

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MANOSE EM CÉLULAS DE  
MELANOMA HUMANO**

Aluno: Matheus Utrilla Martinelli

Orientador: Prof. Dr. André Zelanis Palitot Pereira

São José dos Campos, 2020.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MANOSE EM CÉLULAS DE  
MELANOMA HUMANO**

Projeto desenvolvido como Trabalho de Conclusão de Curso para conclusão do curso e obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aluno: Matheus Utrilla Martinelli

Orientador: Prof. Dr. André Zelanis Palitot Pereira

São José dos Campos, 2020.

Matheus Utrilla Martinelli

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MANOSE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO**

Projeto desenvolvido como Trabalho de  
Conclusão de Curso para conclusão do  
curso e obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia

Aprovado em                    de                    de

Banca Examinadora:

---

Prof.  
Examinador ICT-UNIFESP

---

Prof  
Examinador ICT-UNIFESP

---

Prof.Dr. André Zelanis Palitot Pereira  
Orientador

São José dos Campos, 2020

Na qualidade de titular dos direitos autorais, em consonância com a Lei de direitos autorais nº 9610/98, autorizo a publicação livre e gratuita desse trabalho no Repositório Institucional da UNIFESP ou em outro meio eletrônico da instituição, sem qualquer ressarcimento dos direitos autorais para leitura, impressão e/ou download em meio eletrônico para fins de divulgação intelectual, desde que citada a fonte.

Elaborado por sistema de geração automática com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Utrilla Martinelli, Matheus

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MANOSE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO/ Matheus Utrilla Martinelli

Orientador(a) André Zelanis Palitot Pereira-São José dos Campos, 2020. 61 p.

Trabalho de Conclusão de Curso-Bacharelado em Biotecnologia- Universidade Federal de São Paulo-Instituto de Ciência e Tecnologia, 2020.

1. Câncer. 2. Melanoma. 3. Manose. 4. Metabolismo. 5. Autofagia. I. Zelanis Palitot Pereira, André , orientador(a). II. Título.

## DEDICATÓRIA

*“Aos meus pais, Vera e André”*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, em especial meus pais Vera e André e irmão Caique por estarem ao meu lado e me apoiar durante a universidade.

Ao meu tio Tio Eduardo por todo suporte ao longo destes anos.

À minha namorada Juliana que me deu todo suporte e carinho nos momentos mais difíceis dessa trajetória.

Ao meu orientador André Zelanis por me receber em seu laboratório, sempre manter as portas abertas e ensinar tudo o que podia neste tempo em que trabalhamos juntos.

Aos meus professores do ICT – UNIFESP que me auxiliaram no desenvolvimento como pesquisador, profissional e pessoa com pensamento crítico.

Aos amigos que fiz na universidade, Beatriz, Dijiane, Emily, Isabelle e Giovanne por compartilhar momentos de diversão e estudos ao longo destes anos.

Aos amigos de moradia, João Pedro e Victor por todos os dias de convivência juntos.

Aos amigos do Laboratório de Proteômica Funcional, em especial Dayelle que me ensinou bastante nas poucas semanas juntos, à Uilla e ao Maurício por compartilhar conversas, brincadeiras e reflexões durante os cafés no intervalo do Lab.

Aos colegas do ICESP que fiz durante o meu estágio lá, em especial à Silvina que me acompanhou todos os dias e pode me ensinar e ajudar em muitas atividades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

À Universidade Federal de São Paulo por toda oportunidade e estrutura.

*A sabedoria não vem do acerto,  
mas sim do aprendizado com os  
erros.*

## RESUMO

A elevada demanda energética imposta pelo processo oncogênico tem importantes consequências no metabolismo de células cancerosas, bem como tem impacto expressivo nos métodos de diagnóstico e terapias associadas ao tratamento de neoplasias. A manose é um epímero da glicose e, portanto, é absorvida pelos mesmos transportadores que a glicose. Trabalhos recentes utilizando linhagens celulares tumorais demonstraram que este epímero da glicose se acumula nas células como manose-6-fosfato (M6P), devido à baixa expressão da enzima fosfomanose isomerase (PMI), que converte M6P em frutose-6-fosfato (F6P), um intermediário da via glicolítica. Esta característica tem impacto significativo no metabolismo da glicose pela via glicolítica, ciclo tricarboxílico e via das pentoses fosfato. Neste trabalho, focamos no estudo do efeito da manose sobre diversos processos celulares, como o crescimento celular, a autofagia, a glicosilação de proteínas, o ciclo celular e morte celular programada. Para isso foram realizados ensaios de curva de crescimento das culturas, separação de proteínas do secretoma em resina de Concanavalina-A e posterior SDS-PAGE para identificação de proteínas glicosiladas, *western blotting* da proteína LC3-II, identificação de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's) por citometria de fluxo para o estudo de autofagia e análise do ciclo celular (proporção G0G1/G2M) e morte celular programada (% SubG1) por citometria de fluxo. Observou-se que as linhagens celulares tratadas com manose apresentaram redução significativa no crescimento celular. Também foi observado um acréscimo na produção de AVO's e células em morte celular programada (SubG1) nos grupos tratados exclusivamente com manose. Entretanto, não foi capaz de se observar aumento de proteínas glicosiladas secretadas, diferença significativa de proteína LC3-II no lisado e nem alterações significativas no ciclo celular das células que foram tratadas com manose.

**Palavras-chave:** câncer, melanoma, manose, metabolismo, proteômica e autofagia.



## ABSTRACT

The high energy demand imposed by oncogenic process has important consequences on the metabolism of cancer cells, as well has expressive impact on the diagnosis methods and associated therapies to neoplasms treatments. Mannose is an epimer of glucose and therefore is aboserbed by the same transporters as glucoses. Recent studies using tumoral cell lines has show that this glucose epimer accumulates in cells as mannose-6-phospate (M6P), due to low levels of the enzyme phosphomannose isomerase (PMI), wich converts M6P into fructose-6-phosphate (F6P), an intermediate of the glycolytic pathway. This characteristic has a significant impact on the glucose metabolism by the glycolytic pathway, tricarboxylic cycle and pentose phosphate pathway. In this work, we focus on the study of the effect of mannose on several cellular processes, such as cell growth, autophagy, protein glycosylation, cell cycle and death. For this purpose, were performed culture growth curve assays, separation of secretome proteins in Concanavalin-A resin and later SDS-PAGE to identify glycosylated proteins, western blotting of LC3-II protein and identification of acidic vesicular organelles (AVO's) by flow cytometry to study the autophagy and cell cycle analysis (G0G1 / G2M ratio) and death (% SubG1) by flow cytometry. It was observed that cell lines treated with mannose showed a significant reduction in cell growth. An increase in the production of AVO's and cells in death (SubG1) was also observed in the groups treated exclusively with mannose. However, we were unable to observe increase in secreted glycosylated proteins, no significant difference in LC3-II protein in the lysate, nor significant changes in the cell cycle of cells that were treated with mannose.

**Keywords:** cancer, melanoma, mannose, metabolism, proteomic and autophagy.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Possíveis destinos intracelulares da manose (Gonzalez et al, 2018)

**Figura 2** – *Workflow* dos ensaios realizadas durante o projeto

**Figura 3** – Curva de crescimento linhagem A375 após diversos tratamentos com a administração de manose.

**Figura 4** – Efeito da manose sobre o crescimento celular das células A375 após 72 horas de tratamento com manose.

**Figura 5** – Curva de crescimento linhagem WM1366 após diversos tratamento com a administração de manose.

**Figura 6** – Efeito da manose sobre o crescimento celular das células WM1366 após 72 horas de tratamento com manose.

**Figura 7** – Perfis proteicos dos lisados e secretomas celulares da linhagem A375 após tratamento com manose.

**Figura 8** – Perfil proteico do secretoma celular da linhagem A375 e porções que se ligaram à resina de Concanalina-A para identificação de proteínas glicosiladas.

**Figura 9** – Quantidade de AVO's produzidas pelas células de A375 após tratamento de 24h, 28h e 72h com manose.

**Figura 10** - Quantidade de AVO's produzidas pelas células de WM1366 após tratamento de 24h, 28h e 72h com manose.

**Figura 11** – Proteínas LC3-I, LC3-II e Tubulina precipitadas do lisado celular da linhagem A375. Após tratamento de 24, 48, 72h com manose

**Figura 12** – Porcentagem de células de A375 em SubG1 (hipodiploides), indicativo de morte celular programada. Após tratamento de 24, 48, 72h com manose

**Figura 13** – Porcentagem de células de WM1366 em SubG1 (hipodiploides), indicativo de morte celular programada. Após tratamento de 24, 48, 72h com manose

**Figura 14** – Proporção G0G1/G2M das células linhagem A375 após o tratamento com manose de 24h, 48h e 72h com manose.

**Figura 15** – Proporção G0G1/G2M das células linhagem WM1366 após o tratamento com manose de 24h, 48h e 72h com manose.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Ensaios realizados e as diferentes condições de cultivo adotadas durante o projeto.

**Tabela 2** – Quantificação das proteínas do secretoma que interagiram com a resina. Linhagem A375 tratada com glicose durante 24 horas.

**Tabela 3** – Quantificação das proteínas do secretoma que interagiram com a resina. Linhagem A375 tratada com manose durante 24 horas.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – *protein kinase B*  
AMPK – *AMP-activated protein kinase*  
ANOVA - *Analysis Of Variance*  
Atg – *Autophagy related*  
ATCC – *American Type Cell Collection*  
ATP – *Adenosine Triphosphate*  
AVO's – *Acidic Vesicular Organelles*  
BRAFWT – *BRAF Wild type*  
BSA – *Bovine serum albumin*  
CO<sub>2</sub> – *Dióxido de carbono*  
CSD – *chronacally sun damaged*  
CQ – *Cloroquina*  
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO - *Dimetilsulfóxido*  
DNA – *Deoxyribonucleic acid*  
EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*  
ENO1 - *enolase 1*  
ERK – *Extracellular signal-regulated kinases*  
EtOH – *Alcól Etílico*  
F6F – *Frutose-6-fosfato*  
FT – *Flowthrough*  
GTP – *Guanosine Triphosphate*  
GLUT – *Glucose Transporter*  
GPI – *Glucose phosphate isomerase*  
HBSS – *Hanks' balanced salt solution*  
HIF-1 – *Hipoxia-inducible fator alfa*  
HK - *hexoquinases*  
HK2 - *Hexoquinase 2*  
KDN - *ácido cetodesoxinonulosônico*  
LC3 – *protein light chain 3*  
M6F – *manose-6-fosfato*  
MAPK – *mitogen-activated protein kinase*

MITF – *microphthalmia-associated transcription factor*  
mTOR – *mammalian target of rapamycin*  
PBS – *phosphate-buffered saline*  
PE - *fosfatidiletanolamina*  
PFK – *phosphofructokinase-1*  
PGM – *phosphoglucomutase*  
PMI – *phosphomannose isomerase*  
PI - *propidium iodide*  
PI3K – *Phosphoinositide 3-kinases*  
PPP – *pentose phosphate pathway*  
PVDF - *hydrophobic polyvinylidene fluoride*  
RNA – *Ribonucleic acid*  
SDS PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
SFB – *soro fetal bovino*  
SQ – *Soma dos Quadrados*  
TBS – *Tris-Buffered Saline*  
TBS-T – *Tris-Buffered Saline 0,1% Tween*  
TCA – *tricarboxylic acid cycle*  
ULK – *Unc-51-like*  
UV – *Ultravioleta*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Melanoma .....	14
1.2 Metabolismo energético.....	17
1.3 A manose no metabolismo energético.....	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Linhagens celulares e condições de cultivo .....	25
3.2 Curvas de crescimento em diferentes condições.....	26
3.3 Obtenção do lisado e secretoma celular em diferentes condições.....	26
3.4 Identificação de proteínas glicosiladas no secretoma celular .....	28
3.5 Formação de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's) .....	29
3.6 <i>Western Blotting</i> proteína LC3.....	30
3.7 Análise do ciclo celular e morte celular programada por citometria de fluxo ..	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1 Efeito da manose sobre o crescimento celular.....	33
4.2 Lisados e Secretomas .....	38
4.3 Proteínas glicosiladas no secretoma celular .....	40
4.4 Efeito da manose na formação de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's)....	42
4.5 <i>Western Blotting</i> proteína LC3.....	45
4.6 Efeito da manose no ciclo celular e morte celular programada .....	46
5. CONCLUSÃO .....	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
LISTA DE ANEXOS.....	59

## **1. Introdução**

### **1.1 Melanoma**

O melanoma é um câncer de pele que atinge melanócitos, as células responsáveis pela produção de melanina, e que se encontram na camada basal da epiderme (DOMINGUES, 2018). A melanina é o pigmento escuro responsável por dar cor à pele e possui propriedades que absorvem e dispersam a radiação UV, elimina radicais livres e armazenam íons. Deste modo, a melanina se apresenta como um importante elemento na proteção aos danos do DNA causados pela exposição de raios UV (COSTIN, 2018; RILEY, 1997; BUSH, 2007).

O melanoma cutâneo representa apenas 1% dos cânceres de pele, entretanto, é o mais agressivo e que causa o maior número de mortes devido ao seu grande potencial metastático (ACS, 2019). A incidência da doença é muito influenciada pelo fenótipo, sendo os caucasianos os mais afetados em ambos os gêneros (FERLAY et al, 2012). O principal fator de risco para o desenvolvimento da doença é a exposição prolongado à radiação UV, os fatores genéticos familiares da doença e além disso, estudos mostram que o sofrimento de queimaduras solares na infância ou adolescência está associado a um maior risco de desenvolvimento posterior da doença (GILCHREST, 1999; ELWOOD, 1997; PENNELLO, 2000; INCA, 2019).

Segundo dados do Organização Mundial da Saúde de 2019 (WHO, 2018), foi estimado um total de 287723 novos casos em todo o mundo no ano de 2018 (sendo a média global 3,1 casos por 100mil habitantes). Os países com maior incidência da doença são Nova Zelândia e Austrália (33,6 casos a cada 100mil habitantes), justamente países que possuem predominância de habitantes de pele clara e que estão localizadas em uma faixa do globo terrestre que possui alta exposição de radiação solar ao longo do ano. O número de óbitos causados pelo melanoma no ano de 2019 foi de 60712 (0,63 morte a cada 100 mil habitantes), incluso ambos os sexos.

No Brasil, o câncer de pele tem incidência levemente superior à média global, contando com uma projeção de 4200 novos casos em homens e 4250 novos casos em mulheres para o ano de 2020 (4,04 casos por 100mil habitantes) para o ano de 2020 (INCA, 2020). A região Sul é a região mais acometida pela doença quando comparada às outras regiões, para ambos os

sexos, isso por conta de ser a região do país maior concentração de pessoas de pele clara – 76,8% se autodeclararam brancos. (IBGE, 2016). A taxa de mortalidade é considerada alta em relação à média global, com um registro de 1812 óbitos causados pela doença no último ano (0,87 morte por 100 mil habitantes).

