LUIZA HELENA MADIA LOURENÇO

**Interface entre glicosilação pós-traducional e estresse
de retículo em melanomas: alvo para sensibilização
de células tumorais a agentes quimioterápicos?**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

**São Paulo
2013**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me dar força para seguir em frente e, principalmente, pelas pessoas indispensáveis que colocou em minha vida.

Aos meus pais, Cláudio e Rosângela, pelo amor e apoio irrestritos e incondicionais e pelos grandes exemplos de vida que representam para mim.

Ao meu namorado, Saulo, pelo apoio em todos os momentos.

Às minhas eternas amigas de Brasília, Ana Luiza, Amanda, Mariana, Renata e Mari, por estarem comigo independente da distância.

Em especial, a Renata e Andréia, que além da querida amizade, proporcionaram indiscutível apoio científico para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus novos amigos, Camila MM, Silvina, Carol, Rafa, Luciana, Sofia, Tharci, Flávia, Cris, Tuty, Pri, Karina, Lú Pesca, Lú Moraes, Rodrigo, Ronny, que foram indispensáveis nessa etapa da minha vida e que tanto me ajudaram no laboratório.

Aos funcionários e integrantes do LIM24 e do CTO, pelo dedicado trabalho sem o qual seria impossível o desenvolvimento de nossas pesquisas.

Ao meu orientador Roger Chammas, pela oportunidade e pelo imenso aprendizado.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Abstract

1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1.Melanoma.....	1
1.2.N-glicosilação.....	8
1.3.Superexpressão de MGAT5.....	14
1.4.“Unfolded Protein Response” (UPR).....	15
1.5.Hipótese.....	18
2.JUSTIFICATIVA.....	20
3.OBJETIVOS.....	21
3.1.Objetivo Geral.....	21
3.2.Objetivos específicos.....	21
4.MATERIAS E MÉTODOS.....	22
4.1.Cultivo de células.....	22
4.2.Tratamento com tunicamicina, cisplatina e swainsonina.....	22
4.3.Análise de expressão proteica por Western Blot.....	23
4.4.Avaliação de morte e ciclo celular.....	26
4.5.Análise de expressão gênica de MGAT5A e MGAT5B.....	27
4.6.Avaliação da ligação de L-PHA por citometria de fluxo.....	29
4.7.Transfecção com siRNA para MGAT5A.....	29
4.8.Análise estatística.....	30
5.RESULTADOS.....	31
5.1.As linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 apresentam maior expressão de Mgat5A em comparação à linhagem não-tumorigênica melan-a.....	31
5.2.As linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 apresentam mais produto de MGAT5 que melan-a.....	32
5.3.O tratamento com tunicamicina induz morte e UPR nas linhagens estudadas.....	33
5.4.As linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 são mais resistentes ao tratamento com cisplatina em comparação a linhagem não-tumorigênica melan-a.....	36
5.5.O tratamento com tunicamicina sensibilizou apenas as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 ao tratamento com cisplatina.....	37
5.6.O tratamento com swainsonina não leva a morte e não ativa UPR nas linhagens estudadas.....	40
5.7.O tratamento com swainsonina não sensibiliza as linhagens estudadas ao tratamento com cisplatina.....	43
5.8.Tentaivas de padronização da transfecção de siRNA contra Mgat5A.....	44
5.9.Expressão de MGAT5A após tratamento com tunicamicina.....	45
6.DISSCUSSÃO.....	47
7.CONCLUSÕES.....	55
8.PRÓXIMAS ETAPAS.....	56
9.REFERÊNCIAS.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF4: do inglês, *activating transcription factor 4*

ATF6: do inglês, *activating transcription factor 6*

Bcl-2: do inglês, *B-cell lymphoma 2*

BRAF: do inglês, *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

BSA: albumina sérica bovina

CDK4: do inglês, *cyclin-dependent kinase 4*

CDKN2A: do inglês, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CHOP: do inglês, *CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein*

CTLA-4: do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

EDNRB: do inglês, *endothelin receptor type B*

EDTA: do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*

eIF2 α : do inglês, *eukaryotic translation initiation factor 2A*

ERAD: do inglês, *endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*

FDA: do inglês, *Food and Drugs Administration*

GADD34: do inglês, *growth arrest and DNA-damage-inducible 34*

GADD153: do inglês, *growth arrest and DNA-damage-inducible 153*

GlcNAc: *N*-acetilglicosamina

GRP78: do inglês, *glucose-regulated protein, 78kDa*

IRE1 α : do inglês, *endoplasmic reticulum (ER) to nucleus signalling 1*

JNK: do inglês, *JUN N-terminal kinase*

L-PHA: do inglês, *leucco-phytohaemagglutinin*

MAPK: do inglês, *mitogen activated kinase-like protein*

MGAT: *N*-acetilglucosaminiltransferases

MITF: do inglês, *microphthalmia-associated transcription factor*

NF- κ B: do inglês, *nuclear factor- κ B*

NRAS: do inglês, *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*

PBS: do inglês, *Phosphate buffered saline*

PERK: do inglês, *pancreatic eIF-2alpha kinase*

PI: do inglês, *propidium iodide*

PMA: acetato forbol miristato

qPCR: PCR quantitativa (tempo real)

RE: retículo endoplasmático

ROS: espécies reativas de oxigênio

SOD-2: superóxido dismutase

UGGT: do inglês, *UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1*

UPR: do inglês, *Unfolded Protein Response*

UVA: radiação ultravioleta A

UVB: radiação ultravioleta B

UVR: radiação ultravioleta

XBP1: do inglês, *X-box binding protein 1*

RESUMO

Lourenço LHM. *Interface entre glicosilação pós-traducional e estresse de retículo em melanomas: alvo para sensibilização de células tumorais a agentes quimioterápicos?* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais letal, apesar de ser o menos incidente. Em virtude de sua alta letalidade e de sua crescente incidência, estudos sobre melanoma são de fundamental importância nos dias de hoje. Assim como células tumorais em geral, células de melanoma apresentam características metabólicas diferenciadas, como, por exemplo, altos níveis de espécies reativas de oxigênio e alta taxa de síntese proteica. Essas modificações no metabolismo dispararam vias de resposta a estresse, como a “Unfolded Protein Response” (UPR), contudo, essas células se adaptam a esse estresse constante, que não culmina com a morte das mesmas. Além disso, o padrão de glicosilação em células tumorais também é sabidamente alterado, entre outros motivos, pela expressão diferencial de enzimas da via de glicosilação, como a *N*-acetilglicosaminiltransferase 5 (MGAT5). Relacionando essas duas características de células de melanoma, propusemo-nos a avaliar se a alta expressão de MGAT5A (e/ou MGAT5B) funcionaria como uma resposta adaptativa de células de melanoma ao estresse de retículo endoplasmático, e seria, portanto, responsável por manter o equilíbrio diferenciado nessas células. Durante o desenvolvimento desse estudo, foi possível comprovar que a indução de estresse de retículo por meio de tratamento com tunicamicina, um inibidor da *N*-glicosilação e indutor clássico de UPR, sensibilizou as células de melanoma ao posterior tratamento com cisplatina. Contudo, o tratamento com swainsonina, um inibidor do processamento dos *N*-glicanos que ocorre no complexo de Golgi, não foi capaz nem de disparar “Unfolded Protein Response” nem de induzir morte nessas células e, talvez por esse motivo, não apresentou efeito sensibilizador frente à cisplatina. Além disso, foi observado que as linhagens tumorigênicas apresentam maior expressão de MGAT5A em comparação à linhagem não-tumorigênica melan-a. As tentativas de realização de silenciamento de MGAT5A não foram exitosas. Informações relacionando estresse de retículo e *N*-glicosilação aberrante em células tumorais ainda serão foco de estudo em nosso grupo. Com os resultados apresentados, é possível concluir que o equilíbrio diferencial dos níveis de estresse de retículo em que se encontram as linhagens tumorigênicas do nosso modelo é importante para a sobrevivência das mesmas. Além disso, é de nosso interesse avaliar a dependência de células tumorais das vias ativadas pela superexpressão de MGAT5A, caso ela realmente exista.

Descritores: 1.Melanoma 2.Resistência a medicamentos antineoplásicos 3.Glicosilação 4.Estresse do retículo endoplasmático 5.Resposta a proteínas não dobradas

ABSTRACT

Lourenço LHM. *Interface of post-translational glycosylation and ER stress in melanoma: target to cancer cell sensitization to chemotherapeutic agents?* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Melanoma is the most lethal skin cancer, despite being the least prevalent. Due to its lethality and resistance to a variety of known chemotherapeutic drugs, studies on melanoma are paramount. Tumor cells in general, and melanoma cells particularly, commonly present a disturbed metabolic rate, e.g., altered metabolism of reactive oxygen species and increased rates of protein synthesis. Altogether these perturbations trigger the Unfolded Protein Response (UPR); however, tumor cells are adapted to these conditions and are able to survive. Besides, glycosylation of tumor cells is commonly altered, due to differentiated expression rates of *N*-glycosylation enzymes, like *N*-acetylglucosaminyltransferase 5 (MGAT5). Considering these information together, we proposed that the sustained overexpression of MGAT5A (and/or MGAT5B) observed in Tm1 and Tm5 melanoma cells is part of an adaptive response to reticulum stress, maintaining an unstable equilibrium in tumor cells. In this work, we observed that the induction of endoplasmic reticulum stress caused by tunicamycin treatment, a *N*-glycosylation inhibitor and UPR inducer, sensitized melanoma cells to further cisplatin treatment. In contrast, swainsonine treatment, an inhibitor of Golgi *N*-glycan processing pathway, did not cause cell death nor UPR signaling, and this may be the reason why this treatment did not sensitize cells to cisplatin treatment. MGAT5A silencing was not successful yet. Altogether, the results above show that the unstable equilibrium under which Tm1 and Tm5 tumor cells are seems necessary for their survival. Therefore, it seems that upon malignant transformation, melanoma cells present dependence of MGAT5A expression. Its our interest exploit this melanoma model to understand the concept of oncogenic dependence for MGAT5A expression in the case of melanomas, if it exists.

Descriptors: 1.Melanoma 2.Drug resistance, neoplasm 3.Glycosylation 4.Endoplasmatic reticulum stress; 5.Unfolded protein response

1. INTRODUÇÃO

1.1. Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer de pele originado de melanócitos. Dentre os três tipos de câncer de pele, o melanoma é o menos incidente, correspondendo a menos de 10% dos casos, porém, é responsável por mais de 75% das mortes (KWONG; DAVIES, 2013). Pacientes com melanoma avançado disseminado para sítios distantes e órgãos viscerais apresentam prognóstico muito ruim, com sobrevida média de 6-9 meses e 3 anos de sobrevida para apenas 10-15% dos pacientes (BALCH *et al.*, 2009). Quando diagnosticado precocemente, é altamente curável por meio de excisão cirúrgica. Quando diagnosticado em fases avançadas, em grande parte dos casos já com metástases, a letalidade é alta em virtude da ausência de terapias eficazes. Em virtude da gravidade do prognóstico do melanoma e ausência de eficácia terapêutica, ele tem sido constante foco de pesquisas ao redor de todo o mundo.

Apesar do grande número de estudos a respeito do melanoma, ainda hoje não há um tratamento eficaz para pacientes com diagnóstico tardio. Até 2011, o melhor tratamento disponível para melanoma metastático era o quimioterápico dacarbazina, com taxa de resposta de 15 a 20% e tempo médio de sobrevida de 4,5 a 6 meses (SUN; SCHUCHTER, 2001). Em 2011, o FDA aprovou o uso de dois novos quimioterápicos: vemurafenib e ipilimumab. O vemurafenib, apesar de seu uso ser indicado apenas para pacientes com tumores V600E BRAF mutados (aproximadamente 60% dos casos), apresentou um avanço no tratamento da doença, resultando em uma média de 5,3 meses de sobrevivência livre de progressão em

comparação com 1,6 mês para o tratamento com dacarbazina (CHAPMAN *et al.*, 2011)

O tratamento com ipilimumab, um anticorpo monoclonal que reconhece a molécula CTLA-4, bloqueando a ação inibitória do mesmo e que, por fim, age como um ativador da resposta de células T contra as células tumorais, é indicado para pacientes que já receberam tratamento prévio e apresenta sobrevida média de 10 meses (HANAIZI *et al.*, 2012). Devido a rápida aquisição de resistência após o tratamento com essas novas drogas, as novas abordagens ao tratamento de melanoma metastático tendem à combinação de tratamentos (KWONG; DAVIES, 2013).

No Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, o Manual de Conduta em Oncologia (2010) recomenda o uso de dacarbazina como primeira linha de tratamento e para pacientes jovens e com doença metastática extensa, é indicado tratamento combinado de cisplatina, vimblastina e dacarbazina (HOFF *et al.*, 2010).

