das células de melanoma à morte induzida por cisplatina ou temozolamida através do pré-tratamento com tunicamicina não parece ser dependente da indução de parada de ciclo em G0G1.** As células foram tratadas com tunicamicina (0,1µg/ml por 24 horas) ou afidicolina (3µM por 24 horas) previamente ao tratamento com cisplatina (1 µM por 24 horas) ou temozolamida (50 µM por 24 horas). A quantificação das células hipodiplóides e a avaliação do ciclo celular foram realizadas através da incorporação de iodeto de propídio (PI) e análise por citometria de fluxo. Experimento representativo de três experimentos independentes, realizados em triplicata, contendo a média das triplicatas e o desvio padrão. (ANOVA/Bonferroni). Legenda: Tuni (Tunicamicina); TMZ (Temozolamida); AFID (Afidicolina); CDDP (Cisplatina).



**Figura S11- Células SK-MEL-147 são mais sensíveis à indução de estresse de RE.** Análise por *western blot* da expressão protéica de GRP78 nas linhagens de melanoma humano (SK-MEL-29 e SK-MEL-147). As células foram tratadas com 0,05 e 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas.



**Figura S12- Análise da expressão de GRP78 e GADD153 após o tratamento com tunicamicina e/ou cisplatina.** Análise por *western blot* da expressão proteica de GRP78 e GADD153 nas linhagens de melanoma humano (SbCl2, SK-MEL-28, Mel85, SK-MEL-29 e SK-MEL-147). As células foram tratadas com 0,1µg/ml de tunicamicina por 24 horas e em seguida com 1µM de cisplatina por mais 24 horas. Após os tratamentos foi obtido extrato celular total para análise por *western blot* das proteínas de interesse. Experimento representativo de três experimentos independentes. Legenda: D (DMSO); T (tunicamicina); C (cisplatina).



## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu Dayyeh BK, Quan TK, Castro M, Ruby SW. Probing interactions between the U2 small nuclear ribonucleoprotein and the DEAD-box protein, Prp5. *J Biol Chem.* 2002 ; 7;277(23):20221-33.

Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W. Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. *Cell Mol. Life Sci.* 2004, 61: 2189-2199.

Albini A & Sporn MB. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(2):139-47.

Anderson RG, Orci L. A view of acidic intracellular compartments. *J Cell Biol.* 1988 ;106(3):539-43.

Arap MA, Lahdenranta J, Mintz PJ, Hajitou A, Sarkis AS, Arap W, Pasqualini R. Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands. *Cancer Cell.* 2004;6(3):275-84.

Banerjee A, Lang JY, Hung MC, Sengupta K, Banerjee SK, Baksi K, Banerjee DK. Unfolded protein response is required in nu/nu mice microvasculature for treating breast tumor with tunicamycin. *J Biol Chem.* 2011;19;286(33):29127-38.

Basile KJ, Abel EV, Aplin AE. Adaptive upregulation of FOXD3 and resistance to PLX4032/4720-induced cell death in mutant B-RAF melanoma cells. *Oncogene.* 2012 ;10;31(19):2471-9.

Bassik MC, Scorrano L, Oakes SA, Pozzan T, Korsmeyer SJ. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis. *EMBO J.* 2004; 10;23(5):1207-16.

Batista IF, Ramos OH, Ventura JS, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch Biochem Biophys*. 2010; 15;493(2):151-6.

Beck D, Niessner H, Smalley KS, Flaherty K, Paraiso KH, Busch C, Sinnberg T, Vasseur S, Iovanna JL, Drießen S, Stork B, Wesselborg S, Schaller M, Biedermann T, Bauer J, Lasithiotakis K, Weide B, Eberle J, Schittek B, Schadendorf D, Garbe C, Kulms D, Meier F. Vemurafenib potently induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in BRAFV600E melanoma cells. *Sci Signal*. 2013; 29;6(260):ra7.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000; 2(6):326-32.

Borges BE, Teixeira VR, Appel MH, Steclan CA, Rigo F, Filipak Neto F, da Costa Ferreira AM, Chammas R, Zanata SM, Nakao LS. De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. *Chem Biol Interact*. 2013; 25; 206(1):37-46.

Brem GJ, Mylonas I, Brüning A. Eeyarestatin causes cervical cancer cell sensitization to bortezomib treatment by augmenting ER stress and CHOP expression. *Gynecol Oncol*. 2013; 128(2):383-90.

Callahan MK, Wolchok JD. At the bedside: CTLA-4- and PD-1-blocking antibodies in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 2013; 94(1):41-53.

Cordin O, Banroques J, Tanner N K, Linder P. The DEADbox protein family of RNA helicases. *Gene*. 2006; 15;367:17-37.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group.

Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011; 30;364(26):2507-16.

Chen JC, Wu ML, Huang KC, Lin WW. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression. *Cardiovasc Res.* 2008; 1; 80(1):138-50.

Chen R, Dai RY, Duan CY, Liu YP, Chen SK, Yan DM, Chen CN, Wei M, Li H. Unfolded protein response suppresses cisplatin-induced apoptosis via autophagy regulation in human hepatocellular carcinoma cells. *Folia Biol (Praha).* 2011; 57(3):87-95.

Chudzinski-Tavassi AM, De-Sá-Júnior PL, Simons SM, Maria DA, de Souza Ventura J, Batista IF, Faria F, Durães E, Reis EM, Demasi M. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. *Toxicon.* 2010; 15; 56(7):1145-54.

Contessa JN, Bhojani MS, Freeze HH, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. Molecular imaging of N-linked glycosylation suggests glycan biosynthesis is a novel target for cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2010; 15; 16(12):3205-14.

Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007; 21(4):976-94.

Croft A, Tay KH, Boyd SC, Guo ST, Jiang CC, Lai F, Tseng HY, Jin L, Rizos H, Hersey P, Zhang XD. Oncogenic Activation of MEK/ERK Primes Melanoma Cells for Adaptation to Endoplasmic Reticulum Stress. *J Invest Dermatol.* 2014;134(2):488-97.

Crosby T, Fish R, Coles B, Mason MD. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000 ;( 2):CD001215.

Cross BC, McKibbin C, Callan AC, Roboti P, Piacenti M, Rabu C, Wilson CM, Whitehead R, Flitsch SL, Pool MR, High S, Swanton E. Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* 2009; 1; 122(Pt 23):4393-400.

Dalbadie-McFarland G, Abelson J. PRP5: a helicase-like protein required for mRNA splicing in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(11):4236-40.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002; 27; 417(6892):949-54.

de Ridder GG, Gonzalez-Gronow M, Ray R, Pizzo SV. Autoantibodies against cell surface GRP78 promote tumor growth in a murine model of melanoma. *Melanoma Res.* 2010

de Souza GA, Godoy LM, Teixeira VR, Otake AH, Sabino A, Rosa JC, Dinarte AR, Pinheiro DG, Silva WA Jr, Eberlin MN, Chammas R, Greene LJ. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. *Proteomics.* 2006; 6(5):1460-70.

Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy.* 2005; 1(2):66-74.

Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 6; 1473(1):21-34.

Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol.* 2007; 171(2):513-24.

Elbein AD, Solf R, Dorling PR, Vosbeck K. Swainsonine: an inhibitor of glycoprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981; 78(12):7393-7.

Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003 Mar; 4(3):181-91.

Emery CM, Vijayendran KG, Zipser MC, Sawyer AM, Niu L, Kim JJ, et al. MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:20411–16.

Fagioli C, Sitia R. Glycoprotein quality control in the endoplasmic reticulum. Mannose trimming by endoplasmic reticulum mannosidase I times the proteasomal degradation of unassembled immunoglobulin subunits. *J Biol Chem.* 2001; 276(16):12885-92.

Faitova J, Krekac D, Hrstka R, Vojtesek B. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Cell Mol Biol Lett.* 2006; 11(4):488-505.

Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer.* 2010; 10(2):147-56.

Ghavami S, Yeganeh B, Stelmack GL, Kashani HH, Sharma P, Cunnington R, Rattan S, Bathe K, Klonisch T, Dixon IM, Freed DH, Halayko AJ. Apoptosis, autophagy and ER stress in mevalonate cascade inhibition-induced cell death of human atrial fibroblasts. *Cell Death Dis.* 2012; 21; 3:330.

Ghigna C, Valacca C and Biamonti G. Alternative Splicing and Tumor Progression. *Current Genomics.* 2008; 9, 556-570.

Gidianian S, Mentelle M, Meyskens FL Jr, Farmer PJ. Melanosomal damage in normal human melanocytes induced by UVB and metal uptake--a basis for the pro-oxidant state of melanoma. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(3):556-64.

Gonzalez-Gronow M, Selim MA, Papalás J, Pizzo SV. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(9):2299-306.

Groen A, Lemeer S, van der Wijk T, Overvoorde J, Heck AJ, Ostman A, Barford D, Slijper M, den Hertog J. Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem.* 2005; 18; 280(11):10298-304.

Haas IG. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia.* 1994; 30; 50(11-12):1012-20.

Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton JP, Xu W, Hagen A, Backes BJ, Oakes SA, Papa FR. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell.* 2009; 7; 138(3):562-75.

Hartmann B and Valcárcel J. Decrypting the genome's alternative messages. *Cell Biology.* 2009.; 21:377-386.

Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. *Eur J Pharmacol.* 2009; 25; 625(1-3):234-46.

Heath-Engel HM, Chang NC, Shore GC. The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family. *Oncogene.* 2008; 27; 27(50):6419-33.

Hersey P, Zhang XD. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008; 21(3):358-67.

Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ.* 2007; 14(9):1576-82.

Hozumi S, Hirabayashi R, Yoshizawa A, Ogata M, Ishitani T, Tsutsumi M, Kuroiwa A, Itoh M, Kikuchi Y. DEAD-box protein Ddx46 is required for the development of the digestive organs and brain in zebrafish. *PLoS One*. 2012; 7(3):e33675.

Intlekofer AM, Thompson CB. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol*. 2013; 94(1):25-39.

Irimura T, Gonzalez R, Nicolson GL. Effects of tunicamycin on B16 metastatic melanoma cell surface glycoproteins and blood-borne arrest and survival properties. *Cancer Res*. 1981; 41(9 Pt 1):3411-8.

Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Kiejda KA, Mhaidat N, Wang YF, Thorne R, Zhang XD, Hersey P. Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response. *Cancer Res*. 2007; 15; 67(12):5880-8.

Jiang CC, Lai F, Thorne RF, Yang F, Liu H, Hersey P, Zhang XD. MEK-independent survival of B-RAFV600E melanoma cells selected for resistance to apoptosis induced by the RAF inhibitor PLX4720. *Clin Cancer Res*. 2011; 15; 17(4):721-30.

Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, *et al*. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010; 468:968–72.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*. 2000; 1; 19(21):5720-8.

Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg*. 2011; 30(4):222-8.

Katanasaka Y, Ishii T, Asai T, Naitou H, Maeda N, Koizumi F, Miyagawa S, Ohashi N, Oku N. Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int J Cancer*. 2010; 1; 127(11):2685-98.



Kaufmann R, Spieth K, Lejeune F, et al. Temozolomide in combination with interferon-alfa versus temozolomide alone in patients with advanced metastatic melanoma: a randomized, phase iii, multicenter study from the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005; 23:1–7.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(8):573-84.

Keren H, Lev-Maor G & Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function *Nature Reviews Genetics*, 2010; 11, 345-355.

Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW, Chae HJ. Metformin regulates palmitate-induced apoptosis and ER stress response in HepG2 liver cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010; Jun; 32(2):251-7.

Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S. Role of the unfolded protein response in cell death. *Apoptosis*. 2006;11(1):5-13.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:239-67.

Korabiowska M, Betke H, Brinck U, Grohmann U, Hönig JF, Droese M. Loss of growth arrest DNA damage genes expression in oral melanomas. *In Vivo*. 1999; 13(6):483-5.

Korabiowska M, Betke H, Kellner S, Stachura J, Schauer A. Differential expression of growth arrest, DNA damage genes and tumour suppressor gene p53 in naevi and malignant melanomas. *Anticancer Res*. 1997 ; 17(5A):3697-700.

Korabiowska M, Brinck U, Betke H, Droese M, Berger H. Growth arrest DNA damage gene expression in naevi. *In Vivo*. 1999; 13(3):247-50.

Korabiowska M, Cordon-Cardo C, Betke H, Schlott T, Kotthaus M, Stachura J, Brinck U. GADD153 is an independent prognostic factor in melanoma: immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Histol Histopathol.* 2002; 17(3):805-11.

Kosloski MP, Miclea RD, Balu-Iyer SV. Role of glycosylation in conformational stability, activity, macromolecular interaction and immunogenicity of recombinant human factor VIII. *AAPS J.* 2009 Sep; 11(3):424-31.

Kosowski TR, Keys HR, Quan TK, Ruby SW. DExD/H-box Prp5 protein is in the spliceosome during most of the splicing cycle. *RNA.* 2009; 15(7):1345-62.

Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 2007; 14(2):230-9.

Kvam E & Tyrrell RM. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 1999; 113(2):209-13.

Lazova R, Klump V, Pawelek J. Autophagy in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol.* 2010; 37(2):256-68.

Lederkremer GZ. Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation. *Curr Opin Struct Biol.* 2009; 19(5):515-23.

Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(5):2432-7.

Li W, Yang Q, Mao Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 749–63.

Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 1125–36.

Li X, Zhang K, Li Z. Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. *J Hematol Oncol*. 2011; 23;4:8.

Lincoln DT, Ali Emadi EM, Tonissen KF, Clarke FM. The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res*. 2003; 23(3B):2425-33.

Ling YH, Li T, Perez-Soler R, Haigentz M Jr. Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009; 64(3):539-48.

Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med*. 2013; 19(11):1401-9.

