

JULIA LAURA FERNANDES ABRANTES

"EXPRESSÃO ECTÓPICA DE miR-34a EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO: EFEITOS SOBRE VIAS DE SINALIZAÇÃO RELACIONADAS COM SOBREVIVÊNCIA, PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR"

"ECTOPIC EXPRESSION OF miR-34a IN HUMAN METASTATIC MELANOMA CELLS: EFFECTS ON SIGNALING PATHWAYS RELATED TO SURVIVAL, PROLIFERATION AND CELL DEATH"

CAMPINAS 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA DE PÓS-GRADUACÃO I. B.

JULIA LAURA FERNANDES ABRANTES

"EXPRESSÃO ECTÓPICA DE miR-34a EM CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO HUMANO: EFEITOS SOBRE VIAS DE SINALIZAÇÃO RELACIONADAS COM SOBREVIVÊNCIA, PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR"

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira Halder

"ECTOPIC EXPRESSION OF miR-34a IN HUMAN METASTATIC MELANOMA CELLS: EFFECTS ON SIGNALING PATHWAYS RELATED TO SURVIVAL, PROLIFERATION AND CELL DEATH"

Este	exe	mplar corre	esponde	à redação f	inal
da t	ese	defendida	pelo(a)	candidato	(a)
JUC	iĄ,	LAURA FER	NAWING /	BRANTES	nite Tarresk
		far	ing		
e ap	mva	ba peta Co	missão	uloadora.	

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Doctorate thesis presented to the Biology Institute of the University of Campinas to obtain the ph.D. grade in Functional and Molecular Biology, in Biochemistry.

CAMPINAS 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

 Ab84e
Abrantes, Julia Laura Fernandes, 1984-Expressão ectópica de miR-34a em células de melanoma metastático humano: efeitos sobre vias de sinalização relacionadas com sobrevivência, proliferação e morte celular / Julia Laura Fernandes Abrantes. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.
Orientador: Carmen Veríssima Ferreira Halder. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
1. Câncer. 2. Melanoma. 3. MicroRNAs. 4. Sinalização celular. 5. Morte celular. 1. Ferreira, Carmen Veríssima, 1969-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Ectopic expression of miR-34a in human metastatic melanoma cells: effects on signaling pathways related to survival, proliferation and cell death **Palavras-chave em Inglês**:

Cancer Melanoma microRNAs Cell signaling Cell death **Área de concentração:** Bioquímica **Titulação:** Doutora em Biologia Funcional e Molecular **Banca examinadora:** Carmen Veríssima Ferreira Halder [Orientador] Carmen Silvia Passos Lima Silvya Stuchi Maria Engler Ana Carolina Santos de Souza Galvão Enilza Maria Espreafico Data da defesa: 15-03-2013 **Programa de Pós Graduação:** Biologia Funcional e Molecular Campinas, 15 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carmen Verissima Ferreira Halder (Orientadora)

Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima

Assinatura Assinatura

Assinatura

Inclarding Jantes de Jaura Gabrae

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria Engler

Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão

Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo

Dra. Luciana Maria de Hollanda

"Quando tudo nos parece dar errado Acontecem coisas boas Que não teriam acontecido Se tudo tivesse dado certo."

Renato Russo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sandra e Joaquim**, que sempre me apoiaram na busca pela realização dos meus sonhos, e que me ensinaram, desde cedo, a importância de se batalhar por um objetivo, de perseverar em seus ideais e de fazer com muito amor tudo o que se propõe a fazer em vida.

E ao meu esposo, **Halley**, companheiro na vida, no amor e nos sonhos, que sempre esteve presente nos momentos difíceis, me ajudando a superá-los, e que compartilhou comigo muitos momentos de alegria, que ficarão eternizados em minha memória.

V

AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre comigo, guiando meus passos e dando-me saúde e força para lutar por meus objetivos.
- À minha família e ao meu esposo, por quem vivo hoje e sempre, agradeço por todo o apoio, compreensão e paciência nos momentos difíceis, e pelo imenso amor e carinho que tornam especiais cada dia da minha vida.
- Aos meus sogros, Imaculada e Reni, e a minha cunhada, Lorena, agradeço pelo carinho e afeto que sempre tiveram por mim. É um privilégio poder ter pessoas tão maravilhosas como vocês em minha vida, e agradeço muito a Deus por tê-los hoje como minha família.
- À minha orientadora, Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder, agradeço pela oportunidade de fazer o doutorado sob sua supervisão, pela confiança em meu trabalho, por toda a ajuda e orientação, e por ser pra mim um exemplo de como ser uma grande profissional.
- Aos meus amigos e padrinhos de casamento, Paula, Flávia e Cláudio, agradeço pela amizade, lealdade, pelo carinho, e por terem tornado tantos momentos da minha vida especiais e inesquecíveis.
- As minhas amigas Daisy e Mika, agradeço pela amizade e convívio diários, pelo companheirismo, pelas conversas e pelas boas risadas, pelos almoços e festinhas juntos e por todos os ensinamentos e ajuda no laboratório.
- Ao Gilbert, meu querido professor de inglês, amigo, confidente e terapeuta, agradeço muito pelo carinho, pelas conversas e palavras de incentivo, e por ter me ajudado a superar o medo de falar inglês.

- A todos os meus amigos do laboratório, Rodrigo, Sarah, Karin, Josélia, Cíntia, Thaís, Renato, Bispo e Roberta, agradeço pela companhia diária, pelas conversas, pelas palavras de carinho e incentivo e pela contribuição direta ou indireta para a realização do meu trabalho de doutorado.
- A Milena, minha aluna de iniciação científica, que mais do que aluna foi uma amiga leal. Agradeço a ela por ter-me dado a oportunidade de aprender como ensinar e a ser paciente, e ainda por ter-me ajudado em inúmeros experimentos.
- As técnicas do laboratório, Denise e Cláudia, agradeço pela acolhida e por todo o apoio técnico e pessoal.
- Ao Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, agradeço pelo apoio, pelo carinho, pelas palavras amigas de incentivo e pelo suporte profissional e material.
- À Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler, agradeço por ter-nos cedido as linhagens de melanoma que utilizei durante o meu doutorado e pela colaboração nos experimentos com melanócitos.
- Aos professores: Prof. Dr. Jörg Kobarg, Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima e a Profa. Dra. Ana Carolina Santos de Souza Galvão, agradeço pela participação em meu exame de qualificação, e pela contribuição para a melhoria da qualidade do trabalho.
- Aos professores: Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero, Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, Prof. Dr. Marcelo Lancellotti, Profa. Dra. Ione Salgado, agradeço por terem cedido, gentilmente, os equipamentos de seus laboratórios.
- ✤ À FAPESP, agradeço pelo apoio financeiro concedido.
- E, por fim, agradeço a todos aqueles que fizeram parte deste trabalho direta ou indiretamente.

SUMÁRIO

RESUMOx
ABSTRACTxii
LISTA DE ABREVIATURASxiv
LISTA DE FIGURASxxii
LISTA DE TABELASxxvi
1. INTRODUÇÃO1
1.1. Câncer: Características gerais e aspectos epidemiológicos2
1.2. Terapêutica do câncer
1.3. Melanoma: Modelo para estudo dos mecanismos associados à agressividade,
metástase e resistência a fármacos4
1.4. Alterações moleculares associadas ao estabelecimento e progressão do
melanoma7
1.5. Terapêutica do melanoma15
1.6. Ciclo celular, apoptose e autofagia: Três processos importantes no contexto
tumoral17
1.6.1. Ciclo celular: Aspectos moleculares e regulação17
1.6.2. Apoptose: Aspectos moleculares e regulação21
1.6.3. Autofagia: Aspectos moleculares e regulação25
1.7. RNA de interferência como estratégia para inibir a progressão do câncer31
1.8. p53 e miR-34a constituem uma importante via supressora de tumor34
1.9. Justificativa do trabalho
2. OBJETIVO

3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1. Materiais	46
3.2. Cultura de células e caracterização das linhagens celulares	47
3.3. Transfecções: microRNA e siRNA	48
3.4. Tratamento com quimioterápicos cisplatina, doxorrubicina e temozo	olomida53
3.5. Ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT	53
3.6. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting	54
3.7. Análise do fluxo autofágico	56
3.8. Microscopia Confocal	56
3.9. Microscopia eletrônica de transmissão	57
3.10. Extração de RNA	
3.11. Síntese de cDNA	58
3.12. qRT-PCR	59
3.13. Análise estatística dos resultados	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÕES	103
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

RESUMO

O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele. Seu tratamento permanece como um grande desafio, já que em estágio avançado torna-se extremamente refratário aos tratamentos convencionais. miR-34a é um microRNA supressor de tumor com expressão normalmente reduzida em células cancerosas. A fim de investigar o papel de miR-34a como supressor do melanoma, o principal objetivo deste estudo foi identificar alvos moleculares modulados pela expressão ectópica de miR-34a na linhagem celular de melanoma metastático humano SK-mel-103. miR-34a reduziu significativamente a viabilidade das células de melanoma, o que deve estar relacionado, pelo menos em parte, com o aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax, ativação da caspase-3 e clivagem da PARP-1. Estes dados sugerem que miR-34a foi capaz de induzir apoptose nas células de melanoma. Além disso, houve redução na expressão de CDK4, CDK6, E2F3 e pRb, proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular. Aumento na expressão de p21, um inibidor de CDKs, também foi observado nessas células. Algumas moléculaschave envolvidas com os processos de proliferação celular e apoptose, como proteínas oncogênicas (Axl, AKT, ERK 1/2, β-catenina e c-myc) e proteínas supressoras de tumor miR-34a, respectivamente. (p53 e PTEN), foram "down- e upreguladas" por Interessantemente, o fluxo autofágico foi aumentado por miR-34a, efeito que não foi correlacionado com alterações adicionais na viabilidade das células de melanoma. O aumento no fluxo autofágico ocorreu, provavelmente, como uma resposta celular ao estresse de retículo e a agregação de proteínas induzidos por miR-34a, fenômenos que também podem ter contribuído para a indução de apoptose nesse contexto. Os dados obtidos neste estudo trouxeram novos aspectos moleculares da ação de miR-34a como

Х

supressor tumoral, e permitem apontar este microRNA como um potencial alvo terapêutico contra o melanoma metastático humano.

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer. Its treatment remains a big challenge, since in advanced stage it is extremely refractory to conventional treatments. miR-34a has emerged as an important tumor suppressor, and its expression is normally reduced in cancer cells. To provide more information about the role of miR-34a as a melanoma suppressor, the main goal of this study was to identify key molecular players modulated by ectopic expression of this microRNA in the metastatic melanoma cell line SK-mel-103. miR-34a caused a reduction of melanoma cells viability, what may be related, at least in part, with the increased expression of pro-apoptotic marker, Bax, activation of caspase 3 and PARP-1 cleavage, which indicates that miR-34a triggered apoptosis in melanoma cells. In addition, the expression of CDK4, CDK6, E2F3 and pRb, proteins related to the cell cycle progression, was reduced. An increase in p21 expression, a CDK inhibitor, was also detected in these cells. Some key molecules involved with proliferation and apoptosis processes, such as oncogenic proteins (Axl, AKT, ERK 1/2 kinases, β catenin and c-myc) and tumor suppressor proteins (p53 and PTEN), were down- and upregulated by miR-34a, respectively. Interestingly, the autophagic flux was stimulated by miR-34a, but this effect was not correlated with further alterations in cell viability. The increased autophagy occurred probably as a cellular response against the reticulum stress and the protein aggregation induced by miR-34a in melanoma cells, which can also be contributing to the cell death by apoptosis in this context. Our findings brought up novel molecular aspects about the role of miR-34a as melanoma suppressor. The broad action of this microRNA on key molecular players of melanoma aggressiveness was crucial for

reprogramming these cells in favor of apoptosis. Altogether, this study pointed out miR-34a as a potential therapeutic agent against advanced melanoma.

LISTA DE ABREVIATURAS

- λ : comprimento de onda
- µg/mL: micrograma por mililitro
- μL: microlitros
- µm: micrômetro
- μM: micromolar
- °C: graus celcius
- ADP: adenosina difosfato
- AGO: proteína argonauta
- AKT: PKB ou proteína quinase B
- ANOVA: análise de variância
- APAF-1: fator ativador de protease apoptótica-1
- APC: proteína adenomatous polyposis coli
- ARF: ADP-ribosylation factor
- ASK1: proteína quinase reguladora do sinal apoptótico-1
- ATF: fator de transcrição dependente de AMP cíclico
- ATM: proteína serina quinase ATM
- ATP: adenosina trifosfato
- ATR: Proteína serina treonina quinase ATR
- Axl: receptor tirosina quinase UFO
- Bax: proteína reguladora da apoptose Bax
- Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer

Bcl-2: proteína reguladora da apoptose Bcl-2

BCR-ABL: proteína tirosina quinase BCR-ABL

BER: sistema de reparo de excisão de bases

Bid: BH3-interacting domain death agonist

Bim: Bcl-2-like protein 11

Bip: GRP78 ou proteína regulada por glicose de 78 kDa

BRAF: V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

BSA: albumina de soro bovino

Ca²⁺: íon cálcio

c-Abl: proto-oncogene c-Abl

CDC25: Fosfatase de especificidade dual CDC25

CDK: proteína quinase dependente de ciclina

CDKN2A: Inibidor 2A de quinase dependente de ciclina

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

CHK: proteína serina-treonina quinase CHK

CK: proteína caseína quinase

CKI: inibidores de proteína quinase dependente de ciclina

CLQ: cloroquina

CMA: autofagia mediada por chaperonas

cm²: centímetros quadrados

CO₂: dióxido de carbono

CTL: controle

DEPC: dietilpirocarbonato

DMEM: meio Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

Drosha: ribonuclease 3

dsRNA: ácido ribonucleico de fita dupla

DTIC: dacarbazina (5-(3,3-Dimethyl-1-triazenyl)imidazole-4-carboxamide)

DTT: ditiotreitol

E2F: fator de transcrição E2F7

ECL: enhanced chemiluminescence

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

eIF2a: fator iniciador da tradução eucariótico 2 alfa

EPM: erro padrão da média

ERK1/2: proteína quinase ativada por mitógeno p44/42

FDA: Food and Drug Administration

g: RCF ou força centrífuga relativa

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GβL: proteína G subunidade β-like

GLTSCR2: Glioma tumor suppressor candidate region gene 2

GRP78: Bip ou proteína regulada por glicose de 78 kDa

GSK3: glicogênio sintase quinase 3

GTP: trifosfato de guanosina

h: hora

H₂O: água

HeLa: células de carcinoma de colo de útero humano

HIF-1α: Fator induzido por hipóxia 1α

HCl: ácido clorídrico

HCT116: célula de adenocarcinoma de cólon humano

HRP: peroxidase de rabanete

Hsp: proteína de choque térmico

IAP: proteína inibidora da apoptose

IC50: concentração do composto que diminui em 50% a viabilidade celular

INCA: Instituto Nacional do Câncer

INFABIC: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica aplicada a Biologia

Celular

IRE-1: Proteína serina/treonina quinase/endoribonuclease IRE-1

JNK: proteína quinase c-Jun N-terminal

LAMP-2A: Lysosome-associated membrane glycoprotein 2

LC3: microtubule-associated protein light chain 3

LIPO: lipofectamina

LMWPTP: proteína fosfatase de baixo peso molecular

LN-18: células de glioblastoma maligno humano

M: molar

MDM2: ubiquitina ligase MDM2

MDR: resistência à múltiplas drogas

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

MAPKK: MAPK quinase

MAPKKK: MAPK quinase quinase

mg/mL: miligramas por mililitros

min: minuto

miR: microRNA

MITF: fator de transcrição associado à microftalmia

mL: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

MMP: metaloproteinase

MTOC: centro organizador de microtúbulos

mTOR: proteína serina/treonina quinase alvo da rapamicina

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

NaCl: cloreto de sódio

NaF: fluoreto de sódio

nM: nanomolar

nm: nanômetro

NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

OsO₄: tetróxido de ósmio

p21: inibidor 1 de quinase dependente de ciclina

p38: proteína quinase ativada por mitógeno p38

p53: proteína 53 ou proteína supressora de tumor 53

p62: SQSTM1 ou sequestrosomo 1

PARP-1: poli(ADP-ribose) polimerase

PBS: solução tampão fosfato

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

PCR: reação em cadeia da polimerase

PDK-1: 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1

PE: fosfatidiletanolamina

PERK: RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase

PFA: paraformaldeído

pH: potencial hidrogêniônico

PI3K: fosfatidilinositol-3 quinase

PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

PKB: proteína quinase B ou AKT

PMSF: fenil-metano(sulfonil)fluoreto

PP1a: proteína serina/treonina fosfatase PP1 subunidade catalítica alfa

PP2A: proteína serina/treonina fosfatase 2A

pRb: proteína retinoblastoma

PTEN: proteína fosfatase e homólogo de tensina

PTP4A3: proteína tirosina fosfatase tipo 4A3

PVDF: polivinilideno fluorido

q.r: quantidade relativa

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa

Rb: retinoblastoma

RE: retículo endoplasmático

RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: ácido ribonucleico de interferência

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

ROCK: Proteína quinase associada a Rho

rpm: rotação por minuto

s: segundo

SDS: dodecil sulfato de sódio

Ser: serina

SFB: soro fetal bovino

SHP-2: proteína tirosina fosfatase não-receptor tipo 11

SK-mel-28: célula de melanoma metastático humano

SK-mel-103: célula de melanoma metastático humano

SK-mel-147: célula de melanoma metastático humano

siRNA: pequeno ácido ribonucleico de interferência

SQSTM1: p62 ou sequestrosomo 1

TBS: tampão salino Tris

TBST: tampão salino Tris com Tween 20

TGF-β: fator de crescimento transformador beta

Thr: treonina

TMZ: temozolomida

TNF: fator de necrose tumoral

Tyr: tirosina

U6: pequeno RNA nuclear U6

u.a.: unidade arbitrária

U/mL: unidade por mililitro

Ub: ubiquitina

UBA: domínio de associação a ubiquitina

UBC-3: Enzima conjugadora de ubiquitina E2

UPR: resposta a proteínas não-enoveladas

UTR: região não traduzida

- UV: radiação ultravioleta
- XBP-1: X-box-binding protein 1
- YB-1: Y-box-binding protein 1
- Wee1: protein quinase wee1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Progressão do melanoma7
Figura 2. Principais vias de sinalização associadas à progressão do melanoma10
Figura 3. Visão geral da via Wnt/β-catenina12
Figura 4. Vias de sinalização dependente e independente de Smads induzidas por TGF- β
Figura 5. Os estágios do ciclo celular20
Figura 6. Esquema representativo da ativação de E2F por complexos CDK-ciclina20
Figura 7. Vias de sinalização apoptóticas25
Figura 8. Tipos de autofagia29
Figura 9. Autofagia seletiva e não-seletiva
Figura 10. Mecanismo de RNAi
Figura 11. Modelo da rede p53/miR-34 na regulação da proliferação e morte celular37 xxii

Figura 12. Análise comparativa da expressão de miR-34a entre as linhagens celulares de
melanoma metastático humano SK-mel-103, SK-mel-147 e SK-mel-2864
Figura 13. Associação entre as principais mutações presentes nas linhagens celulares SK-
mel-103, SK-mel-147 e SK-mel-28 e a expressão de miR-34a64
Figura 14. Expressão de miR-34a e algumas de suas proteínas-alvo após transfecção de
células SK-mel-103 com mímico do miR-34a66
Figura 15. Análise da viabilidade de células SK-mel-103 após transfecção com mímico do
miR-34a
Figura 16. Expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular após transfecção de células
SK-mel-103 com mímico do miR-34a
Figura 17. Expressão de proteínas relacionadas com apoptose após transfecção de celulas
SK-mel-103 com mímico do míR-34a
Figura 18. Expressao da proteina p53 apos transfecção de celulas de melanoma com
$\mathbf{E} = \frac{10}{10} \mathbf{L} = \frac{10}{10} \mathbf{L} = \frac{10}{100} \mathbf{L} = \frac{100}{100} \mathbf{L} = \frac{100}{10$
Figura 19. Localização subcelular de p53 apos transfecção de celulas SK-mel-103 com
mimico do mik-34a por 24 noras

Figura	20.	Localização	subcelular	de	p53	após	transfecção	de	células	SK-mel-	103	com
mímico	do 1	miR-34a por	48 horas									77

Figura 25. Expressão de marcadores associados com estresse de retículo e agregação de proteínas após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a......93

Figura 27. Análise da sensibilidade aos quimioterápicos temozolomida, cisplatina e doxorrubicina após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a......95

Figura 28. Análise da expressão de TGF-β2 e seus alvos após transfecção de células SKmel-103 com siRNA contra TGF-β2 ou transfecção com mímico do miR-34a......98

Figura 30. Expressão de marcadores importantes para a progressão do melanoma após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a......102

Figura 31. Resumo esquemático das principais alterações moleculares induzidas pela expressão ectópica de miR-34a em células de melanoma metastático humano......106

LISTA DE TABELAS

Tabela	1. (Caracteriza	ção	das linh	agens celula	res SK	C-me	el-103, SK-m	el-1	47 e SK-mel	-28
quanto	à	estrutura	de	genes	essenciais	para	0	surgimento	e	progressão	do
melanoi	ma		•••••						•••••		.48

– INTRODUÇÃO –

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: Características gerais e aspectos epidemiológicos

A tumorigênese em humanos é um processo de múltiplas etapas que refletem alterações genéticas capazes de governar a transformação progressiva de células normais para células malignas. Embora existam inúmeros tipos distintos de cânceres, seis alterações em comum têm sido apontadas como essenciais para a transformação maligna: autosuficiência em sinais pró-crescimento, refratariedade a sinais anti-crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), ilimitado potencial replicativo, sustentada angiogênese e capacidade de invasão tecidual (metástase) (Revisado por Hanahan & Weinberg, 2000). Avanços conceituais conquistados na última década a respeito dos mecanismos tumorigênicos permitiram a inclusão de duas novas características a esta lista de generalidades do câncer: capacidade de reprogramação do metabolismo energético e evasão da destruição pelo sistema imune. Células tumorais são ainda capazes de recrutar células normais, que por sua vez contribuem para a criação de um microambiente essencial para a aquisição do rol de características tumorais citados anteriormente (Revisado por Hanahan & Weinberg, 2011).

Embora progresso considerável tenha sido alcançado na compreensão dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento e progressão tumoral, o câncer permanece como um importante problema de saúde pública (Revisado por Siegel et al., 2012). Reduzir a incidência e a taxa de mortalidade por câncer requer o desenvolvimento de regimes diagnósticos e terapêuticos mais eficazes. Para isso, torna-se fundamental a investigação e

elucidação dos mecanismos associados à aquisição das oito características essenciais a transformação maligna.

1.2. Terapêutica do câncer

Células cancerosas podem ser removidas cirurgicamente, ou destruídas por compostos químicos tóxicos ou radiação. Apesar de serem essas as abordagens terapêuticas mais exploradas atualmente para o tratamento do câncer, todas apresentam limitações significativas. Cirurgias costumam ser efetivas apenas para a eliminação de tumores não-metastáticos ou em estágio inicial da progressão tumoral (tumor primário), uma vez que raramente podem eliminar todas as metástases. Muitos tratamentos radio- e quimioterápicos que visam a morte das células tumorais são pouco específicos, causando a morte concomitante de células normais. Além disso, apesar da maioria das células tumorais serem mortas por radiação ou quimioterapia, uma pequena população de células-tronco cancerosas de replicação lenta é dificilmente eliminada. Se mesmo poucas células-tronco cancerosas permanecem, essas podem regenerar o tumor. Diferentemente de células normais, células cancerosas sofrem mutações adicionais rapidamente e podem desenvolver resistência a fármacos e a radiação empregadas contra elas (Alberts et al., 2010).