A transição de um melanócito saudável para um tumoral ocorre a partir de fatores ambientais, genéticos, acúmulo de mutações, atividade elevada de oncogenes, baixa atividade de genes supressores de tumor e da falha no reparo de DNA (GRAY-SCHOPFER et al, 2007). A partir da proliferação de células tumorais formam-se as lesões, que normalmente se iniciam com um crescimento não invasivo de forma radial e em seguida ocorre o crescimento vertical à medida que a doença vai se desenvolvendo. O crescimento vertical por períodos prolongados representa o risco de metástase, quando as células atingem as camadas mais profundas da pele onde ocorre a infiltração das células tumorais nos vasos sanguíneos (LEONARDI et al, 2018; JAMES et al, 2015).

A composição genética do melanoma é parte representativa e complexa no desenvolvimento da doença. As vias de sinalização como MAPK e AKT estão constitutivamente ativas nos melanócitos tumorais e podem ocorrer por diversos mecanismos, devido às mutações acumuladas por fatores genéticos e ambientais. Estudos mostram que cerca de 15% a 30% dos melanomas possuem mutação do gene NRAS e outros 40% a 60% apresentam mutações que levam à superexpressão da proteína B-Raf (COLOMBINO, 2013; CURTIN 2005, HAYWARD et al, 2017; CHENG et al, 2017). As mutações ativadoras de *BRAF* e *NRAS* podem coexistir no mesmo melanoma, entretanto, são mutuamente exclusivas no nível de células (SENSI, 2006).

*BRAF* codifica uma serina-treonina quinase citosólica e em 97% das mutações no gene *BRAF* a mudança está localizada no códon 600. (IHLE, 2014). A mutação mais comum, em mais de 80% dos casos, é a BRAFV600E, em que ocorre a troca do aminoácido Valina (V) – um aminoácido hidrofóbico por um ácido glutâmico (E) – um aminoácido polar, na posição 600 da tirosina quinase BRAF, fazendo com que ocorra um enovelamento anormal no sítio catalítico que gera uma conformação ativa constitutivamente, mantendo a via MAPK/ERK ativa em uma razão



de 500 vezes maior do que na BRAF WT (do inglês, *wild-type*) (WAN et al, 2004, RICHTIG et al, 2017). Outras substituições são observadas com menor frequência no mesmo sítio, são elas a troca da Valina (V) por Lisina (V600K) em 10% dos casos, por Arginina (V600R) em 1%, por Leucina (V600L) em 0,3% e Ácido Aspártico (V600D) em 0,1% (IHLE, 2014; LONG et al, 2011).

As mutações no gene *BRAF* tendem a impactar as características do melanoma, tornando-o mais agressivo do que os melanomas que não apresentam a mutação do gene. É mais comum encontrar pacientes jovens que possuem melanoma de mutação BRAF, e também são encontrados mais comumente lesões e tumores em pacientes que não apresentaram dano crônico ao sol, e então são chamados de melanomas non-CSD (do inglês, *chronically sun damage*) (LONG et al,2011; SHAIN 2016). Além disso, melanomas de mutação BRAF apresentam mais frequentemente metástases para o cérebro, sendo então relacionado a menor tempo de sobrevida em pacientes que atingem o estágio IV do que melanomas BRAF WT (RIBAS,2011; HUGDAHL,2016).

Dado a sua agressividade e potencial metastático, é importante que o diagnóstico da doença e do tipo, seja feito precocemente. Com um diagnóstico em suas fases iniciais, a chance de cura é maior do que 80%, para casos em que a lesão já atingiu extensões maiores da pele, mas ainda sem metástase, a chance de cura é em torno de 60% a 80% e nos casos em que já ocorreu metástase as chances de cura caem para um mínimo de 10%, o que reforça a necessidade de um diagnóstico precoce (JAMES et al, 2015). Para isso, são utilizadas diversas abordagens, como técnicas de detecção por imagens e o uso de biomarcadores que são utilizados tanto para diagnóstico quanto o monitoramento dos pacientes com melanoma (MOHAMMADPOUR et al, 2018).

As mutações que ocorrem na proteína NRAS são a segunda causa mais comum do câncer de pele melanoma, apenas atrás das mutações em BRAF. Cerca de 80% dos casos de mutação NRAS, ocorre por mutações *missense* nos códons 12, 13 ou 16 (CURTIN,2005; JAKOB, 2011). Essas mutações levam à um prolongamento da NRAS em um estágio GTP-ligado, mantendo a sinalização anormal das vias MAPK e PI3K, o que acarreta a um elevado crescimento e divisão celular (CURTIN et al, 2005; HODIS et al, 2012; FEDORENKO, 2013).

Para o tratamento do melanoma, é recomendada a abordagem de excisão cirúrgica em casos em que a doença se encontra nos estágios iniciais. A excisão quando feita com as margens adequadas traz um alto potencial curativo. (IBRAHIM, 2009; MATTIA ET AL, 2018). Entretanto, para pacientes com melanoma em estágio IV em que o câncer já pode ter metastizado para outros órgãos do corpo, é recomendado um tratamento a nível sistêmico. Os tratamentos convencionais de quimioterapia e radioterapia possuem baixa eficiência contra o melanoma em estágio avançado, mas podem prolongar o tempo de vida do paciente. Desta forma, novos tratamentos estão sendo desenvolvidos especificamente para o tratamento do melanoma. A terapia alvo inibe o crescimento e sobrevivência de células cancerosas de melanoma especificamente nas vias de sinalização que estão alteradas e em seus genes, sendo uma solução muito mais eficaz, específica e com menos danos colaterais (GRAY-SCHOPFER, 2007). Neste tipo de terapia são utilizados alguns inibidores que agem na via da MAP quinase, através da inibição de BRAF e MEK1/MEK2. Alguns dos inibidores que são utilizados na terapia são o vemurafenib, dafrafenib e trametinib, que são substâncias que atuam diretamente nas vias de sinalização que estão alteradas no melanoma. O tratamento combinado com inibidores de BRAF e MEK tem mostrado efeito significativo de pacientes com melhora e aumento da taxa de sobrevida. Portanto, o tratamento combinado de inibidores, atualmente, é considerado o tratamento padrão para os pacientes que apresentam melanoma com mutação BRAF em estágio avançado (ASCIERTO et al, 2016; LONG,2016; LONG 2017; WELSH, 2016).

## **1.2 Metabolismo energético**

O processo de tumorigênese, muitas vezes decorrente de mutações oncogênicas cumulativas, tem implicações diretas e indiretas no metabolismo celular. Um padrão recorrente em fenótipos tumorais é a capacidade de adquirir os nutrientes necessários mesmo em ambientes pobres e utilizá-los para manter sua viabilidade e aumentar a biomassa. Neste contexto, as alterações nos metabólitos intracelulares e extracelulares que podem acompanhar a reprogramação metabólica associada ao câncer têm efeitos profundos na expressão gênica e proteica, na diferenciação celular e no microambiente tumoral (PAVLOVA, 2016).

O metabolismo tumoral tem sido objeto de estudo desde o início do século passado, quando, por exemplo, o fisiologista e bioquímico alemão Otto Heinrich Warburg demonstrou que células tumorais sofrem um redirecionamento de seu metabolismo energético, reduzindo a fosforilação oxidativa para realizar prioritariamente fermentação láctica, mesmo em concentrações normais de oxigênio (WARBUG et al., 1924). Nos anos subsequentes, avanços significantes na área da biologia molecular, sobretudo em oncogenética, relacionaram alterações em genes supressores tumorais e oncogenes com o processo de transformação maligna, atenuando de certa forma o foco da área metabólica (SCHULZE, 2011). Sabe-se, contudo, que a reprogramação metabólica, que tem como consequência uma desregulação do metabolismo energético celular 'normal', é característica ubíqua de células transformadas, constituindo um dos *hallmarks* do câncer (HANAHAN, 2011). As implicações destas alterações metabólicas têm como base alterações em processos de sinalizações celular que ocorrem durante a oncogênese, capacitando o tumor para um novo (micro)ambiente tumoral (CAIRNS, 2011).

Outras alterações metabólicas do câncer foram descritas em alguns tipos de tumores como naqueles deficientes em p53 e nos que possuem desregulação do gene MYC (HAG et al. 2013). O fator supressor de câncer p53 é uma proteína que previne o desenvolvimento do câncer por diversos mecanismos, incluindo a indução à apoptose, parada do ciclo celular, diferenciação, senescência e manutenção da estabilidade genética (VOGELSTEIN 2000; VOUSDEN, 2009). Nesses tumores cujas células são deficitárias em proteína p53, ocorre uma reprogramação metabólica, com isso o que se observa é a reversão de alguns mecanismos que causavam o retardamento da glicólise, a ativação de TP53-indutor de regulação de glicólise e apoptose (TIGAR), inibição de expressão de transportadores de membrana GLUT 1 e GLUT 4 e redução do nível de fosfoglicerato mutase (PGM), enzima que participa da via glicolítica (BENSAAD et al. 2006). Além disso, as vias de sinalização de AMPK e mTOR são diretamente afetadas por conta da ausência de p53 o que leva à uma inibição da autofagia e contribuindo para o processo de crescimento celular (YEUNG 2008; ZHENG 2012). Trabalhos subsequentes (DANG et al. 2008; KIM et al. 2007) também demonstraram importantes efeitos da desregulação do fator de transcrição oncogênico MYC no metabolismo celular, corroborando

com os fenômenos de reprogramação de vias metabólicas energéticas em células transformadas. A expressão desregulada de MYC é comumente encontrada em tumores humanos, incluindo os de cólon, pulmão e próstata (DANG, 2009). Ele está diretamente ligado com a replicação de DNA e com genes do metabolismo da glicose, como o transportador de glicose GLUT1, hexoquinase 2 (HK2), fosfofrutoquinase (PFK) e enolase (ENO1), auxiliando na priorização da via glicolítica como descrito pelo efeito Warburg. (KIM et al. 2004, 2007; OSTHUS et al. 2000). Genes cujos produtos proteicos estão envolvidos na via glicolítica também respondem diretamente à condição externa de hipóxia; Dang e colaboradores (2008) reportaram a interação entre MYC e HIF-1 (fator induzível por hipóxia), que por sua vez promovem a expressão de diversos genes relacionados ao metabolismo energético em condições de baixa concentração de oxigênio. Os estudos sugerem que HIF-1 seria responsável pela transativação dos genes de transportadores de glicose sob condições de hipóxia, enquanto MYC regula o mesmo conjunto de genes sob condições normais de oxigênio.

O estabelecimento e desenvolvimento da célula tumoral em seu (micro)ambiente requer importantes adaptações, sobretudo do ponto de vista metabólico para permitir os processos exacerbados de operação de vias biossintéticas e de geração de energia (PAVLOVA, 2016). Além das mutações genéticas o microambiente tumoral também desempenha papel importante no metabolismo celular. O ambiente é extremamente alterado por conta das atividades exacerbadas geradas pelas células tumorais, o que cria uma anormalidade espacial, de falta de oxigenação (hipóxia), gradientes de pH, concentração de glicose, nutrientes em geral e metabólitos (CAIRNS,2011; LUNT, 2009). Para suportar tais alterações, mecanismos moleculares foram adaptados, alterando significativamente as vias das principais macromoléculas do organismo, gerando respostas ao estresse celular e, que torna o fenótipo metabólico de células tumorais ainda mais distorcido, influenciando na progressão do tumor. (DEBERARDINIS et al. 2008; LOCASALE, 2011).

A alta captação de glicose é um dos efeitos observados que permite a célula tumoral manter a rápida geração de ATP para suportar a rápida biossíntese de macromoléculas e divisões celulares. Essa capacidade se dá pela ativação de genes como o *AKT1* que apresentam

expressão aumentada em diversos tumores e cuja cascata de eventos de sinalização promove a translocação de transportadores de membrana da família GLUT para a membrana celular, que são responsáveis por internalizar a glicose do meio extracelular para o citoplasma (KOHN et al. 1996; ROBEY, 2009). Além disso, dentre os efeitos subjacentes à ativação do gene *AKT1* estão o aumento do número e da ativação de hexoquinases (HKs), enzimas responsáveis pela fosforilação da glicose citosólica, a primeira etapa da via glicolítica (ROBEY, 2009).

Outra resposta em detrimento do desregulamento do ambiente tumoral, como a hipóxia, baixo pH e privação de nutrientes é a autofagia. Em condições normais, a autofagia basal serve como um mecanismo de manutenção de homeostase celular, reciclando proteínas e organelas antigas ou danificadas e redirecionando os nutrientes para as vias necessárias (YU, 2017). Em células tumorais, o mecanismo de autofagia desempenha papéis duplos, agindo na supressão da tumorigênese por inibir a sobrevivência de células tumorais induzindo a morte celular, mas também promove a tumorigênese por promover a proliferação e o crescimento do tumor (LIM, 2013; SALMINEM, 2013). Mesmo na ausência de nutrientes disponíveis, as células tumorais são adaptadas para otimizar o metabolismo celular de forma a manter a sua viabilidade. Com isso, as células conseguem se adaptar para suportar longos períodos de privação de nutrientes por meio da autodegradação de proteínas e organelas que então são usadas para fornecimento de outras proteínas e nutrientes que servem como suprimento de energia, aumentando a sobrevivência (HE, 2018). O mecanismo da autofagia é controlado por proteínas da família Atg que apresentam funções específicas em cada etapa do processo e estão envolvidas na modulação de vias clássicas como PI3K/Akt e MAPK. A mTOR é uma proteína de dois complexos (mTORC1 e mTORC2) e está associada ao estresse, proliferação celular e progressão do câncer. A ativação de mTORC1 induz a fosforilação de proteínas Atg e levam a inibição da autofagia, portanto, quando mTORC1 está inibida por fatores de estresse ambiental, como a fome e danos em organelas, o processo de autofagia tende a aumentar (KIM, 2011; SCOTT, 2004). Com a inibição de mTOR, ocorre a desfosforilação do complexo ULK (do inglês, *Unc-51-like*) iniciando a formação dos fagóforos que então sofrem alongamentos até ocorrer a fusão das suas extremidades, originando a formação de uma estrutura fechada com

dupla membrana, o autofagossomo. A formação do autofagossomo é auxiliada pela ação da proteína LC3 que é recrutada para a dupla membrana e promove a fusão das extremidades a partir da sua proteólise que deixa um resíduo de glicina exposto para uma posterior conjugação com fosfatidiletanolamina (PE) (DIKIC, 2018; LIU et al., 2010; WU et al., 2006). No processo, a LC3 é processada pela proteína Atg4 tornando-se LC3-I e após sofrer conjugação com a fosfatidiletanolamina passa a ser a LC3-II. Os autofagossomos maduros podem se fundir aos lisossomos, formando uma nova estrutura de membrana única, o autolisossomo que será responsável pela ciclagem seletiva das proteínas e organelas disfuncionais em nutrientes (THURSTON, 2016; DERETIC, 2006).