Lityńska A, Przybyło M, Pocheć E, Hoja-Łukowicz D, Ciołczyk D, Laidler P, Gil D. Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. *Melanoma Res*. 2001; 11(3):205-12.

Liu ZM, Chen GG, Vlantis AC, Tse GM, Shum CK, van Hasselt CA. Calcium-mediated activation of PI3K and p53 leads to apoptosis in thyroid carcinoma cells. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(11):1428-36.

Llewellyn DH, Roderick HL, Rose S. KDEL receptor expression is not coordinately up-regulated with ER stress-induced reticuloplasm expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 7; 240(1):36-40.

Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol*. 2013; 31(3):290-7.

Lund LP, Timmins GS. Melanoma, long wavelength ultraviolet and sunscreens: controversies and potential resolutions. *Pharmacol Ther*. 2007; 114(2):198-207.

Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat*. 2004; 28(1-2):51-65.

Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(12):2277-93.

Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2003; 14;278(11):9100-6.

Maria DA, de Souza JG, Morais KL, Berra CM, Zampolli Hde C, Demasi M, Simons SM, de Freitas Saito R, Chammas R, Chudzinski-Tavassi AM. A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. *Invest New Drugs*. 2013; 31(3):493-505.

Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci*. 2002; 1;7:d765-83.

McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(4):1249-59.

McKibbin C, Mares A, Piacenti M, Williams H, Roboti P, Puumalainen M, Callan AC, Lesiak-Mieczkowska K, Linder S, Harant H, High S, Flitsch SL, Whitehead RC, Swanton E. Inhibition of protein translocation at the endoplasmic reticulum promotes activation of the unfolded protein response. *Biochem J*. 2012; 15; 442(3):639-48.

Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*. 2005; 7(8):766-72.

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, et al. Randomized phase iii study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2000;18:158-66.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006; 6; 355(1):51-65.

Mintz PJ, Kim J, Do KA, Wang X, Zinner RG, Cristofanilli M, Arap MA, Hong WK, Troncoso P, Logothetis CJ, Pasqualini R, Arap W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol.* 2003; 21(1):57-63.

Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Activation and cross-talk between Akt, NF-kappaB, and unfolded protein response signaling in 1-LN prostate cancer cells consequent to ligation of cell surface-associated GRP78. *J Biol Chem.* 2006; 12;281(19):13694-707.

Misra UK, Deedwania R, Pizzo SV. Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-dependent activation of LIMK. *J Biol Chem.* 2005; 15; 280(28):26278-86.

Mörck C, Olsen L, Kurth C, Persson A, Storm NJ, Svensson E, Jansson JO, Hellqvist M, Enejder A, Faergeman NJ, Pilon M. Statins inhibit protein lipidation and induce the unfolded protein response in the non-sterol producing nematode *Caenorhabditis legans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 27; 106(43):18285-90.

Nakagawa H, Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Toyoda Y, Koshiba S, Ishikawa T. Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS J.* 2009; 276(24):7237-52.

Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2011; 468:973–7.

Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010; 468:973–7.

Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J.* 2011; 1; 434(2):181-8.

Noda I, Fujieda S, Seki M, Tanaka N, Sunaga H, Ohtsubo T, Tsuzuki H, Fan GK, Saito H. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin enhances sensitivity to cisplatin in human head-and-neck carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1999; 18; 80(2):279-84.

O'Day CL, Dalbadie-McFarland G, Abelson J. The *Saccharomyces cerevisiae* Prp5 protein has RNA-dependent ATPase activity with specificity for U2 small nuclear RNA. *J Biol Chem*. 1996; 27;271(52):33261-7.

Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004; 11(4):381-9.

Papadakis ES, Finegan KG, Wang X, Robinson AC, Guo C, Kayahara M, Tournier C. The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial-induced apoptotic pathway. *FEBS Lett*. 2006; 20; 580(5):1320-6.

Paraiso KH, Fedorenko IV, Cantini LP, Munko AC, Hall M, Sondak VK, Messina JL, Flaherty KT, Smalley KS. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer*. 2010; 8; 102(12):1724-30.

Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat*. 2004;7(2):97-110.

Poulikakos PI, Persaud Y, Janakiraman M, Kong X, Ng C, Moriceau G, et al. RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E). *Nature* 2011; 480:387–90.

Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature*. 2010; 18;464(7287):427-30.

Przybyło M, Lityńska A. Glycans in melanoma screening. Part 1. The role of  $\beta$ 1,6-branched N-linked oligosaccharides in melanoma. *Biochem Soc Trans*. 2011; 39(1):370-3.

Putchu GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM Jr. JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron*. 2003; 19;38(6):899-914.

Quentin T, Steinmetz M, Poppe A, Thoms S. Metformin differentially activates ER stress signaling pathways without inducing apoptosis. *Dis Model Mech*. 2012 ;5(2):259-69.

Rass K, Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2008;624:162-78.

Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M D JW, Garbe C, Lebbe C, Baurain JF, Testori A, Grob JJ, Davidson N, Richards J, Maio M, Hauschild A, Miller WH Jr, Gascon P, Lotem M, Harmankaya K, Ibrahim R, Francis S, Chen TT, Humphrey R, Hoos A, Wolchok JD. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011; 30;364(26):2517-26.

Ruby SW, Chang TH, Abelson J. Four yeast spliceosomal proteins (PRP5, PRP9, PRP11, and PRP21) interact to promote U2 snRNP binding to pre-mRNA. *Genes Dev*. 1993; 7(10):1909-25.

Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32(10):469-76.

Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther*. 2002; 1(1):14-7.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*. 2007 ; 26(7):1749-60.

Selim MA, Burchette JL, Bowers EV, de Ridder GG, Mo L, Pizzo SV, Gonzalez-Gronow M. Changes in oligosaccharide chains of autoantibodies to GRP78 expressed during progression of malignant melanoma stimulate melanoma cell growth and survival. *Melanoma Res*. 2011; 21(4):323-34.

Shao W, Kim HS, Cao Y, Xu YZ, Query CC. A U1-U2 snRNP interaction network during intron definition. *Mol Cell Biol.* 2012; 32(2):470-8.

Shi H, Kong X, Ribas A, Lo RS. Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600E-BRAF inhibition. *Cancer Res* 2011; 71:5067-74.

Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, Ng C, Chodon T, Scolyer RA, Dahlman KB, Sosman JA, Kefford RF, Long GV, Nelson SF, Ribas A, Lo RS. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)BRAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun.* 2012; 6:3:724.

Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013; 77(4):729-35.

Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 2004; 5; 306(5698):990-5.

Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur J Pharmacol.* 2009; 25; 625(1-3): 220-33.

Song L, Ma L, Zhang X, Jiang Z, Liu H, Jiang C. Effect of tunicamycin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2012; 32(6):766-71.

Song XJ, Yang CY, Liu B, Wei Q, Korkor MT, Liu JY, Yang P. Atorvastatin inhibits myocardial cell apoptosis in a rat model with post-myocardial infarction heart failure by downregulating ER stress response. *Int J Med Sci.* 2011; 8(7):564-72.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69:217-45.



Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature* 2012;487:500–4.

Suh DH, Kim MK, Kim HS, Chung HH, Song YS. Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1271:20-32.

Shintani T and Klionsky DJ, 2004. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science*, 306(5698): 990-995.

Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol Sci.* 2013; 34(12):656-66.

Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, et al. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31:1767–74.

Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, Bremer R, Gillette S, Kong J, Haass NK, Sproesser K, Li L, Smalley KS, Fong D, Zhu YL, Marimuthu A, Nguyen H, Lam B, Liu J, Cheung I, Rice J, Suzuki Y, Luu C, Settachatgul C, Shellooe R, Cantwell J, Kim SH, Schlessinger J, Zhang KY, West BL, Powell B, Habets G, Zhang C, Ibrahim PN, Hirth P, Artis DR, Herlyn M, Bollag G. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 26;105(8):3041-6.

Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev.* 2012; 1;26(11):1131-55.

Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; 287: 664–666.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.

Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:944–957

Venables JP. Aberrant and alternative splicing in cancer. *Cancer Res.* 2004; 1;64(21):7647-54.

Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 2010;18:683–95.

Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Furukawa T, Nakagawa H, Ishikawa T. Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 31; 61(1):66-72.

Wang H, Iakova P, Wilde M, Welm A, Goode T, Roesler WJ, Timchenko NA. C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell.* 2001;8 (4):817-28.

Wang Q, Li L, Ye Y. Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *J Biol Chem.* 2008; 21;283(12):7445-54.

Wang Q, Mora-Jensen H, Weniger MA, Perez-Galan P, Wolford C, Hai T, Ron D, Chen W, Trenkle W, Wiestner A, Ye Y. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 ; 17;106(7):2200-5.

Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer Res.* 2008; 1;68(9):3077-80.

Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ. The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.* 1999; 7(4-6):293-300.

Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, et al. Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012; 487:505–9.

Wittgen HG, van Kempen LC. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma Res.* 2007; 17(6): 400-9.

Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2010; 285(14):10850-61.

Xi H, Barredo JC, Merchan JR, Lampidis TJ. Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK $\beta$  leading to autophagy. *Biochem Pharmacol.* 2013; 15; 85(10):1463-77.

Xu YX, Liu L, Caffaro CE, Hirschberg CB. Inhibition of Golgi apparatus glycosylation causes endoplasmic reticulum stress and decreased protein synthesis. *J Biol Chem.* 2010 ; 6;285(32):24600-8.

Xu YZ, Newnham CM, Kameoka S, Huang T, Konarska MM, Query CC. Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. *EMBO J.* 2004; 28;23(2):376-85

Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer:therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011; 10(9):1533-41.

Ye Y. The role of the ubiquitin-proteasome system in ER quality control. *Essays Biochem.*2005; 41:99–112.

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001; 276:13935–13940.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001; 28; 107(7):881-91.

Yu L, Strandberg L, Lenardo MJ. The selectivity of autophagy and its role in cell death and survival. *Autophagy*. 2008; 4(5):567-73.

Zaidi MR, Day CP, Merlino G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol*. 2008; 128(10):2381-91.

Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem*. 2010 ; 14;285(20):15065-75.

Zhang Y, Tseng CC, Tsai YL, Fu X, Schiff R, Lee AS. Cancer Cells Resistant to Therapy Promote Cell Surface Relocalization of GRP78 Which Complexes with PI3K and Enhances PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Production. *PLoS One*. 2013; 11; 8(11):e80071.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001; 108(8):1167-74.

***ANEXO***

---

## 7. ANEXO

### Aprovação do Comitê de Ética



## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 16/12/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1228/09**, intitulado: "**POTENCIAL ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA MELANOMAS ATRAVÉS DA SENSIBILIZAÇÃO À MORTE INDUZIDA POR CISPLATINA PELA INDUÇÃO DE ESTRESSE DE RE. ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE SENSIBILIZAÇÃO E DA UTILIZAÇÃO DE PEPTÍDEO INDUTOR DE ESTRESSE DE RE**", apresentado pelo Departamento de **RADIOLOGIA e RADIOTERAPIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. ROGER CHAMMAS**

Pesquisador (a) Executante: **RENATA DE FREITAS SAITO**

· CAPPesq, 17 de Dezembro de 2009

**PROF. DR. EDUARDO MASSAD**

Presidente

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br) / [secretariacappesq2@hcnet.usp.br](mailto:secretariacappesq2@hcnet.usp.br)  
matc

***APÊNDICE***

---

## **APÊNDICE**

### **DDX46 in melanoma maintenance**

**Project developed at CNIO (Madrid/Spain),  
Molecular Pathology Programme, Melanoma Group.  
Supervision of Soengas MS and Osterloh L**

#### **Introduction/Rationale**

Malignant melanoma is the most aggressive form of skin cancer and despite of the low incidence, melanoma shows a high mortality associated with the absence of an effective therapy for the metastatic stage of this disease. Since the early stages of melanoma can be easily treated by surgical excision, the early detection is vitally important and raises a large interest in studying very early stages of melanoma initiation and the difference between these early stages and metastatic melanoma.

Melanoma initiates with mutations in melanocytes, the skin cells responsible for melanin production and two different lesions can arise from melanocytes: nevi (benign lesions) and melanoma (malignant lesions). Human nevi are benign lesions, also known as moles, that have pro-oncogenic mutations in the MAPK-pathway (most frequently in BRAF, NRAS and HRAS) but these cells are under control by senescence induction leaded by these mutations (also called oncogene induced senescence; OIS). The induction of senescence is a protective mechanism which prevents the further progression to melanoma, but some melanocytes are able to bypass this senescence program and become malignant. How this senescence programme controls the benign stage or malignant progression it is poorly understood.

Soengas's laboratory at the Spanish National Cancer Research Center (CNIO) is particularly interested in different senescence mechanisms induced by different oncogenes. In order to identify new mechanisms of oncogene induced senescence (apart



from p53 and p16 induced program) Soenga's group did a cDNA microarray of melanocytes expressing pro-oncogenic mutations (HRASG12V, NRASG12V, NRASQ61R and BRAFV600E), frequently associated with certain types of nevi. A great number of gene expression changes were found and with different pattern among the different pro-oncogenic mutants. The great number of changes raised the hypothesis that a more global regulator/event could explain the large number of gene expression changes. A possible candidate for this could be the alternative splicing (AS) described as the generation of proteins isoforms with different structural and functional properties from a single primary transcript (pre-RNA).