A resistência a quimioterápicos é um problema central no câncer, e pode emergir como um evento espontâneo ou ser adquirida pelo tratamento prolongado com agentes antineoplásicos (Kappelmayer et al., 2004; Nobili et al. 2006). Os mecanismos adquiridos de resistência a drogas são bastante variáveis e ilustram a perspicácia das células cancerosas em evadir aos mecanismos de morte induzidos pelos quimioterápicos. Alguns desses mecanismos envolvem a perda da habilidade em "importar" moléculas de fármacos pela membrana plasmática, ou ganho de habilidade em "exportar" moléculas de fármacos para fora da célula através da membrana. Outros dependem do ganho de habilidade em metabolizar moléculas de fármacos, utilizando para isso a mesma maquinaria enzimática usada por células normais para a detoxificação de compostos tóxicos que atinjem o interior da célula. Muitas células tumorais são capazes de desativar componentes da sua maquinaria apoptótica, ou podem, ainda, apresentar uma capacidade aumentada em reparar moléculas de DNA danificadas pela ação de quimioterápicos ou radiação (Weinberg, 2008).

Independente de sua origem, o processo de resistência a quimioterápicos tem se tornado um importante obstáculo no tratamento de pacientes com câncer, contribuindo para a redução na taxa de sobrevida desses pacientes. Trata-se de um mecanismo multifatorial, cujos detalhes moleculares ainda estão sendo investigados. Por esse motivo, a busca pelas bases moleculares da resistência a fármacos tem ganhado força entre os pesquisadores da área nos últimos anos, visando desenvolver estratégias de tratamento mais específicas e eficazes (Sirichanchuen et al., 2012).

1.3. Melanoma: Modelo para estudo dos mecanismos associados à agressividade, metástase e resistência a fármacos

Os melanomas são cânceres originados da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de pigmento presentes na camada basal da epiderme e especializadas na produção de melanina. Os melanócitos produzem a enzima tirosinase, que converte o aminoácido tirosina a um precursor da melanina. A tirosinase é sintetizada e transferida, no complexo de Golgi, para os melanossomas, que passam a sintetizar a melanina. Os melanócitos apresentam longos prolongamentos dendríticos que acumulam melanossomas e

se estendem até os queratinócitos. Através dos dendritos, os melanossomas são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos (Revisado por Wilkerson, 2011). Nos queratinócitos a melanina é liberada e tem a função de proteger o material genético dessas células dos danos causados pela radiação ultravioleta (UV) solar, através de absorção da radiação UV (revisado por Pacheco et al., 2011).

Os fatores de risco para o surgimento do melanoma podem ser classificados como genéticos ou ambientais, sendo a exposição excessiva a radiação UV o fator ambiental mais importante. A exposição a esses fatores pode levar a uma série complexa de eventos genéticos e moleculares capazes de inativar genes supressores de tumor e ativar proto-oncogenes nos melanócitos, dando origem ao melanoma (Markovic et al., 2007; revisado por Pacheco et al., 2011).

Após a transformação maligna dos melanócitos, os melanomas passam por um processo de transformação seqüencial em que o nevo (também conhecido como pinta) alcança uma fase de crescimento radial displásico (**Figura 1**). Esta fase é seguida por uma fase de crescimento vertical que requer alta atividade angiogênica, o que, por sua vez, contribui para a metástase das células de melanoma. Entretanto, o passo mais crítico para a metástase é o espalhamento do melanoma para os vasos linfáticos ao redor do tumor. Seguindo a invasão dos linfonodos, as células de melanoma metastatizam para o pulmão, fígado, cérebro e outros locais (Revisado por Mahabeleshwar & Byzova, 2007).

Melanomas são cânceres conhecidos por seu caráter altamente agressivo e invasivo, o que os tornam excelentes modelos para a investigação desses processos (Segura et al., 2009). No Brasil, segundo dados divulgados pelo Instituto Nacional do câncer (INCA), o câncer de pele continua sendo o tipo mais incidente de câncer, e foi estimado para o ano de 2012 o surgimento de 62.680 novos casos de câncer do pele tipo não melanoma e 3.170 novos casos de câncer de pele do tipo melanoma em homens; para as mulheres, a estimativa foi do surgimento de 71.490 novos casos de câncer de pele do tipo não melanoma e 3.060 casos de câncer de pele do tipo melanoma (Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil, INCA. Disponível na Biblioteca Virtual da Saúde do Ministério da Saúde: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/controle_cancer). Apesar de representar menos de 5% dos casos de câncer de pele, o melanoma é uma doença extremamente letal, sendo responsável por 80 a 85% dos óbitos associados ao câncer de pele e por 1% de todos os óbitos associados ao câncer no Brasil (Mendes et al., 2010). Outro aspecto importante a ser considerado é que o melanoma afeta pacientes na plenitude de suas vidas. Cerca de 60% dos pacientes são diagnosticados antes dos 65 anos de vida e, na faixa etária de 15-34 anos de idade, o melanoma é o câncer mais comum (com excessão do câncer de pele não melanoma) (Cancer Research, UK 2009; Surveillance Epidemiology and End Results 2009; National Comprehensive Cancer Network 2010).



Figura 1. *Progressão do melanoma*. A proliferação aberrante de melanócitos normais leva a formação de um nevo benigno. A rápida proliferação de melanócitos transformados leva a formação de um nevo displásico, que é assimétrico e com bordas irregulares. Segue-se uma rápida fase de crescimento radial, que é caracterizada pelo crescimento intraepidermal. A seguir ocorre uma fase de crescimento vertical, também conhecida como fase de invasão dermal. O melanoma estimula uma rápida vascularização peritumoral, fornecendo suprimento nutricional para o tumor em desenvolvimento e servindo como rota adicional para a metástase (Adaptado de Mahabeleshwar & Byzova, 2007).

1.4. Alterações moleculares associadas ao estabelecimento e progressão do melanoma

Muitos dos traços fenotípicos exibidos por células tumorais são provocados por alterações genéticas que envolvem mutações associadas ao ganho-de-função, amplificação e/ou superexpressão de oncogenes, juntamente com mutações associadas à perda-defunção, deleção e/ou silenciamento epigenético de genes supressores de tumor (Hahn & Weinberg, 2002). Entre as alterações genéticas mais frequentes em melanoma encontram-se mutações em *BRAF*, responsável pela ativação da via de sinalização MAPK/ERK, e *NRAS*, responsável pela ativação das vias MAPK/ERK e PI3K/AKT (Revisado por Rebecca et al., 2012). Além disso, mutações no gene CDKN2A e nos genes da β -catenina e PTEN, também são frequentes e estão fortemente associados à progressão do melanoma.

Diversos estudos têm mostrado que mutações oncogênicas no gene *BRAF* ocorrem em 50-70% dos melanomas (Davies et al., 2002; Revisado por Rebecca et al., 2012). A mutação mais frequente observada (> 85%) é a substituição de um único aminoácido valina por um ácido glutâmico na posição 600 (mutação B-Raf V600E), que é suficiente para conferir ativação constitutiva da via de sinalização MAPK/ERK que, por sua vez, promove a progressão do tumor e metástase através de aumento da proliferação, sobrevivência, motilidade e capacidade de invasão (**Figura 2**) (Revisado por Rebecca et al., 2012).

A via da PI3K/AKT tem se mostrado ativa em vários cânceres, o que tem sido relacionado, em grande parte, a presença de mutações no gene supressor de tumor PTEN (Steelman et al., 2004; Revisado por Lopez-Bergami et al., 2008). A AKT/ proteína quinase B (PKB) é uma serina/treonina quinase que, uma vez ativada por fosforilação de seus resíduos Ser^{473/474} e Thr^{308/309} (Harlan et al., 1995; Nicholson & Anderson, 2002), estimula a transcrição de uma ampla gama de genes envolvidos com proliferação celular, inibição da apoptose e sobrevivência celular (Figura 2) (Nicholson & Anderson, 2002). O gene PTEN codifica uma fosfatase cuja função primária é desfosforilar o produto da PI3K (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, ou PIP3), o que impede a ativação da quinase PDK-1 que é responsável pela fosforilação e ativação da AKT (Simpson & Parsons, 2001). A perda de uma PTEN funcional causa acúmulo desse segundo mensageiro lipídico, o que por sua vez aumenta a atividade da AKT levando a uma consequente redução na taxa apoptótica e aumento da sinalização mitogênica (Wu et al., 2003). A taxa de mutação do gene PTEN encontra-se em torno de 30-50% em linhagens celulares de melanomas, sendo 57-70% dessas mutações representadas por deleções homozigotas do gene PTEN (Guldberg et al., 1997; Tsao et al., 1998; Revisado por Lopez-Bergami, 2008). Mesmo na ausência de alterações genéticas o nível protéico de PTEN tem se mostrado ausente ou muito reduzido em melanomas metastáticos devido à presença de mecanismos de silenciamento epigenéticos ou aumento da ubiquitinação dessa proteína (Revisado por Lopez-Bergami, 2008). A expressão ectópica de PTEN demonstrou suprimir o crescimento (Robertson et al., 1998), a tumorigenicidade e a metástase em melanoma (Hwang et al., 2001). Além disso, estudos conduzidos com a utilização de inibidores da PI3K mostraram a ocorrência de inibição da proliferação e sensibilização de linhagens celulares de melanoma aos tratamentos radio- e quimioterápicos (Hennessy et al., 2005). Em conjunto, esses dados demonstram que PTEN e PI3K desempenham papéis chave na tumorigênese do melanoma.

O gene CDKN2A codifica os inibidores de quinases dependentes de ciclina (CDKs) $p16^{INK4a}$ e $p14^{ARF}$. Mutação, metilação e deleção do gene CDKN2A têm sido descritos tanto em melanomas esporádicos quanto em familiares, ocorrendo em cerca de 80% dos casos (Revisado por Da Forno & Saldanha, 2011). Essas alterações no gene CDKN2A tem sido associadas à evasão da apoptose e da senescência e ao aumento na proliferação, o que dá suporte ao crescimento tumoral descontrolado (**Figura 2**) (Revisado por Ji et al., 2010).


Figura 2. *Principais vias de sinalização associadas à progressão do melanoma*. A via da MAPK/ERK, da PI3K/AKT e a fosfatase PTEN estão mostradas em azul. CDKN2A, responsável pela expressão dos inibidores de CDKs p14 e p16, também está representado na figura (Adaptado de Da Forno & Saldanha, 2011).

A β-catenina é uma proteína de fundamental importância para a biologia do melanoma. Ela pode atuar em associação com caderinas, constituindo as junções aderentes fundamentais para o processo de adesão célula-célula, e pode, além disso, atuar como fator de transcrição, ativando a transcrição de genes-alvo da via de sinalização Wnt (**Figura 3**). A sinalização pela via Wnt é um dos mecanismos fundamentais que governam a proliferação celular, desenvolvimento embrionário e homeostase tecidual. Dada sua importância, mutações na via da Wnt têm sido freqüentemente associadas a doenças, em especial ao câncer. Na ausência de ligação da glicolipoproteína extracelular Wnt com seu receptor, a proteína β-catenina citosólica é constantemente degradada por ação do complexo Axina, composto pelas proteínas Axina, APC, caseína quinase 1 (CK1) e glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) (**Figura 3**). CK1 e GSK3 fosforilam a região aminoterminal da β-catenina, resultando em reconhecimento da β-catenina pela proteína β-Trcp,

uma E3 ubiquitina ligase, e subsequente ubiquitinação e degradação proteasomal da β catenina. Esta contínua eliminação da β -catenina previne que ela alcance o núcleo, fazendo com que os genes-alvo da via Wnt permaneçam reprimidos. A via Wnt/ β -catenina é ativada quando Wnt se liga a seu receptor de membrana, induzindo vários eventos moleculares que culminam com a inibição da fosforilação da β -catenina pelo complexo Axina, o que contribui para a estabilização da β -catenina e permite seu acúmulo intracelular e direcionamento para o núcleo, onde forma complexos com TCF/LEF e ativa a expressão dos genes-alvo da via Wnt, como c-myc e ciclina D1 (Revisado por MacDonald et al., 2009).

A freqüência de β -catenina mutada em melanomas é bastante elevada o que, em geral, tem sido associado com sua ativação (Revisado por Lopez-Bergami et al., 2008; Damsky et al., 2011). Um dos alvos transcricionais ativados pela via Wnt/ β -catenina de importância para a biologia do melanoma é o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF). Assim como ocorre com a β -catenina, a expressão de MITF apresenta-se desregulada em melanomas, e induz aumento da diferenciação melanocítica e pigmentação, o que tem sido associado ao ganho de potencial metastático (Damsky et al., 2011). MITF pode, ainda, ser regulado pela via da MAPK/ERK (**Figura 2**) (Revisado por Göppner & Leverkus, 2011).



Figura 3. *Visão geral da via Wnt/β-catenina*. Na ausência de Wnt (-Wnt) a β-catenina forma complexo com as proteínas APC, GSK3β e axina, é fosforilada por GSK3β e subsequentemente multiubiquitinada (Ub) e degradada em proteassomas. A ligação de Wnt ao receptor frizzled ativa DSH, que por sua vez bloqueia a formação do complexo APC, GSK3β e axina, resultando em acúmulo de β-catenina citosólica (+Wnt). Como consequência, a β-catenina transloca-se para o núcleo e e se associa com os fatores de transcrição TCF/LEF. Os complexos TCF/β-catenina ligam-se ao DNA e ativam os genes alvos de Wnt, como c-myc e ciclina D1. (Adaptado de Poser & Bosserhoff, 2004).

Damsky e colaboradores (2011), utilizando modelo *in vivo* de melanoma baseado em camundongos mutantes para ativação de *BRAF* e deleção de PTEN, demonstraram que a estabilização da β -catenina nesse contexto era capaz de tornar o melanoma altamente metastático, de rápido crescimento e altamente diferenciado. Entretanto, em presença de níveis normais de PTEN, a ativação de B-Raf e estabilização da β -catenina promoveram diferenciação do tumor, mas não foram capazes de induzir metástase, o que reafirma o importante papel da PTEN nesse processo. Esse trabalho deixou evidente a existência de uma relação mútua entre as vias da MAPK/ERK, PI3K/AKT e Wnt/ β -catenina na promoção de um fenótipo altamente metastático em melanomas.

Outra molécula importante para a progressão do melanoma, que vem despertando grande interesse nessa área de estudo, é o fator de crescimento transformador beta (TGF- β). O TGF- β é uma citocina multifuncional que, em condições normais, participa da regulação de diversas atividades celulares, como proliferação e diferenciação, bem como de processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, angiogênese e vigilância imunológica. Em mamíferos, existem três isoformas de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 (Revisado por Javelaud et al., 2008).

Na via de sinalização clássica induzida por TGF- β (sinalização dependente de Smad) (**Figura 4**), a transdução de sinal é iniciada pela formação de um complexo na superfície celular entre TGF- β e receptores serina/treonina quinase transmembrana (tipo I e II), o que induz transfosforilação e ativação do receptor tipo I (T β R-I) pela quinase do receptor tipo II (T β R-II). O receptor tipo I ativado fosforila os efetores Smad2 e Smad3 que se associam com Smad4, e este complexo ativado transloca-se para o núcleo onde regula a transcrição de genes-alvo. A atividade das Smads medeia os efeitos inibitórios de TGF- β sobre o crescimento através de redução na expressão de c-myc, CDC25A e membros da família Id, e aumento da expressão dos inibidores de CDKs p15 e p21. Além de mediar os efeitos inibitórios de TGF- β sobre o crescimento, as Smads podem regular a expressão de vários genes envolvidos com a maquinaria apoptótica e, assim, medeiam os efeitos próapoptóticos do TGF- β (Revisado por Lasfar & Cohen-Solal, 2010). No câncer, TGF- β apresenta papel complexo já que nos estágios iniciais do processo tumoral pode exercer seus efeitos anti-mitogênicos e supressores de tumor, e em estágio avançado passa a ter ação crítica na angiogênese e imunosupressão, fornecendo um microambiente apropriado para o crescimento do tumor e metástase (Revisado por Javelaud et al., 2008). Além da via clássica induzida por TGF- β , outras proteínas e vias de sinalização independentes de Smads podem ser ativadas por TGF- β e desempenham papéis importantes nos estágios avançados da progressão tumoral. Entre elas estão as vias da MAPK/ERK, p38, JNK, PI3K-AKT-mTOR, além de proteínas GTPases Rho, que participam dos processos de reorganização do citoesqueleto, migração e invasão durante a metástase (**Figura 4**) (Revisado por Lamouille & Derynck, 2011).

O aumento da expressão e secreção de TGF- β tem sido reportado em diferentes linhagens celulares de melanoma, quando comparados com melanócitos normais (revisado por Javelaud et al., 2008). Em pacientes com melanoma, os níveis de TGF- β no plasma também têm se mostrado elevados, especialmente nos indivíduos com lesões metastáticas (Krasagakis et al., 1998). De uma forma geral, o desenvolvimento e progressão do melanoma maligno têm sido caracterizados por resistência aos efeitos supressores de tumor de TGF- β , e altos níveis de expressão de TGF- β devem, na verdade, fornecer vantagens seletivas para melanomas com alto potencial invasivo e metastático (Revisado por Lasfar & Cohen-Solal, 2010). Entre as três isoformas de TGF- β expressas em mamíferos, as isoformas TGF- β 2 e TGF- β 3, não expressas em melanócitos normais, mostraram ser expressas já nos estágios iniciais de progressão do melanoma, sendo essa expressão aumentada durante a progressão tumoral (van Belle et al., 1996; revisado por Javelaud et al., 2008).



Figura 4. *Vias de sinalização dependente e independente de Smads induzidas por TGF-β.* Na via de sinalização clássica (dependente de Smad), inicialmente TGF-β forma um complexo com receptores serina/treonina quinase transmembrana (tipo I e II) presentes na superfície celular, o que induz transfosforilação e ativação do TβR-I por ação da quinase do TβR-II. O TβR-I ativado fosforila Smad2 e Smad3 que se associam com Smad4. A seguir, este complexo ativado é translocado para o núcleo onde regula a transcrição de genes-alvo como c-myc, CDC25A, membros da família Id, p15 e p21. Além da via clássica, outras vias de sinalização independentes de Smads podem ser ativadas por TGF- β , como as vias da PI3K/AKT, da Rho GTPase/ROCK e MAP quinases (ERK, p38 e JNK) (Adaptado de Lamouille & Derynck, 2011).

1.5. Terapêutica do melanoma

Se detectado precocemente, a remoção cirúrgica do melanoma pode levar a uma taxa de cura de 90%, enquanto que se detectado em estágio avançado o melanoma tem prognóstico desfavorável, tendo os pacientes uma média de sobrevida de menos de um ano (Revisado por Spagnolo and Queirolo, 2012). Apenas poucas terapias são atualmente disponíveis para o tratamento de melanoma em estágio avançado (metastático). Altas doses de interleucina-2 e dacarbazina (5-(3,3-Dimethyl-1-triazenyl)imidazole-4-carboxamide ou

DTIC) eram as únicas duas terapias aprovadas pelo "Food and Drug Administration" (FDA) até 2011, porém estão associados a uma taxa de resposta de apenas 10-20% (Revisado por Finn et al., 2012). A sobrevida média de pacientes tratados com dacarbazina é de menos de 8 meses (Middleton et al., 2000), e combinações de diferentes regimes quimioterápicos baseados na dacarbazina geralmente conferem um aumento de toxicidade com pouco ou nenhum aumento na taxa de sobrevida dos pacientes (Algazi et al., 2010). Quimioterápicos alternativos atualmente usados no tratamento do melanoma metastático incluem fotemustine, temozolomida (TMZ), paclitaxel (frequentemente em combinação com carboplatina) e docetaxel (Bedikian et al., 1995; Revisado por Spagnolo and Queirolo, 2012).

DTIC e TMZ compõem um grupo de agentes alquilantes conhecidos como compostos triazenos. São drogas que não tem como alvo o ciclo celular, sendo, portanto, ativas em todas as fases do ciclo. A atividade antitumoral desses compostos está relacionada à sua capacidade de induzir metilação do DNA. O íon metildiazônio, um derivado altamente reativo dos dois compostos, reage com bases purínicas do DNA formando adutos metilados. Em termos quantitativos, o ponto mais freqüente de alquilação é a posição N^7 da guanina. Entretanto, O⁶-metilguanina (O⁶-meG) é a principal lesão responsável pela citotoxicidade e efeito mutagênico desses compostos, pois pode gerar um pareamento incorreto de bases no DNA, representada por G(CH₃):T. A presença destes adutos metilados em geral leva a morte celular. A resistência ao tratamento com compostos triazenos tem sido associada ao grau de atividade de sistemas de reparo do DNA como, por exemplo, do sistema de reparo de excisão de bases (BER) (revisado por Marchesi et al., 2007).

A partir de 2011 a FDA aprovou duas novas terapias contra o melanoma avançado: vemurafenibe, um inibidor de BRAF, e ipilimumabe, um estimulador do sistema imune. Apesar de promoverem benefícios clínicos, ambos os tratamentos apresentam limitações. No caso do vemurafenibe, a duração da resposta é curta, enquanto que o ipilimumabe apresenta taxa de resposta baixa (Revisado por Finn et al., 2012). Sendo assim, a busca por terapias mais eficazes contra o melanoma metastático ainda é um grande desafio para os pesquisadores da área, e uma necessidade para os pacientes que sofrem deste mal.

1.6. Ciclo celular, apoptose e autofagia: Três processos importantes no contexto tumoral

1.6.1. Ciclo celular: Aspectos moleculares e regulação

O ciclo celular é um processo complexo onde participam numerosas proteínas regulatórias que direcionam a célula em uma sequência específica de eventos que culminam com a divisão da célula em duas células filhas (mitose). O ciclo celular pode ser morfologicamente dividido em intérfase e fase M (mitótica). A intérfase é ainda subdividida em fase G1, intervalo onde a célula se prepara para a síntese do DNA, fase S, onde ocorre a duplicação do DNA, e fase G2, onde a célula se prepara para a mitose (**Figura 5**) (Revisado por Schafer, 1998).

As proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs) são proteínas regulatórias-chave no ciclo celular, e constituem uma família de proteínas serina/treonina quinases que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular. Dentre as CDKs já identificadas, cinco são ativas durante o ciclo celular: durante G1(CDK4, CDK6 e CDK2), S (CDK2) e G2/M (CDK1) (**Figura 5**). Após serem ativadas por ligação com proteínas ciclinas, as CDKs induzem processos "downstream" através da fosforilação de proteínas-alvo específicas (Revisado por Vermeulen et al., 2003).

Diferentes ciclinas são requeridas nas diferentes fases do ciclo celular (**Figura 5**). As três ciclinas do tipo D (ciclina D1, ciclina D2 e ciclina D3) ligam-se a CDK4 e CDK6, e os complexos CDK-ciclina D são essenciais para a entrada na fase G1 (Sherr, 1994). Outra ciclina que atua na fase G1 é a ciclina E, que se associa com CDK2 e regula a progressão de G1 para a fase S (Ohtsubo et al., 1995). A ciclina A se liga com CDK2, e este complexo é requerido durante a fase S (Girard et al., 1991; Walker & Maller, 1991). No final da fase G2 e início da fase M, a ciclina A forma complexo com CDK1 permitindo a entrada na fase M. A seguir, a mitose é permitida pelo complexo formado por ciclina B e CDK1 (King et al., 1994; Arellano & Moreno, 1997).

As CDKs catalisam o processo de divisão celular através da fosforilação de uma ampla gama de substratos. Na fase G1, um importante alvo das CDKs é a proteína retinoblastoma (pRb), e o complexo CDK-ciclina em G1 fosforila a pRb em múltiplos resíduos. Quando desfosforilada, a proteína pRb se liga ao fator de transcrição E2F tornando-o indisponível para atuar no processo de transcrição (**Figura 6**). Após a fosforilação da pRb pelo complexo CDK-ciclina, a pRb libera E2F, que se torna livre para participar da transcrição de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular (transição G1/S). Dentre os substratos das CDKs em G2 e M estão lamininas nucleares e microtúbulos, que formam o citoesqueleto nuclear (Revisado por Schafer, 1998).

