

**DEPLEÇÃO DE COLESTEROL E INATIVAÇÃO DA V-ATPase COMO  
MECANISMO DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR EM  
MELANOMA**

**GILDEÍDE APARECIDA COSTA**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia como parte das exigências para obtenção do título de doutor(a) em Biociências e Biotecnologia pelo programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Arnaldo Rocha Façanha

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO- UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ  
AGOSTO-2017**

# DEPLEÇÃO DE COLESTEROL E INATIVAÇÃO DA V-ATPase COMO MECANISMO DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR EM MELANOMA

**GILDEÍDE APARECIDA COSTA**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia como parte das exigências para obtenção do título de doutor(a) em Biociências e Biotecnologia pelo programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 23 de agosto de 2017.

Comissão examinadora:

---

Prof. Dra. Andrea Cristina Vetö Arnholdt - UENF

---

Prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira - UENF

---

Prof. Dr. Franz Viana Borges - IFF

---

Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha - UENF (orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças para enfrentar as batalhas diárias.

Aos meus pais, Milton e Neli, e irmãos Ernany e Gilmar pelo apoio incondicional e por sempre me incentivarem a não desistir dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Dr. Arnaldo Rocha Façanha, pelos inúmeros ensinamentos e apoio durante essa jornada.

Aos membros da banca, prof. Dr<sup>a</sup> Andrea Cristina Vetö Arnholdt, prof. Dr. André Lacerda de Abreu Oliveira, prof. Dr. Franz Viana Borges.

Ao Dr. Antônio Jesus Dorighetto Cogo por aceitar revisar esta tese.

Aos colegas de laboratório, Amanda, Brunna, Danilo, Enrico, Frederico, Heloísa, Jacques, Janiélio, Juliana, Layz, Letícia, Luis Alfredo, Raul, Sávio pela ajuda com os experimentos e por tornarem essa caminhada mais leve e divertida.

A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) por não me medirem esforços para ajudar quando solicitados.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Microorganismos (LFBM), que sempre se mostraram solícitos.

Ao professor Dr. Alessandro Ramos Coutinho pela valiosa ajuda com o SIET, pelo incentivo constante e pelos inúmeros momentos de descontração proporcionados ao longo desses anos.

Aos professores, funcionários e à coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia, por sempre se mostrarem a disposição.

A UENF, CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro.

A todos os professores que contribuíram para minha formação até aqui, profissão que tanto admiro e respeito.

A todos os meus amigos, em especial Gina e Aline, pelas palavras motivadoras tão importantes durante a execução desse trabalho.

**ABREVIATURAS**

<b>ADP</b>	Adenosina difosfato
<b>ACMA</b>	6-amino-6cloro-2-metoxiacridina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATPase</b>	Adenosina trifosfatase
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CD</b>	Ciclodextrinas
<b>Conc A</b>	Concanamicina A
<b>DMEM</b>	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino (“ethylenediamine tetraacetic acid”)
<b>M<math>\beta</math>CD</b>	“Methyl- $\beta$ - Ciclodextrin”
<b>MDMs</b>	Microdomínios de membrana
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMPs</b>	Metaloproteases
<b>MOPS</b>	3-[N-morfolino] propano sulfônico (“3-[N-morpholino] propanesulfonic acid”)
<b>MTT</b>	-(3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>Pi</b>	Fosfato inorgânico
<b>PMSF</b>	Fluoreto de fenilmetilsulfonil (“phenylmethylsulphonyl fluoride”)
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio (“lauryl sulfate sodium salt”)
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SIET</b>	“Scanning Ion-selective Electrode Technique”
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético (“Trichloroacetic acid”)
<b>TRIS</b>	Tris-hidroximetil-aminometano (“tris-hydroxymethyl aminomethane”)

## RESUMO

As V-ATPases tem sido foco de crescente interesse nas pesquisas para a cura do câncer por desempenharem importantes papéis na metástase, proliferação e sobrevivência celular, bem como na resistência a drogas. Muitas evidências mostram que células tumorais exibem um metabolismo de lipídios alterado, com aumento considerável na síntese de ácidos graxos, absorção e síntese de colesterol e uma desregulação do metabolismo de esfingolipídios. O colesterol destaca-se por ser um dos componentes majoritário dos 'rafts', microdomínios de membrana (MDMs) que compartimentalizam importantes moléculas envolvidas nos processos de progressão tumoral, como a migração e a invasão. As V-ATPases já foram descritas como uma das proteínas integrais de membrana recrutadas pelos MDMs, e sua atividade é sabida ser afetada pela composição lipídica da matriz membranar. A presente tese demonstra a influência da depleção de colesterol sobre a atividade de hidrólise de ATP e transporte de H<sup>+</sup> das V-ATPases e seu impacto na progressão metastática. Testamos a hipótese da migração e invasão consistirem em processos altamente dependentes das V-ATPases, e que a depleção farmacológica de colesterol afeta de forma significativa a atividade, tanto *in vitro* quanto em células vivas, destas bombas de H<sup>+</sup> em linhagens celulares modelo de melanoma. A inibição da V-ATPase induzida pelo inibidor de colesterol M $\beta$ CD está relacionada a uma inibição do efluxo de prótons nas células tumorais, reduzindo a capacidade de migração e invasão das células tumorais. Em conjunto, os dados sugerem que a atividade da V-ATPase é dependente dos MDMs funcionalmente relacionados à dinâmica membranar necessária à mobilidade das células tumorais, assim como a montagem dos MDMs também depende da atividade desta bomba.

**Palavras-chave:** V-ATPase, MDMs, colesterol, migração, invasão.

## ABSTRACT

V-ATPases have been a focus of increasing interest in cancer cure research because they play important roles in metastasis, cell proliferation and survival, as well as drug resistance. Many evidences shows that tumor cells exhibit an altered lipid metabolism, with considerable increase in fatty acid synthesis, absorption and cholesterol synthesis, and deregulation of sphingolipid metabolism. The cholesterol is noted to be one of the major components of rafts, membrane microdomains (MDMs) that compartmentalize important molecules involved in tumor progression processes, such as migration and invasion. V-ATPases have already been described as one of the integral membrane proteins recruited by MDMs, and their activity is known to be affected by the lipid composition of the membrane matrix. The present work demonstrates the influence of cholesterol depletion on the ATP hydrolytic activity and H<sup>+</sup> transport of the V-ATPases and their impact on the metastatic progression. We have tested the hypothesis that migration and invasion are highly V-ATPase-dependent processes, and that the pharmacological cholesterol depletion significantly affects these H<sup>+</sup> pumps activities in melanoma model cell lines both *in vitro* and living cells. The V-ATPase inhibition induced by the cholesterol inhibitor M $\beta$ CD is related to a proton flux inhibition in tumor cells, reducing the migration and invasiveness capacity of tumor cells. Taken together, the data suggest that V-ATPase activity is dependent on MDMs functionally related to the membrane dynamics required for the tumor cells mobility, as well as the MDMs assembly also depends on this pump activity.

Key words: V-ATPase, MDMs, cholesterol, migration, invasion

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da V-ATPase .....	7
Figura 2- Função das V-ATPases na membrana plasmática de diferentes tipos celulares.....	9
Figura 3- Mecanismo pelo qual as V-ATPases aumentam a invasividade e sobrevivência do tumor .....	11
Figura 4- Estrutura química dos primeiros inibidores específicos da V-ATPase.....	13
Figura 5- Mecanismo proposto pelo qual a superexpressão das V-ATPases de membrana plasmática em um dos pólos da célula modula migração/ invasão.....	17
Figura 6- Rota simplificada da síntese de lipídios.....	22
Figura 7- Inibição da V-ATPase e mobilização de colesterol.....	23
Figura 8- Modelo esquemático da sinalização IGF-IR/PI3K/Akt na geração de sinais de sobrevivência e antiapoptótico.....	25
Figura 9- Estrutura química das ciclodextrinas.....	28
Figura 10- Modelo do mecanismo molecular de extração de colesterol pelas CDs.....	28
Figura 11- Teste de citotoxicidade.....	41
Figura 12- Depleção de colesterol afeta a morfologia celular.....	43
Figura 13- Migração celular após inibição da V-ATPase e depleção de colesterol.....	45
Figura 14- Migração celular usando <i>Transwell</i> .....	46
Figura 15- Invasão celular.....	47
Figura 16- Reatividade imune da subunidade B da V-ATPase, Flotina-2, Integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ .....	49
Figura 17- A atividade hidrolítica e de transporte de $H^+$ foi afetada pela depleção de colesterol.....	51
Figura 18- Medição do fluxo de $H^+$ em células vivas usando SIET.....	55

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT .....	vi
1.INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1. Estrutura das V-ATPases .....	5
2.2. Funções das V-ATPases na fisiologia das células animais.....	8
2.3. V-ATPases e a migração e invasão de células tumorais malignas .....	9
2.4. Inibidores das V-ATPases .....	12
2.5. Migração e Invasão Celular.....	14
2.6. Melanoma.....	17
2.7. Membranas biológicas e colesterol .....	20
2.8. Microdomínios de membrana e câncer .....	23
2.9. M $\beta$ CD - depleção farmacológica de colesterol.....	26
3. HIPÓTESE .....	29
4. OBJETIVOS .....	30
4.1. OBJETIVO GERAL .....	30
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
5.1. Linhagens celulares .....	31
5.2. Reagentes utilizados .....	31
5.3. Teste de citotoxicidade.....	31



5.4. Análise da morfologia celular .....	32
5.5. Isolamento dos MDMs .....	32
5.6. Dosagem de proteína.....	33
5.7. <i>Dot blotting</i> .....	33
5.8. <i>Western blotting</i> .....	34
5.9. Ensaios de migração celular .....	34
5.9.1. Ferimento em monocamada .....	34
5.9.2. <i>Transwell</i> .....	35
5.10. Ensaio de invasão .....	35
5.11. Medida do fluxo de prótons usando o sistema SIET ( <i>Scanning Ion-selective Electrode Technique</i> ) .....	36
5.12. Fracionamento celular e purificação de membrana plasmática .....	37
5.13. Atividade de hidrólise de ATP da V-ATPase .....	37
5.14. Atividade de transporte de prótons .....	38
5.15. Análise estatística .....	39
6. RESULTADOS .....	40
6.1. Viabilidade celular .....	40
6.2. Análise da morfologia celular .....	42
6.3. Efeito da depleção de colesterol e da inibição da V-ATPase sobre a Migração e Invasão .....	44
6.4. Imunolocalização das V-ATPases nas frações provenientes do isolamento dos MDMs.....	48
6.5. Influência da depleção de colesterol na atividade hidrolítica e de transporte de H <sup>+</sup> da V-ATPase.....	50
6.6. Modulação do fluxo de prótons em células vivas em resposta ao tratamento com Conc A e MβCD .....	52
7. DISCUSSÃO .....	56
8. CONCLUSÃO.....	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade nos dias atuais sendo responsável por 8.2 milhões de mortes em 2012 (Ferlay et al., 2012), acometendo indistintamente a todas as classes sociais e grupos étnicos. Devido a sua complexidade mecanística e diversidade ontogênica, constitui uma das doenças mais desafiadoras e requer pesquisas extensivas para o desenvolvimento de novas e mais eficientes terapias e diagnósticos o mais precoce possível. Entre os cânceres, o melanoma maligno vem ganhando destaque nas últimas décadas devido a um aumento radical da sua incidência e mortalidade (Stracci et al., 2005). Na população caucasiana sua incidência anual vem aumentando mais do qualquer outro tipo de câncer (Palunic et al., 2016, Singh e Salama, 2016; Jeong et al., 2011;). Recentemente, as V-ATPases se tornaram alvos promissores para terapia do câncer por desempenharem um importante papel na metástase, crescimento e sobrevivência celular, bem como na resistência a drogas (Perez-Sayans et al., 2009).

As V-ATPases são bombas de prótons dependentes de ATP presentes na membrana de lisossomos, endossomos, vesículas secretórias, vesículas revestidas de clatrina e na membrana de algumas células especializadas (Forgac, 2007; Li e Kane, 2009; Brown et al., 2009) e também tem sido funcionalmente detectada em membranas do complexo de Golgi, do retículo endoplasmático e vesículas do caminho secretório de proteínas (Samarão et al., 2009). Sua função básica é bombear prótons do citosol para os compartimentos intracelulares ou para o espaço extracelular. Tal atividade exerce papéis cruciais em diversos processos, principalmente os envolvidos na proliferação e dinâmica celulares, incluindo: endocitose mediada por receptor, tráfego de proteínas através dos compartimentos endossomais, ativação de zimógenos, e transporte acoplado de íons e pequenas moléculas nutricionais e reguladoras (Forgac, 2007).

O microambiente ácido é crucial para o crescimento, progressão e quimioresistência tumoral (Morita et al., 1992; Martinez-Zaguilan et al., 1996). As V-ATPases exercem um papel chave nesse cenário, pois são responsáveis por manter e estabelecer a homeostase e gradientes de pH do microambiente e

membranas tumorais, respectivamente (Fais et al., 2007). As células tumorais apresentam uma superexpressão dessa bomba de prótons em suas membranas plasmáticas, e evidências cumulativas tem revelado que tal fenômeno exerce forte influência sobre o potencial de malignidade das células tumorais, primariamente relacionada à ativação de proteases ácidas responsáveis pela degradação da matriz extracelular (Sennoune et al., 2004b; Lu et al., 2005; De Milito e Fais, 2005). As V-ATPases intracelulares também contribuem para o tráfego vesicular dessas proteases bem como para sua ativação. Outro papel que as V-ATPases exercem é o de regulação de vias sinalizadoras como as integradas por Wnt e Notch, entre outras (Holliday, 2014).

Outra característica marcante das células tumorais é a alteração no metabolismo de lipídios. As células tumorais malignas apresentam um aumento considerável na síntese de ácidos graxos (Young e Anderson, 2008), absorção e síntese de colesterol (Tosi e Tugnoli, 2005) e uma desregulação no metabolismo de esfingolipídios (Ryland et al., 2011). Os mecanismos de absorção de colesterol mediado pelos receptores de LDL (lipoproteína de baixa densidade) são usados com sucesso para a entrega de componentes conjugados aos esteróis aos seus destinos finais dentro da célula (Schroeder et al., 2010). Além do mais as células tumorais apresentam um aumento dramático no número de receptores de LDL e na absorção de colesterol que chegam a ser 100 vezes maior do que o encontrado em células normais (Ho et al., 1978).

Sendo as V-ATPases proteínas integrais de membrana, estas são estruturalmente e funcionalmente afetadas pela composição lipídica membranar. Muitos trabalhos relatam a organização de microdomínios de membrana (MDMs) ricos em esfingolipídios e colesterol também chamados de 'rafts' lipídicos ou de membrana (Lingwood e Simons, 2010). Os MDMs desempenham um papel importante no processo de sinalização, tráfego de membrana, endocitose e na motilidade das células, e entre as inúmeras moléculas já identificadas nesses microdomínios encontram-se as V-ATPases (Yoshinaka et al., 2004). No caso do colesterol, um dos principais lipídios constituinte dos MDMs, este tem demonstrado exercer influência e ser influenciado pela V-ATPase. Foi descrito a necessidade de colesterol na composição de lipossomos para reconstituição da atividade de bombeamento de prótons da V-ATPase (Perez-Castiñeira e Apps, 1990). Por outro

lado, a inibição da V-ATPase foi relacionada ao aprisionamento do colesterol nos lisossomos, diminuindo os níveis de colesterol livre e gerando depleção deste lipídio na membrana (Bartel et al., 2016). Tal efeito interfere com a fluidez de membrana e aumenta a rigidez celular (Sun et al., 2007), características associadas com a capacidade migratória e invasiva da célula (Bartel et al., 2016).

A migração e a invasão são etapas-chave da cascata metastática e processos estratégicos no qual se investiga possíveis alvos quimioterápicos. A metástase responde por 90% das mortes provocadas por tumores sólidos (Gupta e Massagué, 2006), e assim, o bloqueio ou retardo deste processo consiste em alvo importantíssimo na pesquisa do câncer. Tanto a migração quanto a invasão são processos complexos que envolvem um controle fino da dinâmica membranar, citoplasmática e organelar. O primeiro inclui formações de protrusões em uma margem da célula, adesão, movimento do corpo celular e liberação dos sítios de contato na borda de fuga (Ridley et al., 2003). O segundo perda de adesão da célula tumoral aos componentes da membrana basal ou matriz extracelular (ECM), degradação local destas estruturas dependentes da extrusão ácida, secreção e ativação de proteases dependentes do pH extracelular ácido do microambiente tumoral e aumento da locomoção da célula tumoral para dentro da região modificada. Os três últimos passos são regulados tanto pelo pH intracelular quanto pelo pH extracelular (Cardone et al., 2005), regulação que depende intrinsecamente da participação das V-ATPase, corroborando com estudos prévios que tem sugerido um papel-chave desta bomba na regulação da migração e invasão de células tumorais malignas (Cotter et al., 2015; Nisisho et al., 2011; Hinton et al., 2009b).

Os MDMs também exercem forte influência sobre a migração e invasão celular (Li et al., 2011, Jagielska et al., 2012, Vincent et al., 2012). Neste contexto, fora previamente descrito que a microorganização dos lipídios na membrana plasmática pode afetar as funções da célula mediada pelas integrinas (Pande, 2000). Esses MDMs também são essenciais para aquisição de um fenótipo polarizado durante a migração de células de adenocarcinoma mamário MCF-7 (Mañes et al., 1999). Eventos como a degradação da matriz extracelular e formação de invadopódios em células de câncer de mama também requerem os MDMs. A caveolina-1, proteína marcadora dos MDMs caveolares, é predominantemente expressa em células de câncer de mama invasivo e está correlacionada com a atividade do invadopódio. Essa proteína

desempenha um importante papel no tráfego de componentes para o invadopódio incluindo MT1-MMP (metaloprotease de membrana do tipo 1), responsável pela degradação dos componentes da matriz extracelular (Yamaguchi et al., 2009).

Para realização dos experimentos desse trabalho foram utilizadas as linhagens de melanoma murino B16-F10, caracterizada como muito metastática pela grande quantidade de catepsinas B (Sloane et al., 1982) e B16-F0 caracterizada como pouco metastática. Essa diferenciação foi reforçada pelo grupo através de análises morfológicas tanto de tumores provenientes de ambas as linhagens quanto das linhagens *in vitro*. Tanto a linhagem de melanoma mais metastático B16-F10 quanto o tumor induzido por esta, apresentaram características mais anaplásicas como núcleos aumentados, inúmeros nucléolos, sinais de invasão vistos nas análises de histopatologia, variação no formato celular e maior heterogeneidade, do que o melanoma menos metastático B16-F0 (Santos, 2014). Uma terceira linhagem foi utilizada como controle, Melan-A, cultura de melanócitos murinos, não malignos (Danga et al., 2015).

O presente trabalho investigou a influência da depleção de colesterol nas atividades de hidrólise de ATP e transporte de  $H^+$  da V-ATPase em vesículas isoladas de membrana plasmática, e sobre o respectivo fluxo de prótons monitorado em células vivas. Foi analisado também o comportamento das células vivas sob tratamento com M $\beta$ CD ou concanamicina (Conc A) e sua influência sobre a migração e invasão celular. Os resultados sugerem que o colesterol é essencial para a expressão funcional da bomba, afetando processos que dependem da acidificação extracelular e do gradiente eletroquímico de  $H^+$  da membrana das células tumorais, como a migração e invasão celular.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Estrutura das V-ATPases

As ATPases do tipo vacuolar (V-ATPases) são bombas de prótons presentes nos sistemas endomembranares, lisossomos, endossomos, aparato de Golgi, grânulos secretórios e vesículas revestidas de todas as células eucarióticas e na membrana plasmática de alguns tipos específicos de células animais. Estas enzimas participam do controle da homeostase celular, via manutenção de um pH adequado citoplasmático e acidificação do interior de muitas organelas (Sennoune et al., 2004 b). As V-ATPases mobilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP para bombear prótons através das membranas em que estão funcionalmente expressas. Isto cria um gradiente de pH através da membrana, que resulta em condições ácidas dentro dos compartimentos intracelulares e pH relativamente neutro no citoplasma (Sennoune et al., 2004a). Porém, quando superexpressas na membrana plasmática de células tumorais provocam acidificação do meio extracelular (Martinez-Zaguilan et al., 1996), e energizam uma gama de transportadores secundários e proteínas transmembrana que participam dos processos de reconhecimento celular e adesão matricial.

As V-ATPases são compostas por muitas subunidades organizadas em dois domínios. O domínio  $V_1$  é um complexo periférico de 650 KDa, composto de oito subunidades diferentes (A, B, C, D, E, F, G, H) cujos pesos moleculares variam de 13-70 KDa, envolvido na hidrólise de ATP. O domínio  $V_0$  é um complexo de 260 KDa embebido na membrana, composto de seis subunidades (a, c, c', c'', d, e ) cujos pesos moleculares variam de 9-100 KDa, que proporcionam a translocação dos prótons do citoplasma para o lúmen ou espaço extracelular (Forgac, 2007) (Figura 1).

Sabe-se que as subunidades "A" e "B" são consituíntes da unidade catalítica. Sendo a hidrólise de ATP e a regulação via domínio não homólogo, função da subunidade A. Já a subunidade "B" tem função regulatória e se liga a actina e aldolase (Shao et al., 2003; Shao e Forgac, 2004; Nishi e Forgac, 2002). Sugere-se que a subunidade "C" desempenhe um importante papel regulatório, atuando na

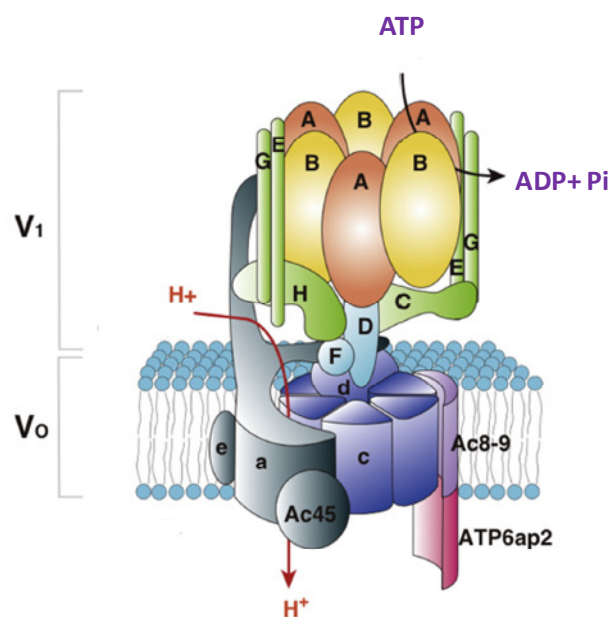
dissociação dos domínios  $V_0$  e  $V_1$  (Inoue e Forgac, 2005; Drory et al., 2004). Acredita-se que a subunidade “D” seja importante para o acoplamento entre o transporte de  $H^+$  e a hidrólise de ATP. Este acoplamento se refere ao acoplamento funcional da enzima, ou seja, o sincronismo entre as atividades de hidrólise de ATP e transporte de  $H^+$  desempenhadas pela V-ATPase (Xu e Forgac, 2000). As subunidades “D” e “F” são chamadas de subunidades rotatórias (Imamura et al., 2003; Arata et al., 2002). Sugere-se que as subunidades “E” e “G” funcionem como estatores, partes fixas que ajudam na manutenção da conformação da V-ATPase, e também atuem como sítios de ligação para reguladores de ATPases de membranas vacuolares e endossomais (Smardon et al., 2002; Arata et al., 2002). A subunidade “H” tem sido associada a regulação da atividade enzimática (Wilkins et al., 2004; Sagermann et al., 2001; Geyer et al., 2002).

A subunidade “a” do domínio  $V_0$  é uma proteína integral de membrana que além de compor o canal de translocação de íons  $H^+$ , também é responsável por direcionar a V-ATPase para diferentes membranas subcelulares (Kawasaki-Nishi et al., 2001.; Toei et al., 2010). Em mamíferos a subunidade “a” está presente em quatro isoformas (a1-a4), sendo as isoformas a3 e a4 responsáveis pelo direcionamento da V-ATPase para a membrana plasmática de osteoclastos e células intercaladas renais, respectivamente (Toyomura et al., 2000; Oka et al., 2001; Smith et al., 2001; Toyomura et al., 2003). Já a subunidade “c” é a principal subunidade envolvida com o transporte de prótons (Nishi e Forgac, 2002), enquanto a subunidade “d” é atribuída a função de promover a associação do domínio  $V_0$  com o domínio  $V_1$  (Pietrement et al., 2006; Nishi et al., 2003; Smith et al., 2002). Em mamíferos a função da subunidade “e” é desconhecida (Sambade e Kane, 2004).

