Talita de Sousa Laurentino

Análise funcional da enzima LOXL3 em astrocitomas

Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Neurologia

Orientadora: Dra. Sueli Mieko Oba Shinjo

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Laurentino, Talita de Sousa

Análise funcional da enzima LOXL3 em
astrocitomas / Talita de Sousa Laurentino. -- São
Paulo, 2019.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Neurologia.

Orientadora: Sueli Mieko Oba Shinjo.

Descritores: 1.Glioblastoma 2.Astrocitoma
3.Lisil oxidase 4.Lisil oxidase tipo 3 5.Apoptose
6.Proliferação de células 7.Mitocôndrias

USP/FM/DBD-292/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Na jornada da vida, existem momentos de grandes euforias e também de grandes dificuldades. E nesses momentos, sempre precisamos de mãos amigas para celebrar e também para chorar conosco. O mar não se atravessa sozinho, por isso, nessa grande parte da minha vida, tenho muitas pessoas a agradecer.

Agradeço a minha família por todo amor e apoio durante essa jornada. Por comemorar comigo as minhas conquistas e me ajudar nas minhas dificuldades. Agradeço a minha irmã Jennifer por todas as vezes que acendeu a luz para mim e me trouxe água enquanto estava escrevendo. Agradeço a minha mãe por toda preocupação, e por quase fazer minha irmã digitar pra mim, com medo de eu ter problemas articulares nas mãos.

Agradeço ao meu noivo Otavio, por todo amor e por toda paciência que teve comigo. Agradeço pelos auxílios técnicos de “programação”. Agradeço por me ouvir falar pacientemente de LOXL3 (o tempo todo), e por me incentivar a continuar quando nada dava certo (ciência).

Agradeço a Dra. Sueli Oba que confiou em mim quando me aceitou como sua aluna (e que continuou confiando mesmo eu sendo um pouco desesperada). Para mim foi um grande privilégio poder trabalhar com ela, e poder receber seus ensinamentos e conselhos. Com sua tranquilidade e força, pude aprender a lidar com as pressões que a vida traz. Agradeço por todos os: “Calma Talita”, que ela me disse. Agradeço por compartilhar comigo um pouco desse enorme e doce coração. Agradeço todo apoio e toda ajuda que me ofereceu.

Agradeço a Prof. Dra. Sueli Marie, que também confiou em mim para trabalhar em seu laboratório. Agradeço pelas perguntas certas, e pelo eterno “Qual é a sua pergunta?” que sempre me fez, levando a grandes questionamentos. Agradeço também pelos puxões de orelha, e por me ensinar a resolver as coisas com elegância. Agradeço por todo incentivo a trabalhar com excelência.

Agradeço a Roseli, que me recebeu com toda sua alegria e com todo seu carinho. Agradeço por não ter medido esforços para me passar os seus conhecimentos, e por sempre estar por perto, e me ajudar quando precisava. Agradeço por todos “Vamos dar um jeito”. Agradeço pelos berloques, pelas pulseiras, pelos cafés, almoços... Enfim, pelos momentos de descontração. E claro, agradeço pelo LOXL3!

Agradeço a Laís, por toda sua amizade e carinho, por também não medir esforços para me passar os seus conhecimentos. Agradeço por ter me ensinado a agir com cautela para não ter “retrabalho”. Agradeço por sempre me orientar e ser como se fosse uma irmã pra mim. Agradeço que com toda sua doçura e delicadeza, por ter me ensinado o passo a passo de cada coisa.

Agradeço a todas as meninas do LIM15 com quem pude compartilhar cada dia. Com elas, longos dias puderam ser transformados em lembranças de altos papos e grandes risadas. Agradeço a todas por me esperar com toda paciência enquanto estava na cultura (Talitando). Agradeço a Isabele, por toda ajuda e por toda paciência em tirar as dúvidas de matemática. A

Fernanda, por todas as risadas proporcionadas, e pelos momentos de descontração. A Stella, por todos os momentos de sensatez nas nossas conversas. A Dali, por dançar e cantar comigo. A Amanda, pelas filosofias de vida, e pelos momentos Zona leste. A Paula, por toda ajuda e pelos puxões de orelha. A Camila, pela sua doçura e por sua disposição em ajudar. A Yollanda, por me ajudar nos últimos experimentos, pelos momentos de discussão (faz parte), e por ser aquela chatonilda/legal. A Marina, por muitas vezes ter dividido comigo seus conhecimentos e sua inteligência. A Keyde, pelos conselhos, a Nathalia Vila, pelos momentos de altas risadas e pelas broncas. A Tawany, pelos momentos de descontração.

Agradeço a Kátia Carvalho, por responder algumas dúvidas, e pelas risadas no corredor.

Agradeço aos funcionários Luiz, Rosa, Nice, Camila, Mônica, Thais, Darcy, Eliene e Márcia.

Agradeço ao Dr Antônio Marcondes Lerário, da Universidade de Michigan, pelas análises do transcriptoma.

Agradeço ao LIM60, especialmente a Andréa e a Priscila, pelo auxílio na citometria de fluxo.

Agradeço ao LIM50, pela utilização do equipamento de leitura de fluorescência.

Agradeço ao CEFAP e ao INFAR pelo auxílio com o Confocal. Ao CTO do ICESP, por permitir o uso do revelador de Western Blot.

Agradeço ao SELA pela utilização dos equipamentos de sequenciamento e análise de qualidade de RNA.

Agradeço a todos que cooperaram para realização desse trabalho.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2016/05777-1, bolsa de mestrado) por fomentar este trabalho.

Um pouco de ciência nos afasta de Deus, muita nos aproxima.

Louis Pasteur

RESUMO

Laurentino TS. *Análise funcional da enzima LOXL3 em astrocitomas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Os astrocitomas são neoplasias originadas das células astrocíticas do sistema nervoso central e são os tumores mais frequentes dentre os gliomas (tumores associados às células gliais). Inicialmente, a Organização Mundial de Saúde classificou os astrocitomas de acordo com a malignidade, levando em conta características histológicas (astrocitomas de grau I a IV). Entretanto, recentemente, características moleculares, como mutações e outras alterações cromossômicas, foram incorporada à classificação. O glioblastoma (GBM), grau IV, é o mais comum dos gliomas e com o pior prognóstico. Para melhor compreensão do processo de gliomagenese, nosso laboratório comparou os genes com maior expressão em GBM em relação ao astrocitoma grau I, com o objetivo de identificar novos alvos terapêuticos. O gene que codifica a enzima lisil oxidase (*LOX*) foi um dos que apresentaram maior expressão em GBM. A enzima *LOX* pertence a uma família com cinco membros, *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* e *LOXL4*, e atua na catalisação das ligações cruzadas do colágeno e da elastina, desempenhando importante papel na rigidez da matriz extracelular. Dentre os membros da família *LOX*, a expressão de *LOXL3* influenciou no prognóstico dos casos com GBM: Pacientes com maior expressão apresentaram uma menor média da sobrevida em relação aos que apresentaram menor expressão do gene. No presente estudo, foi realizado o silenciamento gênico transitório de *LOXL3* com duas sequências de siRNA em linhagem celular de GBM U87MG. A eficiência do silenciamento de *LOXL3* para siRNA1 e siRNA2 foi de 84,7% e 50,9% respectivamente em nível de RNA, e 41,5% e 39,2% respectivamente em nível de proteína em relação ao controle. Em ensaios funcionais, o silenciamento de *LOXL3* levou a uma diminuição da proliferação celular (36,9% e 26,2% para o siRNA1 e siRNA2, respectivamente), além de um aumento de apoptose sem (13,43% e 7,04% para o siRNA1 e siRNA2, respectivamente) e com (32,8% e 24,64% para o siRNA1 e siRNA2, respectivamente) tratamento com temozolamida. Além disso, foi demonstrado por imunofluorescência que *LOXL3* colocalizou com as mitocôndrias nas células U87MG. Adicionalmente à colocalização, as células com silenciamento de *LOXL3* apresentaram um aumento da fluorescência do marcador mitocondrial 5 vezes maior que o controle, além do aumento no número de cópias do DNA mitocondrial de 18,24% para o siRNA1. Ainda, análises de RNA-seq mostraram que células U87MG com silenciamento de *LOXL3* apresentaram uma diminuição da expressão de genes relacionados no processo relacionado com fluxo autofágico e fissão mitocondrial sugerindo que *LOXL3* possivelmente desempenhe um papel no processo de autofagia/mitofagia. Além disso, genes relacionados com a via de replicação do mtDNA também apresentaram um aumento da expressão. Adicionalmente, genes relacionados com a via de apoptose, também apresentaram uma hiperexpressão, corroborando com os ensaios funcionais realizados. Portanto, o silenciamento transitório de

LOXL3 na linhagem celular U87MG promoveu uma diminuição da viabilidade celular, e consequentemente um aumento do nível de apoptose. Além disso, LOXL3 colocalizou com as mitocôndrias na célula U87MG. Baixa expressão de LOXL3 promoveu um aumento da fluorescência do marcador mitocondrial, e adicionalmente, o número de cópias do DNA mitocondrial apresentou um aumento em comparação com o controle. Este trabalho sugere que LOXL3 pode estar envolvido com o processo de dinâmica mitocondrial, favorecendo o a via de autofagia/mitofagia, e inibindo a morte celular na linhagem U87MG. Não há trabalhos anteriores que descrevem o papel de LOXL3 em astrocitomas e nem o envolvimento com mitocôndrias e autofagia e/ou mitofagia. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem um novo papel de LOXL3 em astrocitomas.

Descritores: Glioblastoma; Astrocitoma, Lisil oxidase; Lisil oxidase tipo 3; Apoptose; Proliferação de células; Mitocôndrias.

SUMMARY

Laurentino TS. *The functional role of LOXL3 in astrocytomas* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Astrocytomas are neoplasms originated from astrocytic cells of the central nervous system and are the most common tumors among gliomas (glial cell tumors). Initially, the World Health Organization classified astrocytomas according to malignancy, taking into account histological characteristics (astrocytomas of grade I to IV). However, recently, molecular characteristics such as mutations and other chromosomal alterations have been incorporated into the classification. Glioblastoma (GBM), grade IV, is the most common glioma and with the worst prognosis. For a better understanding of gliomagenesis process, our laboratory compared genes with greater expression in GBM in relation to grade I astrocytoma, in order to identify new therapeutic targets. The gene that codes for the enzyme lysyl oxidase (*LOX*) was one of the genes with higher expression in GBM. The *LOX* enzyme belongs to a family with five members, *LOX*, *LOXL1*, *LOXL2*, *LOXL3* and *LOXL4*, and acts on the catalysis of crosslinks of collagen and elastin, playing an important role in the stiffness of the extracellular matrix. Among the *LOX* family members, *LOXL3* expression influenced on the prognosis of GBM cases: patients with higher *LOXL3* expression had a lower mean survival rate than those with the lowest *LOXL3* expression. In the present study, transient *LOXL3* silencing with two siRNA sequences was performed in the GBM U87MG cell line. The knock down efficiency of *LOXL3* for siRNA1 and siRNA2 was 84.70% and 50.9% respectively at the transcript level, and 41.5% and 39.2%, respectively, at the protein level in relation to the control. In functional assays, *LOXL3* silencing promoted a decrease in cell proliferation (36.9% and 26.2% for siRNA1 siRNA2, respectively), as well as an increase in apoptosis without (13.43% and 7.04% for the siRNA1 siRNA2, respectively) and with (32.8% and 24.64% for the siRNA1 siRNA2, respectively) treatment with temozolomide. Moreover, it was also demonstrated by immunofluorescence that *LOXL3* colocalized with mitochondria in U87MG cells. In addition to the colocalization, cells with *LOXL3* silencing showed an increase in mitochondrial marker fluorescence 5-fold higher than the control cells. Moreover, cells with *LOXL3* knock down had an increase in the number of mitochondrial DNA copy number of 18.24% for siRNA1. Furthermore, RNA-seq analysis showed that U87MG cells with *LOXL3* knock down had a decrease in the expression of genes related to the process related to autophagic flux,

suggesting that LOXL3 probably plays a role in the autophagy/mitophagy process. In addition, genes related to mtDNA replication are also an increase in expression. Additionally, genes related to the apoptosis pathway are also overexpressed, corroborating the data obtained. Therefore, transient silencing of LOXL3 in the U87MG cell line promoted a decrease in cell viability, and consequently an increase in apoptosis level. In addition, LOXL3 colocalized with mitochondria in the U87MG cell. Low LOXL3 expression promotes increased mitochondrial marker fluorescence and, additionally, mitochondrial DNA copy number exhibits an increase compared to control. This work suggests that LOXL3 may be involved with the mitochondrial dynamics process, favoring the autophagy / mitophagy pathway, and inhibiting cell death in the U87MG strain. There are no papers that describe the role of LOXL3 in astrocytomas and neither the involvement with mitochondria and autophagy and / or mitophagy. However, there is no paper that has described the role of LOXL3 in astrocytomas and neither its involvement with mitochondria and autophagy and/or mitophagy. Our data suggest a new role of LOXL3 in astrocytomas.

Descriptors: Glioblastoma; Astrocytoma; Lysyl oxidase; Lysyl oxidase like 3; Apoptosis; Cell Proliferation; Mitochondria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGI	Astrocitoma grau I
AGII	Astrocitoma grau II
AGIII	Astrocitoma grau III
AJUBA	Ajuba LIM protein
AP-1	<i>Activating protein-1</i>
AP-2	<i>Activating protein-2</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BMP-1	Proteína óssea morfogenética 1
BRAF	<i>B-Raf proto-oncogene</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
CCND1	Gene da ciclina D1
CDH1	Gene da caderina 1
COL1A1	Gene da cadeia alfa 1 do colágeno tipo XI
COL2A1	Gene da cadeia alfa 1 do colágeno tipo II
CRE	Elemento responsivo a cAMP
CRL	<i>Cytokine receptor-like</i>
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFR	Gene do receptor do fator de crescimento epidermal
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False Discovery rate</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GBM	Glioblastoma
GTE_x	<i>Genotype Tissue Expression</i>
HBB	Gene da hemoglobina beta
HDAC	Histone deacetilase
HPRT	Gene da hipoxantina fosforibosiltransferase
hTERT	Telomerase transcriptase reversa humana
IDH1	Gene da isocitrato desidrogenase 1
IDH2	Gene da isocitrato desidrogenase 2
IPF	Fibrose pulmonar idiopática
IRF	Fatores regulatório de interferon
LOX	Lisil oxidase
LOXL1	Lisil oxidase like-1
LOXL2	Lisil oxidase like-2
LOXL3	Lisil oxidase like-3
LOXL4	Lisil oxidase like-4
LTQ	Lisil tirosil quinona
MEC	Matriz extracelular
MIBP	Proteína muscular de ligação à integrina
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
mtDNA	DNA mitocondrial
NF1	Gene da neurofibromina
NOS	Não especificado
NRSF	Fator restritivo silenciador neural
NTC	Controle <i>non-target</i>
NUDR	<i>Nuclear DEAF-1-related</i>
NUMA1	<i>Nuclear mitotic apparatus protein 1</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAX	<i>Paired box</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PIT1	Fator de transcrição específico da pituitária-1
PDGFRA	Gene do receptor alfa do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PI	Iodeto de propídeo
PKD1	Proteína quinase D1
PTEN	Gene da fosfatase homóloga a tensina

PVDF	Fluoreto de polivinilideno
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<i>RB1</i>	Gene do correpressor transcricional RB 1
RFX1	Fator regulatório X1
SFB	Soro fetal bovino
SMC1A	<i>Structural maintenance of chromosomes 1A</i>
SMC3	<i>Structural maintenance of chromosomes 3</i>
SNAIL	<i>Snail homolog 1</i>
SNC	Sistema nervoso central
SRCR	Receptor <i>scavenger</i> ricos em cisteína
SRF	Elemento responsivo ao soro
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TCGA	Atlas do Genoma Humano
TFM	Transição fibroblasto-miofibroblasto
TGF	Fator de transformação de crescimento
TMZ	Temozolomida
TPM	Transcritos por milhão
<i>TP53</i>	Gene de p53
<i>YY1</i>	<i>Yin yang 1</i>
β-APN	β-aminopropionitrila

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ESQUEMAS DOS MEMBROS DA FAMÍLIA LISIL OXIDASE.....	18
FIGURA 2. SEQUÊNCIAS DE RNA MENSAGEIROS E PROTEÍNAS DE LOXL3 E VARIANTES	20
FIGURA 3. ATIVIDADE DE AMINO OXIDASE DE LOXL3	22
FIGURA 4. PAPEL DE LOXL3 NO DESENVOLVIMENTO E SISTEMA CRANIOFACIAL-OCULAR.	24
FIGURA 5. LOXL3 NO SISTEMA PULMONAR E CARDIOVASCULAR	25
FIGURA 6. LOXL3 NO SISTEMA MUSCULOESQUELÉTICO E OSTEOARTICULAR.	26
FIGURA 7. LOXL3 E SISTEMA IMUNE	27
FIGURA 8. PAPEL DE LOXL3 EM TUMORES	28
FIGURA 9. EXPRESSÃO DE <i>LOXL3</i> EM TECIDOS NÃO NEOPLÁSICOS E EM ASTROCITOMAS DE DIFERENTES GRAUS DE MALIGNIDADE.....	30
FIGURA 10. CURVA DE SOBREVIVÊNCIA	30
FIGURA 11. EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>LOXL3</i> DE ACORDO COM O GRAU DE MALIGNIDADE NOS CASOS DO TCGA	42
FIGURA 12. EXPRESSÃO DE <i>LOXL3</i> NOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DE GBM.....	43
FIGURA 13. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE <i>LOXL3</i> EM LINHAGENS CELULARES ESTABELECIDAS DE GBM.....	43
FIGURA 14. INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>LOXL3</i> NA LINHAGEM U87MG COM siRNA1 E siRNA2.....	44
FIGURA 15. INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE LOXL3 A NÍVEL PROTEÍNA NA LINHAGEM U87MG APÓS O SILENCIAMENTO COM siRNA.....	45
FIGURA 16. EFEITO DA REGULAÇÃO NEGATIVA DE LOXL3 NA VIABILIDADE CELULAR	46
FIGURA 17. EFEITO DO SILENCIAMENTO DE LOXL3 NA MORTE CELULAR DE CÉLULAS U87MG.	48
FIGURA 18. EFEITO DO SILENCIAMENTO DE LOXL3 NO CICLO CELULAR DE CÉLULAS U87MG SILENCIADAS COM siRNA DE LOXL3.....	49
FIGURA 19. LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DE LOXL3 EM LINHAGEM CÉLULAR U87MG.....	49
FIGURA 20. LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DE LOXL3 EM CÉLULAS U87MG E O EFEITO APÓS A SUA REGULAÇÃO NEGATIVA.....	51
FIGURA 21. EFEITO DO SILENCIAMENTO NA DISTRIBUIÇÃO E MORFOLOGIA DAS MITOCÔNDRIAS APÓS SILENCIAMENTO DE LOXL3.	51
FIGURA 22. EFEITO DO SILENCIAMENTO DE LOXL3 NO NÚMERO RELATIVO DE CÓPIAS DE MTDNA.	52
FIGURA 23. CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE <i>LOXL3</i> E NÚMERO DE CÓPIAS DE MTDNA.....	53
FIGURA 24. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA LINHAGEM CELULAR U87MG APÓS O SILENCIAMENTO DE <i>LOXL3</i> POR MEIO DE siRNA.....	55
FIGURA 25. ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE AUTOFAGIA.	56
FIGURA 26. ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE REPLICAÇÃO DO MTDNA	57
FIGURA 27. ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS DE FUSÃO E FISSÃO MITOCONDRIAL.....	58
FIGURA 28. ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA DE APOPTOSE.	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES ASTROCÍTICOS SEGUNDO A OMS (2016)	15
TABELA 2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DOS GLIOBLASTOMAS.....	17
TABELA 3. CARACTERÍSTICAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA AS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL.....	36
TABELA 4. CASUÍSTICAS DE ASTROCITOMAS UTILIZADAS PARA ANÁLISES.....	39
TABELA 5. TAXA DE SILENCIAMENTO GÊNICO E PROTEICO.....	45

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Tumores do sistema nervoso central.....	14
1.2	Gliomas	14
1.3	Astrocitomas	15
1.3.1	Tumores astrocíticos difusos	16
1.3.2	Outros astrocitomas.....	17
1.4	Lisil oxidase.....	18
1.5	LOXL3	19
1.5.1	LOXL3: gene e proteína.....	19
1.5.2	Localização subcelular	21
1.5.3	Atividade de amino oxidase de LOXL3	21
1.5.4	LOXL3 no desenvolvimento e doenças	22
1.6	LOXL3 como alvo terapêutico.....	30
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Linhagens celulares	34
4.2	Silenciamento de <i>LOXL3</i> por RNA de interferência (siRNA).....	34
4.3	Extração de DNA e RNA total e transcrição reversa.....	34
4.4	PCR quantitativo em tempo real.....	35
4.5	Análise da expressão proteica	36
4.6	Análise de localização celular por imunofluorescência	36
4.7	Viabilidade celular	37
4.8	Apoptose.....	37
4.9	Ciclo celular.....	38
4.10	Análise <i>in silico</i> de expressão gênica.....	38
4.11	Análise do transcriptoma (RNA-SEQ).....	39
4.12	Análises estatísticas	40
5	RESULTADOS	42
5.1	Análises de expressão de <i>LOXL3</i> em astrocitomas e nos subtipos moleculares de GBM.....	42
5.2	Expressão gênica de <i>LOXL3</i> em linhagens celulares.....	43

5.3	Silenciamento de <i>LOXL3</i> através de siRNA.....	44
5.4	Efeito do silenciamento de LOXL3 na viabilidade celular	46
5.5	Efeito do silenciamento de LOXL3 na morte celular	47
5.6	Efeito do silenciamento de LOXL3 no ciclo celular	48
5.7	Localização celular de LOXL3	49
5.8	Análise de número de cópias de DNA mitocondrial.....	52
5.9	Análise do transcriptoma das células silenciadas	53
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÕES	66
8	REFERÊNCIAS	67
9	ANEXOS.....	73
	Anexo 1-Aprovação do Comitê de Ética	73
	Anexo 2-Manuscrito publicado	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do sistema nervoso central

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) ocupam o 19º lugar em incidência. Estima-se que em 2018 houve 296.851 casos reportados no mundo (Bray et al. 2018). Nos Estados Unidos e no Brasil, a estimativa entre 2018-2019 é de 13.310 e 6.320 novos casos de tumores do SNC sejam reportados, respectivamente (Ostrom et al. 2018) (Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil).