O melanoma se caracteriza por um tumor maligno originado de melanócitos que sofreram acúmulo de mutações causadas, por exemplo, por exposição à UVR ou por causas hereditárias (TSAO; SOBER, 1998; HAYWARD, 2003). Evidências epidemiológicas apontam a exposição a esse tipo de radiação como o maior fator de risco do melanoma, contudo, ainda se discute qual das faixas do espectro da UVR – UVB ou UVA - está diretamente relacionada à origem da malignidade (ZAIDI *et al.*, 2008).

A faixa do espectro UVA está relacionada à geração de ROS, capazes de causar danos ao material genético, lipídeos e proteínas (MENA *et al.*, 2009; TUCKER, 2009). Recentemente, foi mostrado que a exposição à radiação UVA

também é responsável por modificações epigenéticas em tumores de pele, por mecanismos ainda não completamente elucidados (CHENG *et al.*, 2012). Já a faixa da UVB é a responsável por causar danos diretos aos ácidos nucleicos, formando dímeros de pirimidina-ciclobutanos e fotoprodutos de 6-4 pirimidina-pirimidona. Essas estruturas correspondem a uma “assinatura” característica desse tipo de dano causado por exposição à UVR. Curiosamente, ela não é encontrada em genes frequentemente mutados em melanomas, como BRAF e CDKN2A (PLEASENCE *et al.*, 2010; ZAIDI *et al.*, 2008).

Seja pela exposição à UVR ou por causas hereditárias, diversos genes e vias envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação, bem como oncogenes e genes supressores de tumor, podem ser alvos dessas mutações, levando à desregulação da proliferação celular, resultando no surgimento de um melanoma. Diversos genes estão relacionados com o desenvolvimento de melanomas, como EDNRB, MITF, CDKN2A, CDK4, BRAF, NRAS e MAPK (REGAD, 2013).

Os genes mais frequentemente mutados em melanomas são BRAF, mutado em aproximadamente 60% dos casos, NRAS, em 15% e MAPK, em 32%. As mutações nesses genes causam ativação constitutiva da cascata de sinalização RAS-RAF-MAPK, que, em células normais, é ativada por estímulos externos, como fatores de crescimento. A ativação permanente dessa via em tumores desregula importantes atividades celulares, como sobrevivência, proliferação, diferenciação e mobilidade (HALUSKA *et al.*, 2006). Curiosamente, mutações em p53, gene supressor de tumor mutado em diversos tipos de câncer, são raras em melanoma. Além de mutações diretas no DNA, os microRNAs e as modificações epigenéticas

também tem sido alvo de pesquisas e parecem estar relacionados com a progressão do melanoma (BONAZZI *et al.*, 2012).

Atualmente, já se sabe que não só alterações genéticas levam à tumorigênese e à progressão tumoral. Estudos mostram a importância de células do microambiente, como fibroblastos, queratinócitos e células do sistema imune, na regulação e manutenção na geração de um microambiente pró-tumoral (KANAVY *et al.*, 2011). Essas células do microambiente parecem estar relacionadas ao descolamento de células de melanoma da membrana basal, produção de fatores de crescimento, bem como à indução de angiogênese, processos críticos para o crescimento, invasão e metástase do melanoma (BOTTI *et al.*, 2012).

Por fim, os melanócitos que passaram por essas alterações adquirem características próprias de células tumorais, como capacidade de evasão à apoptose, sinalização para crescimento sustentada, desregulação das vias energéticas, evasão à destruição pelo sistema imune, instabilidade gênica, entre outras (HANAHA; WEINBERG, 2011).

Considerando esses fatores, diversos estudos culminaram na proposição de um modelo de progressão do melanoma. Neste modelo, a progressão do melanoma se inicia com a formação de um nevo benigno, uma lesão hiperplásica que consiste em melanócitos com proliferação aberrante, que entra em senescência e não progride. O acúmulo de diversas modificações genéticas permite que as células do nevo evadam a senescência e, por influência da expressão alterada de diversos genes, como supressores de tumor, reguladores de apoptose e controladores de ciclo celular, podem se tornar um melanoma de crescimento radial. Esse tipo de melanoma se

caracteriza por se conter na epiderme, mas, com o ganho de outras alterações fenotípicas, o melanoma pode adquirir a capacidade de invadir a derme, caracterizando um melanoma de crescimento vertical. Por fim, as células tumorais podem adquirir a capacidade de sair do seu sítio primário, invadir a corrente sanguínea e se estabelecer em outros sítios do organismo, culminando em um tumor metastático. Apesar de útil para o delineamento de experimentos e didático para a classificação de lesões, dados clínicos mostram que não se observam melanomas que sigam esse modelo com frequência (ZAIDI *et al.*, 2008). Em 2009, o “American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging and Classification” realizou uma análise multifatorial de mais de 10 mil pacientes portadores de melanoma localizado e observou que o nível de invasão não é mais um fator correlacionado à sobrevida dos pacientes; por outro lado, destacou que a taxa mitótica representa um grande poder preditivo de sobrevida (BALCH *et al.*, 2009).

Devido às diversas alterações genéticas sofridas pelas células tumorais, todo o ambiente celular passa por modificações. O crescimento descontrolado dessas células exige uma aceleração do metabolismo e a falta de vascularização adequada acarretam em graves consequências, como o aumento do estresse oxidativo. As células de melanoma são capazes de sobreviver a esse ambiente pró-oxidativo, sugerindo que essas células possuem algum tipo de adaptação a essa condição, provavelmente em virtude de serem originadas de melanócitos (DE SOUZA, 2006). O ambiente pró-oxidativo pode levar a diversas alterações intracelulares, como a perturbação da homeostase do RE. O estresse de RE ocorreria, por exemplo, em virtude do acúmulo de proteínas mal-enoveladas nessa organela, já que em células tumorais há um aumento da síntese proteica, alterações nos níveis intraluminais de cálcio, alterações

no perfil de glicosilação, privação nutricional e também, possíveis danos no maquinário de processamento proteico pelo acúmulo de ROS (HEALY, 2009).

Alguns autores defendem que o estresse de RE é, na verdade, o principal mecanismo *driver* da progressão do melanoma. Em situações de estresse de RE, as células disparam a UPR, que atua em duas vertentes: inicialmente de forma protetora, com o intuito de cessar o estresse; contudo, quando o estresse é persistente, dispara sinalizações de morte. Os detalhes dessa resposta serão abordados no tópico 1.4. Existem muitas evidências de que a chaperona e marcador de estresse de RE GRP78 está superexpresso até mesmo nos estágios iniciais do melanoma, inclusive correlacionando à progressão da doença. As células de melanomas estão então adaptadas ao estresse de RE e isso pode ser um fator envolvido na malignidade e resistência à terapia características dessas células. Nessas células, pode estar ocorrendo apenas a vertente protetora da UPR, resultando na inibição de vias de morte e, conseqüentemente, deixando o tumor mais resistente à morte induzida pelos quimioterápicos utilizados na clínica (HERSEY; ZHANG, 2008).

Nosso grupo tem mostrado dados (não publicados) interessantes sobre estresse oxidativo e ativação da via UPR em tecidos de melanoma humano. Nas imagens obtidas de uma “tissue microarray” dessas amostras (Figura 1) é possível observar que houve marcação positiva para SOD2 nos tecidos de melanoma quando comparados ao controle. A expressão de SOD2 é induzida pela presença de ROS, o que sugere que essas células estejam em um ambiente com desbalanço redox. Além disso, a marcação de ATF4 sugere que a via de UPR está ativa nessas células. Entretanto, a marcação desse fator de transcrição foi predominantemente citoplasmática, o que impossibilita a indução de expressão do seu gene alvo

GADD153, que está envolvido no braço de morte induzida por UPR. De fato, é possível notar na Figura 1 que GADD153 apresentou-se fracamente marcado. Esta talvez seja a explicação de porque embora em um ambiente pró-oxidativo (SOD2) as células de melanoma são capazes de sobreviver. Assim, a UPR poderia estar ativada em virtude do microambiente tumoral pró-oxidativo, mas a via de morte induzida por essa resposta se apresenta inativa.

Figura 1. Expressão de SOD-2, ATF4 e GADD153 em tecidos de melanoma humano. Imagem representativa obtida de “tissue microarray” de amostras de melanoma humano. As células de melanoma se encontram em um ambiente pró-oxidativo, evidenciado pela marcação com SOD-2. Além disso, as células de melanoma não induzem a via de morte (marcação fraca de GADD153) da resposta UPR. É possível notar a marcação de ATF4, componente da via de UPR e fator transcricional de GADD153, contudo devido a sua localização citoplasmática, não exerce a função de fator transcricional e não ativa GADD153.

Outro aspecto importante na origem e progressão do melanoma está relacionado à adesão dos melanócitos, reflexo de alterações na expressão de integrinas e caderinas. No trabalho de Oba-Shinjo e colaboradores (2006) foi desenvolvido um modelo de progressão de melanoma, em que linhagens

tumorigênicas (Tm1, Tm5, entre outras) foram derivadas de uma linhagem não-tumorigênica (melan-a) após ciclos de desadesão. Além de induzirem tumor após serem implantadas em camundongos, as linhagens geradas nesse trabalho adquiriram outras características de fenótipo tumoral, como crescimento independente de ancoragem (resistência a *anoikis*), menor tempo de duplicação, aumento de estruturas com *N*-glicanos complexos e crescimento independente do fator de crescimento PMA (necessário à linhagem melan-a). Outros estudos realizados com as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 demonstraram também que nessas células ocorre redução da expressão de enzimas responsáveis pela degradação de ROS, outra característica compartilhada por células de melanoma (DE SOUZA *et al.*, 2006).

Ainda em relação à importância da adesão na origem e progressão do melanoma, é importante ressaltar que um dos “hallmarks” dessa malignidade é o “switch” da expressão de E-caderinas para N-caderinas (HAASS *et al.*, 2005). Essa mudança confere às células de melanoma maior motilidade e capacidade invasiva. Estudos mostram que, além do “switch”, também a *N*-glicosilação das N-caderinas se modifica ao longo da progressão da doença e influencia a capacidade de migração das células de melanoma. Tumores primários apresentam N-caderinas com *N*-glicanos de alta manose ou bi- antenares, enquanto células metastáticas apresentam estruturas tri e tetra-antenares (CIOŁCZYK-WIERZBICKA *et al.*, 2005).

1.2. *N*-glicosilação

Devido à imensa variedade de processos celulares em que a glicosilação interfere, sua influência em diversas doenças vem sendo estudada há muito tempo (DENNIS *et al.*, 1999a). Por se mostrar muito importante na origem e progressão

tumoral, também tem se dado importância à relação entre glicosilação e câncer (FUSTER; ESKO, 2005).

A glicosilação ocorre durante e após a tradução, momento em que as proteínas são alvo de diversas modificações estruturais. Esse processo consiste na adição de cadeias glicolíticas à proteína nascente e pode ser classificado em *O*-glicosilação e *N*-glicosilação. A *O*-glicosilação ocorre pela adição de açúcares no átomo de oxigênio de um resíduo de serina ou treonina. Já a *N*-glicosilação ocorre pela adição de um oligossacarídeo precursor no átomo de nitrogênio de um resíduo de asparagina.

No presente trabalho, daremos enfoque à *N*-glicosilação. Essa modificação co e pós-traducional é essencial para o correto funcionamento da proteína, protege da ação de proteases, confere estabilidade, solubilidade e heterogeneidade, além de ser fundamental no controle do enovelamento protéico e ocorre apenas em proteínas sintetizadas no RE (ROTH *et al.*, 2010).

O processo de *N*-glicosilação ocorre em várias etapas: transferência do componente *en bloc* do dolicol para a proteína nascente, o processamento do glicano por glicosidases e manosidades, a checagem do enovelamento por calnexina, calreticulina e glicosiltransferases no RE e, por fim, o processamento por manosidades e a adição de GlcNAc pelas MGATs no complexo de Golgi (ROTH *et al.*, 2010; STANLEY, 2011).

O primeiro passo da *N*-glicosilação é a transferência *en bloc* de um glicano com 14 monossacarídeos de um grupo dolicol para um resíduo de asparagina da proteína que esteja na sequência asparagina-X-serina/treonina (sendo X qualquer

aminoácido exceto prolina e ácido aspártico). Esse passo ocorre enquanto a proteína está sendo traduzida e depende da exposição dos sítios de glicosilação e da presença das enzimas e dos componentes que participam do processo (Figura 2). Dessa forma, o padrão de glicosilação varia de acordo com o tipo celular e com as condições nutricionais da célula e, por ser muito importante para a funcionalidade das glicoproteínas, passa por um rígido controle ainda não conhecido completamente (KELLEHER; GILMORE, 2006).

Figura 2. No RE, o oligossacarídeo precursor é transferido para um sítio de glicosilação, ou seja, uma região contendo a sequência de aminoácidos asparagina-X-serina/treonina (sendo X qualquer aminoácido exceto prolina e ácido aspártico).