Reguladores negativos do ciclo celular diferem entre os estágios do ciclo. A inibição do ciclo celular em G2 ocorre por fosforilação da CDK1 pela proteína quinase Wee1. Já a proteína fosfatase Cdc25C promove o efeito oposto ao de Wee1, desfosforilando a CDK1 nos resíduos Tyr¹⁵ e Thr¹⁴, o que é responsável pela ativação da CDK1 (Revisado por

Schafer, 1998). Nas fases G1 e S do ciclo celular, os inibidores de CDKs (CKIs) tem papel fundamental e os mais estudados pertencem às famílias INK4 e Cip/Kip (Sherr & Roberts, 1995). A família INK4 inclui p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) e p19 (INK4d), que inativam especificamente as CDKs de G1 (CDK4 e CDK6). A família Cip/Kip inclui p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) e p57 (Kip2), que são responsáveis pela inibição dos complexos CDK-ciclinas. Eles inibem principalmente os complexos CDK-ciclina de G1 e, em menor extensão, os complexos CDK1-ciclina B (Revisado por Vermeulen et al., 2003). p21, além disso, inibe a síntese de DNA através da ligação e inibição do "antígeno nuclear de proliferação celular" (PCNA) (Pan et al., 1995; Waga et al., 1997). CKIs são regulados tanto por sinais externos quanto internos: p21, por exemplo, contém um local de ligação para p53 na região promotora de seu gene, permitindo que p53 ative transcricionalmente a expressão de p21. Essa é uma das formas pelas quais p53 induz parada do ciclo celular (Waldman et al., 1995). Já a expressão de p15 e a ativação de p27 podem aumentar em resposta ao fator de crescimento transformante β (TGF- β), contribuindo para parada do ciclo celular (Hannon & Beach, 1994; Reynisdottir et al., 1995).

No câncer, existem alterações fundamentais no controle genético da divisão celular, que resultam em proliferação celular irrestrita. A desregulação do ciclo celular associada ao câncer ocorre devido mutações de proteínas importantes em diferentes níveis do ciclo celular. De uma forma geral, em células tumorais as vias de sinalização responsáveis pela transdução do sinal mitogênico estão sempre "ligadas", ou seus mecanismos inibitórios estão "desligados". Em células tumorais, diversas mutações têm sido observadas em genes que codificam CDKs, ciclinas, enzimas ativadoras de CDKs, CKIs, substratos de CDKs e proteínas importantes para os pontos de checagem do ciclo celular ("checkpoints"). Como exemplo, a inativação de genes supressores de tumor como pRb e p53 resultam em disfunção de proteínas que normalmente inibem a progressão do ciclo celular, o que contribui para a aquisição do fenótipo altamente proliferativo inerente às células tumorais (Revisado por McDonald & El Deire, 2000; Revisado por Vermeulen et al., 2003).



Figura 5. *Os estágios do ciclo celular*. Os pontos de atividade dos complexos CDK-ciclina estão indicados na figura (Adaptado de Vermeulen, 2003).



Figura 6. Esquema representativo da ativação de E2F por complexos CDK-ciclina. CDK4 ou CDK6 complexado com ciclina D fosforila pRb, que libera o fator de transcrição E2F para transcrever genes necessários para а progressão do ciclo celular (Adaptado de Schafer, 1998).

1.6.2. Apoptose: Aspectos moleculares e regulação

A morte celular programada é um processo essencial para o desenvolvimento normal, para a manutenção da homeostase e eliminação de células danificadas em organismos multicelulares. Dependendo das alterações morfológicas envolvidas e da participação de caspases, a morte celular pode ser classificada em vários tipos: apoptose, autofagia, necrose, catástrofe mitótica, além de outras formas atípicas de morte celular (Kroemer et al., 2009; Galluzzi et al., 2012).

A apoptose, um processo altamente controlado e dependente de energia, é a forma mais bem caracterizada de morte celular programada. Sua desregulação pode levar ao surgimento do câncer, doenças autoimunes e doenças degenerativas, o que explica o crescente interesse no estudo e caracterização das vias apoptóticas com o intuito de compreender a etiologia dessas doenças e desenvolver terapêuticas mais eficazes contra elas. Muitas das alterações morfológicas sofridas pelas células durante a apoptose tem sido observadas por microscopia de luz e microscopia eletrônica, incluindo a redução do tamanho celular e condensação da cromatina (picnose). Entre outras características importantes associadas ao processo apoptótico estão: formação de bolhas de citoplasma partindo da membrana plasmática celular ("blebbing" da membrana plasmática), formação de corpos apoptóticos e a fagocitose de corpos apoptóticos por células vizinhas ou por macrófagos (Revisado por Burz et al., 2009).

Tanto eventos extracelulares como intracelulares podem levar a ativação de vias bioquímicas responsáveis pelo comprometimento da célula com a apoptose. Existem duas vias principais, a via apoptótica extrínseca e a via apoptótica intrínseca. A via extrínseca opera via receptores de morte presentes na superfície celular, e a via intrínseca depende da ativação mitocondrial após perda da sinalização por fatores de crescimento ou em resposta

a estímulos letais gerados no interior da célula. As duas vias podem apresentar interconecções em alguns pontos e, geralmente, contam com a ativação de caspases (Revisado por Burz et al., 2009; Revisado por Tonissen & Di Trapani, 2009). As caspases constituem uma família de cisteína proteases expressas na maioria das células na forma de pró-enzimas inativas e, quando ativadas por processamento proteolítico, ativam outras caspases, contribuindo para a amplificação do sinal apoptótico (Lamkanfi et al., 2007). Elas podem ser divididas em caspases iniciadoras (caspases 2,8,9 e 10) e caspases efetoras (caspases 3,6 e 7) (Revisado por Burz et al., 2009).

A via apoptótica extrínseca é ativada por ligantes que se ligam a receptores de morte, e que, então, clivam a pró-caspase 8 (**Figura 7**). Após sua ativação, a caspase 8 pode agir sobre a Bid para exercer efeitos apoptóticos mediados pela mitocôndria, ou pode ainda ativar diretamente a caspase 3 sem o envolvimento da mitocôndria (Rossi & Gaidano, 2003). Sendo assim, pode existir uma ligação entre as vias extrínseca e intrínseca, fato que parece ser dependente do tipo celular e do tipo de sinal recebido por esta.

A via apoptótica intrínseca pode ser ativada por vários estímulos, entre eles por estresse, radiação UV, ou pela administração de drogas citotóxicas que perturbem o balanço redox no interior da célula (Revisado por Burz et al., 2009). A mitocôndria apresenta um papel central na via intrínseca (Green & Reed, 1998). O evento chave que governa a ativação da via intrínseca é a permeabilização da membrana mitocondrial externa, que é regulada por muitas proteínas citosólicas, incluindo membros da família Bcl-2 (**Figura 7**). Alguns membros dessa família são pró-apoptóticos e incluem Bax, Bak, Bim e Bid, enquanto outros membros como Bcl-2 e Bcl-xL são antiapoptóticos (Cory et al., 2003). Os mecanismos exatos pelos quais os vários membros da família Bcl-2 afetam a mitocôndria ainda não foram totalmente esclarecidos, entretanto sabe-se que eles podem tanto formar

poros em conjunção com proteínas da membrana mitocondrial, como podem abrir canais pré-existentes (Kuwana et al., 2002; Schwarz et al., 2007). Uma vez ocorrida a permeabilização, citocromo c e outras proteínas (como o "segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria" ou Smac) são liberados do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol. Após sua liberação no citosol, o citocromo c recruta outras proteínas incluindo o "fator ativador de protease apoptótica-1 (Apaf-1) e a pró-caspase 9 para formar o apoptossomo (Revisado por Burz et al., 2009). O apoptossomo é responsável pela clivagem da pró-caspase 9, que por sua vez cliva e ativa a caspase 3, que age em diferentes compartimentos celulares, como exemplo, no núcleo para induzir eventos apoptóticos incluindo a fragmentação do DNA (Srinivasula et al., 1998). A proteína Smac, liberada da mitocôndria juntamente com o citocromo c, age inibindo a ação da proteína IAP ("proteína inibidora da apoptose") sendo, assim, uma proteína pró-apoptótica (Du et al., 2000).

Vários estresses incluindo "fator de necrose tumoral" (TNF), luz UV e estresse oxidativo podem levar a apoptose através da ativação de vias que envolvem "proteínas quinase ativadas por mitógeno" (MAPK) (Revisado por Burz et al., 2009), que exercem efeitos sobre a mitocôndria (**Figura 7**). A "proteína quinase reguladora do sinal apoptótico-1" (ASK1) é uma MAPK quinase quinase (MAPKKK) e é responsável pela ativação de várias MAPK quinases como MKK3, 4, 6 e 7, que então ativam as vias da c-Jun-N-terminal quinase (JNK) e a p38 MAPK (Ichijo et al., 1997). Essas quinases fosforilam e ativam alvos pró-apoptóticos específicos incluindo membros da família Bcl-2 como Bim (Lei & Davis, 2003; Cai et al., 2006), e Bax (Kim et al., 2006). Além disso, elas fosforilam e ativam o fator de transcrição p53 (Buschmann et al., 2001), que desempenha um importante papel na apoptose, particularmente em resposta a danos ao DNA, através de aumento na transcrição de genes pró-apoptóticos como a Bax (Levine, 1997).

O reconhecimento de células transformadas e sua eliminação é um processo conhecido como "vigilância imunológica" (Tesniere et al., 2008). Células tumorais frequentemente escapam a vigilância imunológica devido sua capacidade em esconder as moléculas anormais presentes em sua superfície através de estratégias pró-sobrevivência específicas ou através da inibição das vias apoptóticas (Ullrich et al., 2008). Atualmente, sabe-se que vários tipos de cânceres são ocasionados pela falta de resposta aos estímulos de morte celular, mais do que pelo aumento da taxa proliferativa. Distúrbios em ambas as vias apoptóticas, extrínseca e intrínseca, podem estar envolvidas na tumorigênese (Revisado por Burz et al., 2009).



Figura 7. *Vias de sinalização apoptóticas*. A via apoptótica extrínseca (ativada por receptor de morte) e a via apoptótica intínseca (dependente da mitocôndria) estão ilustradas, bem como a interconecção entre as vias. Vários tipos de estresses e estímulos apoptóticos reduzem o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \psi$). A liberação de citocromo *c* da mitocôndria, através de poros na membrana mitocondrial, é regulada por proteínas da família Bcl-2. Citocromo *c* contribui para a formação do apoptosemo, que então ativa as caspases e leva a apoptose. Estresses podem, ainda, induzir apoptose por ativação das vias de sinalização da JNK e p38 (Adaptado de Tonissen & Di Trapani, 2009).

1.6.3. Autofagia: Aspectos moleculares e regulação

A autofagia é uma via lisossomal finamente regulada de degradação de material citosólico e organelas. Este processo constitui um mecanismo adaptativo de sobrevivência celular durante condições de estresse como, por exemplo, durante a privação de nutrientes, "resposta a proteínas não-enoveladas" (UPR) ou infecção viral, e é regulada por uma

complexa rede de sinalização (Revisado por Eskelinen & Saftig, 2009). Dependendo da rota de entrega para o lisossomo, três tipos de autofagia são conhecidos: a autofagia mediada por chaperonas (CMA), a microautofagia e a macroautofagia (**Figura 8**). A CMA utiliza chaperonas para transportar proteínas citosólicas específicas para os lisossomos. Na microautofagia, o cargo é incorporado diretamente no lisossomo através de invaginação da membrana lisossomal. Já a macroautofagia (também referida simplesmente como autofagia) envolve a formação de vesículas de membrana dupla (autofagossomos) anteriormente a fusão com os lisossomos (Revisado por Checinska & Soengas, 2011; Revisado por Mizushima & Komatsu, 2011).

Após ser induzida por condição de estresse, o primeiro passo da autofagia é a formação do autofagossomo. Uma cisterna de membrana lisa conhecida como fagóforo, ou membrana de isolamento, alonga-se e envolve uma porção de citosol ou um cargo específico, formando uma vesícula de membrana dupla, o autofagossomo. A seguir, o autofagossomo funde-se com um lisossomo, formando o autolisossomo. Tanto o citosol quanto sua membrana limitante são degradados por hidrolases lisossomais, e os produtos da degradação são transportados de volta para citosol onde são reutilizados para biossíntese ou para produção de energia (**Figura 8**) (Revisado por Eskelinen & Saftig, 2009).

Cerca de 1% - 1.5% das proteínas celulares são catabolizadas por hora pelo processo autofágico no fígado, mesmo sob condições nutricionais normais. A autofagia basal age como uma maquinaria de controle de qualidade dos componentes citosólicos, sendo fundamental para a homeostase celular. Embora este controle de qualidade possa ser parcialmente alcançado por autofagia não-seletiva, evidências crescentes têm indicado que a autofagia do tipo "seletiva" exerce papel importante sobre a degradação de proteínas específicas, organelas e bactérias invasoras (**Figura 9**). A autofagia seletiva ocorre constitutivamente e pode, além disso, ser induzida em resposta a estresses celulares (Revisado por Mizushima & Komatsu, 2011).

Um dos substratos mais bem caracterizados da autofagia seletiva é a p62, uma proteína celular expressa ubiquamente que também é conhecida como sequestrossomo 1 (SQSTM1). p62 interage diretamente com a proteína LC3 ("proteína de cadeia leve associada a microtúbulo 3") presente na membrana de isolamento através de uma região de interação com LC3 (Figura 9). Subsequentemente, p62 é incorporado no autofagossomo e então degradado pelo processo autofágico (Revisado por Mizushima & Komatsu, 2011). Em situações onde a autofagia é deficiente ou insuficiente observa-se o acúmulo de p62, o que leva a formação de grandes agregados citosólicos (Figura 9), que incluem as proteínas p62 e ubiquitina (Komatsu et al., 2007). p62 possui um domínio de associação a ubiquitina (UBA). Sendo assim, tem sido proposto que p62 atue como um receptor autofágico para cargos ubiquitinados destinados à degradação, incluindo agregados de proteínas ubiquitinadas, mitocôndrias ubiquitinadas, peroxissomos ubiquitinados e microrganismos ubiquitinados (Revisado por Mizushima & Komatsu, 2011). p62 e outras proteínas adaptadoras, como NDP52 (Thurston et al., 2009) e optineurina (Wild et al., 2011), medeiam a degradação de microrganismos invasores através de interações com ubiquitinas (Figura 9) (Revisado por Mizushima & Komatsu, 2011). Em situações de deficiência ou insuficiência em autofagia, p62 funciona, ainda, como um ponto central na sinalização celular que determina se a célula sobreviverá, através de ativação da via TRAF6-NFkB, ou morrerá, por facilitar a agregação de caspase-8 e caspases efetoras "dowstream" (Figura 9) (Moscat & Diaz-Meco, 2009).

A autofagia tem sido implicada em diversos processos patológicos, incluindo infecções por patógenos, doenças inflamatórias, neurodegeneração e câncer (Revisado por

Morselli et al., 2009; Revisado por Notte et al., 2011; Revisado por Sridhar et al., 2012). No câncer, tem sido atribuído um papel dual para a autofagia, podendo atuar como supressora de tumor nos estágios iniciais de progressão tumoral, e como promotora de tumor nos estágios mais avançados (Revisado por Chen & White, 2011; Revisado por Kung et al., 2011; Revisado por Yang et al., 2011(a)). Sua atividade supressora de tumor é exercida através da eliminação de substratos proteicos oncogênicos, agregados tóxicos de proteínas não-enoveladas e organelas danificadas. A autofagia pode, ainda, limitar a ocorrência de alguns processos associados ao surgimento do câncer, como a inflamação, o dano tecidual e a instabilidade genômica, sugerindo que o estímulo da autofagia deva ser benéfico para a prevenção do câncer. Já a atividade promotora de tumor exercida pela autofagia em cânceres estabelecidos ocorre através da reciclagem intracelular de macromoléculas e organelas citosólicas, processo que é responsável pelo fornecimento de substratos para o metabolismo tumoral e pela manutenção de um "pool" de mitocôndrias funcionais (Revisado por White, 2012).

Diversos estudos recentes sobre terapêuticas do câncer têm atribuído um papel positivo para a autofagia, uma vez que a intensificação desse processo pode levar a morte celular (Revisado por Gozuacik & Kimchi, 2004; Revisado por Notte et al., 2011). Neste sentido, muitas pesquisas têm focado na busca por terapias capazes de induzir a autofagia, com o objetivo de levar às células tumorais a morte. Em melanomas, o uso de drogas como tamoxifeno + curcumina, terfenadina, metformina e SNX-2112 (inibidor de HSP90) mostrou ser capaz de estimular o processo autofágico e levar a morte celular (Chatterjee & Pandey, 2011; Nicolau-Galmés et al., 2011; Tomic et al., 2011; Liu et al., 2012).

28



Figura 8. *Tipos de autofagia*. Macroautofagia: Uma porção de citosol, incluindo organelas, é envolvida por uma membrana de isolamento (ou fagóforo) para formar o autofagossomo. A membrana externa do autofagossomo se funde com o lisossomo, e o material interno é degradado no autolisossomo. Microautofagia: Pequenas porções de citosol são diretamente "engolidas" por invaginação da membrana lisossomal ou do endossomo tardio. Autofagia mediada por chaperonas (CMA): Proteínas substrato são reconhecidas pela proteína chaperona citosólica Hsc70 e cochaperonas. A seguir, elas são translocadas para o lúmen lisossomal após ligação com a proteína transmembrana Lamp-2A, que atua como um receptor lisossomal. Nos três tipos de autofagia, os produtos de degradação resultantes podem ser usados para diferentes propósitos, como, por exemplo, para síntese de proteínas e produção de energia (Adaptado de Mizushima & Komatsu, 2011).



Figura 9. Autofagia seletiva e não-seletiva. (A) Após a privação de nutrientes, a autofagia degrada componentes citosólicos não-seletivamente liberando produtos como os aminoácidos. Defeitos nesse processo causam insuficiência de aminoácidos, o que prejudica a síntese protéica e a produção de energia necessária para a sobrevivência celular. Além disso, a autofagia ocorre constitutivamente em baixos níveis mesmo em condições nutricionais favoráveis, o que permite a renovação de material citosólico. (B) A proteína p62, que se liga a proteína LC3, é um substrato específico para a autofagia. Defeitos no processo autofágico ou insuficiência em autofagia são normalmente acompanhados de acúmulo de p62. Este acúmulo aumenta o funcionamento da p62 como um suporte para proteínas em várias vias de sinalização, como a via do NF- κ B, apoptose e ativação de Nrf2. p62 tem um domínio UBA, através do qual ele pode mediar o sequestro de proteínas ubiquitinadas em autofagossomos. (C) Em resposta a perda de potencial de membrana, a proteína Parkin ubiquitina proteínas da membrana mitocondrial externa, o que induz mitofagia a fim de degradar a mitocôndria danificada. O envolvimento de p62 como proteína adaptadora é controverso. (D) Bactérias invasoras são ubiquitinadas no citosol e receptores autofágicos como p62, NDP52 e optineurina medeiam o sequestro autofágico dos microrganismos a fim de restringir seu crescimento (Adaptado de Mizushima & Komatsu, 2011).

1.7. RNA de interferência como estratégia para inibir a progressão do câncer

O RNA de interferência (RNAi) consiste de um mecanismo conservado de silenciamento gênico pós-transcricional em que pequenos RNAs dupla-fita (dsRNAs), com aproximadamente 22 pares de bases, suprimem a expressão de genes com sequências parcialmente complementares (Revisado por Petrocca & Lieberman, 2011). Desde a descoberta do RNAi existe um interesse crescente no uso deste mecanismo em aplicações clínicas (Revisado por Pecot et al., 2011), uma vez que a maquinaria de RNAi, encontrada em todas as células, pode ser usada para o silenciamento gênico com alto grau de especificidade. O RNAi tem demonstrado grande potencial para uso como terapia do câncer, e a compreensão de seus mecanismos tem levado ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas atualmente em fase inicial de testes clínicos (Revisado por Phalon et al., 2010).

O mecanismo pelo qual dsRNAs inibem a conversão de RNAs mensageiros (RNAm) em proteínas tem sido extensivamente estudado. Resumidamente, dsRNAs são reconhecidos no citoplasma pela ribonuclease Dicer e clivados em pequenos fragmentos contendo 21-23 pares de base. O dsRNA tem uma sequência que forma uma fita "sense" (passageira) e outra fita "antisense" (guia) em relação ao RNAm alvo. Após clivagem pela Dicer o dsRNA resultante se liga a um complexo protéico chamado "complexo de silenciamento induzido por RNA" (RISC), onde a fita passageira do dsRNA é clivada e descartada, enquanto a fita guia é direcionada para a região 3' não traduzida (UTR) do RNAm alvo (**Figura 10**). Quando um dsRNA exógeno, também conhecido como siRNA, é introduzido na célula, seu pareamento completo com o RNAm alvo ativa uma RNase presente no complexo RISC, a Argonauta 2 (AGO2), que degrada o RNAm alvo impedindo

sua tradução. Além disso, as células apresentam dsRNAs endógenos, os microRNAs, que são pré-processados no núcleo por ação da ribonuclease Drosha antes de serem encaminhados para o citoplasma. Devido ao pareamento incompleto com 3'UTRs, os microRNAs em alguns casos não levam a clivagem do RNAm alvo, e sim a repressão de sua tradução (Revisado por Pecot et al., 2011).

Cerca de 1.000 microRNAs humanos distintos já são conhecidos, e estima-se que estes regulem a expressão de mais de 50% dos genes humanos (Friedman et al., 2009). Um único microRNA pode regular múltiplos genes-alvo, indicando que cada microRNA deva regular múltiplas vias de sinalização e participar de uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (Revisado por Tie & Fan, 2011). O perfil de expressão de microRNAs tem se mostrado alterado em muitos tipos de cânceres humanos e ambos, microRNAs supressores de tumor e oncogênicos, têm sido identificados (Dahiya et al., 2008; Lodygin et al., 2008). Existem evidências crescentes de que o perfil de microRNAs deva ser a forma mais precisa de identificar a origem da célula tumoral, bem como o subtipo tumoral, prognóstico, e resposta a intervenções terapêuticas (Revisado por Petrocca & Lieberman, 2011).

Com a contínua descoberta do papel de microRNAs na tumorigênese e desenvolvimento tumoral, pesquisadores tem explorado o uso de microRNAs na terapêutica de tumores. Uma vez que um único microRNA pode regular simultaneamente múltiplos genes e numerosas vias de sinalização associadas com o crescimento tumoral, proliferação, metástase, resistência a drogas e outros fenótipos malignos, o uso de microRNAs deve fornecer vantagens para o tratamento de tumores que envolvem alterações em múltiplos genes (Revisado por Tie & Fan, 2011). Por exemplo, miR-31 regula simultaneamente cinco proteínas envolvidas com a metástase de células de câncer de mama: RhoA, RDX, MMP16,

Fzd3 e ITGA5; e a superexpressão exógena de miR-31 foi capaz de suprimir a metástase das células de câncer de mama, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Valastyan et al., 2009; Valastyan et al., 2010; Valastyan & Weinberg, 2010).



Figura 10. *Mecanismo de RNAi.* Após a introdução de um dsRNA exógeno na célula (siRNA), este deve inicialmente escapar do endosomo. Após o escape endosomal, o siRNA é incorporado ao complexo RISC. No caso de um dsRNA endógeno (microRNA), após seu pré-processamento no núcleo por ação da ribonuclease Drosha, este é encaminhado para o citoplasma, onde sofre novo processamento por ação da RNase Dicer e é a seguir incorporado ao complexo RISC. No complexo RISC a fita passageira (sense) do dsRNA é degradada enquanto a fita guia (antisense) é direcionada a região 3'UTR do RNAm alvo. O silenciamento gênico induzido por siRNA ocorre através de clivagem do RNAm alvo. Já o silenciamento induzido por microRNA ocorre, geralmente, por repressão traducional do RNAm alvo (Adaptado de Pecot et al., 2011).