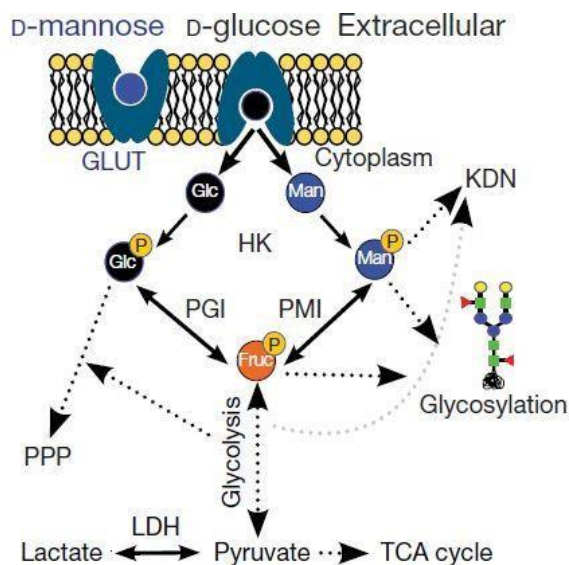
Dadas as informações recentes, nota-se que o entendimento sobre os mecanismos de ação dos tumores é muito mais amplo que apenas efeitos dos oncogenes; o metabolismo celular é chave crucial no entendimento do desenvolvimento destas doenças. Com isso e, aliado às novas tecnologias bioquímicas e moleculares, o metabolismo tumoral tornou-se novamente um tópico de destaque no estudo do câncer (BERGER 2016; CAIRNS et al. 2011; PAVLOVA 2016; SCHULZE 2011)

O metabolismo energético não é o único afetado pelas alterações da célula tumoral. O desequilíbrio na homeostasia celular decorrente do processo tumoral tem um importante reflexo na síntese proteica (PALTRIGDE et al., 2013). Expressões de proteínas em diferentes quantidades e composições são mediadores críticos do processo tumoral; essas modificações contribuem para a aquisição e manutenção das características tumorais (KOHN et al. 1996; PALTRIGDE et al. 2013). A expressão gênica/proteica diferencial entre tecidos tumorais frente aos tecidos saudáveis, compreende um importante aspecto relacionado à tumorigênese e que pode ser utilizado em diagnósticos precoces e prognósticos da doença (POSTE 2011; SCHIESS 2009, ISMAIL et al., 2000).

### **1.3 A manose no metabolismo energético**

O metabolismo energético nos mais variados organismos tem a glicose como um de seus principais substratos oxidáveis; este monossacarídeo tem papel central nas diferentes vias

metabólicas que convergem para a produção de ATP. Outras hexoses (manose e galactose, por exemplo) recebem menos atenção, apesar de poderem ser convertidas em importantes intermediários e integrar diferentes vias metabólicas, como a glicólise, por exemplo. A manose é um epímero da glicose no seu carbono 2 (C2); este tipo de isomeria torna ambas moléculas (glicose e manose) passíveis de serem capturadas pelos mesmos transportadores não específicos da família GLUT (MUECKLER, 2013; THRONES, 2009). Após a internalização da manose, ocorre a rápida ação da enzima hexoquinase, convertendo-a em manose-6-fosfato (M6F); este intermediário pode seguir três vias metabólicas distintas, a de maior relevância fisiológica é a isomerização para um intermediário da via glicolítica, a frutose-6-fosfato (F6F), pela ação da enzima PMI (manose-6-fosfato isomerase); M6F também pode ser destinada à via de glicosilação de proteínas e, minoritariamente, para a produção de ácido cetodesoxinonosônico (KDN) (Figura 1) (Gonzalez et al. 2018).



**Figura 1 – Possíveis destinos intracelulares da manose.** A manose é importada pelo mesmo transportador que a glicose, sendo posteriormente fosforilada em M6F. Dentro da células M6F pode seguir três vias distintas; a glicosilação, a isomerização em Frutose-6-fosfato por ação da fosfomanose isomerase (PMI) ou produção de ácido cetodesoxinonosônico (KDN) (adaptado de Gonzalez et al., 2018).

Recentemente, Gonzalez (et al., 2018) demonstraram, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que células com baixo nível de PMI acumulam M6F em seu interior e não conseguem transformá-la em frutose-6-fosfato, que poderiam seguir para via glicolítica, ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)

e via das pentoses fosfato (PPP). Como resultado, manose aumenta a quantidade de hexose-6-fosfato no interior da célula o que pode inibir alostericamente a atividade de hexoquinases e da glucose-6-fosfato isomerase (GPI)(DEROSSI et al. 2006). A inibição dessas duas enzimas interfere significativamente no metabolismo da glicose e reduz o crescimento celular (DEROSSI et al. 2006; GONZALEZ et al. 2018). Entretanto, a deficiência de PMI varia de acordo com o tecido celular, sendo classificados como não-sensíveis à manose aquelas células em que o gene PMI está expresso em nível elevado, resultando na produção eficiente da proteína manose-6-fosfato isomerase. Os resultados reportados por Gonzalez e colaboradores apontam não só para um retardamento (*in vivo* e *in vitro*) do crescimento tumoral, mas também para uma melhor eficácia na intervenção quimioterápica quando realizada concomitante à administração de manose em tecidos específicos. Sabe-se que a síntese proteica é alterada nestas condições, entretanto, pouco se conhece acerca das vias biológicas comprometidas, bem como da atividade autofágica de células tumorais submetidas ao tratamento com manose. Neste sentido, estas abordagens possibilitaram uma melhor compreensão das bases moleculares dos efeitos da manose num modelo tumoral *in vitro*, representado pela cultura de melanomas humano (linhagens A375 e WM1366 – melanomas *BRAF* mutado e *NRAS* mutado, respectivamente).

## 2. Objetivos

O objetivo principal deste projeto foi avaliar os efeitos da administração de manose em linhagens celulares de melanoma humano. Para esta finalidade, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

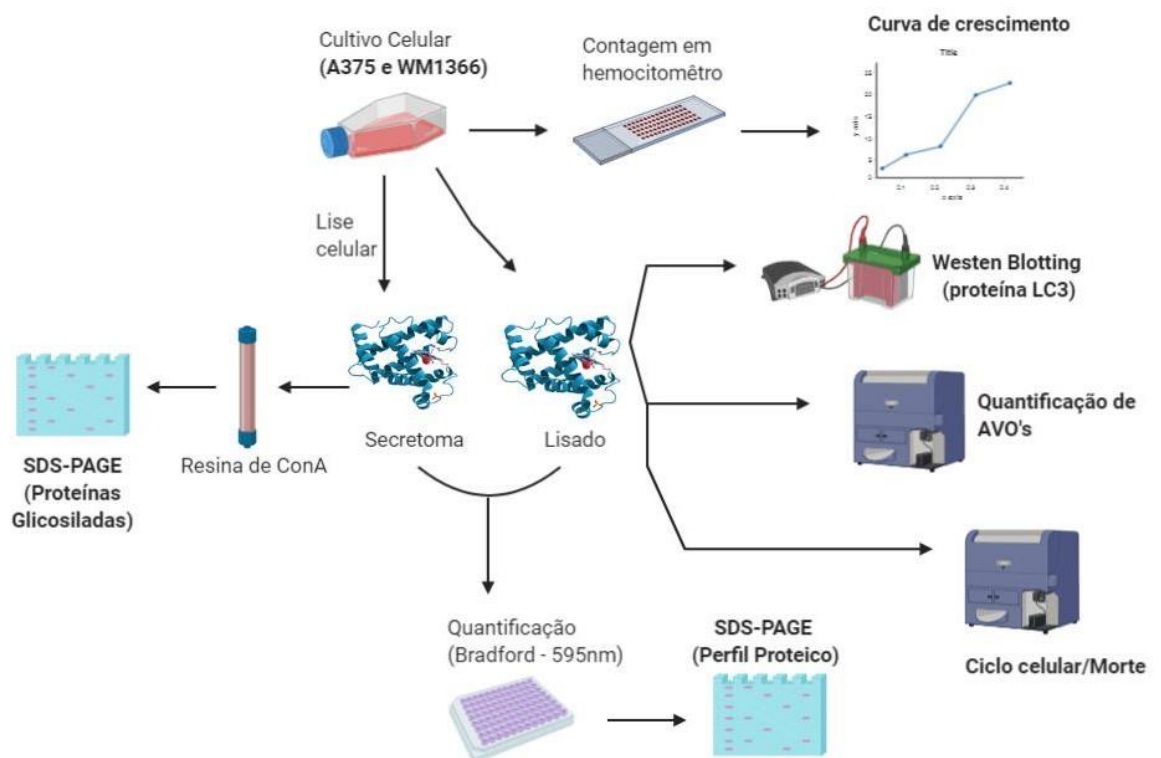
- (1) Avaliar o efeito da administração de manose no crescimento de células de melanoma humano (linhagens A375 e WM1366);
- (2) Avaliar marcadores de autofagia nas células e lisados celulares das culturas submetidas ao tratamento com manose por *western blotting* e citometria de fluxo;



- (3) Analisar os efeitos no ciclo celular e morte celular programada ocasionados pelo tratamento com manose utilizando estudos de citômetria de fluxo;
- (4) Avaliar qualitativamente os lisados celulares das culturas submetidas ao tratamento com manose por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida;

### 3. Material e Métodos

A seguir, apresenta-se um paronama geral (*workflow*)(Figura 2) das metodologias empregadas na investigação do que se propôs os objetivos do projeto e uma tabela (Tabela 1) que mostra quais tratamentos foram realizados para cada condição de cultivo celular. As diferentes condições de cultivo utilizadas formaram 4 grupos experimentais que estão expostos na tabela abaixo.



**Figura 2** – Principais metodologias utilizadas com as linhagens tumorais A375 e WM1366.

**Tabela 1** – Ensaios realizados com as diferentes condições de cultivo celular. Os grupos 1, 2 e 4 foram selecionados para a análise em espectrometria de massas e serão os grupos abordados com maior atenção futuramente. Além desses grupos, foi criado também o grupo 3 para análises pontuais em determinados ensaios, principalmente os de identificação do ciclo e morte celular programada.

Grupo	Condição de cultivo (monossacarídeo na cultura)	ENSAIOS					Identificação	
		Curva de crescimento	Proteínas Glicosiladas	Western blotting anti LC3	Formação AVO's	do ciclo celular e morte	Coleta do Lisado e Secretoma	
1	25mM de Glicose	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	
2	25mM de Manose	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	
3	12,5mM de Glicose + 12,5mM de Manose	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	
4	25mM de Glicose + 25mM de Manose	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Não	

### 3.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

As linhagens celulares utilizadas nos ensaios foram a A375 (obtida a partir de melanoma humano metastático) que foi adquirida da *American Type Cell Collection* (ATCC, EUA) e a WM1366 (obtida a partir de melanoma humano) que foi cedida gentilmente pelo professor Dr. Roger Chammas, do Centro de Investigação Translacional em Oncologia – ICESP/Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP-SP). As células foram mantidas sob cultura em meio DMEM, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), 1,5 mg/L de bicabornato de sódio, 100 mg/L de streptomicina, 25 mg/L de ampicilina e 4 mM de glutamina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, com alta umidade relativa (maior que 90 %) e em atmosfera controlada contendo 5 % de CO<sub>2</sub> e 95% de ar. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias e as células subcultivadas regularmente. As subculturas foram obtidas por descolamento com solução estéril de tripsina 0,25% -EDTA 0,03%. Estoques de células foram congelados na presença de crioprotetor (Dimetilsulfóxido – DMSO a 10%), acondicionados em ampolas e mantidos em nitrogênio líquido. Para os ensaios testando os efeitos diversos da exposição à manose, as culturas foram suplementadas com DMEM sem glicose (D5020 – Sigma-Aldrich), contendo 10% de soro fetal bovino, 1,5mg/L de bicabornato de sódio, 100 mg/L de streptomicina, 25 mg/L de ampicilina, 4mM de glutamina, onde neste meio foi feita a adição dos monossacarídeos (12,5mM ou 25mM

de D-manose ou D-glicose - dependendo do grupo experimental), e as células foram mantidas nas mesmas condições de cultivo e subculturas que as descritas acima.

### **3.2 Curva de Crescimento em diferentes condições**

As curvas de crescimento foram obtidas através do cultivo das células em placas de cultura *multi-well* de 6 poços e contagem em períodos de tempos regulares através de câmara de Neubauer em microscópio invertido CKX41 (Olympus, EUA). Inicialmente, as células foram cultivadas em frascos de cultura T75 e então repicadas, contadas e plaqueadas de forma que todos os poços das placas recebessem o mesmo número de células (A375 -  $4 \times 10^4$  células por poço e WM1366 –  $6 \times 10^4$  células por poço). O plaqueamento foi feito utilizando meio DMEM *high glucose* – 25mM Glicose (D5648 – Sigma-Aldrich) para garantir a aderência das células e 24 horas depois os meios foram substituídos pelos meios de cultura contendo a composição de monossacarídeo (manose e/ou glicose) que foram indicados anteriormente como os testes deste estudo. Após a substituição dos meios, que é considerado o tempo 0h do ensaio, a cada 24 horas, um poço de cada condição que estava sendo testada tinha suas células coletadas e contadas em hemocítômetro. A viabilidade celular foi determinada por coloração de azul de tripan 0,4% (TrypanBlue – Sigma Alrich).

A curva de crescimento foi feita nas 4 condições: (Grupo 1) DMEM suplementado com glicose (25mM) , (Grupo 2) DMEM suplementado com manose (25mM), (Grupo 3) DMEM suplementado com manose (12,5mM) e glicose (12,5mM) e (Grupo 4) DMEM suplementado com manose (25mM) e glicose (25mM) . O intuito é de testar se a aplicação de manose no meio de cultura interfere de algum modo no crescimento celular das linhagens de melanoma humano.

### **3.3 Obtenção do Lisado e Secretoma celular das diferentes condições**

Para obtenção do secretoma celular foram cultivados 6 frascos de cultura T175 das células A375. Inicialmente, todas as células estavam sendo complementadas com o meio DMEM padrão, contendo 25mM de glicose como fonte de monossacarídeo.

Após atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, o meio de cultura foi trocado, e as células receberam suplementação nas duas diferentes condições: (1) DMEM suplementado com glicose (25mM) (grupo 1), (2) DMEM suplementado com manose (25mM) (grupo 2), sendo três frascos para cada condição. As células foram mantidas nessas condições por 24 horas e após este período o meio de cultura condicionado foi coletado e centrifugado por 10 minutos a 2200 x g, a 4°C para a remoção de quaisquer células eventualmente presentes. O material foi então filtrado (filtros com tamanho de poro de 0,22 µm) e, no intuito de se minimizar a ativação de proteases decorrentes da manipulação experimental, foi adicionado uma alíquota de uma solução contendo inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail*, Sigma) e EDTA na concentração final de 5 mM. O secretoma foi obtido pela concentração deste material em ultrafiltradores (sistema Vivaspin 20, *cutoff*: 3 kDa, GE Healthcare, EUA), a 4 °C, 5000g, até que o material resultante foi concentrado aproximadamente 50x (~0,6mL). O teor proteico do secretoma foi avaliado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se uma curva padrão com concentrações crescentes de soroalbumina bovina (BSA). Para reconhecer o perfil proteico do material, também foi realizado um gel de eletroforese SDS-PAGE (12% de poliacrilamida), o gel foi corado pelo método de coloração rápida por nitrato de prata.