Em seguida, ainda no RE, começa o processamento do *N*-glicano adicionado à proteína. Primeiro, ainda co-traducionalmente, ocorre a retirada de três resíduos de glicose (KORNFELD; KORNFELD, 1985). A retirada da terceira glicose ocorre com eficiência muito maior quando há mais de um *N*-glicano adicionado na proteína nascente. Assim, como glicoproteínas com monoglicanos permanecem mais tempo nessa etapa, o maquinário de enovelamento pode atuar mais intensamente e concluir de forma correta o enovelamento de uma proteína mal-enovelada. Calnexina e calreticulina, chaperonas lectina-símile que reconhecem essa estrutura glicosídica, auxiliam no enovelamento proteico nessa etapa, associando-se a uma rede de

proteínas, composta por chaperonas, entre elas, a GRP78, e outras proteínas residentes do RE (Figura 3). Essa etapa é de fundamental importância para o correto enovelamento protéico (HAMMOND *et al.*, 1994).

Figura 3. A estrutura parcialmente processada do N-glicano é reconhecida pelas chaperonas calnexina e calreticulina, responsáveis pelo correto enovelamento da proteína.

Ainda no RE, ocorre a retirada de um resíduo de manose e a estrutura glicosídica recém-formada não é mais reconhecida pelas chaperonas calnexina e calreticulina, que se desligam da proteína nascente. Nessa etapa, a UGGT interage com sítios hidrofóbicos expostos, o que significa que a proteína está mal-enovelada. Caso haja, a UGGT reglicosila o oligossacarídeo, formando novamente a estrutura reconhecível por calnexina e calreticulina, que mais uma vez tentam enovelar corretamente a proteína nascente (Figura 4). Esse ciclo pode ocorrer várias vezes, mas em virtude de um controle temporal no RE, depois de um determinado período, caso a proteína não alcance sua forma nativa, ocorre a sinalização para que a proteína seja degradada pelo complexo proteassomal. Caso não haja mais sítios hidrofóbicos expostos, ocorre a retirada de mais um resíduo de manose e, então, a proteína é transferida para o complexo de Golgi (Figura 5; TROMBETTA; PARODI, 2003).

Figura 4. A glicosiltransferase UGGT reconhece sítios hidrofóbicos que sinalizam mal-enovelamento proteico. Na presença desses sítios, a UGGT reglicosila os *N*-glicanos presentes na proteína nascente e, assim, eles voltam a ser reconhecidos por calnexina e calreticulina. Esse ciclo de reglicosilação ocorre algumas vezes até a proteína ficar na forma nativa, mas, caso isso não aconteça, ocorre a sinalização para a degradação proteassomal.

Figura 5. Etapas finais do processamento do *N*-glicano no RE, com a retirada do último resíduo de glicose e de um resíduo de manose.

No complexo de Golgi, o processamento dos *N*-glicanos continua com a retirada de mais três resíduos de manose. Em seguida, as MGATs adicionam GlcNAcs nos resíduos de manose, de acordo com a acessibilidade dos oligossacarídeos e expressão dessas enzimas nos diversos tipos celulares. As MGATs se acumulam em compartimentos específicos do Golgi, formando uma rígida ordem de atuação. As estruturas assim formadas ainda podem sofrer adição de fucoses, ácidos sialícos, poli-*N*-acetillactosaminas entre outros (Figura 6). A grande gama de

estruturas que podem ser formadas garante a heterogeneidade das glicoproteínas (LAU; DENNIS, 2008; STANLEY, 2011).

Figura 6. Processamento dos *N*-glicanos no complexo de Golgi. O primeiro passo de retirada de 3 resíduos de manose, a adição da primeira GlcNAc e a posterior retirada de 2 resíduos de manose ocorrem obrigatoriamente nessa ordem e são fundamentais para a ação das MGATs. Os passos seguintes variam de acordo com a disponibilidade dessas enzimas, de substrato e dos *N*-glicanos. Para fins ilustrativos, está representado um *N*-glicano processado pelas MGATs I, II e IV e com prolongamentos de polilactosaminas e ácidos siálicos.

Em células normais, são mais frequentemente encontrados *N*-glicanos do tipo bi-antenaes, ou seja, em que houve a adição de resíduos de açúcares apenas em dois resíduos de manose. Já em células tumorais, são mais frequentemente encontradas estruturas tri e tetra-antenaes, um dos tipos de padrão característico da *N*-glicosilação aberrante. Essa diferença ocorre principalmente pela expressão diferencial de algumas enzimas da via de glicosilação, como a MGAT5. Outros tipos de *N*-glicanos aberrantes também são comumente encontrados em tumores, apresentando grande número de cadeias de polilactosamina, alterações na sialilação e na fucosilação (HAKOMORI, 2002; WANG, 2005; BROOKS *et al.*, 2008).

1.3. Superexpressão de MGAT5

O aumento da expressão de MGAT5 em tumores é um fenômeno muito conhecido e estudado e está altamente relacionado ao aumento da agressividade e capacidade metastática dos tumores (LI, 2010; DENNIS *et al.*, 1999b). A superexpressão de MGAT5 já foi caracterizada em diversos tipos tumorais, dentre eles no melanoma (FERNANDES *et al.*, 1991; SEELENTAG *et al.*, 1998; CHAKRABORTY, 2001). Interessantemente, estudos apontam que o gene *Mgat5* é transcricionalmente regulado por ativação de RAS, uma via comumente “up”-regulada em melanoma, como descrito no item 1.1. Corroborando esse dado, os estudos com o modelo de progressão de melanoma desenvolvido em nosso laboratório (melan-a, Tm1 e Tm5) mostraram que há um aumento na produção dos oligossacarídeos *N*-ligados, produto da atividade de MGAT5, nas linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 (DE OLIVEIRA, 2010). Devido a esse achado, despertou-se o interesse para elucidar que vantagens a superexpressão de *Mgat5* estaria conferindo aos tumores.

O *N*-glicano produto de MGAT5 é o intermediário com maior afinidade para a extensão com poli-*N*-acelilactosaminas, que por sua vez, aumentam a afinidade por galectina-1, -3, -8 e -9 (CUMMINGS; KORNFELD, 1984; HIRABAYASHI *et al.*, 2002). Esse fato é importante porque influencia a organização de proteínas de membrana na superfície celular. Glicoproteínas de membrana que apresentam esse tipo de *N*-glicanos tem sua residência na superfície celular aumentada, devido à formação de estruturas supramoleculares na membrana plasmática (denominadas “lattices”). Uma vantagem que esse fenômeno confere aos tumores é a manutenção do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) na membrana por um tempo

prolongado, o que leva a uma sustentação da sinalização para crescimento (LAJOIE et al., 2007).

Outra vantagem conferida a células tumorais que superexpressam MGAT5 é o aumento de motilidade. As moléculas de adesão, como integrinas e caderinas, podem ter sua funcionalidade alterada de acordo com o seu padrão de glicosilação. Diversos trabalhos mostram que o aumento de *N*-glicanos complexos leva à redução da adesão celular, e consequentemente, a um aumento da motilidade e capacidade metastática em linhagens tumorais (ALMARAZ et al., 2012; LAGANA et al., 2006; OGURA et al., 2004; DEMETRIOU et al., 1995).

1.4. “Unfolded Protein Response” (UPR)

Um importante fator que também vem sendo relacionado com tumores, dentre eles o melanoma, é a ativação da UPR. Essa resposta ocorre em face ao estresse de RE. A homeostase do retículo endoplasmático depende de diversos fatores, entre eles estoque adequado de ATP e cálcio e um ambiente pró-oxidativo. Perturbações nesses fatores impedem o correto funcionamento da organela e culminam no acúmulo de proteínas mal-enoveladas, provocando o estresse de RE e, por fim, o disparo da UPR (MA; HENDERSHOT, 2004).

Também é importante destacar que a quebra da homeostase no complexo de Golgi devido a mudanças no pH, bloqueio de transportadores de açúcares e problemas relacionados a proteínas residentes dessa organela podem causar desaceleração do tráfego e acúmulo de proteínas na via secretória. Curiosamente,

esse acúmulo pode, retrogradamente, causar problemas também na homeostase do RE, levando ao disparo da UPR (XU *et al.*, 2010).

A UPR é composta por dois efeitos distintos: inicialmente, ocorre a atenuação da tradução e a degradação de mRNAs e de agregados proteicos, na tentativa de cessar o estresse, e, de forma contrária, dependendo da persistência e intensidade do estresse, ocorre o disparo da apoptose. A resposta de morte ocorre quando a célula alcança um nível irreversível de UPR, o que indica que há algum tipo de controle de duração e de intensidade dessa resposta ainda não elucidado. Assim, o correto enovelamento proteico é essencial para a sobrevivência celular (HETZ, 2012).

A UPR é efetuada por três vias principais. As moléculas iniciadoras dessas vias são PERK, IRE1 α e ATF6 que, em situações de homeostase, estão inativadas pela ligação da chaperona GRP78. Quando proteínas mal-enoveladas se acumulam no RE, GRP78 se desliga dessas moléculas iniciadoras e se liga às proteínas mal-enoveladas, disparando a UPR (BERTOLOTTI *et al.*, 2000; SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005).

Por meio da via da PERK ocorre uma inibição da tradução proteica e a indução da expressão de genes relacionados à autofagia, apoptose, metabolismo de aminoácidos e respostas antioxidantes (HARDING *et al.*, 2000). PERK fosforila eIF2 α , o que causa redução da taxa de tradução e aumento da concentração de ATF4, que é translocado para o núcleo, onde promove a transcrição de GADD34 e de GADD153 (MA *et al.*, 2002). Este último, também conhecido como CHOP, é um fator de transcrição que controla negativamente a transcrição do gene anti-apoptótico Bcl-2 (McCULLOUGH *et al.*, 2001).

Já pela via de IRE1 α , ocorre a degradação de mRNAs e a indução da expressão de genes relacionados ao enovelamento proteico, à degradação proteica associada ao RE (ERAD), à qualidade proteica e síntese de fosfolipídeos, além de induzir vias de alarme de estresse por meio das proteínas JNK e NF- κ B. IRE1 α promove a tradução de XBP1, que por sua vez, é translocada ao núcleo, funcionando como fator de transcrição de ativação dos genes de GRP78 e outras chaperonas, XBP-1, GADD153 e componentes de ERAD (YOSHIDA *et al.*, 2001).

Por fim, a via de ATF-6 também induz a expressão dos genes associados ao ERAD, à qualidade proteica e à síntese de fosfolipídeos. ATF-6 é translocado para o núcleo, onde funciona como fator de transcrição, ativando os genes GRP78, XBP1 e GADD153 (YAMAMOTO *et al.*, 2007; NAKAJIMA *et al.*, 2011).

A UPR está ativada em diversos tumores sólidos (FERNANDEZ *et al.*, 2000; SHUDA *et al.*, 2003; SONG *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002; GAZIT *et al.*, 1999; SHEN *et al.*, 1987; OZAWA *et al.*, 2001), provavelmente, em resposta a falta de nutrientes e oxigênio ocasionada por aporte sanguíneo inadequado. Nesses casos, sugere-se que a UPR seja disparada como resposta protetora aos agravos do ambiente, em prol da sobrevivência das células tumorais, relacionando-a a progressão e agressividade (JAMORA *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 2004). Por outro lado, a UPR pode deixar as células tumorais mais suscetíveis à morte por apoptose, já que, quando prolongada, pode culminar no disparo de vias apoptóticas. Até o presente, ainda é incerto afirmar com precisão se a UPR beneficia o hospedeiro ou o tumor (MA; HENDERSHOT, 2004).

A UPR pode também estar relacionada à resistência ou sensibilidade a quimioterápicos. Ao inibir a tradução e aumentar a degradação proteica, ela pode sensibilizar as células tumorais a agentes que causam danos ao DNA ao impedir a tradução de proteínas de reparo (CHATTERJEE *et al.*, 1997). Contudo, ao mesmo tempo, podem conferir resistência a drogas que alvejam proteínas, como a topoisomerase II, já que a tradução da proteína alvo também está reduzida (YUN *et al.*, 1995).

Além dos dados da literatura apresentados acima, interessante, resultados anteriores do grupo revelam que as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 expressam maiores quantidades de GRP78 e GADD153 em relação à linhagem não tumorigênica melan-a após indução de estresse de RE, mostrando-se mais sensíveis à indução de morte pelo indutor de estresse de RE tunicamicina (DE OLIVEIRA, 2010).

1.5. Hipótese

A nossa hipótese se baseia em dois aspectos amplamente abordados na literatura: tumores apresentam (i) marcadores de UPR constitutivamente expressos e (ii) *N*-glicosilação aberrante. Como esses dois processos celulares se encontram intimamente relacionados na via de secreção proteica no ínterim RE-Golgi, nos propomos a avaliar se a *N*-glicosilação aberrante faz parte da adaptação tumoral que impede o disparo de sinais de morte decorrentes de UPR.

