UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

VIRGÍNIA CAMPOS SILVESTRINI

Avaliação proteômica das alterações no sistema ubiquitina proteassoma durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Ribeirão Preto, 2018

VIRGÍNIA CAMPOS SILVESTRINI

Avaliação proteômica das alterações no sistema ubiquitina proteassoma durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT)

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Area de concentração Bioquímica.

Versão corrigida da dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Bioquímica em 31/01/2019. A versão original encontra-se disponível no departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Orientador: Professor. Dr. Vitor Marcel Faça

Ribeirão Preto

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CARTALOGRÁFICA

SILVESTRINI, VIRGÍNIA CAMPOS.

Avaliação proteômica das alterações no sistema ubiquitina proteassoma durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT) / Virgínia Campos Silvestrini; Orientador, Vitor Marcel Faça - 2018.

96 fs :il. + 1 DVD.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Versão original

1. EMT 2. SAHA 3. Sistema Ubiquitina Proteassoma 4. MG132 5. P5091, 6. USP7.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SILVESTRINI, Virgínia Campos

Título: Avaliação proteômica das alterações no sistema ubiquitina proteassoma durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração bioquímica.

Aprovado em: ...../...../.....

Banca Examinadora

Prof. Dr_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof. Dr_____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Minha gratidão...

A Deus,

Pelo dom da Vida,

Pela Conclusão deste trabalho

por iluminar minha vida e meus estudos sempre

À minha mãe e meu pai

Obrigada por sempre me fazerem ver

Que os bens mais preciosos

Que levamos conosco

São o amor e o Saber

Ao meu irmão, **Júnior**

Pela cumplicidade e amizade

Aos meus Avós, **Márcia e Silvestrini**

Que sempre estiveram ao meu lado

Me apoiando e me encorajando a seguir em frente

Ao meu namorado, **Arthur**

Pelo amor e companheirismo

Àos meus amigos, **Aline, Ana, Anne, Bruna, Carol, Cris e Leo**

Pela ajuda nos momentos difíceis,

Risadas e momentos de alegria.

A vocês o meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, **Prof. Dr. Vítor Marcel Faça** pela oportunidade e confiança que me foram dadas para que eu pudesse desenvolver o presente trabalho em seu laboratório, e por representar para mim um importante modelo pessoal e profissional;

- Aos **mestres do programa de pós-graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos durante estes anos;

- Aos meus amigos do **Laboratório de Proteômica do câncer: Aline, Ana, Anne, Carol, Camila, Guilherme, Germano e Silvinha;**

- Aos pesquisadores, alunos e funcionários do **Hemocentro de Ribeirão Preto que tanto me ajudaram**;

- Aos funcionários e amigos do departamento de **Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Em especial à Ivone e a Andressa**, por toda a ajuda e amizade**;**

- A CAPES e a **FAPESP** (processo 2017/03960-6) pelo suporte financeiro e incentivo a pesquisa;

- Aos **integrantes da banca examinadora,** que disponibilizaram parte do seu tempo para análise deste trabalho;

- A **todas as pessoas** que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

1.**INTRODUÇÃO** **1**
1.1. Câncer e câncer de Mama 1
1.2. A transição epitélio-mesenquimal e o seu envolvimento na progressão tumoral 3
1.3. Inibidor de histona deacetilase como indutor da EMT 10
1.4. Envolvimento de modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante o processo de EMT 12
1.4.1 Ubiquitinação 12
1.4.2 Deubiquitinação 16
1.5. Estudos proteômicos aliados a pesquisa contra o câncer 19

2. OBJETIVOS **22**
2.1. OBJETIVO GERAL 22
2.1.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS 22

3. METODOLOGIA **24**
3.1. Estabelecimento e caracterização da EMT como um modelo de metástase em linhagem epitelial de adenocarcinoma humano 24
3.1.1 Cultivo da linhagem celular MCF-7 25
3.1.2 Modelo de Indução da EMT 25
3.2. Determinação da concentração dos inibidores químicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma 26
3.2.1 Inibidores químicos 26
3.2.2 Ensaio de viabilidade celular (MTT) 26
3.2.3 Ensaio morfológico relacionado aos inibidores do sistema ubiquitina proteassoma 27
3.3. Avaliação dos inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT 27
3.3.1 Influência de P5091 e MG132 durante a EMT 27
3.4. Avaliação da migração celular em MCF-7 induzidas a EMT e tratadas com MG132 e p5091 28
3.4.1 Ensaio de migração celular - Wound healing 28
3.5. Avaliação da Expressão Proteica por *western blotting* 28
3.5.1 Análise de proteínas relevantes à EMT por western blotting 29
3.5.1.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida 29
3.5.1.2 Análise por western blotting 30
3.6. Análise de Imunofluorescência - *High Content Screening* 31

3.7. Análises proteômicas_____ 32
3.7.1 Preparo de Amostras para análise por MRM _____ 32
*3.7.2 Definição da metodologia e análise proteômica dirigida por MRM*_____33
*3.7.3 Análise proteômica - LC/MSMS*_____35
3.8. Array de proteínas ubiquitinas tratadas com MG132 e SAHA _____ 36
3.9. Análises estatísticas_____ 36

4. RESULTADOS_____ 36
4.1 Metanálise de dados prévios visando identificar possíveis proteínas alteradas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT_____ 36
4.2 Caracterização da EMT como um modelo para progressão tumoral em MCF-7 utilizando o inibidor de histona deacetilase SAHA_____41
4.3 Caracterização funcional da EMT na linhagem celular MCF-7 induzida por SAHA_____ 42
4.4 Avaliação da viabilidade celular por MTT da concentração dos inibidores químicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma_____ 43
4.5 Avaliação morfológica por microscopia ótica interferência de MG132 e P5091 em células MCF7 induzidas à EMT_____ 45
4.6 Análise por western blotting das alterações proteicas induzidas pela EMT e tratadas com MG132 e P5091 _____47
4.7 Análise por Imunofluorescência (High Content Screening) da morfologia celular e expressão de Vimentina e SNAIL das células MCF-7 tratadas com MG132 e P5091_____ 49
4.8 Avaliação da migração celular das células MCF-7 induzidas à EMT e tratadas com MG132 e P5091 – Wound healing _____ 53
4.9 Análise por monitoramento múltiplo de reações (MRM) das alterações proteicas induzidas pela EMT e moduladas por P5091_____ 56
4.10 Array de proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma de células MCF-7 induzidas a EMT e moduladas por MG13 _____ 59

5. DISCUSSÃO _____ 62

6. CONCLUSÃO_____ 71

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ 72

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrila

AKT - Protein kinase B

ATCC - *American Type Culture Colection*

CDH1 - E-caderina

CDH2 - N-caderina

CTCs - Cancer stem-like cells

CTRL - Controle

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DTT - Ditiotreitol

DUBs - Enzimas deubiquitinadoras

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EGF - *Epidermal Growth Factor*

EGF - Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*

EMT - Transição epitelial–mesenquimal

ER - Estrogen receptor

FDA - Food and Drug Administration

FGF - fator de Crescimento de Fibroblastos

GO - Gene ontology

HDAC - Histonas Deacetilase

HDACi - Inibidor de Histonas Deacetilases

HGF - Hepatocyte Growth Factor

HGF - Fator de Crescimento de Hepatócito

HIF-α - Sinais Induzíveis Por Hipóxia

IAA - Iodoacetamida

IGF - Fator de Crescimento de Insulina

IL-1β - Interleukin 1

INCA - Instituto Nacional do Câncer

kDa - Kilo Dalton

LC-MS/MS - Espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida

MCF7 - Células epiteliais de adenocarcinoma de mama

MDM2/HDM2 - Murine Doble Minute 2

MET - Transição mesenquimal-epitelial

MG132: carbobenzoxil-L-leucyl-L-leucyl-Leucynal (Inibidor do proteassoma

MRM/SRM - Monitoramento de reações selecionadas ou múltiplas

NF-kβ - Factor nuclear kappa beta

OMS - Organização Mundial da Saúde

PANTHER - *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*

PBS - Salina tamponada com fosfato

PDGF - *Platelet-derived Growth Factor*

PI3K - Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase

PTMs - Modificações Pós-Traducionais

RNA - Ácido ribonucleico

SAHA - Hidroxâmico Suberoilanilida

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sódio

SFB - Soro fetal bovino

SILAC - *Stable Isotopic Labeling in Cell Culture*

SLUG - *Zinc finger protein SNAI2*

SNAIL - *Zinc finger protein SNAI1*

STRING - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*

TGFβ - *Transforming Growth Factor Beta*

TM4F5 - Transmembrane 4 L six family member 5

TNFα - Fatores de Necrose Tumoral Alfa

TWIST1 - *Twist-related protein 1*

UCHS - Hidrolases Carboxi-Terminais Ubiquitinas

UPS - Sistema Ubiquitina Proteassoma

USP5 - Ubiquitin-Specific-Processing Protease 5

USP7 - Ubiquitin-Specific-Processing Protease 7

USPs - Proteases Específicas da Ubiquitina

VIM - Vimentina

ZEB1 - *Zinc finger E-box-binding homeobox 1*

β-TrCP - F-box/WD repeat-containing protein 1 (E3 ligase)

SÍMBOLOS

g - Grama

µg - Micrograma

ng - Nanograma

L - Litro

mL - Mililitro

µL - Microlitro

cm - Centímetro

µm - Micrometro

M - Molar

pH - Log negativo da concentração de H^+

RPM - Rotações por minuto

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

FIGURAS:

Figura 1- Representação das principais características adquiridas pelas células tumorais durante a progressão tumoral (Adaptado de Hannahan e Weinberg, 2011)_____2

Figura 2- A cascata metastática. A metástase pode ser visualizada como um processo que ocorre em duas fases principais: (I) translocação física de células cancerígenas do tumor primário para um órgão distante e (II) colonização das células translocadas dentro desse órgão. (A) Para iniciar a cascata metastática, as células cancerosas dentro do tumor primário adquirem um fenótipo invasivo. (B) Células cancerosas podem então invadir a matriz circundante e em direção aos vasos sanguíneos, onde elas se intravasam para entrar na circulação, que serve como principal meio de passagem para órgãos distantes. (C) Células cancerosas viajando pela circulação são células tronco (CSC). Eles exibem propriedades de sobrevivência independente de ancoragem. (D) No órgão distante, as CTCs saem da circulação e invadem o microambiente do tecido secundário. (E) Neste local, as células cancerosas devem ser capazes de escapar da resposta imune inata e também sobreviver como uma única célula (ou como um pequeno aglomerado de células). (F) Para se transformar em um depósito macrometastático ativo, a célula cancerígena deve ser capaz de se adaptar ao microambiente e proliferar_____5

Figura 3- O processo de EMT. O processo de EMT envolve a transição funcional de inúmeros genes de células epiteliais polarizadas em células mesenquimais com capacidade invasora e migratória. A co-localização destes dois fenótipos distintos define um fenótipo intermediário, indicando um estágio parcial de EMT (Adaptado Kalluri e Weiberg, 2009)_____ 9

Figura 4- Mecanismo de ação coordenada do sistema ubiquitina proteassoma para degradação proteica. A degradação é iniciada pela conjugação da proteína ubiquitina com resíduos de lisina conservados a proteína alvo. A ligação da molécula de ubiquitina é realizada através de três reações enzimáticas. Primeiro, E1 ativa o resíduo de glicina carboxy-terminal da ubiquitina de maneira dependente de ATP. A ubiquitina ativada é então transferida para o sítio de cisteína da enzima E2. No terceiro passo, a E3 liga a ubiquitina da E2 ao resíduo de lisina da proteína alvo. Enquanto aparentemente não existem mais enzimas E1, existem várias E2 e E3 ubiquitina ligases, que são responsáveis pelo processo de degradação seletiva e específica de cada proteína. Depois do processo de ubiqutitinação, as proteínas são degradas no proteassoma, processo envolvido em várias funções celulares, como controle de qualidade do proteomas, resposta a estresse ou regulação do ciclo celular _____14

Figura 5- 5.1) Representação esquemática dos inibidores do proteassoma e função do bortezomib em mieloma A) MG132 e B) Bortezomib. **5.2)** Estrutura e função do proteassoma 26S. A) Estrutura e componentes do proteassoma B) Sítios ativos do proteassoma 26S. Existem três tipos de sítios

proteolíticos na câmara central do proteassoma 20S, e cada anel β contém três sítios ativos. O bortezomib e o M132 atuam principalmente no sítio semelhante a quimotripsina na subunidade β, mas também inibem o local semelhante a caspase em alta concentração _____ 16

Figura 6- Fluoxograma da metodologia utilizada na indução da EMT em células MCF-7 pelo inibidor de histonas deacetilases SAHA, e análises de alterações morfológicas e proteicas decorrentes_____24

Figura 7- Modelo de indução de EMT juntamente com os inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma utilizados. A) Tratamento com MG132; B) P5091_____27

Figura 8- Caracterização morfológica das células MCF-7 induzidas a EMT por 24 horas. As células (A) MCF-7 2 μM de SAHA, aumento 4x, (B) MCF-7 4 μM de SAHA, aumento 4x, aumento 4x, (C) MCF-7 6 μM de SAHA, aumento 4x (D) MCF-7 8 μM de SAHA, aumento 4x. (E) MCF-7 10 μM de SAHA, aumento 4x. (F) MCF-7 Controle (não induzidas), aumento 4x. O experimento ilustrado na figura é representativo de mais de 3 replicatas para esta mesma condição. Imagens obtidas através de microscopia de contraste de fases com aumento de 100x_____ 42

Figura 9- Caracterização morfológica das células MCF-7 induzidas a EMT por 24 horas com 10 μM de SAHA. As células (A) MCF7 controle, aumento de 4x; B) Controle, aumento de 10x; C) Tratadas com 10 μM de SAHA, aumento de 4x e D) Tratadas com 10 μM de SAHA, aumento de 10x. O experimento ilustrado na figura é representativo de mais de 3 replicatas para esta mesma condição. Imagens obtidas através de microscopia de contraste de fases com aumento de 100x_____ 43

Figura 10- *Western blotting* da indução da EMT com SAHA em células MCF-7. Extratos proteicos celulares de MCF-7 controle e tratadas com 10uM de SAHA durante 24 horas foram avaliadas por western blotting com as principais proteínas marcadoras da EMT para confirmar o modelo de indução: Vimentina, β-Catenina e E-caderina. Todos os anticorpos foram utilizados na diluição 1:1000. O extrato celular foi aplicado 30ug por amostra. A proteína GAPDH foi utilizado como controle endógeno_____ 44

Figura 11- Análise da viabilidade celular das células MCF-7 tratadas com MG132 pelo ensaio MTT. O inibidor de proteassoma MG132 foi utilizado nas concentrações exponenciais indicadas no período de 24 horas. Resultados estatisticamente significativos (***p<0,0001) em relação ao controle_____46

Figura 12- Análise da viabilidade celular das células MCF7 tratadas com P5091 pelo ensaio MTT. O inibidor de USP7, P5091 foi utilizado nas concentrações indicadas no período 24 horas. Resultados estatisticamente significativos (** p<0,05 ***p<0,001) em relação ao controle_____46

Figura 13 - Análise morfológica celular de MCF-7 controle e tratadas com os inibidores específicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma: A) 1 μM de MG132 e B) 15 μM P5091_____ 46

Figura 14- Análise morfológica celular de MCF7 controle e tratadas com os inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma juntamente com SAHA 10 µM. A) Células MCF-7 controle, tratadas com 1 µM de MG132 e 1 µM de MG132 + SAHA 10 µM; B) Células MCF-7 controle, tratadas com 15 µM de P5091 e 15 µM de P5091 + SAHA 10 µM_____ 47

Figura 15- Análise por *western blotting* da indução da EMT e modulação por MG132 e P5091. Extratos celulares totais (30 µg) foram separados em géis SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para membrana de PVDF. Foram utilizados anticorpos específicos para cada proteína e a detecção da reação foi feita através do método quimioluminescente, com kit de detecção ECL Prime (GE Helthcare) e reveladas no analisador para imagens luminescentes ImageQuant LAS400mini (GE Lifescience). A) Processo de ubiquitinação realizado por anticorpo específico para ubiquitina em células MCF-7 tratadas com MG132 1 µM e B) Marcação com anticorpos específicos de proteínas relacionadas com vias de P5091 em células MCF-7_____48

Figura 16- Análise por western blotting da indução da EMT e modulação por MG132 e P5091. Extratos celulares totais (30 µg) foram separados em géis SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para membrana de PVDF. Foram utilizados anticorpos específicos para cada proteína e a detecção da reação foi feita através do método quimioluminescente, com kit de detecção ECL Prime (GE Helthcare) e reveladas no analisador para imagens luminescentes ImageQuant LAS400mini (GE Lifescience)_____49

Figura 17- Intensidade de Imunofluorescência da área corada por FITC e texas red, representando marcação por Vimentina e SNAIL. Após 72 horas as células MCF-7, induzidas ou não a EMT e tratadas com MG132 e P5091, foram fixadas e marcadas com SNAIL e Vimentina, seguido de marcação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho anti-IgG de cabra respectivamente. Resultados estatisticamente significativos (***p<0,001) em relação ao controle_____50

Figura 18- Análise morfológica por High Content Screening dos parâmetros morfológicos de células MCF-7 controle, induzidas à EMT com SAHA 10 µM por 24 horas. Os parâmetros analisados como área e contato com células vizinhas foram alterados pelo tratamento com SAHA MG132 e P5091. Resultados estatisticamente significativos (**p<0,001, * p<0,005)_____52

Figura 19- Análise por Imunofluorescência em MCF-7 tratadas com MG132 e P5092. Após 72 horas as células MCF-7, induzidas ou não a EMT e tratadas com MG132 e P5091, foram fixadas e marcadas com anticorpo DAPI para núcleo e citoplasma, snail (FITC), e vimentina (texas red), principais marcadores do processo de EMT. Células marcadas em verde representa a marcação por SNAIL, em vermelho por Vimentina e MERGE imagem sobreposta de Imunofluorescência. Em A) representa o controle; B) SAHA 10

μM; C) MG132 1 μM e SAHA 10 μM; D) P5091 15 μM e E) P5091 15 μM e SAHA 10 Mm_____52

Figura 20- Ensaio de migração das células MCF-7 induzidas à EMT e moduladas com MG132. No painel superior observa-se a migração celular de MCF-7 realizada durante 0, 8, 24 e 57 30 horas, induzidas a EMT e tratadas com MG132 e sua ação combinada. No painel inferior, foi quantificada a migração relativa das células. Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais com resultados estatisticamente significativos (**p<0,05, ****p*<0,001) em relação ao controle de cada tratamento_____ 54

Figura 21- Ensaio de migração das células MCF-7 induzidas à EMT e moduladas com P5091. No painel superior observa-se a migração celular de MCF-7 realizada durante 0, 8, 24 e 30 horas, induzidas a EMT e tratadas com p5091 e sua ação combinada. No painel inferior, foi quantificada a migração relativa das células. Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais com resultados estatisticamente significativos (**p<0,05, ****p*<0,001) em relação ao controle de cada tratamento_____ 55

Figura 22- Perfil dos 27 peptídeos analisados por MRM representando proteínas de interesse envolvidas com a EMT e o sistema ubiquitina proteassoma. O ensaio foi realizado utilizando 100 μg de extrato total de células MCF-7 induzidas á EMT com SAHA e tratadas com P5091 e ainda sua ação combinada. Para o ensaio de MRM, foram utilizados peptídeos padrões para proteínas disponíveis em nosso laboratório e dados públicos externos para os quais não tínhamos disponíveis. _____ 56

Figura 23- Avaliação de proteínas marcadoras da EMT em células MCF-7 através do método de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Após 24 horas amostras das células MCF-7, induzidas ou não a EMT e moduladas por P5091 15 μM foram submetidas à digestão *in situ* e analisadas pelo método de MRM para monitoramento das proteínas A) USP7 B) HDAC1 C) CTNNB1, D) P53, E) Vim, F) CDH1, G) SNAIL2, H) CDK1, I) SUMO1 e J) SUMO2. Os gráficos de barra representam a média da área o pico de cada peptídeo proteotípico. Resultados estatisticamente significativos (**p<0,05, ****p*<0,001) em relação ao controle_____ 58

Figura 24- Quantificação das imagens do *array* de proteínas (*Kit Proteome Profile Array* R&D systems, ARY027) da ativação da via de sinalização relacionado ao sistema ubiquitina proteassoma em células MCF-7 induzidas à EMT e tratadas com MG132 1 μM e sua ação combinada com SAHA. Foram aplicados 200 μg de proteína total em cada spot com base na quantificação pelo reagente de Bradford. MCF-7 controle; MCF-7 tratadas com MG132 1 μM e MG132 1 μM + SAHA 10 Mm _____ 60

Figura 25- Confirmação por *western blotting* da ativação da via de sinalização de ubiquitina em células MCF-7 tratadas com o inibidor do proteassoma MG132 (1 μM). Foram aplicados 30 μg de proteínas em cada

raia, com base na quantificação pelo reagente de Bradford. MCF-7 controle; MCF-7 tratatadas com MG132 1 μM e MG132 1 μM + SAHA 10 μM _____ 60

Figura 26- Agrupamento de proteínas ubiquitinadas pela indução da EMT em células MCF7 com o agente SAHA e alterados pelo inibidor de ubiquitinação MG132. Os dados foram coletados utilizando kit Arranjo de proteínas ubiquitinadas. O gráfico indica o foldchange das proteínas entre duplicadas técnicas analisadas. Em verde está representado proteínas que sofrera diminuição de sua expressão e em vermelho aumento da expressão quando comparados ao controle_____ 61

TABELAS:

Tabela 1- Inibidores de algumas enzimas envolvidas em modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma que modulam a estabilidade e translocação proteica_____ 26

Tabela 2- Proteínas analisadas por western blotting: proteína, peso molecular (Kda), espécie produzida, diluição e fabricante dos anticorpos_____30

Tabela 3. Proteínas analisadas por High Content Screening: proteína, diluição, anticorpo secundário, e marcação _____32

Tabela 4. Proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma identificadas em estudos prévios em células MCF-7 superexpressando SNAIL e MCF-10A induzida a EMT com TGFβ2_____37

Tabela 5- Proteínas reguladas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma em estudos prévios do nosso grupo. Os resultados demonstram proteínas reguladas em células MCF-7 superexpressando o fator de transcrição SNAIL e MCF-10A com TGFβ2_____40

RESUMO: Avaliação proteômica das alterações no sistema ubiquitina proteassoma durante a transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Câncer se destaca no contexto de patologias por ser uma das doenças que mais acometem mortes por ano, sendo caracterizada como um conjunto de doenças multifatoriais que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, dando origem às metástases. Uma importante etapa da cascata metastática é a transição epitélio-mesenquimal (EMT), um processo bem orquestrado que resulta na perda do fenótipo epitelial e aquisição do fenótipo mesenquimal pelas células tumorais, que adquirem carácter invasivo e migratório, além de se tornarem mais resistentes às drogas. Durante este processo, ocorrem inúmeras alterações celulares que modificam a estabilidade proteica e/ou promovem sua translocação subcelular, o transporte de proteínas para a membrana, alterações no citoesqueleto e incluindo o envio de proteínas para degradação pelo proteassoma. A desregulação de fatores de transcrição e modificação pós traducional de proteínas são fatores que podem levar à EMT. Após a eficiente indução da EMT *in vitro* utilizando o inibidor de histonas deacetilase (SAHA) em células de adenocarcinoma de mama MCF-7, foram realizadas análises proteômicas envolvimento os inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma, MG132 e P5091. A modulação por inibição de USP7 resultou em variação da expressão de diversas proteínas biomarcadoras da EMT (SNAIL, β-Catenina, CDK1) e proteínas envolvidas no ciclo celular (P53 e CDK1). O estudo proteômico permitiu a correlação do processo da EMT por SAHA com as vias de modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma, e ainda propõe USP7 como alvo de estudos detalhados para EMT com potencial proposta terapêutica.

Palavras chaves: EMT, SAHA, sistema ubiquitina proteassoma, MG132, P5091, USP7.

ABSTRACT: Proteomic analysis of alterations in the ubiquitin-proteasome system during epithelial to mesenchymal transition (EMT)

Cancer stands out in the context of pathologies because it is one of the diseases that most affect deaths per year, being characterized as a set of multifactorial diseases that has in common the disordered growth of cells that invade tissues and organs, being able to spread to other regions of the body, giving rise to metastases. An important step in the metastatic cascade is the epithelial-mesenchymal transition (EMT), a well-orchestrated process that results in the loss of the epithelial phenotype and acquisition of the mesenchymal phenotype by the tumor cells that acquire a more invasive and migratory character, and become more resistant to drugs. During this process, numerous cellular alterations occur that modify the protein stability and/or promote its subcellular translocation, the transport of proteins to the membrane, changes in the cytoskeleton and including the sending of proteins for degradation by the proteasome. Deregulation of transcription factors and posttranslational modification of proteins are factors that can lead to EMT. After an efficient induction of EMT using the histone deacetylase inhibitor (SAHA) in MCF-7 breast adenocarcinoma cells, proteomic analyzes were performed involving inhibitors related to the ubiquitin proteasome system, MG132 and P5091. Modulation by inhibition of USP7 resulted in varying expression of various EMT biomarker proteins (SNAIL, β-Catenina, CDK1) and cell cycle (P53 e CDK1). The proteomic study allowed the correlation of the SAHA EMT process with the posttranslational modifications pathways related to the ubiquitin proteasome system and also proposes USP7 as the target of detailed studies for EMT with potential therapeutic proposal.

Keywords: EMT, SAHA, ubiquitin proteasome system, MG132, P5091, USP7.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e Câncer de mama

Diversas linhas de evidências sugerem que a tumorigênese em humanos é um processo composto por inúmeras etapas e que estas refletem alterações genéticas que conduzem a transformação progressiva das células humanas normais em células derivadas altamente malignas. Tomadas em conjunto, as observações relacionadas ao câncer em humanos e em modelos animais argumentam que o desenvolvimento tumoral ocorre por meio de um processo formalmente análogo a evolução Darwiniana, na qual uma sucessão de mudanças genéticas, cada uma conferindo um ou outro tipo de vantagem ao crescimento, leva a conversão progressiva de células normais em células tumorais [1].

Neste contexto, câncer é o nome dado para designar um conjunto de doenças multifatoriais que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. É caracterizado pelo acúmulo progressivo de mutações no genoma de uma célula, podendo resultar em alterações na expressão ou funções de genes necessários para manutenção da homeostase celular. À medida que as células normais evoluem para um estado neoplásico, elas adquirem uma sucessão de capacidades que lhes permitem serem tumorigênicas, e, por fim, malignas [2].