Os tumores do SNC foram classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de acordo com aspectos clínico-patológicos, padrão histológico e a localização de cada tumor. Os gliomas são os tumores primários do SNC mais frequentes, seguido dos meningiomas (Ostrom et al. 2018).

1.2 Gliomas

O termo glioma é utilizado para generalizar os tumores que se originam de células chamadas neuroglias (ou células da glia), compostas de células de Schwann, oligodendrócitos, microglia, astrócitos e células endimárias (Graaff and Marschall, 2003).

Os gliomas são classificados pela OMS de acordo com o grau de malignidade, determinada pela presença de indicadores de anaplasia: atipia celular, proliferação endotelial, atividade mitótica e necrose (Weller et al. 2015). Os tumores grau I é aplicado a lesões para baixo potencial proliferativo. Os tumores grau II são neoplasias infiltrativas, porém com baixo grau de proliferação, apresentando geralmente atipia celular. Os tumores grau III apresentam atipia celular e atividade mitótica. Já os tumores grau IV, denominados glioblastoma (GBM), apresentam três ou mais indicadores de anaplasia: atipia celular, atividade mitótica, proliferação endotelial e/ou necrose (Louis et al. 2007). Além dos aspectos histológicos, características moleculares foram integradas aos parâmetros de classificação de tumores do SNC da OMS de 2016. Portanto, os gliomas foram reestruturados em: tumores astrocíticos e oligodendrogliais difusos, outros tumores astrocíticos, tumores endimais, e outros gliomas, além de serem subdivididos de acordo com o perfil molecular (Louis et al. 2016).

1.3 Astrocitomas

Entre os gliomas, os astrocitomas, tumores originados dos astrócitos, são os mais comuns. Nos Estados Unidos, entre 2011-2015, os astrocitomas, incluindo o GBM, ocuparam 75,8% de todos os gliomas (Ostrom et al. 2018).

Os astrocitomas seguem a classificação da OMS quanto ao grau de malignidade. A classificação da OMS dividiu os astrocitomas em tumores astrocíticos difusos (astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e GBM) e outros astrocitomas (astrocitoma pilocítico) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos tumores astrocíticos segundo a OMS (2016)

	Grau	Tumor	Indicadores celulares	Indicadores moleculares
Tumores astrocíticos difusos	II	Astrocitoma difuso	Atipia celular	<i>IDH</i> mutante, <i>IDH</i> selvagem ou NOS
	III	Astrocitoma anaplásico	Atipia celular, atividade mitótica.	
	IV	Glioblastoma	Atipia celular, atividade mitótica, necrose e/ou neovascularização.	
Outros astrocitomas	I	Astrocitoma pilocítico	-	

IDH: gene da isocitrato desidrogenase 1/2; NOS: não especificado

Além disso, como citado anteriormente, o perfil genético foi integrado à classificação da OMS (Louis et al. 2016). As enzimas isocitrato desidrogenase 1 e 2 (*IDH1/2*) são responsáveis pela descarboxilação do isocitrato em α -cetoglutarato. Mutações nos genes que codificam essas enzimas causam importantes alterações no metabolismo celular e estado redox, além de alterações epigenéticas e no reparo de DNA. As mutações nos genes *IDH1/2* foram associadas a um melhor prognóstico dos pacientes, além de apresentarem maior sensibilidade ao tratamento com temozolomida (TMZ) (Molenaar et al. 2018), quimioterápico padrão no tratamento de gliomas (Lee C. Y. 2017). Portanto, cada um dos astrocitomas difusos foi subdividido em: *IDH*-selvagem, *IDH*-mutante e não especificados (NOS), nos quais estão os tumores que não se encaixam nas demais categorias (Louis et al. 2016). As mutações em *IDH1/2* são encontradas majoritariamente em astrocitomas de baixo grau (~70%-80%) e GBM secundário que evoluiu de um astrocitoma de menor grau (~5% dos casos) (Gessler et al. 2017, Kaminska et al. 2019). Já em GBM primário, ou de novo, as mutações recorrentes em *IDH1/2* são mais raras (~12% dos casos) (Parsons et al. 2008).

1.3.1 Tumores astrocíticos difusos

1.3.1.1 Astrocitomas difusos (grau II)

Os astrocitomas difusos (AGII) são tumores de baixo grau (II) e menos frequentes entre os astrocitomas (Louis et al. 2016). Estima-se que em 2018, 1.280 casos tenham sido reportados nos Estados Unidos (Ostrom et al. 2018). Esses tumores são tipicamente caracterizados pelo aumento moderado de celularidade, além de sua capacidade infiltrativa (Forst et al. 2014). Além da ressecção cirúrgica, o tratamento inclui radioterapia e quimioterapia com temozolomida. Porém, para pacientes abaixo de 40 anos, o tratamento com adjuvantes são dispensados, sendo consensual o acompanhamento radiológico (Picca et al. 2018). A média de sobrevida dos pacientes com AGII IDH-mutante é de 10,2 anos, enquanto que, AGII IDH-selvagem apresenta uma média de sobrevida de 8,4 anos (Chan A. K. Y. et al. 2015).

1.3.1.2 Astrocitomas anaplásicos (grau III)

Os astrocitomas anaplásicos (AGIII) são classificados como tumores grau III pela OMS (Louis et al. 2016). Dentre os astrocitomas, os AGIII são os mais frequentes seguidos do GBM. A estimativa é que 1.630 casos tenham sido reportados em 2018 nos Estados Unidos (Ostrom et al. 2018). Adicionalmente à capacidade infiltrativa, o aumento da atividade mitótica é uma das características que define os AGIII (Olar et al. 2015). Adultos com idade média de 40 anos são os mais comumente afetados. A média de sobrevida dos pacientes com AGIII IDH-mutante é de 4,3 anos, enquanto que, AGIII IDH-selvagem apresenta uma média de sobrevida de 1,3 anos (Chan A. K. Y. et al. 2015).

1.3.1.3 Glioblastomas (grau IV)

Os GBMs, classificados como grau IV, são os mais frequentes tumores malignos do SNC. O número estimado de casos no ano 2018, nos EUA, foi de 13.010 casos, e a projeção para o ano de 2019 foi de 13.310 novos casos (Ostrom et al. 2018). Adicionalmente à classificação dada pela OMS, o Atlas do Genoma Humano (TCGA) descreveu alterações genômicas recorrentes em GBM e propôs uma classificação molecular: clássico, mesenquimal, proneural e neural (Verhaak et al. 2010) (Tabela 2). Posteriormente, o subtipo neural foi identificado como contaminação de tecido normal, portanto foi retirado da classificação molecular (Wang et al. 2017).

Tabela 2. Classificação molecular dos glioblastomas

Subtipos	Principais alterações	Sobrevida (meses)
Clássico	Amplificação de <i>EGFR</i> , mutação em <i>EGFRvIII</i> , mutação em <i>PTEN</i>	9-14
Proneural	Amplificação de <i>PDGFRA</i> , mutação de <i>IDH1</i> e <i>TP53</i>	13-17
Mesenquimal	Deleção de <i>NF1</i> e <i>RB1</i>	8-11

EGFR: gene do receptor do fator de crescimento epidermal, *EGFRvIII*: variante vIII de *EGFR*, *PTEN*: gene da fosfatase homóloga a tensina, *PDGFRA*: gene do receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas, *IDH1*: gene da isocitrato desidrogenase 1/2, *TP53*: gene de p53, *NF1*: gene da neurofibromina, *RB1*: gene do correpresor transcricional RB1.

O subtipo clássico foi definido principalmente por alterações (amplificação e mutações) no gene que codifica o receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*), mutações em *PTEN* e a presença da variante *EGFRvIII*. Já o subtipo mesenquimal, predominantemente foi encontrado mutações nos genes *NF1* e *RB1*. O subtipo proneural, apresenta principalmente amplificação focal da região do locus 4q12, região onde se localiza *PDGFRA*, acompanhada de alta expressão do gene. Mutações de *IDH1* e de *TP53* também são encontradas no subtipo proneural (Verhaak et al. 2010).

A média geral de sobrevida dos pacientes com GBM, após ressecção cirúrgica e tratamento de radioterapia e/ou quimioterapia, é de 15 meses. No entanto, o prognóstico é diferente para cada subtipo molecular. A média de sobrevida para o subtipo proneural é em torno de 13-17 meses, para o subtipo clássico é de 9-14 meses, enquanto que o subtipo mesenquimal apresenta pior prognóstico, com média de sobrevida de 8-11 meses (Galatro et al. 2017;(Sidaway 2017). Estudos recentes mostraram que não há diferenças na sobrevida dos pacientes com GBM IDH-mutante. Porém, pacientes que também apresentam a região promotora de *MGMT* metilada apresentam melhor resposta ao tratamento com agentes alquilantes, como o TMZ. *MGMT* codifica uma proteína responsável pelo reparo do DNA, através da remoção de grupo alquil na guanina O6 (Czapski et al. 2018).

1.3.2 Outros astrocitomas

1.3.2.1 Astrocitoma pilocítico (grau I)

Os astrocitomas pilocíticos (AGI) são tumores de baixo grau, classificados pela OMS como grau I. Acometem em sua maioria crianças e adultos jovens. São tumores circunscritos, frequentemente císticos, com baixo potencial proliferativo, (Louis et al. 2007,

Louis et al. 2016). Os pacientes com AGI geralmente apresentam um bom prognóstico; mais de 90% dos casos relatados apresentam sobrevida total de mais de 10 anos. Seu tratamento consiste em ressecção cirúrgica total, seguido de radioterapia, caso a ressecção tenha sido incompleta, e adição do quimioterápico, caso a cirurgia não seja possível (Collins et al. 2015).

1.4 Lisil oxidase

Lisil oxidase (LOX) é uma enzima dependente de cobre, que atua na formação e na reparação da matriz extracelular (MEC), através da catalisação das ligações cruzadas no colágeno e na elastina, promovendo sua estabilização. Pertence a uma família que em mamíferos possui cinco membros: LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 e LOXL4. Todos apresentam homologia entre si na porção C-terminal, como o domínio semelhante ao receptor de citocinas (CRL), domínios conservados de ligação ao cobre, além do cofator lisil-tirosil-quinona (LTQ), necessários para a conformação da proteína e atividade catalítica (Nishioka et al. 2012) (Figura 1).

No entanto, LOX e LOXL1 diferem dos demais membros da família na região N-terminal. As enzimas LOXL2, LOXL3 e LOXL4 possuem quatro domínios denominados SRCR (receptores *scavenger* ricos em cisteína), diferentemente de LOX e LOXL1 que possuem sequências dos seus pró-peptídeos (Figura 1). Desta forma, baseado nas similaridades estruturais de seus domínios, a família é dividida em dois grupos, uma subfamília é formada por LOX e LOXL1, e a outra por LOXL2, LOXL3 e LOXL4 (Barker et al. 2012).

Figura 1: Esquemas dos membros da família lisil oxidase. A porção C-terminal é conservada entre todos os cinco membros e contém a região catalítica com domínio de ligação ao cobre, resíduos de lisil-tirosil quinona (LTQ) e domínio do tipo receptor de citocina (CRL). Por outro lado, a porção N-terminal é variável: LOX e LOXL1 apresentam sequências de pró-peptídeo, enquanto LOXL2, LOXL3 e LOXL4 possuem quatro domínios

receptores de *scavenger* ricos em cisteína (SRCR). LOX, LOXL1 e LOXL3 possuem sítios putativos para clivagem de BMP-1.

1.5 LOXL3

1.5.1 LOXL3: gene e proteína

LOXL3 está localizado no cromossomo 2p13.3, apresentando 23.462 nucleotídeos, 14 exons e o tamanho do cDNA de 3.121 pb (Figura 2a). A região que flanqueia a porção 5' de *LOXL3* no exon 1 corresponde à região promotora e não possui TATA *box* típico ou CAAT *box*, porém apresenta potenciais sítios de ligação a fatores de transcrição como STAT3, STAT6, SRF MIBP / RFX1, SP1, NF1, NRSF, CRE *binding protein 1*, PAX6 *paired domain*, fatores regulatório de interferon (IRF), factor 1 de ligação a GATA, NF- κ B, GAGA *box*, sítios para c-Rel e AP-2 (Lee J. E. and Kim 2006).

LOXL3 codifica uma proteína de 753 aminoácidos com um peso molecular de 80,3 kDa. A região N-terminal de *LOXL3*, correspondente aos exons 2 a 9, contém quatro domínios SRCR e um sítio putativo de clivagem do peptídeo sinal extracelular, entre os resíduos 25 e 26 (Mäki and Kivirikko 2001). Baseado na sua estrutura predita, *LOXL3* pode ser secretado e processado no espaço extracelular pela proteína óssea morfogenética 1 (BMP-1) no local de clivagem GDD (entre os resíduos 446-448) (Figura 2b) (Jourdan-Le Saux et al. 2001), em um processo similar ao de LOX e LOXL1 (Figura 1) (Uzel et al. 2001). O produto clivado tem um tamanho previsto de 35 kDa, com 306 aminoácidos (Jourdan-Le Saux et al. 2001).

Adicionalmente, *LOXL3* pode ser glicosilado. Há três sítios putativos para a O-glicosilação (Ser-26, Ser-28 e Ser-30) logo após o local de clivagem da sequência do peptídeo sinal e cinco locais para N-glicosilação ao longo da proteína (Figura 2b) (Mäki and Kivirikko 2001). Além disto, *LOXL3* também pode ser translocado para o núcleo, pois possui um sinal de localização nuclear (resíduos 293-311) (Mäki and Kivirikko 2001). Além disso, existe um sinal putativo de exportação nuclear na região N-terminal que se sobrepõe ao peptídeo sinal (Ma et al. 2017).

Duas isoformas de *LOXL3*, denominadas *LOXL3*-sv1 e *LOXL3*-sv2, foram identificadas durante a pesquisa por homologia em banco de dados de ESTs (*expressed sequence tags*) humanos (Jeong C. and Kim 2017, Lee J. E. and Kim 2006). *LOXL3*-sv1 é o transcrito mais curto e com perda dos exons 1, 2, 3 e 5. Além disso, a região que flanqueia a porção 5' do exon 4 possui 80 pb adicionais com uma região promotora alternativa, e a região flanqueia a extremidade 3' do exon 14 apresenta uma sequência adicional de 561 pb.

Em contraste ao *LOXL3*, o promotor de *LOXL3*-sv1 possui um TATA *box*, além de potenciais sítios de ligação para diferentes fatores de transcrição como p53, GATA-binding factor 3, STAT5, PIT1, proteína de ligação a elemento responsivo a Ras, Neurogenina 1 e 3, AP-1, PAX 2/5/8, YY1 e NUDR. A tradução desta variante começa no exon 6 e codifica um polipeptídeo previsto de 392 aminoácidos com 44 kDa de peso molecular. Apesar de não possuir os três primeiros domínios do SRCR, *LOXL3*-sv1 conserva a atividade amino oxidase da região C-terminal. Semelhante a *LOXL3*, *LOXL3*-sv1 também pode ser um alvo para BMP-1 (Figura 2) (Lee J. E. and Kim 2006).

A variante *LOXL3*-sv2, descrita mais recentemente, possui 12 exons e ausência dos exons 4 e 5 de *LOXL3*, porém sem alteração do quadro de leitura aberta. As sequências que faltam neste processamento alternativo codificam para o domínio SRCR 2. O transcrito variante *LOXL3*-sv2 codifica uma proteína de 608 aminoácidos com sítios putativos de clivagem de BMP-1 e peso molecular calculado de 67,4 kDa, como mostrado na Figura 2. Embora esta variante mantenha o domínio SRCR3, a sequência de localização nuclear é perdida (Jeong C. and Kim 2017).

Figura 2. Sequências de RNA mensageiros e proteínas de *LOXL3* e variantes. (a) Esquemas da estrutura exon-intron das três variantes transcritas de *LOXL3* humano, com exons representados por caixas e introns por linhas. O transcrito completo e maior de *LOXL3* apresenta 14 exons, com uma região 5' (caixa cinza) e 3' não traduzida (caixa azul tracejada). O transcrito *LOXL3*-sv1 não possui os exons 1, 2, 3 e 5 e apresenta regiões 5' e 3' não traduzidas diferentes (caixas tracejadas). O transcrito *LOXL3*-sv2 difere do transcrito completo pela ausência dos exons 4 e 5. A cor laranja e azul representa os exons que codificam as regiões N-terminal e C-terminal, respectivamente, e a cor amarela a região que codifica a sequência peptídeo sinal. Os pontos verdes representam a localização inicial do codon de tradução. (b) Esquemas das estruturas variantes da proteína *LOXL3*, com domínios de peptídeos sinalizados, receptores *scavenger* ricos em cisteína (SRCR) na região N-

terminal, e domínio catalítico (azul) na região C-terminal. Diamantes vermelhos indicam os locais putativos de O-glicosilação; setas vermelhas indicam sinal de localização nuclear. Todas as variantes proteicas possuem um domínio catalítico comum com a região de ligação ao cobre, o resíduo lisil-tirosil-quinona (LTQ) e o domínio semelhante ao receptor de citocinas (CRL).

1.5.2 Localização subcelular

Originalmente, a localização celular de LOXL3 foi descrita no citoplasma e no espaço extracelular, como proteína secretada no meio de cultura por células de fibrossarcoma (células HT-1080) (Mäki and Kivirikko 2001). Outros estudos mostraram que o LOXL3 também foi secretado por cardiomiócitos e desempenhou um papel na reticulação de colágeno da MEC (Lee J. E. and Kim 2006). Surpreendentemente, o efeito oxidativo do LOXL3 na fibronectina da MEC da junção miotendínea também foi descrito em um modelo de camundongo (Kraft-Sheleg et al. 2016). No citoplasma, LOXL3 foi observado na localização perinuclear em células HeLa com superexpressão de LOXL3, em células de melanoma e em células renais caninas de Madin-Darby (Peinado et al. 2005b, Santamaria et al. 2018). Uma localização intranuclear de LOXL3 também foi relatada em células HeLa e em células de baço de ratos. Além disso, localização citoplasmática e nuclear concomitante foram descritas em câncer gástrico (Kasashima et al. 2018). Curiosamente, a localização nuclear de LOXL3 foi ainda confirmada pela demonstração de sua interação com a telomerase transcriptase reversa humana (hTERT) através de ensaios de duplo híbridos de levedura e de imunoprecipitação (Zhou L. et al. 2013). A distribuição celular dos variantes de LOXL3 ainda não foi muito explorada, uma vez que a localização da isoforma LOXL3-sv1 no citoplasma e no espaço extracelular foi relatada apenas em um estudo (Lee J. E. and Kim 2006). Não foram encontrados estudos sobre a localização da LOXL3-sv2.

1.5.3 Atividade de amino oxidase de LOXL3

LOXL3 possui uma sequência de clivagem para BMP-1 no quarto domínio SRCR (Figura 2b) (Jourdan-Le Saux et al. 2001). Este processo ocorre no espaço extracelular e gera uma amino oxidase cataliticamente ativa com uma massa molecular prevista de 35 kDa referente à porção C-terminal. No entanto, a proteína clivada no tecido do cólon apresentou uma massa molecular de 40 kDa por análise de western blot, possivelmente devido à modificação pós-traducional, como glicosilação. No ensaio de amino oxidase, LOXL3 ou as variantes mostraram atividade de amino oxidase sobre diferentes tipos de colágeno (tipos I, II, III, IV, VI, VIII e X), bem como sobre elastina (Lee J. E. and Kim 2006) (Figura 3). LOXL3 apresenta maior atividade sobre colágeno VIII e LOXL3-sv1 sobre colágeno I, IV e

X (Lee J. E. and Kim 2006). LOXL3-sv2 também mostrou atividade de amino oxidase sobre colágeno tipo I (Jeong C. and Kim 2017). A atividade de amino oxidase de LOXL3 foi inibida pelo β -aminopropionitrila (β -APN), um inibidor potente e irreversível, que inibe a formação de ligações cruzadas *in vivo* (Jeong C. and Kim 2017, Lee J. E. and Kim 2006).

Figura 3. Atividade de amino oxidase de LOXL3. (a) A proteína LOXL3 é sintetizada e secretada no espaço extracelular. (b) LOXL3, clivado por BMP-1, tem os domínios C-terminal e N-terminal separados. (c) A região C-terminal possui a atividade de amino oxidase e promove a ligação de fibras de colágeno e elastina. (d) A porção N-terminal pode ser translocada para o núcleo.

1.5.4 LOXL3 no desenvolvimento e doenças

1.5.4.1 LOXL3 no desenvolvimento e sistema craniofacial-ocular

A importância e o envolvimento de LOXL3 no desenvolvimento foram sugeridos pela primeira vez em um modelo de peixe-zebra, no qual a falta de *Loxl3b*, o ortólogo de LOXL3 de mamíferos, causou defeitos craniofaciais (van Boxtel et al. 2011). Esses achados foram confirmados em camundongos deficientes de *Loxl3* (*Loxl3*^{-/-}), que apresentaram defeitos craniofaciais graves (fenda palatina e mandíbula encurtada) e deformidades da medula espinhal, com diminuição das ligações cruzadas de colágeno e letalidade precoce (Figura 4a) (Zhang J. et al. 2015a). Além disso, camundongos *Loxl3*^{-/-} homozigotos corresponderam a menos de 10% de camundongos recém-nascidos, confirmando a importância do *Loxl3* na viabilidade embrionária (Kraft-Sheleg et al. 2016, Ma et al. 2017).