Para a montagem do complexo V-ATPase são necessárias algumas proteínas acessórias (Kinouchi et al., 2010; Jansen et al., 2010). Entre elas as proteínas Ac8-9 e a ATP6ap2. A Ac8-9 é uma forma truncada do receptor (pro) renina. O seu fragmento M8.9 carboxiterminal é produto da clivagem pela endoprotease furina e não é funcional (Kinouchi et al., 2013). O fragmento M8.9 é o responsável por se associar a V-ATPase (Ludwig et al., 1989). A partir de um estudo do gene ATP6ap2 de camundongo, foi sugerido a necessidade das proteínas ATP6ap2 e Ac8-9 associadas para que ocorra a montagem do complexo V-ATPase (Oshima et al., 2011; Riediger et al., 2011; Kinouchi et al., 2010). A proteína acessória ATP6ap2 é

importante para a sinalização Wnt canônica, pois sua depleção por siRNA reduz a resposta celular à esse tipo de sinalização (Cruciat et al., 2010).

Já a proteína Ac45 vem sendo apontada como uma subunidade regulatória da V-ATPase (Holthuis et al., 1995). Jansen e colaboradores (2008) mostraram que a Ac45 ajuda a controlar a localização da V-ATPase por direcioná-la para dentro de vias secretórias reguladas, afetando a secreção mediada pela V-ATPase e dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Jansen et al., 2008).



**Figura 1- Estrutura da V-ATPase.** A V-ATPase é composta pelo complexo periférico  $V_1$  (amarelo e laranja), responsável pela hidrólise de ATP, e pelo complexo integral,  $V_0$  (roxo e cinza), envolvido no transporte de prótons através da membrana. O complexo  $V_1$  e  $V_0$  estão ligados por uma haste central, compostas pelas subunidades “D” e “F” ( $V_1$ ) e “d” ( $V_0$ ), e múltiplas hastes periféricas, compostas pelas subunidades “C”, “E”, “G”, “H” (verde). As V-ATPases de mamíferos contêm as proteínas acessórias Ac45 e ATP6ap2, ambas necessárias para o funcionamento da enzima. Adaptado de Sun-Wada e Wada, 2015.



## 2.2. Funções das V-ATPases na fisiologia das células animais

As V-ATPases presentes nos compartimentos intracelulares são importantes para processos celulares normais como: endocitose mediada por receptor, tráfego intracelular de membrana, processamento e degradação de proteínas e transporte de pequenas moléculas e íons (Wang et al., 2007; De Milito et al., 2007).

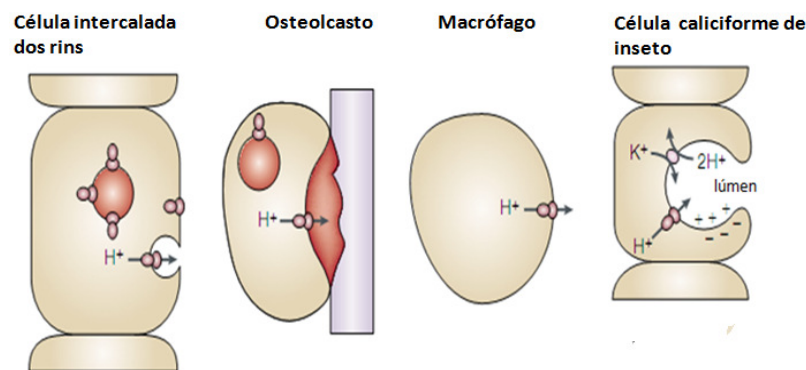
As V-ATPases desempenham um papel essencial na endocitose mediada por receptor por fornecer um pH endossomal ácido necessário para ativar a liberação de ligantes internalizados de seus receptores (Forgac, 2007). A entrega desses ligantes aos endossomos tardios também é facilitada pelo pH ácido luminal gerado pelas V-ATPases (Hinton et al., 2009a). Dentro de lisossomos e outras organelas digestivas as V-ATPases fornecem o pH luminal ácido necessário para a atividade de hidrolases responsáveis pela degradação de proteínas e outras macromoléculas (Forgac, 2007).

Em vesículas secretórias, como as vesículas sinápticas e grânulos de cromafim, as V-ATPases fornecem a força motora para o transporte acoplado de pequenas moléculas empregando seu potencial de membrana ou o gradiente de pH gerado (Moriyama e Yahara, 1999). Uma função similar foi observada nos vacúolos de leveduras, onde, por exemplo, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  está associado ao efluxo de prótons (Anraku et al., 1992).

Na membrana plasmática das células de mamíferos estas bombas desempenham importantes funções: facilitam a reabsorção óssea pelos osteoclastos (Li et al., 1999), secreção pelas células intercaladas dos rins (Wagner et al., 2004), homeostase do pH em macrófagos e neutrófilos (Nanda et al., 1996), angiogênese pelas células endoteliais (Rojas et al., 2006) e maturação e armazenamento dos espermatozoides no trato reprodutivo masculino. Nas células calciformes dos insetos, criam um potencial de membrana positivo que dirige a secreção de  $\text{K}^+$  através de um contra-transporte eletrogênico (Pastor-Soler et al., 2003), (Figura 2).

Outra função da V-ATPase seria o de envolvimento com a regulação da morfologia das células. Estudos realizados por Skinner e Wildeman (1999) provaram que a subunidade c de 16 KDa da V-ATPase se liga ao domínio transmembrana da integrina  $\beta 1$  em mioblastos de rato, e que a superexpressão ou expressão desta

subunidade sem a quarta das suas 4 hélices alterou a morfologia de fibroblastos e mioblastos, sugerindo que a interação de 16 kDa com a  $\beta 1$  seja importante para o controle do crescimento celular. Esta mesma subunidade também forma um complexo com a oncoproteína E5 do papiloma vírus. Essa associação auxilia E5 a ativar o receptor PDGF- $\beta$  (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas) envolvido com o crescimento e divisão celular (Andresson et al., 1995).



**Figura 2- Função das V-ATPases na membrana plasmática de diferentes tipos celulares.** As V-ATPases na membrana apical das células  $\alpha$  intercaladas renais ajudam na secreção ácida para o lúmen dos túbulos distais e ductos coletores. Defeitos nas V-ATPases das células intercaladas levam a desordem chamada de acidose dos túbulos renais distais. As V-ATPase dos osteoclastos estão envolvidas na reabsorção óssea. Elas criam um ambiente ácido necessário para degradação óssea. A osteoporose, caracterizada pela reabsorção óssea insuficiente, está associada com funcionamento inadequado da V-ATPase. A presença de V-ATPases na membrana de macrófagos e neutrófilos auxiliam na homeostase do pH citoplasmático dessas células. Adaptado de Nishi e Forgac, 2002.

### 2.3. V-ATPases e a migração e invasão de células tumorais malignas

A presença de V-ATPases na membrana plasmática de células tumorais malignas invasivas e a superexpressão de subunidades dessa bomba de prótons tem sugerido um possível papel para as V-ATPases na migração e invasão de células cancerígenas. O papel mais conhecido atribuído a essa enzima é o de promoção da atividade de proteases envolvidas com a invasão dependente de um pH ácido (Figura 3). Essas proteases ou clivam diretamente os componentes da matriz extracelular, necessário para que o tumor escape ou invada novos sítios ou

ativa proteases que participam desse processo. Catepsinas e metaloproteases são as duas principais classes de proteases envolvidas na metástase. As catepsinas residem nos lisossomos e necessitam de um pH baixo para sua ativação e atividade (Marshansky et al., 2014; Settembre et al., 2012; Stransky e Forgac, 2015), enquanto que as MMPs não dependem diretamente do pH, mas podem ser ativadas pela clivagem dependente de catepsinas (Stransky e Forgac, 2015; Rush et al., 2012; Kim et al., 2008).

Tanto V-ATPases intracelulares quanto V-ATPases de membrana plasmática desempenham papéis no processo de invasão. As V-ATPases dos compartimentos secretórios de células de câncer de mama, criam um microambiente ácido necessário para ativação das MMP-2 e catepsina B, proteases promotoras de invasão (Hegedüs et al., 2008; Hendrix et al., 2013). Já as V-ATPases de membrana plasmática criam um microambiente extracelular ácido que promove a ativação ou atividade de proteases envolvidas com a invasão (Cotter et al., 2015).

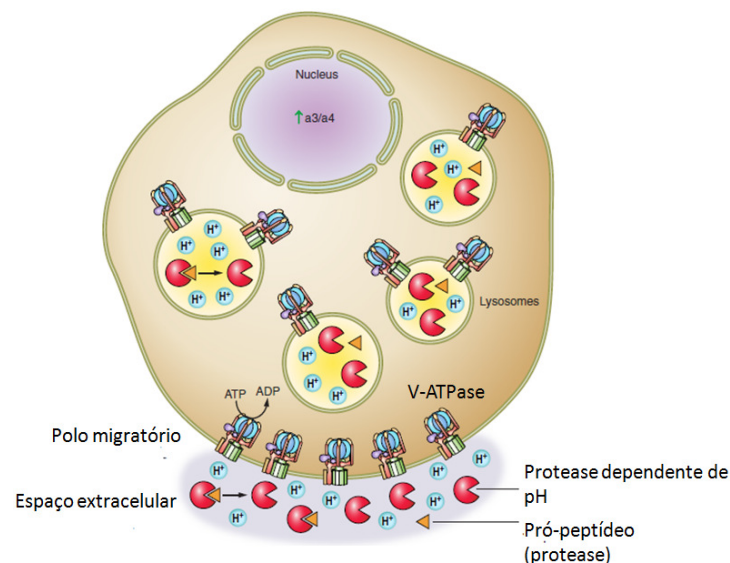
Um possível mecanismo pelo qual V-ATPases podem promover a migração celular é através da interação com a actina do citoesqueleto. Já foi visto que algumas subunidades das V-ATPases interagem ou colocalizam com a actina em vários tipos de célula, incluindo células de câncer de mama (Cai et al., 2014; Hindenburg et al., 1989; Kinouchi et al., 2010). Em células endotéliais microvasculares, as quais sobrevivem em um microambiente ácido assim como as tumorais, a alta densidade de V-ATPases de membrana plasmática em um pólo da célula, cria um gradiente de pH que permite a polimerização da actina devido a um pH citosólico alcalino local (Ouar et al., 2003).

Outra contribuição das V-ATPases para a migração consiste em facilitar a localização de fatores envolvidos na migração celular. Já foi visto que o tratamento de células de câncer de mama SKBR3 com inibidores específicos de V-ATPases alteram a localização apropriada de Rac1 e EGFR, ambos envolvidos na migração (Sun-Wada et al., 2006).

As V-ATPases estão envolvidas também na regulação do potencial de membrana, que por sua vez pode alterar a condutância dos canais de íons. A alteração do influxo de cálcio provocada pela atividade das V-ATPases na

membrana plasmática, tem sido associada a um aumento da capacidade migratória (Fender et al., 2015; Powell et al., 2000).

A interação de certas proteínas com as V-ATPases também podem alterar o seu funcionamento, e por conseqüência a migração e invasão celular. TMSG1, por exemplo, tem a capacidade de interagir e inibir a atividade das V-ATPases. Em células de câncer de mama, a superexpressão de TMSG1 diminui a atividade das V-ATPases, reduz o crescimento celular e inibe a migração e invasão *in vitro* (Fan et al., 2015; Marino et al., 2010). A proteína transmembrana TM9SF4 também pode interagir e inibir a atividade das V-ATPases através da regulação de sua montagem. Foi visto que o silenciamento de TM9SF4 em células de câncer de cólon reduziu a invasão *in vitro* (Lozupone et al., 2015). O papel das V-ATPases na migração e invasão mostra-se bastante complexo, sendo necessários ainda muitos estudos para elucidá-lo completamente.



**Figura 3- Mecanismo pelo qual as V-ATPases aumentam a invasividade e sobrevivência do tumor.** A principal função atribuída as V-ATPases durante a invasão de células tumorais é a de promoção da atividade de proteases dependentes de pH extracelular. Intracelularmente, a acidificação de compartimentos mediada pela V-ATPase pode permitir a ativação de proteases que são entregues a superfície da membrana. Um aumento na expressão das isoformas a3/a4 direcionam as V-ATPases para a membrana plasmática das células tumorais invasivas, onde elas auxiliam na criação de um microambiente ácido que permite a ativação de proteases dependentes de pH e/ou aumenta a atividade dessas proteases. Este microambiente ácido é propício para a sobrevivência da célula tumoral. Adaptado Stransky et al., 2016.

## 2.4. Inibidores das V-ATPases

Existe um interesse ávido na inibição farmacológica das V-ATPases, uma vez que isso pode ajudar a entender uma ampla gama de doenças, incluindo o câncer, osteoporose e o Alzheimer (Hinton et al., 2009a; Williamson e Hiesinger, 2010). A inibição da atividade das V-ATPases causa uma desregulação do pH celular, perturbando o funcionamento da célula. Os primeiros inibidores descritos dessa bomba de prótons foram a bafilomicina A<sub>1</sub> e a Conc A (Figura 4). Ambos são coletivamente conhecidos como plecomacrolídeos e consistem em um grande anel de lactona macrocíclica, composto por 16-18 carbonos, isolados originalmente de muitas espécies de bactéria *Streptomyces* (Bowman et al., 1988). O mecanismo de ação das drogas consiste na sua ligação a subunidade c o que causa inibição da translocação de prótons através desse proteolípido (Huss et al., 2002) resultando em uma acidificação intracitoplasmática (Bowman et al., 2004).

Tanto bafilomicina quanto Conc A são potentes inibidores das V-ATPases, com IC<sub>50</sub> na faixa do nanomolar. Isso faz com que essas moléculas sejam úteis nas pesquisas para distinguir entre os diferentes tipos de ATPases na célula, uma vez que as ATPases do tipo P e F não são inibidas nas concentrações usadas para uma inibição total da V-ATPase (Hernández et al., 2012).

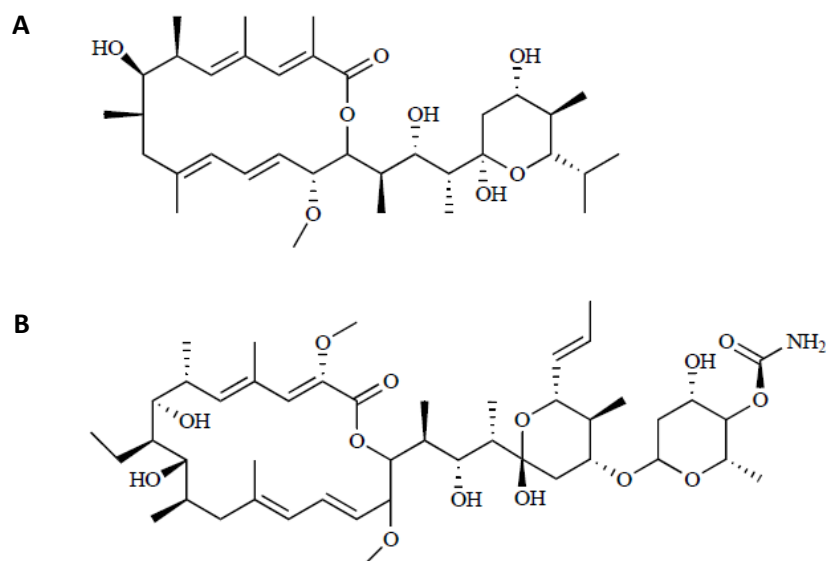
Hoje sabe-se que a Conc A é mais efetiva na inibição da atividade das V-ATPases, do que a bafilomicina (Teodoro, 2004). Já foi visto que o uso destes inibidores específicos das V-ATPases, reduz as taxas de migração de linhagens de câncer de mama e de células endoteliais microvasculares as quais compartilham um microambiente extracelular semelhante aos das células tumorais (Sennoune et al., 2004b; Rojas et al., 2006).

Atualmente têm surgido novos inibidores de V-ATPases, entre eles podem-se citar: FR167356, considerado o primeiro inibidor de V-ATPases que pode discriminar entre as V-ATPases de membrana plasmática dos osteoclastos e as V-ATPases lisossomais, tendo preferência pelas V-ATPases da membrana plasmática. Esse inibidor destaca-se por ser o primeiro componente a distinguir V-ATPases em nível celular (Niikura et al., 2004).

Outro inibidor de V-ATPases que vem sendo estudado é a difilina. Esta droga pode inibir o crescimento e invasão celular e induzir a apoptose em câncer gástrico humano usando a via de sinalização Wnt/  $\beta$  catenina como mecanismo (Shen et al., 2011). Outras moléculas e drogas que inibem as V-ATPases também vem sendo descritos como: NiK12192 (Petrangolini et al., 2006; Melikova et al., 2002), FR20126 (Nikura, 2002) e PPI SB242784 (Hesselink et al., 2008)

Assim como os inibidores clássicos, Conc A e bafilomicina, o archazolid B se liga a subunidade c do domínio  $V_0$  da V-ATPase (Bockelmann et al., 2010), inibindo a atividade das V-ATPases em concentrações nanomolar (Huss et al., 2005). Esse composto é derivado da mixobactéria *Archangium gephyra* (Sasse et al., 2003) e sua citotoxicidade mostrou ser dose e tempo- dependente resultando em morte celular induzida por via apoptótica mitocondrial (von Schwarzenberg e Wiedmann, 2013).

A inibição da V-ATPase tem inúmeras conseqüências para a célula. Processos celulares como dissociação dos ligantes de seus receptores nos endossomos, concentração de hormônios, degradação lisossomal e secreção ácida (Forgac, 2007) são comprometidos pela perda de função da V-ATPase. Podendo a desregulação da homeostase do pH, gerada pela inibição dessa bomba de prótons provocar a morte das células (Luciani et al., 2004; De Milito et al., 2007).



**Figura 4- Estrutura química dos primeiros inibidores específicos da V-ATPase.** (A) Bafilomicina A1 e (B) Conc A. Adaptado de Hernández et al., 2012.

## 2.5. Migração e Invasão Celular

Migração e invasão são termos claramente separados na biologia celular experimental. A migração é definida como um movimento direcionado das células em um substrato como a membrana basal, fibras da matriz extracelular ou placas plásticas. A migração em uma superfície 2D não envolve nenhuma rede de fibras obstrutoras, (ex: colágeno I). Já a invasão é definida como o movimento da célula através de uma matriz 3D, a qual é acompanhada por uma reestruturação do ambiente 3D. A invasão requer adesão, proteólise dos componentes da matriz extracelular e migração, assim as células invasoras remodelam a matriz extracelular. Mesmo havendo dificuldade em separar os processos, é fato que a capacidade para migrar é um pré-requisito para invadir. Uma célula não consegue invadir sem migrar, mas consegue se locomover sem invadir (Kramer et al., 2013).

A migração de células tumorais metastáticas de um sítio primário para um sítio distante é de difícil diagnóstico e característica de muitos cânceres. Esta habilidade também está associada com a resistência a terapia. A migração celular é claramente relevante do ponto de vista das funções biológicas (desenvolvimento embrionário, organogênese e homeostase). Infelizmente a desregulação deste processo também está envolvida na progressão do câncer (angiogênese tumoral e metástase) (Lecomte et al., 2011). A metástase, passo final da progressão tumoral, é a responsável por 90% das mortes provocadas por tumores sólidos, fato que causa preocupação (Gupta e Massagué, 2006). Este evento está associado com a habilidade de migração e invasão da célula, assim inibindo a migração pode-se diminuir e até mesmo anular a metástase (Luo e Guan, 2009; Liu et al., 2009).

Mudanças no pH citosólico são críticas para o estabelecimento da polaridade celular necessária para a motilidade da célula. Um passo crítico na motilidade e migração é a polimerização assimétrica da actina em um dos pólos da célula. O aumento no pH citosólico, provocado em grande parte pela super-expressão de V-ATPases de membrana plasmática promove o recrutamento de cofilina e remodelamento dinâmico da actina em um dos pólos da célula migratória (Bernstein et al., 2000) (Figura 5). Assim as flutuações de pH necessárias para a montagem e desmontagem dos microtúbulos/microfilamentos permitirão a protrusão em uma das margens e a retração na margem oposta pela mudança na rigidez da estrutura do

citoesqueleto favorecendo a transição 'sólido-gelatinoso' Neste contexto, Rojas e colaboradores (2004 e 2006) e Sennoune e colaboradores (2004b), mostraram que as V-ATPases de membrana plasmática co-localizam com a actina em um dos pólos da célula.

Os microtúbulos e microfilamentos regulam o transporte de moléculas provenientes de vesículas derivadas do aparato de Golgi (Schmoranzler e Simon., 2003). Segundo Sennoune e Martinez-Zaguilan (2007), a atividade da V-ATPase pode regular proteínas do citoesqueleto necessárias para o movimento dos endossomos e lisossomos para a membrana plasmática, o que poderia contribuir não somente para um aumento da área de superfície necessária para a migração, mas também a inserção da V-ATPase na membrana plasmática.

A invasão ocorre através de uma série complexa de interações com o tecido hospedeiro. Primeiro há perda de adesão da célula tumoral aos componentes da membrana basal ou matriz extracelular. Segundo, degradação local destas estruturas dependentes da extrusão ácida. Terceiro, secreção de proteases dependentes de pH ácido e sua ativação pelo baixo pH do microambiente tumoral e quarto, aumento da locomoção da célula tumoral para dentro da região modificada. O segundo, terceiro e quarto passos são regulados tanto pelo pH intracelular quanto pelo pH extracelular (Cardone et al., 2005). O pH extracelular ácido das células tumorais, atribuído em grande parte a superexpressão de V-ATPases na membrana plasmática, aumenta a motilidade das células tumorais por induzir a formação de estruturas invasoras como os lamelipódios e filopódios, e também induz um aumento do número e comprimento dos mesmos em células metastáticas (Glunde et al., 2003).

Lamelipódios são protrusões planas que permite a célula se prender e se mover através de superfícies planas. São caracterizados por uma rede de filamentos de actina localizados na parte dianteira da célula, uma vez que células migratórias apresentam-se assimétricas. Essa assimetria é caracterizada por protrusões na parte dianteira e uma cauda de retração na parte traseira (Lefranc et al., 2005). Proteínas reguladoras como as *capping protein* (CP), complexo Arp2/3 SCAR/WAVE, tropomiosina e cofilina são também características dos lamelipódios (Smith et al., 2013). Já os filopódios são projeções citoplasmáticas finas, cilíndricas,

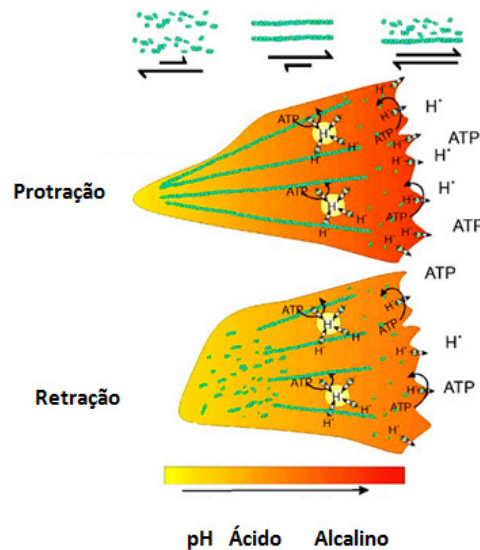


semelhante a uma agulha que se estendem além da borda da membrana em células migratórias. Eles contêm filamentos de actina em ligação cruzada, unidos por proteínas de ligação à actina, desempenham tanto papel mecânico quanto sensorial (Li et al., 2014).

Outra estrutura típica de uma célula migratória são as adesões focais. Elas podem ser definidas como complexos multiprotéicos que promovem a ligação de receptores de matriz extracelular da família das integrinas com a actina do citoesqueleto, mediando assim uma robusta adesão da célula a matriz extracelular (Zamir e Geiger, 2013). Essa ligação das integrinas a actina é mediada por proteínas de adesão focal como as FAK, paxilina, vinculina, talina e Src (Lefranc et al., 2005).

As metaloproteases (MMPs) desempenham um papel fundamental no processo de invasão. Elas são uma família multigene de endopeptidases dependentes de zinco produzidas por muitos tipos celulares, e que degradam diferentes componentes da matriz extracelular. Estão envolvidas tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (Curran e Murray, 2000). Durante o processo de invasão, as MMPs-2, 9 e 14 são conhecidas por estarem localizadas nas protrusões citoplasmáticas e uma vez que são inibidas observa-se uma redução na migração celular e invasão (Egeblad e Werb, 2002).