In humans at least 70% of the genes encoded for transcripts undergo alternative splicing. Many cancer-related genes are regulated by alternative splicing and a common signature of cancer cells is a general loss of splicing fidelity (GHINGNA C., VALACCA C. AND BIAMONTI G. 2008). It is still controversy if these changes in splicing profiles are simply a "noise" occurring in cancer cells or have a direct role in tumorigenesis. Although, it's well known that altered splicing profiles of critical genes may impact on all the major aspects of cancer cell biology, such as inactivation of onco-suppressor or gain of function of proteins implicated in cancer susceptibility and tumor progression. The AS can driver some adaptive advantages to tumor cells, one example is the usage of alternative 5' splice sites within exon 2 which determines the production of two protein isoforms: a long antiapoptotic form (Bcl-XL) and a short apoptosis-promoting protein (Bcl-XS) (AKGUL, C., MOULDING, D.A. AND EDWARDS, S.W., 2004). Thus, a shift in the splicing pattern of these transcripts can determine the proliferative activity of cancer cells and their response to proapoptotic therapies.

With this ample evidence that AS can be related with cancer, recent technical advances are allowing to better understand the features of the AS in tumoral context.

One of the high-throughput technologies that can analyze AS is the splicing-sensitive arrays. Collaboration with Juan Valcárcel (Center for Genomic Regulation - CRG, Barcelona) group allowed the evaluation of 2000 events. Juan Valcárcel group have generated and validated a custom-based splicing sensitive microarray platform that provides a deep coverage and is specifically designed to assess constitutive and alternatively spliced exons in 500 cancer related genes.

The splicing-sensitive array comparing mutated and normal melanocytes showed that multiple RNA binding and splicing modulators were differentially expressed and/or undergo alternative splicing in melanocytes carrying pro-oncogenic mutations compared to normal melanocytes (Ostherloh L. unpublished data). Some of these changes can be found in all conditions while others are specific for a certain pro-oncogenic mutation. With this result one project was elaborated to validate the alternative splicing in the senescent melanocytes.

Another splicing-sensitive array comparing melanoma and melanocytes showed that multiple RNA binding and splicing modulators were also differentially expressed and/or undergo alternative splicing in melanomas compared to normal melanocytes (Ostherloh L. unpublished data). These data originated the project to evaluate the splicing genes alterations in melanoma maintenance and progression. Besides the splicing-sensitive array data, there is a lot of information in the literature regarding the large number of gene expression differences between melanoma and melanocytes. All information together contributes to the same rationale of the importance of a global process implicated in this large number of alterations playing an important role in melanoma progression. Thus, this last array raised a project to compare melanocytes and melanoma cells regarding some candidates founded in the splicing-sensitive array

in an attempt to find one candidate that could be one of the main driver of melanoma progression and maintenance.

A couple of genes were differently expressed in melanomas compared to melanocytes and some of them were elected as candidates for further analyses. One of these candidates was DDX46B or Prp5, which was overexpressed in melanomas compared to melanocytes. The relevant difference of DDX46 gene expression between melanoma and melanocytes turned the attention in this gene as an interesting candidate for further studies to elucidate your importance in tumor progression or maintainance.

DDX46 protein was predicted by the DNA sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PRP5 gene and this protein contains a domain that beared a striking resemblance to a family of RNA helicases characterized by the conserved amino acid sequence Asp-Glu-Ala-Asp (D-EA-D) (DALBADIE-MCFARLAND G & ABELSON J. 1990). DEAD-box proteins represent the largest family of helicases and they participate in the regulation of essentially all the processes involving RNA in a cell, from transcription to degradation (O. CORDIN *et al.*, 2006).

DDX46 is implicated in an early event of the splicing process. Splicing is a conserved mechanism controlled by the spliceosome — a complex composed of many proteins and five small nuclear RNAs (U1, U2, U4, U5 and U6) that assemble with proteins to form small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs). Introns maintain several conserved motifs, most prominently dinucleotides in their 5' and 3' ends (splice-donor and splice-acceptor site, respectively) and an adenosine (A) in the branch point — the initial sequence recognized in intron cleavage. These motifs are recognized by components of the splicing machinery (for example, U1 snRNP binds to the 5' splice site (SS) and U2 snRNP binds to the branch point adenosine). Recognition leads to the recruitment of other components of the spliceosome (U4/6 and U5 snRNPs), followed

by rearrangement in the base pairing with RNA and excision of the intron. The mechanism by which exons are differentiated from introns is obscure, particularly in cases in which exon splicing involves exons that are skipped (cassette exons), mutually exclusive (alternatively spliced) or contain more than one splice site (5' or 3'). Alternative splicing regulation is mediated by interactions of the splicing machinery with further protein factors that enhance or repress the spliceosome. (H KEREN, G LEV-MAOR & G AST, 2010).

The first DDX46 function was described in the work of RUBY SW, CHANG TH AND ABELSON J. (1993), they analyzed the functions of several pre-mRNA processing (PRP) proteins in yeast spliceosome formation and they showed that DDX46 was required for the U2 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP), to bind to the prespliceosome during spliceosome assembly *in vitro*. Since the binding of the U2 snRNP to pre-mRNA is an early and important step in spliceosome assembly, they demonstrated that DDX46 plays an important role in pre-mRNA splicing. With DDX46 purified from *Escherichia coli*, was determined that this protein mediates an ATP dependent conformational change in the intact U2 snRNP necessary for the formation of the pre-spliceosome (O'DAY CL, DALBADIE-MCFARLAND G, ABELSON J, 1996) (ABU DAYYEH BK, QUAN TK, CASTRO M, RUBY SW, 2002).

What it is clear until now about the function of DDX46 is that it is an essential RNA-dependent ATPase required for prespliceosome formation during nuclear pre-mRNA splicing and makes the communication between U1 and U2 snRNPs at the time of pre-spliceosome formation (XU YZ, NEWNHAM CM, KAMEOKA S, HUANG T, KONARSKA MM, QUERY CC., 2004) (KOSOWSKI TR, KEYS HR, QUAN TK, RUBY SW. 2009). The assembly of prespliceosomes is responsible for selection of intron sites for splicing. It is known that U1 and U2 snRNPs recognize 5' splice sites

and branch sites, respectively; although there is information regarding the composition of these complexes, little is known about interaction among the components or between the two snRNPs. As described above, DDX46 is one of the proteins in the network of interactions linking U1 and U2 snRNPs, important for branch site recognition and fidelity during the first steps of the reaction (SHAO W, KIM HS, CAO Y, XU YZ AND QUERY CC. 2012). All the information about DDX46 mentioned above was obtained in yeast studies, so the *in vivo* function of DDX46 remains to be fully elucidated in metazoans. Recently, a new model was suggested in which zebrafish DDX46 is required for the development of the digestive organs and brain, possibly through the control of pre-mRNA splicing. (KIKUCHI Y. *et al.* 2012).

Regarding the participation on splicing machinery, there is little information about DDX46 in the literature and until now nothing is known about DDX46 in mammals or in cancer cells. This lack of information is a great opportunity to study DDX46 and to establish new functions of this protein, especially in cancer context. Thus, the aim of this project was to evaluate the importance of DDX46 in melanoma maintenance and progression.

## **Experimental outline**

### *1) DDX46 expression in melanoma vs melanocyte cells*

Previously data from Soengas M. group have already shown that melanoma cells have increased DDX46 protein levels compared to melanocyte cells.

### *2) Functional relevance of DDX46 in melanoma vs melanocyte cells*

Melanoma and melanocyte cells were infected with lentiviral constructs to deplete or to overexpress the DDX46 by RNA interference (shRNA mediated depletion). Using this approach, we did some functional analyses:

2.1) Cell proliferation

2.2) Cell cycle

2.3) Cell death

2.4) Migration

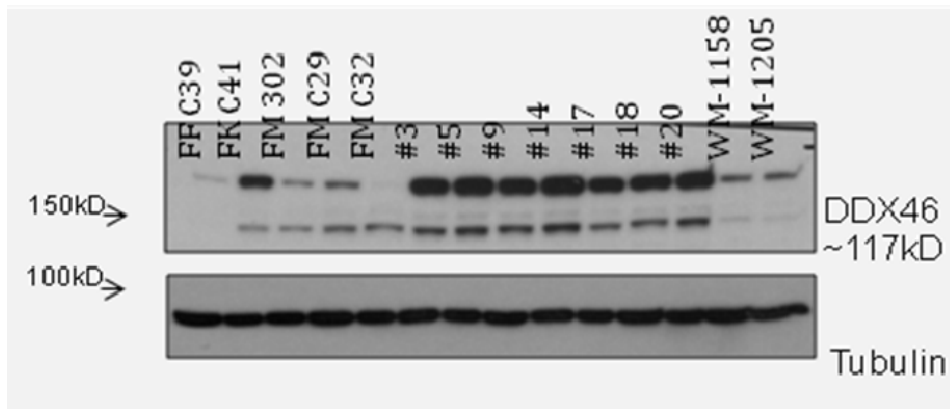
2.5) Cytoskeleton and adhesion evaluation (phalloidin and paxillin)

## **Results and Discussion**

### **1. Different expression of DDX46 in melanoma vs. melanocyte.**

Previously results with a splicing-sensitive array showed that the global gene expression of DDX46 was increased in melanomas compared with melanocytes (Ostherloh L. unpublished data). This result was already validated by western blot analyses showing increased DDX46 protein levels in melanomas. The Figure 01 shows that the protein levels of DDX46 are increased in the majority of melanoma cell lines compared with the protein levels observed in melanocytes, fibroblast and keratinocyte cells (Ostherloh L. unpublished data). This difference of expression between melanoma

and melanocytes became DDX46 an interesting candidate for studying the importance of this protein in melanoma maintenance and progression.



**Figure 01 – DDX46 protein levels are increased in melanoma cells compared with melanocytes, fibroblast and keratinocytes cells.** Western blot analyses for DDX46 protein detection and tubulin as loading control. Legend: FFC39 (Fibroblast); FK C41 (Keratinocyte); FMC29 and FMC32 (Melanocytes); #3,#5,#9,#14,#17,#18,#20,WM-1158 and WM-1205 (melanoma cell lines).

## 2. Screening of DDX46B shRNA in different melanoma cell lines.

To start evaluating the importance of the DDX46 in melanoma cells, we knocked down (k.d.) this protein in some melanoma cell lines. We screened five DDX46 shRNAs (sh1-5) (NM\_014829 Sigma MISSION®) in different melanoma cells lines (SK-Mel-5(#2), SK-Mel-19(#3), SK-Mel-28(#4), SK-Mel-29(#5), SK-Mel-103(#9), SK-Mel-147(#10) and UACC-62(#17)). Melanoma cells were infected with the DDX46 shRNA lentivirus for 5 hours and after puromycin selection the cells were maintained for the functional experiments. The cells started to show changes in the phenotype approximately four days after the infection.

In Figure 02(a) we can see that DDX46 k.d., six days after infection, resulted in morphology alterations in all cell lines with all shRNAs, but in some of DDX46 shRNAs (sh3 and sh5) the phenotype of melanoma cells were more altered. In the majority of the cell lines, the cells get more elongated with the DDX46 k.d.. For

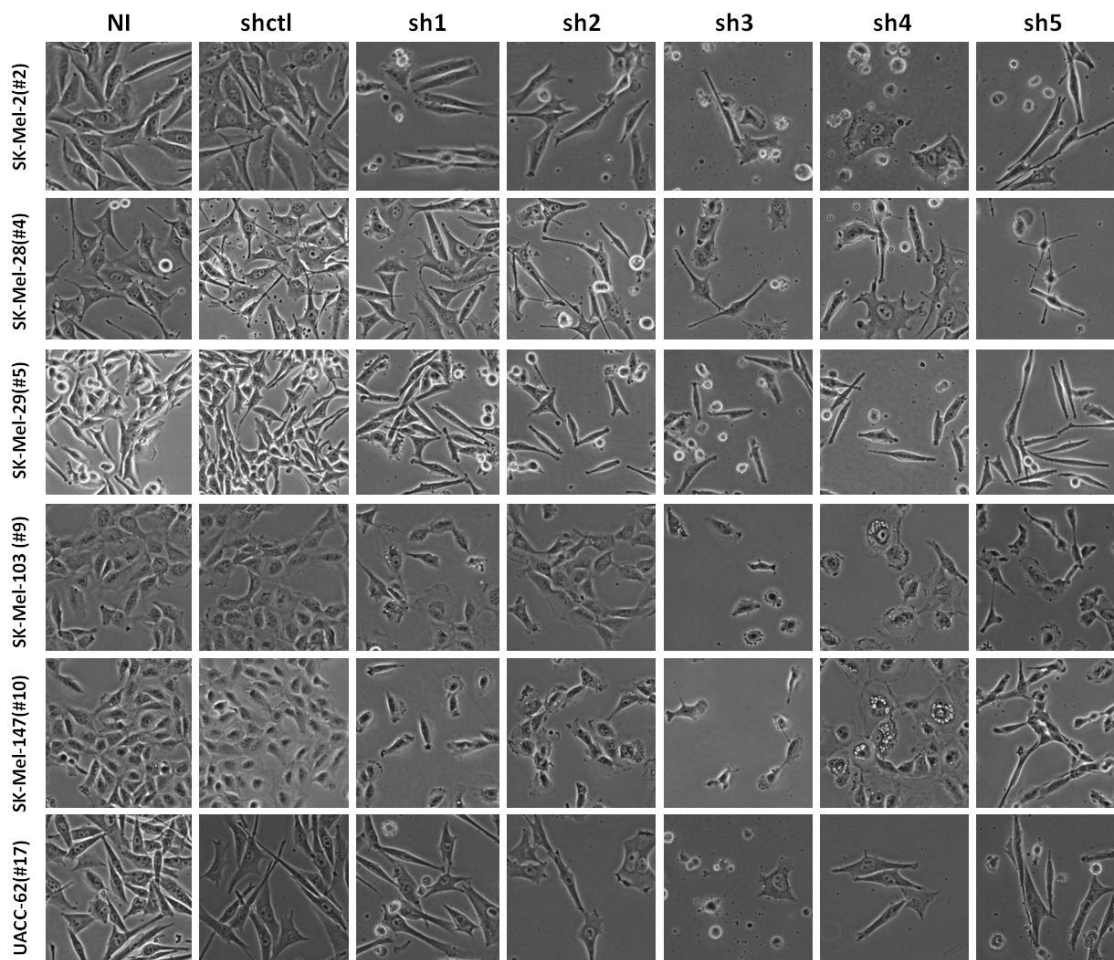
example, the cell line SK-Mel-28 (#4) when infected with sh5 acquires an elongated morphology that reminds the morphology of melanocytes. In contrast, SKMel-103(#9) and SK-Mel-147(#10) cell lines changed their morphology with an expanded cytoplasm and are more flattened with lot of vesicles through the cytoplasm. We also saw debris or vesicles floating in all the cell lines with all the different DDX46 shRNAs, but in some situations more than in others.