Paralelamente, após a remoção do secretoma, as células foram lisadas utilizando *cell scraper* por 3 minutos em cada frasco, e com auxílio do tampão de lise (CHAPS 2%, NaCl 150mM, HEPES 50mM, pH 7,5) e um adicional de inibidores de proteases, sempre mantendo os frascos em contato com gelo para reduzir a desnaturação proteica por conta do calor. O material foi então centrifugado a 14000g, 4°C, 10 minutos, o sobrenadante contendo as proteínas do lisado celular em suspensão foi coletado, identificado e armazenado em -20°C. O teor proteico do lisado também foi avaliado pelo método de Bradford, utilizando-se uma curva de concentrações crescentes e conhecidas de soroalbumina bovina. Mais uma vez, o perfil proteico foi avaliado por um gel de eletroforese SDS-PAGE (12% de poliacrilamida), o gel foi corado pelo método de coloração rápida por nitrato de prata.

Posteriormente, foram cultivados 9 frascos T75 da mesma forma que a descrita acima, porém após a substituição do meio, foi testada a condição 4 (glicose[25mM] + manose[25mM]),

além das condições 1 e 2 que já haviam sido testadas anteriormente. O material lisado das 9 garrafas foram quantificados separadamente. Para essas células, foi coletado o secretoma porém ele foi armazenado e não teve seu material quantificado até o momento.

### **3.4 Identificação de proteínas glicosiladas no secretoma celular.**

A manose é uma hexose que pode desempenhar função energética pela conversão em frutose-6-fosfato, entretanto, a mesma também pode participar de outras vias celulares, como a glicosilação de proteínas e a produção do ácido cetodesoxinonulosônico (KDN)(Gonzalez et al. 2018). Com o objetivo de investigar o destino das moléculas de manose, analisou-se a secreção de proteínas glicosiladas dos grupos 1 e 2. Utilizou-se uma resina cromatográfica com Concanavalina A (Con A Sepharose, GE Healthcare) imobilizada que possui forte afinidade à glicoproteínas, em especial D-glicose e D-manose.

A resina foi preparada por meio da adição de 1mL de suspensão de concanavalina A em um microtubo e, então, o procedimento de lavagem foi realizado (–centrifugação à 400g, 1min e 4°C) por dez vezes com 1mL de tampão de ligação (Tris 20mM, NaCl 500mM, MnCl<sub>2</sub> 1mM e CaCl<sub>2</sub> 1mM) por lavagem –, para então adicionar as amostras (100mL de secretoma de células tratadas 24 horas com manose 25mM e de células tratadas 24 horas com glicose 25mM). A esse volume, adicionou-se 400µL de tampão de ligação (500mL total), os tubos contendo a resina com as amostras foram incubados por 30 minutos, sob agitação. Ao fim da incubação, os tubos foram centrifugados a 400 x g por 1 minuto. Após a passagem da amostra na resina, o sobrenadante foi coletado e identificado como *flowthrough* (FT) e as amostras foram eluídas com 500mL de cada tampão de eluição (tampão de eluição manose 250mM e manose 500mM em tampão de ligação), resultando em mais dois tubos para cada amostra.

Para quantificar e avaliar possíveis alterações no teor proteico dos materiais coletados (*flowthrough*, eluição 250mM e eluição 500mM), foi utilizado o método de Bradford e, posteriormente, foram utilizados 10µg de proteína de cada amostra, para análise eletroforética (SDS-PAGE 12% de poliacrilamida).

### 3.5 Formação de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's)

Uma abordagem recorrente para a análise de autofagia é a identificação de vacúolos ácidos utilizando marcadores de acidez como o laranja de acridina. O laranja de acridina é um corante capaz interagir com moléculas como DNA e RNA, o que permite sua utilização para estudo do ciclo celular (NAFISI et al., 2007). Além disso, por ser um marcador acidotrópico, possui a capacidade de se ligar em autofagossomos maduros, podendo ser utilizado nos estudos de autofagia (TRAGANOS, 1994). Utilizou-se desse marcador e da análise de citometria de fluxo para entendermos a produção de vacúolos ácidos quando as células eram ou não tratadas com a manose.

Para a execução do ensaio, as células foram plaqueadas (A375 -  $3 \times 10^4$  células por poço e WM1366 –  $4 \times 10^4$  células por poço) com meio de cultura DMEM *high glucose* e cultivadas em placas p12. Após 24h do plaqueamento, as culturas foram suplementadas com os meios de culturas respectivos dos grupos 1, 2, 3 e 4 e durante 3 dias, a cada 24 horas, três poços de cada grupo (triplicata) eram retirados para o tratamento de coloração e então análise no citômetro de fluxo (12 amostras linhagem A375 e 12 amostras linhagem WM1366). O pré-processamento das células envolveu a adição de 30mM de cloroquina, um inibidor de autofagia, por um tempo de 1 hora, antes que fossem levadas para a coloração das células que foi feita com incubação em 3mg/mL de laranja de acridina por 10 minutos à 37°C e então os poços foram lavados com PBS e as células retiradas com uso de tripsina que logo em seguida foi inativada com meio de cultura contendo SFB. A solução foi centrifugada por 2 minutos à 2000rpm para isolar as células que foram ressuspendidas em 200mL de PBS. Essa amostra estava então pronta para ser submetida à análise do citômetro de fluxo (Attune NxT Flow Cytometer, EUA). Além das células testadas no estudo, foi criado um grupo de controle positivo, em que células de A375 e WM1366 foram cultivadas paralelamente em HBSS, uma solução salina isenta de aminoácidos que causa *starvation* (privação de nutrientes), assim induzindo rapidamente as células a um processo de autofagia (MEJLVANG, 2018). Outro grupo criado foi o branco, composto das células A375 e WM1366, sem a marcação de laranja de acridina.

Todas as amostras foram analisadas no software Attune NxT, próprio do fabricante do equipamento. Com o processamento dos eventos no equipamento, foi possível obter a quantificação dos vacúolos ácidos presentes nos diferentes grupos, que estão dispostos nos gráficos na seção de Resultados.

### **3.6 Western Blotting proteína LC3**

No objetivo de avaliar o processo de autofagia nas linhagens tumorais, foi realizado o ensaio de *western blotting* com a proteína LC3-II, uma proteína que se associa com ambas as membranas interna e externa do autofagossomo auxiliando a sua formação, assim, o marcador LC3II reflete a atividade autofágica e a detecção por *immunoblotting* se tornou um método comumente utilizado para monitorar o processo de autofagia. (TANIDA, 2008.)

Para realização do ensaio, as células foram plaqueadas (A375 –  $1,1 \times 10^5$  células por poço e WM1366 –  $1,2 \times 10^5$  células por poço) com meio de cultura DMEM *high glucose* e cultivadas em placas p60. Após 24h do plaqueamento, as culturas foram suplementadas com os meios de culturas respectivos dos grupos 1, 2, 3 e 4 e durante 3 dias, a cada 24 horas, uma placa de cada grupo era retirada para coleta do lisado extracelular, resultando em 24 amostras totais (12 amostras linhagem A375 e 12 amostras linhagem WM1366). Para a obtenção do lisado celular, as células foram expostas por 1 hora ao inibidor de autofagia cloroquina (CQ, 30mM), e então lisadas utilizando o *cell scraper* por 3 minutos em cada placa, e com auxílio do tampão de lise (CHAPS 2%, NaCl 150mM, HEPES 50mM, pH 7,5) e um adicional de inibidores de proteases, sempre mantendo as placas refrigeradas para evitar a desnaturação de proteínas no processo. O material coletado foi então centrifugado a 14000g, 4°C, 10 minutos, o sobrenadante contendo as proteínas do lisado celular em suspensão foi coletado, identificado e armazenado em -20°C. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford, utilizando-se uma curva de concentrações crescentes e conhecidas de soroalbumina bovina.

Com o material processado e preparado, separou-se 40 µg de proteínas de cada grupo em um gel de eletroforese (SDS-PAGE 15% de poliacrilamida) e então as proteínas foram transferidas para uma membrana PVDF (P 0,45mm, Amersham Hybond) por um sistema de

transferência líquido, durante 1 hora e 30 minutos, com 100V. Após a transferência de proteínas, a membrana foi incubada em solução de bloqueio de TBS BSA 5% por 1 hora e então lavada. A membrana foi cortada em torno de 30-40kDa e separada a parte inferior para adicionar a solução do anticorpo primário Anti-LC3 (Cell Signaling) – massa molecular aproximada da LC3 é de 17kDa – e a parte superior para adicionar a solução do anticorpo primário Anti-Tubulina (Cayman) – massa molecular da tubulina é de aproximadamente 50kDa – que foram incubados *overnight* à 4°C. Dado o tempo de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T e então ocorreu a incubação com os anticorpos secundários Anti-Rabbit de LC3 e Tubulina durante 1 hora e então a membrana foi levada para ser revelada por fotodocumentação com reagentes enzimáticos.

### **3.7 Análise do ciclo celular e morte celular programada por citometria de fluxo**

Para buscar entender o mecanismo de inibição de crescimento das células provocado pela manose, a progressão do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo. Também foram feitas análises para detectar morte celular programada que poderia ser ocasionada pelo efeito da manose. Essas análises foram feitas usando a marcação das células com o Iodeto de Propídeo (PI), um agente fluorescente que possui propriedade de se intercalar no DNA e emitir fluorescência em cor vermelha (617nm), portanto, possível de quantificar o material genético celular (RICCARDI, 2006). Apesar de também se ligar em RNA e ser impermeável à membrana celular, o protocolo inclui RNAases para degradação dos RNAs e de um detergente para permeabilização de membranas.

As células das duas linhagens foram plaqueadas (A375 -  $3 \times 10^4$  células por poço; WM1366 –  $4 \times 10^4$  células por poço) com meio de cultura DMEM *high glucose* (25mM de glicose) e cultivadas em placas p12. Após 24h do plaqueamento, as culturas foram suplementadas com os meios de culturas respectivos dos grupos 1, 2, 3 e 4 e durante 3 dias, a cada 24 horas, três poços de cada grupo (triplicata) eram retirados para o tratamento de marcação e então análise no citômetro de fluxo (12 amostras linhagem A375 e 12 amostras linhagem WM1366).

As células foram lavadas com PBS, em seguida foram soltas da placa utilizando tripsina,



e a solução foi centrifugada por 2 minutos à 2000rpm, na sequência as células foram ressuspensas e fixadas em 500mL de EtOH 70% durante 3 dias. Para realizar o ensaio, as amostras tiveram o EtOH retirado e foram lavadas com PBS, centrifugadas por 2 minutos à 2000rpm e as células ressuspensas na solução de marcação de iodeto de propídeo (PBS com 100mg/mL de RNAase A e 50mg/L de iodeto de propídeo) que foi deixada em incubação por 30 minutos na ausência de luz, após incubação, a amostra foi centrifuga na mesma configuração anterior e as células ressuspensas em HBSS para posteriormente serem analisadas no citômetro de fluxo (Attune NxT Flow Cytometer, EUA).

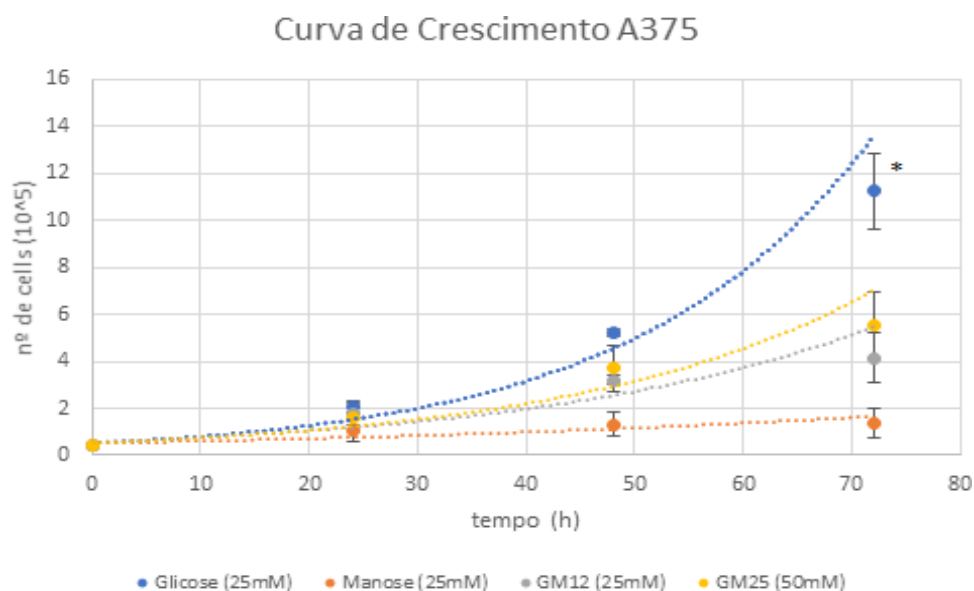
Todas as amostras foram analisadas no software Attune NxT, próprio do fabricante do equipamento. As análises feitas trouxeram informações sobre o ciclo celular (G0G1/G2M) e morte celular programada (%subG1) das células nas diferentes condições de cultivo.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Efeito da manose no crescimento celular

A quantidade de células contadas em 72h nos quatro grupos foram testadas por ANOVA (*Analysis Of Variance*, em inglês) seguida do Teste de *Tukey* (ambos em Anexo), para identificar se existia diferença significativa no crescimento celular e quais grupos apresentavam diferenças. Considerando nível de confiança de 95%, obteve-se o *p-value* < 0,05 no teste ANOVA, indicando que há diferença significativa em pelo menos um dos grupos testados. No Teste de *Tukey* foi possível avaliar a comparação em pares dos grupos, que levaram às discussões que seguem abaixo. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software Minitab versão 17.

Como o esperado por resultados observados na literatura (Gonzalez et al., 2018), a cultura que recebeu meio de cultura comum (ponto azul), apenas o meio DMEM suplementado com 25mM de glicose, foi o grupo que desempenhou crescimento mais acelerado do que os demais grupos (Figura 3).



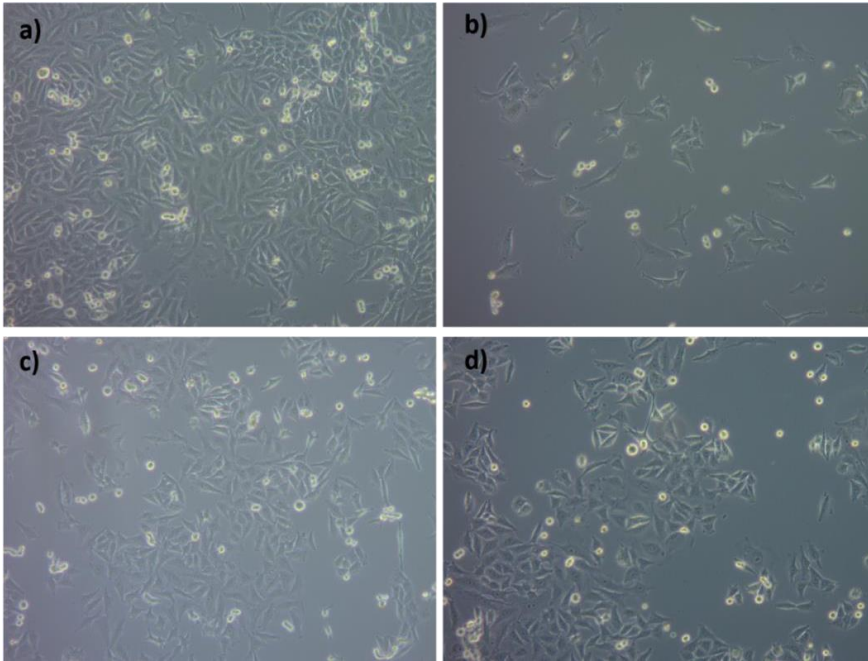
**Figura 3** - Curva de crescimento das células 375 em meio DMEM (10% SFB) contendo: (1) glicose 25mM; (2) manose 25mM; (3)GM12: glicose 12,5mM + manose 12,5mM e (4) GM25: glicose 25mM + manose 25mM.