A adesão das células tumorais a matriz extracelular ocorre principalmente via integrinas. Essas são receptores heterodiméricos presentes na superfície celular, compostas por duas subunidades, uma subunidade  $\alpha$  e uma subunidade  $\beta$  ligadas não covalentemente. Até o momento já foram descritas 18 subunidades  $\alpha$  e 8 subunidades  $\beta$ , que podem se combinar para produzir diferentes heterodímeros com diferentes especificidades para os componentes celulares, como o colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina entre outros. As integrinas estão aptas também a induzir a sinalização intracelular por ativar a expressão de uma ampla gama de genes (Zhang e Chen, 2012). Uma migração celular eficiente requer uma endocitose e reciclagem constante de integrinas tanto quanto sua degradação, estabelecendo a reciclagem de integrinas como um passo determinante da progressão tumoral (Mellman, 2013).



**Figura 5- Mecanismo proposto pelo qual a superexpressão das V-ATPases de membrana plasmática em um dos pólos da célula modula migração/ invasão.** Neste modelo haveria um gradiente de pH que iria do mais ácido no pólo traseiro para o mais alcalino no pólo migratório, atribuído a uma superexpressão de V-ATPases no pólo migratório. Essa alcalinização do citosol promoveria o recrutamento de cofilina e o remodelamento dinâmico da actina no pólo migratório das células permitindo a protrusão no pólo migratório e a retração no pólo traseiro devido a mudanças na rigidez da estrutura do citoesqueleto. Há indícios de uma colocalização da V-ATPase com a actina do citoesqueleto, o que sugere que as V-ATPases de membrana plasmática regulem proteínas do citoesqueleto necessárias para o movimento de vesículas até a membrana plasmática, que pode contribuir não somente para a reciclagem de membrana necessária a migração/invasão como também para inserção da V-ATPase na membrana plasmática. Adaptado de Sennoune e Martinez-Zaguilan, 2007.

## 2.6. Melanoma

O câncer de pele configura-se como o mais frequente em todas as populações. Ele se apresenta basicamente sob duas formas: o melanoma e o não melanoma. Entre os cânceres do tipo não melanoma, os carcinomas basocelular e espinocelular (ou epidermóide) são os mais frequentes. Por sua vez, embora o melanoma seja menos comum do que outros tipos de câncer de pele, ele é responsável por aproximadamente 80% das mortes provocadas por câncer de pele (Palunic et al., 2016; Singh e Salama, 2016; Jeong et al., 2011). O aumento da incidência deste

câncer de pele pode ser atribuído a um aumento dos fatores de risco, tais como: características da pele do hospedeiro (pele clara, presença de nevos displásicos, susceptibilidade a radiação ultravioleta e episódios de queimadura solar), latitude geográfica, imunossupressão e história familiar de melanoma (Konstantinov et al., 2016; Palunic et al., 2016).

O melanoma cutâneo ocorre principalmente na população clara de pele branca, enquanto que a população da Ásia e da África desenvolve principalmente o melanoma acral (palma das mãos, planta dos pés, falanges terminais) e mucosal em baixas incidências (Garbe e Bauer, 2012). Os países que apresentam as maiores taxas de incidência de melanoma cutâneo são a Austrália e Nova Zelândia, chegando a aproximadamente 60 casos a cada 100.000 habitantes por ano (Erdmann et al., 2013). No Brasil, segundo levantamento feito pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram esperados para o ano de 2016, 3.000 novos casos em homens e 2.670 novos casos em mulheres, sendo a região sul do país o local de maior incidência.

O melanoma origina-se dos melanócitos, células produtoras de pigmento, derivadas da crista neural, que durante o desenvolvimento colonizam a pele, olho e uma ampla gama de tecidos ao longo do corpo (Mort et al., 2015). A transformação dos melanócitos em células tumorais é um processo que envolve múltiplos passos, fatores de interação com o ambiente, genética e histórico do indivíduo (ex: história pessoal prévia ou forte histórico familiar de melanoma e fenótipo de nevo atípico) (Konstantinov et al., 2016; Palunic et al., 2016). O pigmento melanina produzido pelos melanócitos, é um complexo macromolecular que dispersa e absorve radiação UV. Essa melanina concentra-se nos espaços perinucleares dos queratinócitos protegendo o núcleo celular de possíveis danos causados pela radiação UV (Tuong et al., 2012).

De acordo com as características histopatológicas os melanomas receberam algumas classificações. 1) Melanoma extensivo superficial caracteriza-se por uma fase de crescimento radial ou horizontal com melanócitos arranjados em ninhos ou sozinhos apresentando um padrão pagetóide. Este padrão diz respeito a migração dos melanócitos para estratos superiores da epiderme semelhante ao que ocorre na doença de Paget mamária. Ocorre em áreas de exposição solar intermitente. 2) Melanoma nodular ocorre quase que exclusivamente na fase de crescimento vertical (sem melanoma *in situ* ou com melanoma *in situ* confinado). Sua localização mais

comum é na extremidade inferior e tronco e a lesão costuma ter crescimento mais rápido que a dos outros subtipos. 3) Lentigo maligno melanoma se caracteriza por uma proliferação individual ou em ninhos de melanócitos atípicos ao longo da membrana basal da epiderme. As células atípicas são pequenas, por vezes fusiformes com nucléolo proeminente. Ao romper a membrana basal a lesão passa a se chamar lentigo maligno melanoma. 4) Melanoma lentiginoso acral tem células organizadas em unidades simples entre as junções epiderme-derme e nos focos confluentes. Em lesões mais avançadas, a disseminação pagetóide é comum bem como a formação de ninhos de melanócitos na epiderme. É mais comum surgir em um sítio acral, mas ocasionalmente pode aparecer nas mucosas (Schadendorf et al., 2015).

A invasão local do melanoma pode ser dividida em 5 estágios ou graus de invasão: os níveis de Clark. Nível I- neoplasia confinada a epiderme; nível II- invasão a derme papilar; nível III- preenchimento de toda a derme papilar; nível IV- penetração da derme reticular, nível V- invasão do tecido granular gorduroso subcutâneo (Clark et al., 1969)

Fortes evidências indicam que a exposição e os danos provocados pela luz do sol e radiação ultravioleta (UVR) (Katsambas e Nicolaidou, 1996; Gilchrest et al.; 1999), especialmente na infância desempenham um papel central na etiologia do melanoma maligno cutâneo com mais de 80% (Armstrong e Kricke, 1999) dos casos sendo atribuídos a exposição ao sol e a mortalidade relacionada ao melanoma maligno cutâneo correlacionando com a distribuição global de UVA (responsável por danos crônicos provocados pelo sol e envelhecimento da pele, diferente da radiação UVB que é responsável pelas queimaduras) (Garland et al., 2003).

A biologia molecular do melanoma cutâneo é bastante ampla. O tumor apresenta marcadores imuno histoquímicos (Mel-CAM), enzimáticos (tirosinaquinase), genéticos (CDKN2A, p53, p21) e protéicos (integrinas, ICAM-1, ciclina D1). Estudos mostram que de cada três pacientes, dois apresentam mutações no gene CDKN2A (inibidor de quinase dependente de ciclina2A) (Mackie e Hauschild, 2009), o qual codifica dois supressores tumorais distintos p16<sup>INK4A</sup> e p14<sup>ARF</sup> (Chin e Fisher, 2006). O conhecimento de tais marcadores é relevante não só para o conhecimento da etiologia e patogênese, mas também para o auxílio ao diagnóstico e prognóstico (Figueiredo et al., 2003).

Apesar da baixa incidência quando comparado aos outros cânceres, o melanoma apresenta alta taxa de letalidade. Entre os sítios mais comuns de metástase estão o fígado, pulmão e cérebro, embora qualquer órgão possa ser atingido (Moschetta et al., 2014). Mesmo com os avanços na medicina, o melanoma metastático distante, estágio IV, ainda está associado com pobre diagnóstico e a média de sobrevivência atualmente é de 6-12 meses, segundo o AJCC (American Joint Committee on Cancer).

## **2.7. Membranas biológicas e colesterol**

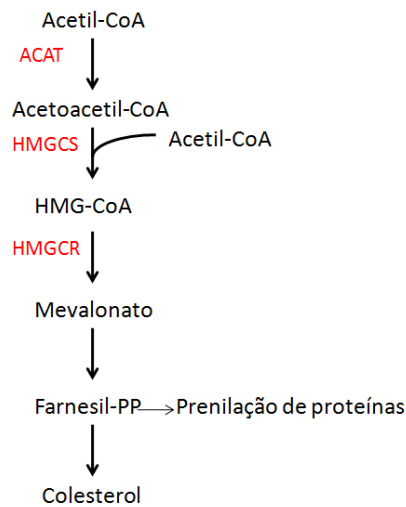
A membrana plasmática é uma entidade dinâmica. Ela funciona como uma barreira que separa o meio intracelular do ambiente extracelular e é composta por proteínas e lipídios que controlam e são controlados por muitos processos biológicos. A fração hidrofóbica composta de lipídios se autoassocia enquanto suas regiões hidrofílicas interagem tanto com o meio extracelular quanto com o meio intracelular para criar a base física da bicamada da membrana plasmática (Simons e Sampaio, 2011). Essa anfipaticidade dos lipídios é essencial para separar estruturas celulares internas do ambiente externo. As membranas plasmáticas dos eucariotos são compostas de glicerofosfolípidios, esfingolipídios e esteróis, em particular o colesterol, que corresponde a 20-25% de todos os lipídios de membrana. Evolutivamente a introdução do colesterol na membrana plasmática parece ter ocorrido após outros lipídios de membrana, pois sua presença coincide com o aumento da concentração de oxigênio no ambiente que ocorreu há aproximadamente 2.5 bilhões de anos atrás (Mouritsen e Zuckermann, 2004).

Em compartimentos endocíticos envolvidos com reciclagem e parte do complexo de Golgi, principalmente no compartimento trans-Golgi, encontra-se colesterol em abundância (Coxey et al., 1993; Mukherjee et al., 1998). Por sua vez, o retículo endoplasmático (RE) apresenta baixo conteúdo de colesterol, cerca de 1% do conteúdo de colesterol total da célula (Lange, 1991). A concentração de colesterol do RE parece controlar muitas funções que estão relacionadas ao transporte de membrana envolvendo a rota RE e RE-Golgi, como a regulação da maquinaria homeostática do esteroide (Goldstein et al., 2006), a atividade das proteínas residentes

no RE e a saída de proteínas de membrana sintetizadas no RE (Runz et al., 2006; Ridsdale et al., 2006).

O colesterol aumenta a rigidez e a espessura da bicamada lipídica (Roduit et al., 2008) e permite o tráfego de proteínas (Lundbaek et al., 2003). Estruturalmente, o colesterol é constituído por 4 anéis de hidrocarbonetos ligados a um grupo hidroxila em uma ponta e uma cauda de hidrocarbonetos na outra, isso confere-lhe propriedades biofísicas que aumentam a coesão e o empacotamento de lipídios vizinhos. Por conta da estrutura rígida de esterol, o colesterol está posicionado preferencialmente na proximidade de cadeias de hidrocarbonetos saturados de lipídios vizinhos, uma vez que eles são mais inflexíveis e alongados do que os lipídios insaturados. Esse aumento da difusão lateral de lipídios, causado pelo colesterol, afeta as propriedades biofísicas da membrana por diminuir a fluidez e reduzir a permeabilidade de moléculas polares (Simons e Vaz, 2004).

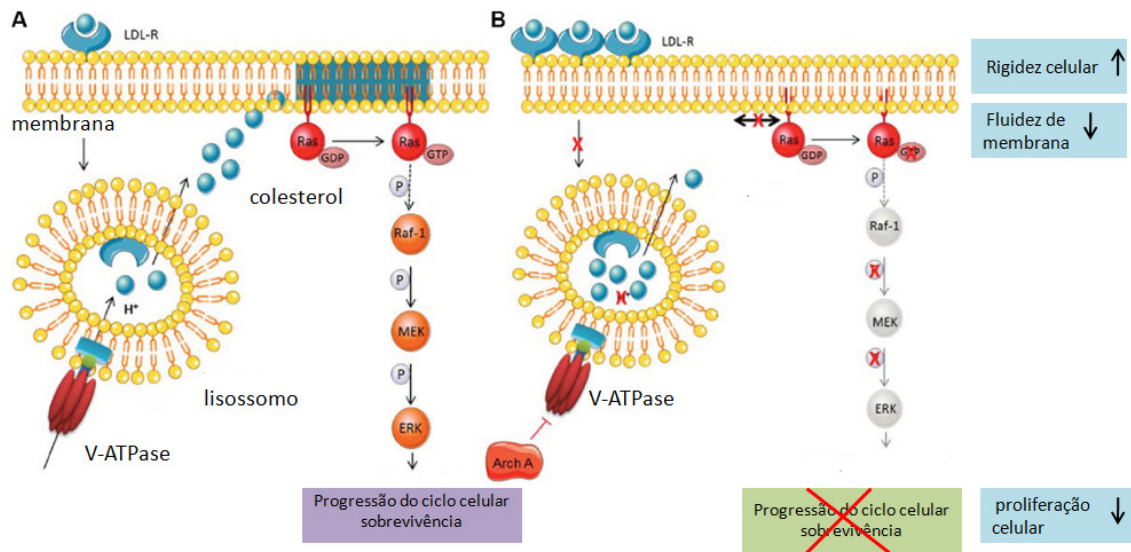
O colesterol é sintetizado a partir do Acetil-CoA através da via do mevalonato (Figura 6). Inicialmente, o Acetil CoA é convertido em acetoacetil-CoA e depois em mevalonato pela enzima HMG-CoA sintase e redutase (HMGCS e HMGCR, respectivamente). A conversão subsequente do mevalonato a colesterol envolve a ação coordenada de inúmeras enzimas que são parte dessa via. Além do importante papel que desempenha como constituinte da membrana, o colesterol também fornece o esqueleto estrutural para a síntese de hormônios esteróides como progesterona e estrogênio (Baenke et al., 2013).



**Figura 6- Rota simplificada da síntese de lipídios.** Adaptado de Baenke et al., 2013

Sabe-se que células tumorais apresentam alterações nas vias associadas aos lipídios e colesterol (Ackerman e Simon, 2014; Cruz et al., 2013). Células tumorais altamente proliferativas apresentam uma avidez por lipídio e colesterol que elas satisfazem de duas maneiras. A primeira envolve o aumento da absorção de lipídios e lipoproteínas exógenos (ou da dieta) e a segunda através da superativação de sua síntese (lipogênese e síntese de colesterol, respectivamente). O excesso de lipídio e colesterol é armazenado na célula de câncer sob a forma de gotícula, e uma grande quantidade dessas gotículas e de ester-colesterol estocado nos tumores (Qiu et al., 2015; Guillaumond et al., 2015) são agora considerados passo chave da agressividade do câncer (Abramczyk et al., 2015).

Atualmente, a V-ATPase vem sendo relacionada ao metabolismo do colesterol. De acordo com Hamm e colaboradores (2014) a inibição da V-ATPase pelo archazolid interfere no metabolismo de colesterol e isso acaba sendo o principal mecanismo de resistência a droga em células de câncer de bexiga. Essa inibição da V-ATPase provoca não somente o aprisionamento do colesterol nos lisossomos, como também diminui os níveis de colesterol livre e leva a depleção de colesterol na membrana plasmática, o que por sua vez altera propriedades biofísicas da célula de câncer como a rigidez e polaridade da membrana plasmática, e interfere na sobrevivência, proliferação e migração celular (Bartel et al., 2016) (Figura 7). Dessa forma, fica evidente a importância de se explorar a relação da V-ATPase com o colesterol.



**Figura 7- Inibição da V-ATPase e mobilização de colesterol.** (A) Sob condições fisiológicas as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) se ligam a seus receptores (LDL-R) e são internalizadas. A V-ATPase acidifica o endo-lisossomo, provocando a dissociação da LDL de seu receptor, seguida de sua clivagem. O colesterol livre é então liberado no citosol, podendo ser usado na construção de outras moléculas ou incorporado a membrana plasmática. A GTPase Ras, localizada principalmente nos MDMs enriquecidos em colesterol, regula diferentes vias de sinalização levando a proliferação e sobrevivência celular. (B) A inibição da V-ATPase pelo archazolid previne a acidificação dos endo-lisossomos e o colesterol acumula-se em seu interior. A perda de colesterol livre causa a depleção de colesterol da membrana e o rompimento dos MDMs enriquecidos em colesterol. Como consequência, Ras não pode ser ativada e a sinalização *downstream* é inibida. Adaptado de Bartel et al., 2016.

## 2.8. Microdomínios de membrana e câncer

Os microdomínios de membrana (MDMs) também chamados de rafts lipídicos ou rafts de membrana podem ser definidos como estruturas ricas em esfingolipídios e colesterol. Eles organizam receptores, várias moléculas e participam da regulação downstream de inúmeras vias de sinalização (Grzybek et al., 2005; Pike, 2006). Há dois tipos principais de MDMs: aqueles que contêm a proteína caveolina (Cav)



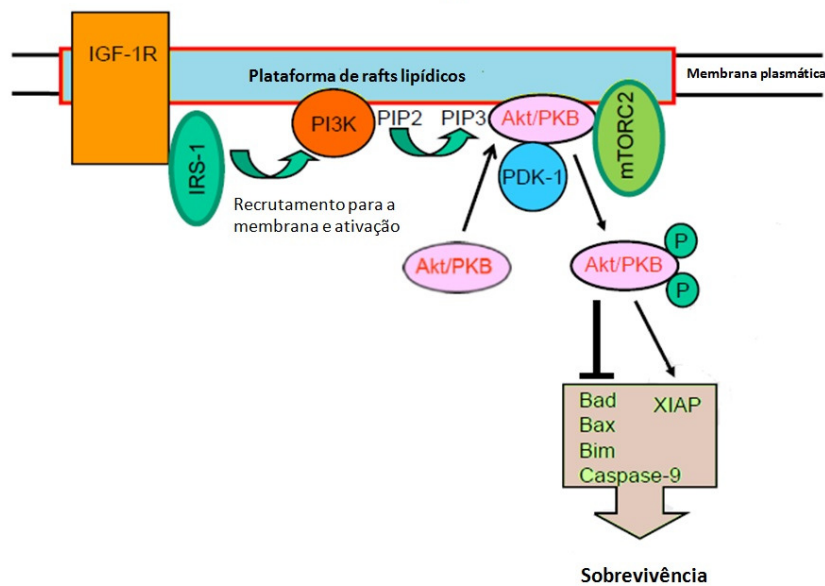
ligada ao colesterol e aqueles que não a possuem. Os MDMs que contêm Cav formam as cavéolas, invaginações do tipo frasco que são detectáveis por microscopia eletrônica, enquanto os MDMs que não contêm Cav são planos e não identificáveis por microscopia. A proteína caveolina se destaca como sendo a principal marcadora dos MDMs do tipo caveolar (Aboulaich et al., 2004), enquanto que nos MDMs planos tem sido encontrado as proteínas flotilina-1/ reggie-2 e flotilina-2/reggie-1 (Frick et al., 2007; Lang et al., 1998).

Entre as vias de sinalização reguladas pelos MDMs encontram-se a via de sinalização Akt. Esta contribui para a progressão do tumor por promover invasividade e angiogênese (Crowell et al., 2007; Hill e Hemmings, 2002). Outras moléculas encontradas nos MDMs são os receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFRs Erb-1, HER1 em humanos). Sua ativação leva a um aumento da proliferação celular, motilidade e diminuição da apoptose. Desempenham papel também na transição epitelial mesenquimal, na regulação das MMPs e nos fatores de crescimento angiogênico VEGF-A, (Gusterson e Hunter, 2009), bem como na angiogênese tumoral (Arteaga, 2003). Os EGFRs são encontrados tanto nos MDMs caveolares (Mineo et al., 1996; Couet et al., 1997; Engelman et al., 1998; Abulrob et al., 2004) quanto nos não caveolares (Ringerike et al., 2002; Roepstorff et al., 2002; Amaddii et al., 2012). Em ambos os casos, sua localização nesses dois diferentes tipos de MDMs promove a ativação de receptores, regulação e interação com outras proteínas sinalizadoras, induzindo a transdução de sinais oriundos de vias de sinalização como a MAPK e Akt. Em células de glioblastoma, a liberação de EGFR para fora das cavéolas aumenta a fosforilação do receptor induzida por ligante e está associada com um fenótipo mais invasivo (Abulrob et al., 2004).

A literatura descreve a presença do complexo de canais KCa/Ca<sup>2+</sup> nos MDMs. Estes canais sozinhos ou associados em complexos nos MDMs desempenham um importante papel na proliferação e migração de células tumorais malignas, essencial para o desenvolvimento do tumor. Em paralelo, os MDMs são necessários para a sinalização HER (receptor de fator de crescimento epidérmico humano) eficiente e a ativação de HER gera variações de Ca<sup>2+</sup> intracelular que pela formação do complexo Ca<sup>2+</sup>/CaM (Calmodulina) também controla HER. Isto sugere que os MDMs organizam HER, os canais de Ca<sup>2+</sup>, KCa e Ca<sup>2+</sup> em um complexo com o objetivo de regular as vias de sinalização dependentes de Ca<sup>2+</sup> intracelular

que regulam proliferação celular, apoptose e migração em células tumorais malignas (Guéguinou et al., 2014).

Outras moléculas também presentes nos MDMs são os IGF (fator de crescimento do tipo insulina). Os IGFs desempenham papel importante na proliferação celular, diferenciação e apoptose, sendo cruciais para o desenvolvimento e progressão do câncer (Baserga et al., 2003; Pollak et al., 2004; Surmacz, 2003). O sistema IGF compreende dois receptores homólogos, o receptor de insulina (IR) e o receptor IGF-1 (IGF-1R) e um terceiro receptor não relacionado, o receptor de manose-6-fosfato (M6P/IGF-IIR). A ativação desses receptores leva a ativação de vias de sinalização intracelulares específicas como Ras/Raf/mitógeno-ativada (MAPK) e a rota de sinalização PI3K classe I que promove a sobrevivência celular (El-Shewy e Luttrell, 2009; Oates et al., 1998)(Figura 8).



**Figura 8- Modelo esquemático da sinalização IGF-1R/PI3K/Akt na geração de sinais de sobrevivência e antiapoptótico.** Adaptado de Mollinedo e Gajate, 2014.

Por outro lado os MDMs também abrigam receptores de morte celular como Fas/CD95. Já existe relato na literatura da indução de apoptose dependente de Fas/CD95 em células de leucemia mediante tratamento com drogas que alvejam os fosfolípidios, como por exemplo edelfosina eter fosfolípido, um protótipo de uma família de componentes chamados análogos de alquilfosfolípídios sintéticos (APLs), ou lípidios antitumorais (ATLs) (Gajate e Mollinedo, 2002; Mollinedo, 2007, 2014;

Mollinedo et al.,2004). Foi visto que o tratamento com a edelfosina promove o deslocamento do receptor de morte Fas/CD95 para os MDMs em células Jurkat (leucemia de célula-T aguda) e células de leucemia mielóide aguda humana HL-60. O tratamento com M $\beta$ CD (methyl- $\beta$ -cyclodextrin), droga que provoca depleção de colesterol, inibiu tanto o agrupamento de Fas/CD95 induzido por edelfosina quanto a apoptose, isso reforça o papel dos MDMs na apoptose mediada por receptor (Gajate e Mollinedo, 2001).

Entre as inúmeras vias de sinalização envolvidas com a migração celular, uma que se destaca em melanomas é a via de sinalização Src-RoA-Rho quinase (ROCK). Em trabalho realizado por Wang et al., 2013, foi demonstrado que os MDMs controlam a migração de células de melanoma por inibir a desmontagem das adesões focais. Os MDMs contribuem para a desmontagem das adesões focais através da dinâmica da actina do citoesqueleto mediada pela via de sinalização Src-RoA-Rho quinase (ROCK). Src é um receptor não tirosina quinase, marcador de raft lipídico, que controla negativamente RhoA, que por sua vez está envolvido com a formação de fibras de estresse. No trabalho, o uso de M $\beta$ CD, provocou um deslocamento de Src para fora dos MDMs, o que causou sua inativação, e uma super ativação de RhoA levando a formação de robustas fibras de estresse e inibindo a desfosforilação das proteínas de adesão como a vinculina e paxilina e a internalização da integrina  $\beta$ 3, o que resultou na supressão da desmontagem das adesões focais com conseqüente inibição da migração.