In addition to the morphology changes, we could see that the efficiency of the DDX46 protein depletion, verified with two different antibodies (Sigma Prestige and Novus), was different between the shRNAs (Figure 02(b)). Among all shRNAs, sh3 showed the best efficiency of DDX46 protein depletion in all cell lines, and sh5 in spite of not having such good efficiency of knocking down resulted in a strong phenotype alteration in all cell lines. Thus, we selected the DDX46 shRNAs 3 and 5 to do the functional analyses.

The Figure 2(c) corroborates the DDX46 k.d efficiency of sh3 and sh5 with immunofluorescence analyses using three different antibodies to detect DDX46 (Sigma Prestige, Sigma and Novus). With all the three different antibodies we can see that in these two melanoma cell lines (SK-Mel-103 and UACC-62) the efficiency of sh3 k.d. is superior to sh5, and the same result was obtained with western blot analyses.

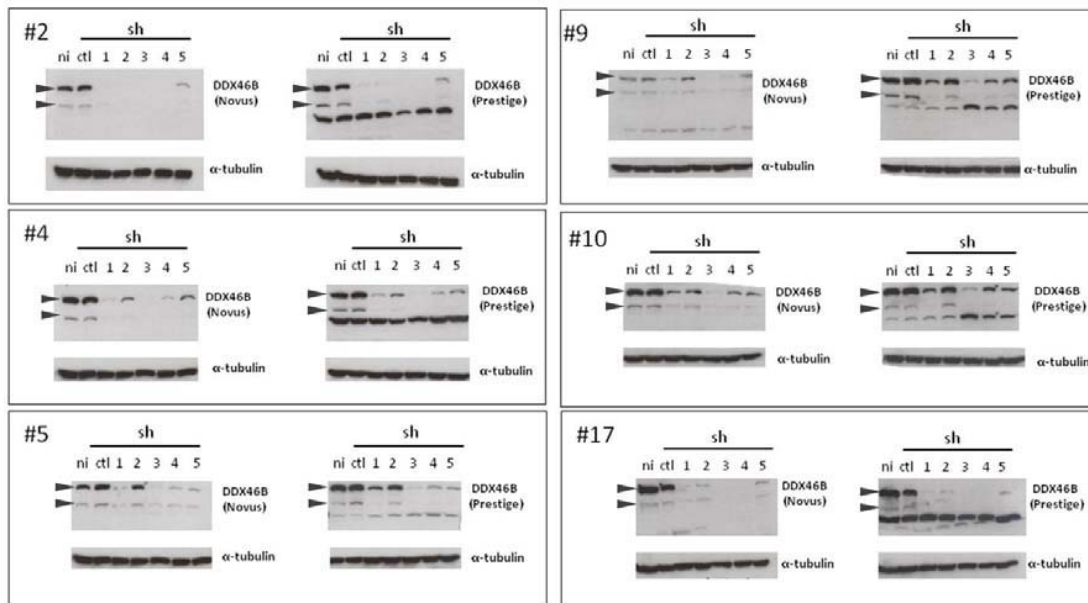


(a)



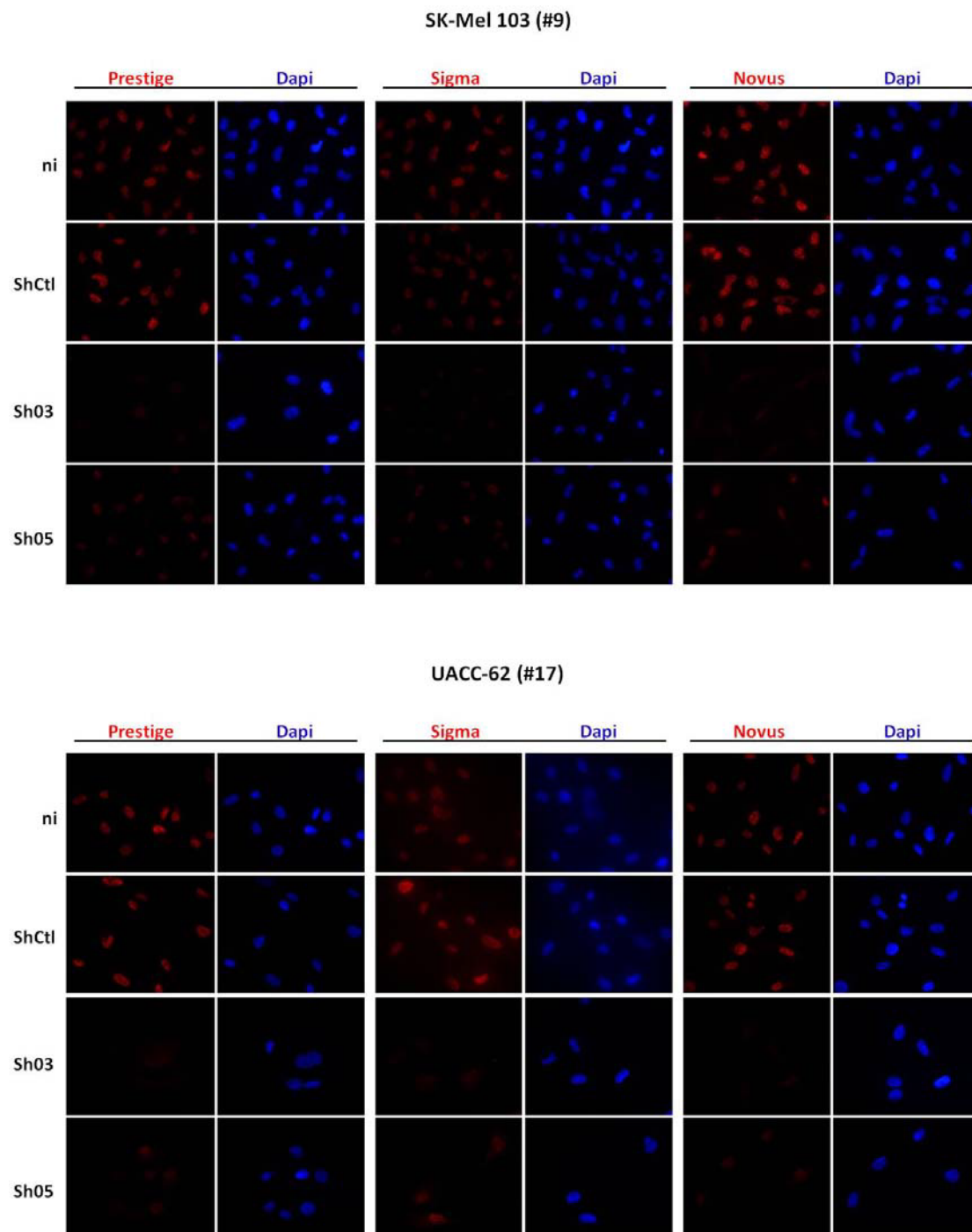
**Figure 02(a) – The DDX46 depletion result in melanoma cells morphology alterations.** Legend: ni (non-infected), ctl (shRNA scramble) and sh1-5 (DDX46 shRNA 1-5).

(b)



**Figure02 (b) – Efficiency of the DDX46 shRNAs evaluated by western blot analyses of DDX46 protein levels detected by two different antibodies (Sigma Prestige and Novus) in different melanoma cell lines.** Legend: ni (non-infected), ctl (shRNA scramble) and sh1-5 (DDX46 shRNA 1-5).

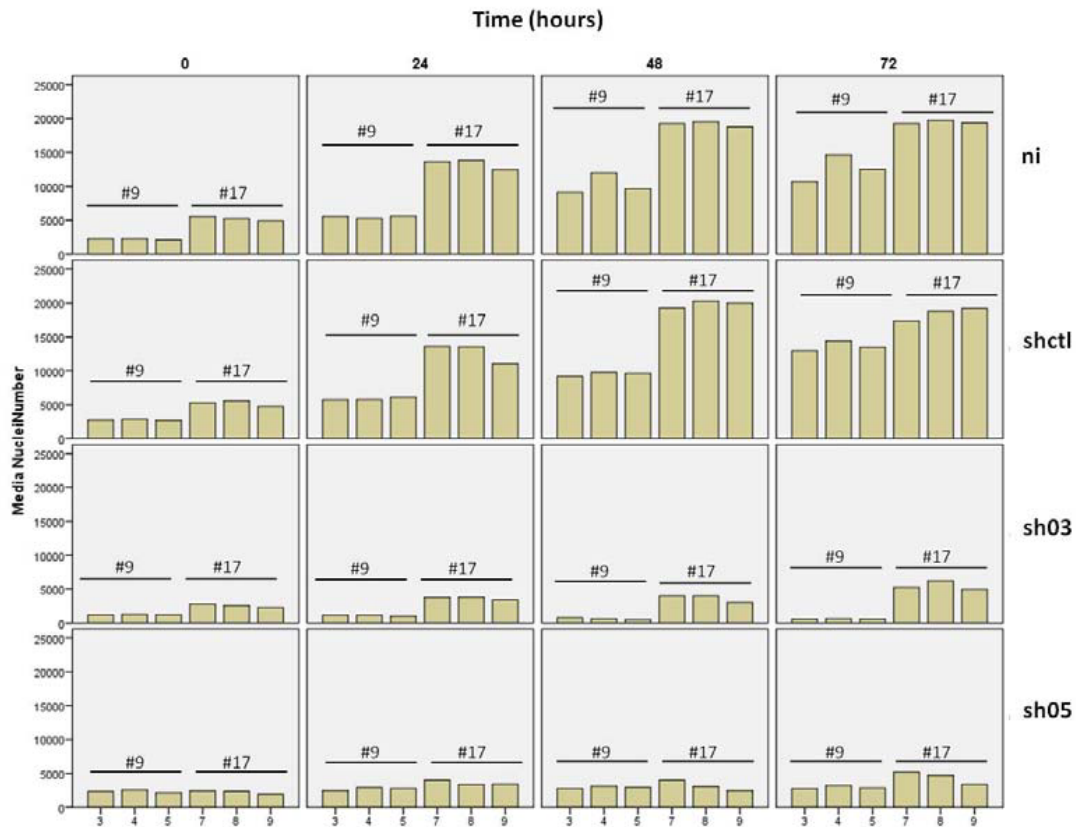
(c)



**Figure02(c) – Efficiency of DDX46 shRNAs evaluated by imunofluorescence with three different antibodies to detect DDX46 (Sigma Prestige, Sigma and Novus) in two melanoma cell lines (SK-Mel-103 and UACC-62). Legend: ni (non-infected), shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).**

### **3 – DDX46 is important for melanoma cell proliferation and cell viability.**

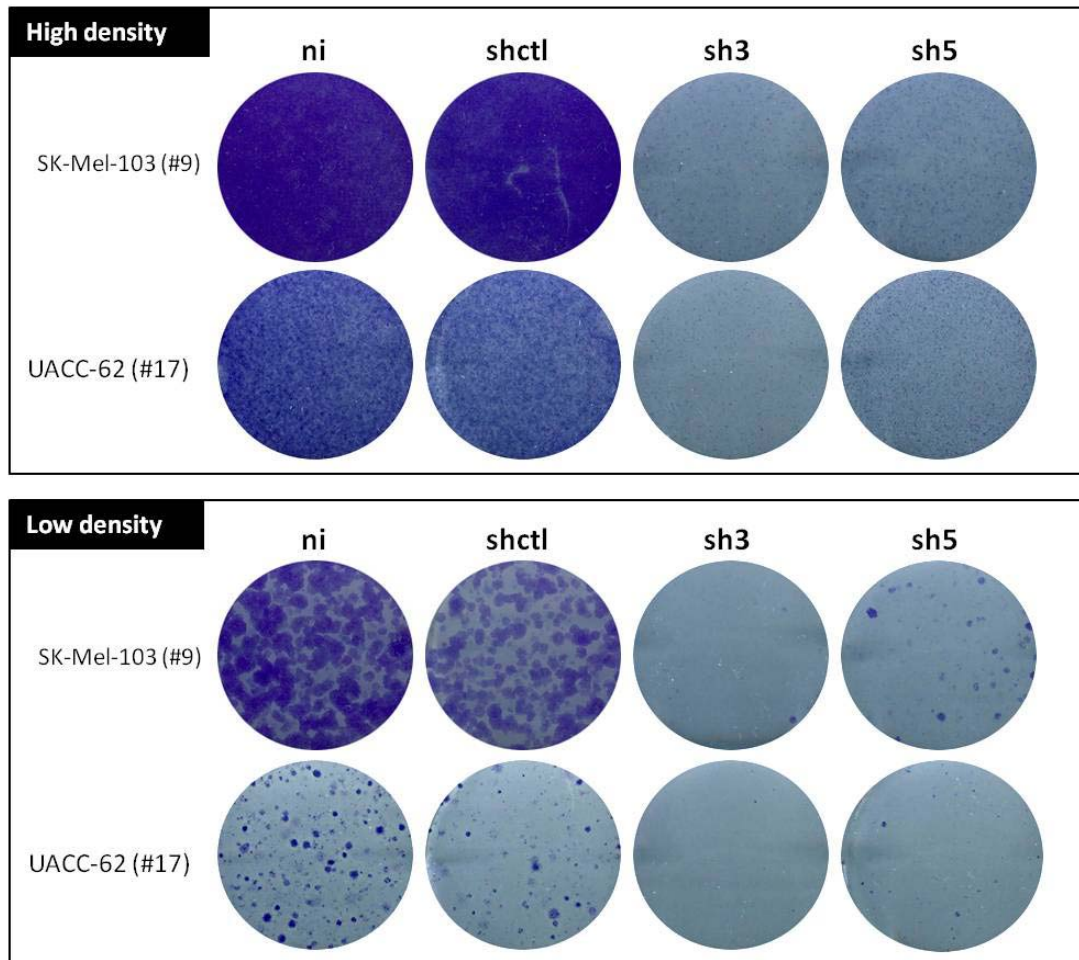
In Figure 02(a) we can see a clear reduction in the cell number with all DDX46 shRNA (1-5). This result could be related with an induction of cell death, reduction of cell proliferation or impairment in cell adhesion in response to DDX46 depletion. To verify which one of these cell process was related with the biologic response to DDX46 depletion, we first quantified the number of cells in the controls (non infected and shRNActl), sh3 and sh5 by counting the Dapi stained nucleus with Opera® High Content Screening System (PerkinElmer's). Dapi counting showed that in both cell lines, SK-Mel-103 and UACC-17, in the controls NI and shctl we can see an increase in the number of nuclei counted along the time-points (0, 24 , 48 and 72 hours), meaning that these cells are proliferating. But, when we look the Dapi counting in the DDX46 sh3 and sh5, in both cell lines, we can see that we don't have an increase in the number of nuclei throughout the time-points, actually the nuclei's number remains almost the same, meaning that these cells are not proliferating (Figure 03). With this result we can observe that DDX46 k.d. result in a clear decrease in cell proliferation.