As características dos modelos de camundongos deficientes em *Loxl3* se sobrepõem a uma colagenopatia humana denominada síndrome de Stickler, uma doença autossômica dominante causada mais frequentemente por mutações de *COL2A1* e *COL11A1*, caracterizada por miopia de grau elevado e fenda palatina. No entanto, mais recentemente, uma variante *missense* homozigótica em *LOXL3* (c.2027G> A, p.Cys676Tyr) foi identificada em uma família com dois irmãos afetados, apresentando micrognatia, fissura de palato e miopia grave (Alzahrani et al. 2015). Além disso, uma família com o fenótipo de SS foi relatada como portadora de uma nova mutação homozigótica de *LOXL3* (c.1036C> T, p.Arg346Trp), na qual dois membros afetados, o pai e uma criança, apresentavam miopia e retinopatia (Chan T. K. et al. 2019). Além disso, uma variante *missense* de *LOXL3* (c.1843A> T, p.Ile615Phe) foi associada à fenda palatina não síndrômica, devido à falta de atividade catalítica da enzima LOXL3, com prejuízo na montagem da fibra colágena no mesênquima palatino. Além disso, indivíduos com o genótipo Phe/Phe apresentaram maior risco de fissura palatina não síndrômica (Khan et al. 2018). LOXL3, como os outros membros de lisil oxidases, também foi observado em todas as camadas da córnea, bem como no limbo e conjuntiva. Miopia grave de início precoce foi associada com mutação *nonsense* homozigótica de *LOXL3* (c.39dup, p.Leu14Alafs*21) e combinação heterozigótica dessa mutação com outra mutação *frameshift* (c.594delG, p.Gln199Lysfs*35) (Li J. et al. 2016). As localizações das cinco mutações no gene *LOXL3* associadas às doenças estão apresentadas na Figura 4b.

Em ceratocone, uma doença caracterizada por astigmatismo irregular, resultando em significativo comprometimento visual, a expressão de LOXL3 é regulada negativamente na córnea, assim como a expressão de LOXL2 e LOXL4, sugerindo que os membros da família LOX podem estar envolvidos na patogênese do ceratocone (Figura 4c) (Dudakova et al. 2016). Além disso, os membros da família LOX, incluindo LOXL3, também podem desempenhar um papel no glaucoma. A expressão e a atividade das lisil oxidases são induzidas por TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 via Smad e vias de sinalização não-Smad (JNK e AP-1) em células de malha trabecular (MT). Como os níveis de TGF- β 2 estão elevados no humor aquoso e nas células da MT, a atividade das lisil oxidases pode aumentar a deposição de MEC e a rigidez da MT, contribuindo para o aumento da hipertensão ocular (Figura 4c) (Sethi et al. 2011).

Figura 4. Papel de LOXL3 no desenvolvimento e sistema craniofacial-ocular. (a) Desenvolvimento: o modelo de rato com deficiência de *Loxl3* demonstrou o papel crítico de LOXL3 no desenvolvimento da medula espinal, craniofacial e pulmonar. (b) Mutações: *LOXL3* é mutado em miopia de início precoce, síndrome de Stickler e pacientes com fissura palatina não síndrômica. (c) Sistema ocular: LOXL3 é regulado negativamente na doença do ceratocone e positivamente em células de malha trabecular.

1.5.4.2 LOXL3 no sistema pulmonar e cardiovascular

Camundongos *Loxl3*^{-/-} também apresentaram desenvolvimento pulmonar imaturo, com redução das cavidades torácicas e hipoplasia pulmonar (Figura 4a) (Zhang J. et al. 2016). Além disso, foi descrito o envolvimento de LOXL3 na fibrose pulmonar idiopática (FPI), uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo descontrolado e excessivo de MEC e consequente disfunção pulmonar grave (Figura 5a). A expressão de LOXL3 foi detectada no tecido de FPI comparado ao tecido pulmonar controle (Jones et al. 2018), mais especificamente no epitélio brônquico dos cílios (Aumiller et al. 2017, Chen et al. 2018). O aumento da atividade de amino oxidase de LOXL3 pode contribuir para a rigidez do tecido pulmonar. A MEC anormal estimula o crescimento de fibroblastos, o que, por sua vez, pode agravar a fibrose pulmonar (Philp et al. 2018). De fato, a expressão aumentada das lisil oxidases, incluindo LOXL3, foi observada em fibroblastos de pulmão humano normal em resposta ao tratamento com vários fatores de crescimento (TGF- β , FGF e PDGF) e hipóxia. Esses estímulos pró-fibróticos induziram a transição fibroblasto-miofibroblasto (TFM), corroborando a importante contribuição de LOXL3 na doença pulmonar fibrótica (Aumiller et al. 2017). No entanto, a inibição de LOXL3, LOX ou outros membros da família LOX não foi eficiente para o tratamento da FPI.

Outro envolvimento de LOXL3 na doença pulmonar foi descrito na hipertensão arterial pulmonar idiopática. Todos os membros da família lisil oxidase estavam elevados nos pulmões desses pacientes, mas apenas a expressão de LOXL2 e LOXL3 estava elevada nas lesões vasculares (Figura 5a) (Nave et al. 2014).

No aneurisma da aorta abdominal, foi descrito que a expressão de LOXL3 é regulada positivamente na parede da aorta de um modelo animal de lesão vascular esclerótica induzida por dieta hiperlipídica e tratamento vasoconstritor (Figura 5b) (Remus et al. 2012).

Na hipertensão arterial sistêmica, observou-se uma alta expressão de LOXL3 nos fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, levando ao aumento da reticulação fibrilar do colágeno e remodelação da MEC cardíaca, que levou a uma rigidez ventricular e disfunção diastólica cardíaca. Curiosamente, essa resposta de LOXL3 à hipertensão foi fortemente influenciada pelos linfócitos TH1, sugerindo uma indução diferencial de LOXL3 de acordo com o perfil imunológico (Figura 5b) (Yu et al. 2006, Yu et al. 2010).

Figura 5. LOXL3 no sistema pulmonar e cardiovascular. (a) Sistema pulmonar: a expressão e atividade de LOXL3 são reguladas por diferentes fatores de crescimento e hipóxia em fibroblastos pulmonares de hipertensão pulmonar idiopática. Isso contribui para a alta expressão e reticulação do colágeno e para a transdiferenciação de fibroblastos para miofibroblastos, denominada transição fibroblasto-miofibroblastos (TFM), sugerindo um importante papel de LOXL3 na fibrose pulmonar. Além disso, a expressão de LOXL3 está aumentada em lesões vasculares pulmonares de pacientes com hipertensão arterial pulmonar. (b) Sistema cardiovascular: a expressão de LOXL3 está aumentada no remodelamento da MEC cardíaca na hipertensão sistêmica e no aneurisma da aorta abdominal. Além disso, fibroblastos cardíacos e cardiomiócitos, influenciados por linfócitos T auxiliares, expressam altos níveis de LOXL3, resultando em ligações cruzadas de colágeno.

1.5.4.3 LOXL3 no sistema musculoesquelético e osteoarticular

Outra função de LOXL3 durante o desenvolvimento foi descrita na formação da junção miotendínea. No desenvolvimento de camundongos, *Loxl3* é expresso na região miotendínea e oxida diretamente a fibronectina, um ligante da integrina. Essa interação ativa a via de sinalização da integrina, com a fosforilação da paxilina, o que garante a regulação correta da organização da estrutura da MEC e a ancoragem das miofibras na junção miotendínea (Figura 6a) (Kraft-Sheleg et al. 2016).

O envolvimento de LOXL3 também foi descrito na osteoartrite (Figura 6b). *LOXL3* foi um dos genes regulados positivamente em um estudo de *microarray* de cartilagem afetada de osteoartrite (Sato et al. 2006). Em outro estudo, Huang et al. confirmaram esse achado e encontraram LOXL3 no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, que se correlacionaram positivamente com os níveis de leptina. Um modelo de rato de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior confirmou a maior expressão de

LOXL3 na cartilagem afetada. Os achados de aumento de expressão de LOXL3 com o tratamento com leptina de condrócitos primários de joelhos de ratos afetados com aumento de apoptose e supressão concomitante de autofagia, corroboraram para o envolvimento de LOXL3 na osteoartrite e o apontam como um potencial alvo terapêutico nesta doença (Huang et al. 2016).

Figura 6. LOXL3 no sistema musculoesquelético e osteoarticular. (a) Sistema miotendinoso: LOXL3 hidroxila a fibronectina, ativando a sinalização da integrina intracelular e a adesão correta das miofibras à junção miotendínea durante o desenvolvimento. (b) Sistema osteoarticular: as expressões de LOXL3 e de leptina estão aumentadas na cartilagem, bem como no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite. Os condrócitos derivados da cartilagem com osteoartrite expressam altos níveis de LOXL3 quando estimulados pela leptina, resultando na indução de autofagia e inibição de apoptose.

1.5.4.4 LOXL3 e sistema imune

Novas atividades enzimáticas de LOXL3 de remoção de grupos acetil e acetilamino de STAT3 também foram relatadas (Ma et al. 2017). Estes novos papéis de LOXL3 na desacetilação e desacetiliminação foram atribuídos aos domínios conservados SRCR 1 a 3 da porção N-terminal da proteína. LOXL3 colocaliza com STAT3 no núcleo, exerce suas atividades catalíticas e interrompe a dimerização de STAT3. Consequentemente, a atividade de transcrição de STAT3 é interrompida, restringindo a proliferação e diferenciação celular. Células com diminuição de LOXL3 apresentaram acetilação constitutiva de STAT3 e aumento da expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas no ciclo celular e pluripotência. Um papel fisiológico de LOXL3 na regulação imune foi demonstrado pela observação de que Stat3 é constitutivamente acetilado em camundongos sem expressão de *Loxl3*, com consequente redução da diferenciação de células T CD4⁺ para Th17 e Treg (Figura 7). Portanto, *Loxl3* regulou negativamente a diferenciação inflamatória de Th17 e Treg, contribuindo para o controle das respostas inflamatórias (Ma et al. 2017).

Figura 7. LOXL3 e sistema imune. LOXL3 desacetila STAT3 e interrompe sua dimerização, inibindo sua atividade transcricional. Consequentemente, as células T CD4⁺ não se diferenciam em Th17 e Treg, sugerindo um papel fisiológico de LOXL3 na regulação imunológica.

1.5.4.5 LOXL3 e câncer

LOXL3 desempenha um papel na repressão da expressão do gene da *E-caderina* (*CDH1*) através da interação física com o SNAIL (Figura 8a), um fator de transcrição envolvido no processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT). A interação de LOXL3 com SNAIL no espaço perinuclear levam à diminuição da expressão de *CDH1*, sugerindo o envolvimento de LOXL3 na progressão do tumor e na metástase (Peinado et al. 2005a). Além disso, SNAIL é regulado pela proteína quinase D1 (PKD1) através da fosforilação na Ser11, e PKD1 promove um aumento da expressão de LOXL3 e sua interação com o SNAIL (Figura 8a). A fosforilação de SNAIL na Ser11 resulta na sua interação com as histonas desacetilases 1 e 2 (HDAC1 e 2), bem como com LOXL3. O complexo formado por SNAIL fosforilado e HDAC1 e 2 é estabilizado no núcleo, e promove a regulação positiva de marcadores de proliferação, como a ciclina D1 e AJUBA (Figura 8a) (Eiseler et al. 2012). Em melanoma, LOXL3 está envolvido na tumorigênese e na progressão tumoral. O aumento da expressão de LOXL3 foi associado à via oncogênica do BRAF na transformação de melanócitos (Santamaria et al. 2018). Adicionalmente, o aumento de LOXL3 no melanoma foi correlacionado com a hipometilação do seu promotor. O silenciamento de LOXL3 promoveu resposta ao dano de DNA em células de melanoma, com acúmulo de quebras de cadeia dupla, mitose aberrante com acúmulo de células na fase G2/M e apoptose. LOXL3 se liga a diferentes proteínas envolvidas na manutenção da integridade do genoma e/ou mitose, como BRCA2, RAD51, SMC1A, MSH2, SMC3 e NUMA1. Estes dados suportam um papel pró-oncogênico de LOXL3 na estabilidade genômica e na conclusão mitótica na

transformação de melanócitos e na sobrevivência e progressão do melanoma (Santamaria et al. 2018).

Figura 8. Papel de LOXL3 em tumores. (a) Progressão tumoral e metástase: LOXL3 interage fisicamente com SNAIL na região perinuclear, impedindo sua degradação e exportação nuclear. SNAIL reprime a transcrição da *CDH1* (gene E-caderina), induzindo a transição epitelial-mesenquimal (EMT). A proteína quinase D1 (PKD1) fosforila SNAIL e regula positivamente a expressão de LOXL3. A fosforilação na Ser11 aumenta a interação de SNAIL e LOXL3, assim como de SNAIL e HDAC1 e 2. O complexo de SNAIL e HDACs é estabilizado no núcleo e leva à regulação positiva de marcadores de proliferação, tais como *AJUBA* e *CCND1* (gene da ciclina D1). (b) Estabilidade genômica e proliferação sustentada: LOXL3 interage com proteínas envolvidas na integridade genômica, como BRCA2, SMC1A, NUMA1, RAD51 e MSH2, com consequente reparo de DNA e evasão de apoptose. Além disso, a interação da LOXL3 com o BRCA2, SMC1A e NUMA1 é importante para a conclusão da mitose contribuindo para a transformação dos melanócitos. (c) Invasão e metástase: a expressão da LOXL3 está na via de sinalização do TGF- β em câncer gástrico. LOXL3 está essencialmente localizado no núcleo e sua expressão se correlaciona com o prognóstico dos pacientes.

Em casos de carcinoma gástrico primário, foi avaliada a expressão de LOXL1, LOXL2 e LOXL3 por imunoistoquímica (Kasashima et al. 2018). Foi observada a expressão LOXL3 principalmente no núcleo. As expressões proteicas positivas de todos os membros da família LOX foram correlacionadas com invasão tumoral, linfonodomegalia e pior prognóstico de pacientes (Kasashima et al. 2018). Além disso, o TGF- β induziu a expressão de LOXL3 em células de câncer gástrico, sugerindo que o LOXL3 estava regulado positivamente pela via de sinalização TGF (Figura 8c) (Kasashima et al. 2018).

A expressão de LOXL3 foi detectada também em câncer de mama, tanto no tumor primário quanto na efusão pleural (Sebban et al. 2009). Em um estudo recente, a expressão de LOX, LOXL1, LOXL2, e LOXL3 foi avaliada por imunoistoquímica em 291 casos de câncer de mama. A expressão de LOXL3 foi positiva em apenas 13,4% dos casos e correlacionou-se com inflamação intratumoral e peritumoral (Jeong et al. 2018). A expressão de LOXL3 foi detectada em vários tipos de tumores, como neoplasmas mieloproliferativos (Tadmor et al. 2013) e carcinoma de ovário (tumor primário, metástase, peritônio e pleura) (Sebban et al. 2009). O peptídeo de LOXL3 foi também detectado no plasma de pacientes com câncer de ovário (Dufresne et al. 2018). Além disso, a expressão de LOXL3 foi observada em células tumorais circulantes de câncer colorretal, e correlacionando-se com a resposta e o prognóstico do tratamento (Barbazan et al. 2014, Insua et al. 2017).

Em um estudo realizado por nosso laboratório, com objetivo de buscar novos alvos terapêuticos para astrocitomas, foram avaliados os genes que estavam com a expressão aumentada em GBM em relação ao astrocitoma de baixo grau. Entre os genes mais expressos, o da enzima LOX encontrava-se 11 vezes mais expresso em GBM (Marie et al. 2008). Prosseguindo com os estudos da família LOX nos astrocitomas, foi realizada uma análise da expressão gênica de todos os cinco membros da família de lisil oxidases em astrocitomas de diferentes graus de malignidade, incluído *LOXL3* (Figura 9). Entretanto, somente a expressão de *LOXL3* teve uma correlação com o prognóstico dos pacientes com GBM. Na análise univariada de sobrevida, pacientes com maior expressão do *LOXL3* apresentaram uma menor sobrevida ($9,56 \pm 1,87$ meses) em relação aos pacientes com menor expressão deste gene ($14,7 \pm 2,32$ meses), como mostra a Figura 10 ($p=0,041$).

Figura 9. Expressão de *LOXL3* em tecidos não neoplásicos e em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. NN: tecido não neoplásico, AGII: astrocitoma difuso (grau II), AGIII: astrocitoma anaplásico (grau III), GBM: glioblastoma (grau IV) (Soares et al., em preparação).

Figura 10. Curva de sobrevida comparando os pacientes com GBM com hiper (vermelho) e hipoexpressão (azul) de *LOXL3*. Casuística do laboratório. A estratificação de pacientes com expressão alta e baixa foi baseada na expressão mediana de *LOXL3*. Adaptado de Soares et al. (em preparação).

1.6 LOXL3 como alvo terapêutico

Os membros da família lisil oxidase tem sido estudados como possíveis alvos terapêuticos para diversos tipos de doenças como fibrose e tumores (Johnston and Lopez 2018, Schütze et al. 2015, Trackman 2016, Yang et al. 2016). Em relação a *LOXL3*, devido

à diversidade de funções que têm sido descritas recentemente e ao seu envolvimento com diversas doenças, incluindo câncer, é considerado um potencial alvo terapêutico. Em astrocitomas, particularmente, seu papel funcional ainda não foi demonstrado. Nossos estudos mostraram que a hiperexpressão de *LOXL3* pode ser um fator de pior prognóstico para os pacientes com GBM, reforçando que pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento e progressão destes tumores.

2 JUSTIFICATIVA

Há poucos dados na literatura sobre a função e expressão de LOXL3 em tumores, principalmente em astrocitomas. Este estudo tem como objetivo analisar o papel funcional da enzima LOXL3 em modelo de GBM, devido aos dados preliminares que mostraram que a expressão de *LOXL3* teve impacto no prognóstico dos pacientes. Foram realizados ensaios *in vitro* para analisar o papel funcional de LOXL3 nos astrocitomas para uma melhor compreensão das vias de sinalização moduladas por LOXL3 que levaram a impactar a sobrevida dos pacientes com GBM.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral: detalhar o papel funcional de LOXL3 através do silenciamento transitório da expressão gênica em linhagens de célula de GBM humano.

Objetivos específicos:

1. Analisar a expressão de LOXL3 em astrocitomas de diferentes graus de malignidade *in silico* e em subtipos moleculares de GBM;
2. Analisar a expressão de LOXL3 em linhagens celulares de GBM humano para escolher o melhor modelo celular para os experimentos funcionais;
3. Realizar o silenciamento da expressão gênica de *LOXL3* por siRNA em linhagem celular U87MG e análise da eficiência do procedimento através de PCR em tempo real e Western blot;
4. Analisar o efeito do silenciamento nas células U87MG por ensaios funcionais, localização celular e número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA);
5. Correlacionar os níveis de expressão de LOXL3 com o número de cópias de mtDNA em astrocitomas;
6. Sequenciamento do transcriptoma das células silenciadas para expressão de *LOXL3* para identificar as vias de sinalização nas quais LOXL3 está envolvido;
7. Avaliar os genes e as proteínas das vias de sinalização relacionadas ao LOXL3 *in silico* através da análise no banco público.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares

As linhagens comerciais de GBM humano, U87MG, U251, A172 e T98G foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) cultivadas em monocamada e mantidas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Thermo Fisher Scientific), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Cultilab) e antibiótico (100 unidades/mL de penicilina, 100 µ/mL de estreptomicina). As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e desagregadas com tripsina/EDTA, centrifugadas e ressuspensas em DMEM para replaqueamento. A concentração e viabilidade celular foram analisadas com azul de Tripán em contador automático Countess (Thermo Fisher Scientific). A linhagem U87MG e U251 possuem mutação em *NF1*, e a linhagem A172, mutação em *RBI*, portanto foram considerados do subtipo mesenquimal, apesar da linhagem U251 apresentar baixos níveis de expressão dos marcadores mesenquimais. A linhagem T98G foi considerada do subtipo clássico, por apresentar alta expressão de *EGFR* (Forbes et al. 2015, Li H. et al. 2019).

4.2 Silenciamento de *LOXL3* por RNA de interferência (siRNA)

Duas sequências de pequenos RNA de interferência (siRNA) foram utilizadas para silenciamento transitório da expressão de *LOXL3*: siRNA1 - (5'-CGGCATGACATTGACTGTCAGTGGA-3') e siRNA2 (5'-CTAGTTTCTGTCTCGAAGACACTGA-3') e comparadas ao controle *non-target* (NTC) (IDT). Os oligonucleotídeos foram diluídos em tampão livre de RNase fornecido pelo fabricante. Células U87MG (1 x 10⁵ células / por poço) foram cultivadas numa placa de seis poços e após 24 h transfectadas com Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) em uma concentração final de 10 nM. O silenciamento de *LOXL3* foi avaliado após 2, 4 e 7 dias de transfecção. A eficiência do silenciamento foi avaliada em nível de expressão gênica e proteica.

4.3 Extração de DNA e RNA total e transcrição reversa

A extração de RNA e DNA foi realizada pelo kit Allprep DNA / RNA Micro seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Qiagen). As concentrações e pureza foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro por leitura a 260 e 280nm. Razões A260/A280 maiores que 1,8 foram consideradas de pureza satisfatória. As amostras de RNA

foram estocadas a -80°C até sua utilização para a síntese de DNA complementar (cDNA). O DNA foi diluído para 1 ng/μL em tampão EB (fornecido pelo kit) e armazenado a 4°C para posterior análise do número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA). A síntese de cDNA foi realizada com 1 μg de RNA com o kit Maxima First Strand cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi diluído em tampão TE (Tris/EDTA) e armazenado a -20°C para posterior utilização para PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

4.4 PCR quantitativo em tempo real

As análises de expressão gênica e do número de cópias de mtDNA foram realizadas através de qPCR. As reações foram realizadas pelo método de incorporação de SYBR Green, em aparelho ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific). Os oligonucleotídeos foram previamente desenhados pela *Integrated DNA Technologies* (IDT), levando em consideração a localização em exons diferentes para evitar amplificação de possível DNA contaminante no caso de expressão gênica. As reações foram realizadas em triplicata em um volume final de reação de 12 μL, contendo 6 μL de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), 3 μL de cDNA ou DNA e 3 μL de oligonucleotídeos. As condições de amplificação foram: incubação a 50°C por 5 minutos, desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 60 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos e extensão). Os dados quantitativos referentes à análise de expressão dos genes foram normalizados em relação ao gene *HPRT* (hipoxantina fosforribosiltransferase). Para a análise de número de cópias de mtDNA, o gene *HBB* (hemoglobina beta) foi utilizado como referência por ser de cópia única.