Aliado a isto, conforme proposto por Hanahan e Weiberg (2000) [3], algumas características que são adquiridas pelas células cancerosas contribuem efetivamente para promoção do câncer, tais como: autossuficiência quanto a fatores de crescimento, insensibilidade a fatores antiproliferativos, instabilidade genômica e mutação, resistência à morte celular programada (apoptose), promoção da inflamação tumoral, reprogramação do metabolismo celular energético, evasão e destruição de células do sistema imunológico, potencial replicativo infinito, angiogênese e, enfim, invasão tecidual e metástase **(Figura 1)** [2].

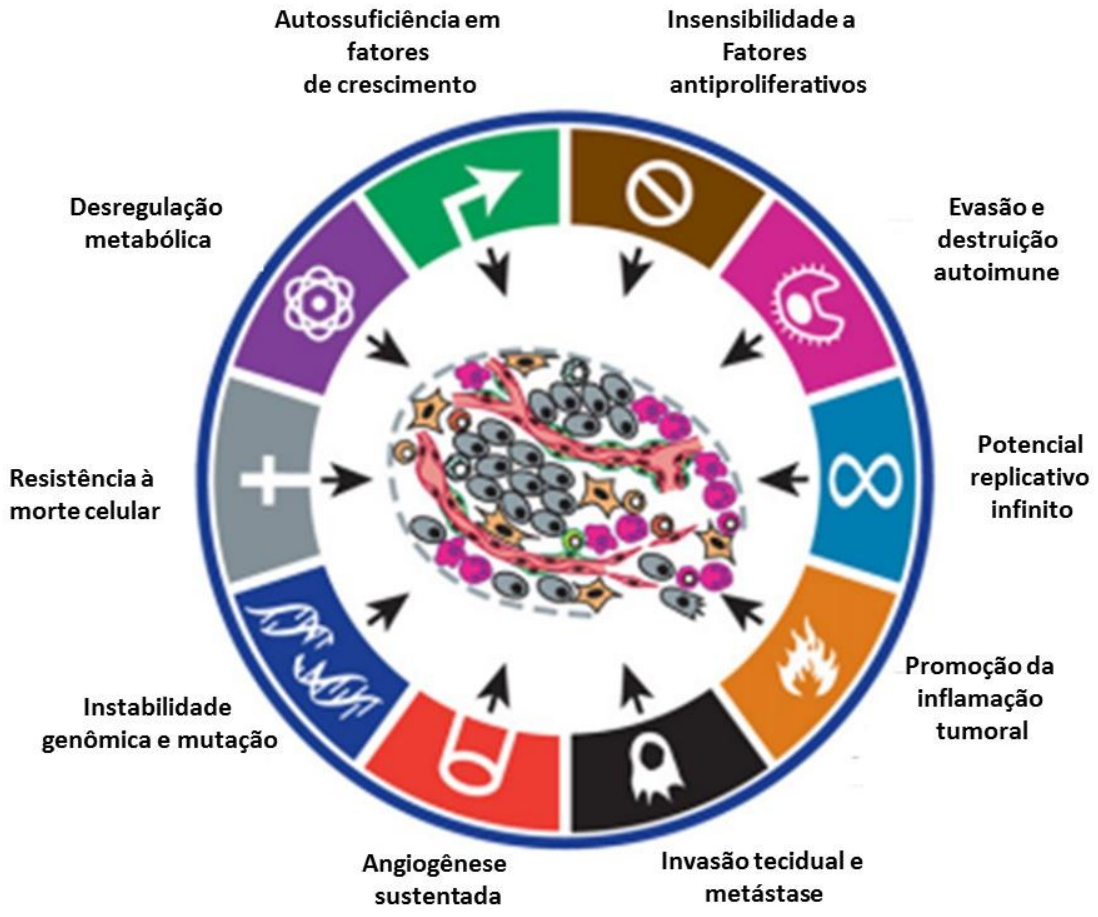

Figura 1- Representação das principais características *(hallmarks)* adquiridas pelas células tumorais durante a progressão tumoral (Adaptado de Hannahan e Weinberg, 2011).

Assim, o acúmulo gradual de mutações genéticas e epigenéticas resultam na alteração do padrão de expressão e funcionalidade de diversos genes específicos em células tumorigênicas. Células que sofrem tais alterações deixam de responder a sinais biológicos importantes para a manutenção da diferenciação, proliferação e morte celular. Além disso, a situação agrava nos casos cujo tumor adquire capacidade invasiva e sofre metástase, a qual é responsável por cerca de 90% dos casos de morte por câncer [2].

Dentre os diversos tipos de câncer, o de mama se destaca por ser o mais comum entre as mulheres no Brasil e no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama representa cerca de 25% das neoplasias em mulheres, sendo a principal causa de morte relacionada à tumorigênese na idade adulta [4, 5]. De acordo com o Instituto Nacional do

Câncer (INCA) são esperados cerca de 59.700 casos em 2018. Apesar destas altas taxas de mortalidade, pacientes diagnosticadas com câncer de mama localizado, ou seja, com ausência de metástase, apresentam uma taxa de sobrevivência muito satisfatória, podendo chegar a 90% dos casos. A situação agrava-se nos casos cujo tumor sofre metástase para os gânglios linfáticos adjacentes ou para órgãos distantes, quando a taxa de sobrevida em 5 anos diminui significativamente, chegando a valores médios de 84% e 23%, respectivamente [6, 7].

Um dos principais desafios do tratamento do câncer de mama é a identificação de biomarcadores confiáveis para melhoria do diagnóstico precoce, triagem, predição de resultado, resposta terapêutica, toxicidade e identificação de novos alvos terapêuticos. Há, atualmente, mais de 1600 testes clínicos e pré-clínicos abertos registrados no registro do ClinicalTrials.gov para o tratamento deste tipo de neoplasia. Neste contexto, novos estudos se tornam necessários para identificar novos alvos para prevenção e tratamento da doença, que contam com maior eficácia e menor toxicidade [8].

O destacamento destas células do tumor primário e subsequente processo de metástase é consequência de uma série de fatores genéticos, epigenéticos, fenotípicos e bioquímicos que acarretam na perda de junções intercelulares, desarranjo da matriz extracelular e aquisição de mobilidade e capacidade de invasão [9]. Durante o desprendimento do tumor primário e consequente processo de metástase, vários mecanismos moleculares, bioquímicos e biológicos estão envolvidos e regulados, os quais são tópicos de constante debate e intenso esforço em pesquisa devido a sua fundamental importância na capacidade de predizer, identificar e erradicar os diversos tipos de câncer. Dentre estes mecanismos relacionados à aquisição de tais características durante o processo de progressão tumoral, está o processo de Transição Epitelial-Mensenquimal (EMT), detalhado a seguir [10].

1.2 A transição epitélio-mesenquimal (EMT) e seu envolvimento na progressão tumoral

A capacidade de células tumorais invadirem tecidos adjacentes, migrarem a partir da massa tumoral primária e formarem novos tumores secundários

tornam a invasão tecidual importantes pontos para o controle e/ou interrupção da progressão tumoral, e consequentemente, de grande relevância para o diagnóstico e/ou erradicação do câncer. Embora a ressecção cirúrgica e as terapias adjuvantes representem alternativas eficazes no combate aos tumores em seus estágios iniciais, o tumor já em metástase, em grande parte, torna-se incurável devido à sua natureza sistêmica e a resistência das células tumorais disseminadas aos agentes terapêuticos atuais [11].

As metástases provenientes de tumores primários são originadas a partir de sucessivos e complexos eventos celulares denominados cascata de invasão metastática [12]. Durante este processo, as células epiteliais tornam-se capazes de, inicialmente, perder a adesão célula-célula e ganhar motilidade, se desprendendo do seu sítio de origem e invadido o estroma e os tecidos adjacentes. Na segunda etapa, chamado intravasão, as células tumorais rompem a membrana basal, matriz celular especializada que desempenha um papel vital na organização de tecidos epiteliais, penetram através do endotélio vascular sanguíneo ou linfático e ganham a circulação sistêmica. Apenas algumas células tumorais parecem ser capazes de sobreviver neste ambiente. Dentre estas, algumas completam o terceiro passo, a extravasão, caracterizado pela penetração das células tumorais no endotélio dos capilares, atingindo sítios distantes. Neste novo microambiente, um conjunto ainda menor de células metastáticas conseguem proliferar, formando um pequeno conjunto de células malignas (micrometástases) e originando novos tumores metastáticos secundários **(Figura 2)** [2, 3].

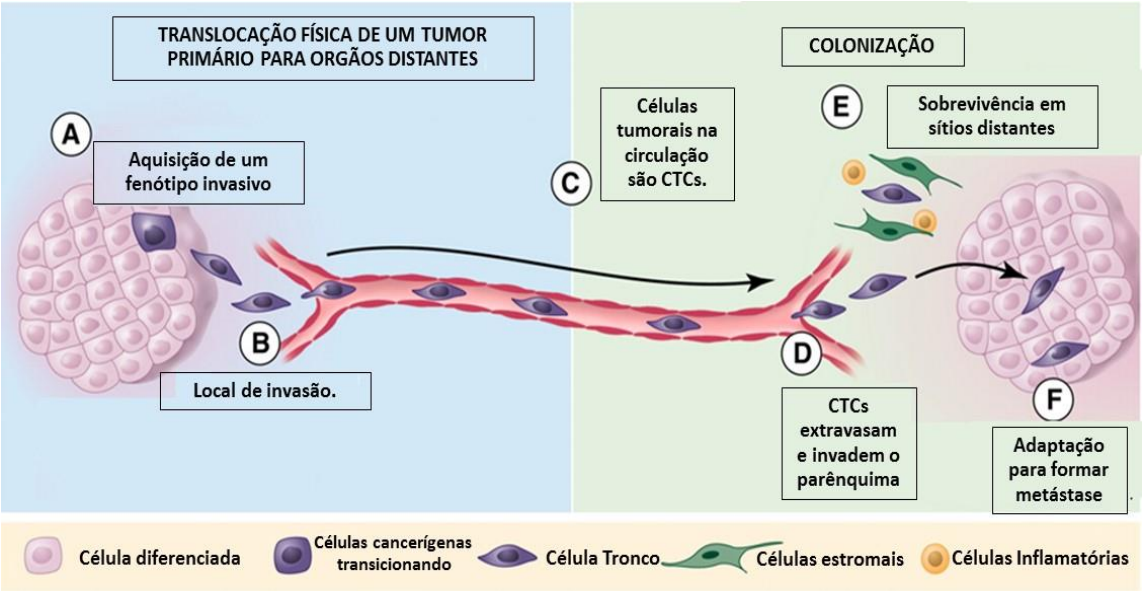

Figura 2- A cascata metastática. A metástase pode ser visualizada como um processo que ocorre em duas fases principais: (I) translocação física de células cancerígenas do tumor primário para um órgão distante e (II) colonização das células translocadas dentro desse órgão. (A) Para iniciar a cascata metastática, as células cancerosas dentro do tumor primário adquirem um fenótipo invasivo. (B) Células cancerosas podem então invadir a matriz circundante e em direção aos vasos sanguíneos, onde elas se intravasam para entrar na circulação, que serve como principal meio de passagem para órgãos distantes. (C) Células cancerosas viajando pela circulação são células tronco (CSC). Eles exibem propriedades de sobrevivência independente de ancoragem. (D) No órgão distante, as CTCs saem da circulação e invadem o microambiente do tecido secundário. (E) Neste local, as células cancerosas devem ser capazes de escapar da resposta imune inata e também sobreviver como uma única célula (ou como um pequeno aglomerado de células). (F) Para se transformar em um depósito macrometastático ativo, a célula cancerígena deve ser capaz de se adaptar ao microambiente e proliferar (Adaptado – Chaffer e Weinberg, 2011) [13].

Diversas evidências indicam que a precisão do controle da arquitetura do tecido epitelial normal pode agir como uma barreira intrínseca à invasão das células tumorais metastáticas, que devem ser superadas antes que elas possam desenvolver características malignas mais evidentes. Neste sentido, a fim de se esquivar dos obstáculos à invasão e a formação metastática, as células tumorais podem optar por um mecanismo que reduz a adesão celular, favorecendo a perda da polaridade ápico-basal, conhecido como transição epitélio mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*). A EMT é caracterizada pela mudança do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal, levando a reorganização e expressão de proteínas de citoesqueleto e à produção de enzimas de degradação de matriz extracelular, além da aquisição de propriedades locomotoras invasivas [14].

Inicialmente descrita em 1968, a EMT foi revelada com um processo de grande importância no movimento celular de embriões, e apenas na década de

80, Greenburg e HAY (1982) demonstraram pela primeira vez a transição fenotípica das células epiteliais *in vivo* [15]. Atualmente, a EMT é reconhecida como um mecanismo envolvido não apenas na embriogênese, mas também no reparo tecidual e tumorigêneses, sendo classificada em três tipos, onde cada uma desempenha funções diferentes. Além disso, com o estudo mais detalhado dos mecanismos da EMT, pode-se subdividir este processo geral em diferentes subgrupos [10]:

1. EMT tipo 1: Está associada ao desenvolvimento embrionário inicial e dá origem à mesoderme, endoderme e células móveis da crista neural. O epitélio primitivo, especificamente o epiblasto, passa por alterações moleculares e origina o mesênquima primário, rico em células mesenquimais migratórias primárias. Essas células podem potencialmente passar por uma etapa inversa e voltarem a células epiteliais através da transição mesenquimal-epitelial (MET), e assim gerar epitélios secundários nos embriões em desenvolvimento.

2. EMT tipo 2: Resulta em um processo de inflamação e é iniciada após uma lesão local onde os fibroblastos e as células imunológicas liberam citocinas e outros fatores pró inflamatórios, bem como proteínas da matriz extracelular que estimulam a EMT nas células epiteliais para gerar células mesenquimais necessárias na cicatrização do local. Ao contrário da EMT do tipo 1, a do tipo 2 se estabelece por períodos mais prolongados e se a inflamação persistir patologicamente, o processo de EMT contínua e as células epiteliais normais podem se diferenciar e gerar uma fibrose ou até lesões nos órgãos.

3. EMT tipo 3: Está diretamente relacionada ao desenvolvimento tumoral, pois permite que as células epiteliais adquiram características fenotípicas mesenquimais invasivas essenciais ao processo de metástase [10, 16]. Neste processo, as células de origem epitelial perdem seu contato célula-célula através de junções celulares (*tight junctions*), junções aderentes (*adherens junctions*), desmossomos e junções comunicantes (*gap junctions*), e adesão

célula-matriz é favorecida. Concomitantemente estas células adquirem características motoras que permitem que elas deixem o tumor primário para iniciar o processo de migração [2, 3, 17]. Desta forma, durante o processo de EMT tipo 3, a célula epitelial perde sua polaridade ápico-basal e adquire uma polaridade ântero-posterior. Tais modificações fazem com que a célula adquira uma morfologia mesenquimal e, consequentemente, maior capacidade invasiva.

Ainda, para que o processo de EMT ocorra, é necessário a repressão de uma série de marcadores epiteliais, ao passo que a expressão de marcadores mesenquimais seja estimulada. No tecido epitelial normal, as células são fortemente ligadas entre si através de adesões célula-célula, as quais suportam grande parte do estresse mecânico. A aderência entre as células e a matriz extracelular acontece por meio de proteínas de adesão, como caderinas e integrinas que se ligam ao citoesqueleto [10]. As junções aderentes compostas de E-caderina em conjunto com anéis de cateninas e actinas presentes nas células epiteliais normais estão associadas com os complexos de polaridade apical, ao passo que as integrinas interagem com componentes da membrana basal [14].

À medida que moléculas indutoras da EMT reprimem a transcrição dos genes codificadores dos componentes das junções celulares, ocorre perda da aderência célula-célula e da polaridade celular. Dessa forma, como consequência, a proteína E-caderina é internalizada e direcionada para a degradação e ocorre o remodelamento de todo o citoesqueleto que favorece a migração celular através da desorganização da membrana basal. A expressão dos receptores de integrina e a ativação de metaloproteases induzem o processo de migração através da matriz extracelular e a posterior invasão de tecidos adjacentes [2].

A influência do microambiente tumoral em células com fenótipo epitelial é mediada por uma série de moléculas de sinalização, entre as quais Wnt, TGFβ e Notch desempenham um papel central [18]. A nível molecular, a EMT é marcada pela perda ou redistribuição de fatores epiteliais, como E-Caderina e

β-Catenina, e superexpressão de fatores mesenquimais como Vimentina e N-Caderina [19], além da participação de repressores transcricionais específicos de E-Caderina, como SNAIL, SLUG, TWIST e ZEB1/2 **(Figura 3)** [20-22].

À medida que as conexões entre EMT e carcinomas progridem, o número de moléculas de sinalização identificadas também continua a crescer, entre eles o fator de crescimento epidérmico (EGF) que atua através de receptores tirosina quinases, o fator de crescimento de insulina (IGF), o fator de crescimento de hepatócito (HGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e derivados de plaquetas (PDGF). Além disso, sinais induzíveis por hipóxia (HIF-α), bem como sinais inflamatórios (NF-kβ), citocinas (IL-1β) e o fator de necrose tumoral (TNFα), têm cooperação na rede complexa de sinais que disparam a EMT [23].

Dentre todos estes fatores, o TGFβ é o mais estudado na indução da EMT, podendo se ligar a um de seus receptores (TGFR1 ou TGFR2) e desencadear uma cascata de sinalização dependente de SMAD. Essa cascata de sinalização é responsável por ativar fatores de transcrição conhecidos por atuar em processos como evasão a apoptose e degradação da matriz extracelular ou mimetizar o sinal desencadeado por receptores tirosina quinase independente de SMAD, ativando vias importantes como MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK), PI3K/AKT e Rho/GTPase [24, 25].

Outro fator de transcrição altamente importante ativado durante a EMT é o SNAIL, membro da família SNAIL de fatores de transcrição e um dos principais reguladores da EMT. Estudos anteriores mostraram que SNAIL é superexpresso em vários tipos tumorais e correlacionado com a agressividade, metástase, recorrência e falta de prognóstico. Este efeito é parcialmente devido a sua capacidade de inibir diretamente a transcrição de genes relacionados a adesão celular, principalmente E-caderina. Além disso, SNAIL também se encontra regulado durante a sobrevivência de células cancerígenas, ciclo celular, evasão a apoptose, adesão celular, diferenciação neuroendócrina e é encontrado superexpresso na região invasiva de tumores [9, 26]. Durante a indução da EMT com TGFβ também foi encontrado que SNAIL forma um complexo repressor com SMAD 3/4, que tem como alvo genes que codificam

proteínas relacionadas a função celular, como E-caderina, ocludina, resultando na repressão destes genes. Dessa forma, o SNAIL é extremamente controlado por modificações pós-traducionais, níveis transcricionais e ainda desempenha mecanismos no controle da expressão de genes alvos da regulação epigenética [27].

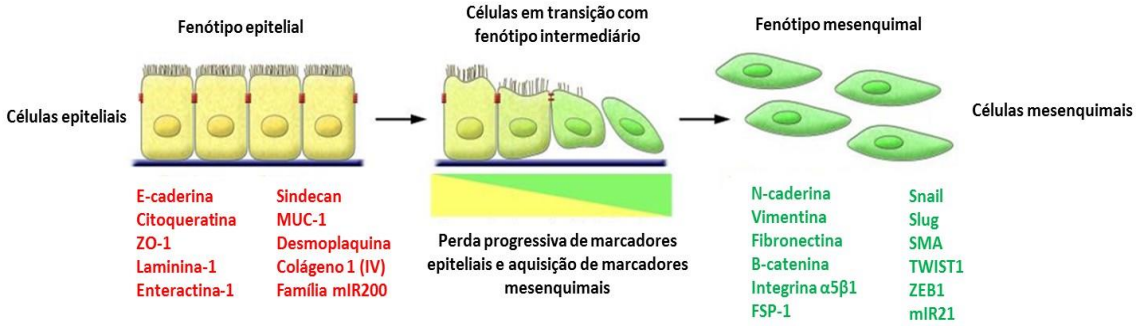

Figura 3- O processo de EMT. O processo de EMT envolve a transição funcional de inúmeros genes de células epiteliais polarizadas em células mesenquimais com capacidade invasora e migratória. A co-localização destes dois fenótipos distintos define um fenótipo intermediário, indicando um estágio parcial de EMT (Adaptado Kalluri e Weiberg, 2009).

É importante destacar ainda que, devido à complexidade do processo de invasão e progressão tumoral, não apenas estas etapas levam as células tumorais a se tornarem metastáticas, mas provavelmente, muitos mecanismos atuando em conjunto. Assim, a etapa final da progressão tumoral é composta por inúmeros passos que necessitam de constante sintonia entre vias e moléculas sinalizadoras, exigindo a coordenação de uma complexa rede de sinalização intracelular que envolve alterações na transcrição, regulação e expressão gênica [12].

Por fim, a compreensão do programa de EMT se faz importante e continua a sua centralidade para progressão do câncer e metástase. Apesar das melhorias no diagnóstico e tratamento, a maioria das mortes causadas por câncer se deve ao fato da metástase ser resistente a terapias convencionais, e sua principal barreira ao tratamento está na heterogeneidade biológica das células nos tumores primários e nas metástases. Além deste fato, os mecanismos do processo de invasão e metástase do câncer ainda não são bem compreendidos e o entendimento a nível celular, molecular e sistêmico representa um fator essencial na pesquisa do câncer. Recentemente, foi reportado a influência da epigenética e agentes químicos que também podem

interferir durante o processo de EMT e métástese, induzindo fatores de transcrição importantes para obtenção do fenótipo mesenquimal, os quais serão detalhados nas sessões seguintes [26].

1.3 Inibidor de Histonas deacetilases como indutor da EMT

As células eucarióticas apresentam como característica a compactação do DNA em cromossomos, constituído por proteínas histonas e proteínas cromossômicas não-histonas. Esta estrutura cromática é propriamente dinâmica, podendo se condensar ou descondensar de acordo com fases do ciclo celular agindo como regulador do acesso ao material genético. Este mecanismo é facilitado por algumas enzimas e modificações pós traducionais que permitem um controle fino para replicação, reparo ou expressão gênica (Albert, 2011).

O nucleossomo é definido como a unidade básica da estrutura da cromatina, consistindo em uma fita de DNA (aproximadamente 200 pb) enrolada à um núcleo proteico octamérico, constituído de proteínas histonas que mantém a estrutura unificada (Albert, 2011). As histonas são proteínas que se apresentam internamente à estrutura do nucleossomo, com suas caudas N-terminais prolongadas para região exterior, e dessa forma, se tornam passíveis de modificações epigenéticas. Estas modificações ocorrem por meio da ligação covalente de substituintes as cadeias laterais de aminoácidos em sua região N-terminal, podendo ser metiladas, fosforiladas e/ou acetiladas, mecanismos que regulam o acesso às regiões promotoras do material genético [28, 29].

O processo reversível de acetilação de resíduos de lisinas nas histonas é realizado por enzimas denominadas histona acetiltransferases (HATs), relacionado com à neutralização da carga positiva das lisinas e, por consequência, a descompactação da estrutura da cromatina, deixando o acesso livre à fatores de transcrição ao material genético [30]. Já o efeito contrário leva a retirada dos grupos acetil de lisinas, realizado por enzimas antagonistas funcionais de HATs, chamadas histonas deacetilases (HDACs), que levam a condensação do material gênico em heterocromatina, e consequentemente, inibem o processo de transcrição [30-32]. Dessa forma, os mecanismos de acetilação e deacetilação de histonas possuem papel

fundamental na conformação da cromatina e em processos epigenéticos que têm sido recorrentemente associadas aos diferentes processos celulares e neoplásicos e consequentemente, com a EMT e progressão tumoral [26].

Neste contexto, HDAC1 é uma histona deacetilase já descrita em alguns estudos de forma controversa, podendo agir tanto como repressora do processo de metástase, ou estar aumentada em células tumorais. Assim, a inibição de HDAC1 tem sido alvo de diversos estudos que buscam compreender tal processo [26, 28, 33]. Os inibidores de HDAC (HDACi) agem através do bloqueio da atividade de histonas deacetilases, aumentando o mecanismo de acetilação, deixando a cromatina transcricionalmente ativa [34].

A classificação de inibidores de HDACs está relacionada tanto à classe de HDACs que estes químicos inibem, quanto a sua composição química. Segundo a estrutura química, estes inibidores podem ser classificados como peptídeos cíclicos (como romidepsina), ácidos alifáticos (como ácido valpróico), benzamidas (como MS-275) e hidroxamatos (como ácido hidroxâmico suberoilanilida, SAHA) [34, 35]. Da mesma forma que a ação das HDACs, os HDACis são também descritos de forma contraditória na literatura em relação ao desenvolvimento tumoral. Alguns destes inibidores já estão em fases de testes clínicos avançados ou em uso no tratamento de neoplasias. Porém, ainda que os avanços no uso destes químicos para o tratamento de tumores tenham progredido, a literatura recente aponta relações entre HDACi e a regulação de fatores de transcrição e proteínas correlacionadas aos mecanismos de progressão tumoral, principalmente relacionados à EMT [36, 37].

O ácido hidroxâmico suberoilanilida (SAHA, Vorinostat) é um dos inibidores descrito como inibidor de HDAC, propiciando a acumulação de grupos acetil em proteínas histonas e não-histonas [38]. Vários testes clínicos foram realizados utilizando o inibidor SAHA, isolado ou em associação com outras drogas para o tratamento de diferentes tipos de câncer (Clinical Trials). Estudos demonstraram que SAHA é capaz de promover a parada do ciclo celular, apoptose e diferenciação celular, enquanto pode ainda inibir a angiogênese junto com a promoção da migração celular e invasão [38, 39].

O uso de SAHA foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) em outubro de 2006 nos Estados Unidos, para o tratamento de linfoma cutâneo de células T [37, 40] e se encontra ainda em fase de ensaios clínicos para o tratamento de diversos tumores hematológicos e sólidos como câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, glioma e leucemias [41]. Porém, estudos de fase II para o tratamento do câncer de mama metastático com SAHA ainda não foram conclusivos, não tendo atingido os "critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos" [42]. Neste sentido, apesar de seu potencial no tratamento de diversas doenças, trabalhos indicam que o inibidor SAHA possui também efeitos no processo de transição epitelial-mesenquimal e consequente metástase [26], o que pode representar um risco ao seu uso clínico.

Segundo alguns autores, HDACis podem promover a EMT em diferentes linhagens celulares cancerígenas por meio da estabilização de SNAIL [26, 36, 43], importante desencadeador do processo de invasão tumoral e metástase [44]. Entretanto, outros estudos sugerem que HDACis podem inibir a EMT a partir da superexpressão da proteína E-caderina [45, 46]. Assim, é possível notar que os efeitos do inibidor SAHA no processo de EMT são contraditórios e ainda pouco estudados nos diversos tipos celulares, havendo a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos e dos efeitos desse químico.