**Figure03 – DDX46 k.d. by sh3 and sh5 result in a decrease of cell number of melanoma cell lines SK-Mel-103 (#9) and UACC-62 (#17).** Quantification of Dapi stained nuclei was performed by Opera machine counting. Legend: ni (non-infected), shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).

To continue verifying if DDX46 was crucial for melanoma cell proliferation, we plated the cells in high density ( $5 \times 10^4$  cells per well) and left the cells to proliferate until the control got a confluence of 90% (almost 72 hours), after this we stained the cells with crystal violet. As illustrated in Figure 04, DDX46 k.d. resulted in a decrease of cell proliferation compared with the controls in the cell lines SK-Mel-103 and UACC-62. With the same cell lines we also did a low density ( $1 \times 10^3$  cells per well) clonogenic assay and in this assay the cells were left to grow and form colonies for approximately two weeks. The clonogenic assay showed to us that in DDX46 shRNA 3 and 5 we can see less colonies formed compared with the controls (ni and shctl) (Figure 04). These

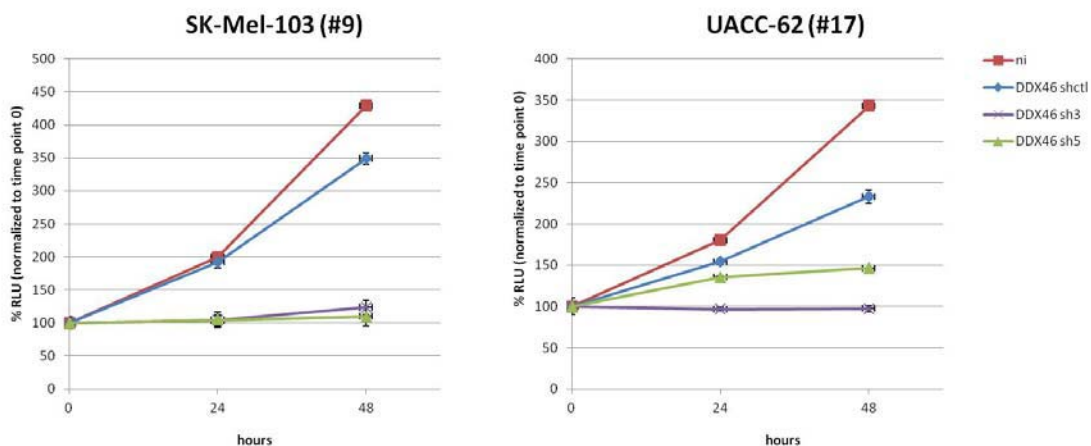
experiments suggest that DDX46 expression is important for melanoma cell proliferation in a short and in a long term.



**Figura04 – DDX46 interfere in melanoma cell proliferation in a short or long term.** Legend: ni (non-infected), shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).

In addition to a decrease in cell proliferation we also evaluated if DDX46 depletion could also be related with a reduction in cell viability. To verify the viability of the cells infected with shRNA DDX46 we used the CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) which is a method to determine the number of viable cells in culture based on quantification of ATP, which signals the presence of metabolically active cells. A homogeneous “add-mix-measure” format, provided in the CellTiter-

GLO®, results in cell lysis and generation of a luminescent signal proportional to the amount of ATP. The principle of this measure is based on the enzyme luciferase which catalyzes the oxidation of your substrate, luciferin in an ATP dependent way and this chemical reaction results in light emission. The light is captured by a luminometer and plotted as Relative light units (RLU), meaning that the more RLU measurement the more ATP is present in the sample, indicating increased cell viability. The %RLU of in different time-points (24 and 48 hours) was normalized by the %RLU obtained with the 0 hours time-point. In the Figure 05 we can see that DDX46 k.d. reduces melanoma cells SK-Mel-103 and UACC-62 viability because we can see a clear decrease in the ATP content (%RLU) of sh3 and sh5 compared with the controls (ni and shctl). The DDX46 k.d. results not only in a decrease of cell proliferation but also in a decrease of cell viability.

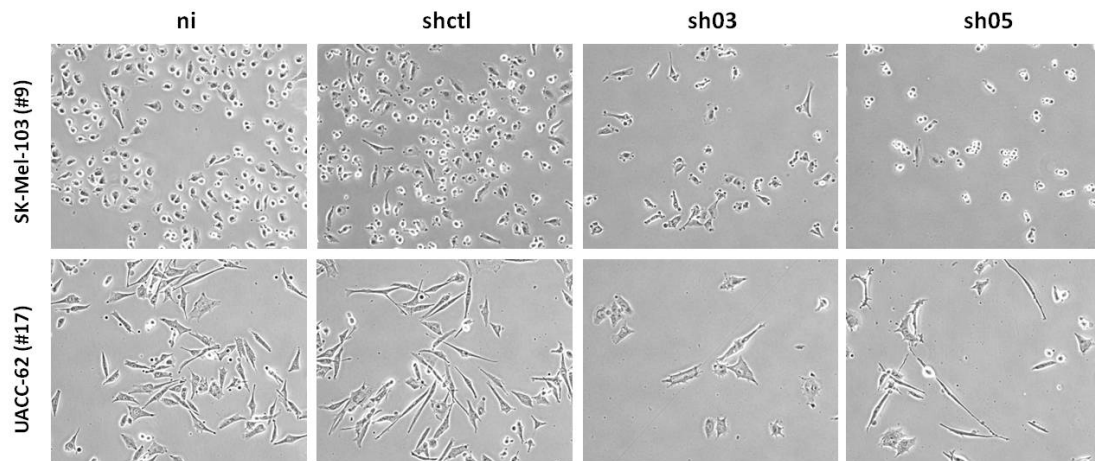


**Figure 05 –Cell Viability of melanoma cells reduction with DDX46 k.d. evaluated by CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay.** Legend: ni (non-infected), shctl (shRNA scramble), sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5), Relative light units (RLU).

#### 4- DDX46 is important to the cell cycle control in melanoma cells. The DDX46 k.d. results in a G0G1 cell cycle arrest.

We observed that the depletion of DDX46 results in a decrease of melanoma cell viability and we were interested in evaluate if this decrease in cell viability could be due an induction of cell death.

Regarding the morphologic alterations, at the beginning, we considered that the DDX46 k.d. resulted in probably two different phenotypes, as shown in Figure 02(a), one with more elongated shape and another rounded but still attached. In an attempt to see if both or one of these phenotypes could be cells in cell death process, we stained the cells still attached with trypan blue to verify the incorporation of this vital dye. But, the absence of trypan blue staining suggested that despite of the severe morphology alteration, these cells were not dying.



**Figure 06 – Melanoma cells with altered morphology in response to DDX46 shRNA 3 and 5, did not incorporated trypan blue.** Legend: ni (non-infected), shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).



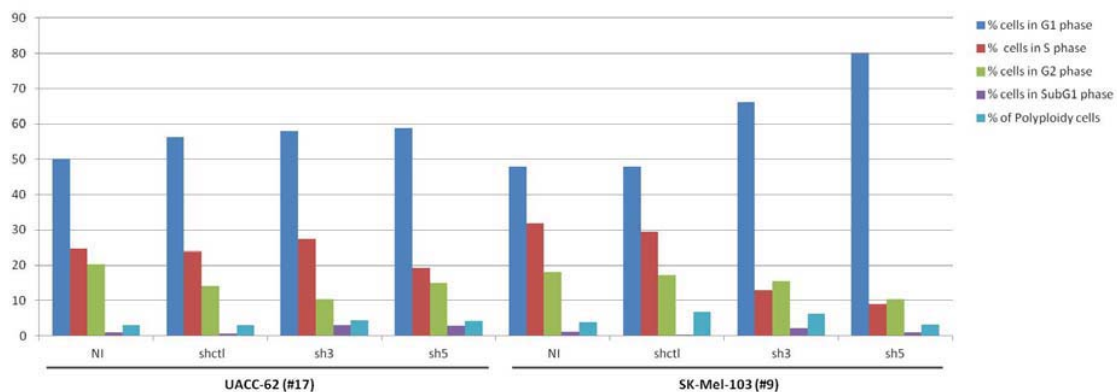
The trypan blue result suggested that the cell death could be not the main process involved in the DDX46 depletion. However, the absence of a positive control to assure that the trypan blue was in fact working was an important issue in this experiment. Thus, to properly evaluate cell death we did a FACs analyses with propidium iodide (PI) intercalation and we could see in Figure 07(a) a very slightly increase in the SubG1% in both cell lines. Corroborating with previously trypan blue assay that the induction of cell death seems not to play a main role in the phenotype of the cells depleted of DDX46. We need to consider that the time-point evaluated was when the cells started to show morphologic alteration, but we need to consider that these cells in a long term will crash and die, and we were interested in verify how these cells behavior in response to the k.d. of DDX46 in attempt to figure out the main driver of the ultimate induced cell death.

In the same Figure 07(a) we can see, especially in cell line SK-Mel-103 that there is a decrease in the % of cells in S phase and at the same time an accumulation of cells in G1 phase. This cell cycle arrest was better evaluated with the cell cycle synchronization before Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation. We synchronized the cells with thymidine before the BrdU reaction. The excess of thymidine causes the inhibition of DNA synthesis due a negative feedback of nucleotide synthesis caused by an imbalance of the nucleotide pool, resulting in a G0G1-phase arrested cell population. The time 0h represents the sample right after the 17 hours of thymidine synchronization, when the cells were arrested in G0G1-phase. The other time-points 4h and 8h are respectively 4 and 8 hours after releasing the cells of the thymidine blocking and allowing them to cycle. With this assay we could see that the controls (ni and shctl) when release of the thymidine blocking were able to start cycling, so we can see that in the time-point 4 hours the cells are no longer arrested in G0G1 and are accumulated in S

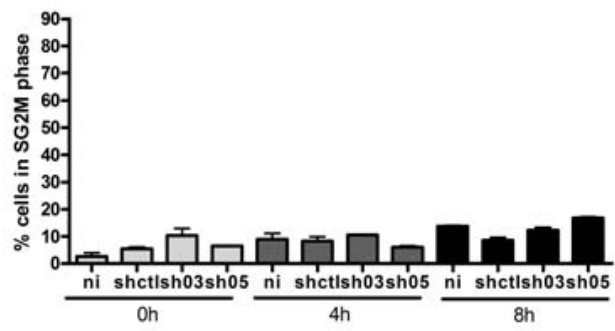
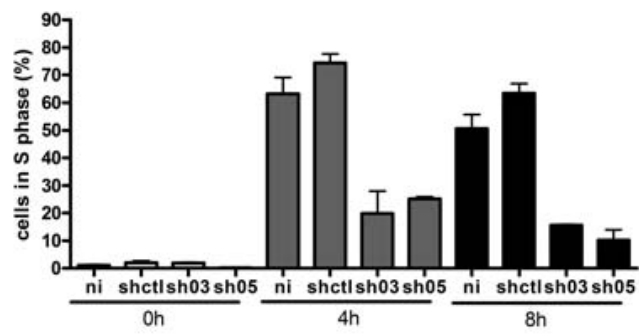
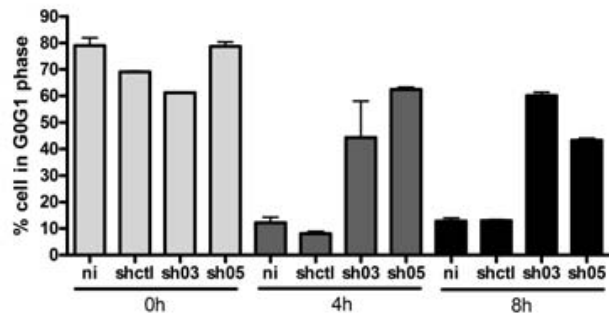
phase. But the same did not happened with sh3 and sh5, in this case the cells remained accumulated in G0G1 phase in the time-points of 4 and also 8 hours. The synchronization assay showed to us a clear accumulation of cells in G0G1 phase in response to the DDX46 k.d. (Figure 07(b)). Thus, in spite of not having a significant cell death, we observed an important cell cycle arrest in G0G1 phase.