1.8. p53 e miR-34a constituem uma importante via supressora de tumor

A proteína p53 tem se tornado um importante foco de pesquisas na área do câncer desde a descoberta de que a maioria dos tumores humanos exibe mutações inativadoras ou regulação alterada dessa proteína (Hainaut et al., 1998; Momand et al., 1998). Investigações intensivas a respeito das funções de p53 tem deixado claro o porquê desta proteína ser tão importante para a proteção contra o câncer. p53 é uma proteína com importante atividade supressora de tumor, que medeia a resposta celular a vários tipos de estresses através da ativação de diferentes efetores "downstream", dependendo do tipo celular e da natureza do estresse envolvidos. Sua atividade supressora de tumor é exercida principalmente através da regulação da transcrição de genes envolvidos no controle da proliferação celular e apoptose (Laptenko & Prives, 2006).

p53 é expressa ubiquamente como uma proteína inativa tendo tempo de meia-vida bastante curto (20-30 minutos), e está presente em baixos níveis em células não-estressadas. A manutenção de baixos níveis de p53 é possibilitada pela atividade da ubiquitina ligase MDM2, que degrada p53 rapidamente. Entretanto, várias condições podem levar ao bloqueio da degradação induzida por MDM2 e, consequentemente, a um rápido aumento nos níveis celulares de p53 e a sua ativação, que incluem: 1) danos diretos ao DNA; 2) danos a componentes envolvidos com o manejo do material genético (como o fuso mitótico); 3) hipóxia; 4) ativação de oncogenes; 5) depleção de ribonucleotídeos e 6) exposição ao óxido nítrico. Uma vez ativado, p53 regula positivamente ou negativamente a transcrição de mais de 150 genes envolvidos em processos celulares diversos (Revisado por Efeyan & Serrano, 2007; Revisado por Fuster et al., 2007). O "dano ao DNA" foi o primeiro tipo de estresse associado à ativação de p53 e, por este motivo, p53 ficou conhecido como "guardião do genoma" (Lane, 1992). Na busca por caracterizar as rotas de sinalização que conectam danos ao DNA com p53, foi identificada uma cascata de serina/treonina quinases que incluem ATM, ATR, CHK1 e CHK2, responsáveis pela fosforilação e ativação de p53 (**Figura 11(A)**). Esta cascata de sinalização é permanentemente ativada em cânceres humanos, o que sugere que o estado canceroso está intrinsecamente associado com a geração de danos ao DNA. Além desta bem estabelecida cascata de quinases, outras vias de sinalização podem participar da ativação de p53 após danos ao DNA, entre elas as vias da p38 MAPK, JNK e c-Abl (Revisado por Efeyan & Serrano, 2007).

A ativação de p53 por sinalização oncogênica também tem ganhado bastante atenção de pesquisadores, visto que, assim como os danos ao DNA, está universalmente presente no câncer. A sinalização oncogênica ativa p53 através de ARF (**Figura 11(A)**) que, por sua vez, interage com MDM2 inibindo sua atividade p53-ubiquitina ligase. Desta maneira, a estabilização de p53 dependente de ARF resulta em dramático aumento da atividade de p53 (Revisado por Efeyan & Serrano, 2007).

Em 2007, diversos estudos demonstraram que microRNAs membros da família miR-34 são alvos diretos de p53, e que a superexpressão dos mesmos é capaz de induzir apoptose e parada do ciclo celular (Revisado por Hermeking, 2010). Entre os alvos moleculares mais conhecidos de miR-34 estão CDK4, CDK6, Ciclina E2, E2F3 e Bcl-2 (**Figura 11(A)**). Entretanto, análises de microarranjos após a introdução ectópica de miR-34 em diversas linhagens celulares tem revelado centenas de alvos downregulados por miR-34 (Revisado por Hermeking, 2010). Em mamíferos, a família miR-34 compreende três microRNAs (**Figura 11(B**)) que são codificados por dois genes distintos: miR-34a que é codificado por seu próprio transcrito, e miR-34b/c que compartilham um transcrito primário comum (Revisado por Hermeking, 2010). A alta similaridade entre os três membros da família miR-34 sugere que eles tenham os mesmos alvos. De fato, uma análise de expressão após a transfecção separada de miR-34a, miR-34b e miR-34c mostrou que os RNAs mensageiros afetados foram praticamente idênticos (He et al., 2007(c)). Entretanto, devem existir diferencas nas afinidades dos três membros de miR-34 pelos seus alvos, uma vez que o pareamento perfeito só é possível entre determinados tipos de miR-34 e a 3'UTR. Um exemplo é c-myc, que parece ser regulado principalmente por miR-34b/c, presumivelmente devido sua maior complementariedade com c-myc 3'UTR comparado com miR-34a. Além disso, em camundongos foi mostrado que miR-34a é expresso ubiquamente sendo sua maior expressão no cérebro, enquanto que miR-34b/c é expresso principalmente no tecido pulmonar. Além disso, essas análises mostraram que miR-34a é, quase sempre, expresso em níveis mais elevados que miR-34b/c, com excessão do pulmão onde miR-34b/c é dominantemente expresso. Sendo assim, esses dados sugerem que os dois genes miR-34 possam ter funções tecido-específicas (Revisado por Hermeking, 2010).

Visto que miR-34a induz mecanismos de supressão tumoral, como interrupção do ciclo celular, senescência e apoptose, a inativação permanente deste microRNA poderia trazer vantagens seletivas para células tumorais. De fato, diversos mecanismos fundamentais para a progressão tumoral tem sido associados à redução nos níveis de expressão de miR-34 em células cancerosas. Além da redução na expressão de miR-34 devido mutações que inativam p53, os próprios genes que codificam miR-34 podem ser alvos de mutações ou inativações epigenéticas no câncer (Revisado por Hermeking, 2010).

Evidências experimentais têm mostrado que a expressão de miR-34a apresenta-se reduzida ou até mesmo ausente em diversos tipos de cânceres, como em linhagens celulares

de carcinoma de mama, pulmão, cólon, rim, pâncreas, bem como em linhagens de melanoma. Esse fato parece estar realmente envolvido com a proliferação e sobrevivência dessas células tumorais uma vez que a expressão ectópica de miR-34a em algumas dessas linhagens foi capaz de bloquear o ciclo celular e induzir senescência (Lodygin et al., 2008). Recentemente, o uso terapêutico de miR-34a sintético foi testado por Martino e colaboradores, que demonstraram efeitos positivos contra o mieloma múltiplo (Di Martino et al., 2012).



Figura 11. *Modelo da rede p53/miR-34 na regulação da proliferação e morte celular.* (A) miR-34, um alvo transcricional direto de p53, reduz a expressão de genes requeridos para a proliferação e sobrevivência. Juntamente com outros alvos de p53, como p21 e Bax, os microRNAs da família miR-34 promovem parada do ciclo celular e morte celular em resposta a estresses relacionados ao câncer (Adaptado de He et al., 2007(b)). (B) Família miR-34: Sequências maduras dos microRNAs miR-34a, miR-34b e miR-34c (Fonte: www.mirbase.org).

1.9. Justificativa do trabalho

O melanoma é um tipo de câncer de caráter altamente agressivo e invasivo, ou seja, o tempo existente entre o seu surgimento, progressão e disseminação para órgãos distantes é bastante curto, o que dificulta a sua detecção e tratamento precoce. A ausência de terapêutica eficaz contra o melanoma em estágio avançado (metastático) faz com que essa doença seja extremamente letal, o que tem tornado a pesquisa básica nessa área essencial a fim de esclarecer os mecanismos moleculares associados à progressão do melanoma. O estudo desses mecanismos pode levar a descoberta de novos pontos-chave na sinalização celular passíveis de intervenções moleculares, o que futuramente contribuiria para o desenvolvimento de novos fármacos ou outras terapias mais eficazes contra o melanoma metastático.

Estudos que associam o papel de microRNAs no desenvolvimento de doenças humanas são recentes. Uma vez que um único microRNA pode regular simultaneamente múltiplos genes e numerosas vias de sinalização associadas com o crescimento tumoral, proliferação, metástase, resistência a drogas, além de outros fenótipos malignos, o uso de microRNAs poderia fornecer vantagens para o tratamento de tumores que envolvem alterações em múltiplos genes (Revisado por Tie & Fan, 2011), como é o caso do melanoma. Dentre os diversos microRNAs de interesse no câncer, miR-34a tem se destacado por sua intensa atividade supressora de tumor. Em 2007, diversos estudos demonstraram que miR-34 é um alvo transcricional direto de p53, e vários alvos moleculares antes atribuídos a p53 hoje são reconhecidos como alvos diretos de miR-34a. Como a descoberta de seu papel no câncer é recente, as informações a respeito da rede de interações moleculares que estão associadas a sua atividade antitumoral ainda são escassas, o que justifica a pesquisa nessa área.

Evidências experimentais têm mostrado que a expressão de miR-34a apresenta-se reduzida ou até mesmo ausente em diversos tipos de cânceres, como o de mama, pulmão, cólon, rim, bexiga, linhagens de carcinoma pancreático, carcinoma primário de próstata, além de linhagens celulares de melanoma e melanoma primário (Lodygin et al., 2008). Entretanto, existem poucas informações disponíveis na literatura científica a respeito do papel de miR-34a na tumorigênese e progressão do melanoma. Além disso, estudos que mostrem alterações moleculares e vias de transdução de sinais induzidas por miR-34a em melanomas, são particularmente escassos. Sendo assim, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar o papel de miR-34a sobre redes de sinalização celular sabidamente envolvidas com o estabelecimento e progressão do melanoma, como as vias da p53, PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 e β -catenina. Dessa forma, pretendemos contribuir para a produção de conhecimento relevante a respeito dos mecanismos moleculares associados à ação antitumoral de miR-34a, o que poderá auxiliar pesquisas futuras para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes contra o melanoma metastático.

- OBJETIVO -

2. OBJETIVO

O principal objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da expressão ectópica de miR-34a sobre vias de sinalização relacionadas com os mecanismos de sobrevivência, proliferação e morte de células de melanoma metastático humano da linhagem SK-mel-103, a fim de propor seu potencial como inibidor da progressão do melanoma em estágio avançado.

Para atingir este objetivo foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a expressão de miR-34a em células SK-mel-103 transfectadas com o mímico do miR-34a;
- Avaliar a viabilidade das células SK-mel-103 transfectadas com o mímico do miR-34a;
- Avaliar o potencial de miR-34a como modulador da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (CDK4, CDK6, E2F3, Ciclina E, pRb e p21) e do processo apoptótico (Bax, Bcl-2, caspase-3 e PARP-1);
- Avaliar o potencial de miR-34a como modulador da expressão de proteínas e vias de sinalização-chaves envolvidas com a progressão do melanoma, tais como as vias da p53, PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2 e β-catenina;
- Avaliar os efeitos de miR-34a sobre o fluxo autofágico nas células de melanoma, além de verificar a relação entre fluxo autofágico e viabilidade celular;

 Avaliar a sensibilidade das células de melanoma ao tratamento com os quimioterápicos temozolomida, cisplatina e doxorrubicina, após transfecção com miR-34a.

- MATERIAIS E MÉTODOS -
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

O mímico do miR-34a e miR-controle negativo (miR-CTL) utilizado nos ensaios de transfecção foi obtido da Applied Biosystems-Ambion (Foster City, CA, USA) (Código: AM17100 e AM17121, respectivamente). Os dois siRNAs para TGF-β2 utilizados foram obtidos da Qiagen (Hilden, Germany) (Hs_TGFB2_1 _ Sense strand: 5'-GCGCUACAUCGACAGCAAATT-3'; 5'-Antisense strand: UUUGCUGUCGAUGUAGCGCTG-3' - Código: SI00049455. Hs_TGFB2_2 - Sense 5'strand: 5'-CCAAGAUUUAGAACCUCUATT-3'; Antisense strand: UAGAGGUUCUAAAUCUUGGGA-3' - Código: SI00049462). Para a análise da expressão do miR-34a por Real-Time PCR foram utilizados: miRNeasy Mini Kit da Qiagen (Código: 217004) para a extração de RNA, TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Código: 4366596) e reagentes para PCR da Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) e Applied Biosystems, e primer para miR-34a e U6 da Applied Biosystems. Para a realização da técnica de western blotting foram utilizados anticorpos primários da Cell Signaling (Beverly, MA, USA), Abcam (Cambridge, MA, USA), Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) e Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), e anticorpos secundários conjugados com HRP da Cell Signaling. Para as análises de microscopia confocal foram utilizados anticorpo primário e anticorpo secundário conjugado com Alexa-Fluor[®]488 da Invitrogen Life Technologies. Hoechst usado para a marcação de núcleos nas microscopias confocais foi obtido da Cell Signaling. Os reagentes utilizados para a microscopia eletrônica de transmissão foram adquiridos da Electron Microscopy Sciences (Hatfield, PA, USA) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O quimioterápico cisdichlorodiammine platinum(II) (cisplatina) foi obtido da Sigma-Aldrich (Código: P4394), o quimioterápico cloridrato de doxorrubicina da Eurofarma e o quimioterápico temozolomida (3-Methyl-4-oxo-8-imidazolo[5,1-*d*][1,2,3,5]tetrazinecarboxamide) da Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) (Cat n°: 420-044-M100). Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foi obtido da Sigma-Aldrich (Código: M2128). LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent (lipofectamina), usado como reagente de transfecção, foi obtido da Invitrogen (Código: 11668-019).

3.2. Cultura de células e caracterização das linhagens celulares

No presente trabalho, foram utilizadas as linhagens de melanoma metastático humano SK-mel-103, SK-mel-147 e SK-mel-28, gentilmente doadas pela Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler, docente do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – São Paulo. O cultivo dessas três linhagens celulares foi realizado em meio DMEM contendo 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina e suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas em atmosfera umidificada, 5% CO₂ a 37°C, e as densidades celulares utilizadas variaram de acordo com o tipo de experimento.

IMPORTANTE: As linhagens celulares SK-mel-147 e SK-mel-28 foram utilizadas apenas em um dos experimentos, para análise comparativa da expressão de miR-34a entre as diferentes linhagens de melanoma. Todos os demais experimentos do trabalho foram realizados utilizando apenas a linhagem SK-mel-103.

Segundo dados obtidos através de comunicação pessoal com a Profa Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler, cada uma das linhagens de melanoma utilizadas apresentam alterações genotípicas específicas de extrema importância para o surgimento e progressão do melanoma. Dada a relevância dessas alterações genéticas para as análises moleculares realizadas no presente trabalho, as principais mutações presentes em cada linhagem celular são apresentadas na tabela a seguir (**Tabela 1**):

Tabela 1. Caracterização das linhagens celulares SK-mel-103, SK-mel-147 e SKmel-28 quanto à estrutura de genes essenciais para o surgimento e progressão do

Linhagem Celular	p53	BRAF (V599)	NRAS
SK-mel-103	Normal	Normal	Q61R
SK-mel-147	Normal	Normal	Q61R
SK-mel-28	R273H	Mutante	Normal

Observações:

melanoma.

* **R273H**: Mutação que resulta na substituição de um aminoácido na posição 273 da p53, de uma arginina (R) para uma histitida (H). Está associada à perda da atividade supressora de tumor da proteína p53.

* **BRAF V599:** Mutação conhecida atualmente como BRAF V600E, resulta da substituição de um aminoácido na posição 600 da B-Raf, de uma valina (V) para um ácido glutâmico (E). Está associada à ativação constitutiva da via MAPK/ERK.

* **Q61R**: Mutação que resulta na substituição de um aminoácido na posição 61 da NRAS, de uma glutamina (Q) para uma arginina (R). Está associada à ativação constitutiva da proteína NRAS, e das vias MAPK/ERK e PI3K/AKT.

3.3. Transfecções: microRNA e siRNA

Para as transfecções em placas de 24 poços, a densidade celular utilizada foi de 6 x

10⁴ células/ml (volume de plaqueamento por poço: 1 mL). Visando manter os parâmetros de transfecção constantes, para placa de 6 poços a densidade celular utilizada foi proporcional a utilizada para a placa de 24 poços, tendo como base de cálculo a área de superfície de cada poço (poço da placa 24 poços: 2 cm²; poço da placa 6 poços: 9.6 cm²). Portanto, a densidade celular utilizada para a placa de 6 poços foi de 14.4 x 10⁴ células/ml

(Volume de plaqueamento por poço: 2 mL). Os plaqueamentos celulares foram realizados sempre 24 horas antes das transfecções.

As transfecções foram realizadas utilizando lipofectamina como reagente de transfecção e 50 nM de microRNA (controle negativo ou miR-34a). Para os ensaios de silenciamento do TGF-β2 foram utilizados dois siRNAs de sequência distintas (siRNA 1 e 2), sendo utilizado 50 nM de cada um dos siRNA concomitantemente. Para as transfecções foi utilizado meio DMEM sem adição de antibióticos, para evitar o efeito citotóxico exercido pelos antibióticos em combinação com a lipofectamina, e sem SFB, para facilitar a formação dos complexos de transfecção (lipofectamina + siRNA ou microRNA). Este meio de transfecção (sem SFB e antibióticos) foi mantido por um período de 5 horas, após o qual foi adicionado meio DMEM contendo antibióticos e SFB (concentração final de SFB: 10%). O meio de cultura utilizado nas transfecções foi sempre trocado por meio fresco (DMEM 10% SFB e antibióticos) após 24 horas de transfecção, a fim de minimizar os efeitos tóxicos induzidos pela lipofectamina.

Delineamento dos grupos experimentais:

- A) Ensaios com microRNA:
 - Grupo Controle (CTL): Células SK-mel-103 não submetidas a intervenções experimentais.
 - Grupo Controle LIPO (CTL LIPO): Células SK-mel-103 tratadas com lipofectamina.
 - Grupo microRNA controle negativo (miR-CTL): Células SK-mel-103 submetidas a transfecção com 50 nM de microRNA controle negativo.

• Grupo microRNA-34a (miR-34a): Células SK-mel-103 submetidas a transfecção com 50 nM de mímico do miR-34a.

OBSERVAÇÃO: Em alguns experimentos foram utilizados apenas os grupos CTL LIPO e miR-34a.

- B) <u>Ensaios com siRNA</u>:
 - Grupo Controle LIPO (CTL LIPO): Células SK-mel-103 tratadas com lipofectamina.
 - Grupo siRNA TGF-β2 (siTGF-β2): Células SK-mel-103 submetidas a transfecção com 50 nM de siRNA 1 e 50 nM de siRNA 2.

Protocolo de transfecção:

Para placa de 24 poços (volume utilizado por poço):





• Grupos transfectados com microRNA (miR-CTL e miR-34a):

Para placa de 6 poços (volume utilizado por poço):

• Grupo Controle LIPO (CTL LIPO):



• Grupos transfectados com microRNA ou siRNA (miR-CTL, miR-34a e





OBSERVAÇÃO: Os experimentos de silenciamento do TGF- β 2 foram realizados em placa de 6 poços. 50 nM de cada um dos siRNAs (siRNA 1 e 2) foi utilizado por poço, portanto: 3.75 µL de siRNA1 e 3.75 µL de siRNA2 (do estoque 20 µM) em 242.5 µL de meio DMEM (sem SFB e sem antibióticos).

A eficiência de transfecção com o mímico do miR-34a foi analisada por real-time PCR e Western Blotting de seus alvos moleculares mais característicos (CDK4, CDK6, E2F3 e Bcl-2). A eficiência de silenciamento do TGF-β2 foi avaliada por Western Blotting de alguns de seus alvos moleculares mais característicos (AKT, ERK1/2, c-myc e MMP-2).

3.4. Tratamento com os quimioterápicos cisplatina, doxorrubicina e temozolomida

Os quimioterápicos temozolomida (TMZ) e cisplatina, utilizados para as análise da sensibilidade a fármacos, foram primeiramente diluídos em DMSO e após em meio de cultura, de modo que a concentração final de DMSO no meio de cultura fosse de 0.1% (concentração não tóxica para as células SK-mel-103 de acordo com testes de citotoxicidade realizados previamente aos tratamentos). O quimioterápico doxorrubicina foi diluído diretamente em meio de cultura. Testes preliminares de citotoxicidade com os quimioterápicos foram realizados para a determinação do IC50 e melhor tempo para tratamento com as drogas. Tendo esses valores como base, as condições para os tratamentos após a transfecção das células SK-mel-103 com o mímico do miR-34a foram determinadas; Concentrações de TMZ utilizadas: 0, 100, 200 e 300 µM; Concentrações de cisplatina utilizadas: 0, 10, 25 e 50 μ M; Concentrações de doxorrubicina utilizadas: 0, 0.5, 2.5 e 5 μ M; tempo de tratamento com os quimioterápicos: 24 horas. Os tratamentos com os quimioterápicos foram realizados 24 horas após a transfecção das células SK-mel-103 com o mímico do miR-34a. Após 24 horas de tratamento com os quimioterápicos a viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT.

3.5. Ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT

Terminado o período de tratamento com os quimioterápicos (24 horas), o meio de tratamento foi removido, os poços foram lavados com PBS e adicionados de meio sem soro contendo o corante MTT (0.5 mg/mL). Após incubação por 4 h a 37°C, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 1 mL/poço de etanol para solubilização do formazan. As placas foram, então, agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada poço foi lida em leitor de placas (ELx 800 BIO-TEK) em $\lambda = 570$ nm (Mosmann, 1983; Denizot

& Lang, 1986). Os valores foram expressos como porcentagens de redução do MTT em relação ao controle (% CTL).

3.6. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

Após as transfecção com siRNA para TGF-β2, miR-CTL ou mímico do miR-34a (realizadas em placas de 6 pocos), foi realizada a coleta das células com o auxílio de um raspador de células ("cell scraper"). A seguir, as células foram transferidas para tubos do tipo eppendorf, centrifugadas, lavadas com PBS (3X) e lisadas com tampão de lise apropriado contendo antiproteases. As amostras foram, então, homogeneizadas com sonicador e mantidas em banho de gelo durante 2h, com agitações a cada 30 minutos, com o objetivo de aumentar a eficiência da extração de proteínas. Após centrifugação do extrato celular a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi descartado e o conteúdo de proteínas foi determinado por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando kit comercial (Sigma) com Albumina como padrão. Após a dosagem de proteínas as amostras foram acrescidas de tampão de amostra na proporção 1:1 [Tris-HCl 100 mM (pH 6.8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0.1 % e glicerol 20%]. A seguir, as amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida (12%) contendo SDS (SDS-PAGE). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF (previamente ativadas com metanol) na presença de 20% de metanol e 0.02% de SDS durante 1h e 30 min em voltagem constante de 120 Volts. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (no caso de proteínas totais) ou com BSA a 3% (no caso de proteínas fosforiladas) preparado em tampão Tris contendo tween 20 a 0,05% (TBST) e incubadas "overnight" com anticorpos primários para: CDK4 (Cat. N°: #2906 -Cell signaling), CDK6 (Cat. N°: #3136 - Cell signaling), E2F3 (Cat. N°: ab11843 - Abcam), Ciclina E (Cat. N°: #4129 – Cell signaling), Phospho-Rb (Ser⁷⁹⁵) (Cat. N°: #9301 - Cell signaling), p21 (Cat. N°: #2947 - Cell signaling), Bax (Cat. N°: #2772 - Cell signaling), Bcl-2 (Cat. N°: #2870 - Cell signaling), Caspase-3 (Cat. N°: #9665 - Cell signaling), PARP-1 (cleaved p25) (Cat. N°: #04-576 – Upstate/Millipore), LC3B (Cat. N°: #2775 - Cell signaling), p62/SQSTM1 (Cat. N°: sc-28359 - Santa Cruz), PTEN (Cat. N°: #9559 - Cell signaling), Phospho-PTEN (Ser³⁸⁰/Thr^{382/383}) (Cat. N°: #9549 - Cell signaling), PP1 α (Cat. N°: #2582 – Cell signaling), PP2A α e β (Cat. N°: ab32141 – Abcam), PTP4A3 (Cat. N°: ab38673 – Abcam), SHP-2 (Cat. N°: #3752 – Cell signaling), Acid Phosphatase (LMWPTP) (Cat. N°: ab26232 – Abcam), mTOR (Cat. N°: ab63480 – Abcam), Phospho-mTOR (Ser²⁴⁴⁸) (Cat. N° ab51044 – Abcam), Axl (Cat. N°: #4566 – Cell signaling), AKT-1 (Cat. N°: #2938 – Cell signaling), Phospho-AKT (Thr³⁰⁸) (Cat. N°: #4056 - Cell signaling), p42/44 MAPK (Erk1/2) (Cat. N°: #4695 - Cell signaling), Phospho-p42/44 MAPK (Erk1/2) (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) (Cat. N°: #4376 – Cell signaling), β catenina ativa (Cat. N°: #05-665 – Upstate), IRE-1α (Cat. N°: #3294 – Cell signaling), HSP90 (Cat. Nº: sc-69703 - Santa Cruz), HSP70 (Cat. Nº: sc-32239 - Santa Cruz), HSP60 (Cat. N°: sc-271215 – Santa Cruz), HSP27 (Cat. N°: ab2790 – Abcam), TGF-β2 (Cat. N°: ab113670 – Abcam), MMP-2 (Cat. N°: #4022 – Cell signaling), ROCK-1 (Cat. N°: #4035 - Cell signaling), c-myc (Cat. N°: #9402 - Cell signaling), UBC-3 (Cat. N°: #4997 - Cell signaling), YB-1 (Cat. N°: #4202 - Cell signaling) e GAPDH (Cat. N°: #2128 - Cell signaling), diluídos 1:1000. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBST (3X de 5 min) e incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase-HRP (1:5000) por 1h e 30 min. Após lavagem das membranas com TBS (3X de 5 min), as bandas foram detectadas por quimiluminescência (ECL) utilizando ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria usando ImageJ software (NIH). Os valores resultantes foram corrigidos pelo valor obtido para o controle interno (GAPDH) correspondente a cada banda. Cada experimento foi realizado em triplicata, e as intensidades finais foram expressas relativamente ao controle LIPO (% CTL LIPO) ou como unidades arbitrárias (u.a).