1.4 Envolvimento de modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante o processo de EMT

1.4.2- Ubiquitinação

Em todas as células, a modulação de processos e alterações disparada por cascatas de sinalização dependem de mecanismos finamente controlados por modificações pós-traducionais. Grande parte da diferença entre os fenótipos das células de organismos multicelulares é devido a diferenças entre regulação transcricional e pós-transcricional que podem levar a diferenças no padrão de expressão proteica. As modificações pós-traducionais como fosforilação, acetilação, hidroxilação e ubiquitinação podem regular a conformação, função e *turnouver* das proteínas celulares, causando impacto na morfologia, atividade, e comunicações célula-célula [47].

O processo de modificações pós-traducionais, em especial, a ubiquitinação e de-ubiquitinação, iniciam uma função crítica em muitos processos relevantes para a biologia do câncer. Estes processos incluem: internalização e degradação de receptores tirosina quinases, localização e degradação de sinais intermediários, regulação de genes de transcrição, reparo de danos no DNA, apoptose e progressão do ciclo celular [48]. A perda deste fino controle regulatório pode estar relacionada a diversas neoplasias, incluindo o processo de metástase, tornando as modificações pós-traducionais importantes alvos para estudo da EMT [49].

Em geral, durante modificações pós-traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma, proteínas alvos são marcadas por ubiquitinação, sumoilação, e/ou nedilação e encaminhadas para degradação no proteassoma. A ubiquitina é uma proteína constituída por 76 aminoácidos, que é incorporada em resíduos de lisina na proteína alvo por uma cascata de reações ativada por três enzimas. A primeira enzima, enzima de ativação (E1), carrega a molécula de ubiquitina de maneira dependente de ATP até a enzima de conjugação (E2). Este complexo é subsequentemente transferido à proteína alvo por enzimas E3 ligases específicas [48]. Enquanto não existem mais de enzimas E1, várias E2 e E3 são requeridas, responsáveis pela seletividade e especificidade da molécula alvo de degradação **(Figura 4).**

Além da degradação por proteassoma, o destino de um conjugado proteína-ubiquitina depende, em parte, do comprimento dos oligômeros de ubiquitina e da configuração das ligações ubiquitina-ubiquitina na cadeia de da própria proteína. Cadeias de quatro ou mais ubiuqiutinas nas quais o C-terminal de uma ubiquitina está ligado a Lys48 da próxima ubiquitina, eficientemente promovem a ligação da proteína modificada ao proteassoma 26S, com subsequente degradação e reciclagem da ubiquitina. Ainda, a própria cadeia de ubiquitina, que apresenta 7 resíduos de lisina nas posições 6, 11, 27, 29, 33, 48 e 63, também pode ser modificada com outras moléculas de ubiquitina. Esse processo, denominado poli-ubiquitinação representa um nível adicional de sinalização em potencial, e endereça a proteína alvo para destruição pelo proteassoma ou lisosoma, ou ainda a transporta para compartimentos específicos, para sofrer endocitose ou participar em diversos

processos bioquímicos [48, 50]. Assim, a monoubiquitinação ou a poli-ubiquitinação por cadeias de ubiquitina interligadas pela Lys63 pode ter uma variedade de consequências para a proteína alvo e que não incluem degradação proteassomal, mas, ao invés disso, podem ser endocitadas ou até translocadas de compartimento celular [51-53].

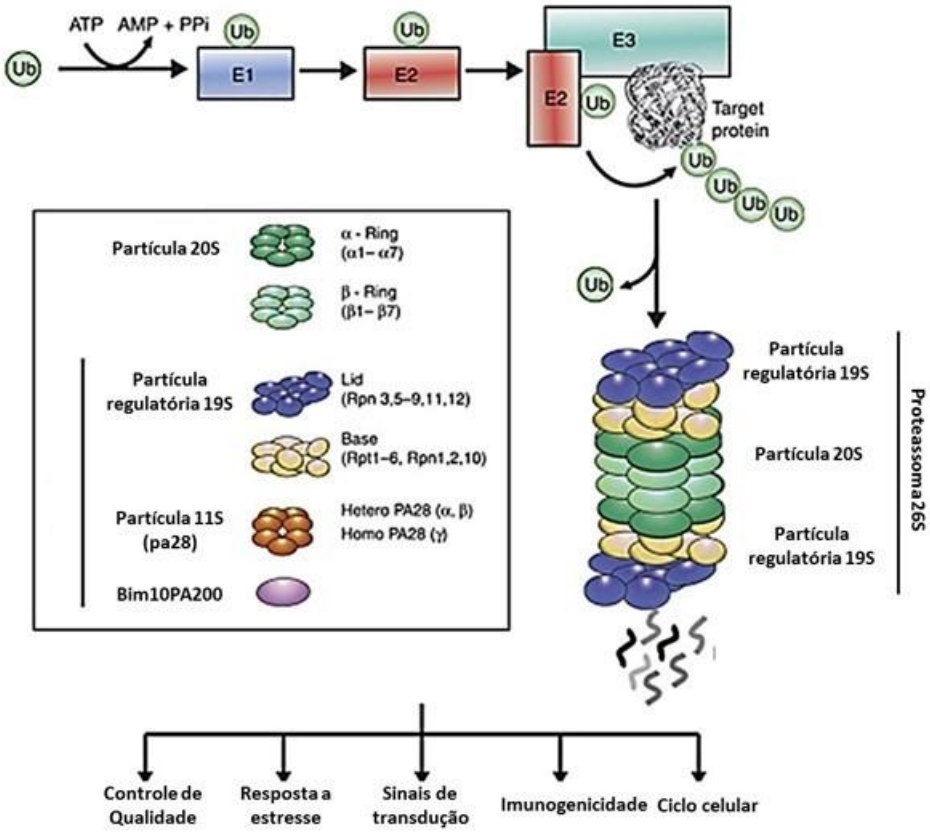

Figura 4- Mecanismo de ação coordenada do sistema ubiquitina proteassoma para degradação proteica. A degradação é iniciada pela conjugação da proteína ubiquitina com resíduos de lisina conservados a proteína alvo. A ligação da molécula de ubiquitina é realizada através de três reações enzimáticas. Primeiro, E1 ativa o resíduo de glicina carboxy-terminal da ubiquitina de maneira dependente de ATP. A ubiquitina ativada é então transferida para o sítio de cisteína da enzima E2. No terceiro passo, a E3 liga a ubiquitina da E2 ao resíduo de lisina da proteína alvo. Enquanto aparentemente não existem mais enzimas E1, existem várias E2 e E3 ubiquitina ligases, que são responsáveis pelo processo de degradação seletiva e específica de cada proteína. Depois do processo de ubiqutitinação, as proteínas são degradas no proteassoma, processo envolvido em várias funções celulares, como controle de qualidade do proteomas, resposta a estresse ou regulação do ciclo celular (Adaptado, Vilchez. 2014 [54]).

Partindo do princípio que as células cancerígenas produzem proteínas essenciais para sobrevivência/proliferação celular e inibem mecanismos de morte celular, surgiu a ideia de que inibir o proteassoma poderia ser importante para estudos de novos alvos contra o câncer e assim, deslocar este fino controle do equilíbrio em direção a morte celular. Além disso, a desregulação

de toda essa maquinaria pode resultar no aumento ou degradação de proteínas alvos que contribuem para oncopatogênese. Baseado neste fato, inicialmente foram desenvolvidos inibidores do proteassoma (IPs) com potencial benéfico, primeiramente voltado para o tratamento da caquexia relacionado ao câncer, posteriormente, muitos estudos pré-clínicos posteriores surgiram e demonstraram induzir apoptose em linhagens celulares e modelos murinos de câncer. Uma das principais hipóteses que conduziu o estudo dos IPs foi baseado na inibição da sinalização de NFKβ, evitando assim, sua translocação nuclear. Essa justificativa levou ao desenvolvimento do bortezomibe, um inibidor do proteassoma de primeira geração e, posteriormente, de agentes de segunda geração, incluindo carfilzomibe, ixazomib e oprozomibe [47, 55-57].

Há cerca de uma década, o inibidor bortezomibe demonstrou atividade clínica interessante como agente único no tratamento de mieloma recidivo e/ou refratário, levando a sua aprovação acelerada pela FDA em 2003. Sua aprovação foi inicialmente para pacientes com doença refratária ao tratamento, como tratamento resgate, com aprovação completa do fármaco em 2005. O bortezomibe foi o primeiro inibidor do proteassoma a ser colocado em uso clínico e age de forma reversível, se ligando ao sítio catalítico do proteassoma 26S possibilitando a inibição do efeito β5/quimotripsina e das atividades hidrolisantes do peptídeo β2/tripsina e β1/pós glutamil11 **(Figura 5 A e B)** [57].

Outro inibidor do proteassoma bastante estudado é o MG132 (carbobenzoxil-L-leucyl-L-leucyl-Leucynal). Da mesma forma que o bortezomib, o MG132 inibe o proteassoma 20S por ligação covalente ao sítio ativo das suas subunidades beta e efetivamente bloqueia a atividade proteolítica do complexo do proteassoma 26S. Estudos anteriores demonstraram que MG132 pode induzir a parada do ciclo celular e ainda desencadear mecanismos apoptóticos **(Figura 5 B)** [58]. Porém, apesar de inibidores do proteassoma serem utilizados para tratamento clínico, pouco se sabe sobre sua ação durante o processo de EMT e progressão tumoral, fato que torna essencial o entendimento dessas vias para descoberta de novos alvos e potenciais alternativas terapêuticas.

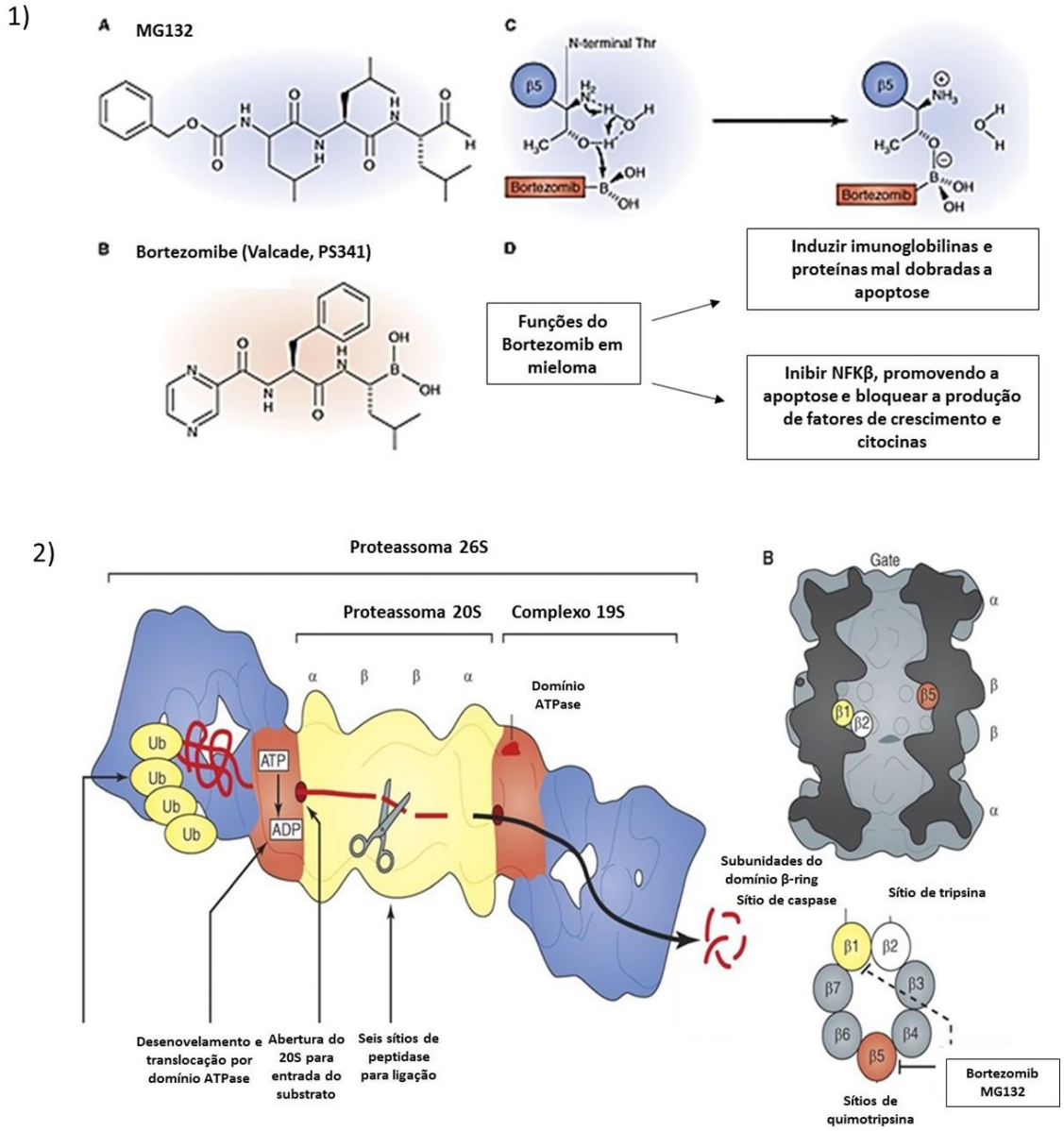

Figura 5- 5.1) Representação esquemática dos inibidores do proteassoma e função do bortezomib em mieloma A) MG132 e B) Bortezomib. 5.2) Estrutura e função do proteassoma 26S. A) Estrutura e componentes do proteassoma B) Sítios ativos do proteassoma 26S. Existem três tipos de sítios proteolíticos na câmara central do proteassoma 20S, e cada anel β contém três sítios ativos. O bortezomib e o M132 atuam principalmente no sítio semelhante a quimotripsina na subunidade β, mas também inibem o local semelhante a caspase em alta concentração**.**

1.4.2- Deubiquitinação

Embora maior atenção esteja voltada para vias de ubiquitinação durante a tumorigênese, só recentemente o processo reverso de de-ubiquitinação tem sido explorado. A ativação de de-ubiquitinases (DUBs) pode também participar da regulação de inúmeros processos celulares, resgatando proteínas endereçadas à degradação e translocando-as para seus sítios originais, ou

ainda revertendo mudanças conformacionais induzidas pela ligação de ubiquitina. As DUBs são enzimas que apresentam uma diversidade de funções, podendo agir como tanto como oncogenes ou supressores tumorais [59-61].

A análise do genoma humano demonstrou a presença de aproximadamente 80 DUBs funcionais que podem ser divididas em seis classes com base na homologia do sitio ativo: Proteases específicas da ubiquitina (USPs), hidrolases carboxi-terminais ubiquitinas (UCHs), proteases do tumor ovariano (OTUs), proteases do domínio da proteína Machado-Joseph, metalopeptidades associadas ao domínio JAMM/MNP, e proteína induzida por proteína quimiotática de monócitos (MCPIP). Assim, cada DUB apresenta função de acordo com a classe a que participa [53].

As DUBs opõem-se à ação das E3 ligases, clivando a ligação isopeptídica entre os resíduos de lisina nas proteínas alvo e a glicina do C-terminal da ubiquitina. Ainda, quando ocorre o comprometimento de um substrato com a proteólise proteossômica ou vacuolar, as DUBs regulam negativamente a degradação proteica. Por outro lado, a de-ubiquitinação de substratos proteolíticos do sistema ubiquitina proteassoma é necessário para manter a taxa de proteólise normal, ajudando a manter um conjunto suficiente de ubiquitinas livres dentro da célula. Além disso, estas proteínas são responsáveis pelo processamento de precursores de ubiquitina inativas e por manter o proteassoma 26S livre de cadeias de ubiquitinas “livres” que possam competir com substratos ubiquitinados para locais de ligação à ubiquitina [53, 61-63].

Uma de-ubiquitinase pouco descrita e altamente importante para o desenvolvimento tumoral é USP7, conhecida por regular a via p53-MDM2, onde USP7 pode regular negativamente os níveis de p53[64] [65]. Estudos anteriores mostraram que sob condições normais USP7 estabiliza os níveis de MDM2 encaminhando p53 para degradação [66]. A consequência funcional da inibição de USP7 inclui diminuição dos níveis de MDM2, com consequente acúmulo de p53, levando a parada do ciclo celular através de p21 e morte celular. Além disso, USP7 foi descrita como possível regulador da EMT, uma

vez que sua inibição leva ao aumento da expressão de E-caderina, e diminuição de Vimentina e N-cadherina [66].

Da mesma forma que os inibidores de proteínas quinases, foram descritas pequenas moléculas inibidoras das DUBs, desde inibidores inespecíficos até inibidores de enzimas DUBs únicas. Também em analogia com os inibidores quinases, os inibidores inespecíficos provavelmente provocam efeitos biológicos mais profundos, mas também apresentam toxicidade inespecífica mais forte. A inibição de DUBs específicas pode levar à inibição de múltiplas funções celulares, levando a diminuição na atividade da própria proteína e ainda afetar oncoproteínas reguladas por elas [59].

Estratégias terapêuticas utilizando inibidores específicos de USP7 pode apresentar efeitos durante o desenvolvimento tumoral e EMT. Um dos inibidores de USP7, conhecido como P5091, inibe ativamente USP7 resultando em poli-ubiquitinação de MDM2 e degradação acelerada pelo proteassoma, consequentemente aumentando os níveis de p53 e p21. Estudos em células de mieloma múltiplo revelaram que P5091 inibiu o crescimento, desencadeou a apoptose e prolongou a sobrevida em animais. Além disso, o tratamento combinado de P5091 e SAHA induziu a atividade sinérgica anti-mieloma múltiplo *in vitro* [66, 67]. Juntos, estes dados sugerem que inibidores específicos e seletivos de DUBs, mais precisamente USP7, podem ser utilizados como estudos de novos alvos terapêuticos

Aqui fica claro que todos os estágios de ubiquitinação e de-ubiquitinação podem ser relevantes para a EMT e, consequentemente, para a progressão tumoral [49, 68]. Portanto, inibidores de enzimas envolvidas na ubiquitinação e de-ubiquitinação que já são objetos de estudos clínicos para controle da progressão tumoral [69] são relevantes no contexto da EMT [47, 70-72]. Além disso, a maioria dos trabalhos envolvendo EMT se restrita a analisar o conteúdo do transcriptoma envolvido na regulação do processo, mas possui limitações significativas. Neste contexto, a proteômica se revela como uma ferramenta fundamental para o entendimento mais completo dos mecanismos envolvidos na EMT relacionados com o UPS que possam permitir a identificação de novos efetores da transição.

1.5 Estudos proteômicos aliados a pesquisa contra o câncer

As proteínas desempenham papel central durante os diferentes eventos biológicos e com isso, servem como alvos terapêuticos diretos. Análises de perfis proteômicos específicos do tumor também pode permitir uma melhor compreensão do desenvolvimento tumoral e ainda identificar novos alvos terapêuticos para o câncer. Como as proteínas são as reais efetoras celulares, a predição gênica muitas vezes não é viável para identificação de uma molécula biomarcadora. Dessa forma, mecanismos como a regulação da função proteica a partir da proteólise, reciclagem e isolamento de compartimentos celulares afetam os produtos genéticos, não genes. Finalmente as interações proteína-proteína e composição das estruturas celulares podem ser determinadas apenas a nível proteico [73].

Neste contexto, a proteômica surgiu como uma tecnologia poderosa para decifrar e integrar os processos biológicos a partir do estudo de todas as proteínas de um sistema biológico. A caracterização do perfil proteômico é fundamental para o entendimento do fenótipo de um organismo uma vez que a estrutura, função, abundância, ou mesmo o número de proteínas em um organismo não podem ser preditos apenas pela análise do genoma ou quantificação de genes mais expressos. Abordagens proteômicas são utilizadas para identificar independentemente alterações nas funções das proteínas ou em suas concentrações que podem ocorrer, por exemplo, durante o desenvolvimento do câncer ou ainda validar variações proteicas previstas por análises de expressão gênicas [74].

O advento da espectrometria de massas evoluiu para se estabelecer como uma plataforma voltada para análise de proteomas complexos, através da comparação entre milhões de espectros de massas e bancos de dados preexistentes, permitindo a identificação de milhares de proteínas simultaneamente dos mais diversos compartimentos celulares em uma ampla faixa de concentrações [75]. O aprimoramento de técnicas para quantificação, separação e identificação de proteínas favoreceram uma análise de proteomas de forma mais intensa, a fim de se entender melhor as funções de diversas proteínas de um organismo. Assim, o avanço desta tecnologia já tem gerado

impactos de grande relevância para diversas doenças, especialmente aliado a descoberta de biomarcadores, uma das grandes promessas da proteômica [76].

A caracterização do perfil proteômico alterado durante o processo de EMT têm sido abordado e diversos avanços foram alcançados. Para ilustrar estes avanços, diversos estudos publicados nos últimos anos apresentam listas extensas de proteínas candidatas a biomarcadoras e alvos terapêuticos para EMT e câncer de mama. Resultados obtidos por nosso grupo identificaram uma lista de 4289 proteínas em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) induzidas a EMT a partir da superexpressão do fator de transcrição SNAIL, com 348 proteínas diferencialmente expressas [26]. Dessas, algumas já são consideradas como biomarcadoras para o processo de EMT, e outras ainda com potencial para se tornarem alvos, com proteínas ainda relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma, como USP7 e USP5 [26].

A proteômica de larga escala voltada para a identificação de milhares de proteínas é de extrema importância para estudos proteômicos, sendo possível avaliar milhares de proteínas alteradas durante um modelo de estudo biológico. Entretanto, com quando o intuito é o descobrimento de assinaturas moleculares que serão utilizadas para caracterização de muitas amostras individualmente, essa estratégia se torna inviável. Assim, uma nova abordagem de proteômica dirigida (*targeted proteomics*) vêm ganhando espaço. Neste caso, são criados painéis com proteínas de interesse que são monitoradas simultaneamente por espectrometria de massas associada a cromatografia líquida, método denominado SRM ou MRM (Monitoramento de reações selecionadas ou múltiplas) [76, 77].

Para esta técnica, peptídeos normalmente trípticos e representados das proteínas de interesse, denominados proteotípicos, são selecionados, sintetizados e utilizados, criando assim um método para quantificação absoluta e simultânea de dezenas de proteínas. Além disso, a abordagem de proteômica dirigida apresenta vantagens significativas em termos de sensibilidade, reprodutibilidade e precisão quando comparada a proteômica de larga escala. Cada técnica proteômica apresenta suas vantagens e podem

ainda ser complementares, auxiliando na descoberta de novos biomarcadores e alvos terapêuticos conta o câncer [77].

Dada a importância das modificações pós-traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma e do processo de EMT no desenvolvimento e metástase do câncer, a identificação das alterações proteômicas envolvidas na EMT bem como alterações em enzimas específicas que modulam a estabilidade de proteínas chaves envolvidas na progressão tumoral, pode contribuir para a elucidação de novas vias de sinalização, processos biológicos e proteínas relevantes para diagnóstico e tratamento do câncer.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar através de abordagens proteômicas a influência de vias de sinalização relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma e alteradas em modelos de progressão tumoral com o processo de transição epitélio mesenquimal (EMT).

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Utilizar dados proteômicos disponíveis para uma metanálise de possíveis proteínas relacionadas ao controle de processos de ubiquitinação/de-ubiquitinação envolvidas durante a EMT.

- ✓ Estabelecer e caracterizar o processo de EMT como um modelo de metástase tumoral na linhagem epitelial de adenocarcinoma humano de mama MCF-7, utilizando o inibidor de histonas deacetilase SAHA;

- ✓ Padronizar os inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma (MG132 e P5091) nas células MCF-7 e durante o processo de EMT;

- ✓ Avaliar morfologicamente, molecularmente e funcionalmente o processo de EMT alteradas com os inibidores MG132 e P5091;

- ✓ Coletar dados proteômicos detalhados por espectrometria de massas de alta resolução acoplados a cromatografia líquida (LC-MS/MS) e analisar de forma quantitativa e qualitativa;

- ✓ Coletar dados proteômicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma através do uso combinado de SAHA e MG132;

- ✓ Validar os dados proteômicos obtidos por western blotting;

- ✓ Selecionar as principais proteínas e vias de sinalização alteradas durante a EMT para desenvolvimento e aplicação de métodos de Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM) utilizando o inibidor de USP7, P5091.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fluxograma da metodologia utilizada

A metodologia utilizada no desenvolvimento deste trabalho encontra-se resumidamente da **Figura 6** a seguir.

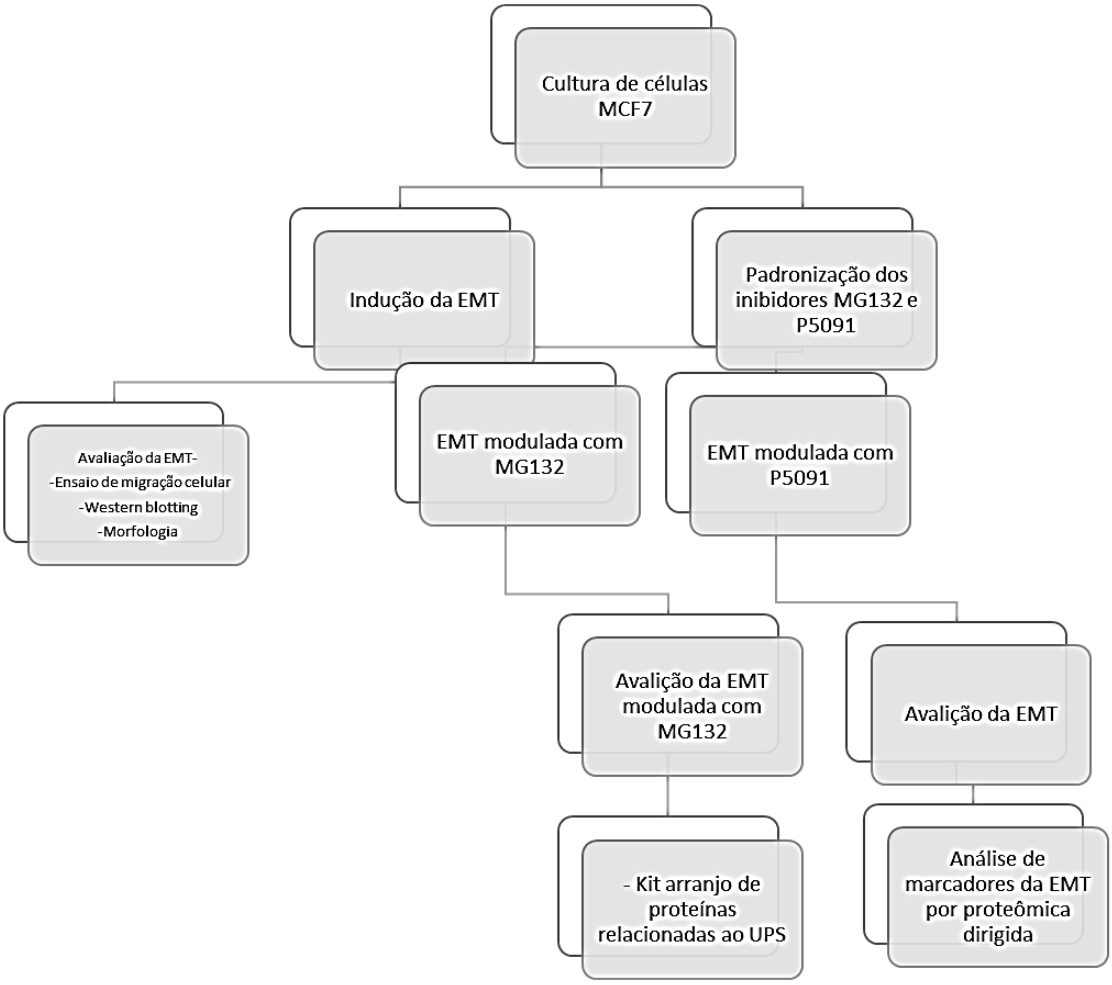

Figura 6- Fluoxograma da metodologia utilizada na indução da EMT em células MCF-7 pelo inibidor de histonas deacetilases SAHA, e análises de alterações morfológicas e proteicas decorrentes.