A amplificação de um único produto foi confirmada pela análise de sua curva de dissociação. As eficiências de amplificação [$E = 10^{(-1 / \text{slope}) - 1}$] foram calculadas usando diluições seriadas de cDNA ou DNA. A Tabela 3 apresenta as informações de sequências dos oligonucleotídeos e tamanho dos produtos utilizados nas reações.

As equações $2^{-\Delta Ct}$ ou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foram aplicadas nos cálculos da expressão de *LOXL3* onde $\Delta Ct = [(\text{média do Ct de } LOXL3) - (\text{média do Ct de } HPRT)]$, e $\Delta\Delta Ct = [(\Delta t \text{ da célula silenciada}) - (\Delta Ct \text{ da célula controle})]$ (Livak and Schmittgen 2001). Para os cálculos de número de cópias do mtDNA, a mesma equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizada, onde $\Delta Ct = [(\text{média do Ct de } HBB) - (\text{média do Ct de mtDNA})]$ e $\Delta\Delta Ct = [(\Delta t \text{ da célula silenciada}) - (\Delta Ct \text{ da célula controle})]$ (Correia et al. 2011, Franco et al. 2018).

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos para as reações de PCR em tempo real

Primers	Produto de PCR (bp)	Orientação	Sequência 5'-3'	Concentração (nm)
<i>LOXL3</i>	115pb	Senso	CTGGAACAGGCCGCATCT	200
		Antisenso	CCCCAGCATCCTCATCGT	
<i>HPRT</i>	118pb	Senso	TGAGGATTTGGAAAGGGTGT	200
		Antisenso	GAGCACACAGAGGGCTACAA	
<i>HBB</i>	94pb	Senso	GTGAAGGCTCATGGCAAGA	400
		Antisenso	AGCTCACTCAGGTGTGGCAAAG	
mtDNA	116pb	Senso	TGATGGCTAGGGTGACTTCAT	400
		Antisenso	CCTAGCCGTTTACTCAATCCT	

4.5 Análise da expressão proteica

A lise das células para extração de proteínas totais foi realizada com tampão RIPA (Tris-HCl 50mM, NP-40 1%, desoxicolato de Na 0,25%, NaCl 150mM, EDTA 1mM) e coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich). As concentrações totais de proteínas foram determinadas pelo método de *Bradford* (Bio Rad Protein Assay) com uma curva padrão de albumina bovina. Os lisados celulares (20 µg de proteínas) foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida gradiente 4-12% (Thermo Fisher Scientific) em tampão de eletroforese NuPAGE MOPS SDS (Thermo Fisher Scientific) e transferidos para uma membrana PVDF através do sistema *iBLOT* seco (iBlot Dry Blotting System, Thermo Fisher Scientific). A membrana, previamente bloqueada com leite desnatado, foi incubada com anti-LOXL3 policlonal de coelho (AVIVA, ARP60280, 1:1000) e anti-β-actina monoclonal de camundongo (clone AC-74, Sigma-Aldrich, 1:20.000) como controle para carregamento de proteína. Foram utilizados os anticorpos secundários conjugados com peroxidase anti-IgG de coelho e anti-IgG de camundongo, ambos na diluição de 1:1.000 (Sigma-Aldrich). As proteínas foram identificadas através de um equipamento de detecção de quimioluminescência (ImageQuant LAS4000- GE Healthcare), utilizando reagente Clarity Max Western ECL Blotting Substrates (BioRad). As bandas de *Western blotting* foram quantificadas utilizando o programa ImageJ Fiji, utilizando a equação: densidade integrada/área (Abramoff 2004).

4.6 Análise de localização celular por imunofluorescência

As células ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em monocamada em lâmina pré-tratada com poli-L-lisina (0,1 mg/mL) e incubadas por 18 h a 37°C. As mitocôndrias foram marcadas com sondas MitoTracker Deep Red FM (Molecular Probes, Thermo Fisher

Scientific), na concentração de 500 nM, por 15 min, segundo as instruções do fabricante. As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 2 horas. A membrana foi permeabilizada com Triton-X-100 (0,1%) diluído em PBS 1x por 30 min a 37°C. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 4% de soro de cabra diluídos em PBS por 30 min a 37°C. O anticorpo primário anti-LOXL3 (AVIVA, ARP60280, coelho policlonal, 1:200) foi incubado por 18 h a 37°C. O anticorpo secundário anti-coelho IgG (Alexa Fluor 488-Molecular Probes, 1:400) foi incubado a 4°C por 18 h. Os núcleos foram corados com DAPI (diamidino-2-fenil-indol, Thermo Fisher Scientific, 1:400) por 3 min. Controles negativos incluem a reação completa, com ausência do anticorpo primário. As preparações foram analisadas em microscopia confocal Leica TCS SP8. As imagens recuperadas foram analisadas pela ImageJ. A colocalização de LOXL3 com núcleo ou mitocôndrias foi analisada utilizando o coeficiente de Mander, sendo que a escala varia de zero, sem colocalização, a 1, colocalização completa (Adler and Parmryd 2010). O valor aceito para considerar colocalização foi acima de 0,8. A fluorescência das imagens também foi quantificada e corrigida pelo método de densidade integrada, utilizando a equação CTCF (*corrected total cell fluorescence*) = Densidade integrada – (área da célula selecionada x média de fluorescência de fundo) (Hartig 2013).

4.7 Viabilidade celular

As células U87MG foram cultivadas (1×10^3 células/poço) em placas de 96 poços e silenciadas com siRNA para LOXL3. Após os tratamentos, análise das células foi realizada com reagente PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific) por 2 h. A fluorescência foi medida em um equipamento GloMax (Promega Corporation) utilizando o comprimento de onda 535 nm de excitação e 560 nm de emissão. Os valores de fluorescência foram normalizados pelo controle branco da reação (somente meio de cultura). As análises foram realizadas após 48, 72 e 96 h após o silenciamento. Os valores de fluorescência são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis.

4.8 Apoptose

As células U87MG foram cultivadas (5×10^3 células/poço) em placas de 6 poços. Após 24 h do transfecção com siRNA, as células foram tratadas com TMZ na concentração de 1 mM, e com o veículo da droga, dimetilsulfóxido (DMSO). Para avaliar apenas o efeito do silenciamento de *LOXL3*, células sem tratamento de TMZ e DMSO também foram avaliadas. No quarto dia de silenciamento, e 72 h após o tratamento com TMZ, as células foram

marcadas com anexina V conjugada com - isotiocianato de fluoresceína (FITC), marcador precoce de fase de apoptose, e iodeto de propídio (PI), intercalante de DNA, marcador de estágio tardio de apoptose utilizando o Dead Cell Apoptosis kit, seguindo orientações do fabricante (Thermo Fisher Scientific). As células foram então analisadas no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences). Os resultados da citometria de fluxo foram analisados no programa FlowJo V10.

4.9 Ciclo celular

As células U87MG foram cultivadas (5×10^3 células/poço) em placas de p6. No terceiro dia após a transfecção, as células foram incubadas com meio DMEM sem SFB, para sincronização. No quarto dia de silenciamento, as células foram incubadas com meio DMEM com 10% SFB, para induzir o progresso do ciclo celular. As células foram coletadas para fixação, em diferentes tempos, 3, 6, 12 e 24 h após o tratamento com DMEM suplementado com SFB. As células foram fixadas com etanol 70%, e incubadas a 4°C por no mínimo 30 min, e no máximo 48 h. Após a etapa de fixação, para evitar a incorporação do intercalante de DNA nos RNAs, as células foram incubadas com RNase A (30 µg/mL) (Sigma-Aldrich), seguido da incubação do PI. A detecção e quantificação das células foram obtidas pela análise de citometria de fluxo (FACS Canto II; BD Biosciences). Os resultados da citometria de fluxo foram analisados no programa FlowJo V10.

4.10 Análise *in silico* de expressão gênica

A análise de expressão de genes foi realizada utilizando o banco público do TCGA (*The Cancer Genoma Atlas*): cBio Portal for *Cancer Genomics Database* (<http://www.cbioportal.org>) (Gao et al. 2013). Neste portal está disponível banco de dados de RNA-seq de centenas de casos de astrocitomas (Brennan et al. 2013) (Tabela 4). Os dados foram baixados e normalizados pelo programa DeSeq (Anders and Huber 2010). Para visualização das vias de processos celulares foi utilizado o KEGG Pathways (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>).

Tabela 4. Casuísticas de astrocitomas utilizadas para análises

Astrocitomas	Laboratório	TCGA
Astrocitoma difuso (II)	26	63
Astrocitoma anaplásico (III)	18	129
Glioblastoma (GBM)	86	160
Proneural	14	29
Clássico	38	38
Mesenquimal	15	48

4.11 Análise do transcriptoma (RNA-SEQ)

O preparo da biblioteca de cDNA foi realizado a partir de 1µg de RNA total extraído de células U87MG silenciadas para LOXL3 com siRNA e NTC (quatro dias após transfecção) de duplicatas experimentais. A construção da biblioteca foi realizada com SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep for Illumina Multiplexed Sequencing, de acordo com o protocolo do fabricante (Agilent Technologies). A integridade do RNA foi analisada em Tapestation 4200 com RNA ScreenTape (Agilent Technologies). RNA mensageiro (mRNA) foi purificado a partir da amostra de RNA total utilizando partículas magnéticas com poliA. Os mRNAs purificados foram fragmentados e a síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando de actinomicina D, e RNA-seq First Strand Master Mix. A primeira fita de cDNA foi purificada utilizando partículas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter). A síntese da segunda fita foi realizada juntamente com o reparo das extremidades das fitas, seguida de mais uma etapa de purificação. Em seguida, foi realizada a ligação dos adaptadores e índices com sequências únicas para cada amostra. As bibliotecas foram enriquecidas por PCR e quantificadas através do Tapestation 4200 com DNA ScreenTape D1000 (Agilent Technologies). O sequenciamento das bibliotecas de RNA-seq foi realizado em sequenciador HiSeq 2500 (Illumina), que faz parte da Rede Premium de equipamento multiusuários (SELA – Sequenciamento em Larga escala) da FMUSP. A análise de bioinformática foi realizada pelo Dr Antônio Marcondes Lerário, colaborador da Universidade de Michigan, de acordo com os seguintes passos:

1. Alinhamento dos dados: os dados brutos (arquivos. FASTQ) de sequenciamento foram alinhados à versão hg38 do genoma humano através do software STAR (Dobin et al. 2013). Ao final desta etapa, foram gerados dois arquivos .BAM: um deles com as sequências de leituras alinhadas às coordenadas genômicas e outro às do transcriptoma. Os dados referentes às coordenadas do transcriptoma (conjunto de genes e numeração dos exons bem como suas coordenadas) foram obtidos do portal *Ensembl*.

2. Quantificação dos dados de expressão gênica: após os arquivos gerados. BAM foi feita a quantificação da expressão de cada gene através do software RSEM (Li B. and Dewey 2011). Foram geradas planilhas individuais para cada amostra, contendo os dados de expressão brutos (medida em contagem por gene) e os dados normalizados dos diferentes métodos: RPKM e COM (Wagner et al. 2012). Além disso, foi gerada uma planilha baseada nos dados em contagens, em que as linhas correspondem a cada gene do transcriptoma e as colunas a cada uma das amostras.
3. Análise estatística: para análise de expressão diferencial, foi utilizado o *framework* limma-voom, disponível no portal *Biocondutor* (Ritchie et al. 2015). Os dados brutos (planilhas com as contagens geradas na etapa anterior) foram inicialmente log-transformados e normalizados. Posteriormente, a análise estatística (expressão diferencial entre os grupos) foi realizada através de modelos lineares e aplicação de estatística *t* moderada.
4. Controle de qualidade: os arquivos .FASTq foram submetidos à análise de controle de qualidade realizada pelo software FASTQC. Além disso, a análise de qualidade incluiu para cada amostra uma estimativa do número de genes detectados, o nível de contaminação por RNA ribossômico, a relação entre transcritos intrônicos e exônicos, bem como número total de sequências alinhadas. Esta análise é feita com a ferramenta RNAseqC (DeLuca et al. 2012).

A análise final dos resultados do RNA-seq (diferença de expressão das células silenciadas por siRNA em relação ao controle NTC) foi realizada através o banco de dados KEGG Pathway através do site do WebGestalt (<http://www.webgestalt.org/>).

4.12 Análises estatísticas

Para as análises de expressão gênica das células, e para os ensaios de proliferação, apoptose e ciclo celular, e quantificação da intensidade de fluorescência, o teste Two-way Anova, foi utilizado para comparação de múltiplos grupos, seguido de pós-teste de Tukey. Para avaliar a diferença no número de cópias de DNA mitocondrial entre as amostras, foi utilizado o teste One-way Anova, seguido também do pós-teste de Tukey. Para a curva de sobrevida de Kaplan-Meier foi utilizado a mediana de expressão para estabelecer os casos com hipoexpressão (abaixo da mediana) e a hiperexpressão (acima da mediana) de *LOXL3*. As análises da expressão gênica entre os astrocitomas de cada grau de malignidade e entre os diferentes subtipos moleculares de GBM foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn, para comparação entre dois grupos. Para a elaboração dos mapas de calor, os dados de RPKM foram normalizados por *z-score*. A correlação de *LOXL3*

com mtDNA foi realizada com os dados de número de cópias previamente quantificados em trabalhos anteriores do laboratório (Correia et al. 2011). O teste de normalidade foi realizado pelo teste de Kolmogorov-Sminorv. Os programas SPSS 20 (IBM) e GraphPad Prism 8 foram utilizados para as análises estatísticas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Análises de expressão de *LOXL3* em astrocitomas e nos subtipos moleculares de GBM

Dados preliminares do laboratório mostraram que a expressão gênica de *LOXL3* aumentava de acordo com o grau de malignidade dos astrocitomas (Figura 9). Além disso, foi também demonstrado que pacientes com GBM com menor expressão de *LOXL3* apresentaram uma maior sobrevida (Figura 10). Para validar *in silico* os dados obtidos, foram realizadas análises de expressão gênica nos diferentes graus de astrocitomas (II, III e GBM) na casuística do TCGA (Figura 11). A expressão de *LOXL3* aumentou de acordo com o grau de malignidade do tumor nos casos do TCGA, sendo o GBM, o grau de maior expressão, confirmando os dados obtidos na casuística do laboratório.

Figura 11. Expressão gênica de *LOXL3* de acordo com o grau de malignidade nos casos do TCGA. AGII: astrocitoma difuso; AGIII: astrocitoma anaplásico, GBM: glioblastoma. As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$), seguido pelo pós-teste de Dunn's para calcular a diferença entre os grupos: ** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

A expressão de *LOXL3* nos subtipos moleculares de GBM foi analisada na casuística do laboratório (Galatro et al., 2017) e do TCGA. Nos casos do laboratório, não houve diferença na expressão de *LOXL3* nos diferentes subtipos moleculares (Figura 12a). Entretanto nos casos do TCGA, a expressão de *LOXL3* foi maior no subtipo mesenquimal quando comparado aos demais subtipos moleculares (Figura 12b).

Figura 12. Expressão de *LOXL3* nos diferentes subtipos moleculares de GBM na casuística do laboratório (a) e do TCGA (b). As barras horizontais representam a mediana de cada grupo. Foi realizado o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$ para os casos do TCGA), seguido pelo pós-teste de Dunn's para calcular a diferença entre dois grupos: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

5.2 Expressão gênica de *LOXL3* em linhagens celulares

Inicialmente foi realizada uma análise de *LOXL3* por qPCR para determinar as linhagens celulares de GBM com maior expressão do gene. Quatro linhagens foram analisadas: U87MG, A172, U251 e T98G (Figura 13). A linhagem que apresentou maior expressão de *LOXL3* foi a U87MG, que, portanto, foi selecionada para o silenciamento de *LOXL3* e ensaios funcionais. A linhagem celular U87MG apresenta características moleculares do subtipo mesenquimal.

Figura 13. Análise de expressão de *LOXL3* em linhagens celulares estabelecidas de GBM. As barras representam o nível de expressão gênica utilizando *HPRT* como gene normalizador.

5.3 Silenciamento de *LOXL3* através de siRNA

Para o silenciamento de *LOXL3*, foram utilizadas duas sequências de oligos comerciais, siRNA1 e siRNA2, além do controle denominado NTC. A linhagem celular U87MG foi transfectada com diferentes concentrações de oligos (0,1 nM; 1 nM e 10 nM) em diferentes tempos (D2, D4 e D7), para obtenção da ideal concentração para o melhor efeito de silenciamento em nível de RNA e proteína. A concentração de 10 nM apresentou melhor efeito no silenciamento de *LOXL3*. O silenciamento gênico e proteico foi analisado através de qPCR (Figura 14) e Western blot (Figura 15), respectivamente.

Figura 14. Inibição da expressão de *LOXL3* na linhagem U87MG com siRNA1 e siRNA2 na concentração de 10 nM para 2 (D2), 4 (D4) e 7 (D7) dias após o silenciamento. As barras representam a média percentagem de expressão de *LOXL3* em diferentes tempos em relação ao controle NTC, com os desvios padrões de dois experimentos independentes.

Figura 15. Inibição da expressão de LOXL3 a nível proteína na linhagem U87MG após o silenciamento com siRNA. (a) *Western blot* de LOXL3 nos diferentes tempos; 2 (D2), 4 (D4) e 7 (D7) dias após o silenciamento com siRNA. (b) Quantificação das bandas de *Western blot* através da análise da densidade integrada utilizando ImageJ. A β -actina foi usada como controle. As barras representam a porcentagem de expressão de *LOXL3* em diferentes tempos em relação ao controle NTC.

O silenciamento a nível gênico e proteico foi eficiente, apresentando a maior nível de silenciamento quatro após a transfecção (Tabela 5). Desta forma, todos os experimentos funcionais foram realizados neste dia.

Tabela 5. Taxa de silenciamento gênico e proteico de LOXL3

Dias (após a transfecção)	Gênico (% em relação ao NTC)		Proteico (% em relação ao NTC)	
	siRNA1	siRNA2	siRNA1	siRNA2
2	82,6	72,2	15,6	14,6
4	84,7	50,8	41,5	39,2
7	40,1	50,2	8,0	34,8

5.4 Efeito do silenciamento de LOXL3 na viabilidade celular

Após o silenciamento, a viabilidade das células silenciadas para o LOXL3 foi avaliada e comparada ao controle. A curva foi acompanhada até 96 h após o silenciamento. Os resultados do ensaio de viabilidade celular estão apresentados na Figura 16.

Figura 16. Efeito da regulação negativa de LOXL3 na viabilidade celular. (a) O ensaio de viabilidade celular foi analisado por incubação do reagente no momento da transfecção com siRNA (D0), e após 2 (D2), 3 (D3) e 4 (D4) dias. As barras representam, as médias $\pm$ desvios padrão de 3 experimentos independentes (8 replicatas cada experimento). (b) Porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre os controles (NTC) e o siRNA1 e siRNA2 de *LOXL3* (**** $p < 0,0001$, teste Anova seguido do pós-teste de Tukey). (c) Figuras representativas em diferentes tempos mostrando a diminuição da taxa de viabilidade celular. Aumento de 10x.

Observou-se uma diminuição na viabilidade celular para ambos os oligos. Para o siRNA1 a viabilidade celular diminuiu 36,9% e para o siRNA2 a diminuição foi de 26,2% em relação ao controle (NTC), com maiores e significativas diferenças no quarto dia ($p < 0,0001$).

5.5 Efeito do silenciamento de LOXL3 na morte celular

Além do crescimento celular, analisamos o efeito do silenciamento de LOXL3 na morte celular de células U87MG. As células sem e com tratamento com TMZ foram marcadas com Anexina V - FITC, marcador de fosfatidilserina (morte inicial) e PI, intercalante de DNA (marcador de morte tardia) e analisadas por meio de citometria de fluxo. Observou-se que as células silenciadas com siRNA1 apresentaram um aumento significativo da morte celular inicial. A taxa de morte celular foi de 13,4% ($p<0,05$) e 32,8% ($p<0,001$) para o siRNA1 enquanto que o controle (NTC) apresentou 2,1% e 18,6% sem e com tratamento de TMZ, respectivamente (Figura 17).

Figura 17. Efeito do silenciamento de LOXL3 na morte celular de células U87MG. (a) Citometria de fluxo usando a marcação com Anexina V - FITC e iodeto de propídio (PI). Os ensaios de apoptose foram realizados com células tratadas com temozolomida (TMZ) e comparadas com células não tratadas. (b) Porcentagem de células totais observadas em citometria de fluxo. Aquisição de 30.000 eventos por amostra. As células U87MG silenciadas para expressão de LOXL3 tiveram um aumento da morte celular em estágio inicial com tratamento com e sem tratamento com TMZ. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o controle (NTC) e o siRNA1 (**** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$) teste Anova seguido do pós-teste de Tukey).

5.6 Efeito do silenciamento de LOXL3 no ciclo celular

Para avaliar a possível causa da diminuição da proliferação celular, além da apoptose, foram analisadas as fases do ciclo celular das células silenciadas. Não se observaram alterações na proporção de células nas fases do ciclo celular das células silenciadas em relação aos controles parentais e NTC (Figura 18).

Figura 18. Efeito do silenciamento de LOXL3 no ciclo celular de células U87MG silenciadas com siRNA de LOXL3. (a) Citometria de fluxo usando a marcação de iodeto de propídio (PI). (b) Porcentagem de células totais observadas em citometria de fluxo. Aquisição de 30.000 eventos por amostra. A inibição de LOXL3 na linhagem celular U87MG não promoveu efeito no ciclo celular. Teste Anova seguido do pós-teste de Tukey.

5.7 Localização celular de LOXL3

A localização LOXL3 foi avaliada através de imunofluorescência na célula U87MG (Figura 19). As células foram marcadas com MitoTracker, um marcador de mitocôndrias, e com anticorpo para LOXL3.

Figura 19. Localização intracelular de LOXL3 em linhagem celular U87MG. (a) Imagens representativas da imunofluorescência de LOXL3 (verde), mitocôndrias (MitoTracker - vermelho) e núcleo (DAPI - azul).