Provavelmente, alguma adaptação foi selecionada nas células tumorais de forma que mesmo sob estresse de RE persistente, apenas o braço protetor da via de

UPR permaneça ativo. Assim, a nossa hipótese é que a superexpressão de MGAT5 (e/ou MGAT5B) seja a adaptação (ou uma das adaptações) que as células tumorais possuem para impedir o disparo de sinais pró-apoptóticos gerados pela UPR.

Isso poderia ocorrer, por exemplo, à medida que essa adaptação permitisse um fluxo mais acelerado das proteínas no RE e no complexo de Golgi, reduzindo o acúmulo de proteínas mal-enoveladas e, assim, reduzindo o estresse causador do disparo da UPR a níveis inferiores aos necessários para o disparo de apoptose.

Além disso, a análise “in silico” da sequência do promotor do gene de MGAT5B indicou presença de um possível sítio de ligação para GADD153, o que sugere que possa haver regulação desse gene por um fator da via de UPR. Dessa forma, é possível que o padrão de glicosilação aberrante dependente da atividade de MGAT5B esteja associado à reação de adaptação ao estresse de retículo.

Assim, nos propomos a avaliar se a *N*-glicosilação aberrante das linhagens tumorigênicas do nosso modelo é um mecanismo de atenuação da sinalização de morte por UPR.

2. JUSTIFICATIVA

Em virtude desses achados, avaliamos com esse projeto se a expressão diferencial de MGAT5, observada em células tumorais e em especial em células de melanoma, ocorreria como uma resposta adaptativa dessas células ao estresse de RE. Considerando que essa enzima é relativamente menos expressa em células normais, a sua superexpressão em células tumorais promoveria uma maior eficiência da via de glicosilação, reduzindo assim o acúmulo de proteínas no retículo e, por consequência, evitando o estresse do mesmo. Assim, com a redução do acúmulo de proteínas mal-enoveladas no RE, os sinais apoptóticos decorrentes de UPR não seriam disparados, tornando as células tumorais mais resistentes ao estresse de RE. Caso essa hipótese se comprove, pode-se mostrar adequada a interferência na expressão de MGAT5 como forma de sensibilizar células tumorais antes do tratamento com quimioterápicos. Dessa forma, o presente trabalho pode contribuir para aumentar a eficiência de fármacos já utilizados, e por consequência, melhorar a eficiência do tratamento do melanoma.

3. OBJETIVOS

3.1.Geral

Avaliar se a expressão diferencial dos parálogos de *Mgat5* (*Mgat5a* e *Mgat5b*) confere vantagem adaptativa à sobrevivência em células de melanoma em condições geradoras de estresse.

3.2.Específicos

3.2.1. Analisar os níveis de expressão das isoformas de MGAT5 (MGAT5A e MGAT5B) e de seu produto nas linhagens Tm1 e Tm5 em comparação com melan-a;

3.2.2. Analisar se há diferença de expressão do marcador de UPR GRP78 entre as linhagens tumorigênicas e não-tumorigênica após o tratamento com tunicamicina e swainsonina;

3.2.3. Avaliar se o tratamento com tunicamicina e com swainsonina sensibilizam as células de melanoma ao tratamento com drogas citotóxicas;

3.2.4. Avaliar os efeitos da subexpressão de MGAT5 na sinalização de UPR e na indução de morte celular;

3.2.5. Analisar se a interferência na expressão de MGAT5 pode servir como sensibilização para posterior tratamento com drogas citotóxicas.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1.Cultivo de células

Foram utilizadas as linhagens celulares de melanócito murino melan-a e de melanoma murino Tm1 e Tm5. As linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 foram derivadas da linhagem melan-a após ciclos de adesão e desadesão, conforme descrito no trabalho de Oba-Shinjo e colaboradores (2006). As linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foram cultivadas em meio RPMI pH 7,2 suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 200nM de acetato de forbol miristato (PMA). As linhagens foram mantidas em estufa úmida a 37°C e em atmosfera contendo 5% de CO₂. O descolamento das células para posterior contagem e subcultivo foi realizado por meio de duas lavagens com PBS-EDTA, seguida de curta exposição à tripsina.

A morfologia das células foi observada em microscopia de luz Carl Zeiss Primo Vert 415510-1101-000 e as imagens foram obtidas com o auxílio da câmera AxioCam ERc5s acoplada ao microscópio.

4.2.Tratamento com tunicamicina, cisplatina e swainsonina

As células foram plaqueadas e, após adesão, a droga correspondente ao experimento (swainsonina, tunicamicina ou cisplatina) foi adicionada aos poços, observando que ao final do experimento as células não ultrapassavam 80% de confluência. Os tratamentos foram mantidos por 6, 24 ou 48 horas. Foram utilizadas as concentrações 0,25; 0,5; 1; 5 e 10µg/ml para swainsonina; 1µg/ml para tunicamicina e 1, 5 e 10µM para cisplatina. Nos experimentos com tunicamicina foi feito um grupo controle tratado com 0,1% de dimetilsulfóxido (DMSO) já que este é o diluente da mesma. O tratamento de sensibilização foi retirado antes da adição da

cisplatina, ou seja, não foram realizados tratamentos aditivos. Após os diferentes períodos de tratamento, as células foram desaderidas e fixadas para posterior ensaio de morte celular avaliando-se o conteúdo hipodiplóide de DNA por incorporação de iodeto de propídio e leitura de fluorescência por FACS (item 4) ou submetidas a lise por tampão de extração proteica para análise do extrato proteico por *Western Blot* (item 3) ou desaderidas para posterior extração de RNA (item 5), ou desaderidas e incubadas com LPHA-ALEXA488 (item 6).

4.3. Análise de expressão proteica por *Western Blot*

4.3.1. Extrato celular

Após a desadesão das células tratadas (conforme descrito no item 2), foi realizada uma lavagem com PBS gelado e, em seguida, foi adicionado tampão de extração proteica citoplasmática. Esse tampão contém 50mM de Tris pH 7,5, 150mM de NaCl, 5mM de EDTA pH 8,0 e 0,1% de Triton X-100. O lisado celular foi mantido no gelo por 15 minutos e em seguida foi submetido a 15 minutos de centrifugação a 12000 g a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado no gelo. O pellet obtido pela centrifugação foi ressuspensionado em tampão de lise nuclear. Esse tampão contém 50mM de Hepes pH7,9, 0,4M de NaCl, 1mM de EDTA e 1mM de DTT (adicionado na hora do uso). Mais uma vez, o lisado celular foi mantido no gelo por 15 minutos e em seguida foi submetido a 15 minutos de centrifugação a 12000 g a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para o tubo que continha o sobrenadante da lise citoplasmática para obtenção do extrato total. O mesmo foi mantido a -20°C até sua posterior utilização.

4.3.2. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas do lisado total foi realizada pelo kit Ensaio de proteínas BCA, da *BioAgency*, conforme descreve o fabricante, utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão proteico. A solução de reagentes A e B foi preparada na proporção de 50:1 (A:B) e então foi adicionada a cada poço de uma placa de 96 poços, numa proporção de 8:1 (reagente:amostra). A placa foi mantida a 37°C por 30 minutos protegida da luz. A leitura das amostras foi realizada em leitor de microplacas, utilizando-se filtros de 562nm.

4.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para a realização da eletroforese, foi preparado um gel de poliacrilamida composto por duas fases distintas: uma fase de empilhamento e outra de separação. Na região superior do gel, onde as proteínas são aplicadas, encontra-se o gel de empilhamento, composto por 3,7% de poliacrilamida. Na região inferior, encontra-se o gel de separação, composto por 10% de poliacrilamida. Antes da aplicação das proteínas, o gel foi mergulhado no tampão de corrida. Foram aplicados 30 µg de proteína, diluídas na proporção 1:1 de tampão de amostra redutor (2x), e 6 µl de marcador de peso molecular. Antes da aplicação, as amostras e o marcador foram deixados no banho seco a 100°C por 5 minutos. As amostras foram aplicadas no gel e corridas a 80 V por 3 a 3,5 horas.

4.3.4. Transferência das amostras

Após a corrida, o gel foi colocado em um aparato de transferência, para que as proteínas migrassem para uma membrana de PVDF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*). Para isso, a membrana foi primeiramente ativada em metanol e em

seguida lavada em água destilada. O aparato de transferência foi montado, contendo esponja, papel, filtro, gel e membrana, e, então, colocado na cuba de transferência. Foi utilizado tampão de transferência contendo 20% de metanol para cobrir completamente o aparato, mantendo a membrana sempre embebida. A corrida foi feita a 50V por duas horas.

4.3.5. Blotting

Com a membrana ativada, foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos pela lavagem com 5% de BSA em PBS-Tween 0,2% em agitação a temperatura ambiente por uma hora. Após bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários policlonais feitos em cabra (anti-GRP78) e em camundongo (anti- β -actina), separadamente, em agitação a 4°C *overnight*. Em seguida, após três lavagens de 10 minutos cada com 1% BSA em PBS-Tween 0,5%, foram incubadas com o anticorpo secundário correspondente conjugado a peroxidase, em agitação por uma hora a temperatura ambiente. Após essa etapa, foram efetuadas novamente três lavagens de 10 minutos cada com 1% de BSA em PBS-Tween 0,5% (BURNETTE 1981). Em seguida, as membranas foram reveladas por quimioluminescência.

4.3.6. Revelação por quimioluminescência

Após a marcação com os anticorpos, foi adicionado à membrana uma solução composta por tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,9), 2,5 mM de luminol, 0,4 mM de ácido p-coumárico e 0,006% de peróxido de oxigênio, e em seguida, a mesma foi colocada dentro do aparelho ImageQuant LAS 4000. Essa solução reage com a peroxidase presente nos anticorpos secundários e excita o luminol. A fluorescência

gerada por essa reação foi captada pelo ImageQuant, que quantificou-a em pixels, gerando imagens digitais da membrana.

4.4.Avaliação de morte e ciclo celular

A avaliação de ciclo celular e de morte foi realizada através de incorporação de iodeto de propídio. O PI é incorporado estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA. Para tal, as células plaqueadas e submetidas a diferentes tratamentos (item 2) foram lavadas duas vezes com PBS-EDTA, e então desaderidas por meio de curta exposição à tripsina. As soluções de lavagem, o tratamento (para recolhimento das células mortas que desaderiram da placa) e suspensão de células foram transferidas para tubos de 1,5ml e centrifugadas por 2 minutos a 2000 rpm. O *pellet* foi ressuspensionado e fixado em etanol 70% gelado e mantido a -20°C até o momento da análise por citometria de fluxo. As células fixadas foram centrifugadas por 5 minutos a 2600 rpm e o sobrenadante foi descartado por meio de inversão dos tubos. O *pellet* foi lavado em PBS e centrifugado a 2800 por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi ressuspensionado em solução de PBS contendo 0,1% de Triton X-100, 200µg/ml de RNase A e 20µg/ml de PI e, então, as amostras foram transferidas para tubos de FACS. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, protegendo da luz, foi feita a captação das células marcadas pelo citômetro FACScalibur. A análise da citometria de fluxo foi realizada utilizando-se o programa Cell Quest Pro da Becton & Dickson. Nos gráficos gerados pela citometria foi possível verificar se as células estavam mortas (conteúdo de DNA abaixo de 2n, ou seja, hipodiplóides), na fase G0/G1 do ciclo celular (conteúdo de DNA 2n) ou nas fases S/G2/M (conteúdo de DNA entre 2n e 4n) do ciclo celular. A porcentagem das células nas diferentes fases

do ciclo celular foi quantificada e os dados foram expressos em gráficos de histogramas.

4.5. Análise de expressão gênica de MGAT5A e MGAT5B

As células foram cultivadas e em seguida, foi realizada a extração de RNA total. As células aderidas foram lavadas com PBS gelado e após a retirada total do PBS, foi adicionado Trizol da Invitrogen, que lisou as mesmas. A proporção de células e quantidade dos reagentes utilizados seguiu as recomendações do fabricante. Com uma micropipeta, o lisado celular foi retirado, e então, transferido para tubos de 1,5ml, e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado clorofórmio e então, novamente as células foram homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos. Após a transferência, álcool isopropílico foi adicionado a cada amostra, e então, as amostras foram mantidas a -80°C “overnight”. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet foi lavado duas vezes com etanol 75%, com centrifugações de 7500g por 5 minutos a 4°C. O pellet de RNA foi dissolvido em água DEPC (dietilpirocarbonato). Por fim, as amostras foram estocadas a -80°C até o momento do uso.

Para a reação de transcriptase reversa, foi utilizada a enzima SuperScript III da Invitrogen e foram utilizadas as quantidades de reagentes indicadas pelo fabricante. Primeiramente, ao RNA total foram acrescentados oligo dT, dNTP mix e água ultrapura Gibco. A seguir, o material foi incubado a 65°C por 5 minutos.