3.1 Estabelecimento e caracterização da EMT como um modelo de metástase em linhagem epitelial de adenocarcinoma humano

3.1.1- Cultivo da linhagem celular MCF-7

A linhagem epitelial MCF-7 (ATCC nº HTB-22TM), provenientes de adenocarcinoma da glândula mamária foram cultivadas em garradas de 75 cm^2 (*Greiner Bio-one*) contendo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium -*

Gibco) com 10% de SFB e 1% de antibiótico Streptomicina Penicilina à temperatura controlada de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2.

O crescimento celular foi monitorado em microscópio invertido de fase (Axiovert 40CFL, Carl Zeiss) e as células foram subcultivadas a cada quatro dias ou quando ocupassem 70% da garrafa (subconfluência). Neste procedimento, também chamado “tripsinização”, o meio de cultura foi removido e a monocamada celular foi lavada com 5 mL de PBS. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C com 3 mL de solução de tripsina (diluída uma vez em PBS) (Sigma Aldrich, Código 9002-07-7) até que perdessem a aderência a garrafa. Então 6 mL de meio DMEM completo foi adicionado para inativação da tripsina devido ao SFB presente no meio de cultura. Esta solução foi centrifugada (Thermo Scientific) a 150 xg, durante 5 minutos, a 4°C. O sedimento celular foi então homogeinizado manualmente e suspenso novamente em meio DMEM completo; uma alíquota desta suspensão foi adicionada à garrafa com DMEM completo, originando uma nova passagem da linhagem celular. Todos os experimentos de manutenção e cultivo da linhagem foram realizados em capela de fluxo laminar, seguindo os protocolos recomendados para manter a esterilidade dos materiais, reagentes e meios de cultura utilizados.

3.1.2- Modelo de Indução da EMT

Para a indução da EMT utilizando o inibidor de histona deacetilase (SAHA), um total de $1x10^6$ células foram plaqueadas em placas de 60 cm^2 contendo meio DMEM completo. Após 48 horas de plaqueamento, as células foram lavadas 2 vezes com PBS à temperatura ambiente e induzidas a EMT. A princípio, monitoramos a concentração de SAHA (SML0061, Sigma Aldrich) com 2 µM a 10 µM, e observamos maior mudança morfológica com 10 µM, concentração que prosseguimos nossos experimentos**.** O tempo de tratamento foi de 24 horas e em seguida as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e coletadas em tampão Tris 0,1M (pH 8,5) ureia 8 M para extração de proteínas totais.

3.2 Determinação da concentração dos inibidores químicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma (MG132 e P5091)

3.2.1- Inibidores Químicos

Para avaliar a influência do sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT foram utilizados dois diferentes inibidores químicos específicos, MG132 e P5091, os quais o mecanismo de ação e fornecedor estão demonstrados na **Tabela 1**. Foram realizados ensaios de MTT e avaliação da morfologia para padronizar as melhores concentrações dos inibidores nas células MCF-7.

Tabela 1– Inibidores de algumas enzimas envolvidas em modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma que modulam a estabilidade e translocação proteica.

Inibidor	Enzima-Alvo	Fabricante/ Código
MG132	Inibidor do Proteassoma 26S	Sigma SML-1135
P5091	Inibidor de USP7 e USP47	Sigma- SML0770

3.2.2- Ensaio de Viabilidade Celular - MTT

Foi realizado ensaio de MTT ((3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bronide – 11465015001, Roche) para avaliar a viabilidade celular das células MCF-7 com P5091 e MG132. Para o ensaio, um total de $1x10^4$ células foram plaqueadas em placas de 96 poços e após 48 horas de aderência celular, os inibidores foram aplicados em concentrações exponenciais. Após 24 horas de incubação, foi adicionado 50 µl de MTT juntamente com o transportador de elétrons durante 2 horas. Após este período de incubação, as absorbâncias foram lidas a 450 e 650 nm em leitor de Elisa (Versamarx Tunable Microplate Reader, Molecular Devices).

Os ensaios de MTT foram conduzidos em triplicata, sendo que o primeiro ensaio todos os inibidores foram feitos com as mesmas concentrações exponenciais de 0,05 µM a 10 µM. Após avaliar a viabilidade celular induzida por cada inibidor, definiu-se uma concentração diferente: MG132 de 0,05 µM a 10 µM e P5091 0,10 µM a 15 µM.

3.2.3- Ensaio morfológico dos inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma

Uma vez que o objetivo principal do trabalho era identificar a influência de enzimas específicas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT, foi necessário identificar uma dose não letal às células e que poderia ser capaz de alterar este processo. Para avaliar as mudanças morfológicas decorrentes do uso dos inibidores específicos, as $1x10^5$ células foram plaqueadas em placas de 6 wells e após 48 horas os inibidores foram aplicados em concentrações pré-estabelecidas pelo ensaio de MTT (P5091 15 µM e MG132 1 µM), após 24 horas de tratamento, as células foram visualizadas em microscópio invertido e comparadas com o controle.

3.3 Avaliação dos inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT

3.3.1- Influência de P5091 e MG132 durante a EMT

Para avaliar a influência de MG132 e P5091 durante a transição epitélio mesenquimal, foram realizados ensaios com as células MCF-7 induzidas ao processo de EMT com SAHA 10 µM, conforme pré-estabelecido. Um total de $1x10^6$ células foram plaqueadas em placas de 60 cm^2 e após 48 horas de aderência foi adicionado SAHA 10 µM juntamente com os inibidores. Os experimentos foram realizados em triplicatas e um panorama geral está demonstrado na **Figura 7**.

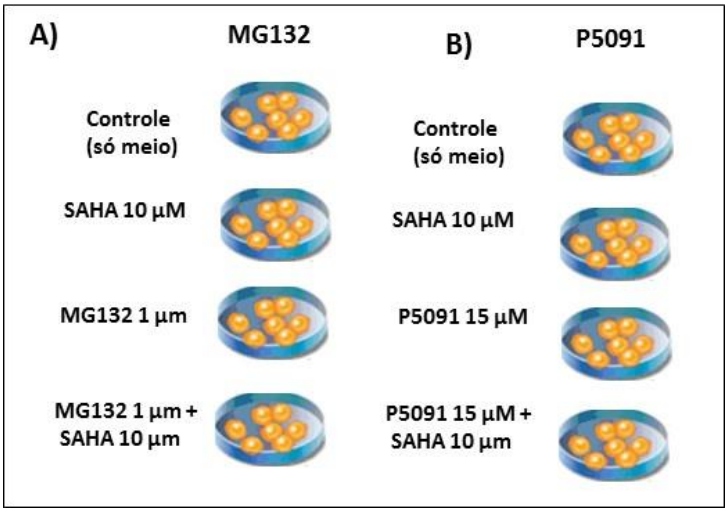

Figura 7- Modelo de indução de EMT juntamente com os inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma utilizados. Tratamento com (A) MG132 e (B) P5091.

3.4 Avaliação da migração celular em MCF7 induzidas a EMT e tratadas com MG132 ou P5091

3.4.1 Ensaio de migração celular – Wound healing

A migração celular foi avaliada pelo ensaio de *Wound-healing*. As células MCF-7 foram crescidas em placas de cultura de 6 poços ($2x10^5$ células/poço) até atingirem a confluência de 80%. Com o auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL foi produzido um risco nas placas e as mesmas foram lavadas 3 vezes com PBS para a remoção das células que possivelmente se soltaram. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37° C na estufa com meio de cultura completo, na presença ou ausência dos modelos de indução e tratamento da EMT como mostrado na **Figura 7- A e B**. As fotos das riscas em locais específicos foram realizadas nos tempos 0, 8, 24 e 30 horas para análise da migração. A área do fechamento da risca foi limitada com o auxílio do software ImageJ nos diferentes tempos.

3.5 Avaliação da expressão proteica por western blotting

As células MCF-7 induzidas à EMT e tratadas com os inibidores MG132 e P5091 plaqueadas e tripsinizadas conforme descrito anteriormente. O pellet foi ressuspendido em 100 µL de tampão de extração (uréia 8 M e Tris 0,1 M, pH 8,5) contendo ortovanadato 1mM (S6508, Sigma) e inibidor de protease (P8340, Sigma) e armazenado em freezer -80 até o momento da extração de proteínas.

3.5.1- Extração celular para western blotting, análise proteômica global, Array e MRM

Para a extração de proteínas destinadas à avaliação por *western blotting* e análise por Monitoramento de Reações Multiplas (MRM), foram feitos 3 ciclos de sonicação em sonicador de banho (UltraSonic Cleaner 750, Unique, São Paulo, Brasil) a 45 W por 5 minutos, intercalando-se a agitação em vortex e resfriamento da amostra em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20000 xg por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e quantificado.

A quantificação de proteínas foi feita utilizando-se o kit da Bio-Rad DC (Bio-Rad, Hercules, C.A), baseado no método descrito por BRADFORD (1976). O ensaio foi realizado em microplacas com um volume total de 220 µL por poço, com faixa de linearidade 0,5 a 2,0 µg de proteínas. Foram utilizados 20 µL e amostra diluída em água Milli Q, 200 µL do reagente Bradford. O volume total utilizado em cada poço da microplaca foi mantido constante (220 µL). Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas a 595 nm em leitor de Elisa. Uma curva padrão com cinco pontos correspondentes a quantidades conhecidas de BSA (0,0 a 2,0µg) foi realizada a cada ensaio. Foram feitas triplicatas para cada amostra. A concentração das amostras foi determinada utilizando 3 quantidades diferentes de proteínas para cada amostra. Os desvios padrões dos resultados obtidos nas triplicatas foram menores que 10%.

3.5.2- Análise de proteínas relevantes à EMT por Western Blotting

Alíquotas do lisado celular contendo 30 µg de proteína total foram misturadas com tampão da amostra (Tris-HCl 60 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (v/v), BME 5% (v/v), ABF 0,002% (p/v)). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 98°C, por 5 minutos, em banho seco (Thermomixer confort, Eppendorf) e centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos (Mini Spin, Eppendorf).

3.5.2.1- Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi feito de acordo com Laemmli (1970) [78]. A eletroforese foi desenvolvida sob corrente de 90 V nos primeiros 20 minutos com posterior mudança para 110 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, em sistema de eletroforese vertical (PowerPac Basoc Powerr, Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra cell, Bio-Rad). O padrão da massa molecular utilizado foi *"Spectra Multicolor Broad Rand Protein Ladder*" (Thermo Scientific)

3.5.2.2- Análise por Western Blotting

As proteínas separadas por eletroforese foram transferidas para a membrana de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare). A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% por 1 hora e 30 minutos a 100 V, 300 mA a 4ºC.Para bloquear sítios não específicos, as membranas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%,

pH 7,6 (TBS-T) com 5% (m/v) de leite desnatado em pó por 1 hora de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo. Depois as membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Feito isso, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários na diluição adequada por 2 horas à temperatura ambiente ou *overnight* a 4ºC sob agitação. Depois foram novamente lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Em seguida, as membranas foram incubadas por 1 horas a temperatura ambiente sob agitação com os anticorpos secundários A detecção foi feita usando *o kit ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (GE HealthCare),* de acordo com as instruções do fabricante e reveladas no analisador para imagens luminescentes ImageQuant LAS4000 mini (GE Healthcare Life Sciences). As proteínas analisadas, a diluição e a procedência dos anticorpos primários estão especificadas na **Tabela 2.**

Tabela 2- Proteínas analisadas por *western blotting:* proteína, peso molecular (kDa), espécie produzida, diluição e fabricante dos anticorpos.

Proteína	***Peso Molecular***	***Espécie***	***Diluição***	***Código/Fabricante***
Vimentina	57kDa	Coelho	1:1000	(#5741- Cell Signaling)
SNAIL	29 kDa	Coelho	1:1000	(#3879- Cell Signaling)
Ubiquitina	-	Camundongo	1:1000	(#3936- Cell Signalling)
GAPDH	37 kDa	Coelho	1:1000	(#5154- Cell Signalling)
P53	53 kDa	Coelho	1:1000	(#2527- Cell Signalling)
P21	21 kDa	Coelho	1:1000	(#2947- Cell Signalling)
CDH1	135 kDa	Coelho	1:1000	(#3195- Cell Signalling)
HDAC	62 kDa	Coelho	1:1000	(#2062- Cell Signalling)

β-Catenina	92 kDa	Coelho	1:1000	(#8480- Cell Signalling)
Cyclin D1	36 kDa	Coelho	1:1000	(#2978- Cell Signalling)
IRS1	95 kDa	Coelho	1:2000	(#2382- Cell Signalling)
EGFR	175 kDa	Coelho	1:1000	(#2646- Cell Signalling)

3.6 Análise de Imunoflorescência – High Content Screening

O ensaio de Imunofluorescência foi realizado em placas de 96 poços específicas (BD) e as imagens foram obtidas em um aparelho *High Content Screening* (HCS), o *ImageXpress* (Micro XLS System, Molecular Devices, LLC, EUA). Inicialmente $1x10^4$ de células MCF-7 foram plaqueadas em cada poço e moduladas com MG132 e P5091 da mesma forma que relatado nas seções anteriores. Após as 72 horas de cultivo celular, as células foram lavadas com PBS e fixadas utilizando-se uma solução de 4% de formol em PBS durante vinte minutos a -20°C. Passando-se o período de fixação, a solução de formol foi retirada e os poços novamente lavados com PBS, deixando-se 100 µL em cada poço, que foram armazenados em geladeira (-4°C) até o momento da marcação com os anticorpos.

Para realização da marcação, o PBS foi substituído por uma solução de glicina (0,1M, Sigma-Aldrich) e as placas foram incubadas por 30 minutos. Após este tempo, os poços foram cuidadosamente novamente lavados três vezes e então submetidos ao passo de bloqueio contendo 1% de BSA em PBS (Albumina soro bovina/Sigma-Aldrich) durante trinta minutos. Em seguida, foram adicionados os anticorpos específicos para as proteínas de interesse Vimentina e Snail **(Tabela 3)**, e deixados *overnight* a 4°C envolta por um papel filme.

No dia seguinte, as placas foram novamente lavadas com PBS duas vezes e incubadas com os anticorpos secundários disponíveis na **Tabela 7** e armazenadas com PBS até o momento da obtenção dos dados. O citoplasma foi marcado *com Cell Mask Blue* e núcleo com solução de *Hoeschst* durante

quinze minutos a temperatura ambiente. As imagens obtidas com o *ImageXpress* (PerkinElmer) foram realizadas para realização de análises de HCS, com o uso do programa Harmony 3.0 (PerkinElmer).

Tabela 3- Proteínas analisadas por western blotting: proteína, peso molecular (Kda), espécie produzida, diluição e fabricante dos anticorpos.

Anticorpo Primario	***Diluição***	***Anticorpo Secundário***	***Código/Fabricante***	***Marcação***
SNAIL	1:500	Coelho	Ab180714/Abcam	FITC
Vimentina	1:100	Cabra	Sc7558/Santa Cruz	*Texas Red*

3.7 Análises Proteômicas

3.7.1- Preparo de Amostras para análise por MRM

O preparo das amostras representa a etapa fundamental para permitir a quantificação adequada pela técnica de monitoramento de reações múltiplas (MRM) e por isso consiste em vários passos, tais como: solubilização completa de proteínas com auxílio de agentes caotrópicos (uréia); digestão enzimática completa por enzima (tripsina), decomplexação/fracionamento de peptídeos de interesse por técnicas de separação em fase sólida (SPE), baseando-se em tamanho, carga e hidrofobicidade; remoção de contaminantes e interferentes e, por fim, concentração e solubilização para aplicação no sistema LC-MS/MS.

Decorridas às 72 horas de indução a EMT, as células foram removidas com a ajuda de *cell scraper* e diluídas em 500 µL de uréia 8 M e Tris 0,1 M, pH 8,5 juntamente com o coquetel de inibidores como descrito anteriormente. As amostras foram processadas para análise por MRM como descrito em Faça et al., (2014) [79].

Após a quantificação pelo método de Bradford, alíquotas de 100 µg de extrato total proteico das amostras foram submetidos a digestão enzimática com tripsina. Para isso, as proteínas foram reduzidas com DTT 10 µg/µL durante 5 minutos a 98°C e alquiladas com IAA (50 µg/µL) (ambos BioRad)

durante 20 minutos, no escuro. As amostras foram diluídas 5 vezes com solução de Tris 0,1 M, pH 8,8 para adição de tripsina na proporção 1:50 (enzima:substrato) e mantidas por 2 horas a 37ºC. Posteriormente, adicionou-se nova alíquota de tripsina modificada (promega) na proporção 1:50 (enzima:substrato) e manteve-se a reação *overnight* a 37ºC. As amostras foram purificadas em colunas de extração de fase-reversa (Oasis – Waters), conforme instruções do fabricante, secas em *speedvac* e reconstituídas em solução de 3% acetonitrila/0,1% ácido fórmico para análise por MRM.

3.7.2- Definição da metodologia e análise proteômica dirigida por MRM

Várias proteínas vêm sendo descritas na literatura por terem importante papel na progressão e metástase de câncer de mama e serem relevantes durante o processo de EMT. Algumas destas proteínas foram selecionadas para monitoramento pela técnica de MRM. Para tal, foram escolhidos peptídeos sintéticos trípticos representativos (proteotípicos), considerando critérios de massa/carga, sequência, qualidade de ionização e fragmentação por CID (*colision induced dissociation*). Tais peptídeos sintéticos estão disponíveis em nosso laboratório e serviram como padrões internos para quantificação. Além disso, proteínas para as quais os peptídeos sintéticos não estavam disponíveis, foram usados métodos computacionais de predição de padrão de fragmentação, tempo de retenção, bem como utilização de métodos pré-definidos em bancos de dados públicos, como o SRMatlas (www.srmatlas.org). Após uma avaliação inicial, foram selecionados os peptídeos com melhor intensidade. Ao todo foram utilizados 27 peptídeos representando as proteínas de interesse.

As análises foram realizadas em nosso laboratório no espectrômetro de massas do XevoTQS-Triplo Quadrupolo acoplado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (UPLC-MS/MS). A intensidade dos íons moleculares dos peptídeos proteotípicos e dos seus fragmentos principais produzidos por CID foram utilizados para validação e quantificação absoluta das proteínas representativas nas amostras por extrapolação em curvas da calibração obtidas para cada um dos peptídeos sintéticos padrão. Os ensaios de MRM na plataforma UPLC-MS/MS foram coletados em sistema de cromatografia líquida

de ultra eficiência desenvolvida em sistema ACQUITY Class I UPLC System (Waters Corporation) com coluna de fase reversa de 150 mm de comprimento, diâmetro de 1 mm e partícula de 1.8 µm. (coluna HSS T3, Waters). O sistema de solventes foi: solvente A - 94.9% de água, 5% de acetonitrila e 0,1% de ác. Fórmico. E solvente B - 99.9% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico (v/v). A corrida cromatográfica utilizou fluxo de 0,1 mL por minuto em um gradiente de 5-30% de solvente B, desenvolvido em 25 minutos. No final de cada corrida foi realizado um ciclo de regeneração da coluna em 100% de solvente B. O sistema de cromatografia é acoplado a espectrômetro de massas do tipo tandem-quadrupolo Xevo TQ-S (Waters Corporation) com fonte de ionização ESI (electrospray). O espectrômetro de massas foi programado para coleta de dados no modo de monitoramento de reações múltiplas, onde foram definidos os parâmetros de massa do íon precursor, massa dos fragmentos monitorados, energia de colisão e tempo de coleta de intensidade iônica (dweel time). Outras condições especificas de operação foram: voltagem do electrospray, 3,5 kV; fluxo do gás auxiliar de 300L/h; temperatura do gás de solvatação de 250ºC. Todo o processo de aquisição e controle do instrumento foram realizados através do software proprietário Masslynx v.4 (Waters Corporation).

3.8 Array de proteínas ubiquitinas tratadas com MG132 e SAHA

Para o kit Array, as células MCF-7 foram plaqueadas, induzidas à EMT e moduladas com 1 µM de MG132 por 24 horas, conforme estabelecido anteriormente. As células foram coletadas e armazenadas com tampão de lise do *Kit Proteome Profile Array* (R&D systems, ARY027). As células foram estocadas a -80°C até o momento da quantificação e incubação das membranas. As etapas foram seguidas conforme instruções do fabricante.

3.10 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software Graphpad Prism*, Versão 7.3 (Graphpad Software Incorporation). Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média de três ou dois experimentos independentes realizados em triplicata. O teste anova foi

realizado para comparação entre mais de um grupo tratado e seu respectivo controle. Os resultados com valor de ***p<0,05* e *****p<0,001* foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Metanálise de dados prévios visando identificar possíveis proteínas alteradas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT

Com o objetivo de identificar proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma que poderiam agir como possíveis reguladoras da EMT, inicialmente foi realizada uma metanálise de dados proteômicos prévios coletados por nosso grupo de duas linhagens de mama induzidas a EMT, MCF-10A induzida a EMT com 10 ng/mL de TGFβ2 e MCF-7 superexpressando o fator de transcrição SNAIL. Em ambas as linhagens o modelo de indução foi comprovado por *western blotting,* ensaios de migração e MRM (dados da MCF-10A não publicados e da MCF-7 disponíveis em [26]).

A partir destes dados realizados por nosso grupo de pesquisa, realizamos uma análise geral por nome de todas as proteínas que apresentavam *ubiquitin* em sua descrição, que apresentaram 99 proteínas relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma, dentre as quais estão descritas ubiquitinas similares, deubiquitinases específicas e E3 ligases (**Tabela 4)**. Dentre estas proteínas, 45 se encontram reguladas, analisadas com base no aumento ou diminuição superior a duas vezes **(Tabela 5)**. Com base neste grande número de proteínas reguladas, fica demonstrado que a interferência de vias específicas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma tem papel durante a EMT e progressão tumoral, o qual será estudado em maiores detalhes nas próximas sessões.

Tabela 4- Proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma identificadas em estudos prévios em células MCF-7 superexpressando SNAIL e MCF-10A induzida a EMT com TGFβ2.

Linhagem celular	*Indutor da EMT*	*Gene*	*Descrição*
MCF-10A	TGFBII	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
MCF-10A	TGFBII	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
MCF-10A	TGFBII	UBA52	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
MCF-10A	TGFBII	UBA52	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 (Fragment)
MCF-10A	TGFBII	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
MCF-10A	TGFBII	UBC	Polyubiquitin-C
MCF-10A	TGFBII	UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
MCF-10A	TGFBII	UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3
MCF-10A	TGFBII	UBE2V1	Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
MCF-10A	TGFBII	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
MCF-10A	TGFBII	OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1
MCF-10A	TGFBII	UBE2V1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
MCF-10A	TGFBII	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
MCF-10A	TGFBII	OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1
MCF-10A	TGFBII	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
MCF-10A	TGFBII	OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1
MCF-10A	TGFBII	UBA52	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
MCF-10A	TGFBII	UBA6	Isoform 2 of Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
MCF-10A	TGFBII	UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
MCF-10A	TGFBII	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5
MCF-10A	TGFBII	SUMO3	Small ubiquitin-related modifier 3
MCF-10A	TGFBII	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
MCF-10A	TGFBII	SUMO2	Small ubiquitin-related modifier 2
MCF-10A	TGFBII	UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like
MCF-10A	TGFBII	SUMO4	Small ubiquitin-related modifier 4
MCF-10A	TGFBII	USP15	Isoform 2 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15
MCF-10A	TGFBII	SUMO3	Small ubiquitin-related modifier 3
MCF-10A	TGFBII	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
MCF-10A	TGFBII	USP15	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15
MCF-10A	TGFBII	UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like
MCF-10A	TGFBII	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
MCF-10A	TGFBII	UBA1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1

MCF-10A	TGFBII	UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
MCF-10A	TGFBII	UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like
MCF-10A	TGFBII	USP8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8
MCF-10A	TGFBII	NEDD4	Isoform 4 of E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4
MCF-10A	TGFBII	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
MCF-10A	TGFBII	UBE3A	Isoform I of Ubiquitin-protein ligase E3A
MCF-10A	TGFBII	ADRM1	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1
MCF-10A	TGFBII	HUWE1	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1
MCF-10A	TGFBII	UBLCP1	Ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase 1
MCF-10A	TGFBII	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7
MCF-10A	TGFBII	OTUB1	Isoform 2 of Ubiquitin thioesterase OTUB1
MCF-10A	TGFBII	UCHL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
MCF-10A	TGFBII	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
MCF-10A	TGFBII	USP8	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
MCF-10A	TGFBII	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
MCF-10A	TGFBII	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
MCF-10A	TGFBII	OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1
MCF-10A	TGFBII	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5
MCF-10A	TGFBII	OTUB1	Ubiquitin thioesterase OTUB1
MCF-10A	TGFBII	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
MCF-10A	TGFBII	HUWE1	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1
MCF-10A	TGFBII	UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
MCF-10A	TGFBII	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 2
MCF-10A	TGFBII	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
MCF-10A	TGFBII	HUWE1	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1
MCF-10A	TGFBII	UCHL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
MCF-10A	TGFBII	UBE2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K (Fragment)
MCF-10A	TGFBII	TRIM25	E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25
MCF-10A	TGFBII	SUMO1	Small ubiquitin-related modifier 1
MCF-10A	TGFBII	USP47	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47
MCF-10A	TGFBII	UBR4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
MCF-10A	TGFBII	USP13	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13 (Fragment)
MCF-10A	TGFBII	ATG7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7

MCF-10A	TGFBII	LTN1	E3 ubiquitin-protein ligase listerin
MCF-10A	TGFBII	ISG15	Ubiquitin-like protein ISG15
MCF-10A	TGFBII	RBX1	E3 ubiquitin-protein ligase RBX1
MCF-10A	TGFBII	UBR4	Isoform 5 of E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
MCF-10A	TGFBII	UBE2L6	Ubiquitin/ISG15-conjugating enzyme E2 L6
MCF-10A	TGFBII	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase
MCF-10A	TGFBII	HUWE1	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1
MCF-10A	TGFBII	UBA6	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
MCF-10A	TGFBII	TRIP12	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase TRIP12
MCF-10A	TGFBII	UFD1L	Ubiquitin fusion degradation protein 1 homolog
MCF-10A	TGFBII	STUB1	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase CHIP
MCF-10A	TGFBII	UBE3A	Ubiquitin-protein ligase E3A
MCF-10A	TGFBII	TRIM23	Isoform Beta of E3 ubiquitin-protein ligase TRIM23
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2O	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 O
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2S	IUbiquitin-conjugating enzyme E2 S
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2V1	Isoform 1 of Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2V2	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 v2
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE4A	I Isoform 2 of Ubiquitin conjugation factor E4 A
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBL4A	Ubiquitin-like protein 4A
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBR4	Isoform 2 of E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBR5	ubiquitin-protein ligase UBR5
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBR7	Putative E3 ubiquitin-protein ligase UBR7
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UCHL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UFM1	Ubiquitin-fold modifier 1
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP10	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP15	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP47	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	VCPIP1	Deubiquitinating protein VCIP135

Tabela 5- Proteínas reguladas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma em estudos prévios do nosso grupo. Os resultados demonstram proteínas reguladas em células MCF-7 superexpressando o fator de transcrição SNAIL e MCF-10A com TGFβ2.