A localização celular de LOXL3 foi também analisada nas células U87MG silenciadas e comparadas com o controle NTC (Figura 20a). Observou-se que LOXL3 colocalizou com as mitocôndrias em 89,1%. Após o silenciamento, a colocalização de LOXL3 com as mitocôndrias foram de 75,8% e 84,4% para siRNA1 e siRNA2, respectivamente, sendo estatisticamente significativo apenas para o siRNA1 ($p < 0,001$) (Figura 20b). O silenciamento de LOXL3 promoveu uma diminuição da fluorescência de LOXL3 em relação ao NTC. Houve diferença estatística apenas para o siRNA1 ($p < 0,05$) (Figura 20c). Estes dados sugerindo o possível envolvimento de LOXL3 com as mitocôndrias.

Figura 20. Localização intracelular de LOXL3 em células U87MG e o efeito após a sua regulação negativa. (a) Imagens representativas da imunofluorescência de LOXL3 (verde), mitocôndria (MitoTracker - vermelho) e núcleo (DAPI - azul) das células controle (NTC) e silenciadas com siRNA1 e siRNA2. (b) Porcentagem de colocalização de LOXL3 com as mitocôndrias. A colocalização foi analisada pelo Coeficiente de Mander (a escala varia de zero, sem colocalização, a 1, colocalização completa). (c) Quantificação da fluorescência de LOXL3 em células U87MG silenciadas com siRNA e controle. (d) Quantificação da fluorescência de mitocôndrias em células U87MG silenciadas com siRNA e controle. A quantificação foi determinada por ImageJ. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão das amostras. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o controle (NTC) e o siRNA (**** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$), teste Anova seguido do pós-teste de Tukey). NTC (n=14), siRNA1 (n=12), siRNA2 (n=21); n= número de células.

O efeito do silenciamento de LOXL3 também foi observado na distribuição mitocondrial. Detectou-se um aumento da fluorescência do marcador MitoTracker nas células silenciadas em relação ao NTC (Figura 20d). Além do aumento da fluorescência, foi observado alterações nas redes mitocondrias após o silenciamento de LOXL3 (Figura 21).

Figura 21. Efeito do silenciamento na distribuição e morfologia das mitocôndrias após silenciamento de LOXL3. Imagens representativas da imunofluorescência das células silenciadas para LOXL3. Mitocôndria (MitoTracker-vermelho); núcleo (DAPI – azul).

5.8 Análise de número de cópias de DNA mitocondrial

LOXL3 colocalizou com as mitocôndrias na linhagem U87MG e seu silenciamento promoveu um aumento da fluorescência das mitocôndrias, indicando um aumento da quantidade de organelas. Após o silenciamento gênico, o DNA total foi analisado para determinação do número de cópias de mtDNA, utilizando qPCR (Figura 22). O silenciamento de LOXL3 promoveu o aumento do número de cópias de mtDNA nas células silenciadas com siRNA1 (20,7%; $p < 0,05$).

As amostras de astrocitomas dos diferentes graus da casuística do laboratório foram previamente analisadas quanto ao número de cópias de DNA mitocondrial (Correia et al. 2011). O número de cópias de mtDNA diminuiu de acordo com o grau, sendo o GBM o grau de maior depleção. *LOXL3*, por sua vez, apresenta um padrão contrário, aumentando a expressão com o aumento de malignidade dos astrocitomas (Soares et al., em preparação). Foi avaliada, então, a correlação dos níveis de expressão de *LOXL3* com o mtDNA nos astrocitomas (Figura 23).

Figura 22. Efeito do silenciamento de LOXL3 no número relativo de cópias de mtDNA. O DNA das células silenciadas foi analisado por qPCR para determinação da quantidade de mtDNA das células silenciadas em relação ao controle (NTC). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas entre o controle (NTC) e o siRNA (* $p < 0,05$, teste Anova seguido do pós-teste de Tukey).

Figura 23. Correlação entre a expressão de *LOXL3* e número de cópias de mtDNA. Gráfico representam análise de correlação de Spearman das amostras da casuística total. Os resultados foram obtidos a partir de log na base de 10. n= 164: não neoplásico = 20; AGI=22; AGII= 26; AGIII=15; GBM= 81.

Os níveis de expressão de *LOXL3* com mtDNA apresentaram uma correlação negativa ($R=-0,33$, $p=0,0001$). Estes dados corroboram com os dados de intensidade de fluorescência e número de cópias das células silenciadas para o *LOXL3*, onde as células com expressão de *LOXL3* diminuído apresentaram aumento da intensidade de fluorescência do marcador mitocondrial, juntamente com um aumento do número de cópias de mtDNA. As análises foram realizadas com a casuística total, incluindo as amostras normais e os diferentes graus de astrocitomas. Foram realizadas as análises separando cada grau, porém a correlação não significativa, possivelmente devido ao número de amostras.

5.9 Análise do transcriptoma das células silenciadas

Foi realizada análise do transcriptoma da linhagem U87MG após o silenciamento com siRNA para *LOXL3* através de RNA-seq. O valor de *fold change* para *LOXL3* foi de -0,6 e -0,16 para siRNA1 e siRNA2, respectivamente, que corresponde a um silenciamento de 51,5% e 11,7% em relação ao controle.

Para a análise de expressão diferencial das células silenciadas em comparação com controle (NTC) foi utilizado o valor de *fold change* (FC) -1,0 e com $p<0,05$ (ou 2 vezes menos expresso nas células silenciadas em relação ao controle NTC) para filtrar os genes hipoeexpressos, para ambos os siRNAs, que resultaram em 560 e 318 genes hipoeexpressos para siRNA1 e siRNA2 respectivamente, e 60 genes em comum aos 2 siRNAs. Para a

análise de hiperexpressão o FC foi de 1,5 (2,83 vezes mais expresso nas células silenciadas em relação ao controle NTC) e 1,0 (2 vezes mais expresso nas células silenciadas em relação ao controle NTC) para siRNA1 e siRNA2, respectivamente. Com o filtro de $p < 0,05$, foram encontrados 443 e 436 genes para siRNA1 e siRNA2 respectivamente, e 111 genes em comum entre os siRNAs. A análise foi realizada no site do *WebGestalt* utilizando o banco dados do *KEGG Pathways*.

Como o papel de LOXL3 em astrocitomas não é conhecido foi realizado uma análise para identificar as possíveis vias em que *LOXL3* está envolvido e compreender sua função nestes tumores. As células silenciadas com os siRNA1 e siRNA2 apresentaram diferenças na expressão de genes e consequentemente no perfil das vias alteradas (Figura 23), possivelmente devido a diferença no silenciamento em nível de RNA (84,7 % e 50,8% para siRNA1 e siRNA2, respectivamente) (Figura 14)

As vias hipoeexpressas alteradas mais enriquecidas com relação para as células silenciadas com siRNA1 foi a via de interação ligante-receptor neuroativo, esteroidogênese de ovário e autofagia. Já as vias com genes hiperexpressos, foram encontradas as relacionadas a sistema imune e inflamação, como interação citocina-citocina receptor e vias de infecção (Figura 24a).

Por outro lado, genes com menor expressão nas células silenciadas com siRNA2 em relação ao controle estavam envolvidos em vias de interação neuroativo ligante-receptor, de sinalização de relaxina, de secreção pancreática e junção célula-célula. Os genes hiperexpressos estavam relacionados a via de sinalização Wnt, lisossomo, via de sinalização cAMP e Rap1, além de interação citocina-citocina receptor (Figura 24b).

Figura 24. Análise do transcriptoma da linhagem celular U87MG após o silenciamento de *LOXL3* por meio de siRNA. Dez vias mais enriquecidas das vias de *KEGG* dos genes hipoexpressos (laranja), e hiperexpressos (azul). (a) siRNA1; (b) siRNA2. As barras representam um score determinado pelo conjunto de genes (FDR) e o *fold change* relacionado. FDR: *false discovery rate*.

Com base nos resultados de análise dos dados de silenciamento que demonstraram um nível maior de silenciamento com siRNA1 das células U87MG, além dos resultados funcionais mostrarem que *LOXL3* pode estar envolvido com a via de autofagia com alteração de mitocôndrias, os genes envolvidos no processo de iniciação, formação do fagóforo, sequestro de proteínas, e formação do autofagossomo foram analisados (Dikic and Elazar 2018). Os valores de diferença de expressão das células silenciadas com siRNA1 e siRNA2 em relação ao controle NTC foram visualizados no mapa de calor apresentado na Figura 25. Observou-se uma diminuição da expressão de vários genes envolvidos no processo autofágico, principalmente na fase de iniciação e sequestro de

proteínas, onde a diminuição da expressão dos genes foi mais significativa (azul). Além disso, pode-se observar que há uma diferença na expressão dos genes relacionados à autofagia entre o siRNA1 e 2, sugerindo que a taxa de silenciamento LOXL3 pode influenciar na regulação dessa via.

Figura 25. Análise de genes envolvidos no processo de autofagia. O mapa de calor foi preparado a partir dos valores de expressão (RPKM) a partir dos dados de sequenciamento do transcriptoma normalizados por *z-score*. Cada linha representa a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com o processo de autofagia nas células silenciadas com siRNA1 e siRNA2 em relação ao controle.

Além da análise de enriquecimento, foi realizada análises de genes relacionados com os processos alterados observados nos ensaios funcionais. Visto que, o silenciamento de LOXL3 promoveu um aumento da fluorescência do marcador mitocondrial, e do número de cópias do DNA mitocondrial, foram analisados genes relacionados com o processo de replicação do DNA mitocondrial (Gustafsson et al. 2016, Kazak et al. 2012, Sage and

Knight 2013) (Figura 26). Observou-se que genes relacionados com a maquinaria de iniciação da transcrição e principalmente genes relacionados com a maquinaria de replicação apresentaram um aumento na expressão em relação ao controle (NTC).

Figura 26. Análise de genes envolvidos no processo de replicação do mtDNA. O mapa de calor foi preparado a partir dos valores de expressão (RPKM) a partir dos dados de sequenciamento do transcriptoma normalizados por *z-score*. Cada linha representa a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com o processo de replicação do mtDNA nas células silenciadas com siRNA1 e siRNA2 em relação ao controle.

Além do aumento da fluorescência do MitoTracker, observou-se que após o silenciamento *LOXL3*, as mitocôndrias apresentavam alterações na rede mitocondrial, portanto foram avaliados os genes relacionados com as vias de fusão e fissão mitocondrial, processo que altera a morfologia e distribuição das mitocôndrias (Wai and Langer 2016) (Figura 27). Genes envolvidos no processo de fissão apresentaram uma diminuição em relação ao controle, enquanto que alguns genes envolvidos nos processos de fusão mitocondrial apresentaram um aumento na expressão nas células silenciadas.

Figura 27. Análise de genes envolvidos nos processos de fusão e fissão mitocondrial. O mapa de calor foi preparado a partir dos valores de expressão (RPKM) a partir dos dados de sequenciamento do transcriptoma normalizados por *z-score*. Cada linha representa a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com o processo de fusão e fissão mitocondrial nas células silenciadas com siRNA1 e siRNA2 em relação ao controle.

Para confirmar os resultados obtidos nos ensaios de apoptose, foram avaliados os genes relacionados com os processos de apoptose das vias extrínseca e intrínseca (Ichim and Tait 2016). Genes que codificam para alguns receptores e caspases envolvidos na via extrínseca da apoptose como apresentaram um aumento da expressão na células silenciada com siRNA1. Genes relacionados com a permeabilidade da membrana externa mitocondrial também foram identificados hiperexpressos em relação ao controle (NTC), bem como proteínas envolvidas no efluxo mitocondrial.

Figura 28. Análise de genes envolvidos na via de apoptose. O mapa de calor foi preparado a partir dos valores (RPKM) a partir dos dados de sequenciamento do transcriptoma normalizados por *z-score*. Cada linha representa a alteração da expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com o processo de apoptose nas células silenciadas com siRNA1 e siRNA2 em relação ao controle.

6 DISCUSSÃO

Recentemente, LOXL3 tem sido fortemente associado à tumorigênese e na progressão do tumor em diversos tipos de câncer. No câncer gástrico, LOXL3 foi correlacionado com o processo de invasão e metástase (Kasashima et al. 2018). Em melanoma, LOXL3 foi associado à transformação maligna de melanócitos, e promovendo a estabilidade genômica do tumor (Santamaria et al. 2018).

Em astrocitomas, sua expressão está relacionada à crescente malignidade do tumor. A expressão de *LOXL3* aumentou proporcionalmente ao grau de tumor dos astrocitomas, sendo sua maior expressão em GBM (Soares et al. em preparação). Estes resultados foram validados *in silico* com dados do TCGA de expressão de *LOXL3* em astrocitomas de diferentes graus de malignidade. Além disso, a expressão de *LOXL3* foi maior no subtipo molecular mesenquimal de GBM, o subtipo que apresenta pior prognóstico.

Para melhor compreender o papel de LOXL3 em astrocitomas, foi realizado o silenciamento transitório com duas sequências de siRNA. O silenciamento a nível proteico foi de cerca de 40% para ambos, embora em nível de expressão gênica o silenciamento foi maior, de aproximadamente 85% e 51% para o siRNA 1 e siRNA2, respectivamente. Embora o nível de silenciamento tenha sido abaixo de 50%, foi possível detectar os efeitos causados pela diminuição da expressão de LOXL3. Para algumas linhagens celulares, como de melanoma primário e metastático, o efeito do silenciamento de *LOXL3* por meio de shRNA foi deletério (Santamaria et al. 2018). É possível que células com nível de silenciamento maior tenham sofrido morte celular. Por esta razão, foi possível avaliar os efeitos da diminuição de expressão de LOXL3 nas células U87MG.

A expressão de LOXL3 na linhagem celular U87MG foi relacionada com a viabilidade celular. As células silenciadas para o LOXL3 apresentaram uma diminuição da viabilidade celular em relação ao NTC de 36% e 26,2% para siRNA1 e siRNA2, respectivamente. Um estudo anterior descreveu que LOXL3 promoveu a estabilização de SNAIL, um fator de transcrição, que forma um complexo com HDAC1 e 2, e leva ao aumento de expressão de marcadores de proliferação, como ciclina D1 e AJUBA (Peinado et al. 2005a). Além disso, LOXL3 promoveu a estabilidade do DNA, através da interação com proteínas envolvidas na manutenção da integridade genômica e/ou mitose, como BRCA2, RAD51, SMC1A, MSH2, SMC3 e NUMA, levando a conclusão da mitose, e consequentemente a progressão tumoral em melanoma (Santamaria et al. 2018). Contrariamente, células com silenciamento de LOXL3 apresentaram acetilação constitutiva STAT3 e aumento da expressão de genes codificadores de proteínas envolvidas no ciclo celular e pluripotência. Novas atividades

enzimáticas de LOXL3 em termos de remoção de grupos acetil e acetilamino de STAT3 também foram relatadas. LOXL3 colocaliza com STAT3 no núcleo, e exerce suas atividades catalíticas duplas e interrompe a dimerização de STAT3. Consequentemente, a atividade de transcrição de STAT3 é interrompida, restringindo a proliferação e diferenciação celular (Ma et al. 2017).

Nos resultados apresentados neste trabalho, o silenciamento de LOXL3 na linhagem de GBM U87MG não causou alteração no ciclo celular.

Em modelo de melanoma, o silenciamento de LOXL3 promoveu resposta ao dano ao DNA deficiente em células de melanoma, com acúmulo de quebras de cadeia dupla, mitose aberrante com acúmulo de células na fase G2/M e apoptose (Santamaria et al. 2018). Corroborando com os dados em melanoma, o silenciamento de LOXL3 em células U87MG levou a um aumento na taxa de apoptose. As células foram avaliadas sem e com tratamento de TMZ, um quimioterápico padrão utilizado para tratamento de GBM. As células silenciadas para LOXL3 através do siRNA1 apresentaram 13,4% ($p < 0,05$) e 32,8% ($p < 0,001$) de morte inicial em relação ao controle (NTC) sem e com tratamento de TMZ, respectivamente. Análises do transcriptoma confirmaram que genes envolvidos no processo de apoptose, tanto da via extrínseca quanto da intrínseca, estavam com a expressão aumentada nas células silenciadas. Genes que codificam para receptores como TRAIL, FAS e FAD, além de caspases, apresentaram aumento da expressão em relação ao controle (NTC). Já na via intrínseca da apoptose, genes relacionados com a permeabilidade da membrana externa mitocondrial, como *BID*, *BAD*, *NOXA* (*PMAIP1*) e *BAK1*, além de proteínas envolvidas no efluxo mitocondrial, como Citocromo C (*CYCS*) também apresentaram um aumento na sua expressão em relação ao controle (NTC), corroborando com os resultados obtidos a partir dos ensaios funcionais.

Quanto à localização, originalmente, LOXL3 foi descrito no espaço extracelular, devido sua atividade de amino oxidase (Lee J. E. and Kim 2006, Mäki and Kivirikko 2001), e no citoplasma, na região perinuclear, interagindo com SNAIL (Peinado et al. 2005a). Estudos mais recentes descreveram LOXL3 na MEC na junção miotendínea (Kraft-Sheleg et al. 2016), na região perinuclear em linhagem de melanoma (Santamaria et al. 2018), e na região intranuclear, atuando com remoção de grupos acetil de STAT3 (Ma et al. 2017), e interagindo com hTERT (Zhou L. et al. 2013). LOXL3 também foi descrito no citoplasma e núcleo em câncer gástrico (Kasashima et al. 2018). Os ensaios de imunofluorescência no modelo de células tumorais U87MG demonstraram LOXL3 na região perinuclear e nuclear. Além disto, foi observado que LOXL3 colocalizou com mitocôndrias. Interessantemente, não há nenhum

trabalho que descreveu este resultado. LOXL3 também apresentou comarcação com o DAPI, marcador de núcleo, corroborando resultados descritos em células de melanoma (Santamaria et al. 2018) e de câncer gástrico (Kasashima et al. 2018). Observou-se que LOXL3 colocalizou com as mitocôndrias e com o núcleo em 89,1% e 56,0%, respectivamente. Células U87MG com silenciamento de LOXL3 apresentaram uma diminuição na colocalização com mitocôndrias de 10% em relação ao controle. A colocalização com núcleo também diminuiu nas células silenciadas. Esta diminuição em parte reflete a diminuição de expressão de LOXL3.

A análise de intensidade de fluorescência das marcações de LOXL3 e de mitocôndrias mostrou que as células silenciadas para o LOXL3 apresentaram uma diminuição da fluorescência de LOXL3 em relação ao controle, confirmando os dados de análise proteica por Western blot. Entretanto, foi observado que houve um aumento de na fluorescência de mitocôndrias nestas células com menor expressão de LOXL3 em relação ao controle. Análise do número de cópias de mtDNA das células silenciadas revelou um aumento do número de cópias de mtDNA. O aumento da fluorescência do marcador MitoTracker, juntamente com o aumento do número de cópias de mtDNA sugere um aumento do número de mitocôndrias.

Além do aumento da fluorescência de marcador mitocondrial, foi observada uma alteração na rede mitocondrial após o silenciamento de LOXL3. As mitocôndrias apresentaram uma morfologia mais reticulada e tubular em relação ao controle. Corroborando com os dados, foi visto que alguns genes envolvidos no processo de fissão mitocondrial apresentaram uma diminuição da expressão em relação ao controle (NTC), como o gene *DNM1L* que codifica para proteína DRP1, importante na fissão mitocondrial, foi identificado hipoexpresso nas células silenciadas em relação ao controle (NTC). Adicionalmente alguns genes envolvidos nos processos de fusão mitocondrial, como *MFN2*, *OPA*, *STOML2* e *PLD6*, apresentaram um aumento na expressão nas células silenciadas, sugerindo LOXL3 pode estar envolvido na dinâmica de fusão e fissão mitocondrial.

O número cópias de mtDNA foi associado com a malignidade dos astrocitomas. O número de cópias diminui de acordo com o grau de malignidade, sendo o GBM o grau com maior depleção de mtDNA (Correia et al. 2011). No entanto, no processo de diferenciação celular, a frequência de formação do tumor foi inversamente relacionada à depleção de mtDNA em células tronco de GBM implantadas em camundongos (Dickinson et al. 2013). Ainda, em gliomas o DNA mitocondrial foi relacionado com o bom prognóstico. Pacientes com altos níveis de números de cópias de mtDNA apresentaram melhor sobrevida (Zhang Y. et al. 2015b), corroborando com os dados de correlação de *LOXL3* com mtDNA, que

mostraram uma correlação inversamente proporcional, ou seja, a hipoexpressão de *LOXL3* foi associada ao aumento do mtDNA. Assim, estes dados poderiam explicar os resultados de influência de *LOXL3* na sobrevida dos pacientes com GBM, ou seja, casos com menor expressão de *LOXL3* apresentaram melhor prognóstico. Adicionalmente, os resultados de aumento do número de cópias de mtDNA nas células U87MG silenciadas para expressão de *LOXL3* com siRNA reforçam esta hipótese. Análises de transcriptoma mostraram que, genes relacionados os processos da maquinaria de iniciação de transcrição e replicação apresentaram um aumento da expressão nas células silenciadas em relação ao controle (NTC).

Os dados de expressão gênica das células silenciadas para *LOXL3* gerados pelo RNA-seq, foram analisados em relação ao controle (NTC). As vias hipoexpressas alteradas mais enriquecidas foram as vias de interação neuroativo ligante-receptor e autofagia para o siRNA1. Para as hiperexpressas, as vias mais enriquecidas foram as envolvidas com resposta imune, como interação citocina-receptor. Já para o siRNA2, as vias hipoexpressas mais enriquecidas estão envolvidas com interação ligante-receptor neuroativo e as vias de junção célula-célula. Para vias hiperexpressas, regulação de citoesqueleto de actina estava alterada. Devido ao grande envolvimento das mitocôndrias com o processo autofágico, uma análise mais detalhada dos genes envolvidos da via de autofagia foi realizada (Rambold and Lippincott-Schwartz 2011). Foram analisados genes envolvidos nos processos gerais de autofagia, como iniciação, formação do fagóforo, sequestro de proteínas, e formação do autofagossomo (Dikic and Elazar 2018). Grande parte dos genes apresentaram hipoexpressão, em relação ao controle. A relação de *LOXL3* com o processo autofágico foi descrito apenas em modelo de osteoartrite, em que *LOXL3*, regulado positivamente, promove a inibição da autofagia (Huang et al. 2016).