Imediatamente após esse período, as amostras foram rapidamente resfriadas em gelo e brevemente centrifugadas. Então, foram adicionados tampão First-Strand, DTT e Superscript III e as amostras foram incubadas a 25°C por 15 minutos e, em seguida, a 55°C por 60 minutos. Para interromper a reação, as amostras foram incubadas a 70°C por 15 minutos, e o cDNA sintetizado foi estocado a 4°C.

Para a análise do cDNA, foi realizada PCR quantitativa com “primers” específicos para a sequência do cDNA de MGAT5A e MGAT5B. A reação foi composta por Power Sbyr Green PCR Master Mix da Applied Biosystems, 200nM de primer “forward” e 200nM de primer “reverse” e água ultrapura Gibco. A eficiência dos pares de primers utilizados foi determinada por meio de uma curva de eficiência, utilizando 50, 5 e 0,5 ng de cDNA. Os valores de eficiência encontrados foram de 105% para o par de “primers” de MGAT5A, 118% para o par de “primers” de MGAT5B e 90% para o par de “primers” de β -actina (utilizado como controle endógeno). A comparação de expressão entre as linhagens foi realizada por meio do modelo matemático proposto por Pfaffl em 2001.

As sequências dos “primers” utilizados são:

MGAT5A: F 5' GGAAAATCAAGTGGATGAAGGACA 3'

R 5' CCAAGGTAAACGAGGACACCAA 3'

MGAT5B: F 5' ACCAGAAGCAAATCCTTGTCCA 3'

R 5' ATGTCTGCCCCACTGTACCATCTC 3'

β -actina: F 5' AGAAAATCTGGCACCACACC 3'

R 5' AGAGGCGTACAGGGATAGCA 3'

4.6. Avaliação da ligação de L-PHA por citometria de fluxo

As células foram desaderidas das garrafas por meio de duas lavagens com PBS-EDTA e exposição rápida a tripsina. Em seguida, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em PBS-BSA 1%. Então, as células foram incubadas com em solução de PBS-BSA 1% contendo 5 μ g/ml de Lectina PHA-L de *Phaseolus vulgaris*, Alexa Fluor® 488 Conjugado (L-PHA) por 45 minutos no gelo, protegidas da luz. Em alguns experimentos, foi utilizado L-PHA conjugado com FITC. Após esse período, foram lavadas mais uma vez e ressuspensas em PBS. Então, foi feita a captação das células pelo citômetro FACScalibur, utilizando-se o canal FL1-H. A análise da citometria de fluxo foi realizada usando-se o programa Cell Quest Pro da Becton & Dickson.

4.7. Transfecção de siRNA para MGAT5A

As células foram plaqueadas em placas de 70mm utilizando-se meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os próximos passos do experimento foram realizados com meio RPMI suplementado com 0,5% de soro fetal bovino. No dia seguinte, foram preparadas 3 soluções distintas: meio com Oligofectamina® Reagent da Invitrogen® (2 μ l de oligofectamina por poço), meio com Silencer® Select Negative control #1 da Invitrogen® (siRNA scramble) e meio com Silencer® Select Pre-designed siRNA contra MGAT5 (ID: S99011) da Invitrogen®. Foram utilizadas duas concentrações de siRNA controle e contra MGAT5A para padronizar o experimento: 20 e 40 nM. Essas soluções foram

incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse período, a solução de meio e oligofectamina, foi acrescentada nas duas soluções de siRNA e essas novas preparações ficaram 15 minutos em incubação. Após esse período, foram distribuídas nas placas de forma a haver uma duplicata para cada grupo: controle, oligofectamina, siRNA scramble e siRNA contra MGAT5A.

4.8. Análise estatística

Para a análise dos dados foi utilizado o teste ANOVA de uma via, com post-hoc de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPadPrim[®] 4.0 e a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p < 0,05$. Na legenda de cada resultado representativo, estará indicado o número (N) de experimentos independentes realizados.

5. RESULTADOS

5.1.As linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 apresentam maior expressão de Mgat5A em comparação à linhagem não-tumorigênica melan-a

Para testar a hipótese do trabalho, inicialmente foi necessário caracterizar o perfil de expressão de MGAT5 nas linhagens estudadas. Por meio da técnica de qPCR, foram avaliados os níveis de expressão dos parálogos MGAT5A e MGAT5B.

Observou-se que as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 expressam mais MGAT5A que a linhagem não tumorigênica melan-a (Figura 7.A). Apesar de se notar apenas uma discreta diferença, por MGAT5A ser uma enzima, o efeito desse achado pode representar implicações significativas para as células.

Além disso, foi possível observar que nenhuma das linhagens apresenta expressão significativa de MGAT5B (Figura 7.B). Segundo Kaneko e colaboradores (2003), pesquisadores que descreveram a MGAT5B, uma análise de expressão da enzima em tecidos normais humanos mostrou que essa enzima só estava expressa em tecidos de testículo e cérebro. Assim, como controle positivo do nosso experimento, utilizamos uma amostra de cérebro murino.

Figura 7. As linhagens tumorigênicas expressam mais MGAT5A em comparação a melan-a e nenhuma das linhagens estudadas expressa MGAT5B. A. Avaliação da expressão de MGAT5A nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 por qPCR (N=4). B. Avaliação da expressão de MGAT5B nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 e de uma amostra de cérebro murino por meio de qPCR (N=1 para experimento com amostra de cérebro; N=3 para experimentos apenas com as linhagens). Para normalização dos dados, foi utilizado o método de Pfaffl com a expressão de β -actina como controle endógeno.

Ainda é importante notar que, apesar de uma aparente diferença na expressão de MGAT5B entre as linhagens, a amplificação do cDNA só foi observada após o ciclo 35 da reação de qPCR, o que é desconsiderado devido a um possível resultado falso-positivo, de acordo com as recomendações da técnica.

5.2.As linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 apresentam mais produto de MGAT5 que melan-a

Após a verificação da expressão diferencial de MGAT5A nas linhagens estudadas, avaliou-se a presença do produto da enzima (ramificações β 1,6-GlcNac) nos *N*-glicanos das glicoproteínas de superfície. Essa análise foi realizada por meio de ensaio de reatividade a LPHA, uma lectina que reconhece especificamente essas estruturas.

Corroborando os dados de qPCR, foi possível observar que as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 apresentam uma maior marcação de LPHA em comparação a melan-a, mostrando que o produto de MGAT5 está mais presente nas glicoproteínas de superfície das linhagens tumorigênicas (Figura 8).

Figura 8. As linhagens Tm1 e Tm5 apresentam mais *N*-glicanos com ramificações β 1,6-GlcNac (produto de MGAT5) que melan-a. Essa avaliação foi feita por meio de citometria de fluxo após a incubação das células com LPHA conjugado com FITC. O histograma roxo corresponde a melan-a, o verde a Tm1 e o rosa a Tm5 (N=2).

5.3.O tratamento com tunicamicina induz morte e UPR nas linhagens estudadas

Partindo do resultado anterior em que observamos que as linhagens tumorigênicas apresentam *N*-glicosilação aberrante, o próximo passo foi verificar se a *N*-glicosilação era importante para a sobrevivência das linhagens estudadas. Para verificar isso, foi utilizada tunicamicina, um inibidor da GlcNAc-fosfotransferase, que impede a ligação do oligossacarídeo precursor ao dolicol, impedindo completamente a *N*-glicosilação das proteínas nascentes.

Para observar os efeitos do tratamento de tunicamicina nas linhagens estudadas, as células foram incubadas com iodeto de propídio para avaliação de morte/ciclo celular. Por meio desse resultado, foi possível observar que tunicamicina induz parada na fase G0G1 do ciclo celular, culminando em morte. Apesar da

diferença de resposta entre as linhagens não ser expressiva, observa-se diferença estatística do tratamento com tunicamicina 1 μ g/ml por 24h em relação ao controle apenas nas linhagens tumorigênicas (Figura 9).

Figura 9. O tratamento com tunicamicina induz parada na fase G0G1 do ciclo celular nas linhagens estudadas. Avaliação de morte celular (A) e ciclo celular (B) por citometria de fluxo de células das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 após tratamento com tunicamicina (Tuni) 1 μ g/ml por 3h 6h e 24h; N=1.

Além da indução de morte, também verificamos que o mesmo tratamento com tunicamicina (1 μ g/ml por 24h) que causou morte celular disparou a via de UPR nas linhagens estudadas, o que foi verificado por meio do aumento da expressão de GRP78 (Figura 10).

Figura 10. Tunicamicina induz o aumento da expressão de GRP78 em melan-a, Tm1 e Tm5. A avaliação foi feita por meio da técnica de Western Blot (N=2). Legenda: C= controle tratado com DMSO 0,1%, veículo utilizado para a diluição de tunicamicina; 6h = tratamento com tunicamicina 1µg/ml por 6h e 24h= tratamento com tunicamicina 1µg/ml por 24h.

Como controle positivo do tratamento, foi realizado ensaio de reatividade a LPHA. O tratamento com tunicamicina 1µg/ml por 24h causou a diminuição de *N*-glicanos complexos produtos de MGAT5A, mas o mesmo tratamento por 6h não causou esse mesmo efeito (Figura 11).

Figura 11. O tratamento com tunicamicina reduz a expressão de *N*-glicanos β 1,6-GlcNac (produto de MGAT5) em melan-a, tm1 e Tm5. Essa avaliação foi feita por meio de citometria de fluxo após a incubação das células com L-PHA-Alexa488; N=1. Legenda: curva roxa= controle, curva verde= tunicamicina 1µg/ml por 6h, curva rosa= tunicamicina 1µg/ml por 24h.

Assim, com esses resultados, observamos que a *N*-glicosilação tem um papel na sobrevivência das células e na indução de estresse de RE, bem como a ativação da via de UPR.

5.4.As linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 são mais resistentes ao tratamento com cisplatina em comparação a linhagem não-tumorigênica melan-a

A partir dos resultados anteriores, em que observamos que as linhagens tumorigênicas são ligeiramente mais sensíveis a indução de morte por UPR em comparação à melan-a, nos propomos a avaliar o efeito da ativação dessa via frente a um segundo agravo.

Para realizar os experimentos de sensibilização, elegemos o quimioterápico cisplatina como segundo agravo, já que esse fármaco é utilizado na clínica para o tratamento de casos avançados de melanoma.

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade das linhagens estudadas a cisplatina, foram realizados experimentos de marcação com iodeto de propídio para a avaliação da população hipodiplóide e do ciclo celular. Por meio desse resultado, foi possível observar que cisplatina induz morte e parada na fase SG2M do ciclo celular em todas as linhagens estudadas, contudo, esse efeito já pode ser observado em melan-a após o tratamento com concentrações menores da droga. Além disso, é importante notar que a linhagem não-tumorigênica melan-a é mais sensível ao tratamento com esse quimioterápico em relação às linhagens tumorigênicas (Figura 12).

Figura 12. As linhagens tumorigênicas são mais resistentes ao tratamento com cisplatina em relação a melan-a. Avaliação de morte celular (A) e ciclo celular (B) por citometria de fluxo de células das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 após tratamento com cisplatina nas concentrações indicadas por 24h; N=1.

Esse resultado é interessante já que as linhagens tumorigênicas são mais resistentes a cisplatina, ou seja, é de extrema importância desenvolver um tratamento de sensibilização para esse fármaco que ainda hoje é utilizado na clínica, apesar de sua toxicidade para células normais.

5.5.O tratamento com tunicamicina sensibilizou apenas as linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 ao tratamento com cisplatina

Considerando os resultados anteriores, em que observamos a resistência das linhagens tumorigênicas ao tratamento com cisplatina e a ligeira sensibilidade diferencial dessas linhagens ao tratamento com tunicamicina, avaliamos a resposta dessas linhagens a sensibilização com tunicamicina antes do tratamento com cisplatina.

Por meio da incubação com iodeto de propídio, avaliamos por citometria de fluxo a presença de células hipodiplóides e as fases do ciclo celular após o tratamento. Esse resultado se mostrou muito promissor, já que a sensibilização das linhagens tumorigênicas foi muito expressiva, ao passo que a linhagem melan-a não sofreu essa sensibilização (Figura 13 e 14).

Figura 13. Tunicamicina sensibiliza as linhagens tumorigênicas ao tratamento com cisplatina. Legenda: Tuni= tunicamicina 1µg/ml (24h), Cis=cisplatina 5µM (24h). No grupo tuni+cis foi realizado tratamento prévio com 1µg/ml de tunicamicina por 24h e após esse período, a solução de tunicamicina foi retirada e adicionado o tratamento com cisplatina 5µM por mais 24h. Os asteriscos (*) representam diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle da respectiva linhagem e as barras representam diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado apenas com cisplatina; N=3.