Linhagem celular	Indutor da EMT	Gene	Descrição
MCF10-A	TGFβ2	SUMO2	Small ubiquitin-related modifier 2
MCF10-A	TGFβ3	USP15	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15
MCF10-A	TGFβ4	UBAP2L	Ubiquitin-associated protein 2-like
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2G1	1 Ubiquitin-conjugating enzyme E2 G1
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	HECTD1	Ubiquitin-protein ligase HECTD1
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	HECTD4	E3 ubiquitin-protein ligase
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	HUWE1	Isoform 1 of E3 ubiquitin-protein
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	ISG15	Ubiquitin-like protein
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	OTUB1	Ubiquitin thioesterase
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	OTUB2	Isoform 1 of Ubiquitin thioesterase
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	MYCBP2	probable E3 ubiquitin-protein
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	RBX1	ubiquitin-protein ligase RBX1
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	STUB1	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	SUMO2	Small ubiquitin-related modifier 2
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	SUMO3	Small ubiquitin-related modifier 3
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	SUMO4	Small ubiquitin-related modifier 4
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	SUMO1	Small ubiquitin-related modifier 2
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	TRIM25	E3 ubiquitin/ISG15 ligase
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	TRIM33	Isoform Beta of E3 ubiquitin-protein ligase
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBA52	Ubiquitin-60S ribosomal protein
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBA6	Ubiquitin-like modifier
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2H	Ubiquitin-conjugating
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2K	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2L3	Ubiquitin-conjugating
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2N	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2O	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 O
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBE2S	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBR4	E3 ubiquitin-protein ligase UBR4
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UCHL3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L3
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UCHL5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L5
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UFM1	Ubiquitin-fold modifier 1
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP15	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP47	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	USP7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBR5	E3 ubiquitin-protein ligase UBR5
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	UBR7	E3 ubiquitin-protein ligase UBR7
MCF-7	SUPEREXPRESSÃO DE SNAIL	VCPIP1	Deubiquitinating protein

4.2 Caracterização da EMT como um modelo para progressão tumoral em MCF-7 utilizando o inibidor de histona deacetilase SAHA

O agente químico SAHA é um inibidor de histona deacetilase, conhecido por aumentar a expressão de SLUG, importante fator de transcrição durante a EMT. Além disso, SAHA representa um interessante modelo de estudo por apresentar efeito dúbio, podendo ser utilizado em estudos clínicos para tratamento tumoral, ou ainda desencadear EMT. Diferentes estudos disponíveis na literatura têm demonstrado a correlação entre os níveis de expressão de proteínas reguladas durante o processo de EMT e o tratamento com SAHA, atualmente em fase avançada de diversos estudos clínicos. Baseado nestas informações, e visto que cada linhagem celular possui uma dose efetiva característica capaz de gerar uma resposta ativando vias de sinalização correspondente ao estímulo utilizado, foi avaliada a resposta da linhagem MCF-7 em diferentes doses de SAHA durante 24 horas. Dentre as diversas concentrações, observou-se que a linhagem MCF-7 apresentou alterações morfológicas mais evidentes quando estimulada com 10 µM de SAHA **Figura 8**.

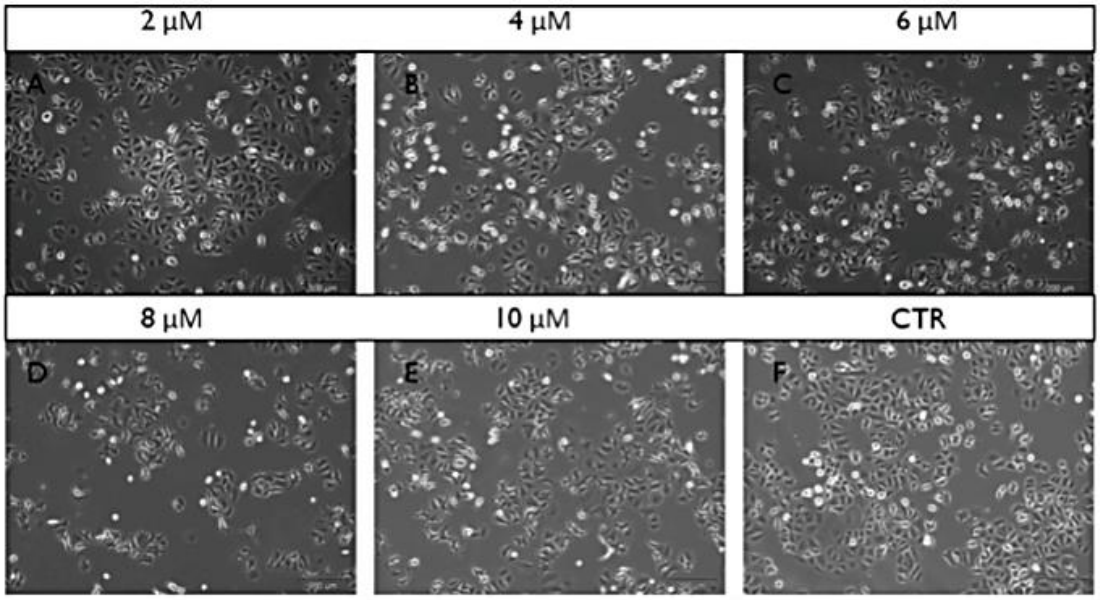

Figura 8- Caracterização morfológica das células MCF-7 induzidas a EMT por 24 horas. As células (A) MCF-7 2 µM de SAHA, aumento 4x, (B) MCF-7 4 µM de SAHA, aumento 4x, aumento 4x, (C) MCF-7 6 µM de SAHA, aumento 4x (D) MCF-7 8 µM de SAHA, aumento 4x. (E) MCF-7 10 µM de SAHA, aumento 4x. (F) MCF-7 Controle (não induzidas), aumento 4x. O experimento ilustrado na figura é representativo de mais de 3 replicatas para esta mesma condição. Imagens obtidas através de microscopia de contraste de fases com aumento de 100x.

Como demonstrado através de microscopia de contraste de fase **(Figura 8)**, pode-se observar claramente a aquisição de um formato fusiforme ou estrelado pelas células MCF-7 após a indução com 10 µM, tornando-se semelhantes a fibroblastos, além de ligeira redução do contato célula-célula. Tais características morfológicas têm sido utilizadas como parâmetro para confirmação do processo da EMT, que tornam as células epiteliais morfologicamente semelhante às mesenquimais.

Portando, com base nos dados apresentados anteriormente e em dados prévios do nosso grupo disponível na literatura, o tratamento da linhagem MCF-7 com SAHA 10 µM durante 24 horas foi utilizada como modelo de indução do processo de EMT [26] **(Figura 9)**.

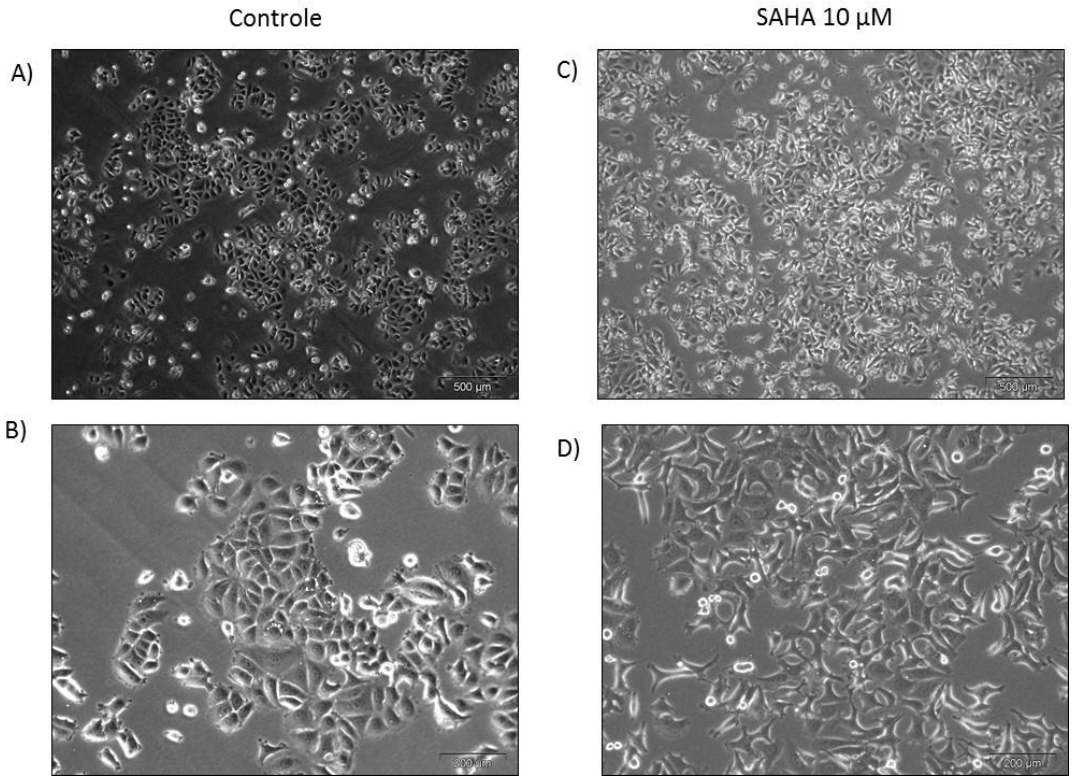

Figura 9- Caracterização morfológica das células MCF-7 induzidas a EMT por 24 horas com 10 µM de SAHA. As células (A) MCF7 controle, aumento de 4x; B) Controle, aumento de 10x; C) Tratadas com 10 µM de SAHA, aumento de 4x e D) Tratadas com 10 µM de SAHA, aumento de 10x. O experimento ilustrado na figura é representativo de mais de 3 replicatas para esta mesma condição. Imagens obtidas através de microscopia de contraste de fases com aumento de 100x.

4.3 Caracterização funcional da EMT na linhagem celular MCF-7 induzida por SAHA

Após o estabelecimento do modelo de indução do processo de EMT na linhagem MCF-7 utilizando SAHA 10 µM durante 24 horas, algumas proteínas consideradas relevantes para aquisição do fenótipo mesenquimal, e consequentemente perda das características epiteliais, foram avaliadas por *western blotting*. O extrato total celular de células tratadas ou não com SAHA 10 µM foram analisadas quanto as alterações de E-caderina, vimentina e SNAIL, demonstrado na **Figura 10.** As células induzidas ao processo de EMT com SAHA 10 µM sofreram alterações no padrão de abundância proteica, revelando aumento de Vimentina e SNAIL, marcadores celulares mesenquimais, e diminuição na expressão de E-caderina, principal marcador epitelial [10, 80].

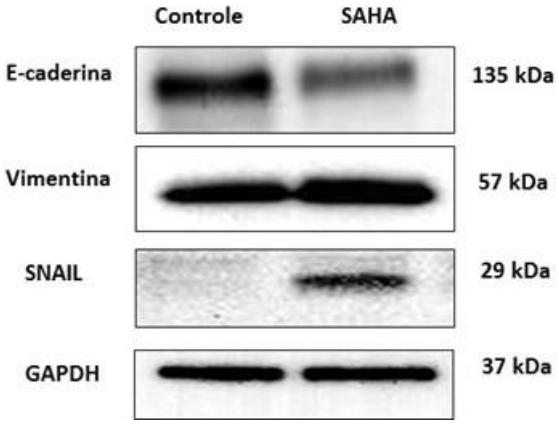

Figura 10- *Western blotting* da indução da EMT com SAHA em células MCF-7. Extratos proteicos celulares de MCF-7 controle e tratadas com 10 µM de SAHA durante 24 horas foram avaliadas por *western blotting* com as principais proteínas marcadoras da EMT para confirmar o modelo de indução: E-Caderina, Vimentina e SNAIL. Todos os anticorpos foram utilizados na diluição 1:1000. O extrato celular foi aplicado 30 µg por amostra. A proteína GAPDH foi utilizado como controle endógeno.

Desta forma, com base nos resultados demonstrados anteriormente, validamos os modelos de indução da EMT na linhagem celular MCF-7 com SAHA 10 µM de maneira morfológica e funcional que permitiram o desenvolvimento das próximas etapas do trabalho.

4.4 Avaliação da viabilidade celular por MTT da concentração dos inibidores químicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma

Antes da análise da influência do sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT, foi preciso identificar a concentração ideal a ser utilizada de cada inibidor químico específico. Para este fim, foi utilizado o ensaio de viabilidade MTT com células MCF-7 tratadas com MG132 e P5091 por 24

horas. Esta técnica possibilita a análise da atividade metabólica celular permitindo avaliar a alteração da viabilidade celular em escala exponencial dependendo da modulação com cada droga testada. Além disso, é possível avaliar a concentração inibitória máxima de cada inibidor químico (IC50) e a partir dessa concentração identificar qual a dose poderia modular a EMT, podendo agir tanto como indutor do processo, como também repressor (MET).

De maneira orientar nossos estudos, foram utilizados protocolos de modelos tumorais utilizando os inibidores químicos selecionados anteriormente [67, 81-83]. Apesar disso, a influência destes inibidores específicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT em linhagens de adenocarcinoma de mama ainda não havia sido descrita, o que dificultou o estabelecimento de uma dose precisa para iniciar nossas pesquisas. Assim, foi utilizada a mesma concentração, em escala exponencial até 10 µM, para ambos inibidores químicos no primeiro ensaio e como esperado, as análises de viabilidade celular apresentaram valores diferentes para cada inibidor.

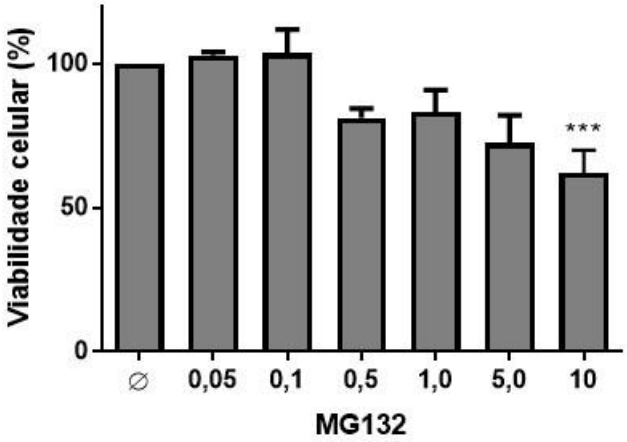

Figura 11- Análise da viabilidade celular das células MCF7 tratadas com MG132 pelo ensaio MTT. O inibidor de proteassoma MG132 foi utilizado nas concentrações exponenciais indicadas no período de 24 horas. Resultados estatisticamente significativos (***p<0,001) em relação ao controle.

A **Figura 11** mostra a análise da viabilidade celular de MCF-7 após o tratamento com as diferentes concentrações de MG132. Com as diferentes concentrações estabelecidas com o inibidor MG132, foi possível avaliar mudança significativa na viabilidade celular de MCF-7, com redução máxima de aproximadamente 35%. Porém, mudanças morfológicas já foram observadas

com 1 µM após 24 horas de tratamento (**Figura 13 A**), concentração utilizada nos experimentos posteriores e que corrobora com outros resultados encontrados na literatura para outras linhagens celulares [82].

O inibidor P5091 é um inibidor específico da enzima deubiquitinase USP7, descrito como, essencial para o "*turnouver"* e função de diversas proteínas celulares. O teste de MTT com P5091 nas concentrações de 0 a 10 µM demonstrou que o inibidor começava a interferir na viabilidade celular apenas a partir de 10 µM, coincidindo com os experimentos da literatura da linhagem celular 231MFP (**Figura 12**) [84]. Assim, prosseguimos nossos estudos utilizando a concentração de 15 µM de P5091.

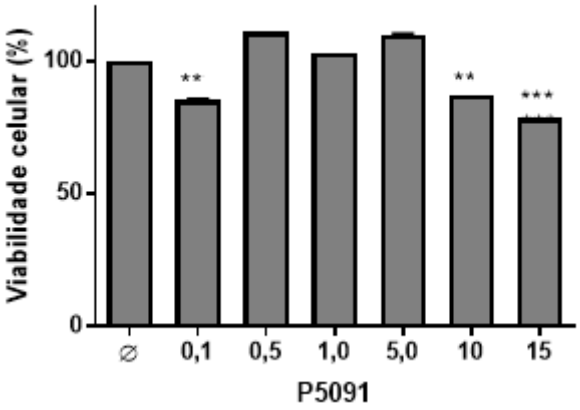

Figura 12- Análise da viabilidade celular das células MCF7 tratadas com P5091 pelo ensaio MTT. O inibidor de USP7, P5091 foi utilizado nas concentrações indicadas no período 24 horas. Resultados estatisticamente significativos (** p<0,05 ***p<0,001) em relação ao controle.

Baseando-se nestes resultados, prosseguimos nossos estudos da correlação do sistema ubiquitina proteassoma e a EMT utilizando o inibidor MG132 1 µM, P5091 15 µM, juntamente com a concentração estabelecida de SAHA de 10uM, como proposta na seção 4.1.

4.5 Avaliação morfológica por microscopia ótica interferência de MG132 e P5091 em células MCF7 induzidas à EMT

Para acompanhamento das alterações morfológicas que ocorreram com o uso dos inibidores químicos específicos durante o processo de EMT, as células MCF-7 foram plaqueadas e 24 horas após, tratadas com 1 µM de MG132 e 15 µM de P5091, e então avaliadas as mudanças morfológicas por de microscopia óptica **(Figura 13)**. O racional para este procedimento inicial seria

o de garantir um início do processo de EMT antes de avaliar a influência dos inibidores do proteassoma e de USP7.

A **Figura 13** destaca as pequenas alterações morfológicas decorridas com o uso dos inibidores MG132 e P5091. As alterações observadas não foram tão evidentes quando comparadas ao controle, o que sugere que apenas a inibição do proteassoma com MG132 1 µM e de USP7 com P5091 15 µM não seriam suficientes para acarretar mudanças morfológicas coincidentes com o processo de EMT, apesar de já ser possível observar menor contato célula-célula.

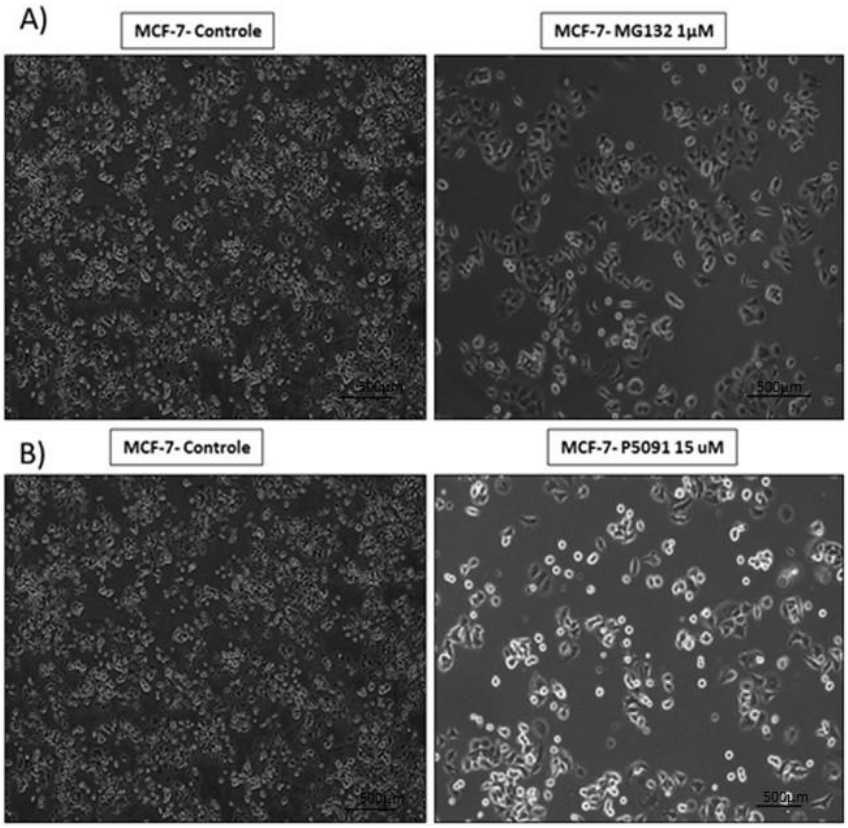

Figura 13- Análise morfológica celular de MCF-7 controle e tratadas com os inibidores específicos relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma: A) 1 µM de MG132 e B) 15 µM P5091.

Para estender nossos estudos de alterações morfológicas decorridas com o uso dos inibidores químicos MG132 1 µM e P5091 15 µM durante o processo de EMT, utilizamos a mesma concentração dos inibidores, mas dessa vez juntamente o inibidor SAHA, desencadeador do processo de EMT. Na **Figura 14**, demonstramos às alterações morfológicas acompanhadas com a

interferência da inibição específica com MG132 1 µM e P5091 15 µM quando a célula está induzida a EMT.

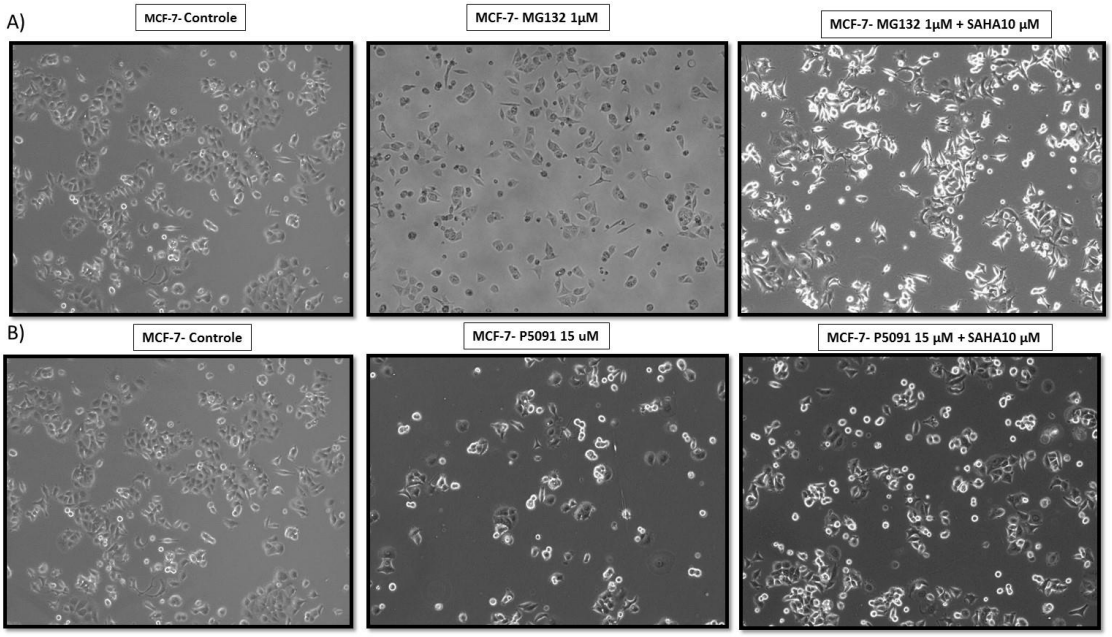

Figura 14- Análise morfológica celular de MCF7 controle e tratadas com os inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma juntamente com SAHA 10 µM. A) Células MCF-7 controle, tratadas com 1 µM de MG132 e 1 µM de MG132 + SAHA 10 µM; B) Células MCF-7 controle, tratadas com 15 µM de P5091 e 15 µM de P5091 + SAHA 10 µM.

Após 24 horas, observamos alterações morfológicas evidentes na linhagem celular MCF-7, como perda da adesão e aquisição de um fenótipo fusiforme característico do processo de EMT, principalmente nas células tratadas com MG132 1 µM + SAHA 10 µM **(Figura 14 A).** A conversão do fenótipo epitelial para uma morfologia fusiforme é regulada por redes integradas de vias de transdução de sinal e fatores de transcrição relacionadas com a EMT que dirigem a expressão alterada de genes envolvidos na adesão celular, diferenciação e motilidade. Este resultado sugere que o uso de MG132 1 µM potencializa o efeito indutor da EMT juntamente com o uso de SAHA 10 µM.

4.6 Análise por western blotting das alterações proteicas induzidas pela EMT e tratadas com MG132 e P5091

Para acompanhamento das alterações na expressão proteicas que ocorrem durante a EMT induzida por SAHA e tratadas com P5091 e MG132 utilizamos a técnica de *western blotting.* De modo a confirmar nosso modelo de inibição do proteassoma por MG132 e de USP7 por P5091, realizamos a

marcação com anticorpos específicos para ubiquitina e USP7, demostrado na **Figura 15- A e B,** respectivamente.