O papel da autofagia nos tumores pode ser de oncossupressor ou oncogênico. Devido às suas funções de controle qualidade, autofagia inibe a transformação maligna. Porém, uma vez que a transformação tenha ocorrido, a autofagia pode dar suporte ao tumor (Galluzzi et al. 2015). A autofagia é o principal mecanismo usado pelas células para manter a homeostase de nutrientes e controle de qualidade das organelas (Levine and Kroemer 2019). Atualmente, a inibição da autofagia ou de algumas fases da autofagia tem sido alvo para tratamentos de diversos tipos de câncer. A hidroxicloroquina, um inibidor de autofagia, que promove o acúmulo de autofagossomo na célula, levou a morte celular em linhagens de células de câncer renal, câncer de mama, e câncer pancreático, sendo administrado sozinho ou em combinação com quimioterápicos. Em gliomas, o uso de hidroxicloroquina está sendo avaliado em fase pré-clínica (Levy et al. 2017, Rosenfeld et al. 2014).

A via especializada de autofagia no controle de qualidade das mitocôndrias é denominada mitofagia. A mitofagia possui um papel importante na degradação e biogênese das mitocôndrias (Vara-Perez et al. 2019). Assim como autofagia, a mitofagia também possui papéis dicotômicos: a mitofagia anormal leva a tumorigênese e, após a formação do tumor, promove a sobrevivência das células tumorais (Chang et al. 2017). Em alguns tumores, como leucemia mielóide, a indução da mitofagia, neste caso, denominada como mitofagia letal, leva a um aumento da apoptose e sensibilidade a quimioterápicos, devido a um aumento excessivo de depuração das mitocôndrias, com ausência da biogênese (Dany et al. 2016). No entanto, o papel da inibição da mitofagia tem sido largamente descrito (Yan and Li 2018). O silenciamento de *BNIP3L*, um regulador de mitofagia, aumentou a sensibilidade a doxorrubicina, um agente que promove uma disfunção mitocondrial em células tronco de câncer colorretal (Yan et al. 2017). Além disso, novos inibidores de mitofagia têm surgido como a liensinina, um alcaloide extraído de um tipo de semente, capaz de inibir a mitofagia e promover a sensibilização a quimioterápicos clássicos como doxorrubicina, paclitaxel, vincristina em câncer de mama, através do bloqueio da fusão dos lisossomos-autofagossomo, aumentando o número de autofagossomo na célula, mecanismo similar ao hidroquinona (Zhou J. et al. 2015). A mitofagia tem sido associada com a renovação das células troncos de câncer, por manter baixos níveis de metabolismo oxidativo. Em câncer de células escamosas, a inibição da mitofagia, levou a diminuição do marcador de células tronco CD44, levando a morte a celular. Além disso, a redução da massa mitocondrial foi maior nas células tronco de câncer do que nas células tumorais estabilizadas, em modelos de câncer de pulmão, cabeça e pescoço (Smith and Macleod 2019).

Este trabalho mostrou que a diminuição da expressão de LOXL3 levou a uma menor proliferação celular em linhagem celular de GBM U87MG e uma maior apoptose. Além disso, mostrou que LOXL3 colocalizou com as mitocôndrias e com o núcleo. Adicionalmente, o silenciamento de LOXL3 promoveu o aumento de mitocôndrias e do número de cópias do mtDNA, sugerindo um aumento do número de organelas. Além disso, a expressão de LOXL3 correlacionou-se de maneira inversamente proporcional com os dados de número de cópias de mtDNA nos astrocitomas e nos tecidos normais, visto que o número de cópias é menor em GBM e a expressão maior de *LOXL3* foram fatores associados ao pior prognóstico dos pacientes. Através das análises de RNA-seq, foi observado que as células silenciadas para LOXL3 apresentaram uma diminuição da expressão de genes relacionados com o processo de autofagia. Este trabalho propõe que, LOXL3 pode estar envolvido na regulação do processo autofágico e nos processos de controle de qualidade mitocondrial. A diminuição da expressão

de LOXL3 poderia levar a uma diminuição da autofagia, com consequente aumento da replicação do mtDNA e do número de organelas como mecanismo de compensação para as mitocôndrias disfuncionais.

7 CONCLUSÕES

1. A expressão de *LOXL3* aumenta de acordo com o grau de malignidade na casuística do TCGA. Além disso, a expressão é maior no subtipo molecular mesenquimal.
2. Dentre as linhagens U87MG, U251MG, T98 e A172, a expressão de *LOXL3* é maior na linhagem U87MG, que foi escolhida para os ensaios funcionais.
3. O silenciamento de *LOXL3* por siRNA levou a diminuição da expressão a nível gênico e proteico na linhagem celular U87MG.
4. O silenciamento de *LOXL3* em células U87MG promoveu a diminuição da proliferação celular, aumento da apoptose (com e sem tratamento com TMZ), sem alterar o ciclo celular.
5. *LOXL3* colocalizou com as mitocôndrias e com o núcleo na linhagem celular U87MG e o silenciamento de sua expressão levou a uma menor colocalização, além de um aumento da fluorescência de mitocôndrias com aumento no número de cópias de DNA mitocondrial.
6. *LOXL3* correlacionou com o número de cópias de DNA mitocondrial na casuística de astrocitomas.
7. Análises do transcriptoma das células silenciadas para *LOXL3* com siRNA1, apresentaram uma diminuição os genes relacionados com o processo autofágico, fissão mitocondrial. Por outro lado, foi observado aumento de genes relacionados com a fusão mitocondrial, replicação do mtDNA, além de outros relacionados com o processo de apoptose.

8 REFERÊNCIAS

- Abramoff MD. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*;11(7):36-42
- Adler J, Parmryd I. 2010. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry A* 77:733-742.
- Alzahrani F, Al Hazzaa SA, Tayeb H, Alkuraya FS. 2015. LOXL3, encoding lysyl oxidase-like 3, is mutated in a family with autosomal recessive Stickler syndrome. *Hum Genet* 134:451-453.
- Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11:R106.
- Aumiller V, Strobel B, Romeike M, Schuler M, Stierstorfer BE, Kreuz S. 2017. Comparative analysis of lysyl oxidase (like) family members in pulmonary fibrosis. *Sci Rep* 7:149.
- Barbazan J, Muinelo-Romay L, Vieito M, Candamio S, Diaz-Lopez A, Cano A, Gomez-Tato A, de Cal MDC, Abal M, Lopez-Lopez R. 2014. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 135:2633-2643.
- Barker HE, Cox TR, Erler JT. 2012. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat Rev Cancer* 12:540-552.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394-424.
- Brennan CW, et al. 2013. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462-477.
- Chan AKY, et al. 2015. Combination genetic signature stratifies lower-grade gliomas better than histological grade. *Oncotarget* 6:20885-20901.
- Chan TK, Alkaabi MK, ElBarky AM, El-Hattab AW. 2019. LOXL3 novel mutation causing a rare form of autosomal recessive Stickler syndrome. *Clin Genet* 95:325-328.
- Chang JY, Yi HS, Kim HW, Shong M. 2017. Dysregulation of mitophagy in carcinogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1858:633-640.
- Chen L, Li S, Li W. 2018. LOX/LOXL in pulmonary fibrosis: potential therapeutic targets. *J Drug Target*:1-7.
- Collins VP, Jones DT, Giannini C. 2015. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* 129:775-788.
- Correia RL, Oba-Shinjo SM, Uno M, Huang N, Marie SK. 2011. Mitochondrial DNA depletion and its correlation with TFAM, TFB1M, TFB2M and POLG in human diffusely infiltrating astrocytomas. *Mitochondrion* 11:48-53.
- Czapski B, Baluszek S, Herold-Mende C, Kaminska B. 2018. Clinical and immunological correlates of long term survival in glioblastoma. *Contemp Oncol (Pozn)* 22:81-85.
- Dany M, et al. 2016. Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML. *Blood* 128:1944-1958.
- DeLuca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazaire MD, Williams C, Reich M, Winckler W, Getz G. 2012. RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. *Bioinformatics* 28:1530-1532.
- Dickinson A, Yeung KY, Donoghue J, Baker MJ, Kelly RD, McKenzie M, Johns TG, St. John JC. 2013. The regulation of mitochondrial DNA copy number in glioblastoma cells. *Cell Death Differ* 20:1644-1653.

- Dikic I, Elazar Z. 2018. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:349-364.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15-21.
- Dudakova L, Sasaki T, Liskova P, Palos M, Jirsova K. 2016. The presence of lysyl oxidase-like enzymes in human control and keratoconic corneas. *Histol Histopathol* 31:63-71.
- Dufresne J, et al. 2018. The plasma peptides of ovarian cancer. *Clin Proteomics* 15:41.
- Eiseler T, Köhler C, Nimmagadda SC, Jamali A, Funk N, Joodi G, Storz P, Seufferlein T. 2012. Protein Kinase D1 Mediates Anchorage-dependent and -independent Growth of Tumor Cells via the Zinc Finger Transcription Factor Snail1*. Pages 32367-32380. *J Biol Chem*, vol. 287.
- Estimativa 2018 – Incidência de câncer no Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro; Brasil: 2017, 41-42p. Disponível em:< <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>, Acessado em 30 de julho de 2019.
- Forbes SA, et al. 2015. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 43:D805-811.
- Forst DA, Nahed BV, Loeffler JS, Batchelor TT. 2014. Low-Grade Gliomas. Pages 403-413. *Oncologist*, vol. 19.
- Franco DG, Moretti IF, Marie SKN. 2018. Mitochondria Transcription Factor A: A Putative Target for the Effect of Melatonin on U87MG Malignant Glioma Cell Line. *Molecules* 23.
- Galluzzi L, et al. 2015. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *Embo j* 34:856-880.
- Galatro, Thais F, Sola, Paula, Moretti, Isabele F, Miura, Flavio K, Oba-Shinjo, Sueli M, Marie, Suely KN, & Lerario, Antonio M. (2017). Correlation between molecular features and genetic subtypes of Glioblastoma: critical analysis in 109 cases. *MedicalExpress*, 4(5), M170505. <https://dx.doi.org/10.5935/medicalexpress.2017.05.05>
- Gao J, et al. 2013. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6:pl1.
- Gessler F, Zappi J, Konczalla J, Bernstock JD, Forster MT, Wagner M, Mittelbronn M, Seifert V, Senft C. 2017. Secondary Glioblastoma: Molecular and Clinical Factors That Affect Outcome After Malignant Progression of a Lower Grade Tumor. *World Neurosurg* 102:49-55.
- Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG. 2016. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 85:133-160.
- Hartig SM. 2013. Basic image analysis and manipulation in ImageJ. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 14:Unit14.15.
- Huang ZM, Du SH, Huang LG, Li JH, Xiao L, Tong P. 2016. Leptin promotes apoptosis and inhibits autophagy of chondrocytes through upregulating lysyl oxidase-like 3 during osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 24:1246-1253.
- Ichim G, Tait SW. 2016. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer* 16:539-548.
- Insua YV, et al. 2017. Predicting Outcome and Therapy Response in mCRC Patients Using an Indirect Method for CTCs Detection by a Multigene Expression Panel: A Multicentric Prospective Validation Study. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (art. 1265).
- Jeong C, Kim Y. 2017. LOXL3-sv2, a novel variant of human lysyl oxidase-like 3 (LOXL3), functions as an amine oxidase. *International Journal of Molecular Medicine* 39:719-724.

- Jeong YJ, Park SH, Mun SH, Kwak SG, Lee SJ, Oh HK. 2018. Association between lysyl oxidase and fibrotic focus in relation with inflammation in breast cancer. *Oncol Lett* 15:2431-2440.
- Johnston KA, Lopez KM. 2018. Lysyl oxidase in cancer inhibition and metastasis. *Cancer Lett* 417:174-181.
- Jones MG, et al. 2018. Nanoscale dysregulation of collagen structure-function disrupts mechano-homeostasis and mediates pulmonary fibrosis. *Elife* 7.
- Jourdan-Le Saux C, Tomsche A, Ujfalusi A, Jia L, Csiszar K. 2001. Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein. *Genomics* 74:211-218.
- Kaminska B, Czapski B, Guzik R, Król SK, Gielniewski B. 2019. Consequences of IDH1/2 Mutations in Gliomas and an Assessment of Inhibitors Targeting Mutated IDH Proteins. *Molecules* 24.
- Kasashima H, et al. 2018. Significance of the Lysyl Oxidase Members Lysyl Oxidase Like 1, 3, and 4 in Gastric Cancer. *Digestion* 98:238-248.
- Kazak L, Reyes A, Holt IJ. 2012. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:659-671.
- Khan MFJ, Little J, Mossey PA, Steegers-Theunissen RPM, Bonsi M, Bassi Andreasi R, Rubini M. 2018. Association between a common missense variant in LOXL3 gene and the risk of non-syndromic cleft palate. *Congenit Anom (Kyoto)* 58:136-140.
- Kraft-Sheleg O, et al. 2016. Localized LoxL3-Dependent Fibronectin Oxidation Regulates Myofiber Stretch and Integrin-Mediated Adhesion. *Dev Cell* 36:550-561.
- Lee CY. 2017. Strategies of temozolomide in future glioblastoma treatment. *Onco Targets Ther* 10:265-270.
- Lee JE, Kim Y. 2006. A tissue-specific variant of the human lysyl oxidase-like protein 3 (LOXL3) functions as an amine oxidase with substrate specificity. *J Biol Chem* 281:37282-37290.
- Levine B, Kroemer G. 2019. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* 176:11-42.
- Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. 2017. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 17:528-542.
- Li B, Dewey CN. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12:323.
- Li H, et al. 2019. HERC3-Mediated SMAD7 Ubiquitination Degradation Promotes Autophagy-Induced EMT and Chemoresistance in Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 25:3602-3616.
- Li J, Gao B, Xiao X, Li S, Jia X, Sun W, Guo X, Zhang Q. 2016. Exome sequencing identified null mutations in LOXL3 associated with early-onset high myopia. *Mol Vis* 22:161-167.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Pages 97-109. *Acta Neuropathol*, vol. 114.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803-820.
- Ma L, et al. 2017. Lysyl Oxidase 3 Is a Dual-Specificity Enzyme Involved in STAT3 Deacetylation and Deacetylimination Modulation. *Molecular Cell* 65:296-309.

- Marie SK, et al. 2008. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. *Int J Cancer* 122:807-815.
- Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, van Noorden CJF. 2018. Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses. *Oncogene* 37:1949-1960.
- Mäki JM, Kivirikko KI. 2001. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem J* 355:381-387.
- Nave AH, et al. 2014. Lysyl oxidases play a causal role in vascular remodeling in clinical and experimental pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1446-1458.
- Nishioka T, Eustace A, West C. 2012. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. *Cell Struct Funct* 37:75-80.
- Olar A, et al. 2015. IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II–III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 129:585-596.
- Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. 2018. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015. *Neuro Oncol* 20:iv1-iv86.
- Parsons DW, et al. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807-1812.
- Peinado H, Del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KS, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F. 2005a. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *Embo j* 24:3446-3458.
- Peinado H, del Carmen Iglesias-de la Cruz M, Olmeda D, Csiszar K, Fong KSK, Vega S, Nieto MA, Cano A, Portillo F. 2005b. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. Pages 3446-3458. *EMBO J*, vol. 24.
- Philp CJ, Siebeke I, Clements D, Miller S, Habgood A, John AE, Navaratnam V, Hubbard RB, Jenkins G, Johnson SR. 2018. Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 58:594-603.
- Picca A, Berzero G, Sanson M. 2018. Current therapeutic approaches to diffuse grade II and III gliomas. *Ther Adv Neurol Disord* 11:1756285617752039.
- Rambold AS, Lippincott-Schwartz J. 2011. Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle* 10:4032-4038.
- Remus EW, O'Donnell RE, Jr., Rafferty K, Weiss D, Joseph G, Csiszar K, Fong SF, Taylor WR. 2012. The role of lysyl oxidase family members in the stabilization of abdominal aortic aneurysms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303:H1067-1075.
- Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47.
- Rosenfeld MR, et al. 2014. A phase I/II trial of hydroxychloroquine in conjunction with radiation therapy and concurrent and adjuvant temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Autophagy* 10:1359-1368.
- Sage JM, Knight KL. 2013. Human Rad51 Promotes Mitochondrial DNA Synthesis Under Conditions of Increased Replication Stress. *Mitochondrion* 13:350-356.
- Santamaria PG, et al. 2018. Lysyl oxidase-like 3 is required for melanoma cell survival by maintaining genomic stability. *Cell Death Differ* 25:935-950.
- Sato T, et al. 2006. Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 54:808-817.

- Schütze F, Röhrig F, Vorlová S, Gätzner S, Kuhn A, Ergün S, Henke E. 2015. Inhibition of Lysyl Oxidases Improves Drug Diffusion and Increases Efficacy of Cytotoxic Treatment in 3D Tumor Models. *Scientific Reports* 5:17576.
- Sebban S, Davidson B, Reich R. 2009. Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. *Virchows Archiv* 454:71-79.
- Sethi A, Mao W, Wordinger RJ, Clark AF. 2011. Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:5240-5250.
- Sidaway P. 2017. CNS cancer: Glioblastoma subtypes revisited. *Nat Rev Clin Oncol* 14:587.
- Smith AG, Macleod KF. 2019. Autophagy, cancer stem cells and drug resistance. *J Pathol* 247:708-718.
- Soares R.S., Laurentino, T.S., Marie, S. K. N. & Oba-Shinjo, S. M. Lysyl oxidase family expression in human astrocytomas (em preparação).
- Tadmor T, Bejar J, Attias D, Mischenko E, Sabo E, Neufeld G, Vadasz Z. 2013. The expression of lysyl-oxidase gene family members in myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 88:355-358.
- Trackman PC. 2016. Lysyl Oxidase Isoforms and Potential Therapeutic Opportunities for Fibrosis and Cancer. *Expert Opin Ther Targets* 20:935-945.
- Uzel MI, Scott IC, Babakhanlou-Chase H, Palamakumbura AH, Pappano WN, Hong HH, Greenspan DS, Trackman PC. 2001. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J Biol Chem* 276:22537-22543.
- van Boxtel AL, Gansner JM, Hakvoort HW, Snell H, Legler J, Gitlin JD. 2011. Lysyl oxidase-like 3b is critical for cartilage maturation during zebrafish craniofacial development. *Matrix Biol* 30:178-187.
- Vara-Perez M, Felipe-Abrio B, Agostinis P. 2019. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation. *Cells* 8.
- Verhaak RG, et al. 2010. An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell* 17:98.
- Wagner GP, Kin K, Lynch VJ. 2012. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci* 131:281-285.
- Wai T, Langer T. 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab* 27:105-117.
- Wang Q, et al. 2017. Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32:42-56.e46.
- Weller M, et al. 2015. Glioma. *Nat Rev Dis Primers* 1:15017.
- Yan C, Li TS. 2018. Dual Role of Mitophagy in Cancer Drug Resistance. *Anticancer Res* 38:617-621.
- Yan C, Luo L, Guo CY, Goto S, Urata Y, Shao JH, Li TS. 2017. Doxorubicin-induced mitophagy contributes to drug resistance in cancer stem cells from HCT8 human colorectal cancer cells. *Cancer Lett* 388:34-42.
- Yang J, et al. 2016. Targeting LOXL2 for cardiac interstitial fibrosis and heart failure treatment. *Nat Commun* 7:13710.
- Yu Q, Horak K, Larson DF. 2006. Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling. *Hypertension* 48:98-104.

- Yu Q, Vazquez R, Zabadi S, Watson RR, Larson DF. 2010. T-lymphocytes mediate left ventricular fibrillar collagen cross-linking and diastolic dysfunction in mice. *Matrix Biol* 29:511-518.
- Zhang J, Liu Z, Zhang T, Lin Z, Li Z, Zhang A, Sun X, Gao J. 2016. Loss of Lysyl Oxidase-like 3 Attenuates Embryonic Lung Development in Mice. *Sci Rep* 6:33856.
- Zhang J, Yang R, Liu Z, Hou C, Zong W, Zhang A, Sun X, Gao J. 2015a. Loss of lysyl oxidase-like 3 causes cleft palate and spinal deformity in mice. *Hum Mol Genet* 24:6174-6185.
- Zhang Y, Qu Y, Gao K, Yang Q, Shi B, Hou P, Ji M. 2015b. High copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) predicts good prognosis in glioma patients. *Am J Cancer Res* 5:1207-1216.
- Zhou J, Li G, Zheng Y, Shen HM, Hu X, Ming QL, Huang C, Li P, Gao N. 2015. A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNM1L-mediated mitochondrial fission. *Autophagy* 11:1259-1279.
- Zhou L, Chen B, Hua X, Zhou P, Guo L, Peng Y, Qiu K. 2013. Effect of newly identified hTERT-interacting proteins on telomerase activity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 45:674-682.

9 ANEXOS

Anexo 1-Aprovação do Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/04/2016, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 109/16 intitulado: “ANÁLISE FUNCIONAL DA ENZIMA LOXL3 EM ASTROCITOMAS” apresentado pelo Departamento de NEUROLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Sueli Mieko Oba Shinjo

Pesquisador (a) Executante: Talita de Sousa Laurentino

CEP-FMUSP, 06 de Abril de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2-Manuscrito publicado

[IJMS] Manuscript ID: ijms-541770 - Accepted for Publication

Icey Wang <icey.wang@mdpi.com>

Seg, 15/07/2019 06:26

Para: Talita Laurentino <talitalaurentino@usp.br>

Cc: Roseli da S. Soares <roselis@usp.br>; Suely K. N. Marie <sknmarie@usp.br>; Sueli M. Oba-Shinjo <suelimoba@usp.br>; IJMS Editorial Office <ijms@mdpi.com>; Icey Wang <icey.wang@mdpi.com>

Dear Dr. Laurentino,

We are pleased to inform you that the following paper has been officially accepted for publication:

Manuscript ID: ijms-541770

Type of manuscript: Review

Title: LOXL3 function beyond amino oxidase and role in pathologies, including cancer

Authors: Talita de S. Laurentino *, Roseli da S. Soares, Suely K. N. Marie, Sueli M. Oba-Shinjo

Received: 19 June 2019

E-mails: talitalaurentino@usp.br, roselis@usp.br, sknmarie@usp.br, suelimoba@usp.br

Submitted to section: Molecular Oncology,

https://www.mdpi.com/journal/ijms/sections/molecular_oncology

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/e2561b4a7e5581008ed4a6261c932020

We will now make the final preparations for publication, then return the manuscript to you for your approval.