## **2.9. M $\beta$ CD - depleção farmacológica de colesterol**

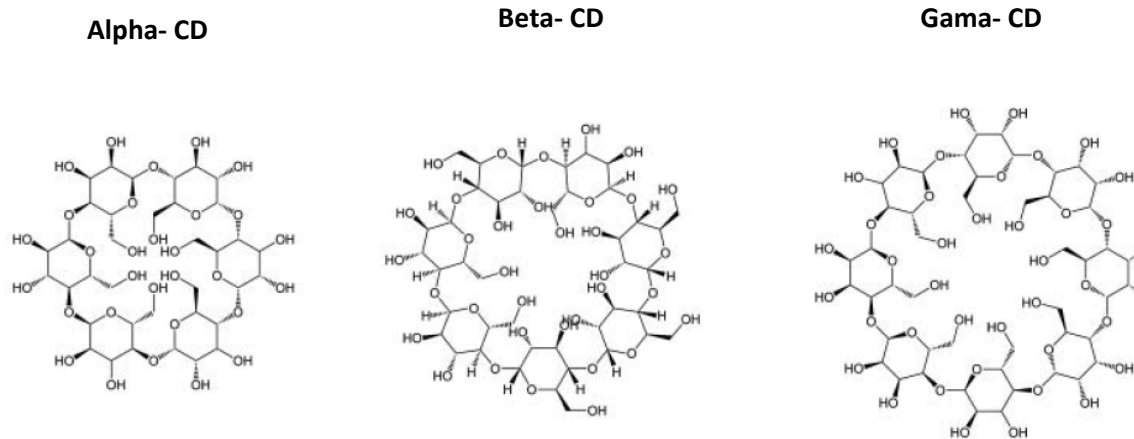
As ciclodextrinas (CDs) são uma família de oligômeros de glicose cíclica que possuem uma superfície polar e uma cavidade hidrofóbica com um diâmetro de 5-8 ângström, capaz de acomodar pequenas moléculas hidrofóbicas. As ciclodextrinas são nomeadas de acordo com o número de unidades de glicose presentes em sua estrutura. As  $\alpha$ -ciclodextrinas possuem seis moléculas de glicose em sua estrutura, as  $\beta$ -ciclodextrinas sete moléculas de glicose e as  $\gamma$ -ciclodextrinas oito moléculas de glicose (Besenicar et al. 2008; Choi et al. 2001; Ohvo and Slotte 1996; Roux et al. 2002) (Figura 9). As CDs têm sido usadas em pesquisas científicas importantes, na

indústria farmacêutica /cosmética e também têm tido aplicações tecnológicas (Duchene e Wouessidjewe 1992; Hedges 1998; Loftsson e Duchêne 2007).

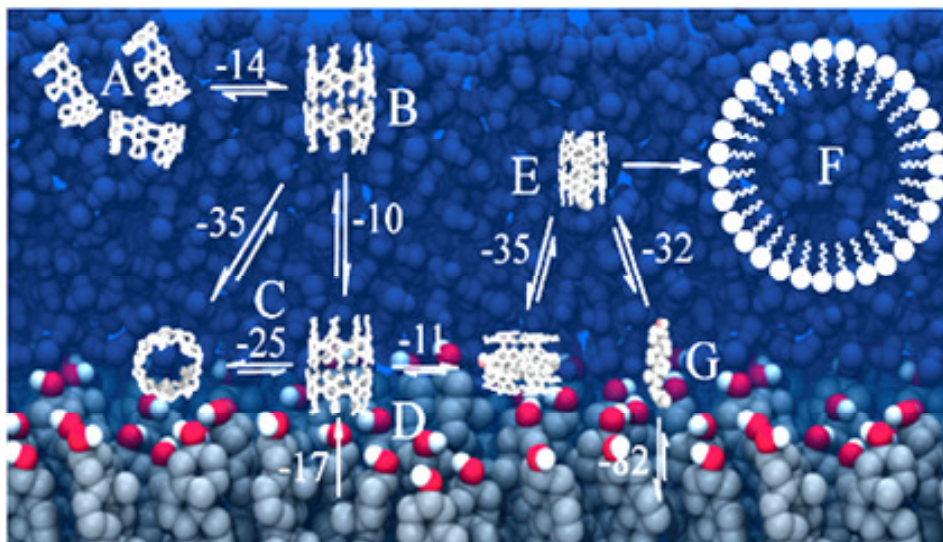
$\beta$ -ciclodextrina e seus derivados methyl-  $\beta$ -ciclodextrin (M $\beta$ CD) e 2-hydroxypropyl-  $\beta$ -ciclodextrin são os mais usados em estudos de manipulação de colesterol em membranas (Besenicar et al., 2008). Os sistemas modelo usados para estudar o mecanismo e os parâmetros moleculares envolvidos na extração de colesterol pelo M $\beta$ CD consistem basicamente em: monocamada (Ohvo e Slotte 1996) e bicamada de lipídios suspensas (Giocondi et al., 2004), misturas artificiais de vesículas unilamelar gigantes (GUV's) (Veatch e Keller, 2003) e membranas naturais (de la Serra et al., 2004). A manipulação do colesterol de membranas usando o M $\beta$ CD tem sido uma ferramenta muito utilizada para estudar os domínios de membrana enriquecidos em colesterol (Jaureguiberry et al., 2010; Lafont et al., 2002; Zidovetzki e Levitan, 2007 ).

López e colaboradores (2011) propuseram um mecanismo molecular de extração de colesterol de membranas pelas CDs que envolve vários passos: i) em uma solução aquosa as CDs se associam e formam dímeros, ii) esses dímeros podem assumir a configuração inclinada ou não, iii) nesta última conformação as CDs estão aptas a extrair colesterol, permitindo a formação de um complexo ligado a superfície da membrana, iv) essa conformação permite a adsorção do colesterol para dentro das CDs, v) ocorrendo assim a dessorção do complexo colesterol/CD da interface. Somente este último passo seria dependente de energia livre (Figura 10)

A literatura associa o uso do M $\beta$ CD à inibição da migração direcional de células, adesão celular induzida por EGF (fator de crescimento epidérmico), polimerização da actina, fosforilação de Akt, translocação de proteína quinase, indicando que os MDMs exercem um papel significativo no crescimento das células tumorais malignas e na metástase (Liu et al., 2007).



**Figura 9- Estrutura química das ciclodextrinas.** Adaptado de Higuchi et al., (2010)



**Figura 10- Modelo do mecanismo molecular de extração de colesterol pelas CDs.** A- Associação das CDs em meio aquoso levando a formação de dímeros. B- Ligação dos dímeros a superfície da membrana. C- Os dímeros assumindo a conformação inclinada ou não inclinada. C- A conformação não inclinada está apta a extrair colesterol das membranas. D- Formação de um complexo ligado à membrana. E- A desorção do complexo traz o colesterol para solução. F- Transferência do colesterol em solução para outras membranas. G- A desorção direta de colesterol é energeticamente muito mais cara. Adaptado López et al., 2011.

### **3. HIPÓTESE**

Muito além da simples indução do processo de acidificação do meio extracelular e ativação de proteases, postulamos que as V-ATPases superexpressas na membrana plasmática de células tumorais atuem na modulação de eventos de invasão, migração e metástase, via sinalização iônica mediada por ativações específicas destas bombas as quais resultariam em oscilações espaço-temporais de íons  $H^+$  resultantes. A presente tese testa a hipótese de que o colesterol e MDMs enriquecidos com este lipídeo exerçam papel chave no controle destas ativações das V-ATPases e dos processos dependentes do gradiente eletroquímico e sinalizações iônicas gerados pela bomba, como a migração e invasão de células tumorais.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Descrever um papel mais amplo para as V-ATPases não somente restrito a acidificação do microambiente tumoral, analisando a influência da depleção de colesterol sobre as V-ATPases e os processos de migração e invasão dependentes da atividade dessa bomba de prótons.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Isolar os MDMs da linhagem de melanoma B16-F10 (linhagem celular modelo de melanomas de alto potencial metastático);

Investigar a presença das V-ATPases nesses microdomínios de membrana;

Analisar a influência da depleção de colesterol sobre a atividade hidrolítica e de transporte de prótons das V-ATPases em B16-F10;

Avaliar a influência da depleção de colesterol sobre a morfologia das células;

Analisar a influência da inibição das V-ATPases e da depleção de colesterol sobre a migração e invasão celular das linhagens de melanoma murino e melanócito;

Comparar o fluxo de prótons entre as linhagens B16-F10, B16-F0 e Melan-A usando o SIET (Scanning Ion-selective Electrode Technique) após inibição da V-ATPase e depleção de colesterol;

Determinar o pH do meio usando o SIET após inibição da V-ATPase e depleção de colesterol;

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Linhagens celulares**

As células tumorais selecionadas para testar as hipóteses propostas são duas linhagens de melanoma murino B16-F10 (Sloane et al., 1982) e B16-F0 muito e pouco metastático, respectivamente, adquiridas no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e a linhagem não tumoral Melan-A (Danga et al., 2015), usada como controle, gentilmente cedida pelo grupo da professora Ana Paula Votto (UFRGS). As células foram mantidas em meio de cultura (DMEM-Sigma D1152), pH 7.0-7.2, suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibiótico/antimicótico 100x (Life Technologies) em estufa a 37 °C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. A troca do meio foi efetuada duas vezes por semana.

### **5.2. Reagentes utilizados**

O inibidor de V-ATPase Conc A (concanamycin A- C9705) e o M $\beta$ CD (Methyl-  $\beta$ -Ciclodextrin-C4555) foram obtidos da Sigma-Aldrich. A Conc A foi dissolvida em DMSO (Dimethyl sulfoxide- Sigma Aldrich D8418), para se obter a concentração de 5 nM. Já o M $\beta$ CD foi dissolvido em água ultrapura para se chegar a concentração de 5 mM. Para a revelação nos ensaios de imunoblotting foi utilizado o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, GE healthcare life sciences). O Matrigel (Matrigel Matrix- 354-248, Corning), foi diluído em água ultra pura estéril e sempre manipulado no gelo. O MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide- M5655, Sigma Aldrich) também foi diluído em água ultra pura estéril para se chegar na concentração estoque de 5 mg/mL. O meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium- D1152) foi obtido da Sigma Aldrich.

### **5.3. Teste de citotoxicidade**

O teste de citotoxicidade do inibidor de V-ATPase, Conc A e o do M $\beta$ CD foram efetuados utilizando o ensaio de MTT. Para este ensaio, as células foram



plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL, num volume final de 200  $\mu$ L. Após 12 horas em estufa a 37<sup>o</sup> C, 5% de CO<sub>2</sub> para aderência, as células foram incubadas com a Conc A e M $\beta$ CD por 24 horas. Ao final da incubação, 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml) foram adicionados em cada poço e 3 h depois o sobrenadante da placa foi removido e os cristais formados solubilizados em DMSO. As densidades óticas (D.O) obtidas foram convertidas em percentual de citotoxicidade. Foram utilizados como controle positivo as células tratadas com Triton X-100 2% (controle positivo ou D.O. c+) e as células não tratadas (controle negativo ou D.O.c-). A leitura foi feita por espectrofotômetro de placa a 570 nm (adaptado de Raso et al., 2001).

#### 5.4.. Análise da morfologia celular

Sabendo-se da importância da morfologia das células para os processos de migração/invasão, a morfologia das células foi analisada depois de tratamento com o M $\beta$ CD, que rompe a integridade dos MDMs por provocar depleção de colesterol. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços *overnight* e então incubadas com DMEM/SFB 1% contendo 5 mM de M $\beta$ CD, por 1, 2, e 3 h em estufa, a 37 °C e atmosfera a 5% de CO<sub>2</sub>. As alterações morfológicas foram investigadas usando microscopia de contraste de fase, em objetiva de 20X. As células foram classificadas como espiadas, fusiformes e arredondas e quantificadas (adaptado de Wang et al., 2013).

#### 5.5. Isolamento dos MDMs

A preparação dos MDMs foi feita por centrifugação em gradiente de densidade. As células ( $2 \times 10^7$ ) tratadas com ou sem 5 mM de M $\beta$ CD por 3 h foram raspadas e centrifugadas a 300 x g por 10 min, o pellet lisado em tampão de lise no gelo (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 mM de PMSF, 1  $\mu$ g/mL de aprotinina/leupeptina, 50 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de pirofosfato de sódio e 1 mM de vanadato de sódio). Os lisados foram homogenizados com dez *strokes* em um homogenizador e passados 30 vezes por uma seringa com agulha de calibre 22. O homogenato (400  $\mu$ L) foi depositado sobre um volume igual de 80% de sacarose dissolvida em tampão MNE (25 mM de MES,

pH 6.5, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM de PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de aprotinina), e então sobrepostos com 800  $\mu\text{L}$  de sacarose a 30% seguido por 400  $\mu\text{L}$  de sacarose a 5%. O gradiente foi ultracentrifugado a 200.000 x g, 4°C por 14 horas em microultracentrífuga. Doze frações (165  $\mu\text{L}$ / fração) foram obtidas do topo até a parte de baixo do gradiente (adaptado de Wang et al., 2013).

## 5.6. Dosagem de proteína

As frações obtidas do isolamento do MDM tiveram o seu conteúdo de proteínas totais dosado pelo método de Bradford (1976). A solução de Bradford foi preparada com 100 mg de comassie blue, 50 mL de etanol sobre agitação durante 1 hora, depois foram adicionados 100 mL de ácido ortofosfórico e o volume completado para 1000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, a solução foi então filtrada em papel filtro 4 vezes. A curva padrão foi obtida utilizando solução de BSA 1 mg/mL diluída a concentrações variando de 2 a 18  $\mu\text{g}$ , completando o volume para 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura e adicionando 900  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford. Para dosar o conteúdo protéico das amostras foram utilizados 90  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura, 10  $\mu\text{L}$  amostra e 900  $\mu\text{L}$  de Bradford e após 15 minutos foi feita a leitura a 595 nm no espectrofotômetro.

## 5.7. Dot blotting

As membranas de nitrocelulose foram embebidas em PBS, secas *overnight*. Em seguida foram adicionadas as frações (10  $\mu\text{g}$  de proteína) resultantes do isolamento do MDM da linhagem B16-F10 à membrana de nitrocelulose. Após serem bloqueadas (5% [w/v] leite em pó desnatado em tampão fosfato), as membranas de nitrocelulose foram incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-flotilina-2 (Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:100, anti-integrina  $\beta 1$  (Abcam) na diluição 1:1.000; anti-integrina  $\beta 3$  (Abcam) na diluição 1:1000. A reação foi detectada com o anticorpo secundário de camundongo conjugado à peroxidase (GE Healthcare Life Sciences), para flotilina-2 e anticorpo secundário de coelho conjugado a peroxidase (Abcam) para as integrinas e reveladas com o kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent.

## 5.8. Western blotting

As análises de *western blotting* foram úteis para identificar em qual fração proveniente do isolamento de MDM encontram-se as V-ATPases. A reatividade imunológica da V-ATPase foi detectada em baixas concentrações protéicas, a fim de prevenir a saturação da reatividade cruzada. Membranas totais (10 µg) isolada da linhagem B16-F10 foram separadas em 10% (w/v) SDS-PAGE e transferidas para a membrana de nitrocelulose. Após ser bloqueada (5% [w/v] leite em pó desnatado em tampão fosfato), uma membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpo policlonal anti-subunidade B da V-ATPase (Santa Cruz Biotechnology). O primeiro anticorpo reconheceu todas as isoformas da enzima na diluição de 1: 250. A reação foi detectada com o anticorpo secundário de coelho conjugado à peroxidase (GE Healthcare), para V-ATPase revelado pelo kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent.

## 5.9. Ensaios de migração celular

### 5.9.1. Ferimento em monocamada

Este experimento permite acompanhar a velocidade com que as células reparam o ferimento provocado por uma ponteira de uma pipeta, devido a capacidade da célula de reorganizar e direcionar os componentes do citoesqueleto para tal tarefa. As células na concentração de  $5 \times 10^4$ /mL foram plaqueadas em uma placa de 24 poços e incubadas *overnight* em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Com um tip de uma pipeta de 10 µL foi provocado um ferimento na porção mediana do poço. Os poços foram lavados 2x com PBS, foi adicionado DMEM/SFB 1%. As células foram tratadas com 5 nM de Conc A, inibidor de V-ATPase, e 5 mM de MβCD seguindo incubação em estufa a 37 ° C, 5% CO<sub>2</sub>. O ferimento foi fotografado e medido usando o software Axio vision Release 4.8.2 nos tempos 0, 6 e 12 h para acompanhamento do reparo da ferida em microscópio óptico invertido, contraste de fase, objetiva de 10 vezes. Foram escolhidos três campos aleatórios para medida da distância de uma margem a outra do ferimento em cada micrografia e três micrografias de cada tratamento para verificação da velocidade de reparo da ferida. Sendo, migração, denominada

porcentagem de reparo = distância ( $\mu\text{m}$ ) no tempo 0 h - distância ( $\mu\text{m}$ ) no tempo 24 h x 100/ distância ( $\mu\text{m}$ ) no tempo 0 h (adaptado de Castellone et al., 2011).

### **5.9.2. Transwell**

As células foram mantidas *overnight* em meio livre de soro, ressuspendidas nesse mesmo meio, ajustadas para um volume de  $1 \times 10^5$  células/mL e semeadas na parte de cima da câmara do transwell. Após 3 h de incubação para adesão das células, foram adicionados 5 nM de Conc A e 5 mM de M $\beta$ CD. Na parte inferior da câmara foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de DMEM/SFB 10% e 6  $\mu\text{L}$  de fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após 14 h de incubação as células que migraram para a parte inferior da membrana foram coradas com cristal violeta 0,05%, fotografadas (20X) e contadas. Quatro experimentos independentes foram realizados (adaptado de Kamath et al., 2001).

### **5.10. Ensaio de invasão**

As membranas do *transwell* foram revestidas com 50  $\mu\text{L}$  de Matrigel diluído na proporção 1:2 em água ultrapura estéril e incubadas 1 h em estufa a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após, as células na concentração de  $1 \times 10^5/\text{mL}$  foram semeadas na parte de cima da câmara do *transwell*. Após 3 h de incubação para adesão das células, foram adicionados 5 nM de Conc A e 5 mM de M $\beta$ CD. Na parte inferior da câmara foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de DMEM/SFB 10% e 6  $\mu\text{L}$  de fibronectina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As células que conseguiram invadir o Matrigel e migrar para a parte de baixo da membrana foram coradas com cristal violeta 0,05%, fotografadas (20X) e contadas. Quatro experimentos independentes foram realizados (adaptado de Kamath et al., 2001).

### **5.11. Medida do fluxo de prótons usando o sistema SIET (*Scanning Ion-selective Electrode Technique*)**

As medições do fluxo de prótons em células vivas foram realizadas utilizando o sistema SIET, eletrodos vibráteis íons-seletivos, que consiste em uma ferramenta altamente sensível, capaz de medir correntes iônicas extremamente pequenas que fluem através de um meio líquido condutor.

Foram analisadas três linhagens celulares, B16-F10, B16-F0 e Melan-A. As mesmas foram plaqueadas em placas de cultivo, mantidas em DMEM/SFB 1%, pH 7,4 em estufa 5% CO<sub>2</sub> *overnight*.

Os microeletrodos vibráteis ion-específicos foram produzidos como descritos por (Feijó et al., 1999). Estes foram produzidos de microcapilares de borosilicato com diâmetro exterior de 1,5 mm e 1,12 mm de diâmetro interior ([www.sutter.com](http://www.sutter.com)), utilizando o aparelho Puller Flaming Brown, Sutter P-98 (Sutter Instruments, Novato, CA). Posteriormente, os microeletrodos foram colocados sob um suporte de vidro coberto por um becker de vidro (1 L) e secos em estufa à 250 °C por 3 horas. Após este período, foi realizada a silanização dos microcapilares, por exposição a vapor de N, N-dimetiltrimetilsilamina (C<sub>5</sub>H<sub>15</sub>NSi, Fluka 41716), ainda na estufa por 20 minutos e deixados para secar por mais 3 horas, na mesma temperatura. Após a vaporização com silano (C<sub>5</sub>H<sub>15</sub>NSi), os microeletrodos foram preenchidos com uma solução de eletrólito (15 mM KCl e 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0, para H<sup>+</sup>) correspondente a uma coluna de 1,5 mm do eletrodo. Após esta etapa, foram preenchidos na ponta, com uma coluna de 20 a 25 µm do respectivo coquetel seletivo, contendo o ionóforo respectivo ao íon estudado (Fluka, Milwaukee, WI). Para estabelecer o contato elétrico com o meio, foi inserido na extremidade basal do microeletrodo, um suporte com um eletrodo de Ag/AgCl (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA).

O eletrodo de referência foi uma referência seca (DRIREF-2, World Precision Instruments), inserido no meio de banho da amostra. Sinais foram medidos pelo amplificador ([www.applicableelectronics.com](http://www.applicableelectronics.com)), sendo a vibração e o posicionamento do eletrodo obtidos através de motores posicionais (stepper-motors), os quais permitem um movimento tridimensional. O controle dos motores, a aquisição de dados e o seu processamento preliminar foram ajustados no software ASET (Science Wares [East Falmouth, MA] – [www.sciencewares.com](http://www.sciencewares.com)). A calibração dos

eletrodos foi realizada por medição do potencial (mV) registrado em três soluções contendo o íon em estudo, em pHs conhecidos: 6,0, 7,0 e 8,0.

A coleta dos dados da microsonda vibrátil seletiva, foi realizada pelo software ASET, que fornece a informação necessária para calcular o fluxo iônico em um determinado ponto [x, y, z] do espaço, por meio da lei de Fick ( $J = D (dc/dx)$ ). O coeficiente de difusão (D) é um valor tabelado para cada íon (de acordo com Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.). A diferença espacial (dx) resulta do cálculo da distância entre os dois pontos em que foram realizadas as medições das concentrações para cálculo do fluxo (15  $\mu\text{m}$ ). A diferença de concentração (dc) é um vetor que varia ao longo do ensaio. Em cada ponto, a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no dado ponto e da equação previamente determinada para o ionóforo durante ao processo de calibração.

#### **5.12. Fracionamento celular e purificação de membrana plasmática**

As células foram lavadas 2x com PBS, raspadas com rodinho em tampão de lise (200 mM de sacarose, 20 mM de MOPS, 1 mM de PMSF, 1 mM de benzamidina, coquetel de inibidores 1:1, 0,03% de BSA, e 200 mM de DTT). Em seguida foram passadas pelo sonicador em três ciclos de 10 segundos, homogenizadas com 10 *strokes* em homogenizador e centrifugadas a 1000 x g por 10 minutos a 4 °C para remover núcleo e debris. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g por 30 minutos a 2 °C. O pellet foi ressuscitado em tampão de ressuspensão (tampão de lise, 10 mM de glicerol, 25 mM de benzamidina, 20 mM de PMSF, coquetel de inibidores 1:1 e 25 mM de DTT) e depositado no topo do gradiente de sacarose (25% e 46%). As amostras foram centrifugadas novamente a 100.000 x g por 2 h e 45 minutos a 2 °C e a fração da interface (entre 25% e 46% de sacarose) enriquecida com V-ATPases foi coletada e congelada em nitrogênio líquido.

#### **5.13. Atividade de hidrólise de ATP da V-ATPase**

Para medir a atividade enzimática da V-ATPase foi utilizado meio de reação contendo 20 mM de HEPES, 5 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 100 mM de KCl, 0,2 mM de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0,2 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Para revelar a atividade da V-ATPase foi usado o inibidor

específico Conc A 5 nM. A reação foi disparada com a adição da fração de membrana isolada em gradiente de sacarose 25% e 46% (0,030 mg/mL de proteína) e parada após 30 minutos de incubação, pela retirada de alíquotas que foram imediatamente transferidas para uma placa de 96 poços contendo TCA (ácido tricloroacético) a 5%, mantida em gelo. Para revelar o fosfato liberado pela hidrólise de ATP foi empregado o método de Fiske e Subbarow (1925), e a leitura feita em leitor de placas a 750 nm.