We also evaluated the protein expression of cyclin B1, a key molecule for G2-M transition during the cell cycle. A large amount of cyclin B1 is present in the cell just prior to mitosis and it is degraded at the end of mitosis, accumulating again during the next cell cycle. Figure 07(c) illustrated a decrease in Cyclin B1 protein levels in both shRNA 3 and 5 in the melanoma cell lines SK-Mel-103 and UACC-62. The decrease in this cyclin comes together with the Brdu result with the cell cycle arrest in G0G1 phase in response to DDX46 depletion.

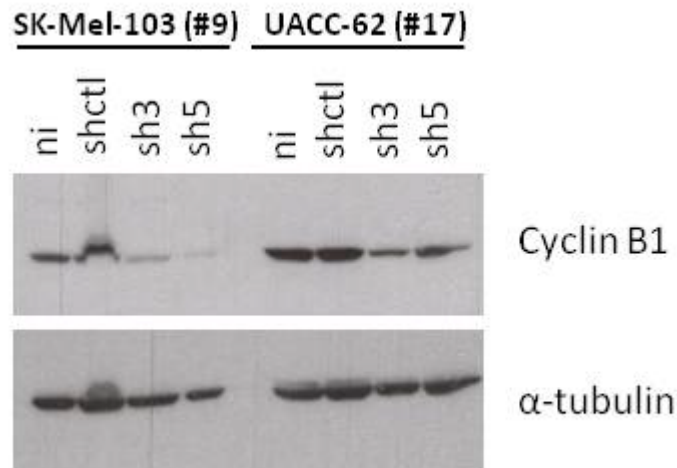
(a)



(b)



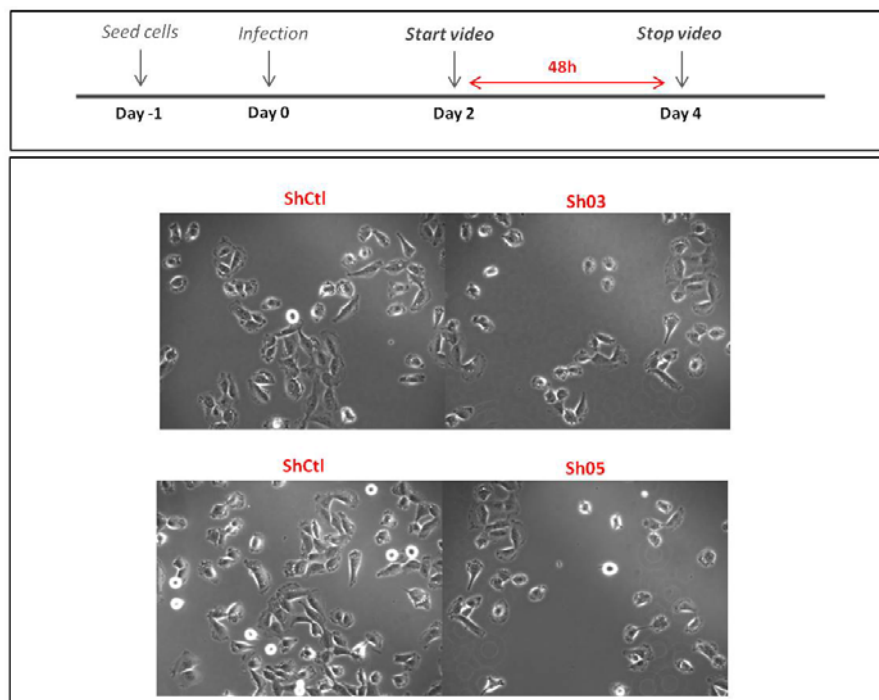
(c)



**Figure 07 – The k.d. of DDX46 did not induce cell death but result in a cell cycle arrest in G0G1 phase with the decrease in a key protein for G2-M transition, cyclin B1.** Flow cytometry analyses (a) PI intercalation and (b) BrdU staining after cell cycle synchronization with thymidine, for cell death and cell cycle quantification. (c) Western blot analyses for the Cyclin B1 detection. Legend: ni (non-infected), shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).

We observed that DDX46 k.d. showed a decrease in cell proliferation and viability, without an important cell death induction in an early moment after the infection. It is important to note that at the beginning we considered that DDX46 k.d. cells were presenting two different phenotypes, one more elongated and another one more rounded but still attached. Thus, we did videos, with the cell line SK-Mel-103 (#9) to follow how these cells get these different phenotypes observed in the DDX46 depletion. We followed the cells for 48 hours starting with two days after infection (Day2), because at this day we started to see the morphologic alterations in the DDX46 k.d. cells. The video 1 (supplementary video01 and 02) shows that the two different phenotypes that we saw at the beginning, one more elongated and another of rounded cells but still attached, are in fact happening in the same cell. The video allowed us to verify that DDX46 k.d. cells have successive morphology changes, between more

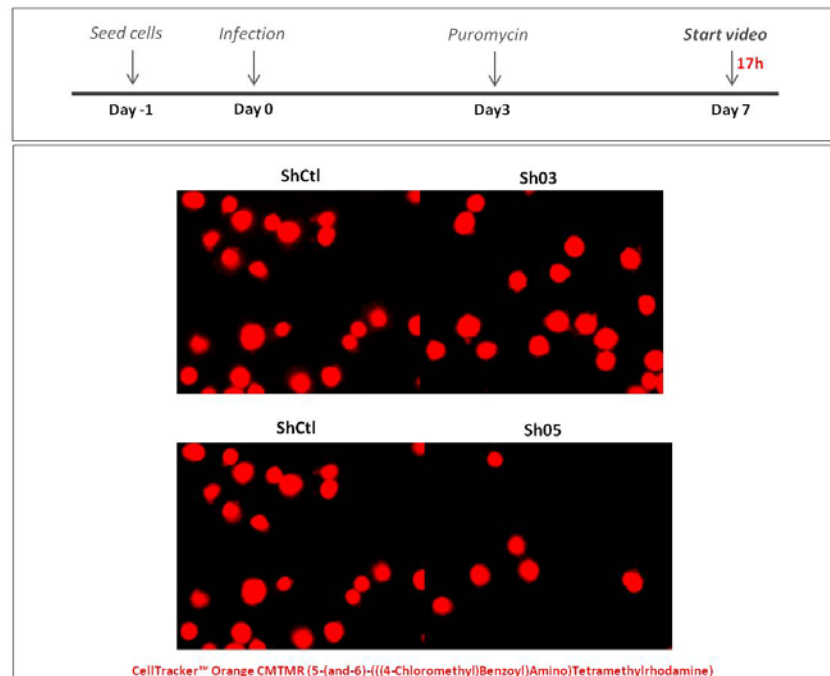
elongated and more spreaded to rounded shape. One explanation is that these cells are trying to divide, when they are rounded, but somehow they are not able to do it, so they spread again but not in a normal way. Thus, the cells try to divide and in addition to not be able to divide they can also have problems to attach again, what could explain the alteration in the shape once they attach again, because the cells shows a lot of extensions and prolongations that are not present in the control cells. Since we saw that the DDX46 depleted cells are arrested in G0G1, but we don't know if in fact these cells are accumulated in G0 or G1 phase, we cannot conclude that these cells are in G1 phase trying to divide. These cells can also be accumulated in G0 phase, meaning that they are quiescent and not trying to divide, so other factors can be favoring the strong morphologic alteration observed in the depleted DDX46, like impairments in cell adhesion and specially disorganization of the cytoskeleton.



**Figure 08 – Video to follow how melanoma cells behavior after DDX46 k.d.**  
Legend: shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).

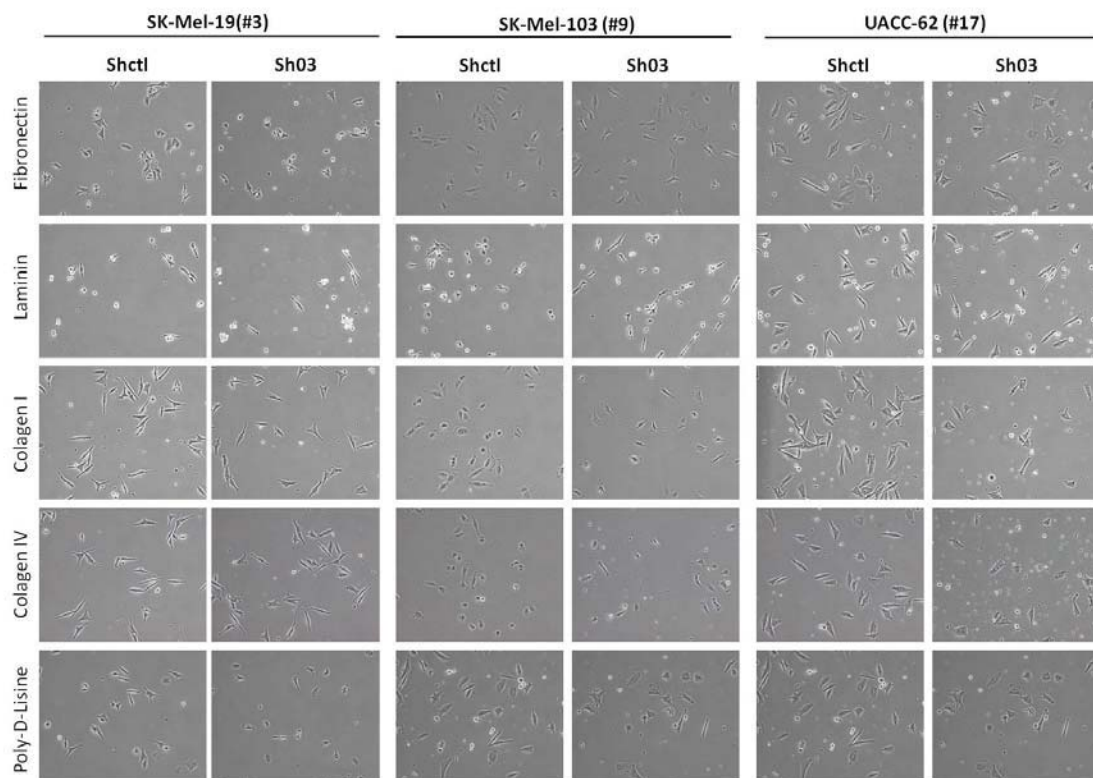
## 5 – DDX46 k.d. impairs the cell attachment and cause the cytoskeleton disorganization associated with the lost of focal adhesions in melanoma cell lines.

To evaluate if these cells had problems to attach after the DDX46 k.d., another video was done, with the cell line SK-Mel-103 (#9) to follow the cells attachment after the cells got the altered phenotype (supplementary video02). For this, the cells were stained with the Molecular Probes® CellTracker™, this fluorescent probe are able to freely pass through cell membranes and are converted to cell-impermeant reaction products allowing us to follow the cell attachment in the microscopy. As shown in the videos 03 and 04 (supplementary), the cells with DDX46 depletion have a delay in the attachment compared with the control cells in both shRNAs constructs (3 and 5). We can see that some cells take more time to attach but in the end they are able to do it, but some are with highly morphologic alteration that are no longer more able to attach and die.



**Figure 9 – Video to follow how the melanoma cells attach after DDX46 k.d.**  
Legend: shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).

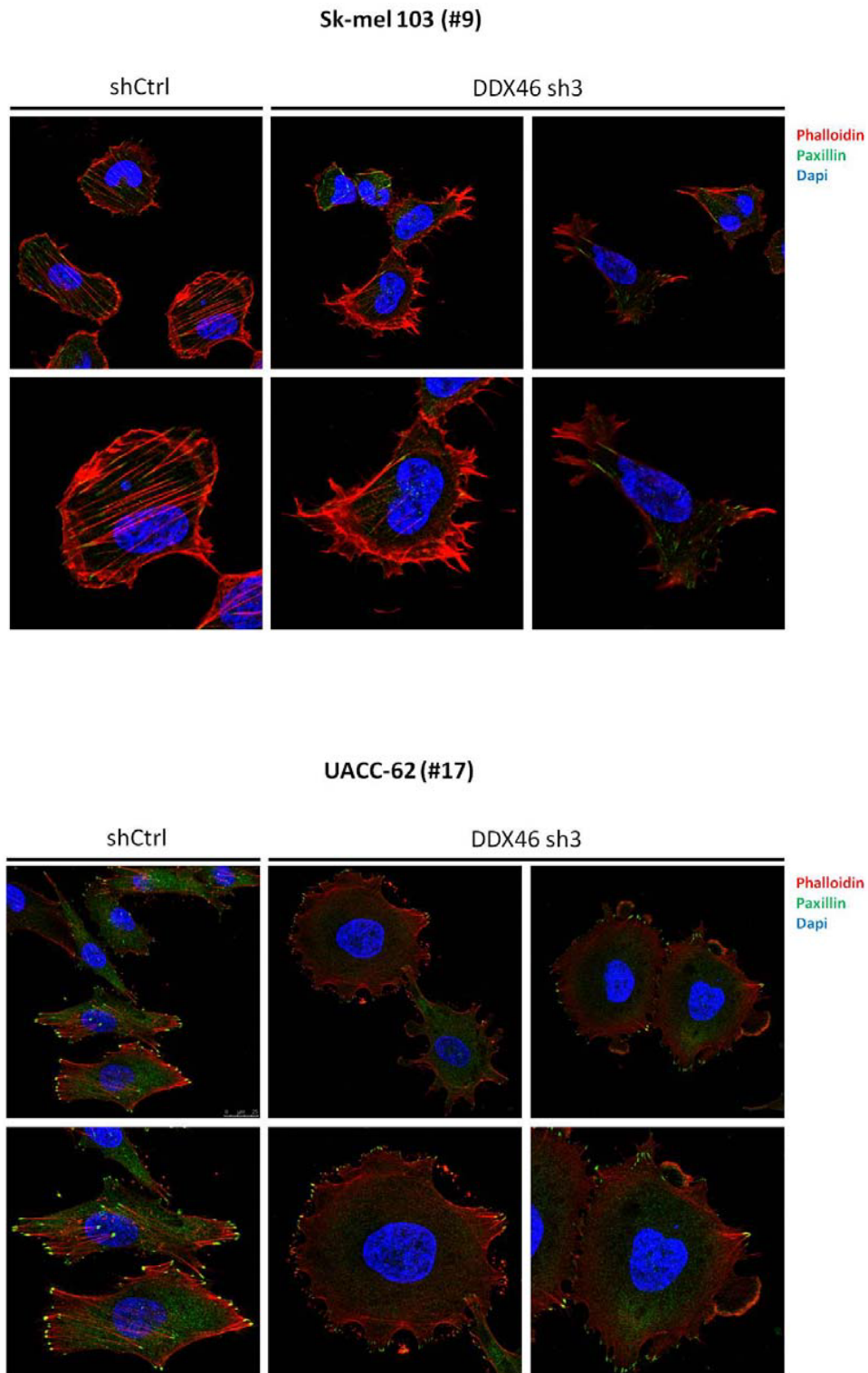
The difficulty in attaching raised the question if the cells with DDX46 k.d. should have different behavior depending of the kind of matrix substrates. To evaluate how the DDX46 k.d. cells attach and spread in different substrates we plate these cells in the BD Biocoat™ 6-well plates coated with different matrixes (laminin, fibronectin, collagen I, collagen IV and Poly-D-Lisine). Figure 10 shows that in general melanoma cells (#3 and #9 more than #17) had problems to spread in laminin even in the controls and we cannot observe an important difference between the different substrates regarding the phenotype of the cells DDX46 depleted. DDX46 k.d. cells showed the expected morphology changing as observed previously in all the different substrates.