3.7. Análise do fluxo autofágico

Para a análise do fluxo autofágico, células SK-mel-103 foram transfectadas com mímico do miR-34a e o inibidor autofágico cloroquina CLQ (50 μ M) foi adicionado ao meio de cultura 4 horas após a transfecção. O meio de cultura contendo CLQ foi mantido em contato com as células até o final do experimento. Após 24 e 48 horas, amostras para Western Blotting foram preparadas para a análise da expressão dos marcadores autofágicos LC3B e p62.

3.8. Microscopia Confocal

Células SK-mel-103 foram plaqueadas 24 horas antes do experimento em lamínulas de vidro (12 mm de diâmetro), inseridas no interior de placas de cultura de 24 poços (1 lamínula por poço). No dia seguinte, as células de melanoma foram transfectadas com mímico do miR-34a, por 24 e 48 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS, fixadas por 20 minutos com paraformaldeído (PFA) 4% em PBS, tratadas com glicina 0.1 M em PBS por 20 minutos, permeabilizadas com triton X-100 0.2% por 2 minutos e bloqueadas com solução de SFB 10% por 5 minutos. Subsequentemente, as células foram incubadas com anticorpo primário rabbit polyclonal anti-p53 (1:200) por 1 hora a 37°C em câmara humidificada. O anticorpo primário foi previamente diluído em solução bloqueadora. As células foram, então, lavadas 1 vez com PBS e bloqueadas por 1 minuto.

Então, as células foram incubadas com anticorpo secundário fluorescente por 30 minutos a 37°C em câmara humidificada. O anticorpo secundário Alexa-Fluor[®]488 foi diluído 1:1000 em solução bloqueadora. O núcleo das células foi marcado com Hoechst. Após 3 lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas de vidro, utilizando meio de montagem da DAKO. As análises foram feitas no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica aplicada a Biologia Celular (INFABIC), na Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, com o auxílio do Dr. Marcelo Bispo de Jesus. As amostras foram analisadas usando um confocal Zeiss LSM 780-NLO em um microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com lentes de imersão 60X. As imagens foram adquiridas sob airy-unity 1, garantindo a confocalidade. Foram adquiridos 1024 por 1024 pixels e os arquivos foram salvos em formato próprio (lsm) sem perda de qualidade, sendo posteriormente analisadas usando ImageJ software (NIH).

3.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após transfecção com 50 nM de mímico do miR-34a por 48 horas as células SK-mel-103 foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 0.01 M, e fixadas com glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M a 4 °C. Após a fixação as células foram lavadas em tampão cacodilato 0.1 M pH 7.2, e pós-fixadas em uma solução contendo 1% tetróxido de ósmio (OsO₄), 0.8% ferrocianeto de potássio por 1 h. Em seguida, foi realizado a desidratação das amostras em gradiente crescente de acetona e incluídos em resina Epon[®]. Em seguida, cortes ultrafinos foram obtidos em um ultramicrótomo e coletados em grades de cobre com 200 mesh, as amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e as imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JM 1400. Todas as análises de MET foram realizadas pela doutoranda Karin Juliane Rocha no Complexo de Central de Apoio a Pesquisa-UEM (COMCAP), com o suporte técnico do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

3.10. Extração de RNA

Para a extração de RNA, as células foram coletadas (linhagens SK-mel-103, SKmel-147 e SK-mel-28), centrifugadas, lavadas com PBS e novamente centrifugadas. O pellet foi ressuspendido e homogeneizado em 700 μ L de Qiazol Lysis Reagent (Qiagen) e mantido à temperatura ambiente por 5 minutos. 200 μ L de clorofórmio foram adicionados, agitando vigorosamente o tubo por 15 segundos. Seguiu-se uma centrifugação a 12000*g* por 15 min a 4°C. A fase superior aquosa, que continha o RNA, foi transferida para um novo tubo. A fim de precipitar o RNA, adicionou-se 500 μ L de isopropanol. A amostra foi mantida a temperatura ambiente por 10 min e então centrifugada a 12000*g* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o pellet lavado com etanol 75% em H₂O DEPC. Após uma centrifugação a 7500*g* por 5 min a 4°C o etanol foi retirado e o tubo foi colocado, aberto, por 5min na bancada para evaporação do remanescente. Em seguida o RNA foi

3.11. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA dos miRNAs foi utilizado o TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante e primer específicos para miR-34a ou U6 (TaqMan microRNA assays, Applied Biosystems).

3.12. qRT-PCR

A reação de qRT-PCR foi montada em placa de 96 poços utilizando o TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), e incubada no StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) a 95°C por 10 min seguidos por 40 ciclos de 15s a 95°C e 1 min a 60°C. A quantificação dos microRNAs foi feita através de TaqMan microRNA Assays (Applied Biosystems) que além do par de primers específicos para transcrição reversa e amplificação, contém uma sonda fluorescente, que contribui para sua precisão. Os dados de expressão do miR-34a foram normalizados pelo valor da expressão do pequeno RNA U6, utilizado como controle endógeno. Os valores de fold change e desvio padrão foram determinados através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

3.13. Análise estatística dos resultados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizada utilizando teste "t" de Student ou ANOVA. *Post test* Tukey foi empregado quando necessário. Foi adotado o nível de significância *P* < 0.05.

- RESULTADOS E DISCUSSÃO -

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise comparativa da expressão de miR-34a entre as linhagens celulares de melanoma metastático humano SK-mel-103, SK-mel-147 e SK-mel-28

Diversos estudos têm mostrado que a expressão de miR-34a, um importante microRNA supressor de tumor, apresenta-se reduzida ou até mesmo ausente em linhagens celulares de melanoma e em pacientes diagnosticados com melanoma cutâneo (Lodygin et al., 2008; Molnár et al., 2008; Caramuta et al., 2010).

Como ainda não tínhamos informações a respeito da expressão de miR-34a nas três linhagens de melanoma metastático humano (SK-mel-103, SK-mel-147 e SK-mel-28) optamos por, antes de dar início as transfecções com o mímico do miR-34a, realizar uma análise comparativa da expressão deste microRNA nas 3 linhagens. Como podemos ver na **Figura 12**, a linhagem SK-mel-103 apresentou a menor expressão de miR-34a entre as 3 linhagens de melanoma, sendo a expressão deste microRNA cerca de 20 vezes maior para a linhagem SK-mel-147 e 50 vezes maior para a linhagem SK-mel-28.

Levando em consideração as mutações presentes nas três linhagens de melanoma (apresentadas anteriormente na **Tabela 1**), não esperávamos encontrar uma maior expressão de miR-34a na linhagem SK-mel-28. A **Figura 13** representa um esquema simplificado da associação entre as mutações presentes em cada linhagem celular e a expressão de miR-34a. Como podemos ver nessa figura, a ativação constitutiva da via MAPK/ERK devido à presença de *BRAF* mutada na linhagem SK-mel-28 poderia estar associada à redução na expressão de miR-34a, efeito que ainda poderia ser intensificado nessa linhagem celular pela perda de função da proteína p53 (mutação p53 – R273H). Essa

conclusão é possível por dois motivos: 1) p53 estimula a expressão de miR-34a (He et al. 2007(a); He et al., 2007(b); Hermeking, 2010), portanto a perda de p53 funcional na linhagem SK-mel-28 contribuiria para a redução na expressão de miR-34a; 2) A via MAPK/ERK tem sido associada a inibição da expressão de miR-34a (Couts et al., 2013), portanto o aumento na funcionalidade desta via na linhagem SK-mel-28 também deveria contribuir para a redução na expressão de miR-34a. Entretanto, sendo a expressão de miR-34a maior na linhagem SK-mel-28 do que nas outras duas linhagens celulares, é possível supor que outro mecanismo, não relacionado com as mutações em NRAS, BRAF e p53, seja determinante para a expressão de miR-34a em melanomas. Diversos estudos tem apontado para a metilação em CpG da região promotora do gene miR-34 como o principal mecanismo responsável pela redução na expressão deste microRNA em tumores (Lodygin ett al., 2008; Chim et al., 2011; Kubo et al., 2011; Vogt et al., 2011; Chen et al., 2012; Tanaka et al., 2012; Siemens et al., 2013). A presença desse mesmo mecanismo epigenético já foi demonstrada em linhagens celulares de melanoma (Lodygin et al., 2008). Sendo assim, é possível supor que a metilação da região promotora do gene miR-34 esteja envolvida com a menor expressão desse microRNA nas linhagens celulares SK-mel-103 e SK-mel-147, comparado a linhagem SK-mel-28.

Baseando-nos no resultado apresentado na **Figura 12**, escolhemos a linhagem SKmel-103 como modelo para avaliar a influência do miR-34a em vários aspectos da biologia do melanoma. Devido a presença de níveis bastante reduzidos de miR-34a na linhagem SKmel-103, acreditamos que a expressão ectópica deste microRNA nesta linhagem poderia nos fornecer respostas celulares mais vigorosas.



Figura 12. Análise comparativa da expressão de miR-34a entre as linhagens celulares de melanoma metastático humano SK-mel-103, SK-mel-147 e SK-mel-28. A expressão de miR-34a para as diferentes linhagens celulares é apresentada em função da expressão obtida para a SK-mel-103 (quantidade relativa – q.r). U6 foi utilizado como controle interno.



Figura 13. Associação entre as principais mutações presentes nas linhagens celulares SK-mel-103, SK-mel-147 e SK-mel-28 e a expressão de miR-34a. As linhagens SK-mel-103, SK-mel-147 apresentam o gene NRAS mutado (Q61R), o que é responsável pela ativação constitutiva da proteína NRAS e ativação das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK. A ativação da via MAPK/ERK tem sido associada à redução na expressão de miR-34a. Já a linhagem SK-mel-28 apresenta mutações nos genes BRAF (V600E), associada à ativação constitutiva da via MAPK/ERK, e p53 (R273H). Ambas as mutações poderiam contribuir para a redução na expressão de miR-34a nessa linhagem celular.

Análise da eficiência de transfecção de células SK-mel-103 com o mímico do miR-34a

A concentração de mímico do miR-34a usada nos primeiros testes de transfecção foi de 50 nM. A escolha dessa concentração foi feita com base em dado da literatura onde o mímico foi utilizado na transfecção de linhagens de melanoma (Yan et al., 2009) e também com base nas instruções do fabricante. As transfecções foram realizadas utilizando o reagente de transfecção lipofectamina (LipofectamineTM 2000 Transfection Reagent - Invitrogen), de acordo com instruções do fabricante adaptadas para a linhagem SK-mel-103 (protocolo descrito em detalhes na seção "Materiais e Métodos"). A transfecção inicial nessas condições foi bastante eficiente, pois foi capaz de aumentar em cerca de 10300 vezes os níveis de miR-34a nas células SK-mel-103, após 24 horas de transfecção (**Figura 14A**). Após 48 horas de transfecção os níveis de miR-34a foram reduzidos para cerca de 165 vezes em relação aos níveis do grupo CTL LIPO (**Figura 14A**). Com 72 horas de transfecção os níveis de miR-34a mantiveram-se praticamente constantes, cerca de 158 vezes a expressão exibida pelo grupo CTL LIPO (**Figura 14A**).

A elevada eficiência de transfecção com o mímico do miR-34a foi corroborada pelo silenciamento de suas proteínas-alvo, como exemplo as proteínas do ciclo celular CDK4 e CDK6 (**Figura 14B**), após 48 horas de transfecção. A transfecção de células SK-mel-103 com o dobro da concentração de mímico do miR-34a (100 nM) não induziu silenciamento adicional de suas proteínas-alvo CDK4 e CDK6 (**Figura 14B**). Sendo assim, a concentração de 50 nM de mímico do miR-34a foi mantida para os experimentos de transfecção subsequentes.



Figura 14. Expressão de miR-34a e algumas de suas proteínas-alvo após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a. (A) Análise da expressão de miR-34a após transfecção de células SK-mel-103 com 50 nM de mímico do miR-34a, durante 24, 48 e 72 horas (Real-Time PCR). A expressão de miR-34a é apresentada em função da expressão obtida para o grupo CTL LIPO (quantidade relativa – q.r). U6 foi utilizado como controle interno. (B) Análise da expressão das proteínas CDK4 e CDK6 após transfecção de células SK-mel-103 com 50 nM ou 100 nM de mímico do miR-34a por 48 horas (Western Blotting). GAPDH foi utilizado como controle interno (n = 3 experimentos distintos).

miR-34a reduz a viabilidade das células de melanoma

A expressão ectópica de miR-34a induziu uma contínua diminuição, de forma tempo-dependente, na viabilidade das células de melanoma. Células SK-mel-103 transfectadas com miR-34a por 24 h, 48 h, 72 h e 96 h exibiram taxas de viabilidade celular de 87 %, 77 %, 48 % e 35 %, respectivamente, comparada com o grupo CTL LIPO (**Figura 15**). Ambos os grupos controle (CTL LIPO e miR-CTL) tiveram suas taxas de viabilidade celular reduzidas, efeito provavelmente atribuído a toxicidade do reagente de transfecção utilizado (lipofectamina). Entretanto, em ambos os grupos controle a porcentagem de

viabilidade celular foi completamente recuperada após 96 horas de transfecção. Subsequentemente, investigamos os mecanismos associados à redução na viabilidade das células de melanoma induzida por miR-34a.



Figura 15. Análise da viabilidade de células SK-mel-103 após transfecção com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM de miR-CTL ou mímico do miR-34a e a porcentagem de viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de redução do MTT 24, 48, 72 e 96 horas após as transfecções. O resultado é apresentado como porcentagem do grupo controle (% CTL) (n = 3, P < 0.05). Valores são média ± EPM. ^a Diferença significativa vs CTL; ^b Diferença significativa vs CTL LIPO; ^c Diferença significativa vs miR-CTL. ANOVA seguido de *post test* Tukey.

miR-34a reduz a expressão de proteínas associadas a progressão do ciclo celular em

células de melanoma

Células de melanoma transfectadas com o miR-34a apresentaram redução da expressão das quinases dependentes de ciclinas CDK4 e CDK6, e do fator de transcrição E2F3, reguladores chaves da progressão do ciclo celular (**Figura 16A e 16B**). Essas proteínas estão entre os alvos validados mais característicos de miR-34a (Revisado por He et al., 2007(a); Revisado por He et al., 2007(b); Revisado por He et al., 2007(c)). Revisado

por Hermeking, 2010). Entre elas, a expressão da CDK6 foi quase completamente inibida (**Figura 16A e 16B**). Além disso, foi observado diminuição nos níveis de fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb) e aumento na expressão da proteína p21 (**Figura 16A e 16B**). Esperávamos observar redução na expressão de Ciclina E, outro alvo bem caracterizado de miR-34a. Entretanto, seu nível de expressão não foi alterado significativamente, o que pode estar relacionado ao fato de que o alvo validado para miR-34a na verdade é a isoforma específica Ciclina E2 (Revisado por He et al., 2007(a); Revisado por He et al., 2007(b); Revisado por He et al., 2007(c)).

A redução na viabilidade das células de melanoma após expressão ectópica de miR-34a deve estar, pelo menos em parte, relacionada com um declínio da taxa proliferativa dessas células devido a diminuição na expressão da CDK4, CDK6 e E2F3, proteínas que induzem a progressão do ciclo celular. Além disso, a redução nos níveis de fosforilação em Ser⁷⁹⁵ da proteína Rb, que age como modulador de fatores de transcrição E2F, certamente teve papel determinante na parada do ciclo celular nessas células. Durante a fase G1 do ciclo celular, um complexo ativo constituído por CDK4/6 e Ciclina D é responsável pela fosforilação da Rb, o que promove o rompimento do complexo repressor formado entre a proteína Rb e o fator de transcrição E2F (Sherr & Roberts, 1999). Esse rompimento libera o fator de transcrição E2F, que passa a estimular a expressão de genes-chave para o processo de síntese de DNA durante a fase S, permitindo a progressão do ciclo celular em G1 / S (Lukas et al., 1996; Guo et al., 2005). Sendo assim, a redução observada nos níveis de fosforilação da Rb provavelmente se deu por ação indireta de miR-34a via silenciamento de seus alvos CDK4 e CDK6, ambas proteínas responsáveis pela fosforilação da Rb. O aumento na expressão da p21, um importante inibidor de CDKs responsável pela parada do ciclo celular na fase G1, também deve ter contribuído para a redução na taxa proliferativa das células de melanoma transfectadas com miR-34a. Esse resultado está em acordo com estudo prévio que mostrou um aumento da expressão de p21 após expressão ectópica de miR-34a em células de carcinoma coloretal HCT116 (Yamakuchi & Lowenstein, 2009).



Figura 16. Expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM de mímico do miR-34a e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após a transfecção. Células controle foram tratadas com a mesma quantidade de lipofectamina utilizada para as transfecções. (A) Imagens dos blottings para as proteínas CDK4, CDK6, Ciclina E, E2F3, p-Rb (Ser⁷⁹⁵) e p21. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. (B) Análise densitométrica dos blottings. O resultado é apresentado como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores são médias ± EPM. * diferença significativa vs CTL LIPO. Teste "t" de Student.

miR-34a aumenta a expressão de marcadores apoptóticos em células de melanoma

Além de atuar como inibidor da progressão do ciclo celular, miR-34a ainda age como supressor de tumor através de indução da apoptose (Chang et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007; Tarasov et al., 2007; Welch et al., 2007; Revisado por Hermeking, 2010). Um dos principais alvos moleculares já validados de miR-34a, envolvido com o processo apoptótico, é a proteína antiapoptótica Bcl-2 (Revisado por (Revisado por He et al., 2007(a); Revisado por He et al., 2007(b); Revisado por He et al., 2007(c); Revisado por Hermeking, 2010). Inesperadamente, a transfecção com 50 nM de miR-34a não promoveu o silenciamento da proteína Bcl-2 nas células SK-mel-103 (Figura 17A). Nem mesmo o aumento da concentração de miR-34a para 100 nM foi capaz de reduzir a expressão da Bcl-2 (Figura 17B). No presente estudo, o mecanismo exato relacionado com esta inalteração na expressão da Bcl-2 não foi investigado. Porém, sabendo que miR-34a é capaz de parear apenas com a porção 3'UTR de um mRNA-alvo com sequência normal, é possível supor que a linhagem SK-mel-103 apresente alguma mutação no gene da Bcl-2. O gene da Bcl-2 mutado produziria um mRNA com estrutura alterada, com o qual miR-34a seria incapaz de parear e promover o silenciamento. Para confirmar esta hipótese, seria necessário analisar a estrutura do gene da Bcl-2 na linhagem SK-mel-103, a fim de saber se sua estrutura é normal ou se apresenta algum tipo de mutação que impossibilita seu silenciamento por miR-34a. Apesar da expressão da Bcl-2 permanecer inalterada após transfecção das células SK-mel-103 com miR-34a, a expressão de seu parceiro pró-apoptótico Bax foi aumentada consideravelmente (Figura 17A).

A ocorrência da apoptose é criticamente favorecida pelo processo de permeabilização da membrana mitocondrial, o qual permite a liberação de proteínas

indutoras de apoptose presentes no espaço intermembrana da mitocôndria. A formação de poros na membrana mitocondrial externa é finamente controlada por um balanço entre membros anti e pró-apoptóticos da família Bcl-2, como as proteínas Bcl-2 (anti-apoptótica) e Bax (pró-apoptótica). Em resposta a estímulos apoptóticos Bax, uma proteína citosólica, sofre alterações conformacionais que permitem sua inserção na membrana mitocondrial externa formando poros ou canais iônicos. Após a permeabilização da membrana mitocondrial externa, proteínas indutoras de apoptose, como o citocromo c, são liberadas para o citoplasma e induzem uma cascata de eventos que culmina com a ativação de caspase-3, que age no núcleo induzindo alterações importantes para o processo de morte celular, incluindo a fragmentação do DNA (Revisado por Armstrong, 2006; Fernandes et al., 2011).

A despeito da inalteração da expressão de Bcl-2, a razão Bax/Bcl-2 (**Figura 17C**), associada à decisão de vida ou morte celular (Basu & Haldar, 1998), apresentou aumento de 46% nas células transfectadas com miR-34a, indicando tendência a morte por apoptose nessas células. Corroborando o aumento na razão Bax/Bcl-2, foi possível detectar aumento de 32% na razão Caspase-3 clivada/Pró-caspase-3 (**Figura 17D**) e de 200% na quantidade de PARP-1 clivada (**Figura 17E**) nas células de melanoma transfectadas com miR-34a, o que reafirma a tendência a apoptose nestas células. A caspase-3 é considerada como a proteína efetora do processo apoptótico e PARP-1 um de seus principais alvos moleculares, com papel fundamental no processo de reparo do DNA (Fernandes-Alnemri et al. 1994). Quando clivada, a caspase-3 torna-se ativa e passa a degradar alvos "downstreams" importantes da via apoptótica, como a PARP-1, contribuindo para a fragmentação do DNA característica nesse processo (Fernandes-Alnemri et al. 1994).



Figura 17. *Expressão de proteínas relacionadas com apoptose após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a*. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM (ou 100 nM) de mímico do miR-34a e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após a transfecção. Células controle foram tratadas com a mesma quantidade de lipofectamina utilizada para as transfecções. (A) Imagens dos blottings para as proteínas Bcl-2, Bax, Pró-caspase-3, capase-3 clivada e PARP-1 clivada. (B) Imagem do blotting para a proteína Bcl-2, comparando sua expressão em células SK-mel-103 transfectadas com 50 nM ou 100 nM de mímico do miR-34a. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. (C) Razão Caspase-3 Clivada/Pró-caspase-3, calculada após análise densitométrica dos blottings para estas proteínas. (D) Análise densitométrica dos blottings para estas proteínas. Os resultados são apresentados como unidades arbitrárias (u.a) ou como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores são média \pm EPM. * diferença significativa *vs* CTL LIPO. Teste "t" de Student.

miR-34a induz aumento da expressão e da translocação nuclear de p53 em células de melanoma

A seguir, iniciamos uma busca por alterações moleculares através das quais miR-34a afeta os processos de sobrevivência, proliferação e apoptose em células de melanoma. A primeira molécula analisada foi o fator de transcrição p53, que compõe uma das mais importantes vias supressoras de tumor, responsável por parada do ciclo celular e indução de apoptose (Zuckerman et al., 2009; Ozaki & Nakagawara, 2011; Suzuki & Matsubara, 2011). miR-34a é induzido por p53 em resposta a estresses oncogênicos e danos ao DNA, e é responsável por muitos dos efeitos supressores de tumor anteriormente atribuídos a p53 (He et al. 2007(a); He et al., 2007(b); Hermeking, 2010). Recentemente, foi descrito a ocorrência de uma alça de feedback positivo entre p53 e miR-34a. Nesse mecanismo de feedback participa ainda outra proteína importante, a SIRT-1. Classificada como histona deacetilase classe III, a SIRT-1 é responsável pela desacetilação NAD-dependente de histonas e proteínas não-histônicas, como exemplo a proteína p53. A desacetilação do resíduo Lys382 da p53, mediada por SIRT-1, promove a redução da atividade da p53. Estudos demonstraram que SIRT-1 é alvo direto de miR-34a, e o silenciamento de SIRT-1 por miR-34a é responsável pelo aumento dos níveis de p53 acetilada, ou seja, de p53 ativa. Sendo assim, ficou demostrado a existência de uma alça de feedback positivo entre p53miR-34a-SIRT-1. Isso significa que, após ativação de p53, o aumento na expressão de miR-34a silencia SIRT-1, o que por sua vez contribui para o aumento da atividade da p53 (Yamakuchi et al., 2008; Yamakuchi & Lowenstein, 2009).