If, however, extensive English edits are required to your manuscript, we will need to return the paper requesting improvements throughout.

We encourage you to set up your profile at SciProfiles.com, MDPI's researcher network platform. Articles you publish with MDPI will be linked to your SciProfiles page, where colleagues and peers will be able to see all of your publications, citations, as well as your other academic contributions.

We also invite you to contribute to Encyclopedia (<https://encyclopedia.pub>), a scholarly platform providing accurate information about the latest research results. You can adapt parts of your paper to provide valuable reference information for others in the field.

Kind regards,
Ms. Icey Wang
Assistant Editor
E-Mail: icey.wang@mdpi.com

MDPI
IJMS Editorial Office
St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel,
Postfach, CH-4020 Basel,
Switzerland

Review

LOXL3 Function Beyond Amino Oxidase and Role in Pathologies, Including Cancer

Talita de S. Laurentino *, Roseli da S. Soares, Suely K. N. Marie and Sueli M. Oba-Shinjo

Laboratory of Molecular and Cellular Biology (LIM 15), Department of Neurology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP 01246-903, Brazil; roselis@usp.br (R.d.S.S.); sknmarie@usp.br (S.K.N.M.), suelimoba@usp.br (S.M.O.-S.)

* Correspondence: talitalaurentino@usp.br; Tel.: +55-11-3061-8310

Received: 19 June 2019; Accepted: 15 July 2019; Published: 17 July 2019

Abstract: Lysyl oxidase like 3 (LOXL3) is a copper-dependent amine oxidase responsible for the crosslinking of collagen and elastin in the extracellular matrix. LOXL3 belongs to a family including other members: LOX, LOXL1, LOXL2, and LOXL4. Autosomal recessive mutations are rare and described in patients with Stickler syndrome, early-onset myopia and non-syndromic cleft palate. Along with an essential function in embryonic development, multiple biological functions have been attributed to LOXL3 in various pathologies related to amino oxidase activity. Additionally, various novel roles have been described for LOXL3, such as the oxidation of fibronectin in myotendinous junction formation, and of deacetylation and deacetylimination activities of STAT3 to control of inflammatory response. In tumors, three distinct roles were described: 1) LOXL3 interacts with SNAIL and contributes to proliferation and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma cells; 2) LOXL3 is localized predominantly in the nucleus associated with invasion and poor gastric cancer prognosis; 3) LOXL3 interacts with proteins involved in DNA stability and mitosis completion, contributing to melanoma progression and sustained proliferation. Here we review the structure, function and activity of LOXL3 in normal and pathological conditions and discuss the potential of LOXL3 as a therapeutic target in various diseases.

Keywords: LOXL3; lysyl oxidase; collagen; development; disease; cancer

1. Introduction

The lysyl oxidase (LOX) family is composed of five members: LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3, and LOXL4. All members are copper-dependent amine oxidases responsible for the covalent crosslinking of soluble collagen and elastin chains into insoluble forms. They contribute to extracellular matrix (ECM) stiffness and stabilization. Although the C-terminal regions of the members of this family are conserved, the N-terminal portions are variable. Accordingly, this family is divided into two groups based on the N-terminal similarities. LOX and LOXL1 have N-terminals with pro-sequences, which confer their secretion as inactive pro-enzymes, whereas LOXL2, LOXL3, and LOXL4 contain scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains, as previously reviewed [1–3]. The structural similarities and differences among all LOX family members are presented in Figure 1. The amino acid sequence similarity is higher between LOXL3 and LOXL2 with 69% homology, whereas between LOXL3 and the other members, LOX, LOXL1, and LOXL4 homology is around 50% [4,5].

LOXL3 is the member of the LOX family on which fewer studies have been conducted. Initially, LOXL3 activity as an amino oxidase was based on the homology with the other members of the family. Recently, more studies about LOXL3 have been published, and a variety of new roles have

been attributed to LOXL3. Here, we review the structure, function, and activity of LOXL3 development and various pathologies.

Figure 1. Schematic diagrams of lysyl oxidase family members. The C-terminal is conserved among all five members, and contains the catalytic portion with copper-binding domain, lysyl-tyrosyl quinone (LTQ) residues, and cytokine receptor-like (CRL) domain. On the other hand, the N-terminal is variable: LOX and LOXL1 has propeptide sequences, while LOXL2, LOXL3, and LOXL4 have four scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains. LOX, LOXL1, and LOXL3 have putative sites for BMP-1 cleavage.

2. LOXL3: Gene and Protein Structure

Human *LOXL3* (ENSG00000115318) was identified in 2001 by three independent groups, through human EST (expressed sequence tag) database searches of sequence similarities to gene coding for other LOX members [5] or homology to mouse *Lor2* [6]. The isolated cDNA predicted a protein with similar domains of previously identified *LOX*, *LOXL1*, and *LOXL2*.

LOXL3 is mapped to chromosome 2p13.3, presenting 23,462 nucleotides, 14 exons, and the full-length cDNA with 3,121 bp (Figure 2a). The 5'-flanking region of *LOXL3* in exon 1, corresponding to the promoter region, has no typical TATA or CAAT boxes, but presents potential transcription factor binding sites for STAT3, STAT6, SRF MIBP/RFX1, SP1, NF1, NRSF, CRE binding protein 1, PAX6 paired domain, IRF-related protein, GATA binding factor 1, NF- κ B, GAGA box, c-Rel sites, and AP-2 [7].

The open reading frame of the longest full-length transcript variant encodes a 753 amino acid protein with a molecular mass of 80.3 kDa. The C-terminal portion comprises the catalytic domain; it has a copper-binding motif, lysyl-tyrosyl-quinone (LTQ) cofactor residues, required for protein conformation and catalytic activity, and a cytokine receptor-like (CRL) domain [5,6,8]. This catalytic region is conserved in other LOX-like proteins, particularly the regions coded by exons 10, 11, and 12. The N-terminal region of *LOXL3*, corresponding to the exons 2 to 9, contains four SRCR domains, and a putative extracellular signal peptide cleavage site, between residues 25 and 26 (Figure 2) [5]. Based on its predicted structure, *LOXL3* can be secreted and processed in the extracellular space by bone morphogenetic protein 1 (BMP-1) at a cleavage site GDD (between residues 446–448) [6], in a similar process to that *LOX* and *LOXL1* (Figure 1) [9]. The cleaved product has a predicted size of 35 kDa, with 306 amino acids [1,6,10].

Additionally, *LOXL3* can be glycosylated. *LOXL3* presents three putative sites for O-glycosylation (Ser-26, Ser-28 and Ser-30) just after the signal peptide sequence cleavage site, which are not found in other LOX-like members, and five sites for N-glycosylation along the protein (Figure 2b) [5]. Therefore, glycosylation of any of these sites can explain the discrepancy in the observed secreted protein size. In fact, recombinant *LOXL3* was recovered in concentrated medium from fibrosarcoma cells (HT-1080), with a size of 97 kDa, a larger molecular weight than expected probably due to glycosylation [5].

Additionally, LOXL3 can also be translocated to the nucleus due to a bipartite nuclear localization signal (residues 293-311), composed of two clusters of basic amino acids [5]. Additionally, there is a putative nuclear exporting signal in the N-terminal region which overlaps with the signal peptide [11].

Additionally, two isoforms of *LOXL3*, termed *LOXL3-sv1* and *LOXL3-sv2*, were identified during the search for *LOXL3* homologues in the human EST database [7,12]. *LOXL3-sv1* is the shortest transcript and lacks exons 1, 2, 3, and 5. In addition, the 5'-flanking region of exon 4 contains additional 80 bp as an alternative promoter, and the 3'-end flanking region of exon 14 contains an additional sequence of 561 bp. In contrast to the full-length *LOXL3*, the *LOXL3-sv1* promoter has a TATA box, and potential binding sites for different transcription factors as for p53, GATA-binding factor 3, STAT5, Pit1, Ras-responsive element binding protein 1, Neurogenin 1 and 3, AP-1, PAX 2/5/8, YY1, and NUDR. Translation of this variant starts at exon 6 and encodes a predicted polypeptide of 392 amino acids with 44 kDa of molecular weight. Despite lacking the first three SRCR domains, *LOXL3-sv1* conserves the C-terminal and the amino oxidase activity. Similar to *LOXL3*, *LOXL3-sv1* might also be a target for BMP-1 and has two putative N-glycosylation sites (Figure 2) [7]. *LOXL3-sv2* variant, described more recently, contains 12 exons and lacks the sequences corresponding to exons 4 and 5 of *LOXL3*, without alteration of the open-reading frame. The missing sequences in this alternative splicing encode for SRCR domain 2. The *LOXL3-sv2* transcript variant encodes a 608 amino acid protein with a calculated molecular mass of 67.4 kDa, with putative O-glycosylation and N-glycosylation sites and as BMP-1 cleavage site, as shown in Figure 2 [12]. Although this variant maintains the SRCR3 domain, the bipartite nuclear localization sequence is lost.

Figure 2. *LOXL3* mRNA and protein variants. **(a)** Schematic diagrams of the intron-exon structure of the three transcript variants of human *LOXL3*, with exons represented by boxes, and intron as bold line. The longest full-length transcript of *LOXL3* has 14 exons, with a 5'UTR (gray box) and 3'UTR (hatched blue box). The transcript *LOXL3-sv1* lacks exons 1, 2, 3, and 5, and has different 5'UTR and 3'UTR regions (dashed boxes). The transcript variant *LOXL3-sv2* differs from the full-length transcript by lacking exons 4 and 5. The orange color represents the exons that code for the N-terminal region, the yellow color represents the region that codes for the signal peptide sequence, and blue color represents the exons that code for the C-terminal region. Green dots represent the start translation codon location. **(b)** Schematic diagrams of *LOXL3* protein variant structures, with signal

peptide and scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domains in the N-terminal region, and catalytic domain (blue) in the C-terminal region. Red diamonds indicate the putative O-glycosylation sites; red arrows indicate bipartite nuclear localization signal. All protein variants has a common catalytic domain with cooper binding region, lysyl-tyrosyl quinone (LTQ) residue, and cytokine receptor-like (CRL) domain.

3. Localization

3.1. Tissue-Specific Expression of LOXL3

Northern blot analysis of *LOXL3* was performed in various normal human tissues, and the band of approximately 3.1–3.2 kb, consistent with the length of the *LOXL3* cDNA sequence, was identified as *LOXL3* mRNA [5,6]. The highest expression levels of *LOXL3* transcript were detected in the heart, spleen, uterus, medulla, spinal cord, and ovary [5,6]. An analysis of *LOXL3* expression levels in a database of normal RNA-human tissues from a large cohort of Genotype-Tissue Expression (GTEx) using the GTEx Browser (<http://www.gtexportal.org/home/>) was performed and is presented in Figure 3 [13–15]. *LOXL3* expression is high in the heart, spleen, and uterus as previously observed by Northern blot analyses. Additionally, *LOXL3* expression is high in the lung, aorta, and coronary arteries (Figure 3), and it has also been described in corneal layers, corneal trabecular meshwork, ocular limbus, and conjunctiva [16].

High *LOXL3-sv1* expressions were detected in the liver, pancreas, spleen, and thymus [7]. High *LOXL3-sv2* expressions were observed in the spleen, testis, ovary, placenta and small intestine [12]. The meaning of these differential expressions of *LOXL3* transcript variants in normal tissues still needs to be elucidated.

Figure 3. *LOXL3* expression analysis in 51 normal tissues. Gene expression was determined by Genotype-Tissue Expression RNA-Seq database using GTEx Browser (<http://www.gtexportal.org/home/>), Analysis Release V7. Expression values are shown in transcripts per million (TPM). Violin plots are represented by median and 25th and 75th percentiles. Outliers represented by points are above or below 1.5 times the interquartile range.

3.2. Subcellular Localization

Originally, the cellular localization of LOXL3 was described in cytoplasm and extracellular space, as protein secreted into the culture medium by fibrosarcoma cells (HT-1080 cells) [5]. Other studies have shown that LOXL3 was also secreted by cardiomyocytes, and played a role in collagen

crosslinking of the ECM [7]. Surprisingly, LOXL3 oxidative effect on the ECM fibronectin of the myotendinous junction has also been described in a mouse model [17]. In the cytoplasm, LOXL3 was observed at perinuclear localization in HeLa cells overexpressing LOXL3, in melanoma cells, and in Madin–Darby canine kidney cells [18,19]. Intracellular LOXL3 has also been reported in HeLa cells and in mouse spleen cells. In addition, concomitant cytoplasm and nuclear localization was described in gastric cancer [20]. Interestingly, LOXL3 nuclear localization was further confirmed by the demonstration of its interaction with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) through yeast two-hybrid and immunoprecipitation assays [21]. The cellular distribution of LOXL3 variants still needs to be completed, as the localization of the LOXL3-sv1 isoform in cytoplasm and extracellular space has been reported only in one study [7]. No studies were found concerning LOXL3-sv2 localization.

3.3. Amine Oxidase Activity of LOXL3

LOXL3 has a putative cleavage sequence site at the fourth SRCR domain (Figure 2b) for BMP-1 [6]. This process occurs in the extracellular space, and generates a catalytically active amino oxidase with a predicted molecular mass of 35 kDa of the C-terminal. However, the cleaved protein from colon tissue by Western blot analysis presented a molecular mass of 40 kDa, possibly due to post-translational modification such as glycosylation. In amine oxidase assay, either LOXL3 or variants showed amine oxidase activity toward different types of collagen (types I, II, III, IV, VI, VIII and X), as well as toward elastin [7] (Figure 4). LOXL3 presents higher activity toward collagen VIII, and LOXL3-sv1 to collagen I, IV, and X [7]. LOXL3-sv2 also showed amine oxidase activity toward collagen type I [12]. LOXL3 amino oxidase activity was inhibited by β -aminopropionitrile (β -APN), a potent and irreversible inhibitor of amino oxidase, which inhibits the formation of crosslinks in vivo [7,12].

Figure 4. LOXL3 amine oxidase activity. (a) LOXL3 protein is synthesized and secreted to extracellular space. (b) LOXL3, cleaved by BMP-1 has the C-terminal separated from the N-terminal domain. (c) The C-terminal region has the amine oxidase activity and promotes the collagen and elastin crosslinking. LOXL3 showed higher specificity to collagen type I, IV, VIII, and X. (d) The N-terminal portion can be translocated to the nucleus. Created with BioRender.

4. LOXL3 Roles in Development and Diseases

4.1. LOXL3 in Craniofacial-Ocular System

The importance and involvement of LOXL3 in development was first suggested in a zebrafish model, in which the lack of *Loxl3b*, the orthologue of mammalian LOXL3, caused craniofacial defects [22]. These findings were confirmed in *Loxl3*-deficient mice (*Loxl3*^{-/-}), which exhibited severe craniofacial defects (cleft palate and shortened mandible) and spinal cord deformities, with a decrease of collagen crosslinks, and early lethality (Figure 5a) [23]. Additionally, *Loxl3*^{-/-} homozygous mice corresponded to less than 10% of weaned mice, confirming the importance of *Loxl3* in embryo viability [11,17].

Interestingly, the features of *Loxl3* deficient mouse models overlap with a human collagenopathy, called Stickler syndrome, an autosomal dominant disease caused most frequently by *COL2A1* and *COL11A1* mutations, characterized by high myopia and cleft palate. However, more recently, a homozygous missense variant in *LOXL3* (c.2027G>A, p.Cys676Tyr) was identified in a family with two affected siblings, presenting micrognathia, cleft palate, and severe myopia [24]. No mutations in collagen genes were detected in either sibling. Additionally, a family with SS phenotype was reported as harboring a homozygous novel *LOXL3* mutation (c.1036C>T, p.Arg346Trp), in which two affected members, the father and a child, presented myopia and retinopathy [25]. Moreover, a missense variant of *LOXL3* (c.1843A>T, p.Ile615Phe) was associated with non-syndromic cleft palate, due to lack of catalytic activity of LOXL3 enzyme, with impaired collagen fiber assembly in palatal mesenchyme. Additionally, individuals presenting the Phe/Phe genotype presented a higher risk of non-syndromic cleft palate [26]. LOXL3, like the other members of lysyl oxidases, was also observed in all layers of corneas, as well as in the limbus and conjunctiva. Early-onset severe myopia was associated with homozygous null mutation on *LOXL3* (c.39dup, p.Leu14Alafs*21) and heterozygous combination of this mutation with another frameshift mutation (c.594delG, p.Gln199Lysfs*35) [27]. Gene localization of the five *LOXL3* mutations associated with diseases is presented in Figure 5b.

In keratoconus, a disease characterized by irregular astigmatism resulting in significant visual impairment, LOXL3 expression is downregulated, as well as LOXL2 and LOXL4 expression, suggesting that LOX members may be involved in keratoconus pathogenesis (Figure 5c) [16]. Moreover, the LOX family members, including LOXL3, might also play a role in glaucoma. Lysyl oxidases expression and activity are induced by TGF-β1, TGF-β2, and TGF-β3 via Smad, and non-Smad (JNK and AP-1) signaling pathways in trabecular meshwork aminopropionitrilcells [28]. As TGF-β2 levels are elevated in the aqueous humor and trabecular meshwork cells, lysyl oxidases activity can enhance ECM deposition and trabecular meshwork stiffness, contributing to increased ocular hypertension (Figure 5c) [28].

4.2. LOXL3 in Pulmonary and Cardiovascular Systems

Loxl3^{-/-} mice also presented immature lung development, with reduced thoracic cavities and pulmonary hypoplasia (Figure 5a) [29]. Additionally, LOXL3 has been involved in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a chronic disease characterized by uncontrolled and excessive accumulation of ECM and consequent severe lung dysfunction (Figure 5d). Upregulated LOXL3 expression was detected in IPF tissue compared to control lung tissue [30], more specifically in the cilia bronchial epithelium [31,32]. Increased LOXL3 amino oxidase activity promoting enhanced collagen crosslink may contribute to lung tissue stiffness. The abnormal ECM stimulates fibroblast growth, which in turn may aggravate lung fibrosis [33]. In fact, upregulated lysyl oxidases, including LOXL3, were observed in normal human lung fibroblasts in response to various growth factors (TGF-β, FGF, and PDGF) and hypoxia. These pro-fibrotic stimuli induced fibroblasts-to-myofibroblasts transition (FMT), corroborating the important contribution of LOXL3 in fibrotic lung disease [31]. Nonetheless, inhibition of LOXL3, LOX or other LOX-like proteins has not been efficient for the treatment of IPF.

Another involvement of LOXL3 in pulmonary disease was described in idiopathic pulmonary arterial hypertension. All lysyl oxidases expression levels were elevated in the lungs of those patients, but only LOXL2 and LOXL3 expression was elevated in vascular lesions (Figure 5d) [34].

In abdominal aortic aneurysm, LOXL3 was described as upregulated in the aortic wall of an animal model of vascular sclerotic lesion induced by high fat diet and vasoconstrictor treatment. Also, the use of LOX family inhibitor β -APN resulted in an increase of lesions, suggesting the critical role of LOXL3 in the integrity of the vascular wall [35].

In systemic hypertension, high LOXL3 expression was observed in cardiac fibroblasts and cardiomyocytes, leading to increased fibrillary collagen crosslinking, and cardiac ECM remodeling, which caused ventricular stiffness and cardiac diastolic dysfunction. Interestingly, such LOXL3 response to hypertension was strongly influenced by TH1 lymphocytes, suggesting a differential LOXL3 induction according to immune background (Figure 5e) [36,37].

4.3. LOXL3 in Myotendinous and Osteoarticular System

Another function of LOXL3 during development was described in myotendinous junction formation. In mouse development, *Loxl3* is expressed in the myotendinous region, and directly oxidizes fibronectin, a ligand of integrin. This interaction activates the integrin signaling pathway, with paxillin phosphorylation, which ensures the correct regulation of ECM scaffold organization and anchoring of myofibers to the muscle-tendon junction (Figure 5f) [17].

LOXL3 involvement was also described in osteoarthritis (Figure 5g). *LOXL3* was one of the genes upregulated in an affected cartilage microarray study of osteoarthritis [38]. In another study, Huang et al. confirmed this finding and found LOX3 in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, which positively correlated with leptin levels [39]. A rat model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection further confirmed the higher expression of *Loxl3* in affected cartilage. Upregulation of *Loxl3* with leptin treatment of primary chondrocytes from affected rat knees with increased apoptosis and concomitant suppression of autophagy corroborated LOXL3 involvement in osteoarthritis and point to it as a potential therapeutic target in this disease [39].

4.4. LOXL3 and Immune System

Novel enzymatic activities of LOXL3 in terms of removal of acetyl and acetylamino groups of STAT3 were also reported [11]. These new LOXL3 deacetylation and deacetylimination roles were attributed to the conserved 1–3 SRCR domains of the N-terminal portion of the protein. LOXL3 colocalizes with STAT3 in the nuclei, exerts its dual catalytic activities, and disrupts STAT3 dimerization. Consequently, STAT3 transcription activity is interrupted, restricting cell proliferation and differentiation. Cells with LOXL3 knockdown presented STAT3 constitutive acetylation and increased expression of gene coding for proteins involved in the cell cycle and pluripotency. A physiologic role of LOXL3 in immune regulation was demonstrated by observing that Stat3 is constitutively acetylated in *Loxl3* knockout mice, with consequent reduced CD4⁺ T cell differentiation to Th17 and Treg (Figure 5h). Therefore, *Loxl3* negatively regulated inflammatory Th17 and Treg differentiation, thus contributing to the control of inflammatory responses [11].