Figura 14. Morfologia de células tratadas com tunicamicina, cisplatina e sensibilizadas; evidenciando a resposta diferencial das linhagens tumorigênicas. Tm1 e Tm5 em relação a melan-a. Legenda: Tuni= tunicamicina 1 μ g/ml (24h), Cis=cisplatina 5 μ M (24h). No grupo tuni+cis foi realizado tratamento prévio com 1 μ g/ml de tunicamicina por 24h e após esse período, a solução de tunicamicina foi retirada e adicionado o tratamento com cisplatina 5 μ M por mais 24h. Após os tratamentos, as células foram observadas em microscópio de luz convencional (aumento 100x).

É importante notar que, mesmo apresentando pouca proporção de células hipodiplóides, o tratamento de tunicamicina parece alterar mais a morfologia das células das linhagens Tm1 e Tm5 (Figura 14).

Interessantemente, a concentração de tunicamicina que sensibilizou as linhagens tumorigênicas foi a mesma que induziu UPR. Assim, esses resultados

sugerem que as linhagens tumorigênicas são mais sensíveis a indução de UPR, principalmente na vigência de um segundo agravo, quando comparadas à linhagem não-tumorigênica melan-a.

5.6.O tratamento com swainsonina não leva a morte e não ativa UPR nas linhagens estudadas

Partindo da caracterização das linhagens estudadas, em que observamos que as linhagens tumorigênicas expressam mais MGAT5A e, por consequência, apresentam mais *N*-glicanos com ramificações β 1,6-GlcNac, realizamos ensaios utilizando swainsonina, um inibidor de Golgi- α -manosidade. Dessa forma, a intenção ao usar swainsonina foi de bloquear, de forma mais específica que tunicamicina, apenas os últimos passos do processamento dos *N*-glicanos no complexo de Golgi.

Assim, com o uso dessa substância, nos propomos a avaliar se a *N*-glicosilação aberrante associada à síntese do complexo antenário contendo GlcNac β 1,6-manose, dependente indiretamente da atividade de α -manosidaseII, é um mecanismo de adaptação das linhagens tumorigênicas. Para analisar os efeitos de swainsonina das linhagens estudadas foram realizados experimentos de ensaio de morte/ciclo celular com iodeto de propídio. Por meio desses experimentos, verificamos que não houve indução de morte em nenhuma das linhagens estudadas (Figura 15.A). Também não foi possível observar uma importante parada no ciclo celular em nenhum dos tratamentos (Figura 15.B).

Figura 15. O tratamento com swainsonina não induz morte nem parada no ciclo celular em melan-a, Tm1 e Tm5. Avaliação de morte celular (A) e ciclo celular (B) por incorporação de iodeto de propídio e análise por citometria de fluxo de células das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 após tratamento com swainsonina nas concentrações indicadas em µg/ml por 24h; N=3.

Além disso, avaliamos também se a inibição do processamento final dos *N*-glicanos induzia o acúmulo de proteínas mal-enoveladas no RE, ativando a UPR. Para isso, após o tratamento, o extrato protéico das células foi avaliado por Western Blot. Verificamos que o tratamento com swainsonina não induziu estresse de RE nas células estudadas, já que não se observou aumento da expressão de GRP78 após os tratamentos (Figura 16).

Figura 16. O tratamento com swainsonina não induziu o aumento da expressão de GRP78 em melan-a, Tm1 e Tm5. A avaliação foi feita por meio da técnica de Western Blot. Legenda: C= controle sem tratamento; 5= swainsonina 5µg/ml por 24h, 10= swainsonina 10µg/ml por 24h; N=1.

Como controle positivo dos experimentos acima, a expressão de *N*-glicanos processados por MGAT5 foi avaliada após os tratamentos com swainsonina, e, como esperado, foi observada a redução dessas estruturas (Figura 17).

Figura 17. O tratamento com swainsonina reduz a expressão de *N*-glicanos β 1,6-GlcNAc em melan-a, Tm1 e Tm5. A avaliação foi feita por meio de citometria de fluxo após a incubação das células com L-PHA-Alexa488; N=1. Legenda: curva roxa= controle, curva verde= swainsonina 5µg/ml por 24h, curva rosa= swainsonina 10µg/ml por 24h.

Esses resultados nos mostraram que a inibição do processamento dos *N*-glicanos que ocorre no complexo de Golgi não foi capaz de induzir UPR nem morte nas linhagens estudadas.

5.7.O tratamento com swainsonina não sensibiliza as linhagens estudadas ao tratamento com cisplatina

Os resultados anteriores nos mostraram que o tratamento com swainsonina não foi capaz de induzir UPR, mas, mesmo assim, avaliamos o seu uso como sensibilizador frente ao tratamento com cisplatina considerando que mesmo uma sensível perturbação (que pode não ter sido detectada por WB) fosse suficiente para sensibilizar as células.

Para verificar se o tratamento com swainsonina era capaz de sensibilizar as linhagens tumorigênicas a cisplatina, tratamos primeiramente as células com swainsonina por 24h e, após esse período, retiramos o tratamento e adicionamos a solução de meio com cisplatina por mais 24h. Para avaliar a indução de morte e parada no ciclo celular, realizamos a marcação por iodeto de propídio. Por meio desse experimento, foi possível observar que o tratamento com swainsonina não foi capaz de sensibilizar as células ao tratamento com cisplatina (Figura 18).

Figura 18. O tratamento com swainsonina não sensibilizou as células ao tratamento com cisplatina. Legenda: C=controle, Sw 5=swainsonina 5µg/ml, Sw 10=swainsonina 10µg/ml, Cis=cisplatina 5µM. Os asteriscos (*) representam diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle da respectiva linhagem; N=2.

5.8. Tentaivas de padronização da transfecção de siRNA contra Mgat5A

Para testar a hipótese do trabalho, é necessário silenciar o gene MGAT5A para verificar se ele é o responsável pela adaptação das células tumorigênicas ao estresse de RE. Para isso, foram realizadas diversas tentativas de padronização do siRNA Silencer Select Pre-Designed siRNA (ID: S99011) testando diferentes concentrações do oligo e diferentes tempos de transfecção, contudo, sem sucesso (Figura 19).

Figura 19. Padronização do silenciamento de MGAT5A por siRNA. Após o período de transfecção indicado, as células das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 foram submetidas à extração de RNA pelo método de Trizol. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA obtido e amplificado por uma reação de qPCR.

5.9. Expressão de MGAT5A após tratamento com tunicamicina

Como não foi possível realizar o silenciamento de MGAT5A, tratamos as células com altas doses de tunicamicina para verificar se a indução de UPR era capaz provocar a superexpressão de MGAT5A como uma tentativa de se adaptar ao estresse. Contudo, não foi possível observar uma indução de MGAT5A, pelo contrário, observamos uma redução no mRNA dessa proteína, possivelmente em virtude do efeito de redução global de síntese proteica causado por UPR (Figura 20).

Figura 20. As linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 apresentam expressão reduzida do mRNA de MGAT5A após tratamento com tunicamicina. A. Avaliação da expressão de MGAT5A nas linhagens melan-a, Tm1 e Tm5 por qPCR após tratamento com tunicamicina nas concentrações indicadas por 24h (N=1). Estão representadas as expressões relativas de mRNA de MGAT5A de cada grupo experimental em relação ao grupo DMSO em cada linhagem separadamente. Para normalização dos dados, foi utilizado o método de Pfaffl com a expressão de β -actina como controle endógeno.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados de caracterização das linhagens melan-a, Tm1 e Tm5, modelo de progressão de melanoma desenvolvido no grupo, corroboram os dados da literatura, mostrando que células tumorais apresentam padrões de *N*-glicosilação aberrante. Essa característica tem sido considerada um mecanismo pró-tumoral por influenciar diversos aspectos celulares importantes para a sobrevivência e proliferação de células tumorais, como ativação constitutiva de vias de receptores de morte e proliferação (LAU; DENNIS, 2008), indução de resposta imune (GALUSTIAN et al., 1994), aumento de motilidade e metástase (ZHAO et al., 2008). Em virtude desses achados, a inibição da *N*-glicosilação aberrante vem sendo estudada como uma possível forma de terapia antitumoral.

O modelo de progressão tumoral escolhido para a realização deste trabalho apresenta diversas características importantes para o teste da nossa hipótese. Primeiramente, por ser composto por linhagens com uma mesma origem genotípica (melan-a) e por representarem estágios diferentes de progressão, nos permite compará-las de maneira coerente. Assim, a comparação entre melan-a, Tm1 e Tm5 pode nos auxiliar a compreender as adaptações que ocorrem durante a progressão do melanoma.

Além disso, o proteoma completo das linhagens estudadas mostrou que a expressão de proteínas antioxidantes foi reduzida nas linhagens tumorigênicas Tm1 e Tm5 em comparação à linhagem não-tumorigênica melan-a (DE SOUSA *et al.*, 2006). Esse fato demonstra a relação direta entre estresse oxidativo e progressão dessa doença neste modelo. A redução de expressão dessas proteínas pode estar

relacionada ao fato das linhagens tumorigênicas terem desenvolvido outras adaptações em resposta ao estresse oxidativo ao qual estão submetidas. É importante ressaltar que o estresse oxidativo do microambiente tumoral pode levar a diversas alterações intracelulares, inclusive ao mau funcionamento de algumas organelas, dentre elas, o RE. O correto funcionamento do RE depende, dentre outras coisas, de um balanço oxidativo característico, em que a formação de pontes dissulfeto seja favorecida, em prol do correto enovelamento protéico.

Na literatura e em dados do nosso grupo, vemos que os tumores expressam constitutivamente alguns marcadores de UPR, como GRP78. Isso ocorre possivelmente para manter o braço de sobrevivência dessa via ativo, e assim, proteger os tumores das condições desfavoráveis do microambiente, bem como de tratamentos. Contudo, no nosso modelo, observamos que as linhagens tumorigênicas estudadas não apresentam maior expressão basal de GRP78 em relação à melan-a. Esse resultado é aparentemente controverso, contudo, isso ocorre, provavelmente, porque no tecido tumoral, as células estão expostas a um microambiente pró-oxidativo, principalmente devido à vascularização deficiente. Na cultura de células, contudo, esse ambiente não é mimetizado, já que as células não estão submetidas à privação de nutrientes/oxigênio.

Considerando a estreita relação funcional e física entre o RE e o Golgi, assim como entre *N*-glicosilação e correto enovelamento protéico, propomos que possivelmente a *N*-glicosilação aberrante funcione como um mecanismo de adaptação ao estresse de retículo nas células tumorais. Essa relação estaria tamponando o sistema de indução de morte, de forma que o balanço entre sobrevivência e morte fosse rompido e prevalecesse o braço de proteção.

A nossa hipótese se baseia em alguns trabalhos que mostram a relação entre *N*-glicosilação e o tráfego de proteínas na via de secreção. Por exemplo, o trabalho de Jasiulionis e colaboradores (1996) mostrou a influência da *N*-glicosilação aberrante de integrinas na velocidade de trânsito dessa proteína na via secretória (RE-Golgi). Outro trabalho importante é o de Xu e colaboradores (2010), que mostra que a inibição do processamento dos *N*-glicanos no Golgi leva ao acúmulo de proteínas tanto nessa organela quanto no RE, resultando na ativação da UPR.

Além desses trabalhos, outra evidência que corrobora a nossa hipótese é a localização inesperada de proteínas em células tumorais, como GRP78 na superfície celular (ZHANG *et al.*, 2010). Essa proteína possui um domínio KDEL, que sinaliza para a permanência no RE, contudo, esse mecanismo de retenção de proteínas no RE parece estar sobrecarregado na vigência de UPR, além de aparentemente haver algum outro mecanismo específico que permite a sua localização na superfície em células tumorais.

Assim, para testar se a indução de estresse de RE por meio do bloqueio total da *N*-glicosilação, utilizamos a droga tunicamicina. Por meio dessa abordagem, foi possível observar como essas linhagens respondem a um sistema em que o estresse de RE está induzido, mimetizando as condições encontradas nos tumores. Nossos dados após o tratamento com tunicamicina mostraram que todas as linhagens dependem dessa modificação pós-traducional para o correto enovelamento proteico, já que ocasionou o disparo da via de UPR em todas as linhagens estudadas. Esses resultados foram surpreendentes, já que esperávamos observar respostas diferencial entre as linhagens.

Entretanto, curiosamente, foi possível observar uma resposta diferencial entre as linhagens sob um segundo agravo (cisplatina) após o tratamento com tunicamicina. Com essa abordagem, as linhagens tumorigênicas foram mais sensíveis à indução de morte em comparação à linhagem não-tumorigênica melan-a. Esse resultado sugere que as linhagens tumorigênicas se encontram em um delicado equilíbrio de indução do braço de morte da UPR, já que não houve diferença no disparo da UPR nas linhagens, mas diferença na indução de morte. Uma possível explicação para isso é que as linhagens dispõem vias diferentes “downstream” a GRP78 e que, por fim, resultem na sensibilidade diferencial observada. Assim, para compreender melhor essa resposta, seria necessário avaliar a expressão dos componente da cascata de sinalização, de forma a compreender porque as células tumorigênicas são mais sensíveis ao tratamento combinado.