As culturas que receberam manose na composição do meio de cultivo apresentaram desempenho no crescimento afetado (pontos cinza, amarelo e laranja). Dentre elas, podemos notar algumas diferenças, aquelas células que receberam estritamente manose como monossacarídeo, foram as que tiveram um crescimento mais lento, não chegando ao ponto de dobrar o número de células no período de 72h de cultivo (Figura 3).

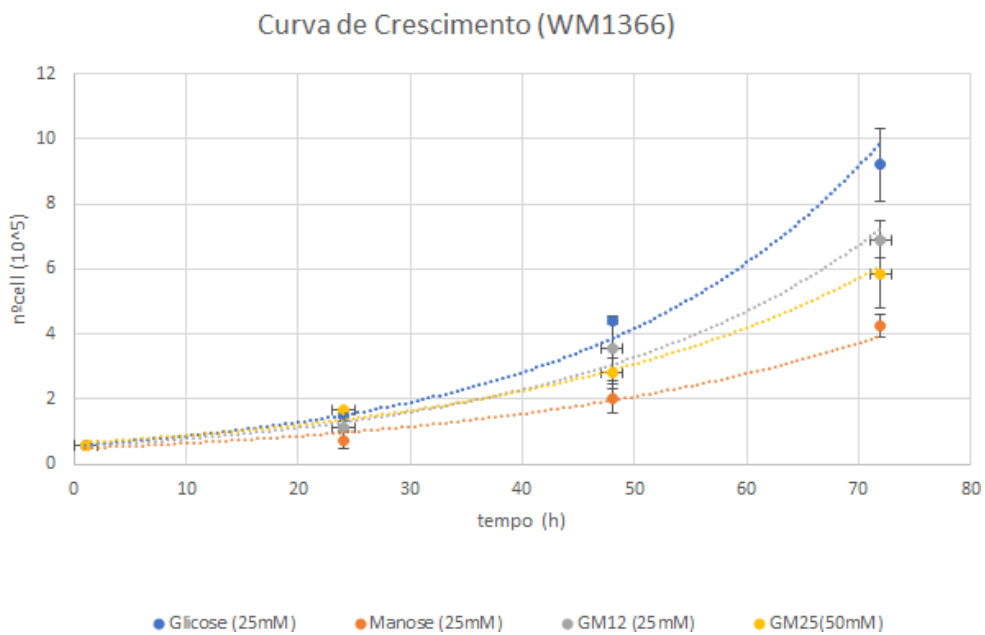
A possível hipótese que poderia explicar o efeito de retardo no crescimento celular provocado pela manose, seria a baixa atividade da enzima PMI nesta linhagem celular, que impossibilitaria as moléculas de manose que são absorvidas de serem convertidas em frutose-6-fosfato e seguir na via glicolítica gerando energia para o crescimento (Figura 1). Além disso, a manose pode interferir na captação de glicose por serem absorvidas pelos mesmos transportadores de membrana não específicos da família GLUT (MUECKLER, 2009,2013) e acumular no ambiente intracelular, causando a inibição alostérica de enzimas de vias metabólicas como a hexoquinases e glicose-6-fosfato (DeRossi et al. 2006).

As culturas que receberam misto de manose e glicose (grupos 3 e 4), mesmo em concentrações diferentes, não apresentaram diferença estatística significativa com base no Teste de *Tukey*. Esse resultado mostrou que, para a A375, nessas concentrações, a manose não apresentou um efeito cumulativo de retardamento no crescimento celular.

Também foi possível avaliar que a administração de 50mM de monossacarídeos (grupo 4) por um período de 72h, não causou citotoxicidade superior para as células em relação à administração de 25mM de ambos os carboidratos (grupo 3), hipótese que foi levantada baseada em resultados na literatura que mostram a indução de morte por exposição crônica de alto nível de glicose em diversos tecidos celulares. (SANTIAGO et al., 2007; PEIRÓ et.al., 2001; LUPI et al., 2002; ALLEN et al., 2005).



**Figura 4** – Imagens realizadas em microscópio óptico com aumento de 10x. As imagens das culturas foram feitas após 72h de cultivo e podemos ver a confluência celular em cada uma das condições. Linhagem celular A375 após 72 horas de tratamento. As células foram cultivadas em meio DMEM (10% SFB) contendo: a) glicose (25mM); (b) manose (25mM); (c) glicose (12,5mM) + manose (12,5mM) e (d) glicose (25mM) + manose (25mM). Observa-se maior crescimento na condição a) que foi tratada com glicose (controle) e menor crescimento na condição b) que foi tratada estritamente com manose durante as 72 horas.

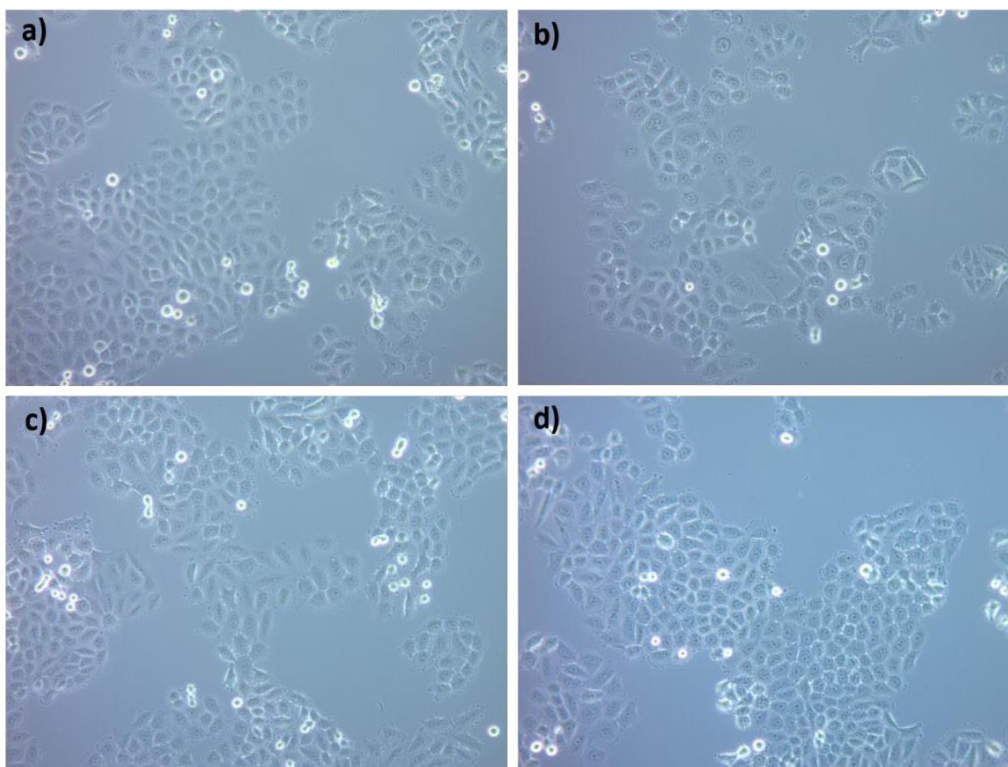


**Figura 5** - Curva de crescimento das células WM1366 em meio DMEM (10% SFB) contendo: (1) glicose 25mM; (2) manose 25mM; (3)GM12: glicose 12,5mM + manose 12,5mM e (4) GM25: glicose 25mM + manose 25mM.

Os tratamentos estatísticos aplicados para os dados das células A375 foram realizados também para os dados da linhagem WM1366. As discussões que se seguem são baseadas nos resultados do Teste ANOVA e Teste de *Tukey* (ambos em Anexo). O Teste ANOVA obteve *p-value* < 0,05 indicando a presença de ao menos um grupo significativamente diferente dos demais.

A curva de crescimento da linhagem WM1366 (Figura 5) apresentou padrões de crescimento semelhantes à curva da linhagem A375. Como o esperado, o grupo 1 (ponto azul) que recebeu o meio de cultura DMEM com 25mM de glicose foi o que desempenhou melhor crescimento dentre os quatro grupos com base na média, entretanto, diferentemente da linhagem A375, não apresentou crescimento significativamente diferente do grupo 3 (12,5mM de glicose + 12,5mM de manose) com base no Teste de *Tukey*. As culturas que receberam manose, também tiveram comportamento de crescimento mais lento, dentre elas o grupo 4 (ponto laranja), que recebeu estritamente manose foi o que desempenhou menor crescimento, com base na média, apesar de não ser significativamente diferente do grupo 3 (25mM de glicose + 25mM de manose), o que indica que a molaridade de manose utilizada nos dois grupos não foram significantes para o crescimento no período observado.

Nesta linhagem celular, também foi possível observar que a administração de 50mM (grupo 4) por 72h não foi citotóxica para as células.



**Figura 6** - Imagens realizadas em microscópio óptico com aumento de 10x. As imagens das culturas foram feitas após 72h de cultivo e podemos ver a confluência celular em cada uma das condições. Linhagem celular WM1366 após 72 horas de tratamento. As células foram cultivadas em meio DMEM (10% SFB) contendo: a) glicose (25mM); b) manose (25mM); c) glicose (12,5mM) + manose (12,5mM) e d) glicose (25mM) + manose (25mM).

Conforme discutido acima, o perfil observado na curva de crescimento das duas linhagens foi semelhante. Entretanto, o efeito de retardo no crescimento celular foi mais brando na linhagem WM1366, o que também pode ser observado pelos resultados do coeficiente de Fisher e da composição da soma dos quadrados (SQ) apresentados no teste ANOVA, o tratamento com manose explica 72% dos fatores envolvidos no crescimento celular da linhagem A375, enquanto o tratamento explica 52% dos fatores na linhagem pareada (dados em Anexo). Observa-se que os grupos que receberam manose (grupos 2 a 4) da linhagem WM1366 apresentaram um desempenho bem superior quando comparado à linhagem A375. Por exemplo, na linhagem WM1366, o grupo que recebeu exclusivamente manose (grupos 2) multiplicou o número de células em aproximadamente 7 vezes do plaqueamento até o final do ensaio, enquanto na linhagem A375, o número de células nas 72h foi de apenas 3x do plaqueamento. Os outros

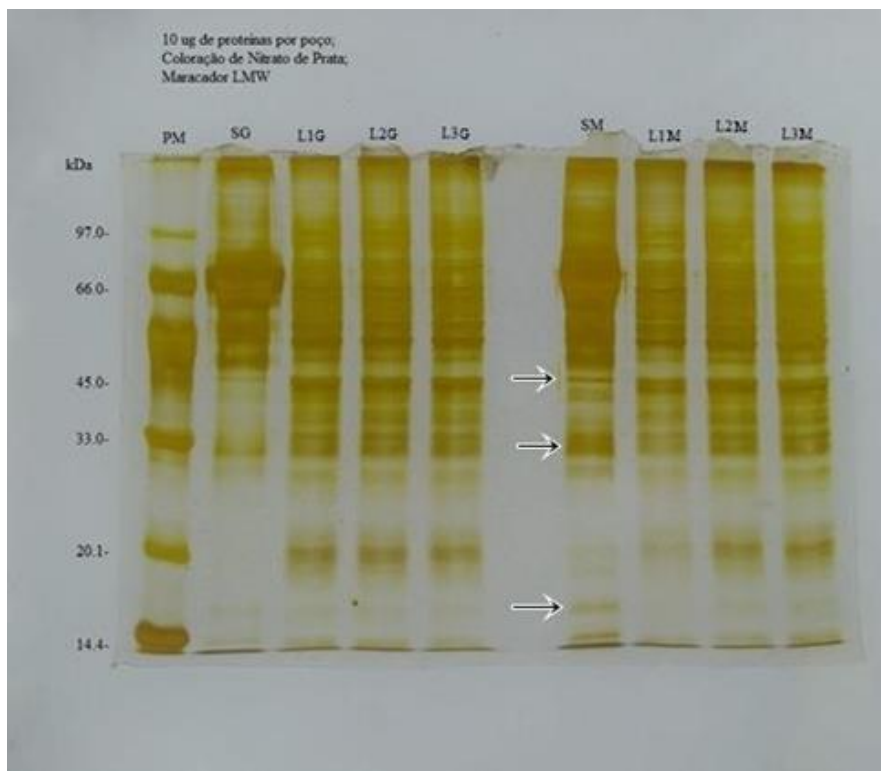
grupos mostram fatores de multiplicação semelhantes. Uma possível explicação para este resultado seria a taxa de crescimento superior da A375 sobre a WM1366, com base nos dados coletados na curva de crescimento, o tempo de duplicação em condições normais (DMEM 25mM de glicose, 10%SFB), o *doubling-time* da A375 é de 14,96h, enquanto o da WM1366 é de 18,28h. Isso evidencia uma necessidade de mais fontes de carboidrato para suprir a sua necessidade energética. Essa avidéz superior por energia é o que resulta um efeito adverso mais acentuado quando está privada de fontes de carboidrato, e que pode estar relacionado às mutações específicas de cada linhagem de melanoma, e também principalmente aos níveis de expressão de PMI em cada linhagem celular. A célula A375 é um melanoma que possui mutação no gene codificante para a enzima treonina-quinase BRAF (gene *BRAF*), resultando em uma inversão anormal no sítio catalítico que gera uma conformação ativa constitutivamente, mantendo a via MPAK/ERK ativa em uma razão de 500 vezes maior do que da BRAF normal (WAN et al, 2004, RICHTIG et al, 2017), o que a torna uma linhagem mais agressiva do que a célula de WM1366, que por sua vez, não apresenta tal mutação no gene *BRAF* e é um melanoma com mutação no gene *NRAS* que leva à prolongação anormal das vias MAPK e PI3K (CURTIN et al, 2005; HODIS et al, 2012; FEDORENKO, 2013).

O efeito de retardo no crescimento celular das linhagens tumorais A375 e WM1366, desperta o interesse do uso da manose complementada à outras metodologias de combate, para auxiliar na diminuição da expansão do tumor, como descrito anteriormente em outros linhagens e tecidos em González et.al (2018).

#### **4.2 Lisados e Secretomas(indicar que foi so pra a375)**

A média do teor proteico obtida para os lisados das células que receberam glicose e das que receberam manose no meio de cultura foram bastante similares. Houve uma diferença notável nos secretomas, apenas. Os secretomas coletados e concentrados (apenas das condições 25mM glicose – grupo 1 e 25mM manose – grupo 2) apresentaram teor proteico de 3,96  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 3,19  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  respectivamente. Os lisados coletados das mesmas células, apresentaram média de concentração de 2,83 ( $\pm 0,36$ ) e 2,84 ( $\pm 0,59$ ), respectivamente.