#### 5.14. Atividade de transporte de prótons

A determinação do gradiente de  $H^+$  segue o protocolo descrito por Okorokov e Lichko (1983) realizado no espectrofluorímetro (Shimadzu RF-5301 PC) com abertura de 5/10 nm e com comprimento de onda de excitação 415 nm e de emissão 485 nm. A formação do  $\Delta pH$  através das membranas pelo transporte de  $H^+$  realizado pela  $V$ -ATPase é realizada por meio de solução contendo: 100 mL de  $MgSO_4$  50 mM (2,5 mM de concentração final); 50 mL de KCl 2 M (50 mM de concentração final); 10 a 100 mL de vesículas de membrana, volume dependente da atividade, de modo que a amplitude máxima ( $F_{m\acute{a}x}$ ) não ultrapasse 50% de decaimento da fluorescência; tampão MOPS-KOH (sacarose 12,5 %, MOPS-KOH 20 mM, pH 7,2) em quantidade necessária para completar 2 mL do volume final. Em seguida, são adicionados 3 mL da sonda fluorescente ACMA 1 mM (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine, sonda fluorescente capaz de ligar-se aos  $H^+$  e atravessar as membranas biológicas). Após três minutos de incubação (ou tempo necessário para estabilização da fluorescência) acrescenta-se ATP-KOH 100 mM pH 7,2 (concentração final de 1 mM). A cinética de extinção da fluorescência (“*quenching*”) é monitorada até atingir o equilíbrio entre o efluxo e o influxo de prótons “*steady-state*”, quando é adicionado  $NH_4Cl$  2 M (concentração final de 20 mM) a fim de paralisar a reação, desfazendo o gradiente protônico estabelecido.

Para análise da  $V$ -ATPase segue-se o mesmo procedimento, adicionando-se o inibidor específico da  $V$ -ATPase, a Conc A 110 mM (concentração final de 11,5  $\mu M$ ) ao tampão de incubação. A atividade de  $V$ -ATPase é determinada pela atividade total menos a atividade Conc A-insensível. A velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) e da fluorescência máxima ( $\Delta F_{M\acute{a}x}$ ) na suspensão de vesículas de membranas é determinada a partir dos dados gráficos obtidos durante as análises. Sendo utilizadas as seguintes fórmulas:

$V_0 = [F_0 / (F_{\text{máx}} * t)] * 100$ , onde:

$V_0$ : velocidade inicial de formação de  $\Delta\text{pH}$  (%);

$F_0$ : fluorescência dependente de  $V_0$  num tempo  $t$ , determinado pela extrapolação da maior inclinação inicial para o eixo do tempo;

$F_{\text{máx}}$ : fluorescência máxima (total);

$t$ : tempo em minutos.

$\Delta F_{\text{máx}} = F_{\text{eq}} / F_{\text{máx}} * 100$ , onde:

$F_{\text{eq}}$ : fluorescência de equilíbrio determinada como fluorescência do “platô” que reflete o equilíbrio entre o influxo e o efluxo de  $\text{H}^+$  nas vesículas.

### 5.15. Análise estatística

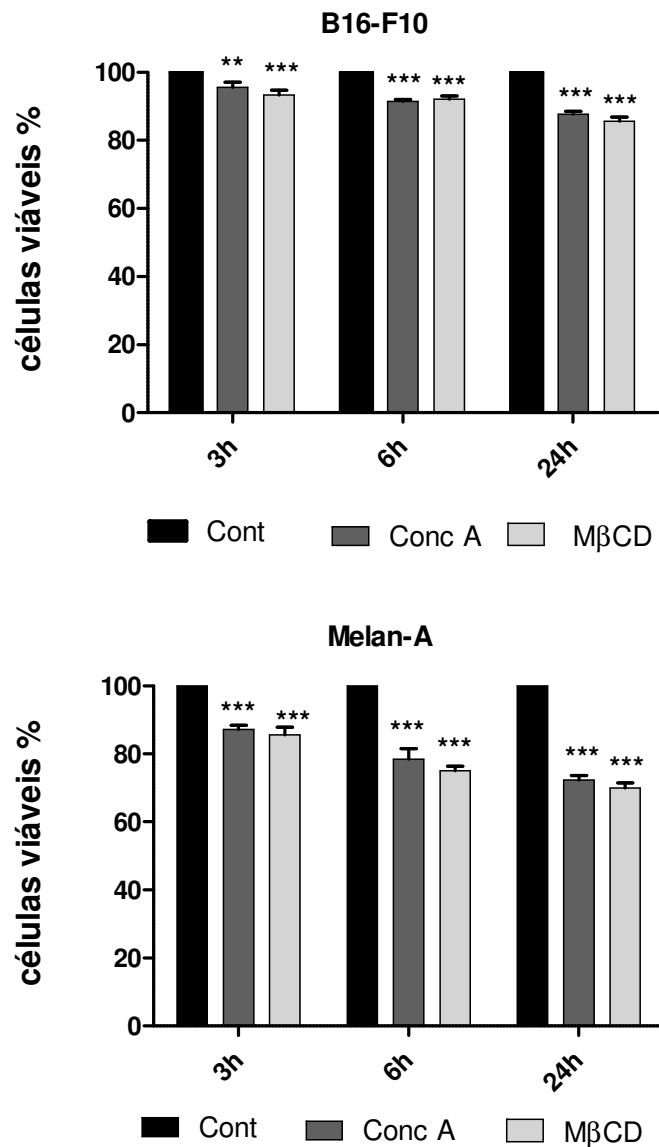
Todos os experimentos foram repetidos no mínimo três vezes e os resultados são expressos como média  $\pm$  EP quando aplicável. O software GraphPAD Prism 5 foi usado para análise estatística. Para comparar a diferença entre as variáveis foram usados Student t-test, Tukey's Multiple Comparison Test e Bonferroni test. Valores de  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ).



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Viabilidade celular

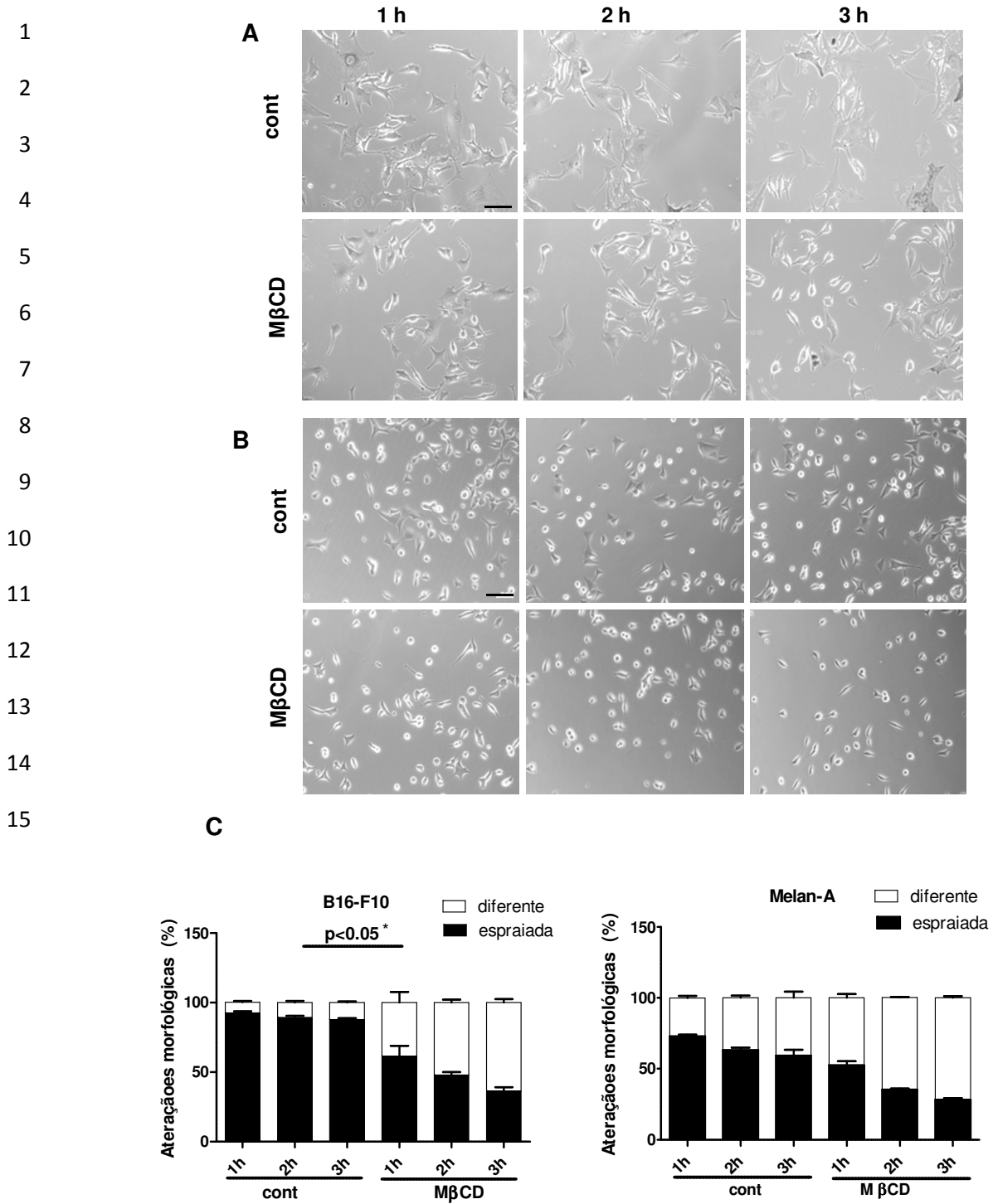
A fim de analisar o potencial citotóxico das drogas utilizadas, foram realizados ensaios de viabilidade celular baseados na metabolização do MTT pelas desidrogenases mitocondriais. Os testes de viabilidade revelaram que quanto maior o tempo de exposição aos inibidores Conc A e M $\beta$ CD menores foram as taxas de viabilidade. As células tumorais mostraram-se um pouco mais resistentes aos tratamentos com Conc A e M $\beta$ CD do que a linhagem Melan-A. Mesmo após, 24 h de exposição tanto a Conc A quanto ao M $\beta$ CD foi observado uma porcentagem considerável de células vivas da linhagem B16-F10, aproximadamente 95% e 93%, respectivamente. Já a linhagem Melan-A, mostrou-se mais sensível aos tratamentos, apresentando 72% e 69% de células vivas após incubação de 24 h com a Conc A e M $\beta$ CD, respectivamente (Figura 11). Baseado nestes resultados, as concentrações de 5 nM de Conc A e 5 mM de M $\beta$ CD foram usadas nos experimentos seguintes.



**Figura 11- Teste de citotoxicidade-** As células B16-F10 (A) e Melan-A (B) foram incubadas por 3 h, 6 h e 24 h com a Conc A (5 nM) e MβCD (5 mM), e em seguida com MTT por 3 horas. O sobrenadante foi removido e os cristais solubilizados em DMSO. A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro (570 nm). Os valores são apresentados como média  $\pm$  EP de três experimentos. \*\*\* $p$ <0.001, \*\* $p$ <0.01. (Two-way ANOVA, Bonferroni post test).

## 6.2. Análise da morfologia celular

Investigamos o efeito do tratamento com o M $\beta$ CD na morfologia das células B16-F10 e Melan-A. Em nosso trabalho assumimos que o padrão diferente se refere a morfologia diferente de espreiada. O tratamento alterou o padrão de morfologia das células de espreiadas para fusiformes nas células tumorais (Figura 12 A). A maioria das células não tratadas manteve a morfologia espreiada, cerca de 90%. Após 3 horas de tratamento com o M $\beta$ CD as células inverteram o padrão de morfologia, cerca de 64% passaram a apresentar morfologia fusiforme (Figura 12 C). Já a linhagem Melan-A após 3 h de tratamento apresentou basicamente dois tipos de morfologia : arredonda e fusiforme (Figura 12 B), apenas 28% das células se mantiveram espreiadas (Figura 12 C). Esses dados reforçam o papel dos MDMs na manutenção da morfologia celular, tão importante para a migração e invasão. A depleção de colesterol provocada pelo tratamento com o M $\beta$ CD também provocou uma redução do tamanho das células (dados observados, porém não quantificados) quando comparadas às células não tratadas.



**Figure 12- Depleção de colesterol afeta a morfologia celular.** As células B16-F10 (A) e Melan-A (B) foram tratadas com 5 mM de M $\beta$ CD por diferentes intervalos de tempo. Microscopia de contraste de fase foi usada na análise das alterações morfológicas (20x). (C) Porcentagem de células com morfologias diferenciadas após o tratamento. Barra de escala, 50  $\mu$ m. Valores são apresentados como média  $\pm$  EP de três experimentos independentes.  $p < 0.05^*$ , Student's  $t$  test.

### 6.3. Efeito da depleção de colesterol e da inibição da V-ATPase sobre a migração e invasão

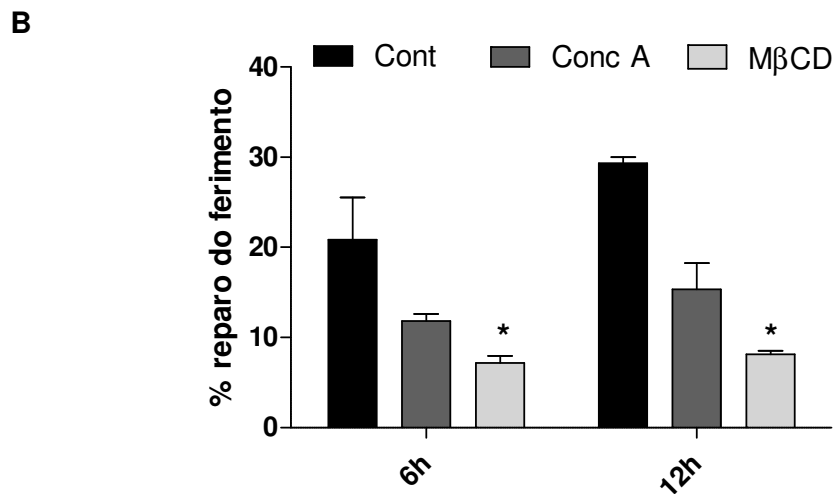
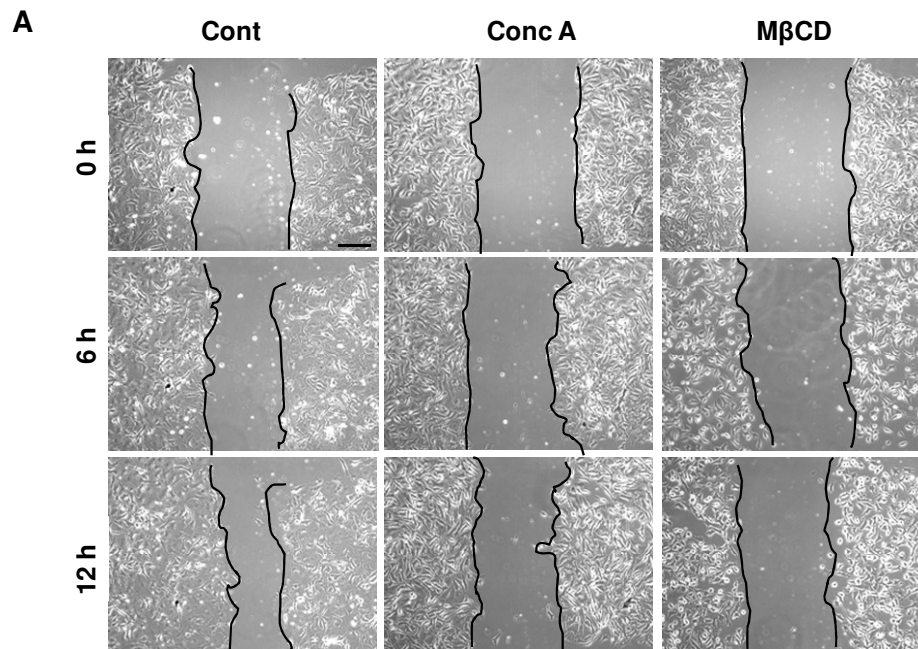
As perturbações funcionais ocorridas em microdomínios membranares, associadas à depleção de colesterol provocado pelo M $\beta$ CD, foram analisadas em função da inibição da migração e invasividade, estimadas pelos ensaios de ferimento em monocamada e *Transwell*. Para estimar a contribuição da inibição da V-ATPase e os efeitos induzidos pela depleção de colesterol, os dados do tratamento com M $\beta$ CD foram comparados com os resultados obtidos com o tratamento com a Conc A. A Figura 13 A e B, mostra que as células B16-F10 migraram mais rapidamente para área do ferimento quando não tratadas. Após 6 e 12 h, as taxas de reparo do ferimento eram de 15% e 30%, respectivamente. Entretanto, a capacidade de migração das células tratadas com M $\beta$ CD foi significativamente reduzida. As taxas de reparo do ferimento foram de apenas 15% e 8% após 12 h de incubação.

Resultados semelhantes foram encontrados nos ensaios usando *Transwell*. Vimos que, 10  $\mu$ g/ml de fibronectina e SFB 10% como quimioatratadores induziu eficientemente a migração das células através da membrana do *Transwell*. Situação que foi revertida pela inibição das V-ATPases e pela depleção de colesterol (Figura 14 A). Os tratamentos com Conc A e M $\beta$ CD inibiram aproximadamente 54% e 55%, respectivamente, da migração de B16-F10. Para a linhagem menos metastática e para a não tumoral a inibição foi mais discreta (Figura 14 A e B).

Para avaliar a capacidade invasiva das células, as membranas foram revestidas com Matrigel, mimetizando a matriz extracelular. Observou-se uma inibição da invasão de cerca de 41% e 44% para B16-F10, com o tratamento com a Conc A e M $\beta$ CD respectivamente. Para B16-F0 a inibição provocada pela Conc A foi cerca de 34% e pelo M $\beta$ CD de 30%. Já para Melan-A as taxas de inibição pela Conc A e M $\beta$ CD foram de 29% e 32% respectivamente (Figura 15 A e B).

Esses dados sugerem que a migração e invasão das células de melanoma B16-F10, B16-F0 e a linhagem não tumoral Melan-A requerem tanto a integridade dos MDMs quanto a atividade das V-ATPases.

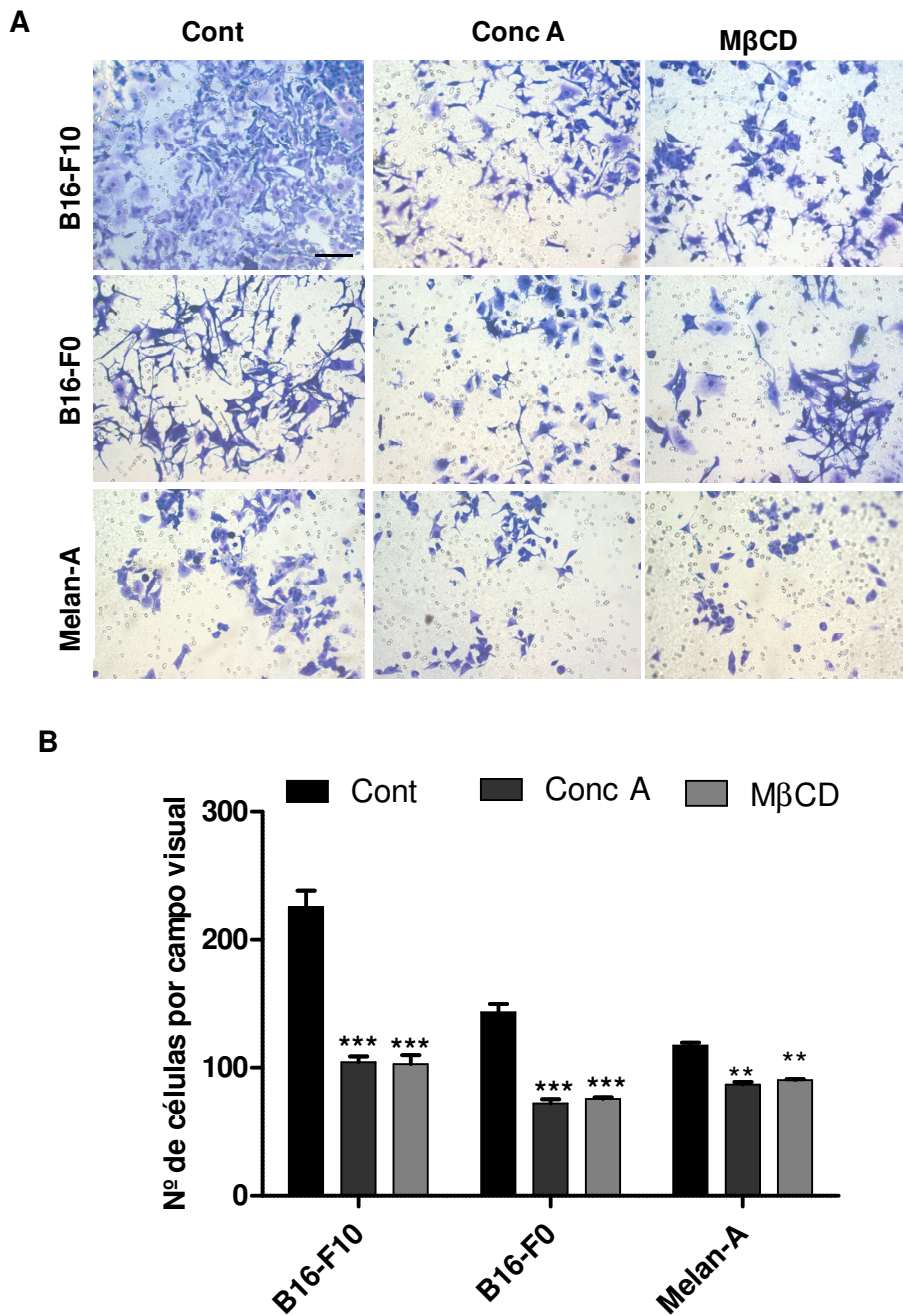
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12



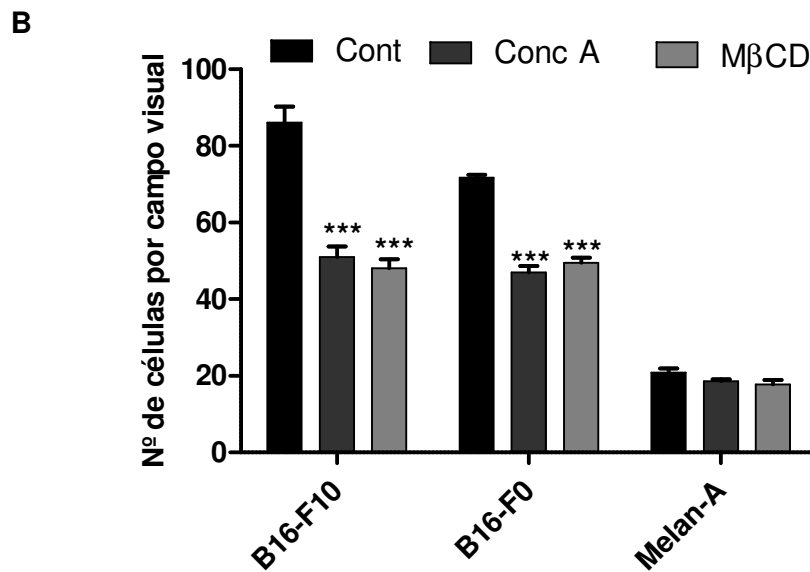
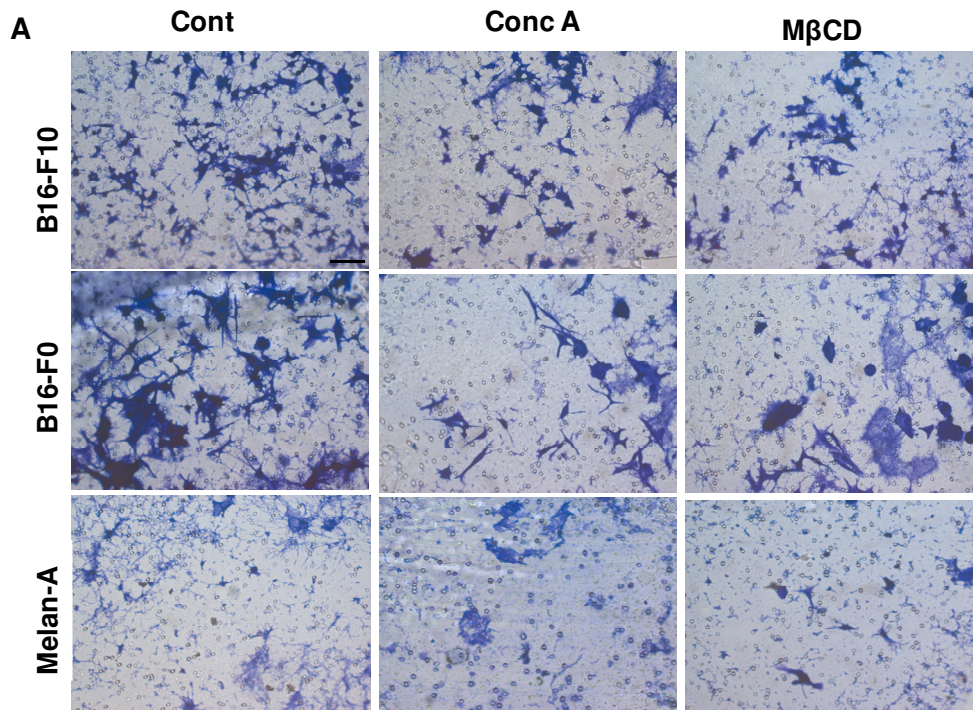
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

**Figura 13- Migração celular após inibição da V-ATPase e depleção de colesterol.** (A) Um ferimento com uma ponteira de pipeta foi provocado na monocamada de células B16-F10 e a cicatrização subsequente acompanhada por 6 e 12 h após incubação com 5 mM MβCD e 5 nM Conc A. As células foram fotografadas sob microscopia de contraste de fase (10×). Barra de escala, 100 μm. (B) Análise quantitativa da migração das células B16-F10 durante a cicatrização do ferimento. A velocidade de reparo foi calculada em relação à largura inicial do ferimento. Os valores são apresentados como média ± EP de três experimentos independentes. \* $p < 0.05$ , Tukey's Multiple Comparison Test.