Figure 5. Role of LOXL3 in development and diseases. **(a)** Development: *Loxl3*-deficient mouse model demonstrated the critical role of LOXL3 in spinal cord, craniofacial and pulmonary development. **(b)** Mutations: LOXL3 is mutated in early-onset myopia, Stickler syndrome, and non-syndromic cleft palate patients. **(c)** Ocular system: LOXL3 is downregulated in keratoconus disease and upregulated in trabecular meshwork cells. **(d)** Pulmonary system: LOXL3 expression and activity are upregulated by different growth factors and hypoxia by idiopathic pulmonary hypertension lung fibroblasts. This contributes to high collagen expression and crosslinking and to trans-differentiation of fibroblasts to myoblasts, named fibroblast-to-myofibroblast transition (FMT), suggesting an important role of LOXL3 in lung fibrosis. Additionally, LOXL3 is upregulated in lung vascular lesions of patients with pulmonary arterial hypertension. **(e)** Cardiovascular system: LOXL3 is upregulated in cardiac ECM remodeling in systemic hypertension and in abdominal aortic aneurism. Additionally, cardiac fibroblasts and cardiomyocytes, influenced by T helper lymphocytes, express high levels of LOXL3 resulting in collagen crosslinking. **(f)** Myotendinous system: LOXL3 hydroxylates fibronectin, which activates intracellular integrin signaling, and correct adhesion of myofibers to muscle-tendon junction during development. **(g)** Osteoarticular system: LOXL3 and leptin are upregulated in osteoarthritis cartilage, as well as in synovial fluid of osteoarthritis patients. Osteoarthritis cartilage-derived chondrocytes express high levels of LOXL3 when stimulated by leptin, resulting in induction of autophagy and inhibition of apoptosis. **(h)** Immune system: LOXL3 deacetylates STAT3 and disrupts STAT3 dimerization, inhibiting its transcriptional activity. Consequently, CD4⁺ T cells do not differentiate to Th17 and Treg, suggesting a physiologic role of LOXL3 in immune regulation. Created with BioRender.

4.5. LOXL3 and Cancer

LOXL3 plays a role in the repression of E-cadherin gene (*CDH1*) expression through physical interaction with SNAIL (Figure 6a), a transcription factor involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. LOXL3 interaction with SNAIL in the perinuclear envelope cooperates to downregulate *CDH1* expression, thus suggesting LOXL3 involvement in tumor progression and metastasis [18]. Furthermore, SNAIL is regulated by protein kinase D1 (PKD1) through phosphorylation at Ser11, and PKD1 promotes the upregulation of LOXL3 and its interaction with SNAIL (Figure 6a). SNAIL phosphorylation at Ser11 results to the binding to histone deacetylases 1 and 2 (HDAC1 and 2), as well as to LOXL3. The complex formed by Snail phosphorylated and HDAC1 and 2 is stabilized in the nucleus, and promotes upregulation of proliferation markers, such as cyclin D1 and AJUBA (Figure 6a) [40]. In melanoma, LOXL3 is involved in tumorigenesis and tumor progression. The upregulation of LOXL3 was associated with the oncogenic BRAF pathway in melanocyte transformation [19]. Additionally, LOXL3 upregulation in melanoma was correlated with LOXL3 promoter hypomethylation. LOXL3 silencing promoted DNA damage response in melanoma cells, with accumulation of double-strand breaks, aberrant mitosis with accumulation of

cells in the G2/M phase, and apoptosis. LOXL3 binds to different proteins involved in the maintenance of genome integrity and/or mitosis, such as BRCA2, RAD51, SMC1A, MSH2, SMC3, and NUMA1.

These data support a pro-oncogenic role of LOXL3 in genomic stability and mitotic completion in melanocyte transformation and melanoma survival and progression [19].

Figure 6. Role of LOXL3 in tumor. (a) Tumor progression and metastasis: LOXL3 physically interacts with SNAIL in perinuclear region, preventing the SNAIL degradation and nuclear export. SNAIL represses the *CDH1* (E-cadherin gene) transcription, which induces epithelial-mesenchymal transition (EMT). Protein kinase D1 (PKD1) phosphorylates SNAIL and upregulates LOXL3 expression. The phosphorylation at Ser11 increases the interaction of SNAIL and LOXL3, as well as of SNAIL and HDAC1 and 2. SNAIL and HDACs complex is stabilized in the nucleus and promotes upregulation of proliferation markers, such as *AJUBA* and *CCND1* (cyclin D1 gene). (b) Genomic stability and sustained proliferation: LOXL3 interacts with proteins involved in genomic integrity, as BRCA2, SMC1A, NUMA1, RAD51, and MSH2, with consequent DNA repair and evasion of apoptosis. Additionally, interaction of LOXL3 with BRCA2, SMC1A and NUMA1 is important to mitotic completion, which contributes to melanocyte transformation. (c) Invasion and metastasis: LOXL3 expression is downstream from TGF- β signaling pathway in gastric cancer. LOXL3 is essentially localized in the nucleus and the expression correlates with prognosis of patients. Created with BioRender.

In a large cohort of 597 primary gastric carcinoma cases, Kasashima et al. evaluated the expression of LOXL1, LOXL2, and LOXL3 by immunohistochemistry [20]. LOXL3 expression was detected mainly in the nucleus. Positive protein expressions of all three members of LOX family were correlated with tumor invasion, lymph node metastasis, and poorer prognosis of patients [20]. Moreover, TGF- β induced LOXL3 upregulation in gastric cancer cells, suggesting that LOXL3 was downstream from the TGF- β signaling pathway (Figure 6c) [20].

LOXL3 expression was detected in breast cancer, both in primary and pleural effusion [41]. In a recent study, LOX, LOXL1, LOXL2, and LOXL3 expressions were evaluated by immunohistochemistry in 291 cases of breast cancer. LOXL3 expression was positive in only 13.4%

of cases and correlated with intratumoral and peritumoral inflammation, as well as with expression of estrogen and progesterone receptors and molecular subtypes [42].

LOXL3 expression was also detected in various kinds of tumors, such as myeloproliferative neoplasms [43] and ovarian carcinoma (primary tumor, metastasis, and peritoneum and pleura effusions) [41]. LOXL3 peptide was detected in the plasma of ovarian cancer patients [44]. Furthermore, LOXL3 expression has been detected in circulating tumor cells of colorectal cancer, and its expression has been correlated with treatment response and prognosis [45,46].

5. Concluding Remarks

Recent studies on LOXL3 have uncovered novel and diversified roles beyond its canonical function as amino oxidase. Interestingly, LOXL3 plays roles in embryonic development and in the pathogenesis of several diseases, including collagenopathies, fibrosis, and cancer, which highlights LOXL3 as a potential target for therapy. Currently, non-selective pan inhibitor of the LOX family, β -APN, is available. The structural similarities among LOX family members and lack of precise knowledge about their crystal structures make the development of a specific-LOX-member inhibitor a challenge. Nonetheless, a recent report of an LOXL2/LOXL3 dual inhibitor paves the way to obtaining a specific LOXL3 inhibitor for therapeutic purposes [47,48]. A specific LOXL3 inhibitor could be used for the treatment of diverse pathologies. This revision of the most recent works on LOXL3 may motivate and speed up to achievement of this goal.

Author Contributions: Conceptualization, T.d.S.L., S.K.N.M., and S.M.O.-S.; data curation, T.d.S.L., R.d.S.S., and S.M.O.-S.; supervision, S.K.N.M. and S.M.O.-S.; writing—original draft, T.d.S.L.; writing—review & editing, T.d.S.L., R.d.S.S., S.K.N.M., and S.M.O.-S.

Funding: This research was funded by Sao Paulo Research Foundation (FAPESP), grant 2016/05777-1, Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Fundação Faculdade de Medicina (FFM), and Faculdade de Medicina da USP (FMUSP).

Acknowledgments: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

AJUBA	Ajuba LIM protein
AP-1	Activating protein-1
AP-2	Activating protein-2
BMP-1	Bone morphogenetic protein 1
BRAF	B-Raf proto-oncogene
BRCA2	Breast cancer 2
CAAT	CCAAT sequence
CCND1	Cyclin D1 gene
CDH1	Cadherin-1 gene
COL2A1	Collagen type II alpha 1 chain gene
COL11A1	Collagen type XI alpha 1 chain gene
CRE	cAMP response element
c-Rel	Proto-oncogene c-Rel
CRL	Cytokine receptor-like
ECM	Extracellular matrix
FGF	Fibroblast growth factor 1
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EST	Expressed sequence tag
FMT	Fibroblast-to-myofibroblast transition
GAGA	GAGA sequence
GATA	GATA sequence
GTE _x	Genotype Tissue Expression
HDAC	Histone deacetylase

hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
IPF	Idiopathic pulmonary fibrosis
IRF	Interferon regulatory factors
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LOX	Lysyl oxidase
LOXL1	Lysyl oxidase-like 1
LOXL2	Lysyl oxidase-like 2
LOXL3	Lysyl oxidase-like 3
LOXL4	Lysyl oxidase-like 4
LTQ	Lysyl tyrosyl quinone
MIBP	Muscle integrin binding protein
MSH2	MutS homolog 2
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NRSF	Neural restrictive silencer factor
NUDR	Nuclear DEAF-1-related
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1
PAX	Paired box
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKD1	Protein kinase D1
Pit1	Pituitary transcript factor 1
RAD51	DNA repair protein RAD51 homolog 1
RFX1	Regulatory factor X1
SRCR	Scavenger receptor cysteine-rich
SNAIL	Snail homolog 1
SMC1A	Structural maintenance of chromosomes 1A
SMC3	Structural maintenance of chromosomes 3
SRF	Serum response element
SS	Stickler Syndrome
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TATA	TATAAA sequence
TGF	Transforming growth factor
TPM	Transcripts per million
UTR	Untranslated region
YY1	Yin yang 1
β -APN	β -aminopropionitrile

References

1. Barker, H.E.; Cox, T.R.; Erler, J.T. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 540–552.
2. Nishioka, T.; Eustace, A.; West, C. Lysyl oxidase: from basic science to future cancer treatment. *Cell Struct. Funct.* **2012**, *37*, 75–80.
3. Mayorca-Guiliani, A.; Erler, J.T. The potential for targeting extracellular LOX proteins in human malignancy. *Onco Targets*. **2013**, *6*, 1729–1735.
4. Asuncion, L.; Fogelgren, B.; Fong, K.S.K.; Fong, S.F.T.; Kim, Y.; Csiszar, K. A novel human lysyl oxidase-like gene (LOXL4) on chromosome 10q24 has an altered scavenger receptor cysteine rich domain. *Matrix Biol.* **2001**, *20*, 487–491.
5. Mäki, J.M.; Kivirikko, K.I. Cloning and characterization of a fourth human lysyl oxidase isoenzyme. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 381–387.
6. Jourdan-Le, C.S.; Tomsche, A.; Ujfalusi, A.; Jia, L.; Csiszar, K. Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein. *Genom* **2001**, *74*, 211–218.
7. Lee, J.E.; Kim, Y. A tissue-specific variant of the human lysyl oxidase-like protein 3 (LOXL3) functions as an amine oxidase with substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37282–37290.
8. Huang, Y.; Dai, J.; Tang, R.; Zhao, W.; Zhou, Z.; Wang, W.; Ying, K.; Xie, Y.; Mao, Y. Cloning and

- characterization of a human lysyl oxidase-like 3 gene (hLOXL3). *Matrix Biol.* **2001**, *20*, 153–157.
9. Uzel, M.I.; Scott, I.C.; Babakhanlou-Chase, H.; Palamakumbura, A.H.; Pappano, W.N.; Hong, H.H.; Greenspan, D.S.; Trackman, P.C. Multiple bone morphogenetic protein 1-related mammalian metalloproteinases process pro-lysyl oxidase at the correct physiological site and control lysyl oxidase activation in mouse embryo fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22537–22543.
 10. Panchenko, M.V.; Stetler-Stevenson, W.G.; Trubetskoy, O.V.; Gacheru, S.N.; Kagan, H.M. Metalloproteinase activity secreted by fibrogenic cells in the processing of prolysyl oxidase. Potential role of procollagen C-proteinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7113–7119.
 11. Ma, L.; Huang, C.; Wang, X.J.; Xin, D.E.; Wang, L.S.; Zou, Q.C.; Zhang, Y.S.; Tan, M.D.; Wang, Y.M.; Zhao, T.C.; et al. Lysyl Oxidase 3 Is a Dual-Specificity Enzyme Involved in STAT3 Deacetylation and Deacetylimination Modulation. *Mol. Cell* **2017**, *65*, 296–309.
 12. Jeong, C.; Kim, Y. LOXL3-sv2, a novel variant of human lysyl oxidase-like 3 (LOXL3), functions as an amine oxidase. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 719–724.
 13. Consortium, G. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 580–585.
 14. Mele, M.; Ferreira, P.G.; Reverter, F.; DeLuca, D.S.; Monlong, J.; Sammeth, M.; Young, T.R.; Goldmann, J.M.; Pervouchine, D.D.; Sullivan, T.J.; et al. The human transcriptome across tissues and individuals. *Sci.* **2015**, *348*, 660–665.
 15. Battle, A.; Brown, C.D.; Engelhardt, B.E.; Montgomery, S.B. Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nat.* **2017**, *550*, 204–213.
 16. Dudakova, L.; Sasaki, T.; Liskova, P.; Palos, M.; Jirsova, K. The presence of lysyl oxidase-like enzymes in human control and keratoconic corneas. *Histol. Histopathol.* **2016**, *31*, 63–71.
 17. Kraft-Sheleg, O.; Zaffryar-Eilot, S.; Genin, O.; Yaseen, W.; Soueid-Baumgarten, S.; Kessler, O.; Smolkin, T.; Akiri, G.; Neufeld, G.; Cinnamon, Y.; et al. Localized LoxL3-Dependent Fibronectin Oxidation Regulates Myofiber Stretch and Integrin-Mediated Adhesion. *Dev. Cell* **2016**, *36*, 550–561.
 18. Peinado, H.; del Carmen Iglesias-de la Cruz, M.; Olmeda, D.; Csiszar, K.; Fong, K.S.; Vega, S.; Nieto, M.A.; Cano, A.; Portillo, F. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* **2005**, *24*, 3446–3458.
 19. Santamaria, P.G.; Floristan, A.; Fontanals-Cirera, B.; Vazquez-Naharro, A.; Santos, V.; Morales, S.; Yuste, L.; Peinado, H.; Garcia-Gomez, A.; Portillo, F.; et al. Lysyl oxidase-like 3 is required for melanoma cell survival by maintaining genomic stability. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 935–950.
 20. Kasashima, H.; Yashiro, M.; Okuno, T.; Miki, Y.; Kitayama, K.; Masuda, G.; Kinoshita, H.; Morisaki, T.; Fukuoka, T.; Hasegawa, T.; et al. Significance of the Lysyl Oxidase Members Lysyl Oxidase Like 1, 3, and 4 in Gastric Cancer. *Digestion* **2018**, *98*, 238–248.
 21. Zhou, L.; Chen, B.; Hua, X.; Zhou, P.; Guo, L.; Peng, Y.; Qiu, K. Effect of newly identified hTERT-interacting proteins on telomerase activity. *Acta. Biochim. Biophys. Sin.* **2013**, *45*, 674–682.
 22. Van Boxel, A.L.; Gansner, J.M.; Hakvoort, H.W.; Snell, H.; Legler, J.; Gitlin, J.D. Lysyl oxidase-like 3b is critical for cartilage maturation during zebrafish craniofacial development. *Matrix Biol.* **2011**, *30*, 178–187.
 23. Zhang, J.; Yang, R.; Liu, Z.; Hou, C.; Zong, W.; Zhang, A.; Sun, X.; Gao, J. Loss of lysyl oxidase-like 3 causes cleft palate and spinal deformity in mice. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 6174–6185.
 24. Alzahrani, F.; Al Hazzaa, S.A.; Tayeb, H.; Alkuraya, F.S. LOXL3, encoding lysyl oxidase-like 3, is mutated in a family with autosomal recessive Stickler syndrome. *Hum. Genet.* **2015**, *134*, 451–453.
 25. Chan, T.K.; Alkaabi, M.K.; ElBarky, A.M.; El-Hattab, A.W. LOXL3 novel mutation causing a rare form of autosomal recessive Stickler syndrome. *Clin. Genet.* **2019**, *95*, 325–328.
 26. Khan, M.F.J.; Little, J.; Mossey, P.A.; Steegers-Theunissen, R.P.M.; Bonsi, M.; Bassi Andreasi, R.; Rubini, M. Association between a common missense variant in LOXL3 gene and the risk of non-syndromic cleft palate. *Congenit. Anom.* **2018**, *58*, 136–140.
 27. Li, J.; Gao, B.; Xiao, X.; Li, S.; Jia, X.; Sun, W.; Guo, X.; Zhang, Q. Exome sequencing identified null mutations in LOXL3 associated with early-onset high myopia. *Mol. Vis.* **2016**, *22*, 161–167.
 28. Sethi, A.; Mao, W.; Wordinger, R.J.; Clark, A.F. Transforming growth factor-beta induces extracellular matrix protein cross-linking lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2011**, *52*, 5240–5250.
 29. Zhang, J.; Liu, Z.; Zhang, T.; Lin, Z.; Li, Z.; Zhang, A.; Sun, X.; Gao, J. Loss of Lysyl Oxidase-like 3 Attenuates Embryonic Lung Development in Mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33856.
 30. Jones, M.G.; Andriotis, O.G.; Roberts, J.J.; Lunn, K.; Tear, V.J.; Cao, L.; Ask, K.; Smart, D.E.; Bonfanti, A.;

- Johnson, P.; et al. Nanoscale dysregulation of collagen structure-function disrupts mechano-homeostasis and mediates pulmonary fibrosis. *Elife* **2018**, *7*, e36354.
31. Aumiller, V.; Strobel, B.; Romeike, M.; Schuler, M.; Stierstorfer, B.E.; Kreuz, S. Comparative analysis of lysyl oxidase (like) family members in pulmonary fibrosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 149.
 32. Chen, L.; Li, S.; Li, W. LOX/LOXL in pulmonary fibrosis: potential therapeutic targets. *J. Drug Target* **2019**, *27*, 790–796.
 33. Philp, C.J.; Siebeke, I.; Clements, D.; Miller, S.; Habgood, A.; John, A.E.; Navaratnam, V.; Hubbard, R.B.; Jenkins, G.; Johnson, S.R. Extracellular Matrix Cross-Linking Enhances Fibroblast Growth and Protects against Matrix Proteolysis in Lung Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2018**, *58*, 594–603.
 34. Nave, A.H.; Mizikova, I.; Niess, G.; Steenbock, H.; Reichenberger, F.; Talavera, M.L.; Veit, F.; Herold, S.; Mayer, K.; Vadasz, I.; et al. Lysyl oxidases play a causal role in vascular remodeling in clinical and experimental pulmonary arterial hypertension. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 1446–1458.
 35. Remus, E.W.; O'Donnell, R.E.; Jr.; Rafferty, K.; Weiss, D.; Joseph, G.; Csiszar, K.; Fong, S.F.; Taylor, W.R. The role of lysyl oxidase family members in the stabilization of abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2012**, *303*, 1067–1075.
 36. Yu, Q.; Horak, K.; Larson, D.F. Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling. *Hypertens.* **2006**, *48*, 98–104.
 37. Yu, Q.; Vazquez, R.; Zabadi, S.; Watson, R.R.; Larson, D.F. T-lymphocytes mediate left ventricular fibrillar collagen cross-linking and diastolic dysfunction in mice. *Matrix Biol.* **2010**, *29*, 511–518.
 38. Sato, T.; Konomi, K.; Yamasaki, S.; Aratani, S.; Tsuchimochi, K.; Yokouchi, M.; Masuko-Hongo, K.; Yagishita, N.; Nakamura, H.; Komiya, S.; et al. Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* **2006**, *54*, 808–817.
 39. Huang, Z.M.; Du, S.H.; Huang, L.G.; Li, J.H.; Xiao, L.; Tong, P. Leptin promotes apoptosis and inhibits autophagy of chondrocytes through upregulating lysyl oxidase-like 3 during osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 1246–1253.
 40. Eiseler, T.; Köhler, C.; Nimmagadda, S.C.; Jamali, A.; Funk, N.; Joodi, G.; Storz, P.; Seufferlein, T. Protein kinase D1 mediates anchorage-dependent and -independent growth of tumor cells via the zinc finger transcription factor Snail1. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 32367–32380.
 41. Sebban, S.; Davidson, B.; Reich, R. Lysyl oxidase-like 4 is alternatively spliced in an anatomic site-specific manner in tumors involving the serosal cavities. *Virchows Arch.* **2009**, *454*, 71–79.
 42. Jeong, Y.J.; Park, S.H.; Mun, S.H.; Kwak, S.G.; Lee, S.J.; Oh, H.K. Association between lysyl oxidase and fibrotic focus in relation with inflammation in breast cancer. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 2431–2440.
 43. Tadmor, T.; Bejar, J.; Attias, D.; Mischenko, E.; Sabo, E.; Neufeld, G.; Vadasz, Z. The expression of lysyl-oxidase gene family members in myeloproliferative neoplasms. *Am. J. Hematol.* **2013**, *88*, 355–358.
 44. Dufresne, J.; Bowden, P.; Thavarajah, T.; Florentinus-Mefailoski, A.; Chen, Z.Z.; Tucholska, M.; Norzin, T.; Ho, M.T.; Phan, M.; Mohamed, N.; et al. The plasma peptides of ovarian cancer. *Clin. Proteom.* **2018**, *15*, 41.
 45. Barbazan, J.; Muinelo-Romay, L.; Vieito, M.; Candamio, S.; Diaz-Lopez, A.; Cano, A.; Gomez-Tato, A.; de Cal, M.D.C.; Abal, M.; Lopez-Lopez, R.A. A multimarker panel for circulating tumor cells detection predicts patient outcome and therapy response in metastatic colorectal cancer. *Int. J. Cancer* **2014**, *135*, 2633–2643.
 46. Insua, Y.V.; de la Camara, J.; Vazquez, E.B.; Fernandez, A.; Rivera, F.V.; Silva, M.J.V.; Barbazan, J.; Muinelo-Romay, L.; Folgar, S.C.; Abalo, A.; et al. Predicting Outcome and Therapy Response in mCRC Patients Using an Indirect Method for CTCs Detection by a Multigene Expression Panel: A Multicentric Prospective Validation Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, E1265.
 47. Hajdu, I.; Kardos, J.; Major, B.; Fabo, G.; Lorincz, Z.; Cseh, S.; Dorman, G. Inhibition of the LOX enzyme family members with old and new ligands. Selectivity analysis revisited. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3113–3118.
 48. Schilter, H.; Findlay, A.D.; Perryman, L.; Yow, T.T.; Moses, J.; Zahoor, A.; Turner, C.I.; Deodhar, M.; Foot, J.S.; Zhou, W.; Greco, A.; et al. The lysyl oxidase like 2/3 enzymatic inhibitor, PXS-5153A, reduces crosslinks and ameliorates fibrosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 1759–1770.