Para os lisados coletados, o teor proteico verificado foi, grupo 1:  $1,54(\pm 0,01)$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; grupo 2:  $1,48 (\pm 0,03)$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e grupo 3 :  $1,93 (\pm 0,12)$   $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .



**Figura 7** – Perfil proteico dos lisados e secretomas celular da linhagem A375 tratada com grupo 1 (glicose 25mM) e grupo 2 (manose 25mM). As células foram expostas à manose durante 24 horas. As siglas correspondem à PM: padrão de massa molecular; SG: secretoma glicose, L1G, L2G e L3G correspondem aos lisados de cada frasco de cultura das células que receberam glicose; SG: secretoma manose e L1M, L2M e L2M são os lisados dos frascos em que as células foram tratadas com manose. SDS-PAGE com 12% de poliácridamida. Em cada poço foi aplicado 10 $\mu\text{g}$  de proteínas. A coloração foi realizada com Nitrato de Prata.

A figura 7 é correspondente ao gel feito com o secretoma e lisado celular das duas condições (grupo 1 e grupo 2). Ao observar os perfis, notam-se bastante semelhanças sobretudo nos lisados celulares, que são qualitativamente e quantitativamente parecidos. Analisando comparativamente os perfis de secretoma, notam-se algumas alterações quantitativas e qualitativas nas região de 45kDa, 33 kDa e de 14,4 kDa. Apenas com a análise do gel não é possível concluir nenhuma diferença entre os grupos, entretanto, é um resultado que nos estimula a explorar mais a fundo as alterações que possivelmente são causadas pela adição da manose.



### 4.3 Proteínas glicosiladas nos secretomas celulares (indicar que foi so pra A375)

Os secretomas das condições 1 e 2 foram testados na resina de Concanavalina-A na intenção de localizar uma possível via de destino para a manose que essas células estão incorporando. Para estudar a quantidade de proteínas que estavam sendo glicosiladas e exportadas e o perfil dessas proteínas, foi feito a quantificação do material que não se ligou à resina (*Flowthrough*) e daqueles que se soltaram após a aplicação dos eluentes (M250 e M500).

**Tabela 2-** Quantificação das proteínas que interagiram com a resina. TOT se refere à quantificação do conteúdo total que foi coletado, FT se refere ao flowthrough, ou seja, a porção da amostra que passou sem interagir com a resina e M250 e M500 se referem às proteínas que interagiram com a coluna e saíram após aplicação dos tampões de eluição. Células tratadas 24 horas com glicose antes da coleta do material.

<b>Glicose (25mM)</b>	<b>TOT</b>	<b>FT</b>	<b>M250</b>	<b>M500</b>
<b>ug/uL</b>	0,418	0,132	0,130	0,157
<b>% do conteúdo total</b>	100%	31%	31%	37%

**Tabela 3-** Quantificação das proteínas que interagiram com a resina. TOT se refere à quantificação do conteúdo total que foi coletado, FT se refere ao flowthrough, ou seja, a porção da amostra que passou sem interagir com a resina e M250 e M500 se referem às proteínas que interagiram com a coluna e saíram após aplicação dos tampões de eluição. Células tratadas 24 horas com manose antes da coleta do material

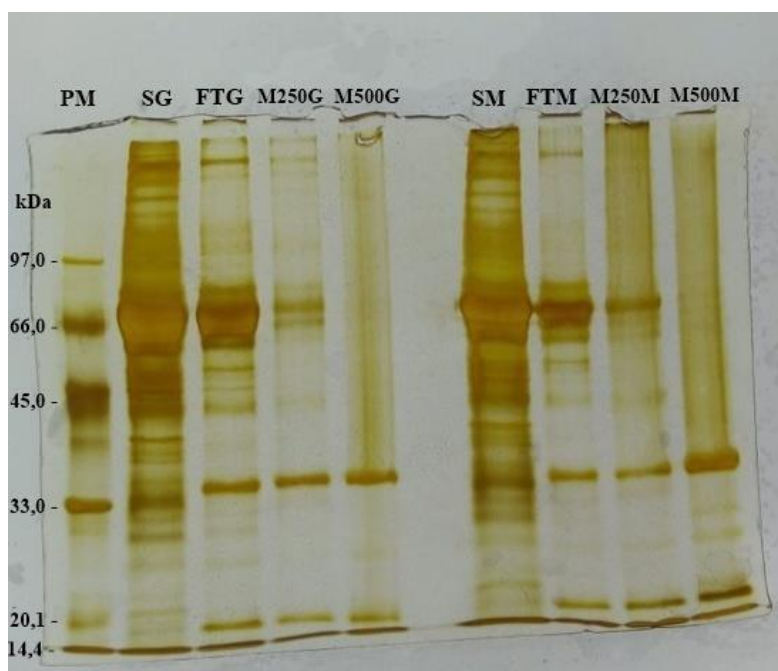
<b>Manose (25mM)</b>	<b>TOT</b>	<b>FT</b>	<b>M250</b>	<b>M500</b>
<b>ug/uL</b>	0,531	0,267	0,123	0,142
<b>% do conteúdo total</b>	100%	50%	23%	27%

A partir da quantificação dos materiais (Tabela 1 e 2), foi possível identificar que no secretoma das células que foram tratadas com glicose, a porção que não se ligou à resina, portanto, não possuía proteínas glicosiladas, representou 32% do total. Os outros 31% foram proteínas que tinham certa interação com a resina de concanavalina-A e deste modo, foram eluídas quando uma solução de manose 250mM foi passada na coluna e os outros 37% foram proteínas que apresentaram maior afinidade pela coluna. Enquanto nas células tratadas com

manose, a porção que não se ligou à coluna foi de 50%, e os outros 23% e 27% foram os que tiveram interação com a coluna e saíram após aplicação dos eluentes de 250mM e 500mM de manose, respectivamente.

Os resultados indicam que, aparentemente, as células tumorais que recebem o tratamento de manose parecem não estar direcionando o excedente deste açúcar para a glicosilação de proteínas que serão secretadas, inclusive a proporção de células glicosiladas encontradas no secretoma dessas células são inferiores à encontrada no grupo controle que continuou recebendo glicose. Entretanto, ainda não foi descartada a possibilidade de aumento na produção de glicosilações, mas a nossa pergunta agora é para onde essas proteínas glicosiladas estão sendo direcionadas. Uma outra hipótese é que essas proteínas podem estar sendo direcionadas para a membrana celular e não secretadas como foi analisado. Esta hipótese será testada posteriormente em outro trabalho analisando as proteínas de membrana celular. Outro possível olhar para o resultado, é que o grupo tratado com manose tem menor proporção de proteínas glicosiladas pois esse pode ser mais um dos efeitos observados da administração de manose nas células.

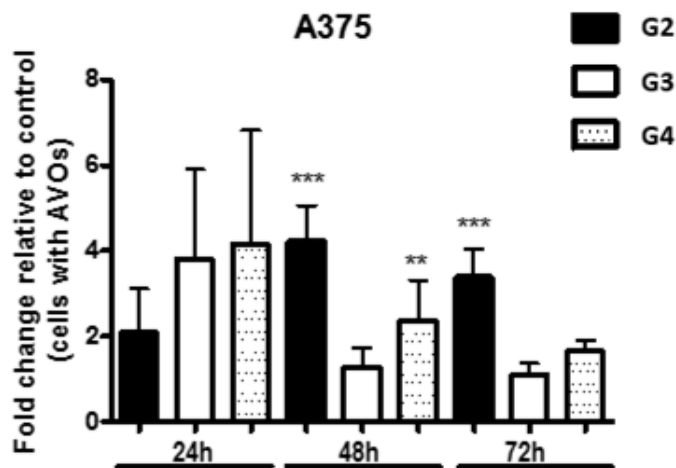
Ao observar o perfil proteico presente na figura 8, aparentemente em ambas as condições, o perfil das proteínas glicosiladas (*lanes* 4,5 e 9,10) do secretoma se apresentam de forma muito semelhantes, com apenas poucas alterações na faixa de 66 kDa. Entretanto, o SDS-PAGE é uma técnica exploratória que pouco indica quais são as diferenças observadas em sua composição, requerindo ensaios mais elaborados para entender quais são as proteínas que foram quantificadas da resina e apresentadas no gel de forma diferenciada.



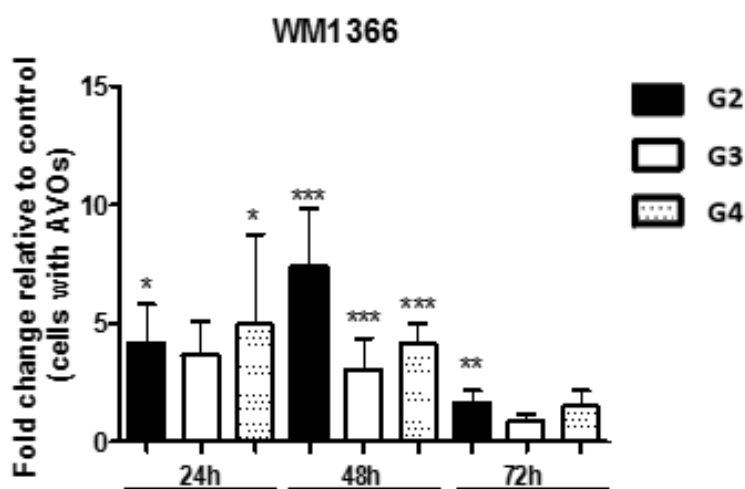
**Figura 8** - Perfil proteico dos secretomas celulares das células tratadas com manose e glicose e as suas porções que ligaram se ligaram na resina de Concanavalina-a (ConA) e foram eluídas respectivamente com os eluentes de 250mM de manose e 500mM de manose. PM é o padrão de peso molecular, SG é o secretoma das células tratadas com glicose, FTG é o flowtrough, ou seja, o que passou desse secretoma sem se ligar à coluna e M250G e M500G são as proteínas que foram eluídas ao passar essas duas soluções eluentes. O SM é o secretoma das células tratadas com manose, FTM é o flowtrough, M250M e M500M são as proteínas que eluíram. SDS-PAGE com 12% de poliacrilamida. Foram aplicados 10ug de proteínas por poço. A coloração foi realizada com Nitrato de Prata.

#### 4.4 Efeito da manose na formação de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's)

O efeito da manose na formação de AVO's foi analisado pela quantificação dos compartimentos ácidos nas células, utilizando a marcação por laranja de acridina e posterior análise em citometria de fluxo. Os resultados estão dispostos nas figuras abaixo.



**Figura 9** - Quantidade de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's) produzidas nas células de A375 nos tempos de 24h, 48h e 72h. Os resultados estão normalizados pelo controle (grupo 1). (G2 = manose 25mM; G3 = glicose 12,5 mM + Manose 12,5 mM; G4 = glicose 25 mM + Manose 25 mM).



**Figura 10** - Quantidade de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's) produzidas nas células de WM1366 nos tempos de 24h, 48h e 72h. Os resultados estão normalizados pelo controle (grupo 1). (G2 = manose 25mM; G3 = glicose 12,5 mM + Manose 12,5 mM; G4 = glicose 25 mM + Manose 25 mM).

Nas figuras 9 e 10, podemos observar a produção de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's) que foram obtidas a partir de citometria de fluxo das linhagens A375 e WM1366, respectivamente. Os valores são dos grupos 2, 3 e 4 normalizados pelo grupo 1, que é o grupo

grupo controle, onde as células são cultivadas apenas com DMEM *high glucose* (25mM de glicose), para cada tempo experimental.

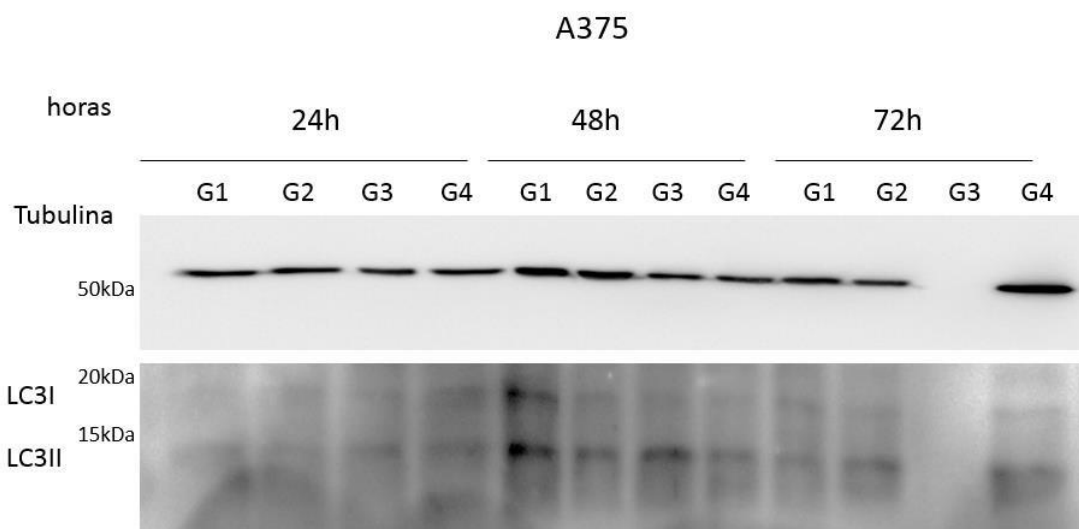
A linhagem A375 apresenta um incremento na formação de AVO's a partir das 48h para o grupo tratado estritamente com manose (grupo 1). Os demais grupos, apresentam uma produção acentuada nas primeiras 24 horas, entretanto, os valores diminuem nos próximos pontos, indicando que apesar de conter manose no cultivo celular, a presença conjunta da glicose causa um abrandamento na produção de vesículas ácidas. De qualquer maneira, todos os grupos que contém manose na composição do meio de cultivo apresentaram produção elevada quando comparada ao controle, podendo dizer que a administração de manose leva à maior produção de AVO's, que pode estar relacionada com o maior *turnover* de proteínas, que pode ser ocasionado pelo processo autofágico.

Na linhagem WM1366, observa-se um pico de produção de AVO's em 48h para o grupo tratado estritamente com manose (grupo 2), assim como ocorre na linhagem A375. Entretanto, no tempo de 72h, é possível observar uma queda no número de compartimentos ácidos em todos os grupos.

Aparentemente, os resultados de ambas linhagens, indicam que em torno de 48h ocorre o primeiro pico de produção de vesículas ácidas. Na linhagem A375, observou-se que a quantidade de AVO's se manteve elevada também no ponto de 72h, enquanto na linhagem WM1366 a quantidade diminui abruptamente. Com isso, considerando que de fato está ocorrendo o processo de autofagia para obtenção de nutrientes, podemos sugerir que na linhagem A375, por ser uma célula que se divide em menor tempo, observamos que as células continuam em constante degradação autofágica para captar nutrientes que são altamente demandados. Já na linhagem WM1366, podemos interpretar que as células realizam o processo autofágico em 48h, e se utilizam desses nutrientes de forma mais cadenciada de forma que em 72h não é necessário um novo pico de degradação para manter a atividades celulares. Para a confirmação desta hipótese, seria necessária a observação em outros pontos como, por exemplo, 6h, 12, 96h e 120h.