1



**Figura 14- Migração celular usando *Transwell*.** Nesses ensaios de as células foram tratadas com as doses de MβCD e Conc A e depositadas na parte de cima da membrana do inserto. As células que migraram através da membrana do inserto foram fixadas e coradas. (A) Imagens representativas do ensaio. (B) Quantificação do número de células migratórias. Barra de escala, 50 μm. Os valores são apresentados como média ± EP de quatro experimentos isolados \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01 (Two-Way ANOVA Bonferroni post test)



22

23

24

25

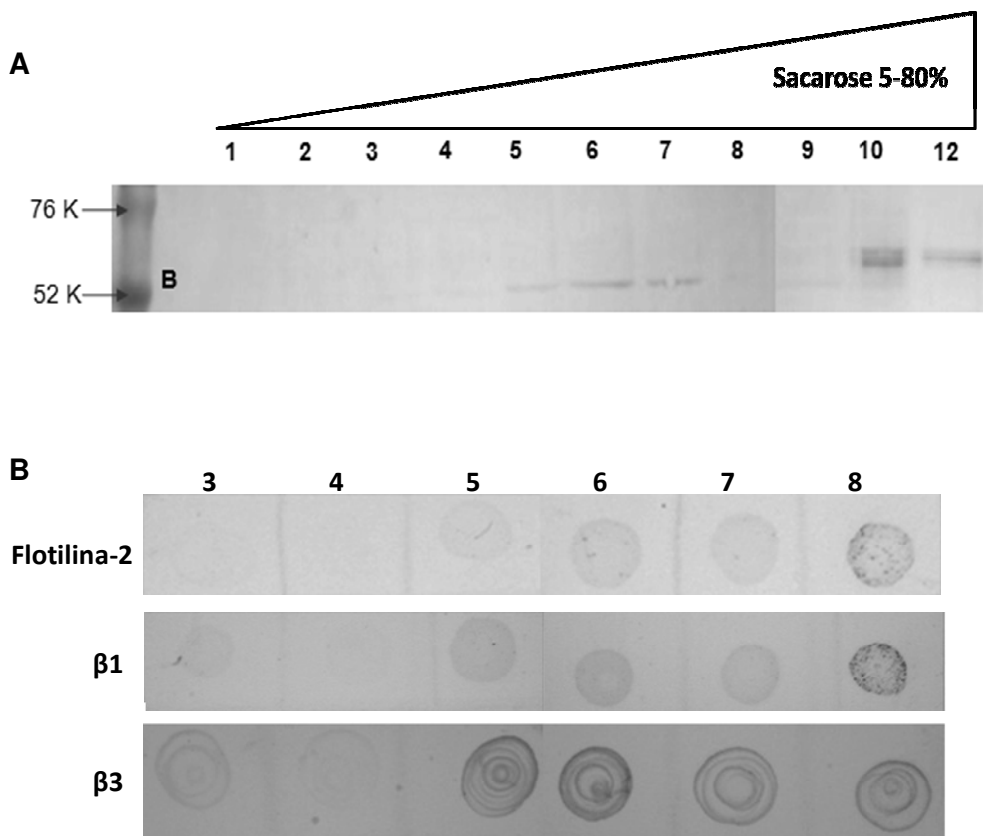
**Figura 15- Invasão celular.** Nesse ensaio as membranas do *Transwell* foram revestidas com Matrigel para mimetizar a matriz extracelular. (A) Figuras representativas dos ensaios de invasão. (B) Número de células invasoras. Barra de escala, 50  $\mu$ m. Os valores são apresentados como média  $\pm$  EP de quatro experimentos isolados \*\*\* $p$ <0.001, (Two-way ANOVA, Bonferroni post test).



#### 6.4. Imunolocalização das V-ATPases nas frações provenientes do isolamento dos MDMs

A fim de identificar em qual das frações obtidas do isolamento dos MDMs seria encontrada marcação para V-ATPase, foram realizados ensaios de *Western Blotting*. Foi encontrada marcação para subunidade B da V-ATPase nas frações 5, 6 e 7 (Figura 16 A). Assim como no ensaio de *Dot Blotting* também observou-se marcação para a flotilina-2, proteína marcadora dos MDMs nas frações 5, 6, 7 e 8, o que sugere fortemente que em melanoma as V-ATPases de membrana plasmática encontram-se nos MDMs. Por participarem ativamente dos processos de migração e invasão, e por apresentarem uma relação com as V-ATPases, a imulocalização das integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$  também foi analisada. Os resultados revelaram que as integrinas estavam presentes nas frações correspondentes à flotilina-2 e V-ATPase (Figura 16B), indicando que a inserção dessas moléculas nos MDMs pode desempenhar um papel importante em suas interações.

A marcação da subunidade B da V-ATPase também foi observada nas frações 10 e 12, possivelmente pelo fato dessa subunidade possuir alta afinidade em formar complexos com a actina do citoesqueleto (Holliday et al., 2000). Por outro lado, não foi possível analisar a fração 11 pelo excesso de melanina, o que deixou a fração com consistência gelatinosa. Foram realizados ensaios de *western blotting* para colocalização da flotilina-2, porém não foi detectada.



29 **Figura 16- Imuno reatividade da subunidade B da V-ATPase, Flotilina-2,**  
 30 **Integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$ .** A análise das frações (1 a 12) de membranas isoladas a partir  
 31 do gradiente de sacarose (5%, 30% e 80%) revelou a marcação da subunidade B da  
 32 V-ATPase nas frações 5, 6 e 7 (A), bem com da flotilina-2, maracadora dos  
 33 'rafts'MDMs, e das integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$  (B)

34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

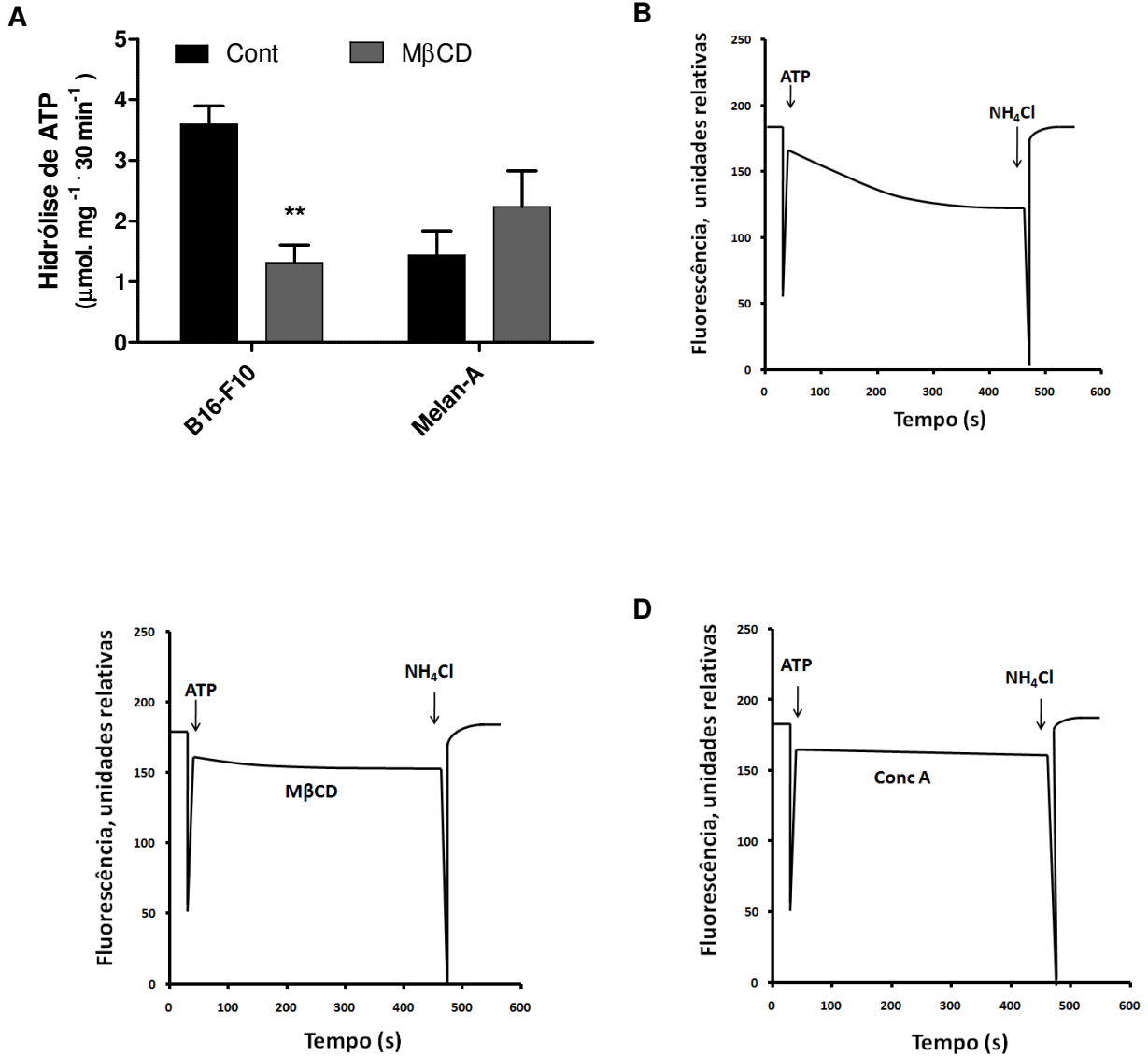
## 6.5. Influência da depleção de colesterol na atividade hidrolítica e de transporte de H<sup>+</sup> da V-ATPase

Sabendo-se da necessidade do colesterol na estruturação funcional de constituintes membranares e na montagem dos MDMs, investigou-se o efeito da depleção de colesterol na atividade hidrolítica e de transporte de H<sup>+</sup> pelas V-ATPases em vesículas de membranas celulares isoladas em gradiente de sacarose (25% e 46%). Essas vesículas foram incubadas por 30 min com 5 mM de M $\beta$ CD antes dos ensaios. A atividade hidrolítica da V-ATPase nas membranas das vesículas das células B16-F10 foi inibida significativamente pelo tratamento com o M $\beta$ CD quando comparado ao controle, chegando a aproximadamente 63% de inibição (Figura 17 A). A atividade de transporte de H<sup>+</sup> mediado pelas V-ATPases nessas vesículas também foi analisada. Tal atividade é representada pela queda da fluorescência do ACMA na presença de 1 mM de ATP (Figura 17 B). Quando essa queda se estabiliza o gradiente protônico pode ser desfeito pela adição de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A atividade de bombeamento de H<sup>+</sup> foi completamente inibida pela Conc A e pelo M $\beta$ CD (Figura 17 C e D, respectivamente). Juntos esses dados sugerem fortemente que o colesterol membranar e possivelmente os MDMs estruturados a partir deste lipídio, são importantes tanto para a atividade hidrolítica quanto para a atividade de transporte de H<sup>+</sup> executados pela V-ATPase da linhagem celular tumoral.

Por outro lado, foi possível observar que a linhagem não tumoral Melan-A. responde de forma diferente. Além de apresentar uma atividade hidrolítica significativamente menor que B16-F10, a depleção de colesterol estimulou a hidrólise de ATP pelas bombas de células Melan-A (Figura 17 A). Isso nos leva a hipotetizar que a depleção de colesterol esteja estimulando outros sistemas transportadores de H<sup>+</sup> na linhagem não tumoral. Contudo, esse fato necessitará de investigações mais aprofundadas.

Todos esses resultados nos levam a hipotetizar que os MDMs dotados de V-ATPases devam ser estruturas mais predominantes em membranas de células tumorais. Talvez por seu elevado metabolismo, as células tumorais recrutem mais microdomínios que funcionam como plataformas organizadoras de proteínas membranares, incluindo V-ATPases, as quais exercem papéis chave na transdução de energia necessária aos processos carcinogênicos.

1 Foram realizados inúmeros ensaios de transporte de prótons com a linhagem  
 2 Melan-A, porém não foi possível a obtenção de vesículas de membranas  
 3 plasmáticas competentes na formação de gradientes de H<sup>+</sup>.



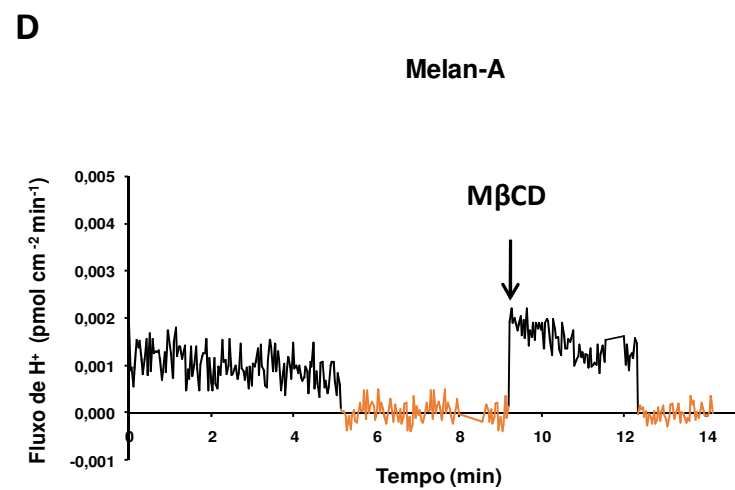
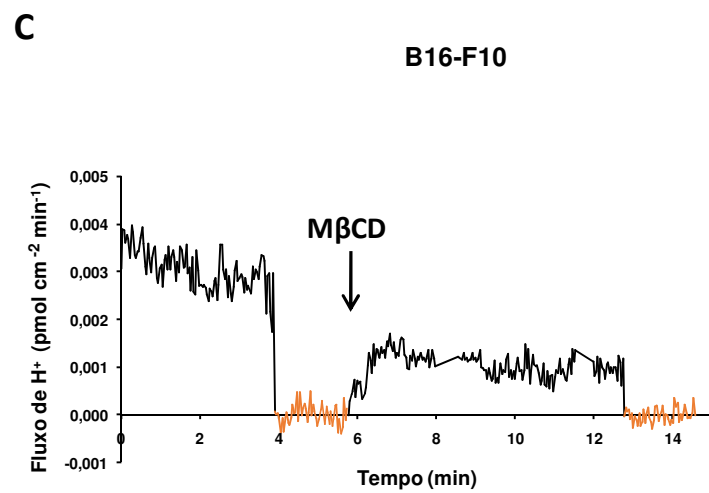
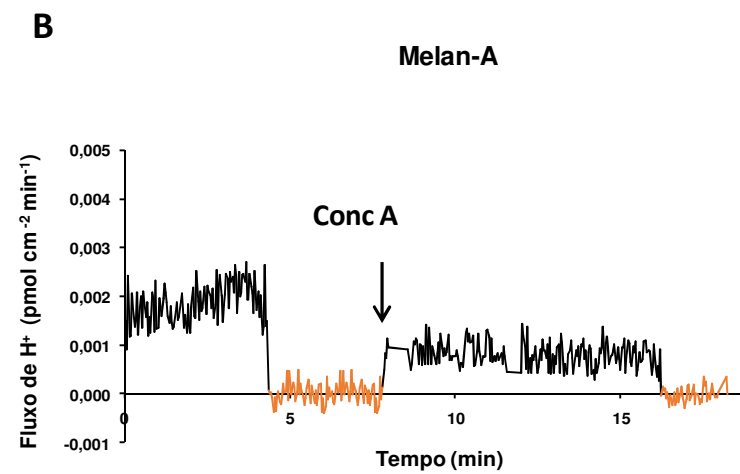
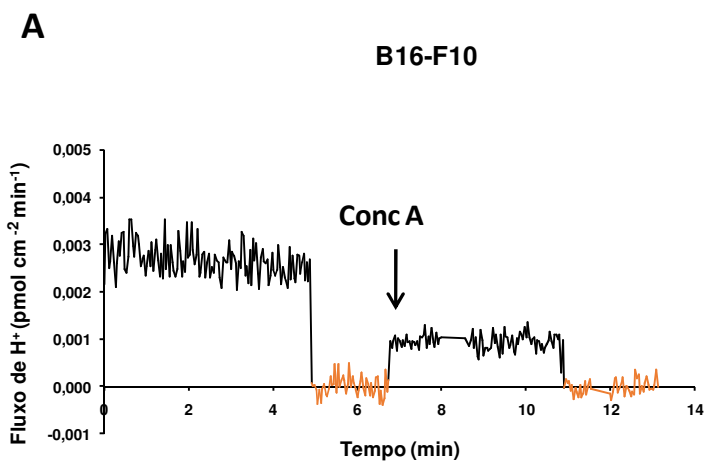
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16 **Fig 17- A atividade hidrolítica e de transporte de H<sup>+</sup> foi afetada pela depleção de**  
 17 **colesterol.** A atividade hidrolítica Conc A-sensível detectada colorimetricamente após 30  
 18 min de reação (A). A atividade foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP, pH 7,0, e parada  
 19 com TCA 5% gelado. O transporte de H<sup>+</sup> monitorado pelo *quenching* do ACMA (B). O  
 20 transporte de H<sup>+</sup> foi detectado em vesículas obtidas a partir de células B16-F10 (~100 μg  
 21 de proteínas). Esquema representativo do transporte de H<sup>+</sup> obtido em vesículas de células  
 22 B16-F10 após incubação prévia em 5 mM de MβCD (C) ou 11,5 μM de Conc A (D). As  
 vesículas foram obtidas a partir do fracionamento celular em gradiente de sacarose das  
 células B16-F10 e Melan-A (25%-46%). Os valores são apresentados como média ± E.P  
 de três experimentos isolados. Two-way ANOVA. \*\*p<0.01 (Two-way ANOVA, Bonferroni  
 post test).

## 6.6. Modulação do fluxo de prótons em células vivas em resposta ao tratamento com Conc A e M $\beta$ CD

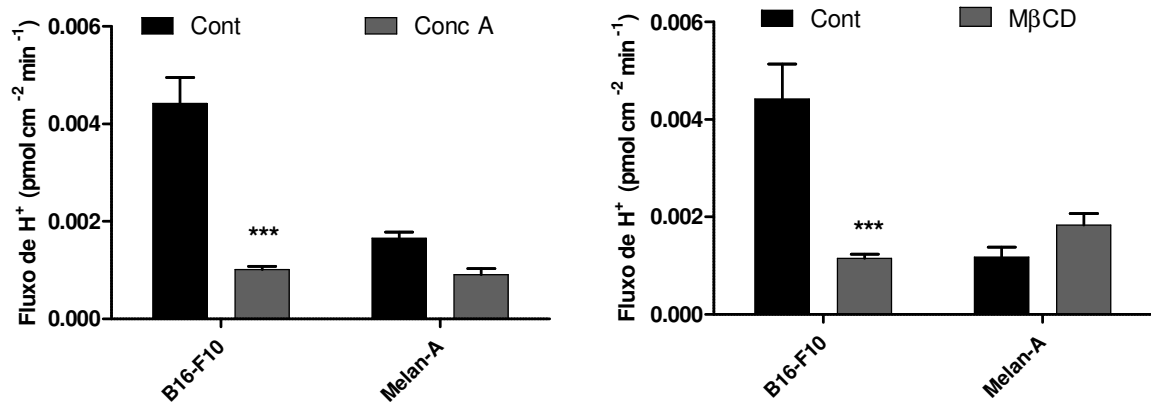
O estudo da dinâmica do fluxo de prótons em células vivas é de extrema importância para prover um melhor entendimento da atuação funcional das H<sup>+</sup>-ATPases no metabolismo celular e tumoral. Considerando a superexpressão de V-ATPases na membrana plasmática das células tumorais, como principal responsável pela acidificação do meio extracelular, investigamos o efeito da depleção de colesterol no fluxo de H<sup>+</sup>. Corroborando com os resultados *in vitro*, os resultados obtidos com as células vivas usando o sistema SIET, mostraram que tanto o tratamento com a Conc A (Figura 18 A) quanto o tratamento com o M $\beta$ CD (Figura 18 C) provocaram uma redução significativa no efluxo de H<sup>+</sup>, de 77% e 74%, respectivamente, nas células B16-F10 (Figura 18 E e F). Notamos que o poder de inibição do efluxo de H<sup>+</sup> foi semelhante entre os tratamentos. Em relação à Melan-A, observamos que além do efluxo de H<sup>+</sup> nessa linhagem ser cerca de 70% menor que em B16-F10 (Figura 18 B e D), a depleção de colesterol estimulou o efluxo de H<sup>+</sup> em 36% (Figura 18 F), resultado semelhante ao obtido nos ensaios de atividade hidrolítica em vesículas de membrana plasmática isoladas por fracionamento celular. Diferente de B16-F10, a inibição da extrusão de prótons provocada pela Conc A foi menor na Melan-A, cerca de 45% (Figura 18 E). Resultados condizentes com a diferença de metabolismo e de expressão de V-ATPases previstos para as linhagens.

O sistema SIET também possibilitou verificar as alterações do pH extracelular após os tratamentos. Após a incubação com a Conc A houve um discreto aumento do pH extracelular em B16-F10 e Melan-A (Tabela 1). Já com o tratamento com o M $\beta$ CD o aumento do pH extracelular de B16-F10 foi mais acentuado. Os dados mostram que, compatível com a inibição do efluxo de H<sup>+</sup> provocada pela incubação com a Conc A, houve uma alcalinização do meio extracelular em ambas as linhagens. Consistentemente, a inibição do efluxo de H<sup>+</sup> provocada pela depleção de colesterol também gerou uma alcalinização do meio extracelular na linhagem tumoral. Porém, a resposta da Melan-A foi oposta; a depleção de colesterol levou a uma redução do pH, o que caracteriza a ativação de sistemas de extrusão de prótons resultando na acidificação do meio extracelular (Tabela 1). Ainda que as

- 1 diferenças sejam sutis nas medidas de pH, o efeito disso no microambiente tumoral
- 2 permanece incerto. Mais estudos serão necessários para elucidar tal questão.



1



2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

**Figure 18- Medição do fluxo de H<sup>+</sup> em células vivas usando SIET.** (A-D) Representação gráfica do fluxo protônico após os tratamentos com Conc A ou MβCD. (E-F) Fluxo de H<sup>+</sup> detectados ao longo da monocamada de células tratadas com ConA ou MβCD. Os dados são apresentados como média ± EP de três experimentos independentes. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (Two-way ANOVA, Bonferroni post test).

13

14

15

16

17

**Table 1-** Comparação entre pH extracelular das células B16-F10 e Melan-A depois do tratamento com Conc A e MβCD. Os valores são apresentados como média ± EP de três experimentos independentes. \*p<0.001, (Two-way ANOVA, Bonferroni post test).