**Figure 10 – BD Biocoat™ 6-well plates coated with different extracellular matrix (laminin, fibronectin, collagen I, collagen IV and Poly-D-Lisine).** Legend: shctl (shRNA scramble) and sh3 (DDX46 shRNA-3).

DDX46 depleted cells showed problems to attach and this could contribute for the morphologic alterations observed, but was important to check the cytoskeleton more carefully. In Figure 11 we can see morphologic alterations in DDX46 depleted melanoma cells (#9 and #17) by the staining of actin filaments with phalloidin and also the focal-adhesions with paxillin staining. Figure 11 shows an important rupture of the stress fibers in the DDX46 k.d. (sh3 and sh5) when compared with the control, and also that the focal adhesions are also reduced in these cells, illustrating the difficult attachment showed by these cells presented in the video 03 and 04.

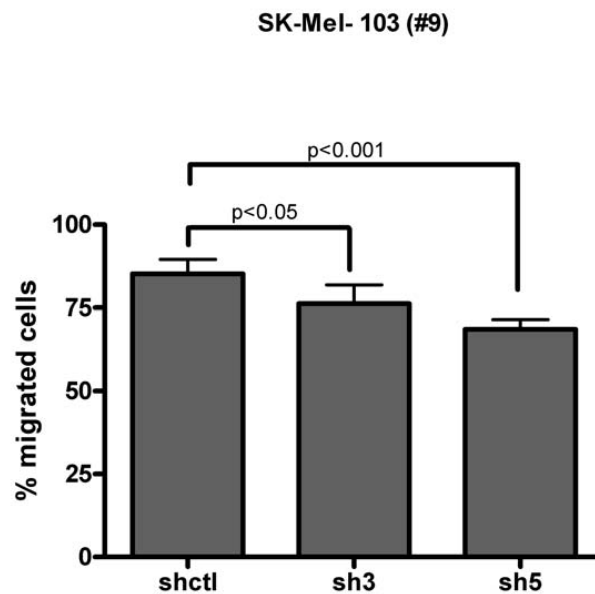




**Figure 11- Imunofluorescence showing that the cells with DDX46 k.d. (sh 3) had fragmentation of the stress fibers and lost of focal adhesions. Legend: shctrl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).**

**6 – DDX46 k.d. results in a decrease in the migration capacity on melanoma cells****SK-Mel-103.**

All these cytoskeleton alterations raised the question if these morphologic alterations could impair the migration capacity of these cells. For this, we did a migration assay using a transwell chamber (BD BioCoat™). The Figure 12 shows that DDX46 k.d. melanoma cell, SK-Mel-103, have decreased invasion capacity compared with the control.



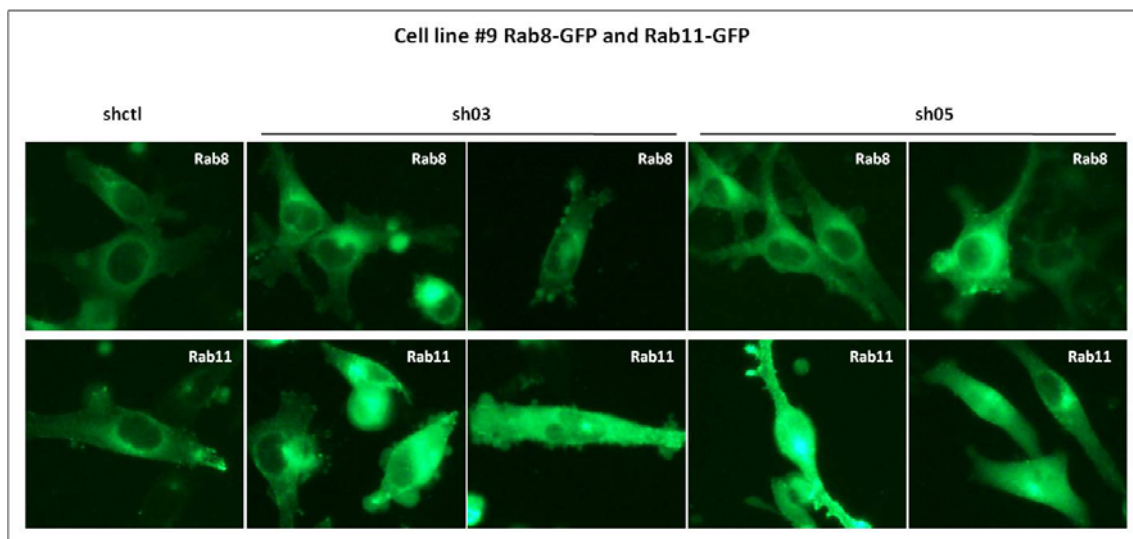
**Figure 12 - The DDX46 k.d. result in a decrease of melanoma cells invasion capacity.** Legend: shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).

Another important issue that we observed when we k.d. DDX46 in the melanoma cells was that we could saw a lot of vesicles with different sizes in the conditioned medium, suggesting that the secretory pathway may be activated in this cells.

The family of Rab GTPases is involved in many steps of membrane trafficking, including vesicle formation, vesicle movement along actin and tubulin networks, and

membrane fusion. We infected the melanoma cell line SK-Mel-103 (#9) with two Rab-GFP, Rab8 and Rab11, in an attempt to see how was the secretory pathway in these cells when we k.d. DDX46. Rab8 regulate biosynthetic traffic from the *trans*-Golgi (TGN) to the plasma membrane and Rab11 regulate slow endocytic recycling.

In Figure 12 we can see an accumulation of Rab8 and 11 and especially in sh3, it is possible to see some vesicles Rab8 and Rab11 positive being secreted. With this result we can visualize that the secretory pathway is activated when we k.d. DDX46.



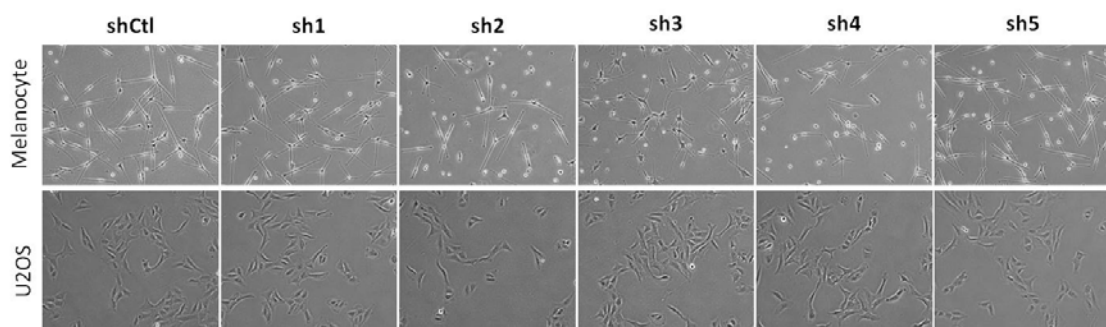
**Figure 13 - Vesicles Rab8 and Rab11-GFP positives in the melanoma cells with DDX46 k.d.** Legend: shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).

#### 7 – Melanocytes are not affected by the DDX46 k.d.

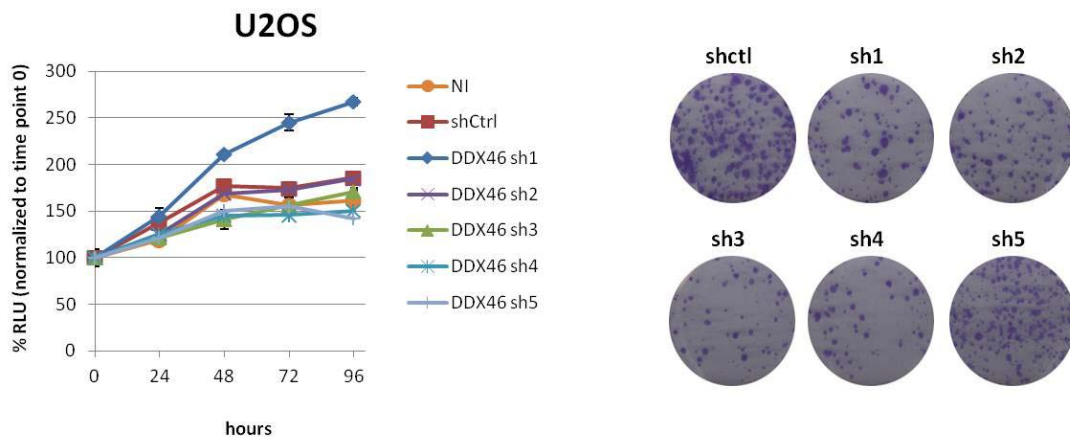
In contrast to what was observed in melanoma cells, melanocytes when depleted of DDX46 did not result in morphologic alterations with cytoskeleton disorganization. Actually, only one out five of DDX46 shRNA (sh3) altered the phenotype of the melanocytes (Figure 14). Somehow the DDX46 protein seems to play a more important role in melanoma than in melanocyte cells, turning this protein a promising target for future therapeutic therapies. Unfortunately, it was not possible to

do the clonogenic assay to evaluate the survival capacity after DDX46 k.d. in melanocytes because these cells are not able to survive in low density confluence. Another viability tests will be done by Soengas group in order to quantify the data presented here.

We also investigated the behavior of another tumor cell with the DDX46 depletion. As shown in the Figure 14, the human osteosarcoma cells (U2OS), like melanocytes, were not stressed with the DDX46 k.d. The U2OS did not have alterations on morphology or in the proliferation activity and survival capacity (Figure 15). It is important to consider that further studies with different tumor cells types need to be done to assure that the DDX46 have a main role specific in melanoma cells. But, these results suggest that DDX46 can be a very interesting target for melanoma therapies.



**Figure 14 – DDX46 k.d. didn't alter the morphology of melanocytes or human osteosarcoma cells (U2OS).** Legend: shctl (shRNA scramble) and sh3/sh05 (DDX46 shRNA-3 and shRNA-5).



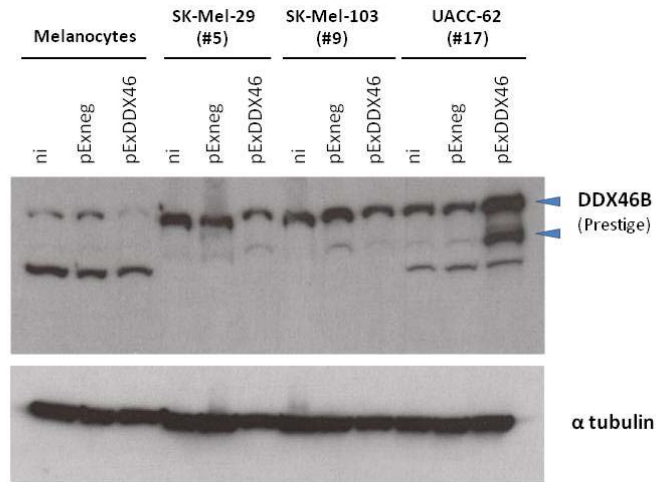
**Figure 15 – DDX46 k.d. did not interfere on human osteosarcoma cells (U2OS) proliferation or survival capacity.** Legend: NI (non infected), shctl (shRNA scramble), sh1-05 (DDX46 shRNA 1-5) and Relative light units (RLU).