Martins e colaboradores (2011) reportaram um outro aspecto interessante que promove o uso da estratégia de quimissensibilização por indução de estresse de RE. O grupo mostrou que o tratamento associado de um estressor de RE com cisplatina promove a exposição de calreticulina na membrana celular, revertendo a incapacidade de elicitar resposta imune característica dos tratamentos individuais com tunicamicina e cisplatina.

Outros grupos mostraram o efeito quimissensibilizador de tunicamicina em outros modelos e frente a outros estressores (SONG *et al.*, 2012; NODA *et al.*, 1999; LING *et al.*, 2009). O único estudo com melanoma utilizando tunicamicina como sensibilizador tem o intuito de expor receptores TRAIL para a membrana por meio da indução de estresse de RE (JIANG *et al.*, 2007). Assim, a interferência na N-

glicosilação aberrante e consequente disparo de UPR como estratégia de quimiossensibilização de melanomas ainda não havia sido testada.

Apesar dos resultados promissores com tunicamicina, dados do nosso grupo mostram que o uso dessa droga “*in vivo*” não é recomendado devido a sua alta toxicidade. Assim, nos propomos a avaliar uma outra substância que interferisse na *N*-glicosilação e induzisse estresse de RE, mas que apresentasse menor toxicidade. Como a via de *N*-glicosilação e processamento dos *N*-glicanos é muito extensa, iniciando-se no RE e se completando no complexo de Golgi, era interessante utilizar uma ferramenta que também permitisse avaliar em que momento dessa via ocorre a adaptação desenvolvida pelas linhagens tumorigênicas.

Assim, utilizamos swainsonina, um inibidor da enzima Golgi α -manosidase II, ou seja, uma substância que inibe completamente o processamento dos *N*-glicanos que ocorre no complexo de Golgi. Li e colaboradores (2012) mostraram que o tratamento com swainsonina induz apoptose por via mitocondrial em células de câncer de pulmão - vale ressaltar que esse é um tipo de morte induzida pela UPR. Sun e colaboradores (2009) também sugeriram a relação do bloqueio da *N*-glicosilação do complexo de Golgi com estresse de RE, mas relacionada à sobrecarga de cálcio no RE.

Devido a conhecida importância da *N*-glicosilação aberrante para os tumores, diversos grupos já testaram o efeito antitumoral de swainsonina *in vitro* e *in vivo*, sendo possível encontrar na literatura estudos bem sucedidos em diversos tipos tumorais, entre eles glioma (SUN *et al.*, 2009), adenocarcinoma de mama (SANTOS *et al.*, 2011), carcinoma pulmonar (LI *et al.*, 2012) e melanoma (DENNIS *et al.*,

1990). Em virtude desse sucesso, essa droga foi submetida a testes clínicos. Estudos de fase I e IB com vários tipos de malignidades avançadas, entre elas melanoma, indicaram que fossem realizados mais estudos clínicos com outras concentrações do fármaco (GOSS *et al.*, 1994; GOSS *et al.*, 1997). Contudo, um estudo de fase II com swainsonina em pacientes com carcinoma renal avançado ou metastático desaconselhou a continuação de testes clínicos em virtude de não ter sido observada resposta anti-tumoral do fármaco e dos indesejados efeitos neurotóxicos (SHAHEEN *et al.*, 2005).

Em virtude do efeito tóxico dessa droga, pesquisadores propuseram o uso de swainsonina em baixas doses, com o intuito de sensibilizar células tumorais a outros tratamentos. O efeito sensibilizador de swainsonina foi comprovado em linhagens de câncer colorretal *in vitro* associado ao tratamento com 5-fluorouracil (HAMAGUCHI *et al.*, 2007) e em tratamento aditivo de swainsonina e cisplatina em células de carcinoma ascítico de Ehrlich *in vivo* (SANTOS *et al.*, 2011). Dessa forma, pesquisas com essa droga são importantes para um possível uso clínico como sensibilizador, mas também para a determinação do mecanismo pelo qual a perda da *N*-glicosilação do Golgi promove a morte celular.

Apesar de extensamente testada, o mecanismo que propomos na nossa hipótese, ou seja, se swainsonina induz morte celular por meio do acúmulo de proteínas na via secretória e consequentemente pelo disparo de UPR, não foi foco de nenhum trabalho. Assim, para testar a nossa hipótese nas linhagens do nosso modelo, realizamos ensaios com diversas doses dessa substância para definir a concentração ideal para prosseguimento do nosso estudo. Contudo, swainsonina não induziu morte celular, mesmo em concentrações altas (10µg/ml) comparadas às concentrações

utilizadas nos trabalhos acima citados. DE-FREITAS-JUNIOR e colaboradores (2012) também não observaram indução de morte em células de câncer colorretal após tratamento com swainsonina (8 μ g/ml) por 24-72h. Assim, a resposta a essa substância parece ser dependente da linhagem/origem tumoral utilizada.

Além de não resultar em morte celular, verificamos que o tratamento com swainsonina também não induziu UPR nas linhagens estudadas. Esse resultado negativo pode sugerir que as estruturas aberrantes formadas na vigência do tratamento com swainsonina (*N*-glicanos com alta manose), também podem estar funcionando como um mecanismo de aumento de velocidade do fluxo de proteínas na via de secreção proteica. Isso poderia ocorrer pela presença de moléculas, como lectinas, que se ligam ainda dentro do RE em *N*-glicanos aberrantes e ajudam a “carregar” as proteínas pela via de secreção (HAURI *et al.*, 2002).

Considerando os aspectos evolutivos da seleção da superexpressão de MGAT5 em tumores, acreditamos que ela esteja relacionada a alguma característica intrinsecamente ligada a sobrevivência celular. Assim, apesar de ainda não ter sido possível testar nossa hipótese com a inibição de MGAT5, acreditamos que é importante a continuação do estudo, já que não há na literatura dados que mostram se de fato há alguma relação entre a *N*-glicosilação aberrante e o aumento do fluxo de proteínas na via secretória como mecanismo adaptativo ao estresse de RE em células tumorais.

Além dos aspectos já destacados nesse trabalho, acreditamos que essa relação possa se verificar porque evolutivamente representaria uma melhor explicação para a seleção dessa característica em virtualmente todos os tipos tumorais, mesmo em

estágios iniciais de progressão da doença. Apesar de se saber a relação entre *N*-glicosilação aberrante e motilidade, amplamente estudada em diversos modelos, a presença desse padrão aberrante de *N*-glicosilação em tumores “in situ” (CHAMMAS *et al.*, 1994), demonstra que esse não foi o motivo pelo qual essa característica foi selecionada. Dessa forma, é lógico acreditar que essa característica está relacionada com algum mecanismo intrinsecamente relacionado com a sobrevivência celular, como a indução de morte por UPR.

Outro fator que pode sugerir isso é o fato de quase não se encontrar na literatura a inibição transiente (siRNA) de MGAT5, o que poderia mostrar como a expressão dessa proteína está “protegida” nas células. Neste trabalho, tentamos realizar a inibição transiente dessa proteína, contudo sem sucesso. É necessário testar outras sequências de siRNA para poder afirmar que não é possível fazer a inibição transiente dessa proteína, mas vasta pesquisa na literatura mostrou que apenas 2 grupos conseguiram êxito com essa abordagem, enquanto diversos trabalhos mostraram a inibição com o uso de shRNA. É interessante destacar também que o modelo murino “knock-out” para MGAT5 é viável, apresenta reduzida progressão tumoral, susceptibilidade aumentada a doenças auto-imunes e desvios comportamentais (DENNIS *et al.*, 2002).

7. CONCLUSÕES

Por meio dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que as linhagens tumorigênicas do modelo estudado apresentam *N*-glicosilação aberrante, aumento da expressão da enzima MGAT5A e consequentemente, mais *N*-glicanos com ramificações β 1,6-GlcNAc. Além disso, foi possível notar que o bloqueio da *N*-glicosilação nessas linhagens foi mais crucial para a sobrevivência das mesmas frente a um segundo agravo, em relação a linhagem não-tumorigênica melan-a. Por fim, é importante destacar que a interferência na *N*-glicosilação pode se mostrar uma interessante estratégia terapêutica para o tratamento de melanomas.

8. PRÓXIMAS ETAPAS

8.4. Testar outras sequências de siRNA contra MGAT5A, bem como outros veículos de transfecção, como lipofectamina.

8.5. Caso não se obtenha sucesso com o silenciamento transiente, padronizar o silenciamento estável por meio da técnica de shRNA.

8.6. Verificar o efeito do silenciamento de MGAT5A no disparo de UPR e na viabilidade das linhagens estudadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almaraz RT, Tian Y, Bhattacharya R, Tan E, Chen SH, Dallas MR, Chen L, Zhang Z, Zhang H, Konstantopoulos K, Yarema KJ. Metabolic flux increases glycoprotein sialylation: implications for cell adhesion and cancer metastasis. **Molecular & Cellular Proteomics** 2012; 11(7): M112.017558.
- Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm Jr MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ and Sondak VK. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. **Journal of Clinical Oncology** 2009; 27 (36): 6199-6206.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. **Nature Cell Biolololy** 2000; 2: 326–332.
- Bonazzi VF, Stark MS, Hayward NK. MicroRNA regulation of melanoma progression **Melanoma Research** 2012; 22 (2):101-113.
- Botti G, Cerrone M, Scognamiglio G, Anniciello A, Ascierto PA, Cantile M. Microenvironment and tumor progression of melanoma: New therapeutic perspectives. **Journal of Immunotoxicology** 2012 [Epub ahead of print] (doi:10.3109/1547691X.2012.723767).
- Brooks, S.A., Carter, T.M., Royle, L., Harvey, D.J., Fry, S.A., Kinch, C., Dwek, R.A. and Rudd, P.M. Altered glycosylation of proteins in cancer: what is the potential for new anti-tumour strategies. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** 2008; 8: 2–21.
- Burnette WN. “Western Blotting”: eletrophoretic tranfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocelulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry** 1981; 112:195-203.
- Chakraborty AK, Pawelek J, Ikeda Y, Miyoshi E, Kolesnikova N, Funasaka Y, Ichihashi M, Taniguchi N. Fusion hybrids with macrophage and melanoma cells up-regulate N-acetylglucosaminyltransferase V, beta1-6 branching, and metastasis. **Cell Growth & Differentiation** 2001; 12: 623-630.
- Chammas R, Jasiulionis MG, Cury PM, Travassos LR, Brentani RR. Functional hypotheses for aberrant glycosylation in tumor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 1994; 27(2): 505-507.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA; BRIM-3 Study Group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **The New England Journal of Medicine** 2011; 364(26): 2507-2516.

- Chatterjee S, Hirota H, Belfi CA, Berger, SJ, Berger NA. Hypersensitivity to DNA cross-linking agents associated with up-regulation of glucose-regulated stress protein GRP78. **Cancer Research** 1997; 57: 5112–5116.
- Chen IP, Henning S, Faust A, Boukamp P, Volkmer B and Greinert R. UVA-induced epigenetic regulation of P16INK4a in human epidermal keratinocytes and skin tumor derived cells. **Photochemical & Photobiological Sciences** 2012; 11, 180-190.
- Chen X, Ding Y, Liu CG, Mikhail S, Yang CS. Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans. **Carcinogenesis** 2002; 23: 123–130.
- Ciołczyk-Wierzbicka, D., Amoresano, A., Casbarra, A., Hoja-Lukowicz, D., Litynska, A. and Laidler, P. The structure of the oligosaccharides of N-cadherin from human melanoma cell lines. **Glycoconjugate Journal** 2004; 20: 483–492.
- Cummings RD, Kornfeld S. The distribution of repeating [Gal beta 1,4GlcNAc beta 1,3] sequences in asparagine-linked oligosaccharides of the mouse lymphoma cell lines BW5147 and PHAR 2.1. **The Journal of Biological Chemistry** 1984; 259(10): 6253-6260.
- de-Freitas-Junior JC, Bastos LG, Freire-Neto CA, Rocher BD, Abdelhay ES, Morgado-Díaz JA. N-glycan biosynthesis inhibitors induce in vitro anticancer activity in colorectal cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry** 2012; 113(9): 2957-2966.
- de Oliveira LMD. *Resposta diferencial ao estresse de retículo endoplasmático em modelo de melanoma murinho: implicações para quimiossensibilização*. Dissertação (Mestrado em Oncologia Experimental). São Paulo. Universidade de São Paulo, 2010.
- de Souza GA, Godoy LM, Teixeira VR, Otake AH, Sabino A, Rosa JC, Dinarte AR, Pinheiro DG, Silva WA Jr, Eberlin MN, Chammas R, Greene LJ. Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation. **Proteomics** 2006; 6:1460-70. Proteomics. 2006 Mar;6(5):1460-70.
- Demetriou M, Nabi IR, Coppolino M, Dedhar S, Dennis JW. Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. **The Journal of Cell Biology** 1995; 130(2):383-92.
- Dennis JW, Pawling J, Cheung P, Partridge E, Demetriou M. UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice. **Biochimica et Biophysica Acta** 2002; 1573(3): 414-422.
- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Protein glycosylation in development and disease. **Bioessays** 1999a; 21(5): 412-421.

- Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects** 1999b; 1473(1):21-34.
- Dennis JW, Koch K, Yousefi S, Vander E. Growth inhibition of human melanoma tumor xenografts in athymic nude mice by swainsonine. **Cancer Research** 1990; 50: 1867-72.
- Fernandez PM, Tabbara SO, Jacobs LK, Manning FC, Tsangaris TN, Schwartz AM, Kennedy KA, Patierno SR. Overexpression of the glucoseregulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. **Breast Cancer Research and Treatment** 2000; 59: 15–26.
- Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cancer** 2005; 5(7): 526-542.
- Galustian C, Foulds S, Dye JF, Guillou PJ. Swainsonine, a glycosylation inhibitor, enhances both lymphocyte efficacy and tumour susceptibility in LAK and NK cytotoxicity. **Immunopharmacology** 1994; 27(2):165-172.
- Gazit G, Lu J, Lee AS. De-regulation of GRP stress protein expression in human breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research and Treatment** 1999; 54: 135–146.
- Goss PE, Baptiste J, Fernandes B, Baker M, Dennis JW. A phase I study of swainsonine in patients with advanced malignancies. **Cancer Research** 1994; 54(6):1450-1457.
- Goss PE, Reid CL, Bailey D, Dennis JW. Phase IB clinical trial of the oligosaccharide processing inhibitor swainsonine in patients with advanced malignancies. **Clinical Cancer Research** 1997; 3(7):1077-1086.
- Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Pigment Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Cell Research** 2005;18(3):150-159.
- Hakomori, S. Glycosylation defining cancer malignancy: new wine in an old bottle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 2002; 99: 10231–10233.
- Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. **Clinical Cancer Research** 2006; 12(7 Pt 2):2301s-2307s.
- Hamaguchi J, Nakagawa H, Takahashi M, Kudo T, Kamiyama N, Sun B, Oshima T, Sato Y, Deguchi K, Todo S, Nishimura SI. Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines. **Molecular Cancer** 2007; 6:1–9.
- Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. Role of *N*-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality

- control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1994; 91: 913-917.
- Hanahan D , Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011, 144:646-674.
- Hanaizi Z, van Zwieten-Boot Z, Calvo G, Sancho A. The European Medicines Agency review of ipilimumab (Yervoy) for the treatment of advanced (unresectable or metastatic) melanoma in adults who have received prior therapy: Summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. **European Journal of Cancer** 2012 ; 48: 237-242.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Molecular Cell** 2000; 6: 1099–1108.
- Hauri HP, Nufer O, Breuza L, Tekaya HB, Liang L. Lectins and protein traffic early in the secretory pathway. **Biochemical Society Symposium** 2002; (69):73-82.
- Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. **Oncogene** 2003; 22:3053–3062.
- Healy SJM, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. **European Journal of Pharmacology** 2009; 625(1-3):234-246.
- Hersey P, Zhang XD. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. **Pigment Cell Melanoma Research** 2008; 21: 358–367.
- Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2012;13(2):89-102.
- Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, et al. Oligosaccharide specificity of galectins:A search by frontal affinity chromatography. **Biochimica et Biophysica Acta** 2002; 1572: 232–254.
- Hoff P e colaboradores. **Manual de condutas em Oncologia** – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo. Imprensa Oficial do Estado de São Paulo. São Paulo 2010.
- Jamora C, Dennert G, Lee AS. Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1996; 93: 7690–7694.
- Jasiulionis MG, Chammas R, Ventura AM, Travassos LR, Brentani RR. Alpha6beta1-Integrin, a major cell surface carrier of beta1-6-branched oligosaccharides, mediates migration of EJ-ras-transformed fibroblasts on laminin-1 independently of its glycosylation state. **Cancer Research** 1996; 56(7):1682-1689.

- Jiang CC, Chen LH, Gillespie S, Kiejda KA, Mhaidat N, Wang YF, Thorne R, Zhang XD, Hersey P. Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response. **Cancer Research** 2007; 67(12): 5880-5888.
- Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet Radiation and Melanoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery** 2011; 30: 222-228.
- Kaneko M, Alvarez-Manilla G, Kamar M, Lee I, Lee JK, Troupe K, Zhang W, Osawa M, Pierce M. A novel $\beta(1,6)$ -N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-VB). **FEBS Letters** 2003; 554(3): 515–519.
- Kelleher DJ, Gilmore R. An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. **Glycobiology** 2006;16(4):47R-62R.
- Kornfeld, R., and Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. **Annual Review of Biochemistry** 1985; 54: 631-664.
- Kwong LN, Davies MA. Targeted therapy for melanoma: rational combinatorial approaches. **Oncogene** 2013; 1-9.
- Lagana A, Goetz JG, Cheung P, Raz A, Dennis JW, Nabi IR. Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. **Molecular and Cellular Biology** 2006; 26(8):3181-93.
- Lajoie P, Partridge EA, Guay G, Goetz JG, Pawling J, Lagana A, Joshi B, Dennis JW, Nabi IR. Plasma membrane domain organization regulates EGFR signaling in tumor cells. **The Journal of Cell Biology** 2007; 179(2):341-56.
- Lau K, Dennis JW. N-Glycans in cancer progression. **Glycobiology** 2008; 18 (10): 750–760.
- Li M, Song L, Qin X. Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. **Journal of Biosciences** 2010; 35(4):665–673.
- Li Z, Xu X, Huang Y, Ding L, Wang Z, Yu G, Xu D, Li W, Tong D. Swainsonine activates mitochondria-mediated apoptotic pathway in human lung cancer A549 cells and retards the growth of lung cancer xenografts. **International Journal of Biological Sciences** 2012; 8(3):394-405.
- Ling YH, Li T, Perez-Soler R, Haigentz M Jr. Activation of ER stress and inhibition of EGFR N-glycosylation by tunicamycin enhances susceptibility of human non-small cell lung cancer cells to erlotinib. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology** 2009; 64(3): 539-548.
- Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. **Journal of Molecular Biology** 2002; 318: 1351–1365.
- Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? **Nature Reviews Cancer** 2004; 4(12): 966-977.

- Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, Michaud M, Menger L, Gdoura A, Tajeddine N, Tesniere A, Zitvogel L, Kroemer G. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. **Oncogene** 2011; 30(10): 1147-1158.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Molecular and Cellular Biology** 2001; 21: 1249–1259.
- Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis** 2009; 674(1-2):36-44.
- Noda I, Fujieda S, Seki M, Tanaka N, Sunaga H, Ohtsubo T, Tsuzuki H, Fan GK, Saito H. Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin enhances sensitivity to cisplatin in human head-and-neck carcinoma cells. **International Journal of Cancer** 1999; 80(2): 279-284.
- Nakajima S, Hiramatsu N, Hayakawa K, Saito Y, Kato H, Huang T, Yao J, Paton AW, Paton JC, Kitamura M. Selective abrogation of BiP/GRP78 blunts activation of NF- κ B through the ATF6 branch of the UPR: involvement of C/EBP β and mTOR-dependent dephosphorylation of Akt. **Molecular Cell Biology** 2011; 31(8):1710-1718.
- Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, Jasiulionis MG. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia** 2006; 8(3):231-241.
- Ogura T, Noguchi T, Murai-Takebe R, Hosooka T, Honma N, Kasuga M. Resistance of B16 melanoma cells to CD47-induced negative regulation of motility as a result of aberrant N-glycosylation of SHPS-1. **The Journal of Biological Chemistry** 2004; 279(14):13711-13720.
- Ozawa K, Tsukamoto Y, Hori O, Kitao Y, Yanagi H, Stern DM, Ogawa S. Regulation of tumor angiogenesis by oxygen-regulated protein 150, an inducible endoplasmic reticulum chaperone. **Cancer Research** 2001; 61: 4206–4213.
- Park HR, Tomida A, Sato S, Tsukumo Y, Yun J, Yamori T, Hayakawa Y, Tsuruo T, Shin-ya K. Effect on tumor cells of blocking survival response to glucose deprivation. **Journal of the National Cancer Institute** 2004; 96: 1300–1310.
- Pleasant ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, Varela I, Lin ML, Ordóñez GR, Bignell GR, Ye K, Alipaz J, Bauer MJ, Beare D, Butler A, Carter RJ, Chen L, Cox AJ, Edkins S, Kokko-Gonzales PI, Gormley NA, Grocock RJ, Haudenschield CD, Hims MM, James T, Jia M, Kingsbury Z, Leroy C, Marshall J, Menzies A, Mudie LJ, Ning Z, Royce T, Schulz-Trieglaff OB, Spiridou A, Stebbings LA, Szajkowski L, Teague J, Williamson D, Chin L, Ross MT, Campbell PJ, Bentley DR, Futreal PA, Stratton MR. A comprehensive

- catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **Nature** 2010; 463: 191-197.
- Regad T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**. Publicado on-line em 27 de março de 2013. DOI 10.1007/s00018-013-1324-2.
- Roth J, Zuber C, Park S, Jang I, Lee Y, Kysela KG, Le Fourn V, Santimaria R, Guhl B, Cho JW. Protein N-Glycosylation, Protein Folding, and Protein Quality Control. **Molecules and Cells** 2010; 30: 497-506.
- Santos FM, Latorre AO, Hueza IM, Sanches DS, Lippi LL, Gardner DR, Spinosa HS. Increased antitumor efficacy by the combined administration of swainsonine and cisplatin in vivo. **Phytomedicine** 2011; 18(12):1096-1101.
- Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. **Annual Review of Biochemistry** 2005; 74:739-89.
- Shaheen PE, Stadler W, Elson P, Knox J, Winquist E, Bukowski RM. Phase II study of the efficacy and safety of oral GD0039 in patients with locally advanced or metastatic renal cell carcinoma. **Investigational New Drugs** 2005; 23(6):577-581.
- Shen J, Hughes C, Chao C, Cai J, Bartels C, Gessner T, Subject J. Coinduction of glucose-regulated proteins and doxorubicin resistance in Chinese hamster cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1987; 84: 3278–3282.
- Shuda M, Kondoh N, Imazeki N, Tanaka K, Okada T, Mori K, Hada A, Arai M, Wakatsuki T, Matsubara O, Yamamoto N, Yamamoto M. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. **Journal of Hepatology** 2003; 38: 605–614.
- Song L, Ma L, Zhang X, Jiang Z, Liu H, Jiang C. Effect of tunicamycin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells in vitro.[Article in Chinese] **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao** 2012; 32(6): 766-771.
- Song, M. S., Park, Y. K., Lee, J. H., Park, K. Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C- ϵ /ERK/AP-1 signaling cascade. **Cancer Research** 2001; 61: 8322–8330.
- Stanley P. Golgi glycosylation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology** 2011; 3:a005199.
- Sun JY, Yang H, Miao S, Li JP, Wang SW, Zhu MZ, Xie YH, Wang JB, Liu Z, Yang Q. Suppressive effects of swainsonine on C6 glioma cell in vitro and in vivo. **Phytomedicine** 2009; 16(11):1070-1074.
- Sun W, Schuchter LM. Metastatic melanoma. **Current Treatment Options in Oncology** 2001; 2(3):193-202.

- Trombetta, E.S., and Parodi, A.J. Quality control and protein folding in the secretory pathway. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 2003; 19: 649-676.
- Tsao H, Sober AJ. Ultraviolet radiation and malignant melanoma. **Original Research Article Clinics in Dermatology** 1998; 16(1):67-73.
- Tucker MA. Melanoma Epidemiology. **Hematology/Oncology Clinics of North America** 2009; 23(3):383-395.
- Wang, P.H. Altered glycosylation in cancer: sialic acids and sialyltransferases. **Journal of Cancer Molecules** 2005; 1: 73–81.
- Xu YX, Liu L, Caffaro CE, Hirschberg CB. Inhibition of Golgi apparatus glycosylation causes endoplasmic reticulum stress and decreased protein synthesis. **The Journal of Biological Chemistry** 2010; 285(32):24600-24608.
- Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1. **Developmental Cell** 2007;13(3): 365-376.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell** 107, 881–891 (2001).
- Yun J, Tomida A, Nagata K, Tsuruo T. Glucose regulated stresses confer resistance to VP-16 in human cancer cells through a decreased expression of DNA topoisomerase II. **Oncology Research** 1995; 7: 583–590.
- Zaidi MR, Day CP and Merlino G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **Journal of Investigative Dermatology** 2008; 128: 2381–2391.
- Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. **The Journal of Biological Chemistry** 2010; 285(20):15065-15075.
- Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N. Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins. **Federation of European Biochemical Societies Journal** 2008; 275(9):1939-1948.