#### 4.5 Western Blotting proteína LC3-II

Apesar dos resultados do ensaio de formação de AVO's indicarem a tendência das células tratadas com manose estarem em processo de autofagia, o fato de ter a produção de vacúolos ácidos no interior das células, não significa necessariamente que são autofagossomos, portanto, foi realizada uma contraprova do resultado, através da identificação da proteína LC3-II no lisado celular, por meio de um ensaio de *western blotting*.



**Figura 11** - Proteína LC3II precipitada usando anticorpo Anti-LC3II. Glc – Grupo 1 (25mM de glicose); Grupo 2 (25mM de manose); Grupo 3 (12,5mM de glicose + 12,5mM de manose); Grupo 4 (25mM de glicose + 25mM de manose).

Como é possível visualizar na Figura 11, é apresentada a fotodocumentação da membrana das proteínas da linhagem A375 após a imunocoloração. Foram testados todos os grupos em todas as condições de tempo da linhagem A375. Observa-se a presença do padrão utilizado, tubulina bem identificada para todos os grupos, exceto no G3 em 72h. Para a proteína LC3, foram identificadas poucas diferenças aparentemente significativas nos lisados celulares, indicando a primeiro momento que não existiria atividade autofágica elevada nos grupos testados com manose, sendo possivelmente o tempo de 48h o que possui maior atividade dentre os grupos observados. Uma possível explicação para o resultado não ter apresentado a identificação esperada das proteínas no gel, seria a baixa eficiência do anticorpo Anti-LC3-II utilizado no ensaio, que foi incapaz de revelar com precisão a quantidade de proteínas

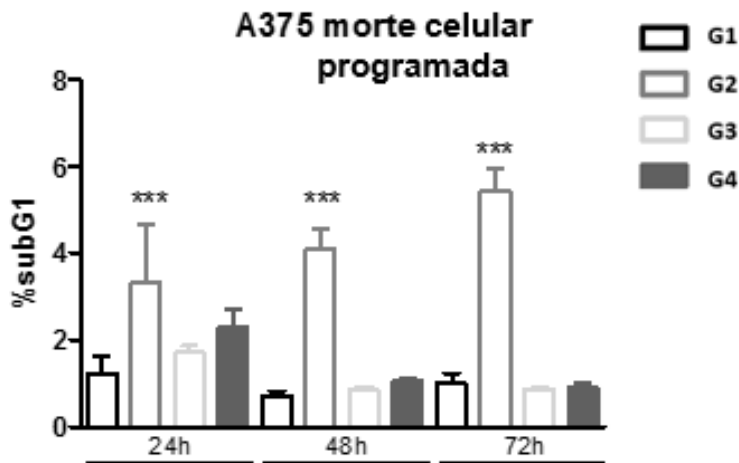
presentes na membrana.

Além disso, é possível observar que o grupo 3 na condição 72h não apresenta revelação de ambas as proteínas (tubulina e LC3-II) o que possivelmente pode indicar uma falha na composição do poço do gel que impossibilitou a corrida das proteínas ou até mesmo uma falha no manuseio da amostra que deixou o poço vazio no momento da corrida eletroforética.

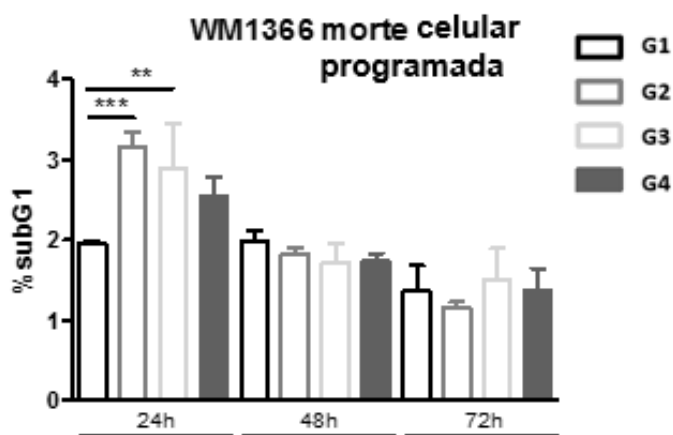
Com isso, podemos dizer que o resultado foi inconclusivo para precisar se está ocorrendo de fato o processo de autofagia. A repetição do ensaio, juntamente com o ensaio da linhagem WM1366 foi programado para ocorrer no decorrer do mês de março, entretanto, com o início da quarentena por conta da crise de Sars-Cov-2 (Coronavírus) as atividades no Laboratório do Centro de Investigação Translacional em Oncologia – ICESP foram suspensas, impossibilitando a repetição dos testes.

#### **4.6 Efeito da manose no ciclo celular e morte celular programada**

As análises do ciclo e morte celular programada foram baseadas na quantificação de DNA no interior das células, utilizando a marcação por iodeto de propídeo (PI) e citometria de fluxo. Assim, os eventos detectados podem ser classificados nas fases do ciclo celular de acordo com a intensidade de fluorescência. Células com o dobro de DNA da fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> estão na fase G<sub>2</sub>. Células que tiveram morte celular programada, tem menos intensidade de fluorescência visto que o DNA está fragmentado (SubG<sub>1</sub>).



**Figura 12** – Porcentagem de células hipodiplóides que se encontram na fase SubG1, ou seja, em processo de morte celular programada para todos os grupos da linhagem A375. (G1 = glicose 25mM; G2 = manose 25mM; G3 = glicose 12,5 mM + Manose 12,5 mM; G4 = glicose 25 mM + Manose 25 mM).



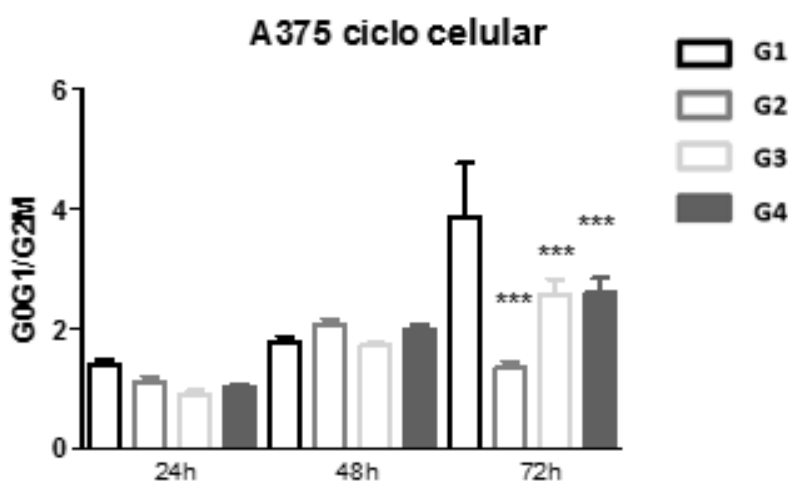
**Figura 13** - Porcentagem de células hipodiplóides que se encontram na fase SubG1, ou seja, em processo de morte celular programada para todos os grupos da linhagem WM1366. (G1 = glicose 25mM; G2 = manose 25mM; G3 = glicose 12,5 mM + Manose 12,5 mM; G4 = glicose 25 mM + Manose 25 mM).

Nos ensaios de morte celular programada (Figuras 12 e 13), podemos identificar que a linhagem A375 apresenta elevado número de células hipodiplóides no grupo que foi tratado apenas com manose no cultivo (grupo 2). Os demais grupos que receberam administração de manose (grupos 3 e 4) apresentam valores minimamente elevados nas primeiras 24h e depois ocorre normalização junto ao grupo controle nos demais pontos.

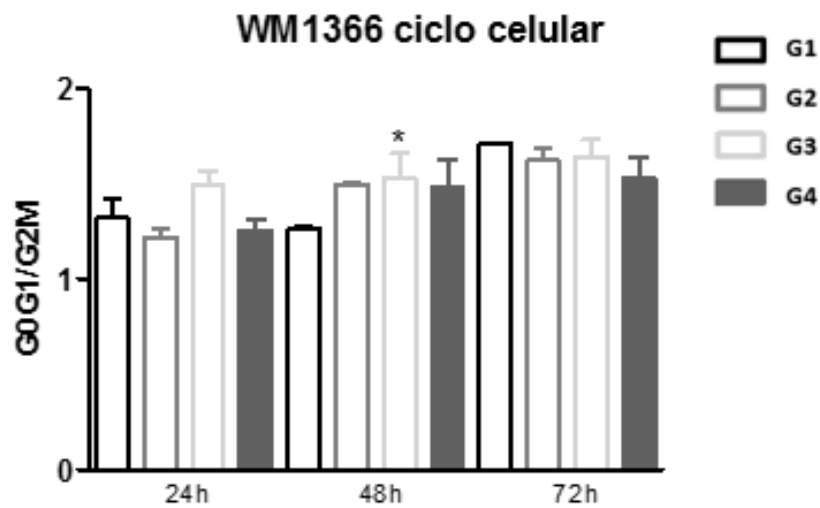


Na linhagem WM1366, a quantidade de células que sofreram morte celular programada é levemente elevada nas primeiras 24h e nos pontos subsequentes a quantidade de células em morte vai decrescendo. O fenômeno é observado em todos os grupos, inclusive o grupo 2 que recebe estritamente manose.

Esses resultados corroboram para a observação de que a linhagem A375 é mais sensível à manose e dependente da presença da glicose, o que é coincidente com a característica de um crescimento mais acelerado, como observado anteriormente e com a possibilidade de possuir menor expressão da enzima PMI. Os resultados também nos trazem a reflexão de que o tratamento das células com meio de cultura misto (glicose + manose) podem prevenir as células de processos de morte celular programada nas linhagens celulares.



**Figura 14** – Análise do ciclo celular, as populações celulares foram identificadas conforme a posição do ciclo celular que se encontravam e dispostas na proporção G0G1/G2M. Quanto maior a proporção, maior a quantidade de células nas fases iniciais do ciclo celular. Análise feita para todos grupos e tempos da linhagem A375. (G1 = glicose 25mM; G2 = manose 25mM; G3 = glicose 12,5 mM + Manose 12,5 mM; G4 = glicose 25 mM + Manose 25 mM).



**Figura 15** - Análise do ciclo celular, as populações celulares foram identificadas conforme a posição do ciclo celular que se encontravam e dispostas na proporção G0G1/G2M. Quanto maior a proporção, maior a quantidade de células nas fases iniciais do ciclo celular. Análise feita para todos grupos e tempos da linhagem A375. (G1 = glicose 25mM; G2 = manose 25mM; G3 = glicose 12,5 mM + Manose 12,5 mM; G4 = glicose 25 mM + Manose 25 mM).

Nos ensaios de ciclo celular (Figuras 14 e 15), em ambas as células, observa-se que a proporção de células G0G1/G2M mantém-se quase inalterada, em exceção no grupo 2 da linhagem A375, no tempo de 72h. Nesta população, podemos ver uma proporção de células G0G1/G2M estatisticamente menor que os demais grupos do mesmo ponto, mostrando que nesse grupo há mais células nas fases G2M, o que pode sugerir uma parada do ciclo celular em uma destas fases. Para comprovação desta informação, deveria ser analisado a proporção das populações por períodos superiores à 72h, que não foram investigados no ensaio. Também é possível notar que o grupo controle da célula A375 sofre uma grande alteração no ciclo, apresentando maior proporção de células G0G1, o que possivelmente representa a linhagem celular na fase estacionária do ciclo celular, que pode ser explicada pela alta densidade celular que a cultura atingiu nas 72h e com isso, ocorre uma queda natural na duplicação dessas células.

De qualquer forma, em maneira geral, os resultados sugerem que a administração de manose não têm a capacidade significativa de causar uma parada do ciclo celular em exceção dos grupos anteriormente citados.

## 5. Conclusão

Durante o presente trabalho foi possível concluir que:

- A manose apresentou efeito de redução do crescimento celular em ambas as linhagens celulares de melanoma humano;
- O melanoma com mutação do gene *BRAF* (linhagem A375) apresenta um fenótipo de crescimento mais acelerado
- O melanoma com mutação no gene *NRAS* (linhagem WM1366) é mais afetado pelo acréscimo da manose, muito provavelmente pelo fenótipo de crescimento e pela possível expressão de maior nível de PMI do que a linhagem A375.
- As células de A375 tratadas com manose apresentam perfis proteicos semelhantes apesar da diferença fenotípica no crescimento celular;
- A análise de proteínas glicosiladas sugere que não ocorre acréscimo no endereçamento da manose para a via de glicosilação de proteínas;
- A produção de Organelas Vesiculares Ácidas (AVO's) foi elevada nos grupos que receberam exclusivamente manose no meio de cultura, o que indica que pode estar ocorrendo processo autofágico nestas células.
- A análise do ciclo celular sugere que, em exceto por um grupo da linhagem A375, a manose aparentemente não possui efeitos de parada do ciclo celular.
- A análise de células hipodiplóides (Sub G1) da linhagem A375 indica que o grupo que foi tratado exclusivamente com manose é mais suscetível à morte celular programada.

Para um melhor entendimento dos efeitos da manose observados neste trabalho, almeja-se o estudo futuro da expressão da enzima fosfomanose isomerase (PMI) em ambas as linhagens celulares, o que irá complementar nos conhecimentos gerados e discussões que aqui foram levantadas.

## 6. Referências Bibliográficas

Allen, D. A., Yaqoob, M. M., & Harwood, S. M. **Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications.** The Journal of Nutritional Biochemistry, 16(12), 705–713, 2005.

American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2019.** Atlanta: American Cancer Society; 2019.

Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B et al. **Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial.** Lancet Oncol;17:1248–1260, 2016.

Bensaad, Karim, Atsushi Tsuruta, Mary A. Selak, M. Nieves Calvo Vidal, Katsunori Nakano, Ramon Bartrons, Eyal Gottlieb, and Karen H. Vousden. 2006. **TIGAR, a P53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis.** Cell 126(1):107–20, 2006.

Berger, Thorsten, Mary E. Saunders, and Tak W. Mak. **Beyond the Oncogene Revolution: Four New Ways to Combat Cancer.** Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 81:85–92, 2016.

Bradford, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, 72(1–2), 248–254, 1976.

Bush, W. D., & Simon, J. D.. **Quantification of Ca<sup>2+</sup>-binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis.** Pigment Cell Research, 20(2), 134–139, 2007.

Cairns, Rob A., Isaac S. Harris, and Tak W. Mak. **Regulation of Cancer Cell Metabolism.** Nature Reviews Cancer 11(2):85–95, 2011.

Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Massari, F., MacLennan, G. T., & Montironi, R. **Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine.** Modern Pathology, 31(1), 24–38, 2017.

Colombino M, Capone M, Lissia A et al. **BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma.** J Clin Oncol;30:2522–2529, 2013.