Nossos resultados demonstram a inibição efetiva do proteassoma, indicado pelos altos níveis de proteínas marcadas quando as células MCF-7 foram tratadas com MG132, inibidor do proteassoma. Destaque se dá também para o alto nível de ubiquitinação induzido pelo tratamento com SAHA, quando comparados as células não tratadas, resultado que demonstra a significativa participação do ubiquitina proteassoma sobre proteínas chaves da EMT **(Figura 15-A).**

Na **Figura 15-B** foi observado diminuição da expressão de USP7 com o tratamento com P5091, fato que não coincide para amostras com tratamento combinado com SAHA. Ainda, para avaliar o envolvimento de outras proteínas envolvidas com a sinalização de USP7, realizamos marcações com proteínas específicas para β-catenina e P53. Alterações na expressão de P53 foram evidentes nas células MCF-7 tratadas com P5091, resultado que demonstra que a inibição e consequente diminuição dos níveis de USP7 pode estar relacionada com aumento de P53, e possível diminuição de β-catenina.

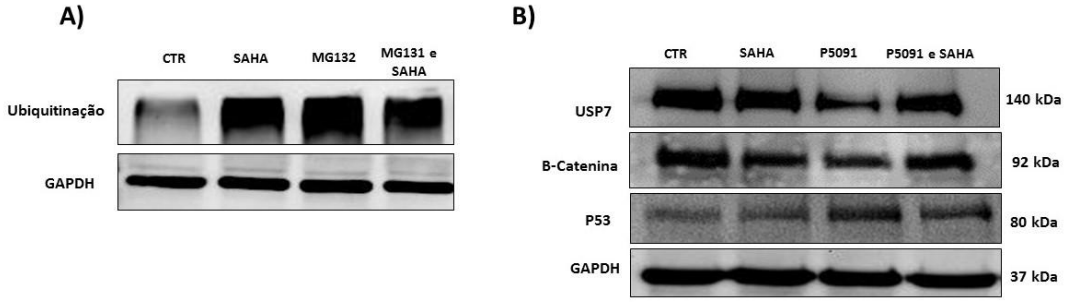

Figura 15. Análise por *western blotting* da indução da EMT e modulação por MG132 e P5091. Extratos celulares totais (30 µg) foram separados em géis SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para membrana de PVDF. Foram utilizados anticorpos específicos para cada proteína e a detecção da reação foi feita através do método quimioluminescente, com kit de detecção ECL Prime (GE Helthcare) e reveladas no analisador para imagens luminescentes ImageQuant LAS400mini (GE Lifescience). A) Processo de ubiquitinação realizado por anticorpo específico para ubiquitina em células MCF-7 tratadas com MG132 1 µM e B) Marcação com anticorpos específicos de proteínas relacionadas com vias de P5091 em células MCF-7.

Ainda, para avaliar a influência de MG132 e P5091 durante a EMT, realizamos marcações para as principais proteínas biomarcadoras do processo de EMT, E-caderina, β-catenina, vimentina, HDAC1 e pP53. A análise da

Figura 16 demonstra alterações no padrão de expressão de E-caderina e β-catenina com os diferentes inibidores. Interessantemente, há um aumento da expressão de E-caderina e diminuição de β-catenina ocasionado pela inibição de USP7, sugerindo uma inibição do processo de EMT.

De fato, pouco se sabe se o mecanismo regulatório de MG132 e P5091 sobre a EMT, porém, fica claro seu papel modulador de diversas vias bioquímicas relacionadas a progressão tumoral. Portanto, de maneira geral, as mudanças observadas nos níveis destas proteínas por *western blotting* indicam a célula MCF-7 foi funcional e responsiva ao estímulo proposto.

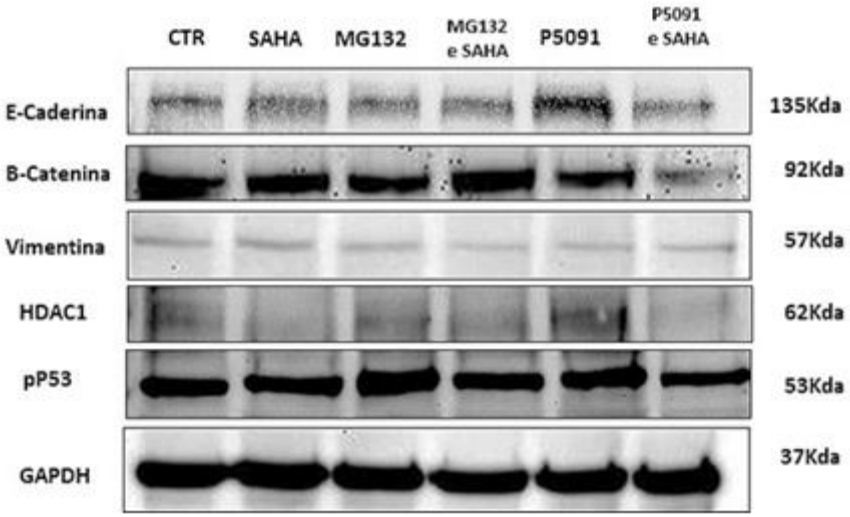

Figura 16. Análise por *western blotting* da indução da EMT e modulação por MG132 e P5091. Extratos celulares totais (30 µg) foram separados em géis SDS-PAGE 12% e eletrotransferidos para membrana de PVDF. Foram utilizados anticorpos específicos para cada proteína e a detecção da reação foi feita através do método quimioluminescente, com kit de detecção *ECL Prime* (GE Helthcare) e reveladas no analisador para imagens luminescentes ImageQuant LAS400mini (GE Lifescience).

4.7 Análise por Imunofluorescência (High Content Screening) da morfologia celular e expressão de Vimentina e SNAIL das células MCF-7 tratadas com MG132 e P5091

A partir dos resultados observados anteriormente, as células MCF-7 foram estimuladas novamente à indução da EMT e com os inibidores MG132 e P5091, a fim de se observar as possíveis alterações morfológicas e na expressão proteica de Vimentina e SNAIL pela técnica de Imunofluorescência.

A exposição durante 24 horas ao inibidor de histonas deacetilases e inibidores do proteassoma resultou em respostas distintas nos diferentes

tratamentos nas células MCF-7. A análise por Imunofluorescência demonstrou a aquisição de uma nova morfologia pelas células MCF-7 após a indução da EMT e com modulação de vias específicas do proteassoma, sustendada pelo aumento significativo nos níveis de proteínas clássicas deste processo, tais como SNAIL e Vimentina em todos os tratamentos (**Figura 17**). As imagens demonstram alterações dinâmicas dos filamentos de Vimentina resultante da modulação pelos inibidores, além de maior intensidade quando comparada ao controle **(Figura 19).**

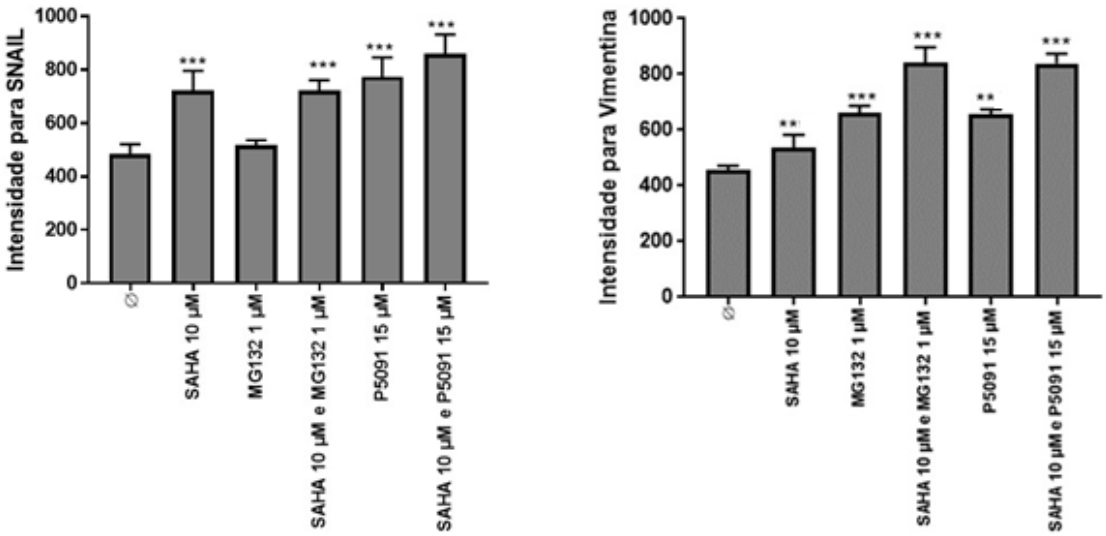

Figura 17. Intensidade de Imunofluorescência da área corada por FITC e texas red, representando marcação por Vimentina e SNAIL. Após 72 horas as células MCF-7, induzidas ou não a EMT e tratadas com MG132 e P5091, foram fixadas e marcadas com SNAIL e Vimentina, seguido de marcação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho anti-IgG de cabra respectivamente. Resultados estatisticamente significativos (***p<0,001) em relação ao controle.

As células induzidas a EMT e moduladas pelo sistema ubiquitina proteassoma sofreram ainda aumento da área celular e diminuição do contato célula-célula, condizente com as alterações esperadas **(Figura 18).** Estes resultados provenientes de uma sofisticada análise de imagens de microscopia também indicam que as células estão respondendo aos estímulos e inibições testados.

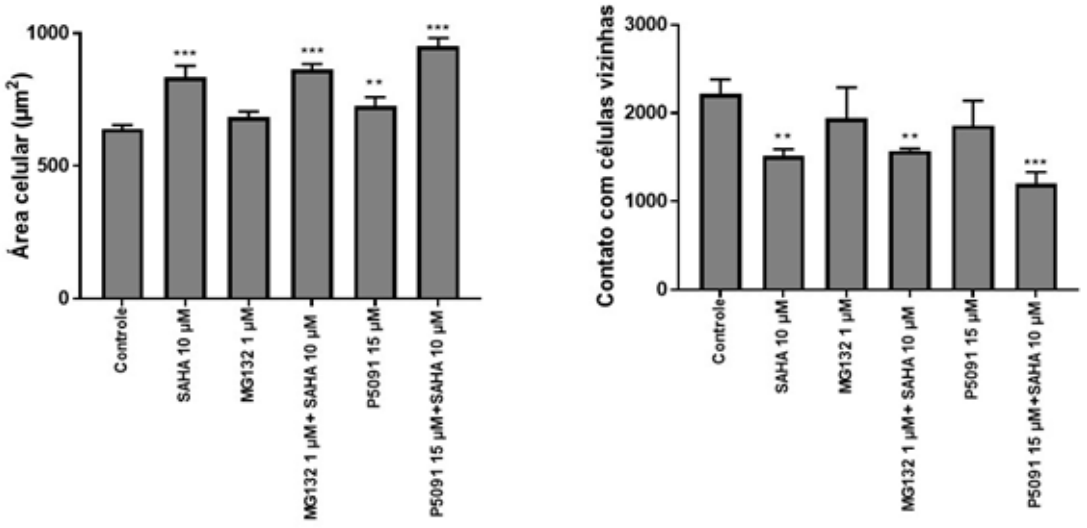

Figura 18. Análise morfológica por *High Content Screening* dos parâmetros morfológicos de células MCF-7 controle, induzidas à EMT com SAHA 10 µM por 24 horas. Os parâmetros analisados como área e contato com células vizinhas foram alterados pelo tratamento com SAHA MG132 e P5091. Resultados estatisticamente significativos (****p*<0,001, ** p<0,05).

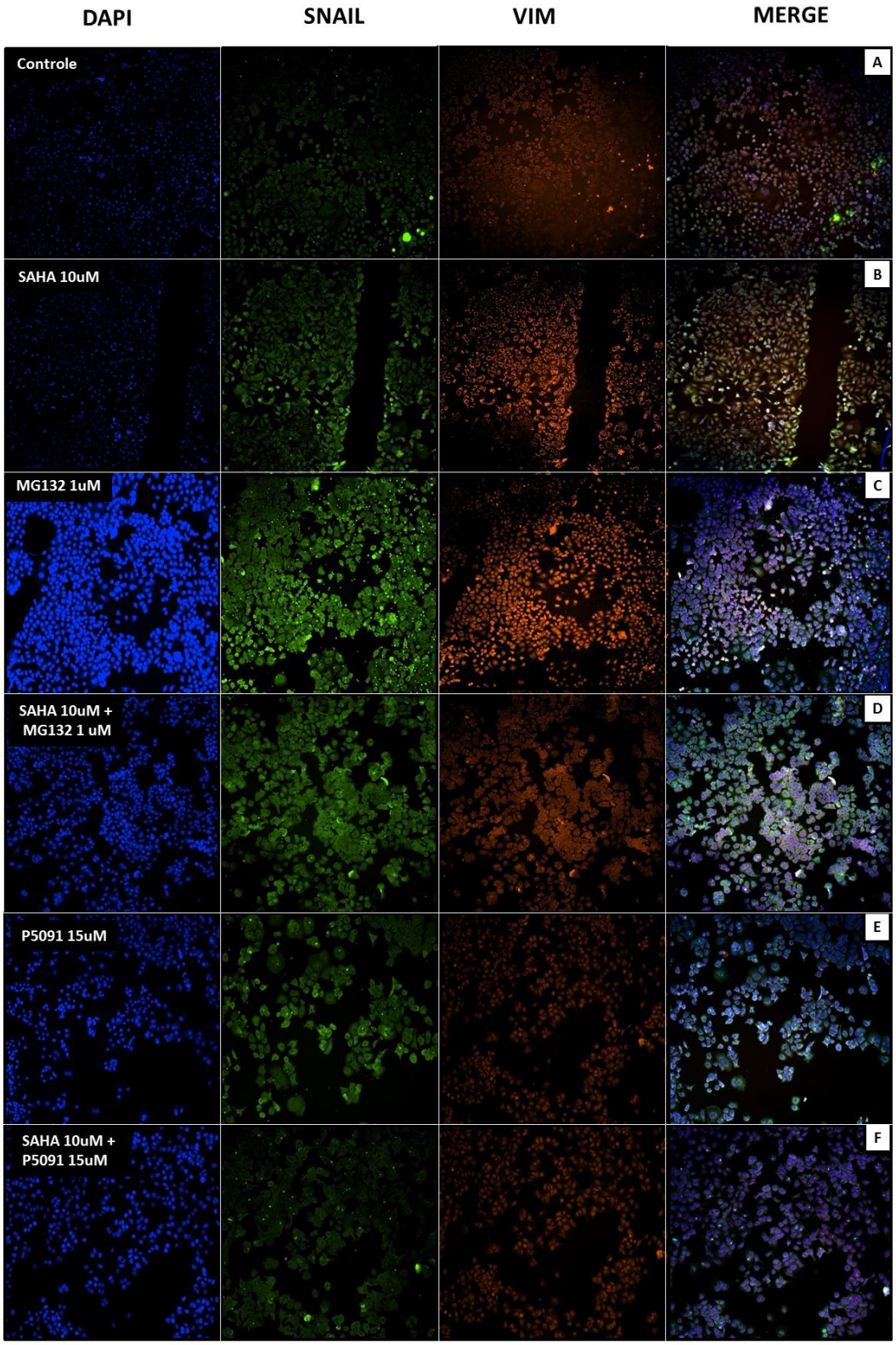

Figura 19. Análise por Imunofluorescência em MCF-7 tratadas com MG132 e P5092. Após 72 horas as células MCF-7, induzidas ou não a EMT e tratadas com MG132 e P5091, foram fixadas e marcadas com anticorpo DAPI para núcleo e citoplasma, SNAIL (FITC), e Vimentina (texas RED), principais marcadores do processo de EMT. Células marcadas em verde representa a marcação por SNAIL, em vermelho por Vimentina e MERGE imagem sobreposta de Imunofluorescência. Em A) representa o controle; B) SAHA 10 µM; C) MG132 1 µM e SAHA 10 µM; D) P5091 15 µM e E) P5091 15 µM e SAHA 10 µM.

4.8 Avaliação da migração celular das células MCF-7 induzidas à EMT e tratadas com MG132 e P5091 – Wound healing

Ainda dentro da avaliação da indução da EMT e as alterações provocadas pelos inibidores MG132 e P5091, realizamos para as células MCF-7, experimentos de migração celular. As células que apresentarem características mesenquimais tem necessariamente maior capacidade migratória. As **figuras 20 e 21** mostram os resultados de migração de MCF-7 tratadas com MG132 e P5091, respectivamente. Para este ensaio, as células MCF-7 foram induzidas à EMT com SAHA 10 µM, moduladas pelos inibidores relacionados ao UPS, MG132 1 µM e P5091 15 µM, e acompanhadas durante 0, 8, 24 e 30 horas. As análises foram feitas com base na fechadura das ranhuras.

Foi possível observar em todos os tratamentos mudanças significativas na migração celular de MCF-7 quando comparadas ao controle. Primeiramente, destacando mais uma vez nosso modelo de indução com SAHA 10 µM (**Figura 19**), observamos que com apenas 8 horas de exposição ao inibidor de histonas deacetilase já acontecem mudanças morfológicas celulares que as tornam mais migratórias. Com todos estes resultados apresentados até o presente momento, concluímos que nosso modelo de indução da EMT com SAHA é consistente e evidencia alterações moleculares, bioquímicas e funcionais correlacionadas a EMT.

Dando continuidade aos nossos estudos de modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT, realizamos o ensaio de migração celular na presença do inibidor MG132. Foi observado aumento significativo da migração celular, que se destaca principalmente nas células sem tratamento combinado com SAHA (**Figura 20**).

A análise da **Figura 21** destaca também mudanças significativas da migração celular decorridas pela ação de P5091 15 µM nas células MCF-7. Com 24 horas de tratamento é possível observar que quase todas as áreas disponíveis para migração foram ocupadas nos dois tratamentos, P5091 e em sua ação combinada com SAHA.

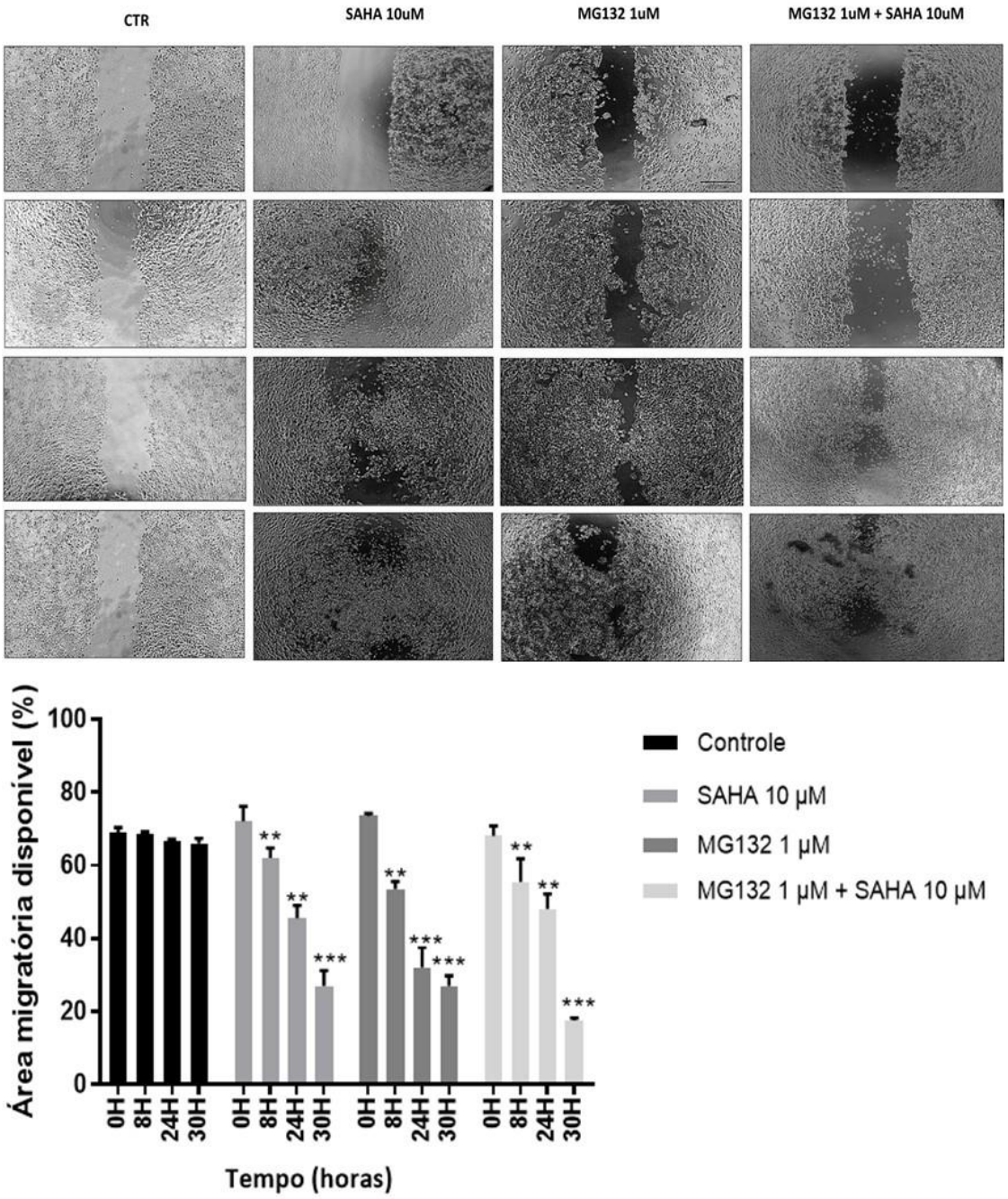

Figura 20. Ensaio de migração das células MCF-7 induzidas à EMT e moduladas com MG132. No painel superior observa-se a migração celular de MCF-7 realizada durante 0, 8, 24 e 30 horas, induzidas a EMT e tratadas com MG132 e sua ação combinada. No painel inferior, foi quantificada a migração relativa das células. Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais com resultados estatisticamente significativos (***p<0,001, ** p<0,05) em relação ao controle de cada tratamento.

Em conclusão, os estudos de desenvolvimento dos modelos aqui apresentados sugerem alterações relacionado ao sistema ubiquitina proteassoma que são inibidas por MG132 e P5091 durante a EMT e que

favorecem a aquisição do fenótipo mesenquimal observado pelas células MCF-7. Assim, para entendimento das interrelações entre as vias da EMT e de degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina proteassoma, necessitamos de estudos mais aprofundados e também mais amplos que possam indicar as proteínas chave de conectam esses importantes processos da progressão tumoral. Nas próximas seções, daremos destaque aos resultados obtidos com estratégias proteômicas, que abriram novas perspectivas neste estudo.

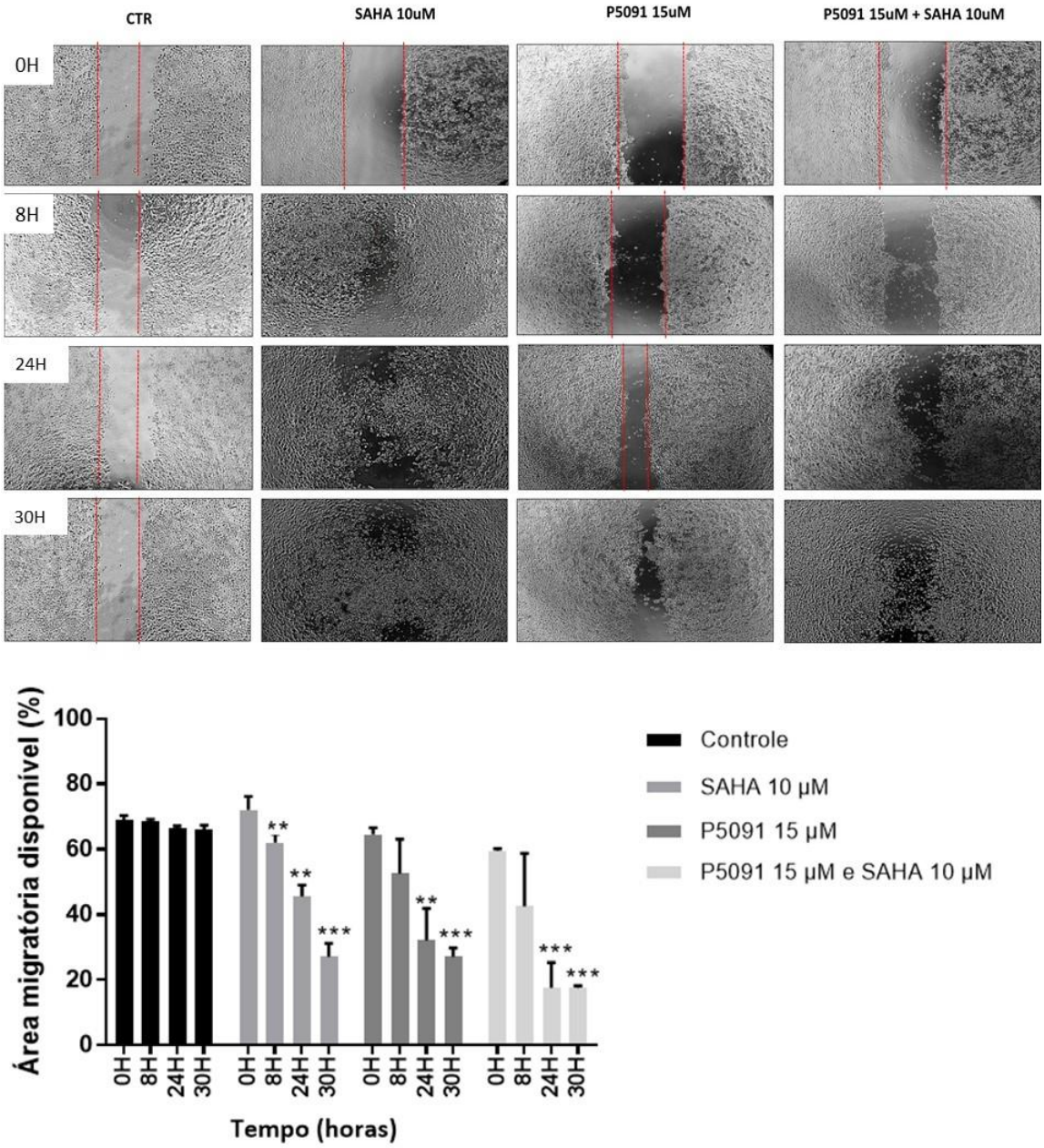

Figura 21. Ensaio de migração das células MCF-7 induzidas à EMT e moduladas com P5091. No painel superior observa-se a migração celular de MCF-7 realizada durante 0, 8, 24 e 30 horas, induzidas a EMT e tratadas com p5091 e sua ação combinada. No painel inferior,

foi quantificada a migração relativa das células. Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais com resultados estatisticamente significativos (**p<0,05, ***p<0,001) em relação ao controle de cada tratamento.