Linhagem celular	pH Extracelular			
	Controle	Conc A	Controle	MβCD
B16-F10	7.206 ± 0.003	7.299 ± 0.003*	7.166 ± 0.005	7.308 ± 0.003*
Melan-A	7.227 ± 0.005	7.321 ± 0.002*	7.320 ± 0.002	7.279 ± 0.001*

13

14

15

16

17



## 1 7. DISCUSSÃO

2  
3 Uma característica comum a células tumorais é a alteração do metabolismo  
4 de lipídios, afetando especialmente fenômenos de sinalização e adesão  
5 relacionadas à dinâmica do citoesqueleto (Staubach e Hanisch, 2011; Santos e  
6 Schulze, 2012; Head et al., 2014). O colesterol é um lipídio esteróide essencial,  
7 necessário para a regulação da fluidez e dinâmica de membranas, e uma miríade de  
8 processos associados, entre os quais a endocitose, o tráfego de vesículas, além de  
9 várias rotas de sinalizações mediadas por receptores transmembranares. A literatura  
10 relata que a depleção de colesterol pode aumentar a rigidez da célula ao desregular  
11 a fluidez de membrana, alterando as características biofísicas das membranas (Sun  
12 et al., 2007). A inibição da V-ATPase de células tumorais foi recentemente descrita  
13 por induzir uma redução dos processos de migração e invasão metastáticas, em  
14 concomitância com uma diminuição das taxas de colesterol celular (Bartel et al.,  
15 2016). Nesta tese, este fenômeno foi explorado com maior abrangência,  
16 descrevendo os efeitos diretos da depleção farmacológica de colesterol sobre a  
17 atividade da V-ATPase e a capacidade migratória e invasiva de células de  
18 melanoma.

19 Nossos resultados mostram que a depleção de colesterol provocada pelo  
20 tratamento com o inibidor M $\beta$ CD alterou de forma considerável a morfologia e  
21 reduziu o tamanho das células, como já descrito em outras linhagens de células  
22 malignas e não-malignas (Li et al., 2006; Guerra et al., 2016; Gestel et al., 2005).  
23 Ainda em acordância com dados prévios da literatura, houve redução significativa da  
24 migração e invasão das células das linhagens de melanoma murino, similar a  
25 estudos prévios com modelos de melanoma humano sob tratamento com o M $\beta$ CD  
26 (Wang et al., 2013) ou inibidores de colesterol alternativos, cyclodextrin e Apo 1  
27 (Meyer et al., 2007). O colesterol modula a fluidez das membranas e a progressão  
28 tumoral e parece ser muito dependente desta maior plasticidade celular. Por  
29 exemplo, células de câncer de mama, pancreático, cervical, de bexiga (Lin et al.,  
30 2015) e hepatocarcinoma humano (Bartel et al., 2016) mostraram-se mais fluidas  
31 quando comparadas a seus controles não-malignos. Aparentemente, células  
32 tumorais perdem a capacidade de captar ou de responder aos estímulos ambientais  
33 que determinariam uma dada configuração e histopaticidade, e com tal perda,  
34 emergiria seu potencial invasivo e migratório (Lin et al., 2015). Aqui trabalhamos a

1 hipótese do potencial metastático está diretamente associado com o papel do  
2 colesterol na manutenção da morfologia necessária à migração e invasão celular,  
3 etapas cruciais da cascata metastática.

4 Microdomínios de membrana (MDMs) enriquecidos em colesterol e  
5 esfingolipídios, também chamados de rafts, atuam como as principais plataformas  
6 de agrupamento de proteínas que interagem em inúmeras vias de sinalização. Tais  
7 MDMs compartimentalizam diversos processos celulares, favorecendo interações  
8 proteína-proteína específicas, facilitando a ativação de cascatas de transdução de  
9 sinais, bem como a sinalização mediada por receptor (Lingwood e Simons, 2010).  
10 Nossos resultados de imunodeteção acoplada a fracionamento celular revelaram  
11 que a V-ATPase e flotilina-2, proteína marcadora de MDMs, estão presentes nas  
12 mesmas frações de membrana (5-7) oriundas do fracionamento para o isolamento  
13 de MDMs (Figura 16 A e B). Em estudos anteriores usando o mesmo protocolo de  
14 fracionamento celular, foi evidenciado que o intervalo no qual se encontra marcação  
15 para os MDMs, se estende entre a fração 1 até a fração 7 (Silva e Merino 2014,  
16 Wang et al., 2013, Fabelo et al., 2014). Assim, nossos dados sugerem que de fato  
17 pode haver uma co-expressão desta bomba de prótons e da flotilina nos MDMs de  
18 linhagens celulares modelo de melanoma murino. A V-ATPase já foi descrita como  
19 um dos componentes de MDMs de vesículas sinápticas de cérebro de ratos  
20 (Yoshinaka et al., 2004). Mas a presença das V-ATPases não se restringe aos  
21 MDMs de membrana plasmática, pois já foram também descritas em MDMs de  
22 Complexo de Golgi (Gkantiragas et al., 2001), endossomos tardios (Lafourcade et al.,  
23 2008) e fagossomos (Dermine et al., 2001).

24 A adesão das células tumorais a matriz extracelular representa um importante  
25 passo da migração celular e as integrinas são as principais responsáveis por essa  
26 adesão. Já foi relatado que a subunidade  $\beta 1$  da integrina interage com a subunidade  
27 c da V-ATPase nas adesões focais em mioblastos (Skinner e Wildeman, 1999). As  
28 integrinas  $\beta 1$  são encontradas nos MDMs (Leitinger e Hogg, 2002) e a internalização  
29 da integrina  $\beta 3$  para reciclagem depende desses MDMs (Wang et al., 2013), o que  
30 indica que essas moléculas sejam dependentes da integridade dos MDMs para  
31 exercerem sua função de adesão. Como nossos resultados de imunodeteção  
32 indicam a coexpressão nas mesmas frações membranares de V-ATPases e  
33 integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 3$ , típicas de MDMs podemos hipotetizar que essa interação da  
34 subunidade c da V-ATPase com a integrina  $\beta 1$  possa ocorrer nesses MDMs. Assim,

1 nossos dados abrem caminho para futuros estudos usando marcadores da  
2 plasmalema e das diferentes endomembras, a fim de definir melhor a co-localização  
3 e as interações funcionais das V-ATPases nos MDMs da superfície celular e nas  
4 distintas vesículas e organelas subcelulares em células tumorais.

5 As V-ATPases já são conhecidas por desempenharem um importante papel  
6 na apoptose e metástase de células cancerígenas, participando da reciclagem de  
7 receptores e do metabolismo energético (Wiedmann et al., 2012; Schneider et al.,  
8 2015). A superexpressão desta bomba na membrana plasmática de células  
9 tumorais, nos mais diversos tipos de cânceres, leva a acidificação do meio  
10 extracelular tumoral (Martinez-Zaguilan et al., 1999) e alcalinização do citosol  
11 (Bernstein et al., 2000), criando uma condição propícia para os fenômenos de  
12 migração e invasão (Cotter et al., 2015, Nisisho et al., 2011, Hinton et al., 2009b).  
13 Nossos resultados confirmam tal assertiva ao comprovar que a inibição das V-  
14 ATPases pela Conc A reduziu de forma significativa a migração e invasão das  
15 células tumorais. A redução da migração e invasão relacionada à inibição da bomba  
16 também já foi observada em outros tipos de câncer, com o uso de outros inibidores,  
17 como a nova droga NiK-12192 (Supino et al., 2008) e o clássico inibidor bafilomicina  
18 (Sennoune et al., 2004a).

19 A inibição da migração e invasão celular observada após incubação tanto com  
20 Conc A (5 nM) quanto com o M $\beta$ CD (5 mM) não pode ser atribuída à toxicidade  
21 inespecífica destas drogas, visto que nessas concentrações os níveis de células  
22 viáveis após 24 horas de incubação foram maiores que 90% para a linhagem  
23 maligna B16-F10 (Figura 11). A semelhança dos efeitos das duas drogas sugere  
24 uma possível relação entre os fenômenos de inibição da V-ATPase e o da depleção  
25 de colesterol, com a diminuição da motilidade celular. A Conc A é relativamente  
26 tolerada em culturas tumorais, e apesar de altamente tóxica para a maioria das  
27 células normais, algumas linhagens de carcinoma resistem bem até a concentração  
28 maior do que a usada nesse trabalho. A linhagem de carcinoma de célula escamosa  
29 oral SQUU-B mostrou-se resistente ao tratamento com 10 nM de Conc A,  
30 apresentando taxa de viabilidade maior que 95% (Kiyoshima et al., 2013). Células de  
31 câncer de mama MDA-MB231 também mostraram-se resistentes ao tratamento com  
32 5 mM de M $\beta$ CD, não apresentando comprometimento da viabilidade celular (Guerra  
33 et al., 2016).

1           Aparentemente, o papel das V-ATPases nas etapas de migração e invasão  
2 que compõem a cascata metastática parece bem mais complexo do que fora  
3 inicialmente previsto. Atualmente, existe um corpo de evidências indicando  
4 implicações pleiotrópicas relacionadas às diversas expressões funcionais das V-  
5 ATPases , incluindo o metabolismo de lipídios. Estudos apontam que a inibição das  
6 V-ATPases pelo archazolid interfere com o metabolismo de colesterol, reduzindo sua  
7 distribuição na membrana plasmática issorepresenta o principal mecanismo de  
8 resistência à drogas em células de câncer de bexiga (Hamm et al., 2014).  
9 Recentemente, foi visto que a inibição das V-ATPases pelo archazolid em  
10 hepatocarcinoma, não somente aprisiona o colesterol nos lisossomos como também  
11 diminui os níveis de colesterol livre, provocando depleção de colesterol na  
12 membrana plasmática, o que altera importantes propriedades biofísicas da célula de  
13 câncer como a rigidez e a polaridade da membrana plasmática (Bartel et al., 2016).  
14 Tais alterações inteferem com a plasticidade das membranas e comprometem a  
15 capacidade migratória e invasiva das células cancerígenas.

16           O recrutamento de proteínas específicas em MDMs também consiste numa  
17 propriedade crucial para a formação de estruturas invasoras/migratórias, como  
18 ocorre com a proteína BASP-1 (proteína solúvel ácida do cérebro), presente nos  
19 MDMs de sítios de contato célula-célula, que atua na estruturação das protruções  
20 tipo-filopódio em células endotélias da veia umbilical humana (HUVEC) . A proteína  
21 BASP-1, também conhecida como NAP-22, foi originalmente descrita nas  
22 terminações dos axônios neuronais, e desempenha funções similares a proteína  
23 GAP-43 associada ao crescimento axonal, porém pode ser encontrada em outros  
24 tipos de células e tecidos, diferente de GAP-43 que é exclusiva de neurônios  
25 (Sprenger et al., 2006). Essas são algumas das proteínas recrutadas em MDMs nas  
26 membranas, os quais constituem plataformas de formatação das estruturas de  
27 membrana pró-migratórias.

28           Os MDMs associados ao tráfego vesicular também desempenham um papel  
29 crucial nos processos migratório e invasivo das células carcinogênicas. O tráfego  
30 intracelular de vesículas ao longo dos filamentos do citoesqueleto exerce importante  
31 papel nos processos de invasão e metástase. Por outro lado, a migração celular  
32 através da matriz também é um processo dinâmico, o qual depende de um  
33 “*turnover*” ativo de elementos do citoesqueleto e movimentos membranares para a

1 formação das extensões celulares. De fato, muitos dos componentes da maquinaria  
2 endocítica e sistema de reciclagem estão concentrados nas principais extensões  
3 das células invasoras (Hattula et al., 2006).

4 A invasão celular requer a distribuição de moléculas de adesão bem como a  
5 secreção de enzimas que degradam a matriz extracelular. No primeiro caso,  
6 integrinas direcionam invaginações membranares e extensões celulares, e assim,  
7 regulam a formação de filopódios e invadopódios (Kerber et al., 2009; Caswell et al.,  
8 2007). Alterações no tráfego, ativação e apresentação de integrinas na superfície  
9 celular podem alterar consideravelmente o comportamento das células tumorais  
10 malignas (Muller et al., 2009; Rainero et al., 2012)

11 O tráfego de vesículas pode modular a liberação de MMPs e outras proteases  
12 e assim alterar a migração celular. Rab8 (membro da superfamília Ras de proteína G  
13 monomérica) e a proteína VAMP-7 (proteína de membrana associada à vesícula) da  
14 vesícula SNARE mediam a secreção de MMP do tipo 1 (MT1-MMP), que regula o  
15 fenótipo invasivo de células HeLa e de osteosarcoma (Bravo-Cordero et al., 2007). É  
16 provável que essa população específica de vesículas de membrana interaja com  
17 microtúbulos e microfilamentos de F-actina (Itoh et al., 2011; Hu et al., 2011). Esta  
18 via secretória de proteínas resulta na promoção de protrusões e extensões celulares  
19 que são necessárias para a invasão celular (Kerber et al., 2009; Caswell et al.,  
20 2007).

21 As V-ATPases estruturalmente e/ou funcionalmente associadas à outras  
22 proteínas em MDMs, desempenham um papel ativo no tráfego vesicular. Sabe-se  
23 que tanto os MDMs planos quanto as cavéolas invaginantes estão envolvidos com o  
24 tráfego de vesículas. MDMs planos e cavéolas são bioquimicamente similares,  
25 domínios de membrana que agrupam proteínas específicas. Contudo, estes se  
26 diferenciam morfológicamente e parecem desempenhar funções  
27 complementares. As cavéolas podem mesmo ser consideradas um tipo  
28 especializado de MDMs, pois são pequenas invaginações que brotam das  
29 membranas plasmáticas, em formato de U (Parton et al., 2003). A proteína caveolina  
30 é o principal marcador desse tipo de 'raft', pois se oligomeriza e cobre toda superfície  
31 citoplasmática da cavéola, atuando como um ancoradouro para outras proteínas e  
32 também pode regular negativamente eventos de sinalização (Razani et al., 2002).  
33 Esse tipo de microdomínio está muito envolvido com o tráfego de vesículas, e dentre

1 as moléculas presentes nas cavéolas já foram evidenciadas V-ATPases (Sprenger  
2 et al., 2006).

3 As V-ATPases participam ativamente do tráfego vesicular. Acredita-se que  
4 por si só, estas bombas de prótons já sejam capazes de interagir com vias de  
5 sinalização e que subunidades de seus dois domínios,  $V_1$  e  $V_0$ , interajam  
6 diretamente com a maquinaria do tráfego de vesículas (Sun-Wada et al., 2003). Sua  
7 inibição acarreta na inibição da “protocitose” (tipo de tráfego vesicular em que as  
8 cavéolas absorvem pequenos solutos, os quais se difundem passivamente para o  
9 citoplasma) mediada pelas cavéolas (Mineo e Anderson, 1996), o que sugere que as  
10 V-ATPases regulam o transporte caveolar.

11 A presença de V-ATPases em MDMs lipídicos de muitas organelas envolvidas  
12 com o tráfego vesicular, como nos endossomos tardios (Lafourcade et al., 2008),  
13 fagossomos (Dermine et al., 2001) e Complexo de Golgi (Gkantiragas et al., 2001),  
14 leva a supor que haja uma necessidade da inserção dessa bomba de prótons nos  
15 MDMs para que ela exerça sua função reguladora do tráfego vesicular. Por outro  
16 lado, as V-ATPases também estariam diretamente envolvidas com a organização  
17 desses microdomínios. Isso pode ser exemplificado por um estudo feito com V-  
18 ATPases de fagossomo de macrófago J774, onde foi observado que a inibição das  
19 V-ATPases pela bafilomicina, droga reconhecida por impedir a formação (ou  
20 maturação) dos lisossomos, inibiu a aquisição de flotilina-1 pelos fagossomos. Essa  
21 proteína seria adquirida pelos fagossomos pela fusão com organelas endocíticas  
22 tardias (Dermine et al., 2001), impedida pela inibição das V-ATPases. Sem flotilina-1  
23 a formação dos MDMs fica então prejudicada.

24 Outra atividade influenciada diretamente pelos MDMs dos fagossomos é a  
25 nucleação de actina. Estudos têm mostrado que os fagossomos estão envolvidos  
26 com a nucleação de actina e que essa função é potencializada pelas flotilinas dos  
27 MDMs lipídicos, adquiridas durante o processo de maturação dessa organela.  
28 Análises proteômicas dos MDMs lipídicos de fagossomos indicam que a actina é a  
29 principal proteína dessas estruturas, mostrando que esses microdomínios são sítios  
30 de acumulação e polimerização de actina (Rozelle et al., 2000).

31 O sistema de transporte baseado na polimerização direta da actina pela  
32 hidrólise de ATP de monômeros de actina e iniciado por proteínas ligadas a  
33 superfície de partículas transportadoras, gera um tipo de movimento chamado de  
34 “cauda de cometa”. Proteínas da família WASP/Scar, do complexo Arp2/3 e ou

1 dinamina e cortactina são obrigatoriamente componentes do sistema de transporte  
2 baseado na actina (Le Clainche e Carlier, 2008; Schafer et al., 2002). Esse tipo de  
3 transporte é responsável pela translocação de vesículas micropinocíticas  
4 (pinossomos) (Merrifield et al., 1999), vesículas revestidas de clatrina, endossomos e  
5 lisossomos (Merrifield et al., 2002). Ao mesmo tempo em que há uma dependência  
6 dos MDMs para a nucleação da actina, o movimento de vesículas enriquecidas em  
7 MDMs se dá de uma forma similar a citada acima (Rozelle et al., 2000). Assim, o  
8 impedimento da polimerização de actina por causa de uma inibição dos MDMs  
9 resultaria em um bloqueio do transporte de todas essas vesículas perturbando o  
10 funcionamento da célula.

11 A V-ATPase interage diretamente com a maquinaria do tráfego de vesículas  
12 (Sun-Wada et al., 2003), logo, sua inibição compromete a fusão de vesículas entre si  
13 e com a membrana plasmática. Assim, moléculas como as integrinas, MMPs,  
14 catepsinas e as demais moléculas envolvidas com a migração e invasão não  
15 poderiam ser recicladas e entregues a membrana, inibindo assim a migração e  
16 invasão celular. Essa poderia ser uma explicação complementar para os nossos  
17 resultados obtidos nos ensaios de migração e invasão, em que constatamos uma  
18 significativa redução dessas etapas do processo metastático após a inibição da  
19 atividade da V-ATPase.

20 A depleção de colesterol também reduziu a migração e invasão das células  
21 de melanoma em níveis semelhantes aos observados com o tratamento com a Conc  
22 A, em nossos resultados. Isso poderia ter ocorrido pelo fato de toda a sinalização  
23 pró-invasiva e migratória dependente dos MDMs ter sido desfeita pela  
24 desestabilização desses MDMs, e/ou também pelo fato da depleção de colesterol ter  
25 inibido a atividade da V-ATPase e todos os processos dependentes da atividade  
26 dessa bomba de prótons.

27 A hipótese de que os MDMs estão envolvidos na regulação da atividade da V-  
28 ATPase de mamíferos se iniciou com estudos em leveduras, nos quais evidências  
29 sugeriam que a esfingomielina (Chen et al., 2004) e a ceramida (Dawson et al.,  
30 2008) modulam o funcionamento da V-ATPase. Interessantemente, foi visto que a  
31 ceramida é necessária para oligomerização da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana em  
32 leveduras (Lee et al., 2002). Observando esses resultados oriundos de estudos em  
33 leveduras, em que o ambiente lipídico é tão importante para a atividade das H<sup>+</sup>-  
34 ATPase, e dado a conservação em termos de evolução molecular destas bombas, é

1 plausível que MDMs de células de mamíferos também regulem a atividade da V-  
2 ATPase. Nossos resultados mostram de forma inédita que a depleção de colesterol  
3 provocada pelo M $\beta$ CD inibiu de forma significativa a atividade de hidrólise de ATP e  
4 de transporte de H<sup>+</sup> pelas V-ATPases nas células de melanoma murino B16-F10 que  
5 superexpressam V-ATPase em suas membranas (Figura 17). É possível que a  
6 perturbação da fluidez de membrana provocada pela depleção de colesterol induzida  
7 por M $\beta$ CD, poderia levar a uma dissociação e/ou desacoplamento funcional dos  
8 domínios V<sub>1</sub>-V<sub>0</sub>, inibindo a atividade da V-ATPase, com conseqüente redução da  
9 acidificação mediada por essa bomba de prótons. Alternativamente, poderia haver o  
10 comprometimento de uma interação direta do colesterol com a V-ATPase através de  
11 seus sítios de interação proteína-lipídio no domínio V<sub>0</sub>, que seria necessária para o  
12 funcionamento eficiente da bomba.

13 Assim como uma elevada fluidez de membrana afeta a atividade da V-  
14 ATPase, a baixa fluidez também o faz. Já foi visto que todas as subunidades da V-  
15 ATPase dos endossomos tardios de células de rim de hamsters bebês se localizam  
16 nas frações de MDMs. Esses endossomos quando tratados com a droga U1866A,  
17 que provoca um acúmulo de colesterol, apresentaram um aumento da associação  
18 dos domínios V<sub>1</sub>-V<sub>0</sub>. O que corrobora a hipótese de um papel chave da composição  
19 da membrana na associação-dissociação dos domínios V<sub>1</sub>-V<sub>0</sub>. Foi sugerido que a  
20 diminuição da fluidez de membrana provocada pelo acúmulo de colesterol, induzida  
21 por U1866A, poderia levar a uma forte interação dos domínios V<sub>1</sub>-V<sub>0</sub> impedindo o  
22 funcionamento apropriado da bomba (Lafourcade et al., 2008).

23 Uma terceira alternativa para explicar a inibição da atividade das V-ATPases  
24 pela depleção de colesterol dos MDMs estaria relacionada com a actina e outros  
25 elementos do citoesqueleto. Sabe-se que os MDMs estão relacionados intimamente  
26 com a estruturação dos filamentos de actina do citoesqueleto. Foi demonstrado que  
27 proteínas localizadas nos MDMs podem regular a formação do citoesqueleto  
28 (Leitingerand e Hogg, 2002; Baron et al., 2003; MacLellan et al., 2005), enquanto os  
29 filamentos de actina, por sua vez, também podem participar na manutenção da  
30 integridade das membranas resistentes a detergente (DRMs) (Chichili e Rodgers,  
31 2009). Analisando membranas do Golgi foi sugerido que os filamentos de actina  
32 podem também regular indiretamente a associação dos domínios V<sub>0</sub>-V<sub>1</sub> da V-  
33 ATPase desde que os MDMs encontrem-se intactos (Serra-Peinado et al., 2016).  
34 Uma vez que provocamos uma perturbação na montagem dos MDMs pela depleção



1 de colesterol, isso pode ter afetado a interação desses MDMs com a actina do  
2 citoesqueleto, que por sua vez pode ter atuado no desacoplamento estrutural e/ou  
3 funcional da V-ATPase. Analisando nossos resultados e os dados presentes na  
4 literatura, fica claro que tanto a falta quanto o excesso de colesterol nas  
5 membranas inibem a atividade da V-ATPase, ou seja, para um apropriado  
6 funcionamento da bomba pode ser requerido uma composição específica de lipídios  
7 anulares e/ou de MDMs.

8       Eventos ou processos que necessitem de condições de pH intra- e  
9 extracelular específicas, como a fusão de membranas, podem ser afetados por uma  
10 falha na translocação de  $H^+$  energizado pelas V-ATPases. A inibição ou qualquer  
11 outro impedimento na translocação de  $H^+$  pelas V-ATPases provoca efeitos graves  
12 na célula que se duradouros, pode levar a morte celular (Hernández et al., 2012).  
13 Entre os processos que são afetados pela inibição da bomba destacam-se a inibição  
14 da autofagia, processo intimamente associado ao câncer. Todavia, o papel exercido  
15 e o mecanismo pelos quais a V-ATPase atuaria na prevenção da morte celular ou  
16 como mecanismo desta, difere entre os tipos de câncer e condição de  
17 desenvolvimento (Eng e Abraham, 2011). A inibição da sinalização via Wnt, um dos  
18 mecanismos fundamentais que direcionam a proliferação e polaridade celular (Logan  
19 e Nusse, 2004), bem como a diminuição da quimioresistência, são eventos também  
20 relacionados à acidificação do lúmen de organelas como o lisossomo, a qual  
21 depende da atividade de V-ATPases. De fato, o acúmulo de drogas no interior de  
22 organelas ácidas caracteriza células com perfil de quimioresistência (Altan et al.,  
23 1998; Murakami e Shibuya, 2001).