- Costin, G.-E., & Hearing, V. J. **Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress.** The FASEB Journal, 21(4), 976–994, 2007.
- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T et al. **Distinct sets of genetic alterations in melanoma.** N Engl J Med ;353:2135–2147, 2005.
- Dang, Chi V, Anne Le, and Ping Gao. 2009. **MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities.** Clinical Cancer Research 15(21):6479–83, 2009.
- Dang, Chi V., Jung-whan Kim, Ping Gao, and Jason Yustein. **The Interplay between MYC and HIF in Cancer.** Nature Reviews Cancer 8(1):51–56, 2008.
- DeBerardinis, Ralph J., Julian J. Lum, Georgia Hatzivassiliou, and Craig B. Thompson. **The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation.** Cell Metabolism 7(1):11–20, 2008.
- Deretic, V.,. **Autophagy as an immune defense mechanism.** Current opinion in immunology, 18(4), pp.375–82, 2006.
- DeRossi, C., Bode, L., Eklund, E. A., Zhang, F., Davis, J. A., Westphal, V., Wang, L., Borowsky, A. D., & Freeze, H. H. **Ablation of Mouse Phosphomannose Isomerase (Mpi) Causes Mannose 6-Phosphate Accumulation, Toxicity, and Embryonic Lethality.** Journal of Biological Chemistry, 281(9), 5916–5927, 2006.
- Dikic, I., & Elazar, Z. **Mechanism and medical implications of mammalian autophagy.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 19(6), 349–364., 2018.
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., & Populo, H. **Melanoma treatment in review.** ImmunoTargets and Therapy, Volume 7, 35–49, 2018.
- Elwood JM, Jopson J. **Melanoma and sun exposure: An overview of published studies.** Int J Cancer;73:198–203, 1997.
- Fedorenko IV, Gibney GT and Smalley KS: **NRAS mutant melanoma: Biological behavior and future strategies for therapeutic management.** Oncogene. 32:3009–3018, 2013
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** Int J Cancer.,136(5):E359–E386, 2015.

Gilchrest, B. A., Eller, M. S., Geller, A. C., & Yaar, M. **The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation**. *New England Journal of Medicine*, 340(17), 1341–1348, 1999.

Gonzalez, P.S., O'Prey, J., Cardaci, S. *et al.* **Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy**. *Nature* **563**, 719–723, 2018.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. **Melanoma biology and new targeted therapy**. *Nature*, 445(7130), 851–857, 2007.

Hanahan, Douglas and Robert A. Weinberg. **Hallmarks of Cancer: The next Generation**. *Cell* 144(5):646–74, 2011.

Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N *et al.* **Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes**. *Nature* ;545:175–180, 2017.

He, L., Zhang, J., Zhao, J., Ma, N., Kim, S. W., Qiao, S., & Ma, X. **Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress**. *Advances in Nutrition*, 9(4), 493–504, 2018.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, *et al.*: **A landscape of driver mutations in melanoma**. *Cell*. 150:251–263. 2012.

Hou, B., Wang, G., Gao, Q. *et al.* **SQSTM1/p62 loss reverses the inhibitory effect of sunitinib on autophagy independent of AMPK signaling**. *Sci Rep* **9**, 11087 , 2019.

Hugdahl E, Kalvenes MB, Puntervoll HE *et al.* **BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival**. *Br J Cancer*; 114:801–808, 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PNADC Distribuição da população, por cor ou raça 2012-2016**. Diretoria de Pesquisas. 2016.

brahim, N., & Haluska, F. G. **Molecular Pathogenesis of Cutaneous Melanocytic Neoplasms**. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 551–579, 2009.

Ihle MA, Fassunke J, König K *et al.* **Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations**. *BMC Cancer* ;14:13, 2014.

Ismail, R. S., R. L. Baldwin, J. Fang, D. Browning, B. Y. Karlan, J. C. Gasson, and D. D. Chang. **Differential Gene Expression between Normal and Tumor-Derived Ovarian Epithelial Cells.** Cancer Research 60(23):6744–49, 2000.

Instituto Nacional do Câncer - **INCA. Estatísticas do câncer.** 2019 [Acessado em 15/09/2020].  
**Disponível em:** <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva - **INCA. ESTIMATIVA 2020 Incidência de Câncer no Brasil;** 2020.

Isola, A., Eddy, K., & Chen, S. **Biology, Therapy and Implications of Tumor Exosomes in the Progression of Melanoma.** Cancers, 8(12), 110, 2016.

JAMES, W. et al. **Andrew's Diseases of the Skin, International Edition: Clinical Dermatology. [S.I.]:** Elsevier Health Sciences, 2015.

Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, Curry JL, Joseph RW, Alvarado GC, Rohlfs ML, Richard J, Gershenwald JE, Kim KB, Lazar AJ, Hwu P, Davies MA. **NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma.** Cancer. 15;118(16):4014-23, 2012.

Kang, R., H. J. Zeh, M. T. Lotze, and D. Tang. **The Beclin 1 Network Regulates Autophagy and Apoptosis.** Cell Death and Differentiation 18(4):571–80, 2011.

Kim, J.; Kundu, M.; Viollet, B.; Guan, K.L. **AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1.** Nat. Cell Biol, 13, 132–141, 2011.

Kim, J. -w., K. I. Zeller, Y. Wang, A. G. Jegga, B. J. Aronow, K. A.O'Donnell, and C. V. Dang. 2004. **Evaluation of Myc E-Box Phylogenetic Footprints in Glycolytic Genes by Chromatin Immunoprecipitation Assays.** Molecular and Cellular Biology 24(13):5923–36, 2004.

Kim, J. -w., P. Gao, Y. C. Liu, G. L. Semenza, and C. V. Dang. **Hypoxia-Inducible Factor 1 and Dysregulated c-Myc Cooperatively Induce Vascular Endothelial Growth Factor and Metabolic Switches Hexokinase 2 and Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1.** Molecular and Cellular Biology 27(21):7381–93, 2007.

Kohn, Aimee D., Scott A. Summers, Morris J. Birnbaum, and Richard A. Roth. **Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation.** Vol. 271, 1996.

Leonardi, G. C. et al. **Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review).** International Journal of Oncology, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

Lim, K.-H., & Staudt, L. M.. **Toll-Like Receptor Signaling**. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 5(1), a011247–a011247, 2013.

Liu, Chunli et al.,. **Autophagy and protein aggregation after brain ischemia**. Journal of neurochemistry, 115(1), pp.68–78, 2010.

Locasale, Jason W. and Lewis C. Cantley. **Metabolic Flux and the Regulation of Mammalian Cell Growth**. Cell Metabolism 14(4):443–51, 2011.

Long GV, Flaherty KT, Stroyakovskiy D et al. **Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study**. Ann Oncol;28:1631–1639, 2017.

Long GV, Menzies AM, Nagrial AM et al. **Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma**. J Clin Oncol ;29:1239–1246, 2011.

Long GV, Weber JS, Infante JR et al. **Overall survival and durable responses in patients with BRAF V600-mutant metastatic melanoma receiving dabrafenib combined with trametinib**. J Clin Oncol;34:871–878, 2016.

Lunt, S. J., Chaudary, N. & Hill, R. P. **The tumor microenvironment and metastatic disease**. Clin. Exp. Metastasis 26, 19–34, 2009.

Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patané G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P. **Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated**. Diabetes. May;51(5):1437-42, 2002.

Mattia, G., Puglisi, R., Ascione, B., Malorni, W., Carè, A., & Matarrese, P. **Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies**. Cell Death & Disease, 9(2), 2018.

Mejlvang, J., Olsvik, H., Svenning, S., Bruun, J.-A., Abudu, Y. P., Larsen, K. B., Brech, A., Hansen, T. E., Brenne, H., Hansen, T., Stenmark, H., & Johansen, T. **Starvation induces rapid degradation of selective autophagy receptors by endosomal microautophagy**. Journal of Cell Biology, 217(10), 2018.



- Mohammadpour, A. et al. **Melanoma: Where we are and where we go**. Journal of Cellular Physiology, 2018.
- Mueckler, M., & Thorens, B. **The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters**. Molecular Aspects of Medicine, 34(2–3), 121–138, 2013.
- Nafisi, S., Saboury, A. A., Keramat, N., Neault, J.-F., & Tajmir-Riahi, H.-A. **Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue**. Journal of Molecular Structure, 827(1-3), 35-43, 2007.
- Noda, N. N., & Inagaki, F. **Mechanisms of Autophagy**. Annual Review of Biophysics, 44(1), 101-122, 2015.
- Osthus, R. C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L. A., & Dang, C. V. **Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by c-Myc**. Journal of Biological Chemistry, 275(29), 21797–21800, 2000.
- Paltridge, James L., Leila Belle, and Yeesim Khew-Goodall. 2013. **The Secretome in Cancer Progression**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1834(11):2233–41, 2013.
- Pavlova, Natalya N. and Craig B. Thompson. **The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism**. Cell Metabolism 23(1):27–47, 2016.
- Peiró, C., Lafuente, N., Matesanz, N., Cercas, E., Llergo, J. L., Vallejo, S., Rodríguez-Mañas, L., & Sánchez-Ferrer, C. F. **High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide**. British Journal of Pharmacology, 133(7), 967–974, 2001
- Pennello G, Devesa S, Gail M. **Association of surface ultraviolet B radiation levels with melanoma and nonmelanoma skin cancer in United States blacks**. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.;9:291–297, 2000.
- Poste, George. **Bring on the Biomarkers**. Nature 469(7329):156–57, 2011.
- Ribas A, Flaherty KT. **BRAF targeted therapy changes the treatment paradigm in melanoma**. Nat Rev Clin Oncol ;24:426–433, 2011.
- Riccardi C, Nicoletti I. **Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry**. Nat Protoc ;1(3):1458-61, 2006.

Richtig G, Hoeller C, Kashofer K, Aigelsreiter A, Heinemann A, Kwong LN, Pichler M, Richtig E. **Beyond the BRAFV600E hotspot: Biology and clinical implications of rare BRAF gene mutations in melanoma patients.** Br J Dermatol.;177:936–944, 2017.

Riley, P. A. **Melanin.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 29(11), 1235–1239, 1997.

Robey, R. Brooks and Nissim Hay. **Is Akt the ‘Warburg Kinase’?-Akt-Energy Metabolism Interactions and Oncogenesis.** Seminars in Cancer Biology 19(1):25–31, 2009.

Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. **Beclin 1 interactome controls the crosstalk between apoptosis, autophagy and inflammasome activation: Impact on the aging process.** Ageing Research Reviews, 12(2), 520–534, 2013.

Santiago, A. R.; Cristóvão, A. J.; Santos, P. F.; Carvalho, C. M.; Ambrósio, A. F. **High Glucose Induces Caspase-Independent Cell Death in Retinal Neural Cells.** Neurobiology of Disease , 25 (3), 464–472, 2007.

Schiess, Ralph, Bernd Wollscheid, and Ruedi Aebersold. **Targeted Proteomic Strategy for Clinical Biomarker Discovery.** Molecular Oncology 3(1):33–44, 2009.

Schulze, Almut. **A Fresh Look at Cancer Metabolism in a Historical Setting.** Nature Publishing Group 12, 2011.

Scott, R.C.; Schuldiner, O.; Neufeld, T.P. **Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila Fat Body.** Developmental Cell, 7(2), 167–178, 2004.

Sensi, M., Nicolini, G., Petti, C. et al. **Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma.** Oncogene 25, 3357–3364, 2006.

Shain, A. H.; Bastian, B. C. **From melanocytes to melanomas.** Nature Reviews Cancer, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

Tanida I, Ueno T, Kominami E. **LC3 and Autophagy.** Methods Mol Biol; 445:77-88, 2008.

Thurston, T.L.; Boyle, K.B.; Allen, M.; Ravenhill, B.J.; Karpiyevich, M.; Bloor, S.; Kaul, A.; Noad, J.; Foeglein, A.; Matthews, S.A.; et al. **Recruitment of TBK1 to cytosol-invading Salmonella induces WIPI2-dependent antibacterial autophagy.** EMBO J., 35, 1779–1792, 2016.

Traganos F, Darzynkiewicz Z. **Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocyte subpopulations.** Methods Cell Biol. 41: 185-194, 1994.

Vogelstein, Bert, David Lane, and Arnold J. Levine. **Surfing the P53 Network.** Nature 408(6810):307–10, 2000.

Vousden, Karen H. and Kevin M. Ryan. **P53 and Metabolism.** Nature Reviews Cancer 9(10):691–700, 2009.

Warburg O, Posener K, Negelein E. **Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle.** Biochem Zeitschr.152:309–44, 1924.

Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R, Cancer Genome Project. **Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF.** Cell.; 116:855–867, 2004.

Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA et al. **Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: where to next? Eur J Cancer ;62:76–85, 2016.**

World Health Organization. **Cancer Fact Sheets, 2018.**

Wu, J. et al.,. **Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B—two novel markers of autophagosome.** Biochemical and biophysical research communications, 339(1), pp.437–42, 2006.

Yeung, S. J., J. Pan, and M. H. Lee. **Roles of P53, Myc and HIF-1 in Regulating Glycolysis — the Seventh Hallmark of Cancer.** Cellular and Molecular Life Sciences 65(24):3981–99, 2008.

Yu, L., Chen, Y., & Tooze, S. A.. **Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms.** Autophagy, 14(2), 207–215, 2017.

Zheng, Jie. **Energy Metabolism of Cancer: Glycolysis versus Oxidative Phosphorylation (Review).** Oncology Letters 4(6):1151–57, 2012

## LISTA DE ANEXOS

**Figura A1:** Análise de variância (ANOVA) e Teste Tukey dos quatro grupos testados (A375).....59

**Figura A2:** Análise de variância (ANOVA) e Teste Tukey dos quatro grupos testados (WM1366).....60

```
Análise de Variância

Fonte  GL  SQ (Aj.)  QM (Aj.)  Valor F  Valor-P
Fator   3   2604,6    868,20    31,65    0,000
Erro   28   768,1     27,43
Total  31   3372,7

Sumário do Modelo

          S      R2  R2(aj)  R2(pred)
5,23766  77,23%  74,79%  70,25%

Médias

Fator  N  Média  DesvPad  IC de 95%
G      8  28,13  8,72    ( 24,33; 31,92)
M      8  3,375  2,200   (-0,418; 7,168)
GM12   8  10,38  3,58    ( 6,58; 14,17)
GM25   8  13,75  3,99    ( 9,96; 17,54)

DesvPad Combinado = 5,23766

Comparações Emparelhadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 95%

Fator  N  Média  Agrupamento
G      8  28,13  A
GM25   8  13,75  B
GM12   8  10,38  B C
M      8  3,375  C

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.
```

**Figura A1** – Análise de variância (ANOVA) e Teste Tukey dos quatro grupos testados (A375).

## Análise de Variância

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Fator	3	513,4	171,14	11,05	0,000
Erro	25	387,1	15,49		
Total	28	900,6			

## Sumário do Modelo

S	R2	R2(aj)	R2(pred)
3,93516	57,01%	51,85%	42,70%

## Médias

Fator	N	Média	DesvPad	IC de 95%
GW	7	22,71	4,68	( 19,65; 25,78)
MW	8	11,25	2,92	( 8,38; 14,12)
GM12W	8	17,13	4,97	( 14,26; 19,99)
GM25W	6	14,667	2,160	(11,358; 17,975)

DesvPad Combinado = 3,93516

## Comparações Emparelhadas de Tukey

Informações de Agrupamento Usando Método de Tukey e Confiança de 95%

Fator	N	Média	Agrupamento
GW	7	22,71	A
GM12W	8	17,13	A B
GM25W	6	14,667	B C
MW	8	11,25	C

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes.

**Figura A2** - Análise de variância (ANOVA) e Teste Tukey dos quatro grupos testados (WM1366).