4.9 Análise por monitoramento múltiplo de reações (MRM) das alterações proteicas induzidas pela EMT e moduladas por P5091

Com a finalidade de estender nossos estudos das alterações proteicas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT, utilizamos a estratégia denominada monitoramento de reações múltiplas (MRM). A análise apresenta alta sensibilidade e permite a detecção simultânea de várias proteínas a partir de uma mesma amostra contendo aproximadamente 100 µg de proteínas totais. Para o desenvolvimento do método de MRM, foi realizada uma seleção de peptídeos trípticos ideais e dados públicos e externos ao nosso laboratório para as proteínas de interesse. Os peptídeos foram escolhidos com base no padrão de expressão celular através do banco de dados SRM atlas, que serve ou sintetizados sevindo como padrão interno nas amostras [85].

Após o estabelecimento da melhor condição do processo de indução da EMT e padronização do inibidor P5091, 27 peptídeos representando as principais proteínas biomarcadoras da EMT foram selecionadas para monitoramento. O perfil cromatográfico de todos os peptídeos analisados está demostrado na **Figura 22.**

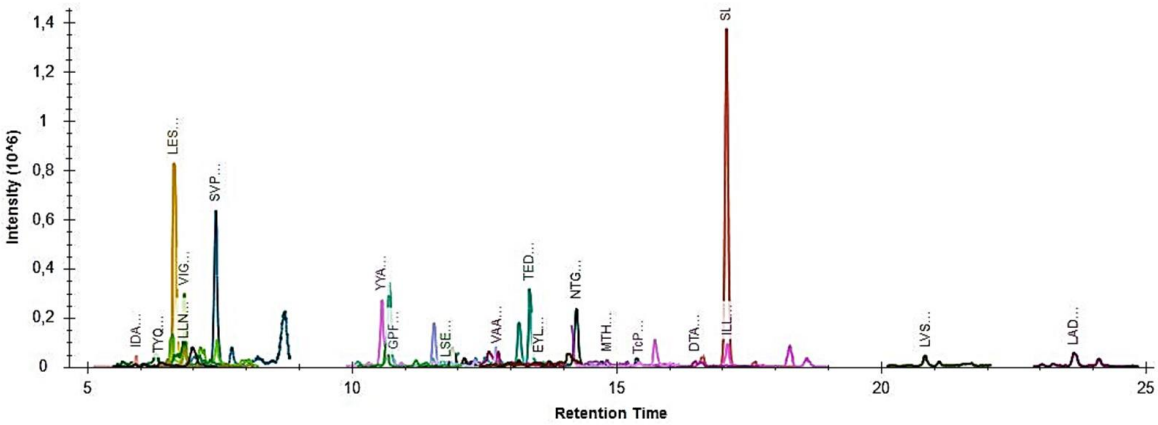

Figura 22- Perfil dos 27 peptídeos analisados por MRM representando proteínas de interesse envolvidas com a EMT e o sistema ubiquitina proteassoma. O ensaio foi realizado utilizando 100 µg de extrato total de células MCF-7 induzidas á EMT com SAHA e tratadas com P5091 e ainda sua ação combinada. Para o ensaio de MRM, foram utilizados peptídeos padrões para proteínas disponíveis em nosso laboratório e dados públicos externos para os quais não tínhamos disponíveis.

A análise por MRM demonstrou que a aquisição de uma nova morfologia pelas células MCF-7 após a indução da EMT foi sustentada por aumento de proteínas clássicas do processo, tais como Vimentina, SNAIL e ainda USP7. Resultado também condizente com o esperado pode ser observado para a proteína E-caderina, CTNNB1 e HDAC, que apresentaram seus níveis reduzidos após a indução da EMT, apoiando o fenótipo de perda das junções célula-célula e aumento da capacidade celular migratória **(Figura 23).**

Em nossa análise por MRM, fica claro que a expressão de USP7 diminui de forma significativa quando tratada com P5091 15 µM. Ainda, nossos resultados indicam uma diminuição significativa na expressão de β-catenina, HDAC, P53, CDK1 e CDH1 quando moduladas com o inibidor P5091, fato que sugere papel de USP7 na EMT.

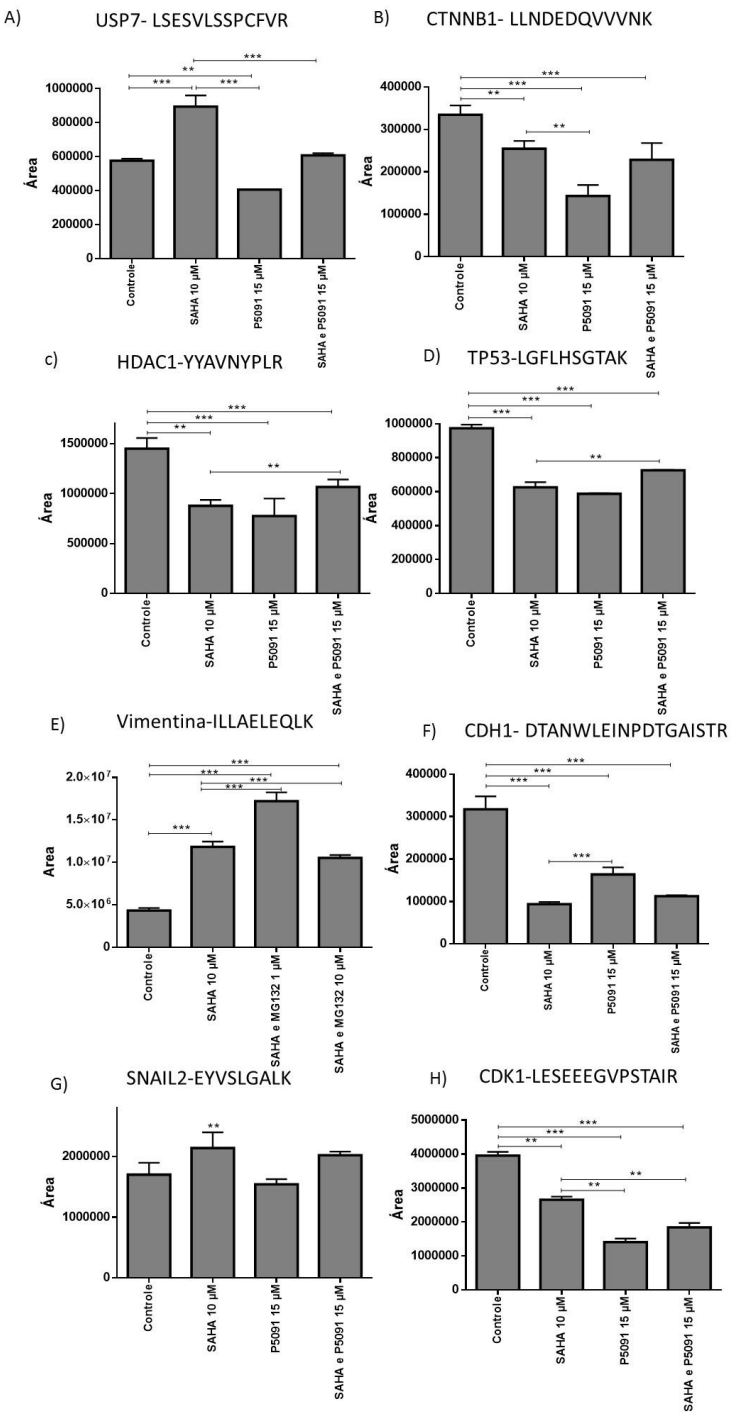

Figura 23- Avaliação de proteínas marcadoras da EMT em células MCF-7 através do método de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Após 24 horas amostras das células MCF-7, induzidas ou não a EMT e moduladas por P5091 15 µM foram submetidas à digestão *in situ* e analisadas pelo método de MRM para monitoramento das proteínas A) USP7 B) HDAC1 C) CTNNB1, D) P53, E) Vim, F) CDH1, G) SNAIL2, H) CDK1, Os gráficos de barra representam a média da área o pico de cada peptídeo proteotípico. Resultados estatisticamente significativos (**p<0,05 e ***p<0,001) em relação ao controle.

4.10 Array de proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma de células MCF-7 induzidas a EMT e moduladas por MG132

A análise do perfil de expressão de proteínas ubiquitinadas é essencial para a compreensão de respostas celulares normais e no desenvolvimento de doenças. Para detectar a presença de proteínas reguladas pelo sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT, utilizamos um kit na forma de arranjo de anticorpos que detecta simultaneamente 49 proteínas que são substratos de ubiquitina. Esta análise foi realizada entre as diferentes amostras induzidas à EMT e tratadas com MG132, bem como com ação combinada dos dois tratamentos. O resultado desta análise está representado na **Figura 24 a 26.**

Dentre as proteínas monitoradas, 24 delas apresentaram expressão diminuída em ambos os tratamentos. Interessantemente, as outras 25 proteínas apresentavam regulação diferente entre os grupos tratados **(Figura 26)**. De acordo com a lista de proteínas reguladas e a disponibilidade imediata dos anticorpos, as proteínas p21, IRS1 e EGFR foram selecionadas para análise por *western blotting*, confirmando os resultados encontrados por alterações proteômicas do Array. Destaca-se ainda, o aumento da expressão de p21 quando moduladas por MG132 e ainda quando induzidas à EMT. A proteína p21, também já foi demonstrada como alterada durante a EMT em linhagem de ovário induzidas com EGF, e representa fundamental importância para controle do ciclo celular, fato que se faz essencial durante a progressão tumoral [72].

Além disso, vale destacar que a linhagem epitelial MCF-7 é positiva para o receptor de estrógeno ER-α, e sua diminuição demonstrada pelo kit Array pode ser marcador de progressão tumoral e metástase, fato sustentado ainda pela maior diminuição durante o tratamento com MG132 e sua ação combinada com SAHA **(Figura 24).**

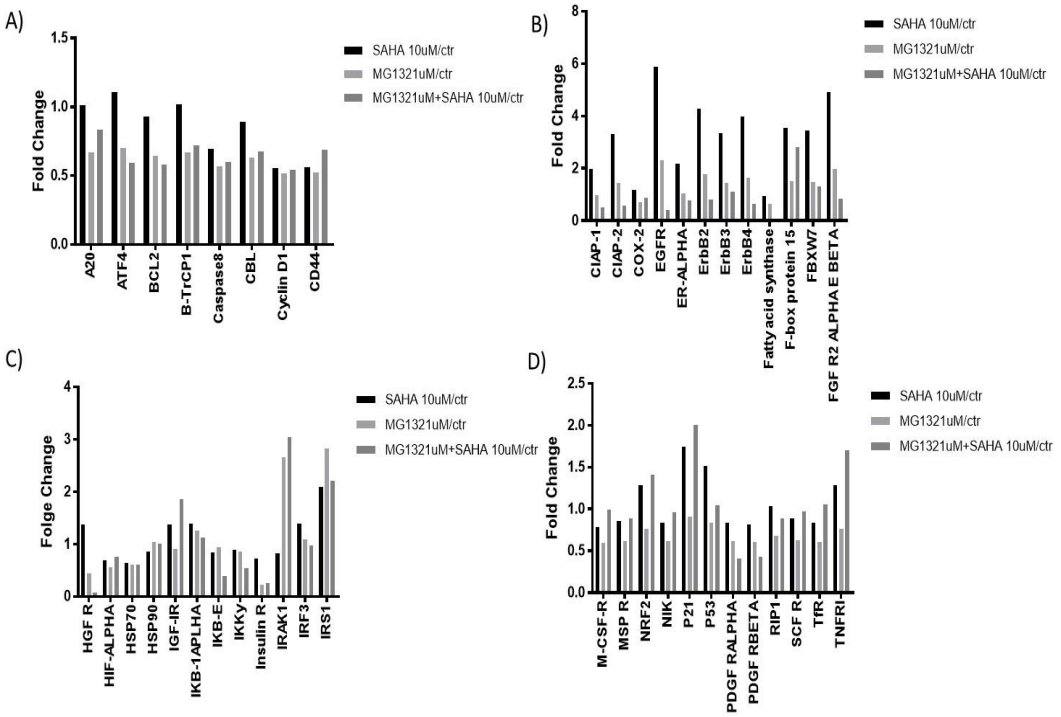

Figura 24- Quantificação das imagens do *array* de proteínas (*Kit Proteome Profile Array*** R&D systems, ARY027) da ativação da via de sinalização relacionado ao sistema ubiquitina proteassoma em células MCF-7 induzidas à EMT e tratadas com MG132 1 µM e sua ação combinada com SAHA. Foram aplicados 200 µg de proteína total em cada spot com base na quantificação pelo reagente de Bradford. MCF-7 controle; MCF-7 tratatadas com MG132 1 µM e MG132 1 µM + SAHA 10 µM.

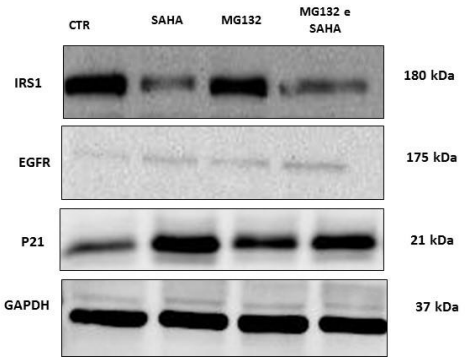

Figura 25- Confirmação por *western blotting* da ativação da via de sinalização de ubiquitina em células MCF-7 tratadas com o inibidor do proteassoma MG132 (1 µM). Foram aplicados 30 µg de proteínas em cada raia, com base na quantificação pelo reagente de Bradford. MCF-7 controle; MCF-7 tratadas com MG132 1 µM e MG132 1 µM + SAHA 10 µM.

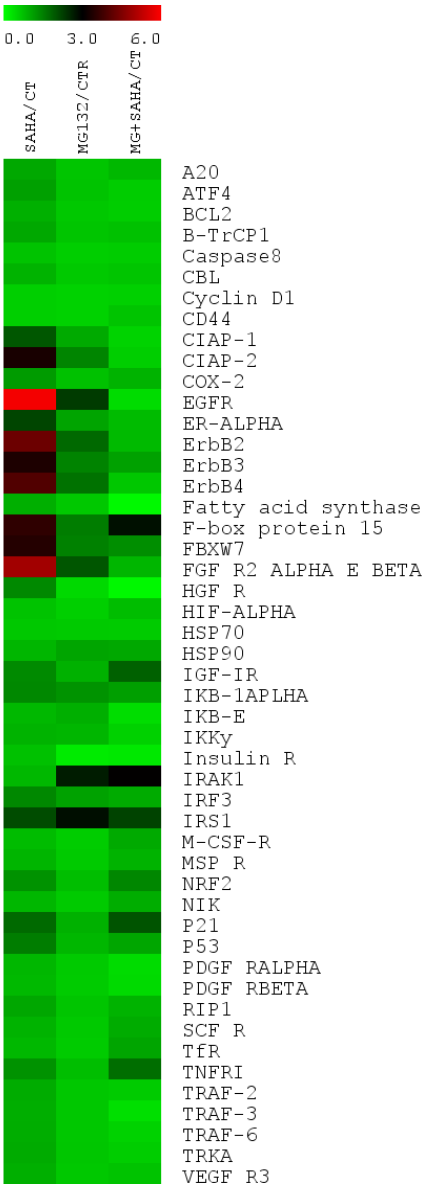

Figura 26- Agrupamento de proteínas ubiquitinadas pela indução da EMT em células MCF7 com o agente SAHA e alterados pelo inibidor de ubiquitinação MG132. Os dados foram coletados utilizando kit Arranjo de proteínas ubiquitinadas. O gráfico indica o foldchange das proteínas entre duplicadas técnicas analisadas. Em verde está representado proteínas que sofrera diminuição de sua expressão e em vermelho aumento da expressão quando comparados ao controle.

5. DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, a busca por estratégias terapêuticas mais eficientes contra diferentes tipos de câncer tem refletido em uma ampla gama de trabalhos disponíveis na literatura, que visam a elucidação de novos mecanismos de sinalização presentes nas células tumorais ou mesmo a descoberta de novos fármacos ou moléculas capazes de inibir a proliferação celular e, por fim, o crescimento tumoral. Apesar dos recentes avanços na medicina, os processos de metástase, reincidência tumoral e resistência a terapia continuam sendo responsáveis pelas altas taxas de mortalidades de pacientes com câncer de mama de estágios avançados. Sem dúvida, o melhor entendimento dos mecanismos moleculares de condução e progressão do câncer auxilia no desenvolvimento de alternativas para diagnóstico precoce e tratamento da doença.

Para superar todas as etapas que compõem a cascata de invasão metastática, as células tumorais precisam adquirir capacidade migratória e invasiva através do processo de transição epitélio mesenquimal. Dessa forma, diversos estudos têm demonstrado que a ativação do processo de EMT permite às células tumorais um aumento da capacidade migratória e invasiva que se torna fundamental à metástase [10, 80, 86, 87]. O processo de EMT, envolve o rompimento das junções aderentes e a perda da polaridade celular, permitindo que as células tumorais se dissociem do tumor primário adquirindo múltiplos fatores mesenquimais [9].

O papel da EMT na invasão e metástase de câncer é fortemente apoiada por vários modelos celulares *in vitro* e apesar de diversos estudos, as vias de regulação de todo o processo ainda não está desvendada, uma vez que diversos mecanismos bioquímicos e moleculares cooperam para aquisição de características mesenquimais. Com o intuito de simular o processo de EMT *in vitro* foi utilizada a linhagem epitelial de mama, MCF-7. A indução da EMT, pode ser realizada através de diferentes moléculas, neste estudo, realizada com o inibidor de histona deacetilase, SAHA, capaz de aumentar a expressão de alguns importantes marcadores mesenquimais, como SNAIL e Vimentina. Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que a inibição de HDAC1

através de SAHA aumentava a expressão de SNAIL, essencial para o processo de EMT e metástase, corroborando com nossos dados aqui demonstrados [26]. Assim, como resultado do processo de indução, as células perderam a forma cúbica e adquiriram caráter fusiforme característico das células mesenquimais, demonstrando uma indução eficaz e bem caracterizada da EMT com 10 µM de SAHA.

O inibidor SAHA, conhecido também como Verinostat, já passou por 135 estudos clínicos e está sendo atualmente estudado em outros 85 para diversos tumores sólidos e hematológicos (clinicaltrials.org). Segundo alguns autores, inibidores de histonas deacetilases podem promover a EMT em diferentes linhagens de células cancerígenas por meio da estabilização da proteína SNAIL [26, 43], promovendo sua acetilação e inibindo sua degradação por proteassoma [44]. Entretanto, outros estudos sugerem que estes inibidores podem inibir a EMT a partir da superexpressão da proteína E-caderina [45, 46]. Nossos resultados apontam efeitos de SAHA no processo de EMT, demonstrado pelo aumento da expressão de SNAIL, diminuição de E-caderina e β-catenina, dados que sugerem risco quanto ao seu uso clínico.

Baseado no modelo das células MCF-7 aqui estudados, nosso mecanismo de indução foi apoiado ainda por diminuição nos níveis do receptor de estrógeno (ERα) por array quando tratadas com SAHA, uma vez que esta linhagem é positiva para ERα, e sua diminuição é associada com aumento da agressividade tumoral. O receptor de EGR, EGFR, pertence à família ErbB de receptores tirosina quinase (RTK), a qual consiste em quarto proteínas transmembrana, ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3, e ErbB4/HER4 [88]. É bem estabelecido que EGFR está desregulado ou mutado em diversas malignidades epiteliais, como o câncer de cólon, de pulmão e o de mama [89, 90]. Especificamente no câncer de mama, entre os vários subtipos, EGFR é mais frequentemente expresso nos tipos triplo negativo e inflamatório, os quais são altamente agressivos, e seu perfil de expressão é inversamente proporcional com o status do receptor de estrógeno (ER), fato que confirma nossos apresentados por array [88].

Ainda buscando melhor entendimento do processo de EMT, nosso grupo realizou diversas análises proteômicas prévias a fim de elucidar vias envolvidas na EMT e metástase do câncer. Dessas análises em linhagens celulares de mama induzas a EMT por superexpressão de SNAIL ou com TGFβ2, foram detectadas 99 proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma, dentre as quais 45 estavam reguladas durante a EMT. Com base neste alto número de proteínas reguladas, hipotetizamos que interferências na via do proteassoma poderia também interferir na EMT e em todos os processos biológicos que nela ocorrem, como, por exemplo, migração celular. Sabe-se também que muitos processos celulares são modulados por mecanismos finamente controlados por modificações pós traducionais.

O sistema ubiquitina proteassoma representa o componente central da maquinaria de degradação de proteínas celulares com funções essenciais para homeostase, que incluem a prevenção do acúmulo de proteínas mal dobradas ou deletérias. Assim, partindo do princípio que as células cancerígenas produzem proteínas essenciais para sobrevivência/proliferação celular e inibem mecanismos de morte celular, surgiu-se a ideia de que inibir o proteassoma poderia ser importante para estudos de novos alvos contra o câncer [47].

Os inibidores de proteassoma foram inicialmente desenvolvidos com potencial benéfico para o tratamento da caquexia relacionado ao câncer, e dessa forma, muitos estudos pré-clínicos posteriores surgiram e demonstraram induzir apoptose em linhagens celulares e modelos murinos de câncer. A princípio, as células de mieloma são altamente sensíveis a inibição do proteassoma por duas razões principais: Estas células expressam uma grande quantidade de imunoglobulinas anormais, o que corrobora com a função do proteassoma, eliminar proteínas mal dobradas e tóxicas para a célula e também inibindo o proteassoma, mais proteínas mal dobradas ficariam acumuladas, induzindo mecanismos apoptóticos. A segunda razão é ainda baseada no fato de que as células do mieloma apresentam expressão aumentada de NFKβ e o proteassoma ser seu principal mecanismo de degradação. NFKβ é responsável por inibir a apoptose, promover a expressão de citocinas e fatores de crescimento importantes para o desenvolvimento tumoral. Dessa forma, o tratamento com inibidores do proteassoma preveniria a

ativação de NFKβ e permitiria ainda o acumulo de proteínas mal dobradas sinalizando mecanismos apoptóticos celulares [91-93].

No contexto do câncer e EMT, NFkβ participa de várias vias inibindo a apoptose e induzindo a proliferação celular, e ainda induz fatores de transcrição importantes para obtenção do fenótipo mesenquimal, como SNAIL, TWIST e ZEB. Estudos anteriores demonstraram que NFkβ pode induzir a superespressão de SNAIL, prevenindo ubiquitinação e sua consequente degradação por E3 ligase βTRCP, com consequente ativação da progressão tumoral [94-98]. P53 é outro fator de transcrição importante durante a EMT, regulando ciclo celular e apoptose. Quando a célula não está sob situações de estresse p53 é ubiquitinado pela E3 ligase MDM2 e, então, degradado no proteassoma. Quando ativado em resposta a um dano de DNA, p53 executa um programa de transcrição dependendo de modificações pós-traducionais e coativadores disponíveis para a interrupção do ciclo celular, dando tempo necessário para reparo do DNA ou apoptose [99].

Visando avaliar a interferência do sistema ubiquitina proteassoma sobre proteínas que regulam a estabilidade e translocação proteica durante o processo de EMT, utilizamos dois diferentes inibidores químicos específicos que regulam o sistema ubiquitina proteassoma, MG132 e P5091 [58]. O MG132 é um inibidor do proteassoma da mesma classe do Bortezomibe, atual tratamento disponível para mieloma múltiplo e alvo de diversos outros tipos tumorais. Já P5091 é um inibidor específico de USP7, uma deubiquitinase regulada em nossos estudos e curiosamente envolvida com diversas proteínas que participam da migração celular e metástase [100].

Como discutido anteriormente, a diminuição na expressão de E-caderina seguido pelo aumento de N-caderina ou a superexpressão de Vimentina tem sido considerado indicadores importantes na progressão tumoral, visto que são proteínas marcadoras para o processo de EMT [9]. A análise de migração celular representa uma importante etapa durante a progressão tumoral, fato que corrobora com nossos resultados, demonstrando aumento na capacidade migratória de MCF-7 induzidas à EMT e moduladas por MG132 e P5091 em relação ao controle, uma vez que estas se destacaram e se expandiram,

ultrapassando as barreiras de células, a fim de ocuparem o espaço da ranhura. Ainda, análise morfológica e de Imunofluorescência revelaram alterações significativas na expressão de dois dos principais marcadores mesenquimais, Vimentina e SNAIL em células MFC-7 com ambos os tratamentos, corroborando com o aumento da migração celular, essencial para ocorrência de metástase. Além disso, nossos resultados levaram a consistentes divergências perante ao uso destes inibidores, mostrando regulação a nível bioquímico e molecular das principais proteínas envolvidas na indução da EMT.

Como descrito anteriormente, a proteína β-Catenina, é uma das principais proteínas reguladoras da EMT é também degradada pelo sistema ubiquitina-proteassoma. Alguns estudos demonstraram que na maioria das células epiteliais, a expressão de β-Catenina é baixa devido a sua constante degradação pelo sistema ubiquitina proteassoma, através de sua E3- ligase β-TrCP. Assim, uma falha na ubiqutinação de β-Catenina levaria a sua consequente ativação, facilitando o processo de formação de células mesenquimais [101]. Nossos resultados apresentam efeitos contrários, uma vez que a indução da EMT com SAHA levou a diminuição de β-catenina, já bem estabelecido na literatura. Sendo assim, alterações no padrão de expressão destas proteínas se relacionam à aquisição de fenótipo mesenquimal, promovendo a migração celular e metástase, competências relacionadas à progressão tumoral com participação fundamental do sistema ubiquitina proteassoma [9, 14].

Esforços mais recentes concentraram-se na descoberta e desenvolvimento de inibidores de moléculas de outros componentes principais do sistema ubiquitina proteassoma, incluindo inibidores de DUBs, enzima conjugada E1 ou E3-ubiquitina ligase [67]. Dentre as proteínas reguladas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma, USP7 aparece em ambas as linhagens identificadas em nossa metanálise, além de estar correlacionada com a progressão tumoral por participar de vias importantes, como P53 e MDM2 [100]. Baseado nestes fundamentos e em nossas análises por *western blotting* e MRM, que demonstraram significativo aumento de USP7 durante a indução da EMT com SAHA, realizamos a padronização e inibição desta DUB específica com P5091 durante a EMT.