Sabendo da existência desse mecanismo de feedback, avaliamos a expressão de p53 e também sua translocação nuclear, a fim de verificar a funcionalidade da proteína após a expressão ectópica de miR-34a nas células de melanoma. Por ser um fator de transcrição, p53 exerce a maior parte de suas atividades supressoras de tumor no núcleo, estimulando a transcrição de inúmeros genes supressores de tumor. Por esse motivo, a análise da translocação de p53 do citosol, onde essa proteína é normalmente presente na ausência de estímulo estressor, para o núcleo, constitui um bom indicador do grau de atividade dessa proteína. Células SK-mel-103 controle (CTL LIPO) exibiram uma expressão extremamente baixa de p53 (Figura 18A e 18B), enquanto que células SK-mel-103 transfectadas com miR-34a apresentaram um aumento significativo não só na expressão (Figura 18A e 18B), mas também na translocação de p53 para o núcleo, especialmente após 48 horas de transfecção (Figura 20) como indicado por imagens de microscopia confocal (Figuras 19 e 20). Estas imagens mostram claramente o aumento da marcação de p53 no núcleo das células SK-mel-103, o que é um resultado extremamente interessante uma vez que p53 apresenta outros alvos com atividade supressora de tumor, além de miR-34a. Entre eles estão as proteínas p21 e Bax, ambas com expressões aumentadas nas células SK-mel-103 após transfecção com miR-34a (Figuras 16 e 17, respectivamente).



Figura 18. Expressão da proteína p53 após transfecção de células de melanoma com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM de mímico do miR-34a e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após a transfecção. Células controle foram tratadas com a mesma quantidade de lipofectamina utilizada para as transfecções. (A) Imagem do blotting para as proteínas p53. (B) Análise densitométrica do blotting para p53. O resultado é apresentado como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores são média ± EPM. * diferença significativa vs CTL LIPO. Teste "t" de Student.



Figura 19. Localização subcelular de p53 após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a por 24 horas. Lâminas para microscopia confocal foram preparadas 24 horas após as transfecções com miR-34a ou tratamento com lipofectamina (grupo CTL LIPO). A proteína p53 foi marcada com anticorpo secundário conjugado com Alexa®-Fluor 488 (verde) e os núcleos marcados com Hoechst (azul). (A-C) Grupo CTL LIPO: Notar, na sobreposição das imagens, a presença de apenas um núcleo marcado para p53 (seta vermelha). (D-F) Grupo miR-34a: Notar que a transfecção com miR-34a por 24h aumentou o número de núcleos marcados para p53 (4 núcleos). Setas vermelhas nas imagens sobrepostas: Células SK-mel-103 com marcação nuclear para p53. Barras em C e F = 20 μ m.



Figura 20. Localização subcelular de p53 após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a por 48 horas. Lâminas para microscopia confocal foram preparadas 48 horas após as transfecções com miR-34a ou tratamento com lipofectamina (grupo CTL LIPO). A proteína p53 foi marcada com anticorpo secundário conjugado com Alexa®-Fluor 488 (verde) e os núcleos marcados com Hoechst (azul). (A-C) Grupo CTL LIPO: Notar, na sobreposição das imagens, a presença de dois núcleos marcados para p53 (setas vermelhas). (D-F) Grupo miR-34a: Notar a presença de grande número de núcleos marcados para p53 (16 núcleos). Setas vermelhas nas imagens sobrepostas: Células SK-mel-103 com marcação nuclear para p53. Barras em C e F = 20 μ m.

miR-34a modula a expressão de proteínas-chave envolvidas com os processos de

proliferação, evasão da apoptose e sobrevivência de células de melanoma

A atividade da proteína fosfatase PTEN, principal regulador negativo da via da PI3K/AKT (Revisado por Hollander et al., 2011), foi alterada pela expressão ectópica de miR-34a nas células SK-mel-103. Apesar da expressão global da PTEN ter sido aumentada,

os níveis de fosforilação nos resíduos inibitórios Ser³⁸⁰/Thr^{382/383} também foram aumentados (Figura 21A). Entretanto, esse aumento na fosforilação no sítio inibitório da PTEN não ocorreu de forma proporcional ao aumento na expressão total da proteína, uma vez que a razão p-PTEN/PTEN mostrou redução de 28% nas células de melanoma transfectadas com miR-34a (Figura 21B), o que nos permite concluir que a PTEN está mais ativa nesse grupo. A PTEN apresenta-se constitutivamente ativa nas células onde é expressa, sofrendo inativação por mecanismos pós-traducionais, em especial por fosforilação de sítios inibitórios como Ser³⁸⁰/Thr^{382/383}, presentes na porção C-terminal da proteína (Revisado por Tamguney & Stokoe, 2007; Revisado por Wang & Jiang, 2008; Revisado por Zhang & Yu, 2010). O conhecimento a respeito da dinâmica de regulação da atividade da PTEN é recente e ainda escasso, entretanto a responsabilidade pelas fosforilações inibitórias da PTEN já foi atribuída a algumas proteínas, como a caseína quinase 2 (CK2), GSK3β e GLTSCR2 (PICT-1). (Vazquez et al., 2000; Revisado por Tamguney & Stokoe, 2007; Revisado por Wang & Jiang, 2008; Revisado por Zhang & Yu, 2010). O aumento na expressão da PTEN deve ainda estar relacionado com o aumento na expressão e atividade da p53. Juntamente com miR-34a, a PTEN tem sido apontada como um alvo molecular chave da via supressora de tumor induzida por p53 (Stambolic et al., 2001; Revisado por Tamguney & Stokoe, 2007; Revisado por Wang & Jiang, 2008; Revisado por Zhang & Yu, 2010). Estudos têm mostrado que PTEN e p53 regulam uma a outra em um mecanismo de feedback positivo. PTEN interage com p53 dando estabilidade a forma ativa desta proteína que, por sua vez, modula positivamente a transcrição do gene da PTEN (Stambolic et al., 2001; Lian & Cristofano, 2005; Li et al., 2006).

O aumento na atividade da PTEN foi acompanhado por redução na expressão da p-AKT (Thr³⁰⁸) e na razão p-AKT/AKT-1 (**Figura 21A e 21C**), o que significa redução na atividade da AKT nas células de melanoma transfectadas com miR-34a. Esta redução na atividade da AKT deve estar relacionada não apenas com o aumento na atividade da PTEN, mas também com a redução na expressão da proteína Axl (Figura 21A e 21D). Recentemente, Axl foi apontado como alvo direto de miR-34a (Lee et al., 2011; Mackiewicz et al., 2011; Mudduluru et al., 2011), o que deve explicar sua reduzida expressão nas células de melanoma transfectadas com miR-34a. Axl é um receptor com atividade tirosina quinase que, uma vez ativado pela ligação com fatores de crescimento, é responsável pela ativação das quinases AKT e ERK1/2 (Fridell et al., 1996; Goruppi et al., 1997; Allen et al., 1999; Sawabu et al., 2007; Linger et al., 2008; Koorstra et al., 2009). Sendo assim, a redução na expressão de Axl deve estar relacionada não só com a redução na atividade da AKT, mas também com a redução na atividade da ERK1/2 (Figura 21A e **21E**), observada nas células de melanoma transfectadas com miR-34a. Há poucos meses foi proposto que a via de sinalização B-Raf/MKK/ERK pode regular a expressão de miR-34a em melanomas (Couts et al., 2013). Juntos, esses dados indicam a ocorrência de um mecanismo de feedback entre ERK e miR-34a. A redução nos níveis de fosforilação da AKT e ERK1/2 induzida por miR-34a no presente trabalho, corroborou dados apresentados por outros pesquisadores (Yan et al., 2009; Lal et al., 2011).

A via da MAPK/ERK tem sido associada à indução de proliferação, diferenciação, motilidade e inibição de apoptose, enquanto que a AKT, uma proteína central na via da PI3K, tem sido associada à indução de crescimento, sobrevivência e proliferação celular, além de inibir a apoptose, processos fundamentais para o funcionamento normal das células. Entretanto, em células tumorais estas duas vias de sinalização são freqüentemente desreguladas e, por este motivo, são alvos comuns de modulação em terapias contra o câncer (Revisado por Chappell et al., 2011; Revisado por Steelman et al., 2011(a)). Além dos efeitos celulares anteriormente citados, o aumento na atividade dessas vias em células tumorais tem sido associado à aquisição de resistência a fármacos, o que dificulta o tratamento quimioterápico do câncer (Abrams et al., 2010; Revisado por Chappell et al., 2011; Steelman et al., 2011(b); Revisado por Steelman et al., 2011(c)). Em melanomas, as vias da MAPK/ERK e PI3K/AKT são, em geral, constitutivamente ativas devido a alterações genéticas, e tem sido as principais vias associadas com o desenvolvimento e progressão do melanoma. Diversos estudos têm associado essa atividade constitutiva com a capacidade de melanoma em resistir a apoptose, proliferar de forma anormal, induzir angiogênese peritumoral e invadir novos tecidos, o que caracteriza o fenótipo agressivo exibido por este tipo de câncer (Revisado por Bogenrieder & Herlyn, 2011; Revisado por Gaudi & Messina, 2011; Revisado por Yajima et al., 2012). Sendo assim, a busca por intervenções capazes de reduzir a atividade dessas vias em melanomas tem sido prática freqüente, uma vez que podem refletir na redução da agressividade tumoral.

A proteína mTOR é um importante alvo da AKT, e funciona principalmente como um sensor da disponibilidade de nutrientes, induzindo crescimento celular. Suas atividades celulares são possibilitadas por meio da formação de dois complexos protéicos distintos: mTORC1 (composto pelas proteínas mTOR, Raptor, GβL e Deptor) e mTORC2 (composto pelas proteínas mTOR, Rictor, GβL, Sin1, PRR5 e Deptor). mTORC1 é formado após fosforilação em Ser²⁴⁴⁸ e ativação da mTOR pela AKT, e está envolvido com a indução de crescimento celular em presença de condições nutricionais favoráveis. Já o complexo mTORC2 pode induzir sobrevivência celular através de fosforilação da AKT no resíduo ativador Ser⁴⁷³ (Sarbassov et al., 2005; Jacinto et al., 2006), além de participar dos processos de remodelamento do citoesqueleto e transporte de íons (Revisado por Dunlop & Tee, 2009; Revisado por Laplante & Sabatini, 2009; Revisado por Downling et al., 2010; Revisado por Hoeffer & Klann, 2010; Revisado por Neufeld, 2010). Em muitos cânceres tem sido mostrado uma hiperativação da mTOR, que além de fornecer vantagens em termos de crescimento para a célula tumoral (Revisado por Guertin & Sabatini, 2005; Espona-Fiedler et al., 2012) tem sido associada a aquisição de resistência a drogas quimioterápicas (Revisado por Jiang & Liu, 2008). No presente trabalho não observamos alterações significativas na atividade da mTOR após expressão ectópica de miR-34a nas células de melanoma. Tal conclusão se baseia na análise da razão p-mTOR / mTOR, que indica o grau de atividade da proteína, e que permaneceu inalterada após a intervenção experimental, comparado ao grupo controle LIPO (**Figura 21F**).

A via da Wnt/ β -catenina é outra via de sinalização que pode regular positivamente a proliferação celular (MacDonald et al., 2009). Devido aos marcantes efeitos celulares associados à desregulação da atividade da β -catenina em melanomas, essa proteína tem despontado como um importante alvo de modulação em intervenções terapêuticas. No presente trabalho, mostramos que a expressão ectópica de miR-34a foi capaz de reduzir os níveis de β -catenina ativa em células SK-mel-103 (**Figura 21G**). A β -catenina encontra-se ativa quando desfosforilada em Ser37/Thr41 (van Noort et al., 2007), e uma vez ativa migra para o núcleo onde age como fator de transcrição. A redução nos níveis de β -catenina ativa em serda de reduzira causada por ação direta de miR-34a, já que a β -catenina foi descrita por outro grupo de pesquisa como alvo direto desse microRNA (Kim et al., 2011), ou por ação indireta via redução da atividade da AKT (Lee et al., 2009; Covey et al., 2010; Lau et al., 2011). Estudos confirmaram a relação entre AKT e β -catenina ao mostrar que níveis aumentados de PTEN promovem redução nos níveis intracelulares de β -catenina, atuando através da redução na atividade da AKT que por sua vez inibe a GSK3,
quinase responsável pela inativação da β-catenina (Lee et al., 2009; Covey et al., 2010; Lau

et al., 2011).



Figura 21. Expressão de proteínas envolvidas com os processos de proliferação, evasão da apoptose e sobrevivência após transfecção de células SKmel-103 com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM de mímico do miR-34a e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após а transfecção. Células controle foram tratadas mesma com а quantidade de lipofectamina utilizada para as transfecções. (A) Imagens dos blottings para as proteínas PTEN, p-PTEN (Ser³⁸⁰/Thr^{382/383}), Axl, $(Thr^{308}).$ AKT-1, p-AKT Erk1/2, p-Erk1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) mTOR, pmTOR (Ser²⁴⁴⁸) e β -catenina ativa. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Estão representadas figura as possíveis na interações moleculares entre as proteínas analisadas. (B) p-PTEN/PTEN. Razão (\mathbf{C}) Razão p-AKT/AKT-1. **(D)** Análise densitométrica do blotting para Axl. (E) Razão p-Erk1/2/Erk1/2. (F) Razão pmTOR mTOR. (G) Análise densitométrica do blotting para β -catenina ativa. Os resultados são apresentados unidades arbitrárias como (u.a) ou como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores

Transfecção com miR-34a estimula o fluxo autofágico em células de melanoma

Diversos estudos têm mostrado que microRNAs podem modular o processo autofágico, sensibilizando células cancerosas a tratamentos que induzem morte celular (Gundara et al., 2012). A fim de examinar se miR-34a modula o processo autofágico em células de melanoma, dois importantes marcadores autofágicos foram escolhidos para análise, LC3B e p62. A LC3 é uma proteína muito usada como marcador de autofagosomos. Após ser sintetizada, a LC3 é processada por Atg4, gerando LC3-I que é, em seguida, conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) para se tornar LC3-II (Mizushima et al., 2010). Enquanto que LC3-I está localizada no citosol, LC3-II está associada com a membrana do autofagosomo, e por isso sua análise permite avaliar a extensão de formação dos autofagosomos (Kabeya et al., 2000). A proteína p62 é incorporada aos autofagosomos através de ligação direta com LC3, sendo posteriormente degradada no processo autofágico.

Níveis aumentados de LC3II têm sido associados a dois eventos opostos, ao aumento da síntese de autofagosomos, ou a redução na taxa de degradação dos mesmos, o que leva ao acúmulo de LC3II (Tanida et al., 2004). A fim de evitar uma interpretação errônea do processo autofágico utilizando apenas o perfil de expressão da LC3B e p62, optamos por analisar o fluxo autofágico, utilizando o inibidor autofágico cloroquina (CLQ), que prejudica a acidificação lisossomal (Mizushima et al., 2010). Sendo assim, a expressão das proteínas LC3B e p62 foi avaliada na presença ou ausência de 50 µM de CLQ. Na ausência de CLQ, a razão LC3BII/LC3BI foi levemente aumentada nos grupos controle (CTL LIPO e miR-CTL), o que deve ter ocorrido devido ao uso de lipofectamina nas transfecções (**Figura 22A-C**). Entretanto, a transfecção com miR-34a levou a um aumento maior na

razão LC3BII/LC3BI, comparado com o grupo controle (CTL), principalmente após 48 horas de transfecção (**Figura 22A-C**). Interessantemente, na presença de CLQ, todos os grupos exibiram um aumento acentuado na razão LC3BII/LC3BI (**Figura 22A-C**), o que indica a presença de altos níveis basais de autofagia nas células de melanoma. Devido a esse aumento acentuado na razão LC3BII/LC3BI em todos os grupos experimentais, foi possível notar diferença significativa no fluxo autofágico entre os grupos miR-34a e controle (CTL) apenas após 24 horas de transfecção. Embora esta técnica seja amplamente utilizada para o monitoramento do fluxo autofágico, pode ser difícil obter resultados conclusivos se a linhagem celular em estudo apresentar altos níveis basais de autofagia, como ocorre, por exemplo, com células HeLa cultivadas em condições normais (Mizushima et al., 2010). Nesta situação, fica difícil detectar alterações adicionais nos níveis de LC3 após indução da autofagia. Sendo assim, para melhorar nossa compreensão a respeito das diferenças na atividade autofágica entre os grupos, partimos para a análise da proteína p62.

Na presença de CLQ, a diferença no fluxo autofágico entre os grupos tornou-se mais evidente, já que a expressão de p62 foi aumentada significativamente no grupo miR-34a comparado com os grupos controle, 24 e 48 horas após as transfecções (**Figura 22A**, **22D e 22E**). Este acúmulo de p62 quando o inibidor autofágico foi utilizado é um forte indicativo de que o processo autofágico foi induzido nas células de melanoma transfectadas com miR-34a.



Figura 22. Análise do fluxo autofágico após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com mímico do miR-34a (50 nM) e o inibidor autofágico cloroquina (50 μ M) foi adicionado ao meio de cultura 4 horas após a transfecção. A cloroquina (CLQ) foi mantida em contato com as células até o final do experimento, e amostras para Western Blotting foram coletadas 24 e 48 horas após as transfecções. (A) Imagens dos blottings para as proteínas LC3BI, LC3BII e p62. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. Razão LC3BII/LC3BI após 24 horas (B) e 48 horas de transfecçõo (C). Análise densitométrica do blotting para p62 após 24 horas (D) e 48 horas de transfecção (E). Significado dos símbolos: (-) sem CLQ; (+) com CLQ. O resultado é apresentado como porcentagem do grupo controle (% CTL) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores são média ± EPM. ^a Diferença significativa *vs* CTL; ^b Diferença significativa *vs* miR-CTL. ANOVA seguido de *post test* Tukey.

Inibição da autofagia reduz a viabilidade de células de melanoma

A indução de autofagia tem sido relacionada com sobrevivência ou morte celular, dependendo do contexto celular e da intensidade do estímulo envolvidos na análise (Morselli et al., 2009; Kung et al., 2011; Rosenfeldt & Ryan, 2011; Yang et al., 2011(a); White, 2012). Sabendo disso, investigamos se o aumento na atividade autofágica em células de melanoma transfectadas com miR-34a tinha influência sobre a viabilidade dessas células. Para este propósito, células SK-mel-103 foram tratadas com CLQ (50 µM) após 4 horas da transfecção com miR-34a, e a viabilidade celular foi avaliada por ensaio de redução do MTT, 24 e 48 horas após a transfecção. Com 24 horas de transfecção, o uso de CLQ não promoveu alteração na viabilidade celular entre os grupos (Figura 23A). Entretanto, a CLQ promoveu redução significativa na viabilidade celular em todos os grupos controle após 48 horas de tratamento (Figura 23B), indicando que a autofagia é um mecanismo importante para a sobrevivência de células de melanoma em condições normais. O aumento no fluxo autofágico, induzido por miR-34a, não promoveu alteração adicional na viabilidade celular nesse grupo, uma vez que a porcentagem de viabilidade celular foi praticamente a mesma, na ausência ou presença de CLQ (Figura 23B).

Esta é a primeira vez que miR-34a é associado a indução de autofagia, já que na literatura encontramos apenas um estudo que apresenta a idéia oposta. Neste estudo, Yang e colaboradores (2011(b)) mostraram que miR-34 inibiu a autofagia através do silenciamento da proteína Atg9 em *Caenorhabditis elegans* e em células de mamíferos. Sabendo que a autofagia estimulada pela transfecção com miR-34a não foi capaz de promover alterações adicionais na viabilidade celular, e sabendo ainda que células de melanoma parecem usar a autofagia como um mecanismo normal de sobrevivência, somos levados a considerar a

possibilidade do aumento no fluxo autofágico não ter sido induzido por miR-34a *per se*, mas sim pela própria célula de melanoma como uma tentativa de sobreviver em face ao estímulo de morte induzido por miR-34a. Além disso, como miR-34a foi capaz de aumentar a translocação nuclear de p53, é possível que p53 esteja intermediando a indução da autofagia por miR-34a. De fato, quando no núcleo, p53 pode estimular a expressão de genes requeridos para a autofagia (Galluzzi et al., 2010; Maiuri et al., 2009; Sui et al., 2011).



Figura 23. Análise da viabilidade de células SK-mel-103 após transfecção com mímico do miR-34a e tratamento com o inibidor autofágico cloroquina. Células SK-mel-103 foram transfectadas com mímico do miR-34a (50 nM) e o inibidor autofágico cloroquina (50 μ M) foi adicionado ao meio de cultura 4 horas após a transfecção. A cloroquina (CLQ) foi mantida em contato com as células até o final do experimento, e a porcentagem de viabilidade celular foi verificada pelo ensaio de redução do MTT 24 horas (A) e 48 horas (B) após as transfecções. O resultado é apresentado como porcentagem do grupo controle (% CTL) (n = 3, P < 0.05). Valores são média ± EPM. ^a Diferença significativa vs CTL; ^b Diferença significativa vs CTL LIPO; ^c Diferença significativa vs miR-CTL. ANOVA seguido de *post test* Tukey.

miR-34a induz estresse de retículo e agregação de proteínas em células de melanoma

A análise ultraestrutural das células SK-mel-103 transfectadas com miR-34a por 48 horas revelou a presença de grandes agregados de proteína no citosol dessas células (Figura 24B-E), comparado com a ultraestrutura de uma célula SK-mel-103 normal (CTL LIPO) (Figura 24A). Em alguns casos, os agregados observados foram considerados como agressomos, devido a sua estrutura e localização celular (Figura 24B). Agressomos são definidos como inclusões citosólicas pericentriolares, livres de membrana, contendo proteínas "não-enoveladas" e/ou ubiquitinadas, localizados próximos do núcleo em uma região conhecida como centro organizador de microtúbulos (MTOC) (Johnston et al., 1998). Além de agressomos, diversos agregados periféricos de proteínas foram observados nas células de melanoma transfectadas com miR-34a (Figura 24C e 24D). Tipicamente, agregados de proteínas são formados na periferia celular e translocados para o MTOC através de transporte retrógrado em microtúbulos, para em seguida constituir os agressomos (Johnston et al., 1998). Foi possível notar, ainda, uma grande quantidade de retículo endoplasmáticos (RE) já rodeados por agregados de proteína (Figura 24E).

O acúmulo de agregados de proteína no citosol de células de mamíferos pode exercer efeitos extremamente tóxicos para essas células. Sendo assim, ao longo do processo evolutivo, células de mamíferos desenvolveram mecanismos para evitar a agregação de proteínas, como a presença de proteínas chaperonas, e também para destruir os agregados já formados, como o sistema ubiquitina-proteassoma e a autofagia seletiva (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000; Lamark & Johansen, 2012). Quando o agregado de proteína formado é muito grande, a autofagia é o único mecanismo capaz de destruir esta estrutura adequadamente. Tipicamente, grandes agregados de proteína podem ser observados quando as vias de degradação estão sobrecarregadas ou bloqueadas (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000; Lamark & Johansen, 2012). Independentemente do motivo que está levando ao aumento na agregação de proteínas, o aumento do fluxo autofágico nas células de melanoma transfectadas com miR-34a pode estar ocorrendo como uma resposta celular a formação desses agregados tóxicos de proteínas.