## 8 – Overexpression of DDX46 in melanocytes and melanoma cells.

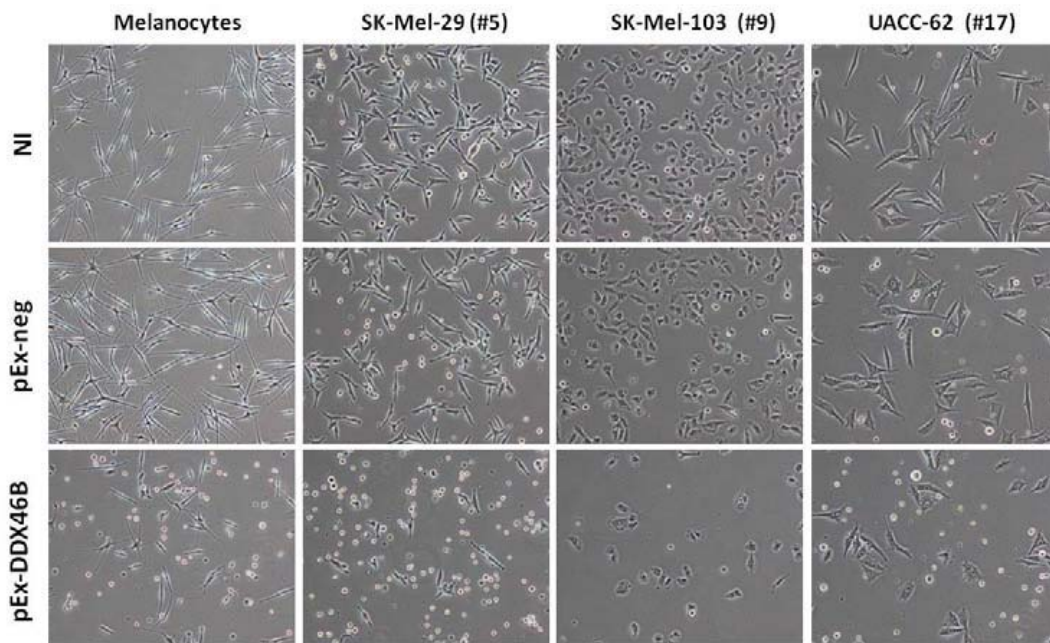
Once we knew that melanocytes have less expression of DDX46 compared with melanoma cells, we started the study with k.d. this protein in melanoma cells. But we also tried to overexpress the DDX46 in melanocytes. We started screening different transfection helpers combinations: (#59, #60, #61); (psPAX2 and PMD2G) and (pVSVG and pdeltaR8.9). However, we did not succeed with none of these three different combinations to induce the overexpression of DDX46 in melanocytes. The only DDX46 induction occurred with the cell line UACC-62 (#17) and the helpers (pVSVG and pdeltaR8.9), as shown in Figure 16(a). In addition to this we can see in Figure 16(b) that the overexpression of DDX46 culminate in cell death not only in cell line #17, in which we observed the DDX46 protein accumulation, but also in the melanocytes and the other melanoma cells, where we did not observed the same DDX46 induction. More experiments need to be done to conclude what happens when we overexpress DDX46 in melanocytes and in melanoma cells. These data are not enough to conclude but these assays will be done by Soengas group.

All these results showed that DDX46 is important for melanoma maintenance and the DDX46 project will be continue by one of the members of Soenga's group (Osterloh L.). Since we observed an important alteration in the stress fibers in response to the DDX46 depletion, they will investigate the Ras homolog gene family, member A (RhoA) pathway which regulates the actin cytoskeleton in the formation of the stress fibers. In addition to this, they will investigate molecular targets of DDX46 with microarrays and RNA binding protein immunoprecipitation.

(a)



(b)



**Figure 16 – DDX46 overexpression in melanocytes and in melanoma cells.** (a) western blot analyses for DDX46 detection and (b) morphologic alterations acquired in inverted microscope. Legend: NI (non infected), pEx-neg (empty vector) and pEx-DDX46 (DDX46 overexpression).

## **Conclusion**

DDX46 project allowed us to verify that this protein can have more functions than the helicase activity already described in the literature. More than this, this is the first time that the protein DDX46 is studied in human cells and correlated with tumor cells.

DDX46 k.d. in melanoma cells results in significant morphology alterations with cytoskeleton disorganization combined with stress fibers fragmentation and lost of focal adhesions. The absence of DDX46 seems to impair the cell cycle, with an arrest in G0G1 phase, followed by a stressed phenotype described above. The cells depleted with DDX46 lose the ability to attach properly and after all these features these cells will die in the end. Curiously, the DDX46 depletion in melanocytes did not result in the same stressed phenotype. Only one out five DDX46 shRNA led to alterations in melanocytes morphology. The same was observed with human osteosarcoma cells, U2OS. More studies are needed to conclude that DDX46 have a more important role in melanoma than in other tumor types.

For the first time we described a new function for the RNA helicase DDX46, which can be involved in the cell cycle control and in the cell morphology organization. More than this, we showed that DDX46 is important for melanoma maintenance and that this protein seems to be more important for malignant cells, melanoma cells, than to melanocytes. These results make this protein an interesting target for future melanoma therapy strategies.



## **Methods**

### **Cell Culture**

Melanoma cells SK-Mel-5(#2), SK-Mel-19(#3), SK-Mel-28(#4), SK-Mel-29(#5), SK-Mel-103(#9), SK-Mel-147(#10) and UACC-62(#17) were provided by the Sloan Katherin Hospital – New York –USA and were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with fetal serum bovine (FBS) (Lonza) 10% and penicylin/streptomycin (1%) (Invitrogen). Normal human melanocytes were isolated from the epidermis of neonatal foreskins. Briefly, foreskins were incubated overnight in trypsinization solution (22.5mM HEPES, 7.5mM glucose, 2.25mM KCl, 100mM NaCl, 0.75mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.17% trypsin). Dermis and epidermis were separated by scraping. The epidermal compartment was incubated for 3–4 d in 254CF medium (Cascade Biologicals) supplemented with 0.1mM CaCl<sub>2</sub>, 2% fetal bovine serum and keratinocyte growth supplement (Cascade Biologicals). Melanocytes were subsequently separated from keratinocytes by differential trypsinization. For long-term cultures, melanocytes were propagated in 254CF medium in the presence of 0.2mM CaCl<sub>2</sub> and melanocyte growth supplement (Cascade Biologicals).

### **Cell Viability Assay (Cell Titer GLO® (Promega))**

The cells were plated in an opaque-walled 96 wells and after the specific treatments; the plate was took out of the incubator and let on the bench to stabilize at room temperature for approximately 30 minutes. Prior to this, the CellTiter-Glo® Buffer was thawed and the lyophilized CellTiter-Glo® was equilibrated at room temperature. The lyophilized was reconstituted in the buffer to get the CellTiter-Glo®

reagent and after gently vortexing to obtain a homogeneous solution it was added a volume equal to the volume of cell culture medium present in each well. The contents were mixed for 2 minutes on an orbital shaker and after this the plate was incubate at room temperature for 10 minutes to stabilize the luminescent signal, which was recorded by a Luminometer.

### **Protein imunnobloting**

The cells collected by trypsinization and the supernatant were spinned at 2,000 rpm for 2-3min, than the supernatant was aspirated and the pellet was washed with 1 ml of PBS 1x. The pellet could be used directly or frozen at -80°C. Just before total protein extraction the vials were placed on ice and the pellets were resuspended in Laemmli buffer (0.0625 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS (Biorad), 10% Glycerol (Sigma-Aldrich), 5%  $\beta$ -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)) by a complete and fast mixing inside the pipette tip (2x10<sup>6</sup> cells were resuspended in 70-80  $\mu$ l of Laemmli Buffer). After this the proteins were boiled at 99°C for 5 minutes with agitation and the proteins extracted could be stored in the fridge and used next day or stored in -20 °C. The protein quantification was determined by the BRADFORD Assay. The Protein Assay Buffer was diluted 1x with H<sub>2</sub>O and 1  $\mu$ l of sample was added to 1000  $\mu$ l of the 1x BioRad Buffer. A BSA curve was prepared diluting BSA in 1ml 1x BioRad Buffer. The absorbance was read at 595 nm. A total of 30 $\mu$ g of protein were separated in a 10% SDS-PAGE gel and transferred to Immobilon-PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA). Prior to addition of 1<sup>o</sup> antibody the membrane was blocked with 5% milk in PBS-0.02% Tween 20 (*Sigma-Aldrich*). This could be done at RT for 1 hr or O/N at 4 oC rocking. If done O/N, the membrane was let to come to RT in blocking before adding 1<sup>o</sup> antibody. The 1<sup>o</sup> antibodies used were DDX46 (Novus Biologicals®), DDX46

(Sigma Prestige) and cyclinB1 (Cell Signaling), they were incubated O.N. at 4 °C rocking and after the incubation the membranes were washed 3 times with PBS-0.02% Tween and incubated with the respective 2<sup>o</sup> antibody with HRP (Amersham ECL) for ~1.5hrs at RT rocking. After another 3 times of washing with PBS-0.02% Tween, was added to the membranes a mix of equal volumes of reagent 1 and 2 of ECL Kit (GE Healthcare) and let incubate for 1 minute. The membrane was picked up, the excess of reagents was shaken off and the membrane was developed in a dark room.

### **Hypodiploid cells % quantification with propidium iodide intercalation and FACs analyses.**

The cells were harvested in the appropriate manner and washed in 1x PBS. The cell fixation was done with adding dropwise cold 70% EtOH to the cell pellet while gently vortexing for ensure fixation of all cells and minimise clumping and the cells were let fixating for at least 30min at 4 °C. After fixated the cells were washed twice in Phosphate-citrate buffer (192 parts of 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Disodium phosphate) and 8 parts of 0.1M citric acid (pH 7.8)) for helping to elute the small fragments. To ensure that only DNA was stained, the cells were incubated with Ribonuclease (50ul of 100ug/ml RNase). After this the cells were incubated with 200ul of Propidium Iodide (50ug/ml) and analysed by flow cytometry.

### **Cell cycle evaluation with BrDu staining and thymidine synchronization.**

The cells were treated with 10 µM BrdU for 30 minutes and after the incubation they were harvested in the appropriate manner and washed in 1x PBS. The cell fixation was done with adding dropwise cold 70% EtOH to the cell pellet while gently vortexing for ensure fixation of all cells and minimise clumping and the cells were let fixating for

at least 30min at 4 °C. After fixation the cells were washed 2x in PBS and re-suspend in 2M hydrochloric acid (HCl) for incubation of 30 minutes at room temperature, mixing at intervals. After spinning off the acid (2000rpm 3 minutes) the cells were washed 2x in PBS and 1x in PBS-T. Were added 2 µl of anti-BrdU antibody directly to the cell pellet and incubate for 20 minutes at room temperature in the dark. After washing 1x in PBS-T.the cells were stained with 50 µl secondary antibody for 20 minutes at room temperature in the dark. After washing 1x in PBS the cells were treated with 50 µl ribonuclease (Sigma) or 1ul if using Qiagen RNase and 150µl propidium iodide at room temperature, in the dark for at least 30 minutes and analysed by flow cytometry. For thymidine blocking the cells were incubated with 2mM Thymidine for 18 h and after this Thymidine was removed, the cells were washed 1x with 1x PBS and fresh DMEM-10%SBS was added for 4 and 8 hours of releasing the cells to enter in the cell cycle. After this time-points of releasing the cells were incubated with BrdU and the protocol described above was followed.

### **Transfection and lentiviral-mediated gene transfer**

Viral supernatants were generated on 293T cells transfected via standard calcium phosphate precipitation with 4 µg of vector plasmid, and 4 µg of each of the lentiviral packaging constructs p59, p60 and the p6. The plasmids of shRNA targeting DDX46 (NM\_014829 Sigma MISSION®) are sequence-verified shRNA lentiviral plasmids (pLKO.1-puro) provided as frozen bacterial glycerol stocks in Escherichia coli for propagation and downstream purification of the shRNA clones. pLKO.1 contains the puromycin selection marker for transient or stable transfection. The plasmids for Rab8 and Rab 11 contained the reporter gene GFP (green fluorescence protein). Media was changed 8–16 h after transfection and the viral supernatants were collected 36–40 h

later and armazenated at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Melanoma cells were infected with the virus shRNA DDX46 produced for 5 hours and the efficiencies were estimated by purimicin selection (shRNA DDX46) or green fluorescence visualization for Rab-GFP.

### **Invasion assay**

Cells in a 10cm dish with 50-70% confluency were washed 2x with 1x PBS and starved O.N. in serum-free DMEM. After the starvation, the cells were trypsinized, centrifuged and resuspended in PBS for counting. The amount of  $3,33 \times 10^5$  cells were washed in 1x PBS and resuspended in  $100\mu\text{l}$  of serum-free DMEM. From this cell solution  $300\mu\text{l}$  were added per well in the upper chamber of the transwell and in the lower chamber were added  $750\mu\text{l}$  of 10% FBS/DMEM. Prior to this the matrigel was rehydrated with serum-free DMEM for 2 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . After plating the cells in the chambers, the transwells were incubated for 18 hours. After this time allowing migration the medium was removed in the upper and lower chamber and was added 4% of paraformaldehyde to upper and lower chamber and incubated for 15 minutes at room temperature. The 4% of paraformaldehyde was removed and the chambers were kept in 1% of paraformaldehyde at  $4^{\circ}\text{C}$ . The total cell number and the migrated cells were scanned and counted by the confocal microssopy.

### **Imunofluorescence**

The cells were plated in coverslipes and fixated with 4% of paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature and were kept in 1% of paraformaldehyde at  $4^{\circ}\text{C}$ . After fixation the cells were washed 1x with 1xPBS and washed 2x with PBS-0.1M glicine for 10 minutes each, than the cells were permeabilized with 1x PBS+0.2% Triton-X for 5 minutes. After washing 2x with 1x PBS the cells were blocked with 1x

PBS-1%BSA at room temperature and incubated with the primary antibody (DDX46) in a humidified chamber for 1 hour at room temperature. After washing 3 x with 1x PBS the cells were incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor® 488) for 1 hour at room temperature. After washing 2x with 1x PBS for 5 minutes each the coverslips were placed over a drop of mounting media containing Dapi.