Estudos anteriores demonstram que em condições não patológicas, USP7 estabiliza os níveis de MDM2 fato que leva a constante ubiquitinação e degradação de P53. Ao contrário, quando USP7 é inibida, MDM2 é degradada, deixando níveis elevados de P53, o que corrobora com nossos dados demonstrados por *western blotting*. Adicionalmente, USP7 pode apresentar efeito dúbio, agindo tanto como supressor de tumor como também como oncogenes. Sob condições patológicas, a expressão de USP7 apresenta profunda variação em câncer bexiga [102], pulmão [103], colo [104], próstata [105], cérebro [106], ovário [107] e mama [64]. Além disso, mutações no gene de USP7 sugerindo perda ou ganho de função pode ser favorável para o crescimento tumoral [100].

Estudos anteriores em linhagens de adenocarcinoma de pulmão demonstraram superexpressão de USP7 correlacionada com migração celular metástase por diminuição de E-caderina e superexpressão de Vimentina. Ainda no mesmo estudo a inibição de USP7 por RNA de interferência aumentou níveis de proteínas epiteliais e diminuiu proteínas mesenquimais [66]. Outro estudo realizado por Wang e colaboradores. 2017, demonstrou que P5091 pode agir como supressor do crescimento tumoral e indutor de autofagia em câncer de ovário, sugerindo também a inibição de USP7 como potencial mecanismo terapêutico [65]. Neste contexto, para avaliar a interferência de USP7 durante a EMT, realizamos análises de proteômica dirigida realizadas em células MCF-7 tratadas com P5091 e ainda sua ação combinada com SAHA. Ainda, o desenvolvimento do método de MRM em nosso laboratório merece destaque por ter contribuído de forma efetiva com as etapas do estudo, pois a quantificação de proteínas conhecidamente relacionadas à EMT somadas a outras metodologias aqui presentes, foram essenciais para análise da efetividade da indução da EMT por SAHA e modulações por P5091.

A diminuição da expressão de β-catenina e E-caderina demonstrados em nossos resultados, caracteriza a EMT, visto que tais proteínas são marcadores epiteliais já bem descritos na literatura. Como relatado anteriormente, β-catenina é uma proteína multifuncional codificada pelo gene CTNNB1 que desempenha um papel crucial no processo de metástase tumoral. No contexto da EMT, ocorre como consequência, a desorganização do

complexo E-caderina/β-catenina e consequente liberação da β-catenina, a qual se acumula no citoplasma. Na ausência de sinais de crescimento e diferenciação, a concentração de β-Catenina livre no citoplasma é regulada através da sua fosforilação, seguida por degradação pela via ubiquitina/proteassoma [108]. Adicionalmente, β-Catenina pode ser deubiquitinada por USP7 levando sua constante ativação, fato que corrobora com nossos resultados aqui apresentados, uma vez que a inibição de USP7 leva a diminuição da expressão de β-catenina [109].

Ainda, durante a progressão tumoral múltiplos mecanismos moleculares convergem a fim de suprir as necessidades básicas de uma célula, regulando principalmente ciclo celular, geração de ATP e biossíntese de macromoléculas. Assim, proteínas do ciclo celular são constantemente reguladas por diferentes proteínas chaves chamadas ciclinas dependentes de quinase (CDK), uma família de serina/treonina quinases, que são ativadas em pontos específicos do ciclo. Até agora, nove CDK foram identificadas, sendo que cinco delas participam do ciclo celular, durante G1 (CDK4, CDK6 e CDK2), S (CDK2), G2 e M (CDK1). Os níveis de ciclinas se alteram ao longo do ciclo celular e, desta forma, eles periodicamente ativam as CDK. A EMT induzida por SAHA foi capaz de alterar a transição da fase G2 e M de maneira independente de P53, que não foi detectada modulação em nossa análise *por western blotting* [72]. Em cerca de metade de todos os tipos de câncer, o gene TP53 é perdido ou mutado, resultando na expressão de uma proteína mutante transcricionalmente inativa [110]. Essas alterações foram mostradas com redução significativa de CDK1, típico da indução da EMT, que tem sido indicativo de um prognóstico ruim para pacientes com câncer de mama [26]. Adicionalmente, a expressão de USP7 demonstrou estar correlacionada com a expressão de CDK1, uma vez que sua inibição levou a diminuição de CDK1, resultado relacionado a regulação de outras proteínas do ciclo celular [111].

Dentro ainda das modificações pós traducionais de conjugação de pequenas proteínas, as vias de sumoilação também são fundamentais em processos tumorais. Neste processo ocorre uma ligação reversível de SUMO, uma pequena proteína de 95 aminoácidos (isoforma de SUMO2), que modula muitos aspectos regulatórios incluindo o controle do ciclo celular, o transporte

nuclear, entre outros [112]. Embora a compreensão dos mecanismos envolvendo o papel regulatório destas modificações pós-traducionais no câncer ainda não esteja desvendada, há uma crescente lista de fatores de transcrição e proteínas que induzem a EMT em células cancerosas que também são reguladas por sumoilação [113]. Estudos anteriores demonstraram que em células de câncer de mama, ocorre uma superexpressão de FOXM1, a qual é capaz de induzir a EMT. Curiosamente, FOXM1 é regulada por sumoilação, reprimindo sua transcrição, e aumentando a ubiquitinação e degradação mediada por APC/Cdh [114]. A via de sumoilação também é capaz de regular p53, por conjugação direta ou atividade mediada por MDM2 [115]. Ainda, nossos resultados demonstram significativa redução de SUMO2 durante a EMT induzida por SAHA, confirmando o envolvimento regulatório de ubiquitinas similares durante processos de progressão tumoral.

Estudos prévios realizados por Asakur e colaboradores. 2015, destacou a participação de diferentes inibidores do proteassoma durante a EMT em células de carcinoma endotelial e resistentes a bortezomibe e MG132, as quais adquiriam invasão celular como consequência da terapia, comprovado pela diminuição da expressão de E-caderina e aumento de ZEB1 [116]. Kim e colaboradores. 2011 também identificaram que MG132 pode desencadear EMT e progressão tumoral através da proteína transmembranar TM4SF5 em diferentes linhagens celulares [117]. Contrário a estes estudos, Baritaki e colaboradores. 2009 demonstrou que o inibidor do proteassoma NPI-0052 leva a inibição da EMT em câncer de próstata, através da supressão de SNAIL e aumento da expressão de E-caderina [118]. Assim, resultados controversos são encontrados na literatura em relação aos inibidores do proteassoma, fato que demonstra necessidade de maior atenção voltada ao uso destes inibidores.

De maneira geral, a análise das proteínas reguladas pela atividade do inibidor de histonas deacetilases SAHA e os inibidores do proteassoma (MG132) e de USP7 (P5091) em células MCF-7 permitiu a identificação de diversas vias e processos celulares alterados pela indução da EMT. Outros resultados preliminares e ainda não publicados pelo nosso laboratório mostram que algumas proteínas reguladas neste estudo relacionadas ao sistema

ubiquitina proteassoma são também alteradas durante a indução da EMT com TGFβ em linhagem epitelial de mama (MCF10A), como as proteínas SUMO2, SUMO1, USP7 e USP10, indicando a interligação das redes de sinalização e indução da EMT com o sistema ubiquitina proteassoma. Nossos resultados sugerem o aumento da migração celular e potencialmente a evolução para um processo de metástase tumoral de células de adenocarcinoma de mama quando moduladas com os inibidores relacionados ao sistema ubiquitina proteassoma, MG132 e P5091, fato que demonstra que a inibição de vias tão específicas pode levar a padrões celulares alterados capazes de desencadear ou ainda potencializar processos de progressão tumoral. De fato, a modulação de via bioquímicas e moleculares específicas por modificações pós-traducionais durante a EMT ainda não está desvendada. O que fica claro com os dados aqui apresentados é que há uma intensa modulação do sistema ubiquitina proteasssoma, que se mostrou regulado a nível de diversas proteínas indutoras do processo.

No geral, os resultados aqui demonstrados revelam que o inibidor SAHA foi um potente inibidor da EMT, favorecendo a aquisição do fenótipo mesenquimal e a migração celular e destacamos a regulação da EMT por modificações pós-traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma como um importante passo para progressão tumoral. O estudo proteômico aqui descrito permitiu revelar alterações em diversas proteínas já relacionadas direta ou indiretamente ao processo de metástase. Em conjunto com estas proteínas, várias outras ainda não correlacionadas aos processos da progressão do câncer também foram identificadas. Todas elas, individualmente ou em conjunto dentro das diferentes redes ou vias de sinalizações descritas, representam potenciais alvos para inibição da progressão tumoral. Assim, este estudo, combinado com outros estudos do nosso grupo abre novas possibilidades para tentar alterar processos relacionados à EMT e potencialmente inibir o câncer metastástico. Descrevemos ainda que a inibição de apenas uma deubiquitinase específica está relacionada com diversas vias celulares que corroboram para obtenção de um novo fenótipo celular, fato que sugere USP7 como um novo alvo terapêutico para progressão tumoral.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo foi demonstrado a eficiência do inibidor de histona deacetilase SAHA como agente indutor da EMT em células de adenocarcinoma de mama MCF-7. A partir de um modelo bem estabelecido que buscou mimetizar uma etapa da cascata metastática foi possível avaliar as interferências de vias importantes de modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma, que exercem grande importância na modulação de diversas vias bioquímicas corroborando para aquisição de um novo fenótipo que favoreça a migração e progressão tumoral. Baseando-se neste modelo, a análise de proteínas relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma durante a EMT e moduladas com MG132 possibilitou a identificação de proteínas reguladas importantes em diversas vias que corroboram para aquisição de um fenótipo mesenquimal, como ciclo celular e comunicação. Análises por proteômica dirigida validaram as alterações na expressão de USP7, Vimentina, β-catenina, E-caderina, HDAC e P53. Nossos resultados demonstram que a inibição de vias tão específicas são capazes de levar a alterações morfológicas, moleculares e bioquímicas e regular uma série de processos ativadas durante a EMT. Além disso, demonstramos a importância das modificações pós traducionais relacionadas ao sistema ubiquitina proteassoma para EMT que, consequentemente, podem auxiliar na descoberta de novas terapias aplicadas a progressão tumoral e ao processo metastático.

7. Referências Bibliográficas

1. Du, W. and O. Elemento, *Cancer systems biology: embracing complexity to develop better anticancer therapeutic strategies.* Oncogene, 2015. **34**(25): p. 3215-25.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016.* CA Cancer J Clin, 2016. **66**(1): p. 7-30.
5. Fitzmaurice, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study.* JAMA Oncol, 2016.
6. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2018.* CA Cancer J Clin, 2018. **68**(1): p. 7-30.
7. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012.* CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
8. Seely, J.M. and T. Alhassan, *Screening for breast cancer in 2018-what should we be doing today?* Curr Oncol, 2018. **25**(Suppl 1): p. S115-S124.
9. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.* Cell, 2009. **139**(5): p. 871-90.
10. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
11. Nguyen, D.X., P.D. Bos, and J. Massague, *Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization.* Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 274-84.
12. Chaffer, C.L., et al., *EMT, cell plasticity and metastasis.* Cancer Metastasis Rev, 2016. **35**(4): p. 645-654.
13. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, *A perspective on cancer cell metastasis.* Science, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
14. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 442-54.
15. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells.* J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 333-9.
16. Samatov, T.R., A.G. Tonevitsky, and U. Schumacher, *Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds.* Mol Cancer, 2013. **12**(1): p. 107.
17. Larance, M. and A.I. Lamond, *Multidimensional proteomics for cell biology.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2015. **16**(5): p. 269-80.
18. Gonzalez, D.M. and D. Medici, *Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition.* Science signaling, 2014. **7**(344): p. re8.
19. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
20. Medici, D., E.D. Hay, and D.A. Goodenough, *Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition.* Molecular biology of the cell, 2006. **17**(4): p. 1871-9.

21. Grassi, M.L., et al., *Proteomic analysis of ovarian cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by epidermal growth factor (EGF) reveals mechanisms of cell cycle control.* Journal of proteomics, 2017. **151**: p. 2-11.
22. Diaz, V.M., R. Vinas-Castells, and A. Garcia de Herreros, *Regulation of the protein stability of EMT transcription factors.* Cell adhesion & migration, 2014. **8**(4): p. 418-28.
23. Chaffer, C.L., et al., *EMT, cell plasticity and metastasis.* Cancer metastasis reviews, 2016. **35**(4): p. 645-654.
24. Zi, Z., D.A. Chapnick, and X. Liu, *Dynamics of TGF-beta/Smad signaling.* FEBS letters, 2012. **586**(14): p. 1921-8.
25. Zhang, Y.E., *Non-Smad pathways in TGF-beta signaling.* Cell research, 2009. **19**(1): p. 128-39.
26. Palma Cde, S., et al., *Proteomic Analysis of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Reveals Cross-talk between SNAIL and HDAC1 Proteins in Breast Cancer Cells.* Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(3): p. 906-17.
27. Wang, Y., et al., *The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis.* Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(9): p. 963-972.
28. Damaskos, C., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer.* Anticancer Res, 2017. **37**(1): p. 35-46.
29. Rando, O.J. and K. Ahmad, *Rules and regulation in the primary structure of chromatin.* Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(3): p. 250-6.
30. Inche, A.G. and N.B. La Thangue, *Chromatin control and cancer-drug discovery: realizing the promise.* Drug Discov Today, 2006. **11**(3-4): p. 97-109.
31. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation.* Bioessays, 1998. **20**(8): p. 615-26.
32. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function.* Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
33. Gong, C., et al., *BRMS1L suppresses breast cancer metastasis by inducing epigenetic silence of FZD10.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 5406.
34. New, M., H. Olzscha, and N.B. La Thangue, *HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code?* Mol Oncol, 2012. **6**(6): p. 637-56.
35. Dokmanovic, M., C. Clarke, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives.* Mol Cancer Res, 2007. **5**(10): p. 981-9.
36. Ji, M., et al., *HDAC inhibitors induce epithelial-mesenchymal transition in colon carcinoma cells.* Oncol Rep, 2015. **33**(5): p. 2299-308.
37. Marks, P., et al., *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 194-202.
38. Munshi, A., et al., *Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gamma-H2AX foci.* Mol Cancer Ther, 2006. **5**(8): p. 1967-74.
39. Richon, V.M., et al., *Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10014-9.
40. Joosten, M., et al., *A novel approach to detect resistance mechanisms reveals FGR as a factor mediating HDAC inhibitor SAHA resistance in B-cell lymphoma.* Mol Oncol, 2016. **10**(8): p. 1232-44.

41. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors.* Nature, 1999. **401**(6749): p. 188-93.
42. Therasse, P., et al., *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada.* J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(3): p. 205-16.
43. Jiang, G.M., et al., *Histone deacetylase inhibitor induction of epithelial-mesenchymal transitions via up-regulation of Snail facilitates cancer progression.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(3): p. 663-71.
44. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, *Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?* Nat Rev Cancer, 2007. **7**(6): p. 415-28.
45. Lei, W., et al., *Histone deacetylase 1 is required for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(9): p. 1489-97.
46. Srivastava, R.K., R. Kurzrock, and S. Shankar, *MS-275 sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells, inhibits angiogenesis and metastasis, and reverses epithelial-mesenchymal transition in vivo.* Mol Cancer Ther, 2010. **9**(12): p. 3254-66.
47. Manasanch, E.E. and R.Z. Orlowski, *Proteasome inhibitors in cancer therapy.* Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(7): p. 417-433.
48. Voutsadakis, I.A., *The ubiquitin-proteasome system and signal transduction pathways regulating Epithelial Mesenchymal transition of cancer.* Journal of biomedical science, 2012. **19**: p. 67.
49. Hussain, S., Y. Zhang, and P.J. Galardy, *DUBs and cancer: the role of deubiquitinating enzymes as oncogenes, non-oncogenes and tumor suppressors.* Cell cycle, 2009. **8**(11): p. 1688-97.
50. Strieter, E.R. and D.A. Korasick, *Unraveling the complexity of ubiquitin signaling.* ACS chemical biology, 2012. **7**(1): p. 52-63.
51. Weissman, A.M., *Themes and variations on ubiquitylation.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(3): p. 169-78.
52. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination.* Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.
53. Amerik, A.Y. and M. Hochstrasser, *Mechanism and function of deubiquitinating enzymes.* Biochim Biophys Acta, 2004. **1695**(1-3): p. 189-207.
54. Vilchez, D., I. Saez, and A. Dillin, *The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 5659.
55. Dou, Q.P. and J.A. Zonder, *Overview of proteasome inhibitor-based anti-cancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system.* Curr Cancer Drug Targets, 2014. **14**(6): p. 517-36.
56. Kisselev, A.F. and A.L. Goldberg, *Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates.* Chem Biol, 2001. **8**(8): p. 739-58.
57. Park, J.E., et al., *Next-generation proteasome inhibitors for cancer therapy.* Transl Res, 2018.
58. Guo, N. and Z. Peng, *MG132, a proteasome inhibitor, induces apoptosis in tumor cells.* Asia Pac J Clin Oncol, 2013. **9**(1): p. 6-11.

59. D'Arcy, P., X. Wang, and S. Linder, *Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy.* Pharmacol Ther, 2015. **147**: p. 32-54.
60. Pfoh, R., I.K. Lacdao, and V. Saridakis, *Deubiquitinases and the new therapeutic opportunities offered to cancer.* Endocr Relat Cancer, 2015. **22**(1): p. T35-54.
61. Fraile, J.M., et al., *Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options.* Oncogene, 2012. **31**(19): p. 2373-88.
62. Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe, *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 550-63.
63. Millard, S.M. and S.A. Wood, *Riding the DUBway: regulation of protein trafficking by deubiquitylating enzymes.* J Cell Biol, 2006. **173**(4): p. 463-8.
64. Epping, M.T., et al., *TSPYL5 suppresses p53 levels and function by physical interaction with USP7.* Nat Cell Biol, 2011. **13**(1): p. 102-8.
65. Wang, M., et al., *The USP7 Inhibitor P5091 Induces Cell Death in Ovarian Cancers with Different P53 Status.* Cell Physiol Biochem, 2017. **43**(5): p. 1755-1766.
66. Zhao, G.Y., et al., *USP7 overexpression predicts a poor prognosis in lung squamous cell carcinoma and large cell carcinoma.* Tumour Biol, 2015. **36**(3): p. 1721-9.
67. Chauhan, D., et al., *A small molecule inhibitor of ubiquitin-specific protease-7 induces apoptosis in multiple myeloma cells and overcomes bortezomib resistance.* Cancer Cell, 2012. **22**(3): p. 345-58.
68. Nijman, S.M., et al., *A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes.* Cell, 2005. **123**(5): p. 773-86.
69. Manasanch, E.E. and R.Z. Orlowski, *Proteasome inhibitors in cancer therapy.* Nature reviews. Clinical oncology, 2017.
70. Poersch, A., et al., *A proteomic signature of ovarian cancer tumor fluid identified by highthroughput and verified by targeted proteomics.* Journal of proteomics, 2016. **145**: p. 226-36.
71. Palma Cde, S., et al., *Proteomic Analysis of Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) Reveals Cross-talk between SNAIL and HDAC1 Proteins in Breast Cancer Cells.* Molecular & cellular proteomics : MCP, 2016. **15**(3): p. 906-17.
72. Grassi, M.L., et al., *Proteomic analysis of ovarian cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by epidermal growth factor (EGF) reveals mechanisms of cell cycle control.* J Proteomics, 2017. **151**: p. 2-11.
73. Garcia-Foncillas, J., et al., *Proteomic analysis in cancer research: potential application in clinical use.* Clin Transl Oncol, 2006. **8**(4): p. 250-61.
74. Petricoin, E.F., et al., *Clinical proteomics: translating benchside promise into bedside reality.* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(9): p. 683-95.
75. Cox, J. and M. Mann, *Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology.* Annu Rev Biochem, 2011. **80**: p. 273-99.
76. Faca, V., A. Krasnoselsky, and S. Hanash, *Innovative proteomic approaches for cancer biomarker discovery.* Biotechniques, 2007. **43**(3): p. 279, 281-3, 285.
77. Liebler, D.C. and L.J. Zimmerman, *Targeted quantitation of proteins by mass spectrometry.* Biochemistry, 2013. **52**(22): p. 3797-806.
78. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

79. Faca, V.M., et al., *The secretome analysis by high-throughput proteomics and multiple reaction monitoring (MRM).* Methods Mol Biol, 2014. **1156**: p. 323-35.
80. Ye, X. and R.A. Weinberg, *Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression.* Trends Cell Biol, 2015. **25**(11): p. 675-86.
81. Shao, S., et al., *Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia.* Int J Oncol, 2014. **44**(5): p. 1661-8.
82. Gavilan, E., et al., *Breast cancer cell line MCF7 escapes from G1/S arrest induced by proteasome inhibition through a GSK-3beta dependent mechanism.* Sci Rep, 2015. **5**: p. 10027.
83. An, T., et al., *USP7 inhibitor P5091 inhibits Wnt signaling and colorectal tumor growth.* Biochem Pharmacol, 2017. **131**: p. 29-39.
84. Roberts, L.S., et al., *Mapping Novel Metabolic Nodes Targeted by Anti-Cancer Drugs that Impair Triple-Negative Breast Cancer Pathogenicity.* ACS Chem Biol, 2017. **12**(4): p. 1133-1140.
85. Kusebauch, U., et al., *Human SRMAtlas: A Resource of Targeted Assays to Quantify the Complete Human Proteome.* Cell, 2016. **166**(3): p. 766-778.
86. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions.* J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
87. Mittal, V., *Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis.* Annu Rev Pathol, 2018. **13**: p. 395-412.
88. Kyriakopoulou, K., et al., *Advances in targeting epidermal growth factor receptor signaling pathway in mammary cancer.* Cell Signal, 2018. **51**: p. 99-109.
89. Harari, P.M., *Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology.* Endocr Relat Cancer, 2004. **11**(4): p. 689-708.
90. Boopathy, G.T.K., et al., *Phosphorylation of Mig6 negatively regulates the ubiquitination and degradation of EGFR mutants in lung adenocarcinoma cell lines.* Cell Signal, 2018. **43**: p. 21-31.
91. Hideshima, T., et al., *NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma.* J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 16639-47.
92. Cenci, S., et al., *Pivotal Advance: Protein synthesis modulates responsiveness of differentiating and malignant plasma cells to proteasome inhibitors.* J Leukoc Biol, 2012. **92**(5): p. 921-31.
93. Goldberg, A.L., *Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs.* J Cell Biol, 2012. **199**(4): p. 583-8.
94. Wu, Y. and B.P. Zhou, *TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion.* Br J Cancer, 2010. **102**(4): p. 639-44.
95. Min, C., et al., *NF-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer.* Journal of cellular biochemistry, 2008. **104**(3): p. 733-44.
96. Pham, C.G., et al., *Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs.* Mol Cell Biol, 2007. **27**(11): p. 3920-35.
97. Chua, H.L., et al., *NF-kappaB represses E-cadherin expression and enhances epithelial to mesenchymal transition of mammary epithelial cells: potential involvement of ZEB-1 and ZEB-2.* Oncogene, 2007. **26**(5): p. 711-24.

98. Bachelder, R.E., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition.* J Cell Biol, 2005. **168**(1): p. 29-33.
99. Devine, T. and M.S. Dai, *Targeting the ubiquitin-mediated proteasome degradation of p53 for cancer therapy.* Curr Pharm Des, 2013. **19**(18): p. 3248-62.
100. Bhattacharya, S., et al., *Emerging insights into HAUSP (USP7) in physiology, cancer and other diseases.* Signal Transduct Target Ther, 2018. **3**: p. 17.
101. Jiang, Y.G., et al., *Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha.* Int J Urol, 2007. **14**(11): p. 1034-9.
102. Varol, N., E. Konac, and C.Y. Bilen, *Does Wnt/beta-catenin pathway contribute to the stability of DNMT1 expression in urological cancer cell lines?* Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(5): p. 624-30.
103. Masuya, D., et al., *The HAUSP gene plays an important role in non-small cell lung carcinogenesis through p53-dependent pathways.* J Pathol, 2006. **208**(5): p. 724-32.
104. Becker, K., et al., *A role of HAUSP in tumor suppression in a human colon carcinoma xenograft model.* Cell Cycle, 2008. **7**(9): p. 1205-13.
105. Song, M.S., et al., *The deubiquitinylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network.* Nature, 2008. **455**(7214): p. 813-7.
106. Cheng, C., et al., *Expression of HAUSP in gliomas correlates with disease progression and survival of patients.* Oncol Rep, 2013. **29**(5): p. 1730-6.
107. Zhang, L., et al., *Expression of USP7 and MARCH7 Is Correlated with Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer.* Tohoku J Exp Med, 2016. **239**(3): p. 165-75.
108. Fodde, R. and T. Brabletz, *Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior.* Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(2): p. 150-8.
109. Novellasdemunt, L., et al., *USP7 Is a Tumor-Specific WNT Activator for APC-Mutated Colorectal Cancer by Mediating beta-Catenin Deubiquitination.* Cell Rep, 2017. **21**(3): p. 612-627.
110. Yaginuma, Y. and H. Westphal, *Abnormal structure and expression of the p53 gene in human ovarian carcinoma cell lines.* Cancer Res, 1992. **52**(15): p. 4196-9.
111. Morra, F., et al., *FBXW7 and USP7 regulate CCDC6 turnover during the cell cycle and affect cancer drugs susceptibility in NSCLC.* Oncotarget, 2015. **6**(14): p. 12697-709.
112. Driscoll, J.J. and R. Dechowdhury, *Therapeutically targeting the SUMOylation, Ubiquitination and Proteasome pathways as a novel anticancer strategy.* Target Oncol, 2010. **5**(4): p. 281-9.
113. Bogachek, M.V., J.P. De Andrade, and R.J. Weigel, *Regulation of epithelial-mesenchymal transition through SUMOylation of transcription factors.* Cancer Res, 2015. **75**(1): p. 11-5.
114. Bao, B., et al., *Over-expression of FoxM1 leads to epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells.* J Cell Biochem, 2011. **112**(9): p. 2296-306.

115. Chiu, S.Y., et al., *SUMO-specific protease 2 is essential for modulating p53-Mdm2 in development of trophoblast stem cell niches and lineages.* PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. e310.
116. Asakura, T., et al., *Proteasome inhibitor-resistant cells cause EMT-induction via suppression of E-cadherin by miR-200 and ZEB1.* Int J Oncol, 2015. **46**(5): p. 2251-60.
117. Kim, J.Y., et al., *Proteasome inhibition causes epithelial-mesenchymal transition upon TM4SF5 expression.* J Cell Biochem, 2011. **112**(3): p. 782-92.
118. Baritaki, S., et al., *Inhibition of epithelial to mesenchymal transition in metastatic prostate cancer cells by the novel proteasome inhibitor, NPI-0052: pivotal roles of Snail repression and RKIP induction.* Oncogene, 2009. **28**(40): p. 3573-85.