Interessantemente, a expressão da proteína IRE-1, um importante sensor de estresse de retículo ativado como parte da "resposta a proteínas não-enoveladas" (UPR) (Lin et al., 2007), foi muito aumentada nas células de melanoma transfectadas com miR-34a (Figura 25), o que corrobora o aumento da agregação de proteínas observado nessas células. Vários fatores são requeridos para o correto dobramento de proteínas no RE, incluindo ATP, Ca²⁺ e um ambiente oxidante para permitir a formação de ligações dissulfeto (Gaut & Hendershot, 1993). Devido a essas exigências, o RE é altamente sensível a estresses que perturbem os níveis de energia celular, o estado redox e as concentrações de Ca²⁺. Esses estresses reduzem a capacidade de "folding" de proteínas que ocorre no RE, o que resulta em acúmulo e agregação de proteínas não-enoveladas, condição referida como estresse de retículo (Revisado por Szegezdi et al., 2006; Revisado por Gorman et al., 2012). Para combater os efeitos deletérios do estresse de retículo, as células desenvolveram várias estratégias protetoras, coletivamente chamadas de "resposta a proteínas não-enoveladas" (UPR). Esta resposta celular complexa é mediada por três receptores transmembrana do RE: PERK, ATF6 e IRE-1 (Revisado por Szegezdi et al., 2006). IRE-1 é uma quinase/endoribonuclease (RNAse) que inicia o splicing alternativo do RNAm de Xbp-1 (Yoshida et al., 2001; Calfon et al., 2002). O fator de transcrição resultante XBP-1 ativa a transcrição de chaperonas de RE, que participam diretamente do processo de dobramento de proteínas no RE (Lee et al., 2003). PERK é uma quinase transmembrana que fosforila o

fator iniciador da tradução eIF2α, reduzindo a síntese protéica a fim de contrapor a sobrecarca de proteínas do RE (Harding et al., 1999). Nas células em repouso, os três receptores (PERK, ATF6 e IRE-1) são mantidos em estado inativo através de sua associação com a chaperona de RE GRP78 (também conhecida como BiP). Com o acúmulo de proteínas malformadas, GRP78 se dissocia dos três receptores, o que leva a ativação desses e a indução da UPR (Revisado por Szegezdi et al., 2006).

A UPR é primordialmente uma resposta celular pró-sobrevivência que visa reduzir o acúmulo de proteínas não-enoveladas e restaurar o funcionamente normal do RE (Schroder & Kaufman, 2005). Entretanto, se a agregação de proteínas é persistente e o estresse não pode ser cessado, a sinalização pró-sobrevivência dá lugar à sinalização pró-apoptótica (Revisado por Szegezdi et al., 2006; Revisado por Gorman et al., 2012). A despeito do aumento no fluxo autofágico observado nas células de melanoma transfectadas com miR-34a, esse aumento não foi suficiente para promover a completa remoção dos agregados tóxicos de proteínas formados nessas células. Muitas células tumorais exibem níveis basais de autofagia elevados, mesmo em condições nutricionais normais (Revisado por White, 2012), o que claramente ficou demonstrado ocorrer com as células de melanoma no presente trabalho (Figura 22). De uma forma geral, esses níveis de autofagia basais, elevados de forma crônica em células tumorais, impossibilitam aumentos adicionais da resposta autofágica sob condições de estresse. Além disso, tem sido mostrado que a ativação do oncogene RAS está associada ao aumento da autofagia basal, e células tumorais com esta característica tem uma habilidade limitada em promover aumentos adicionais no fluxo autofágico, o que diminui sua adaptação a estresses (Revisado por White, 2012). Não sabemos qual perturbação, estimulada por miR-34a, foi responsável pela indução de estresse de retículo e agregação de proteínas nas células de melanoma. Entretanto, o fato é

que esse estresse está ocorrendo de forma intensa e levando a uma acumulação tóxica de agregados protéicos no interior das células de melanoma, uma vez que estas células parecem não ser capazes de aumentar o fluxo autofágico de forma adequada nesta condição de estresse. Uma vez que a persistência de níveis elevados de estresse de retículo pode determinar a morte celular por apoptose, é bem possível que o estresse de retículo induzido por miR-34a esteja contribuído para a indução de apoptose nas células de melanoma.

A partir da análise proteômica de melanócitos normais e células de melanoma SKmel-103 (dados não mostrados), observamos que as células de melanoma superexpessam diversos componentes associados à maquinaria de síntese proteica, e também a proteína chaperona HSP90, responsável pelo "folding" de proteínas oncogênicas como EGFR, AKT, CDK4, HIF-1a, BCR-ABL e MMP-2 (revisado por Mahalingam et al., 2009). Por estar inserida em uma condição de síntese protéica aumentada de forma constante, é de se esperar que a HSP90 desempenhe papel importante na manutenção da homeostase protéica no melanoma. Sendo assim, uma redução significativa na expressão dessa, ou de outra chaperona, poderia estar relacionada com o aumento na agregação de proteínas observado nas células de melanoma transfectadas com miR-34a. Na tentativa de melhor compreender o motivo envolvido com esse aumento da agregação de proteínas, a expressão das proteínas chaperonas HSP90, HSP60, HSP70 e HSP27, foi analisada. Como mostrado na figura 25, nenhuma dessas chaperonas apresentou alteração significativa de expressão. Sendo assim, outro mecanismo, não esclarecido neste trabalho, deve estar relacionado ao aumento na agregação de proteínas induzido por miR-34a em melanoma.



Figura 24. Análise ultraestrutural de células SK-mel-103 após transfecção com mímico do miR-34a. Após 48 horas de transfecção, células SK-mel-103 foram fixadas, pós-fixadas com tetróxido de ósmio, desidratadas, e incluídas em resina Epon812. Secções ultrafinas foram marcadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, e as imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas em JEOL JM 1400 TEM. (A) Célula SK-mel-103 controle, tratada apenas com lipofectamina (CTL LIPO). miR-34a induziu a formação de agressomos (B) e agregados periféricos de proteínas (C-E). Inserto em B: detalhe do agressomo; Inserto em C: detalhe de um agregado periférico de proteínas. Setas pretas em E: agregados de proteínas formados ao redor do retículo endoplasmático. Barras em A, B, C e E = 1 μ m, Barras dos insertos e D = 0.5 μ m.



Figura 25. Expressão de marcadores associados com estresse de retículo e agregação de proteínas após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM de mímico do miR-34a e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após a transfecção. Células controle foram tratadas com a mesma quantidade de lipofectamina utilizada para as transfecções. (A) Imagens dos blottings para as proteínas IRE-1, HSP90, HSP60, HSP70 e HSP27. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. (B) Análise densitométrica dos blottings. Os resultados são apresentados como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores são média ± EPM. * diferença significativa vs CTL LIPO. Teste "t" de Student.

miR-34a não altera de forma expressiva a sensibilidade das células de melanoma ao

tratamento com quimioterápicos

Células de melanoma SK-mel-103 exibiram elevada resistência ao quimioterápico temozolomida (TMZ), o que pode ser visto pela curva de viabilidade apresentada na **figura 26**. Este não é um resultado isolado, já que outros trabalhos tem relatado a existência de linhagens de melanoma altamente resistentes a temozolomida, com IC₅₀ podendo variar entre 100 μ M e 1 mM (Augustine et al., 2009). Tal resistência pode advir do fato de que a maioria das linhagens celulares é obtida de pacientes com melanoma metastático,

provavelmente em tratamento com dacarbazina no momento da coleta das células tumorais. Sendo assim, as células já podem ser obtidas do paciente com resistência adquirida ao quimioterápico.

Informações a respeito dos efeitos de miR-34a sobre a sensibilidade a drogas quimioterápicas são escassas e controversas, sendo relatados casos de aumento na sensibilidade e outros de inducão de resistência (Fujita et al., 2008; Bhatt et al., 2010; Kojima et al., 2010; Weeraratne et al., 2011; Kastl et al., 2012). A fim de esclarecer o real papel de miR-34a sobre a sensibilidade a tratamentos quimioterápicos no melanoma, análises de viabilidade celular foram realizadas após transfecção com miR-34a e posteriores tratamentos com os quimioterápicos TMZ, cisplatina ou doxorrubicina. Para estas análises, células SK-mel-103 foram pré-transfectadas por 24 horas com o mímico do miR-34a, posteriormente lavadas com PBS para a retirada dos complexos de transfecção que poderiam gerar uma resposta citotóxica exacerbada em contato com o quimioterápico, e a seguir tratadas com um dos quimioterápicos pelo período de 24 horas. Como podemos ver na figura 27A, a expressão ectópica de miR-34a não foi capaz de reverter a resistência das células de melanoma ao quimioterápico TMZ. As células de melanoma foram altamente responsivas ao tratamento com cisplatina, e a transfecção com miR-34a promoveu leve sensibilização ao quimioterápico, sendo o IC_{50} para tratamento com a droga alterado de 25 µM (no CTL LIPO) para 15 µM (Figura 27B). Para o quimioterápico doxorrubicina, houve uma tendência a sensibilização pela transfecção com miR-34a, porém não significativa (Figura 27C).



Figura 27. Análise da sensibilidade aos quimioterápicos temozolomida, cisplatina e doxorrubicina após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram pré-transfectadas com 50 nM de mímico do miR-34a durante 24 horas. O grupo controle foi tratado apenas com lipofectamina pelo mesmo período (CTL LIPO). Após este período o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS e a seguir tratadas com um dos quimioterápicos por 24 horas. Em seguida a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio de redução do MTT. (A) Curva de viabilidade para o tratamento com temozolomida. (B) Curva de viabilidade para o tratamento com cisplatina. (C) Curva de viabilidade para o tratamento com com função do grupo CTL LIPO (% CTL) (n = 3). Valores são média ± EPM.

TGF-β2 é alvo do miR-34a

TGF-β é uma citocina multifuncional que, em condições normais, participa da regulação de diversas atividades celulares, como proliferação e diferenciação, bem como de processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento embrionário, angiogênese e vigilância imunológica. Em mamíferos, existem três isoformas de TGF-B: TGF-B1, TGF-B2 e TGFβ3 (Javelaud et al., 2008). No câncer, TGF-β apresenta papel complexo já que nos estágios iniciais do processo tumoral pode exercer efeitos anti-mitogênicos e supressores de tumor, e em estágio avançado passa a ter ação crítica na angiogênese e imunosupressão, fornecendo um microambiente apropriado para o crescimento do tumor e metástase (Revisado por Javelaud et al., 2008). Além da via clássica induzida por TGF- β (dependente de Smads), outras proteínas e vias de sinalização (independentes de Smads) podem ser ativadas por TGF-B e desempenham papéis importantes nos estágios avançados da progressão tumoral. Entre elas estão as vias da MAPK/ERK, p38, JNK, PI3K/AKT/mTOR, além de proteínas GTPases Rho, que participam dos processos de reorganização do citoesqueleto, migração e invasão durante a metástase (Revisado por Lamouille & Derynck, 2011).

O aumento da expressão e secreção de TGF- β tem sido reportado em diferentes linhagens celulares de melanoma, quando comparados com melanócitos normais (revisado por Javelaud et al., 2008). Em pacientes com melanoma, os níveis de TGF- β no plasma também têm se mostrado elevados, especialmente nos indivíduos com lesões metastáticas (Krasagakis et al., 1998). De uma forma geral, o desenvolvimento e progressão do melanoma maligno têm sido caracterizados por resistência aos efeitos supressores de tumor de TGF- β , e altos níveis de expressão de TGF- β devem, na verdade, fornecer vantagens seletivas para melanomas com alto potencial invasivo e metastático (Revisado por Lasfar & Cohen-Solal, 2010). Entre as três isoformas de TGF- β expressas em mamíferos, as isoformas TGF- β 2 e TGF- β 3, não expressas em melanócitos normais, mostraram ser expressas já nos estágios iniciais de progressão do melanoma, sendo essa expressão aumentada durante a progressão tumoral (van Belle et al., 1996; revisado por Javelaud et al., 2008).

Um segundo objetivo planejado para este trabalho seria o silenciamento do TGF- β 2 nas células de melanoma, utilizando, para isso, siRNAs específicos contra TGF- β 2. Diversos experimentos de silenciamento foram realizados, utilizando vários siRNAs de sequências distintas, porém todos os resultados foram instisfatórios. Inúmeros parâmetros de transfecção foram alterados na tentativa de obter uma melhora na eficiência de transfecção. Entretanto, como podemos ver na **figura 28** (**A e B**), que representa uma das tentativas de silenciamento do TGF- β 2 utilizando 50 nM de dois siRNAs distintos, o procedimento não foi capaz de silenciar alguns dos principais alvos do TGF- β (como as proteínas AKT, ERK1/2, c-myc e MMP-2). Nem mesmo TGF- β 2 foi silenciado nesses experimentos (**Figura 28A e 28B**), o que prova a total ineficiência do procedimento de silenciamento para esta proteína nas células de melanoma.

Surpreendentemente, a expressão ectópica de miR-34a foi capaz de reduzir em aproximadamente 80% a expressão do TGF- β 2 nas células de melanoma (**Figura 28C**). Existem alguns trabalhos recentes na literatura associando miR-34a com a via do TGF- β . Um desses trabalhos, mostrou que miR-34a inibe a via do TGF- β através de silenciamento da proteína Smad4 (Genovese et al., 2012). Outros trabalhos mostram ainda que, o aumento

na atividade da via do TGF- β suprime a expressão de miR-34a (Yang et al., 2012), e que o silenciamento do TGF- β 1 leva ao aumento na expressão de miR-34a (Dogar et al., 2011). Entretanto, este é o primeiro estudo a mostrar que miR-34a pode promover o silenciamento da isoforma atípica TGF- β 2 em células tumorais.



Figura 28. Análise da expressão de TGF-β2 e seus alvos após transfecção de células SK-mel-103 com siRNA contra TGF-β2 ou transfecção com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas 50 nM de siRNA1 e 50 nM de siRNA2 contra TGF-β2, simultaneamente, e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após a transfecção. (A) Imagem dos blottings para as proteínas TGF-β2, AKT-1, ERK1/2, c-myc e MMP-2. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. (B) Análise densitométrica dos blottings. (C) Imagem e análise densitométrica do blotting para TGF-β2 em células de melanoma transfectadas com 50 nM de miR-34a por 48 horas. Os resultados são apresentados como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores são média ± EPM. * diferença significativa vs CTL LIPO. Teste "t" de Student.

Análise da expressão de fosfatases com ação promotora ou supressora de tumor após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a

A fosforilação e desfosfolilação de proteínas, processos mediados por proteínas quinases e fosfatases, respectivamente, são eventos fundamentais na coordenação de funções celulares, como crescimento, divisão celular, adesão e motilidade. Dado seu importante papel no funcionamento celular normal, a desregulação na expressão e/ou atividade de fosfatases tem sido implicada como componente-chave na progressão de alguns tipos de cânceres humanos (Revisado por Barr, 2010; Revisado por Julien et al., 2011). Sendo assim, no presente trabalho também avaliamos o papel de miR-34a na expressão de algumas fosfatases importantes para o contexto tumoral.

A **Figura 29** mostra a expressão das fosfatases: PP1 α , envolvida na desfosforilação da proteína pRb e consequente inibição do ciclo celular (Durfee et al., 1993); PP2A α e β , que juntamente com a PTEN participa da inibição da via da AKT (Guénin et al., 2008); PTP4A3 (ou PRL-3), associada com aumento da proliferação celular, motilidade e potencial metastático (Revisado por Guzińska-Ustymowicz & Pryczynicz, 2011); LMWPTP, envolvida com o aumento da agressividade tumoral (Revisado por Souza et al., 2009) e capacidade de invasão (Chiarugi, 2004); e SHP-2, que media a ativação da via da ERK (revisado por Matozaki et al., 2009). A expressão ectópica de miR-34a não promoveu alteração significativa na expressão de nenhuma dessas fosfatases em células de melanoma. De todas as fosfatases analisadas neste trabalho, apenas a PTEN teve sua expressão alterada, dado que já foi discutido anteriormente.



Figura 29. Expressão de fosfatases após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM de mímico do miR-34a e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após a transfecção. Células controle foram tratadas com a mesma quantidade de lipofectamina utilizada para as transfecções. (A) Imagens dos blottings para as fosfatases PP1 α , PP2A $\alpha \in \beta$, PTP4A3, LMWPTP e SHP-2. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. (B) Análise densitométrica dos blottings. Os resultados são apresentados como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P > 0.05). Valores são média ± EPM. Teste "t" de Student.

miR-34a altera a expressão de c-myc e ROCK-1, marcadores importantes para a

progressão do melanoma

A proteína c-myc é uma oncoproteína que atua na regulação transcricional de genes envolvidos com proliferação celular, diferenciação e apoptose. Em muitos cânceres, como em melanomas (Revisado por Polsky & Cordon-Cardo, 2003), c-myc encontra-se superexpresso, o que fornece vantagens proliferativas, antiapoptóticas e também angiogênicas as células tumorais (Revisado por Baudino & Cleveland, 2001). Diversos estudos têm mostrado que a expressão de c-myc é necessária, e suficiente, para que a maioria das células entre na fase S do ciclo celular e ative a angiogênese, enquanto que sua inibição promove parada do ciclo celular e diferenciação terminal (Revisado por Baudino & Cleveland, 2001). Sua expressão também foi avaliada no presente trabalho, e como mostrado na **figura 30**, foi reduzido em 30% nas células de melanoma transfectadas com miR-34a. A redução na expressão de c-myc pode ter ocorrido por ação direta de miR-34a, já que essa proteína foi apontada como um alvo direto de miR-34a ativa (Christoffersen et al., 2010; Yamamura et al., 2012(a); Yamamura et al., 2012(b)), ou pode ainda ter ocorrido por ação indireta via redução nos níveis de β -catenina (Revisado por MacDonald et al., 2009).

A família Rho de GTPases, que inclui Rho, Rac e Cdc42, está envolvida em múltiplos eventos celulares, incluindo progressão do ciclo celular, crescimento, diferenciação, reorganização do citoesqueleto e motilidade. A serina/treonina quinase ROCK (ROCK-1 e ROCK-2) tem sido apontada como um dos principais alvos de Rho GTPases, em especial da RhoA, desempenhando importante papel na sinalização mediada por Rho (Revisado por Karlsson et al., 2009; Revisado por Narumiya et al., 2009). Como mostrado na figura 30, a expressão de ROCK-1 foi reduzida em 50% após transfeção de células de melanoma com miR-34a. A sinalização via Rho/ROCK tem sido implicada na migração e metástase de células tumorais. Como exemplo, Zohrabian e colaboradores (2009) mostraram que a inibição da ROCK foi capaz de reduzir a migração de células de glioblastoma LN-18. Além disso, nesse mesmo estudo os autores mostraram que a inibição da ROCK promove redução nos níveis de ERK fosforilada. Além de exercer efeitos sobre a motilidade celular, outro estudo mostrou que a inibição da via Rho/ROCK é capaz de potencializar a inibição do crescimento e apoptose induzidos pelo tratamento com o quimioterápico cisplatina em células de câncer de ovário (Ohta et al., 2012). Sabendo disso, é possível supor que a redução nos níveis de ROCK-1 observada após transfecção das células de melanoma com miR-34a contribua para reduzir a agressividade e capacidade

invasiva desse câncer. A proteína ROCK-1 não foi descrita, até então, como alvo direto de miR-34a. Sendo assim, é possível que um efeito indireto de miR-34a, mediado por ação de outras proteínas e vias de sinalização, participe na alteração da expressão dessa proteína.

As proteínas UBC-3 e YB-1, outros alvos de interesse no contexto tumoral, não tiveram seus níveis de expressão alterados pela transfecção com miR-34a (**Figura 30**). A proteína UBC-3 está envolvida com o processo de ubiquitinação e degradação de proteínas importantes no câncer como p27 (Pagano et al., 1995) e β-catenina (Semplici et al., 2002). Já a proteína YB-1 está envolvida com o aumento da transcrição de ciclina A, ciclina B1, MMP-2 e MDR-1 e redução da transcrição de Fas e p53 (Uchiumi et al., 1993; Mertens et al., 1997; Lasham et al., 2000; Jurchott et al., 2003; Lasham et al., 2003; Homer et al., 2005).



Figura 30. Expressão de marcadores importantes para a progressão do melanoma após transfecção de células SK-mel-103 com mímico do miR-34a. Células SK-mel-103 foram transfectadas com 50 nM de mímico do miR-34a e amostras para Western Blotting foram coletadas 48 horas após a transfecção. Células controle foram tratadas com a mesma quantidade de lipofectamina utilizada para as transfecções. (A) Imagens dos blottings para as proteínas c-myc, ROCK-1, UBC-3 e YB-1. A proteína GAPDH foi utilizada como controle interno. (B) Análise densitométrica dos blottings. Os resultados são apresentados como porcentagem do grupo controle LIPO (% CTL LIPO) (n = 3 experimentos distintos, P < 0.05). Valores são média ± EPM. * diferença significativa vs CTL LIPO. Teste "t" de Student.

- CONCLUSÕES -

5. CONCLUSÕES

A expressão ectópica de miR-34a em células de melanoma metastático humano, da linhagem SK-mel-103, foi capaz de promover inúmeras alterações moleculares que culminaram com a redução na viabilidade dessas células. As principais alterações moleculares, descritas anteriormente neste trabalho, estão esquematizadas na **figura 31**. Resumidamente, as alterações promovidas por este microRNA foram:

- Redução tempo-dependente na viabilidade das células de melanoma;
- Bloqueio do ciclo celular através de redução na expressão das proteínas CDK4, CDK6, E2F3 e pRb e aumento na expressão de p21;
- Indução de morte celular por apoptose, através do aumento da expressão das proteínas Bax, Caspase-3 clivada e PARP-1 clivada.
- Aumento na expressão e translocação nuclear do fator de transcrição p53, o que deve estar envolvido com o aumento na expressão das proteínas p21 e Bax;
- Aumento na atividade da fosfatase PTEN e consequente redução na atividade da proteína quinase AKT;
- Redução na expressão do receptor tirosina quinase Axl, o que deve estar envolvido com a redução na atividade das quinases AKT e ERK1/2;
- Redução na expressão de β-catenina ativa, provavelmente induzida por ação direta de miR-34a e também pela redução nos níveis de AKT ativa;
- Redução na expressão de c-myc, que pode ter ocorrido por ação direta de miR-34a e também pela redução nos níveis de β-catenina ativa;
- Redução na expressão de TGF-β2, o que pode estar associado a redução na atividade das quinases AKT e ERK1/2;

- Aumento no fluxo autofágico, o que não foi associado a alterações adicionais na viabilidade das células de melanoma;
- Indução de estresse de retículo, detectado pelo aumento na expressão da proteína IRE-1 e pela formação de agregados tóxicos de proteínas.

Os resultados observados aqui deixaram claro que o aumento da expressão de miR-34a pode representar uma estratégia benéfica na terapia do melanoma avançado, por atuar na redução da expressão de marcadores associados a proliferação celular, sobrevivência e migração, e aumento na expressão de marcadores associados a morte celular.



Figura 31. Resumo esquemático das principais alterações moleculares induzidas pela expressão ectópica de miR-34a em células de melanoma metastático humano. Todos os experimentos foram realizados utilizando a linhagem de melanoma metastático humano SK-mel-103. Alterações moleculares na via de sinalização da p53 (A), da AKT (B), da ERK1/2 (C) e da β -catenina (D). No esquema estão representadas, no interior de quadros cinza, as principais respostas celulares envolvidas com as alterações moleculares. *Importante:* As ligações entre as proteínas na via não refletem, necessariamente, interações diretas entre as mesmas. Além disso, é preciso deixar claro que outros mecanismos, não representados na figura, também podem estar contribuindo para as alterações observadas. Setas vermelhas para cima: Expressão e/ou atividade aumentada; Setas vermelhas para baixo: Expressão e/ou atividade reduzida; \rightarrow : Efeito estimulatório; \neg :Efeito inibitório.

– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS –

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrams SL, Steelman LS, Shelton JG, Wong EW, Chappell WH, Bäsecke J, et al. The Raf/MEK/ERK pathway can govern drug resistance, apoptosis and sensitivity to targeted therapy. *Cell Cycle 2010*; **9**: 1781-1791.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biologia Molecular da Célula. 5ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

Allen MP, Zeng C, Schneider K, Xiong X, Meintzer MK, Bellosta P et al. Growth arrestspecific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropinreleasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 191-201.

Algazi AP, Soon CW, Daud AI. Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects. *Cancer Manag Res* 2010; **2**: 197-211.

Arellano M, Moreno S. Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 559-73.

Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 2006; **28**: 253-260.

Augustine CK, Yoo JS, Potti A, Yoshimoto Y, Zipfel PA, Friedman HS, et al. Genomic and molecular profiling predicts response to temozolomide in melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 502-510.

Barr AJ. Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development. *Future Med Chem* 2010; **2**: 1563-1576.

Basu A, Haldar S. The relationship between BcI2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. *Mol Hum Reprod* 1998; **4**: 1099-1109.

Baudino TA, Cleveland JL. The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 691-702.

Bedikian AY, Weiss GR, Legha SS, Burris HA 3rd, Eckardt JR, Jenkins J et al. Phase II trial of docetaxel in patients with advanced cutaneous malignant melanoma previously untreated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 2895-2899.

Bhatt K, Zhou L, Mi QS, Huang S, She JX, Dong Z. MicroRNA-34a is induced via p53 during cisplatin nephrotoxicity and contributes to cell survival. *Mol Med* 2010; **16**: 409-416.

Bogenrieder T, Herlyn M. The molecular pathology of cutaneous melanoma. *Cancer Biomark* 2010; **9**: 267-286.

Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 2009; **48**: 811-21.

Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S et al. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2743-2754.

Cai B, Chang SH, Becker EB, Bonni A, Xia Z. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J Biol Chem* 2006; **281**: 25215-25222.

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002; **415**: 92-96.

Caramuta S, Egyházi S, Rodolfo M, Witten D, Hansson J, Larsson C, et al. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2010; **130**: 2062-2070.

Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; **26**: 745-52.

Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011; **2**: 135-164.

Chatterjee SJ, Pandey S. Chemo-resistant melanoma sensitized by tamoxifen to low dose curcumin treatment through induction of apoptosis and autophagy. *Cancer Biol Ther* 2011; **11**: 216-228.

Checinska A, Soengas MS. The gluttonous side of malignant melanoma: basic and clinical implications of macroautophagy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; **24**: 1116-1132.

Chen HY, White E. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; **4**: 973-983.

Chen X, Hu H, Guan X et al. CpG island methylation status of miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2012; **130**: 1607-1613.

Chiarugi P, Taddei ML, Schiavone N, Papucci L, Giannoni E, Fiaschi T, et al. LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. *Oncogene* 2004; **23**: 3905-3914.

Chim CS, Wan TS, Wong KY et al. Methylation of miR-34a, miR-34b/c, miR-124-1 and miR-203 in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J Transl Med* 2011; **9:** 197.

Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M et al. p53independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 236-245.

Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; **22**: 8590-8607.

Couts KL, Anderson EM, Gross MM, Sullivan K, Ahn NG. Oncogenic B-Raf signaling in melanoma cells controls a network of microRNAs with combinatorial functions. *Oncogene* 2013; **32**: 1959-1970.

Covey TM, Edes K, Coombs GS, Virshup DM, Fitzpatrick FA. Alkylation of the tumor suppressor PTEN activates Akt and β -catenin signaling: a mechanism linking inflammation and oxidative stress with cancer. *PLoS One* 2010; **5**: e13545.

Da Forno PD, Saldanha GS. Molecular aspects of melanoma. *Clin Lab Med* 2011; **31**: 331-343.

Dahiya N, Sherman-Baust CA, Wang TL, Davidson B, Shih IeM, Zhang Y, et al. MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One* 2008; **3**: e2436.

Damsky WE, Curley DP, Santhanakrishnan M, Rosenbaum LE, Platt JT, Gould Rothberg BE, et al. β -catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* 2011; **20**: 741-754.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; **417**: 949-954.

Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; **89**: 271-277.

Di Martino MT, Leone E, Amodio N, Foresta U, Lionetti M, Pitari MR et al. Synthetic miR-34a mimics as a novel therapeutic agent for Multiple Myeloma: in vitro and in vivo evidence. *Clin Cancer Res* 2012. Oct 3. e-pub ahead of print.

Dogar AM, Towbin H, Hall J. Suppression of latent transforming growth factor (TGF)beta1 restores growth inhibitory TGF-beta signaling through microRNAs. *J Biol Chem* 2011; **286:** 16447-16458.

Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1804**: 433-439.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; **102**: 33-42.

Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal* 2009; **21:** 827-835.

Durfee T, Becherer K, Chen PL, Yeh SH, Yang Y, Kilburn AE, et al. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 1993; **7**: 555-569.

Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 2007; **6**: 1006-1010.

Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 664-673.

Espona-Fiedler M, Soto-Cerrato V, Hosseini A, Lizcano JM, Guallar V, Quesada R, et al. Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: prodigiosin vs. obatoclax. *Biochem Pharmacol* 2012; **83:** 489-496. Fernandes RO, Dreher GJ, Schenkel PC, Fernandes TR, Ribeiro MF, Araujo AS, et al. Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Cell Biochem Funct* 2011; **29**: 617-623.

Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994; **269**: 30761-30764.

Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med* 2012; **10**: 23.

Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, Burchert A, McCloskey P, Spizz G et al. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 135-145.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; **19**: 92-105.

Fujita Y, Kojima K, Hamada N, Ohhashi R, Akao Y, Nozawa Y, et al. Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **377**: 114-119.

Fuster JJ, Sanz-González SM, Moll UM, Andrés V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 192-199.

Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Maiuri MC, Kroemer G. Defective autophagy control by the p53 rheostat in cancer. *Cell Cycle* 2010; **9**: 250-255.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19: 107-120.

Gaudi S, Messina JL. Molecular bases of cutaneous and uveal melanomas. *Patholog Res Int* 2011; **2011**: 159421.

Gaut JR, Hendershot LM.The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 1993; **5**: 589-595.

Genovese G, Ergun A, Shukla SA, Campos B, Hanna J, Ghosh P et al. microRNA regulatory network inference identifies miR-34a as a novel regulator of TGF- β signaling in glioblastoma. *Cancer Discov* 2012; **2**: 736-749.

Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. Cell. 1991 Dec 20;67(6):1169-79.

Göppner D, Leverkus M. Prognostic parameters for the primary care of melanoma patients: what is really risky in melanoma? *J Skin Cancer* 2011; **2011**: 521947.

Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther* 2012; **134**: 306-316.

Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Requirement of phosphatidylinositol 3kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 4442-4453.

Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; **23**: 2891-2906.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; **281**: 1309-1312.

Guénin S, Schwartz L, Morvan D, Steyaert JM, Poignet A, Madelmont JC, et al. PP2A activity is controlled by methylation and regulates oncoprotein expression in melanoma cells: a mechanism which participates in growth inhibition induced by chloroethylnitrosourea treatment. *Int J Oncol* 2008; **32**: 49-57.

Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005; **11**: 353-361.

Guldberg P, thor Straten P, Birck A, Ahrenkiel V, Kirkin AF, Zeuthen J. Disruption of the MMAC1/PTEN gene by deletion or mutation is a frequent event in malignant melanoma. *Cancer Res* 1997; **57**: 3660-3663.

Gundara JS, Zhao J, Robinson BG, Sidhu SB. Oncophagy - harnessing miRNA regulation of autophagy in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 2012; 18 Oct. e-pub ahead of print.

Guo J, Sheng G, Warner BW. Epidermal growth factor-induced rapid retinoblastoma phosphorylation at Ser780 and Ser795 is mediated by ERK1/2 in small intestine epithelial cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 35992-35998.

Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A. PRL-3, an emerging marker of carcinogenesis, is strongly associated with poor prognosis. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; **11**: 99-108.

Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 331-341.

Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, et al. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 205-213.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144**: 646-674.

Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 1994; **371**: 257-261.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999; **397**: 271-274.

Harlan JE, Yoon HS, Hajduk PJ, Fesik SW. Structural characterization of the interaction between a pleckstrin homology domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 1995; **34**: 9859-9864.

He X, He L, Hannon GJ. The guardian's little helper: microRNAs in the p53 tumor suppressor network. *Cancer Res* 2007; **67**: 11099-11101. (**a**)
He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 819-822. (**b**)

He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007; **447**: 1130-1134. (c)

Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2005; **4**: 988-1004.

Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 2010; **17**: 193-199.

Hoeffer CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 2010; **33**: 67-75.

Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 289-301.

Homer C, Knight DA, Hananeia L, Sheard P, Risk J, Lasham A, et al. Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function. *Oncogene* 2005; **24**: 8314-8325.

Hwang PH, Yi HK, Kim DS, Nam SY, Kim JS, Lee DY. Suppression of tumorigenicity and metastasis in B16F10 cells by PTEN/MMAC1/TEP1 gene. *Cancer Lett* 2001; **172**: 83-91.

Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997; **275**: 90-94.

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*. 2006; **127**: 125-137.

Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A. Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; **21**: 123-132.

Ji Z, Flaherty KT, Tsao H. Molecular therapeutic approaches to melanoma. *Mol Aspects Med* 2010; **31**: 194-204.

Jiang BH, Liu LZ. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment. *Drug Resist Updat* 2008; **11**: 63-76.

Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 1998; **143**: 1883-1898.

Julien SG, Dubé N, Hardy S, Tremblay ML. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 35-49.

Jurchott K, Bergmann S, Stein U, Walther W, Janz M, Manni I, et al. YB-1 as a cell cycleregulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27988-92796.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; **19**: 5720-5728.

Kappelmayer J, Simon A, Kiss F, Hevessy Z. Progress in defining multidrug resistance in leukemia. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; **4**: 209-217.

Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1796**: 91-98.

Kastl L, Brown I, Schofield AC. miRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **131**: 445-454.

Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 2006; **281**: 21256-21265.

Kim NH, Kim HS, Kim NG, Lee I, Choi HS, Li XY, et al. p53 and microRNA-34 are suppressors of canonical Wnt signaling. *Sci Signal* 2011; **4:** ra71.

King RW, Jackson PK, Kirschner MW. Mitosis in transition. Cell 1994; 79: 563-571.

Kojima K, Fujita Y, Nozawa Y, Deguchi T, Ito M. MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *Prostate* 2010; **70**: 1501-1512.

Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; **131**: 1149-1163.

Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL, Offerhaus GJ et al. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther* 2009; **8**: 618-626.

Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 524-530.

Krasagakis K, Thölke D, Farthmann B, Eberle J, Mansmann U, Orfanos CE. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. *Br J Cancer* 1998; **77**: 1492-1494.

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 3-11.

Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 4965-4974.

Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2011; **21**: 71-100.

Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, Ellisman MH, Latterich M, Schneiter R, et al. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; **111**: 331-342.

Lal A, Thomas MP, Altschuler G, Navarro F, O'Day E, Li XL *et al.* Capture of microRNAbound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genet* 2011; **7**: e1002363.

Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *Int J Cell Biol* 2012; **2012**: 736905.

Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* 2007; **14**: 44-55.

Lamouille S, Derynck R. Emergence of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin axis in transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* 2011; **193**: 8-22.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 1992; 358: 15-16.

Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. J Cell Sci 2009; 122: 3589-3594.

Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 951-961.

Lasfar A, Cohen-Solal KA. Resistance to transforming growth factor β -mediated tumor suppression in melanoma: are multiple mechanisms in place? *Carcinogenesis* 2010; **31**: 1710-1717.

Lasham A, Lindridge E, Rudert F, Onrust R, Watson J. Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* 2000; **252**: 1-13.

Lasham A, Moloney S, Hale T, Homer C, Zhang YF, Murison JG et al. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem* 2003; **278**: 35516-35523.

Lau MT, Klausen C, Leung PC. E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via β -catenin-Egr1-mediated PTEN expression. *Oncogene* 2011; **30**: 2753-2766.

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 7448-7459.

Lee JY, Kang MB, Jang SH, Qian T, Kim HJ, Kim CH et al. Id-1 activates Akt-mediated Wnt signaling and p27(Kip1) phosphorylation through PTEN inhibition. *Oncogene* 2009; **28**: 824-831.

Lee JH, Voortman J, Dingemans AM, Voeller DM, Pham T, Wang Y et al. MicroRNA expression and clinical outcome of small cell lung cancer. *PLoS One* 2011; **6**: e21300.

Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 2432-2437.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88:323-331.

Li AG, Piluso LG, Cai X, Wei G, Sellers WR, Liu X. Mechanistic insights into maintenance of high p53 acetylation by PTEN. *Mol Cell* 2006; **23**: 575-587.

Lian Z, Di Cristofano A. Class reunion: PTEN joins the nuclear crew. *Oncogene* 2005; **24**: 7394-7400.

Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* 2007; **318**: 944-949.

Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK. TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 2008; **100**: 35-83.

Liu KS, Liu H, Qi JH, Liu QY, Liu Z, Xia M et al. SNX-2112, an Hsp90 inhibitor, induces apoptosis and autophagy via degradation of Hsp90 client proteins in human melanoma A-375 cells. *Cancer Lett* 2012; **318**: 180-188.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.

Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 2008; **7**: 2591-2600.

Lopez-Bergami P, Fitchman B, Ronai Z. Understanding signaling cascades in melanoma. *Photochem Photobiol* 2008; **84**: 289-306.

Lukas J, Bartkova J, Bartek J. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 6917-6925.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; **17**: 9-26.

Mackiewicz M, Huppi K, Pitt JJ, Dorsey TH, Ambs S, Caplen NJ. Identification of the receptor tyrosine kinase AXL in breast cancer as a target for the human miR-34a microRNA. *Breast Cancer Res Treat* 2011; **130**: 663-679.

Mahabeleshwar GH, Byzova TV. Angiogenesis in melanoma. *Semin Oncol* 2007; **34**: 555-565.

Mahalingam D, Swords R, Carew JS, Nawrocki ST, Bhalla K, Giles FJ. Targeting HSP90 for cancer therapy. *Br J Cancer* 2009; **100**: 1523-1529.

Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 87-93.

Marchesi F, Turriziani M, Tortorelli G, Avvisati G, Torino F, De Vecchis L. Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacol Res* 2007; **56**: 275-287.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007; **82**: 364-380.

Matozaki T, Murata Y, Saito Y, Okazawa H, Ohnishi H. Protein tyrosine phosphatase SHP-2: a proto-oncogene product that promotes Ras activation. *Cancer Sci* 2009; **100**: 1786-1793. McDonald ER 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review). *Int J Oncol* 2000; **16**: 871-886.

Mendes GL, Koifman RJ, Koifman S. Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. *J Toxicol Environ Health A*. 2010; **73**: 850-7.

Mertens PR, Harendza S, Pollock AS, Lovett DH. Glomerular mesangial cell-specific transactivation of matrix metalloproteinase 2 transcription is mediated by YB-1. *J Biol Chem* 1997; **272**: 22905-22912.

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S et al. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2000; **18**: 158-166.

Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; **140**: 313-326.

Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011; **147**: 728-741.

Molnár V, Tamási V, Bakos B, Wiener Z, Falus A. Changes in miRNA expression in solid tumors: an miRNA profiling in melanomas. *Semin Cancer Biol* 2008; **18**: 111-122.

Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 1998; **26**: 3453-3459.

Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC et al. Anti- and protumor functions of autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 1524-1532. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.

Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell* 2009; **137**: 1001-1004.

Mudduluru G, Ceppi P, Kumarswamy R, Scagliotti GV, Papotti M, Allgayer H. Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene* 2011; **30**: 2888-2899.

Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2009; **28**: 65-76.

Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol* 2010; **22**: 157-168.

Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; **14**: 381-395.

Nicolau-Galmés F, Asumendi A, Alonso-Tejerina E, Pérez-Yarza G, Jangi SM, Gardeazabal J et al. Terfenadine induces apoptosis and autophagy in melanoma cells through ROS-dependent and -independent mechanisms. *Apoptosis* 2011; **16**: 1253-1267.

Nobili S, Landini I, Giglioni B, Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 2006; **7**: 861-879.

Notte A, Leclere L, Michiels C. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol* 2011; **82**: 427-434.

Ohta T, Takahashi T, Shibuya T, Amita M, Henmi N, Takahashi K et al. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxiainducible factor-1α in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2012; **13**: 25-33.

Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 2612-2624.

Ozaki T, Nakagawara A. p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 603925.

Pacheco I, Buzea C, Tron V. Towards new therapeutic approaches for malignant melanoma. *Expert Rev Mol Med* 2011; **13**: e33.

Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995; **269**: 682-685.

Pan ZQ, Reardon JT, Li L, Flores-Rozas H, Legerski R, Sancar A, et al. Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J Biol Chem* 1995; **270:** 22008-22016.

Pecot CV, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 59-67.

Petrocca F, Lieberman J. Promise and challenge of RNA interference-based therapy for cancer. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 747-54.

Phalon C, Rao DD, Nemunaitis J. Potential use of RNA interference in cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 2010; **12**: e26.

Polsky D, Cordon-Cardo C. Oncogenes in melanoma. Oncogene 2003; 22: 3087-3091.

Poser I, Bosserhoff AK. Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histol Histopathol* 2004; **19:** 173-188.

Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2007; **26**: 731-743.

Rebecca VW, Sondak VK, Smalley KS. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res* 2012; 22: 114-122.

Reynisdóttir I, Polyak K, Iavarone A, Massagué J. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 1995; **9:** 1831-1845.

Robertson GP, Furnari FB, Miele ME, Glendening MJ, Welch DR, Fountain JW In vitro loss of heterozygosity targets the PTEN/MMAC1 gene in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**: 9418-9423.

Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 2011; **32**: 955-963.

Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica* 2003; **88:** 212-218.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; **307**: 1098-1101.

Sawabu T, Seno H, Kawashima T, Fukuda A, Uenoyama Y, Kawada M et al. Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway. *Mol Carcinog* 2007; **46**: 155-164.

Schafer KA. The cell cycle: a review. Vet Pathol 1998; 35: 461-478.

Schröder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;**74:**739-89.

Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? *Apoptosis* 2007; **12:** 869-876.

Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 1814-1819.

Semplici F, Meggio F, Pinna LA, Oliviero S. CK2-dependent phosphorylation of the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBC3B induces its interaction with beta-TrCP and enhances beta-catenin degradation. *Oncogene* 2002; **21**: 3978-3987.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. Cell 1994; 79: 551-555.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999; **13**: 1501-1512.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; **62**:10-29.

Siemens H, Neumann J, Jackstadt R et al. Detection of miR-34a promoter methylation in combination with elevated expression of c-Met and β -catenin predicts distant metastasis of colon cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 710-720.

Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. Exp Cell Res 2001; 264: 29-41.

Sirichanchuen B, Pengsuparp T, Chanvorachote P. Long-term cisplatin exposure impairs autophagy and causes cisplatin resistance in human lung cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2012; **364**: 11-18.

Souza AC, Azoubel S, Queiroz KC, Peppelenbosch MP, Ferreira CV. From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 1140-1153.

Spagnolo F, Queirolo P. Upcoming strategies for the treatment of metastatic melanoma. *Arch Dermatol Res* 2012; **304**: 177-184.

Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J Pathol* 2012; **226**: 255-273.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1998; **1**: 949-957.

Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 2001; **8**: 317-325.

Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA. The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets* 2004; **8**: 537-550.

Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)* 2011; **3**: 192-222. (**a**)

Steelman LS, Navolanic P, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Martelli AM et al. Involvement of Akt and mTOR in chemotherapeutic- and hormonal-based drug resistance and response to radiation in breast cancer cells. *Cell Cycle* 2011; **10**: 3003-3015. (**b**)

Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Bäsecke J et al. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia* 2011; **25**: 1080-1094. (c)

Sui X, Jin L, Huang X, Geng S, He C, Hu X. p53 signaling and autophagy in cancer: a revolutionary strategy could be developed for cancer treatment. *Autophagy* 2011; **7**: 565-571.

Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 978312.

Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stressinduced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; **7**: 880-885.

Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. J Cell Sci 2007; 120: 4071-4079.

Tanaka N, Toyooka S, Soh J et al. Frequent methylation and oncogenic role of microRNA-34b/c in small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012; **76:** 32-38.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 47704-47710.

Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle* 2007; **6**: 1586-1593.

Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 3-12.

Thurston TL, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 2009; **10**: 1215-1221.

Tie J, Fan D. Big roles of microRNAs in tumorigenesis and tumor development. *Histol Histopathol* 2011; **26**: 1353-1361.

Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis* 2011; **2**: e199.

Tonissen KF, Di Trapani G. Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nutr Food Res* 2009; **53:** 87-103.

Tsao H, Zhang X, Benoit E, Haluska FG. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* 1998; **16**: 3397-3402.

Uchiumi T, Kohno K, Tanimura H, Matsuo K, Sato S, Uchida Y et al. Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* 1993; **4**: 147-157.

Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Kroemer G, Zitvogel L. Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 21-28.

Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szász AM, Wang ZC et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009; **137**: 1032-1046.

Valastyan S, Weinberg RA. miR-31: a crucial overseer of tumor metastasis and other emerging roles. *Cell Cycle* 2010; **9**: 2124-2129.

Valastyan S, Chang A, Benaich N, Reinhardt F, Weinberg RA. Concurrent suppression of integrin alpha5, radixin, and RhoA phenocopies the effects of miR-31 on metastasis. *Cancer Res* 2010; **70**: 5147-5154.

van Belle P, Rodeck U, Nuamah I, Halpern AC, Elder DE. Melanoma-associated expression of transforming growth factor-beta isoforms. *Am J Pathol* 1996; **148**: 1887-1894.

van Noort M, Weerkamp F, Clevers HC, Staal FJ. Wnt signaling and phosphorylation status of beta-catenin: importance of the correct antibody tools. *Blood* 2007; 110: 2778-2779.

Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000; **20:** 5010-5018.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; **36:** 131-149.

Vogt M, Munding J, Grüner M et al. Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch* 2011; **458:** 313-322.

Waga S, Li R, Stillman B. p53-induced p21 controls DNA replication. *Leukemia* 1997; **11**: 321-323.

Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995; **55:** 5187-5190.

Walker DH, Maller JL. Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* 1991; **354**: 314-317.

Wang X, Jiang X. PTEN: a default gate-keeping tumor suppressor with a versatile tail. *Cell Res* 2008; **18**: 807-816.

Weeraratne SD, Amani V, Neiss A, Teider N, Scott DK, Pomeroy SL et al. miR-34a confers chemosensitivity through modulation of MAGE-A and p53 in medulloblastoma. *Neuro Oncol* 2011; **13**: 165-175.

Weinberg RA. A biologia do câncer. Porto Alegre: Artmed, 2008.

Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007; **26**: 5017-5022.

White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 401-410.

Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 2011; **333**: 228-233.

Wilkerson BL. Malignant melanoma. Plast Surg Nurs 2011; 31: 105-107.

Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene* 2003; **22**: 3113-3122.

Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol Res Pract* 2012; **2012**: 354191.

Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 13421-13426.

Yamakuchi M, Lowenstein CJ. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle* 2009; **8**: 712-715.

Yamamura S, Saini S, Majid S, Hirata H, Ueno K, Deng G et al. MicroRNA-34a modulates c-Myc transcriptional complexes to suppress malignancy in human prostate cancer cells. *PLoS One* 2012; **7**: e29722. (**a**)

Yamamura S, Saini S, Majid S, Hirata H, Ueno K, Chang I et al. MicroRNA-34a suppresses malignant transformation by targeting c-Myc transcriptional complexes in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2012; **33**: 294-300. (**b**)

Yan D, Zhou X, Chen X, Hu DN, Dong XD, Wang J MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 1559-1565.

Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 2011; **10**: 1533-1541. (**a**)

Yang J, Chen D, He Y, Meléndez A, Feng Z, Hong Q, et al. MiR-34 modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan via repressing the autophagy gene atg9. *Age (Dordr)*. 2011. Nov 12. e-pub ahead of print. (b)

Yang P, Li QJ, Feng Y, Zhang Y, Markowitz GJ, Ning S et al. TGF-β-miR-34a-CCL22 signaling-induced Treg cell recruitment promotes venous metastases of HBV-positive hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2012; **22**: 291-303.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001; **107**: 881-891.

Zhang S, Yu D. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 4325-4330.

Zohrabian VM, Forzani B, Chau Z, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. Rho/ROCK and MAPK signaling pathways are involved in glioblastoma cell migration and proliferation. *Anticancer Res* 2009; **29**: 119-123.

Zuckerman V, Wolyniec K, Sionov RV, Haupt S, Haupt Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. *J Pathol* 2009; **219**: 3-15.