24       Sendo o controle do pH exercido pelas V-ATPases tão importante para as  
25 células, e em especial para as células tumorais, a atividade das V-ATPases também  
26 foi monitorada em células vivas, usando um sistema não invasivo de microeletrodos  
27 vibráteis (SIET). O SIET nos permitiu acompanhar em tempo real o comportamento  
28 dos fluxos de prótons nas células em resposta aos tratamentos. A inibição das V-  
29 ATPases pela Conc A provocou uma maior alcalinização do meio extracelular em  
30 células de melanoma B16-F10 do que na linhagem não carcinogênica, Melan-A.  
31 Porém, a depleção de colesterol teve efeito oposto na linhagem não maligna,  
32 estimulando o efluxo de  $H^+$  e conseqüentemente acidificando o meio extracelular  
33 (Figura 18 D e F), dado compatível com os resultados obtidos *in vitro* com  
34 membranas isoladas. Estudos *in vivo* têm mostrado que enquanto o pH extracelular

1 de células normais vai do neutro ao levemente alcalino (7.2-7.5), o pH extracelular  
2 de diferentes tipos de tumor varia entre 6.4-7.3 (Engin et al., 1995, Glunde et al.,  
3 2003). Uma variação na relação pH intracelular/pH extracelular de 0,1 unidade de pH  
4 pode romper processos bioquímicos e biológicos cruciais, como a síntese de ATP,  
5 funcionamento de enzimas, proliferação, migração, invasão e metástase  
6 (Pastorekova et al., 2007; Lou et al., 2011). Verificamos variações desta ordem no  
7 presente estudo, as quais podem estar associadas à inibição da atividade das V-  
8 ATPases pelos tratamentos e o bloqueio dos processos de migração e invasão.

9 Os nossos dados sugerem claramente uma relação entre a disponibilidade de  
10 colesterol em microdomínios das membranas com a expressão funcional de V-  
11 ATPases em células tumorais, no qual a inibição direta ou indireta da atividade desta  
12 bomba provocada pela depleção de colesterol resulta numa inibição de processos  
13 dependentes do funcionamento adequado das V-ATPases.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

## 1 8. CONCLUSÃO

2

3           Analisando os inúmeros trabalhos sobre MDMs, podemos hipotetizar que as  
4 principais, senão quase todas as reações celulares dependentes da dinâmica de  
5 transportadores, receptores e outras proteínas de membrana acontecem de forma  
6 estruturada em microdomínios específicos. Sendo a V-ATPase o sistema primário de  
7 transporte de íons nas membranas de vesículas e organelas ácidas, e na membrana  
8 plasmática de células tumorais, e diante dos dados aqui apresentados, é tentador  
9 especular que essa bomba de prótons seja finamente regulada pelo conteúdo de  
10 colesterol e/ou balanço da composição lipídica dos microdomínios em que está  
11 inserida, e em contrapartida, que esta também regule de alguma forma a  
12 estruturação funcional desses MDMs.

13           Nesse trabalho descrevemos como a depleção de colesterol afeta a atividade  
14 da V-ATPase e a migração e invasão celular dependentes do funcionamento dessa  
15 bomba de prótons. Demonstramos que a depleção de colesterol provoca uma  
16 inibição da migração e invasão celular em um grau semelhante à inibição provocada  
17 pela Conc A, inibidor clássico das V-ATPases. Em conjunto, os dados aqui  
18 apresentados sustentam a hipótese da atividade da V-ATPase ser dependente de  
19 MDMs enriquecidos de colesterol, e que a função dos MDMs na organização de  
20 estruturas migratórias e invasivas também depende da atividade da bomba. A  
21 inibição da V-ATPase induzida pela depleção de colesterol também pôde ser  
22 correlacionada, com a inibição do efluxo de prótons nas células tumorais vivas. Tal  
23 efeito impede a acidificação do microambiente extracelular das células tumorais, um  
24 elemento chave previamente relacionado ao mecanismo de ação da migração e  
25 invasão de células tumorais. O impacto potencial destes resultados para o  
26 desenvolvimento de novas terapias antimetastáticas, estabelece uma plataforma  
27 para estudos mecanísticos mais aprofundados sobre a interdependência funcional  
28 revelada entre MDMs e V-ATPases, e as diferenças existentes entre células  
29 tumorais e não tumorais.

30

31

## 1 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2 ABOULAICH, N.; VAINONEN, J. P.; STRALFORS, P.; VENER, A. V. Vectorial  
3 proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of  
4 polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in  
5 human adipocytes. *Biochemical Journal*, v. 383, p. 237–248, 2004.
- 6
- 7 ABRAMCZYK, H., SURMACKI, J., KOPEC, M., OLEJNIK, A. K., LUBECKA-  
8 PIETRUSZEWSKA, K., FABIANOWSKA-MAJEWSKA, K. The role of lipid droplets  
9 and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and  
10 MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. *Analyst*, v.  
11 140, p. 2224–2235, 2015.
- 12
- 13 ABULROB, A.; GIUSEPPIN, S.; ANDRADE; M. F.; MCDERMID, A.; MORENO, M.;  
14 STANIMIROVIC, D. Interactions of EGFR and caveolin-1 in human glioblastoma  
15 cells: evidence that tyrosine phosphorylation regulates EGFR association with  
16 caveolae. *Oncogene*, v. 23, p. 6967-6979, 2004.
- 17
- 18 ACKERMAN, D.; SIMON, M. C. Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh  
19 tumor microenvironment. *Trends in Cell Biology*, v. 24, p. 472–478, 2014.
- 20
- 21 ALTAN, N.; CHEN, Y.; SCHINDLER, M.; SIMON, S. M. Defective acidification in  
22 human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *The Journal of*  
23 *Experimental Medicine*, v.187, p.1583-1598, 1998.
- 24
- 25 AMADDII, M.; MEISTER, M.; BANNING, A.; TOMASOVIC, A.; MOOZ, J.;  
26 RAJALINGAM, K. TIKKANEN, R. Flotillin-1/reggie-2 protein plays dual role in  
27 activation of receptor-tyrosine kinase/mitogen-activated protein kinase signaling. *The*  
28 *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p. 7265-7278, 2012.
- 29
- 30 American Joint Committee on Cancer. Disponível em:  
31 <[https://cancerstaging.org/referencetools/deskreferences/Documents/47.Melanoma.](https://cancerstaging.org/referencetools/deskreferences/Documents/47.Melanoma.pdf)  
32 pdf>Acesso em: 02 de julho. 2017.
- 33 ANDRESSON, T.; SPARKOWSKI, J.; GOLDSTEIN, D. J.;SCHLEGEL, R. Vacuolar  
34 H(+)-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus  
35 E5 oncoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 6830–6837, 1995.
- 36 ANRAKU, Y.; UMEMOTO, N.; HIRATA, R.; OHYA, Y. Genetic and cell biological  
37 aspects of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *Journal of Bioenergetics and*  
38 *Biomembranes*, v. 24, p. 395-406, 1992.
- 39
- 40 ARATA, Y.; BALEJA, J. D.; FORGAC, M. Localization of subunits D, E and G in the  
41 yeast V-ATPase complex using cysteine-mediated crosslinking to subunit B.  
42 *Biochemistry*, v. 41, p. 11301–11307, 2002.
- 43 ARMSTONG, B. K.; KRICKER, A. How much melanoma is caused by sun?  
44 *Melanoma Res*, v.3, p. 395-401,1999.
- 45

- 1 ARTEAGA, C. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy.  
2 *Seminars in Oncology*, v. 30, p. 3-14, 2003.  
3
- 4 BAENKE, F.; PECK, B.; MIESS, H.; SCHULZE, A. Hooked on fat: the role of lipid  
5 synthesis in cancer metabolism and tumour development. *Disease Models &*  
6 *Mechanisms*, v.6, p.1353–1363, 2013.  
7
- 8 BARON, W.L.; DECKER, H.; COLOGNATO, C.; FFRENCH-CONSTANT. Regulation  
9 of integrin growth factor interactions in oligodendrocytes by lipid raft microdomains.  
10 *Current Biology*, v. 13, p. 151–155, 2003.  
11
- 12 BARTEL, K.; WINZI, M.; ULRICH, M.; KOEBERLE, A.; MENCHE, D.; WERZ, O.;  
13 MÜLLER, R.; GUICK, J.; VOLLMAR, A. M.; SCHWARZENBERG, V.K.V-ATPase  
14 inhibition increases cancer cell stiffness and blocks membrane related Ras signaling  
15 - a new option for HCC therapy. *Oncotarget*, p.1-12, 2016.  
16
- 17 BASERGA, R., PERUZZI, F., REISS, K. The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J*  
18 *Cancer*, v. 107, p. 873-877, 2003.  
19
- 20 BERNSTEIN, B. W., PAINTER, W. B., CHEN, H., MINAMIDE, L. S., ABE, H.,  
21 BAMBURG, J. R. *Intracellular pH modulation of ADF/cofilin proteins. Cell Motility and*  
22 *the Cytoskeleton*, v.47, p. 319–336, 2000.  
23
- 24 BESENICAR, M. P.; BAVDEK, A.; KLADNIK, A.; MACEK, P.; ANDERLUH, G.  
25 Kinetics of cholesterol extraction from lipid membranes by methylbeta- cyclodextrin—a  
26 surface plasmon resonance approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1778,  
27 p.175–184, 2008.  
28
- 29 BOCKELMANN, S.; MENCHE, D.; RUDOLPH, S.; BENDER, T.; GROND S et al  
30 Archazolid A binds to the equatorial region of the c-ring of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase.  
31 *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 38304–38314, 2010.  
32
- 33 BOWMAN, E.; J.; GRAHAM. L. A.; STEVENS, T. H.; BOWMAN, B. J. The  
34 bafilomycin/concanamycin binding site in subunit c of the V-ATPases from  
35 *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological*  
36 *Chemistry*, v. 279, n. 32, p. 33131–8, 2004.  
37
- 38 BOWMAN, E. J.; SIEBERS, A.; ALTENDORF, K. Bafilomycins: a class of inhibitors of  
39 membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proceedings*  
40 *of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 85, n. 2, p.  
41 7972–6. 1988.
- 42 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram  
43 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical*  
44 *Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.  
45
- 46 BRAVO-CORDERO JJ, et al. MT1-MMP proinvasive activity is regulated by a novel  
47 Rab8-dependent exocytic pathway. *The EMBO Journal*, v. 26, p.1499–510, 2007.  
48  
49

- 1 BROWN, D.; PAUNESCU, T. G.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V. Regulation of the  
2 V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid-base homeostasis and vesicle  
3 trafficking. *Journal Experimental of Biology*, v. 212, p. 1762–1772, 2009.
- 4
- 5 CAI, M.; LIU, P.; WEI, L.; WANG, J.; QI, J.; FENG, S.; DENG, L. Atp6v1c1 may  
6 regulate filament actin arrangement in breast cancer cells. *PLoS One*, v.9, n.1, p.1-5,  
7 2014.
- 8
- 9 CARDONE, R. A.; CASAVOLA, V. E.; RESHKIN, S. J. The role of disturbed pH  
10 dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in metastasis. *Nature*, p. 786-795, 2005.
- 11 CASTELLONE, R. D.; LEFFLER, N. R.; DONG, L.; YANG, L. V. Inhibition of tumor  
12 cell migration and metastasis by the proton-sensing GPR4 receptor. *Cancer Letters*,  
13 v. 312, p.197–208, 2011.
- 14
- 15 CASWELL, P. T, et al. Rab25 Associates with alpha 5 beta1 Integrin to promote  
16 invasive migration in 3D microenvironments. *Developmental Cell*, v.13, p. 496–510,  
17 2007.
- 18
- 19 CHEN, S. H.; BUBB, M. R.; YARMOLA, E. G.; ZUO, J.; JIANG, J, et al. Vacuolar H<sup>+</sup>-  
20 ATPase binding to microfilaments: regulation in response to phosphatidylinositol3-  
21 kinase activity and detailed characterization of the actin-binding site in subunit B. *The*  
22 *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 7988–7998, 2004.
- 23
- 24 CHICHILI, G.R.; RODGERS, W. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane  
25 raft structure. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, p. 2319–2328, 2009.
- 26
- 27 CHIN, L.; GARRAWAY, L. A.; FISHER, D. E. Malignant melanoma: genetics and  
28 therapeutics in the genomic era. *Genes & Development*, v. 20, p. 2149–2182, 2006.
- 29
- 30 CHOI, Y. H.; YANG, C. H.; KIM, H. W.; JUNG, S. Molecular modeling studies of the  
31 b-cyclodextrin in monomer and dimer form as hosts for the complexation of  
32 cholesterol. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 39, p.  
33 71–76, 2001.
- 34
- 35 CLARK, W.; FROM, L.; BERNARDINO E, A.; MIHM, M. C. The histogenesis and  
36 biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer*  
37 *Research*, v. 29, p.705-727, 1969.
- 38
- 39 COUET, J., M. SARGIACOMO, e M.P. LISANTI. Interaction of a receptor tyrosine  
40 kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and  
41 serine/threonine kinase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p.  
42 30429–30438, 1997.
- 43
- 44 COTTER, K.; CAPECCI, J.; SENNOUNE, S.; HUSS, M.; MAIER, M.; MARTINEZ-  
45 ZAGUILAN, R.; FORGACM. Activity of Plasma Membrane V-ATPases Is Critical for  
46 the Invasion of MDA-MB231 Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological*  
47 *Chemistry*, v. 290, n. 6, p. 3680–3692, 2015.
- 48

- 1 COXEY, R. A.; PENTCHEV, P. G.; CAMPBELL, G.; BLANCHETTE-MACKIE, E.J.  
2 Differential accumulation of cholesterol in Golgi compartments of normal and  
3 Niemann–Pick type C fibroblasts incubated with LDL: a cytochemical freeze-fracture  
4 study. *The Journal of Lipid Research*, v. 34, p.1165–1176, 1993.
- 5  
6 CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; FAY, J.R. Targeting the AKT protein kinase for  
7 cancer chemoprevention. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 6, p. 2139-2148, 2007.
- 8  
9 CRUCIAT, C. M.; OHKAWARA, B.; ACEBRON, S. P.; KARAUANOV, E.;  
10 REINHARD, C.; INGELFINGER, D.; BOUTROS, M.; NIEHRS, C. Requirement of  
11 prorenin receptor and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling.  
12 *Science*, v. 327, p. 459–463, 2010.
- 13  
14 CRUZ, P. M.; MO, H.; MCCONATHY, W. J.; SABNIS, N.; LACKO, A.G. The role of  
15 cholesterol metabolism and cholesterol transport in carcinogenesis: a review of  
16 scientific findings, relevant to future cancer therapeutics. *Frontiers in Pharmacology*,  
17 v. 4, n.1, p-19, 2013.
- 18  
19 CURRAN, S.; MURRAY, G.I. Matrix metalloproteinases: molecular aspect of their  
20 roles in tumour invasion and metastasis. *European Journal of Cancer*, v. 36, p.  
21 1621–1630, 2000.
- 22 DANGA, M.E.; YAAR, R.; BHAWAN. J. Melan-A positive dermal cells in malignant  
23 melanoma in situ. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 42, p. 388-93, 2015.
- 24  
25 DAWSON. K.; TOONE,W. M.; JONES, N.; WILKINSON, C. R. Loss of regulators of  
26 vacuolar ATPase function and ceramide synthesis results in multidrug sensitivity in  
27 *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, v.7,p. 926–937, 2008.
- 28  
29 DE LA SERRA, B. J.; PEREZ-GIL, J.; SIMONSEN, A. C.; BAGATOLLI, L.A  
30 Cholesterol rules: direct observation of the coexistence of two fluid phases in native  
31 pulmonary surfactant membranes at physiological temperatures. *The Journal of*  
32 *Biological Chemistry*, v. 279, p. 40715–40722, 2004.
- 33  
34 DE MILITO, A.; FAIS, S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors.  
35 *Future Oncology*, v.1, p. 779–786, 2005.
- 36  
37 DE MILITO, A.; IESSI, E.; LOGOZZI, M.; LOZUPONE, F.; SPADA, M.; MARINO, M.  
38 L.; FEDERICI, C.; PERDICCHIO, M.; MATARRESE, P.; LUGINI, L.; NILSSON, A.;  
39 FAIS, S. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cells tumors trough a  
40 caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer*  
41 *Research*, p. 5408-5417, 2007.
- 42  
43 DERMINE, J-F.; DUCLOS, S.; GARINI, J.; ST-LOUIS, F.; REA, S.; PARTON, R. G.;  
44 DESJARDINS, M. Flotillin-1-enriched Lipid Raft Domains Accumulate on Maturing  
45 Phagosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 21, p. 18507–18512,  
46 2001.
- 47  
48 DRORY, O.; FROLOW, F.; NELSON, N. Crystal structure of yeast V-ATPase C  
49 subunit reveals its stator function. *EMBO Reports*, v. 5, p.1148–1152, 2004.

- 1  
2 DUCHENE, D.; WOUESSIDJEW, D. Industrial uses of cyclodextrins and their  
3 derivatives. *Journal of Coordination Chemistry*, v. 27, p. 223–236, 1992.  
4
- 5 EGEBLAD, M.; E WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in  
6 cancer progression. *Nature Reviews*, v. 2, p. 161-175, 2002.
- 7 EL-SHEWY, H. M.; E, LUTTRELL.; L.M. Insulin-like growth factor-2/mannose-6  
8 phosphate receptors. *Vitamins and Hormones*, v. 80, p. 667-697, 2009.
- 21  
22 ENG, C. H.; ABRAHAM, R. T. The autophagy conundrum in cancer: influence of  
23 tumorigenic metabolic reprogramming. *Oncogene*, v. 24, n. 30, p- 4687-96, 2011.  
24
- 25 ENGELMAN, J. A.; CHU, C.; LIN, A.; JO, H.; IKEZU, T.; OKAMOTO, T.; KOHTZ, D.  
26 S.; LISANTI, M.P. Caveolin-mediated regulation of signaling along the p42/44 MAP  
27 kinase cascade in vivo. A role for the caveolin-scaffolding domain. *FEBS Letters*, v.  
28 428, p. 205-211, 1998.
- 29
- 30 ENGIN, K.; D.B LEEPER, J.R.; CATER, J. R.; THISTLETHWAITE, A. J.;  
31 TUPCHONG, L.; MCFARLANE, J. D. Extracellular pH distribution in human tumours.  
32 *International of Journal hyperthermia*, v. 11, p. 211–216, 1995.
- 33 ERDMANN, F.; LORTET-TIEULENT, J.; SCHÜZ, J.; ZEEB, H.; GREINERT,  
34 R.; BREITBART E. W.; BRAY, F. International trends in the incidence of malignant  
35 melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *International*  
36 *Journal of Cancer*, v. 15, n. 132, p. 385-400, 2013.
- 37 FABELLO, N.; MARTÍN, V.; MARÍN, R.; MORENO, D.; FERRER, I.; DÍAZ, M. Altered  
38 lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's  
39 disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiology of Aging*, v. 35, p.  
40 1801-1812, 2014.
- 41
- 42 FAIS. S.; DE MILITO, A.; YOU, H.; QIN, W. Targeting vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases as a new  
43 strategy against cancer. *Cancer Research*, v. 67, p. 10627–10630, 2007.  
44
- 45 FAN, S.; WANG, Y.; WU, Z.; ZHANG, Z.; LU, J.; LI, M.; SHAN, Q.; WU, D.; SUN, C.;  
46 HU, B.; ZHENG, Y. AGPAT9 suppresses cell growth, invasion and metastasis by  
47 counteracting acidic tumor microenvironment through KLF4/LASS2/V-ATPase  
48 signaling pathway in breast cancer. *Oncotarget*, v.6, p.18406–18417, 2015.
- 49
- 50 FEIJÓ, J. A.; SAINHAS, J.; HACKETT, G. R.; KUNKE, J. G.; HEPLER, P. K. Growing  
51 pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-  
52 dependent acidic tip. *Journal of Cell Biology*, v. 144, n. 3, p. 483–496, 1999.
- 53
- 54 FENDER, A.W.; NUTTER, J. M.; FITZGERALD, T.L.; BERTRAND, F. E.; SIGOUNAS  
55 G. Notch-1 promotes stemness and epithelial to mesenchymal transition in colorectal  
56 cancer. *The Journal of Biological Chemistry*, v.116, p. 2517–2527, 2015.  
57
- 58 FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S et al.  
59 GLOBOCAN 2012, cancer incidence and mortality worldwide IARC Cancer Base.  
60 *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, v 1, n. 11, 2012.



- 1  
2 FIGUEIREDO, L. C.; CORDEIRO, L. N.; ARRUDA, A. P.; CARVALHO, M. D. F.;  
3 RIBEIRO, E. M.; COUTINHO, H. D. M. Câncer de pele: estudo dos principais  
4 marcadores moleculares do melanoma cutâneo. *Revista Brasileira de*  
5 *Cancerologia*, v. 49, n. 3, p. 179-83, 2003.
- 6 FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *The*  
7 *Journal of Biological Chemistry*, v. 66, p. 375-400, 1925.
- 8  
9 FORGAC, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and  
10 pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.8, p. 917–929, 2007.
- 11  
12 FRICK, M.; BRIGHT, N. A.; RIENTO, K.; BRAY, A.; MERRIFIED, C.; NICHOLS, B. J.  
13 Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane  
14 curvature, and vesicle budding. *Current Biology*, v. 17, p.1151-1156, 2007.
- 15  
16 GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. Biological activities, mechanisms of action and  
17 biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH3 (Edelfosine), a  
18 proapoptotic agent in tumor cells. *Current Drug Metabolism*, v. 3, p. 491-525, 2002.
- 19  
20 GAJATE, C.; MOLLINEDO, F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH3 induces  
21 apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in  
22 human leukemic cells. *Blood*, v. 98, p. 3860-3863, 2001.
- 23  
24 GARBE, C.; BAUER, J. Melanoma. In Bologna, J. L., Jorizzo, J. L.; Schaffer, J.  
25 *Dermatology*. 3<sup>a</sup>ed. New York: Elsevier, p. 1885–1914, 2012.
- 26  
27 GARLAND, C. F.; GARLAND, F. C.; GORHAM, E. D. Epidemiologic evidence for the  
28 different roles of ultraviolet A and B radiation in melanoma mortality rates. *Ann*  
29 *Epidemiol*, v. 13, p. 395-404, 2003.
- 30  
31 GESTEL, R.A.V.; HELMS, J.B.; BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B. M. Effects of  
32 Methyl-*b*-Cyclodextrin-Mediated Cholesterol Depletion in Porcine Sperm Compared  
33 to Somatic cells. *Molecular Reproduction and Development* v. 72, p. 386-395, 2005.
- 34  
35 GEYER, M. *ET AL*. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor  
36 protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *The Journal of*  
37 *Biological Chemistry*, v. 277, p. 28521–2859, 2002.
- 38  
39 GILCHREST, B. A.; ELLER, M. S.; GELLER, A. C, et al. The pathogenesis  
40 of melanoma induced by ultraviolet radiation. *The New England Journal of Medicine* ,  
41 v. 340, p. 1341-1348, 1999.
- 42  
43 GIOCONDI, M. C.; MILHIET, P. E.; DOSSET, P.; L. E.; GRIMELLEC, C. Use of  
44 cyclodextrin for AFM monitoring of model raft formation. *Biophysical Journal*, v. 86,  
45 p.861–869, 2004.
- 46  
47 GKANTIRAGAS. I.; BRU, B.; STUVEN, E.; KALOYANOVA, D.; LI, X.L.; LOHR, K.;  
48 LOTTSPPEICH, F.; FELIX, T.; WIELAND, F. T. E.; HELMS, J. B. Sphingomyelin-

- 1 enriched Microdomains at the Golgi Complex. *Molecular Biology of the Cell*, v. 12, p.  
2 1819–1833, 2001.
- 3
- 4 GLUNDE, K.; GUGGINO, S.E.; SOLAIYAPPAN, M.; PATHAK, A. P.; ICHIKAWAZ, Y.;  
5 ZAVER, M.; BHUJWALLA, Z.M. Extracellular Acidification Alters Lysosomal  
6 Trafficking in Human Breast Cancer Cells. *Neoplasia*, v.5, p. 533–545, 2003.
- 7
- 8 GOLDSTEIN, J. L.; DEBOSE-BOYD, R. A.; BROWN, M. S. Protein sensors for  
9 membrane sterols. *Cell*, v. 124, p. 35–46, 2006.
- 10 GUÉGUINOU, M.; GAMBADE, A.; FÉLIX, R.; CHANTÔME, A.; FOURBON, Y.;  
11 BOUGNOUX, P.; WEBER, G.; POTIER-CARTEREAU, M.; VANDIER, C. Lipid rafts,  
12 KCa/ClCa/Ca<sup>2+</sup> channel complexes and EGFR signalling: novel targets to reduce  
13 tumor development by lipids? *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1848, n. 10, p. 2603–  
14 2620, 2014.
- 15 GUERRA, F. S.; SAMPAIO, L. S.; KONIG, S.; BONAMINO, M.; MARIA, I. D. R.;  
16 COSTA, M. L.; FERNANDES, P.; MERMELSTEIN, C. Membrane cholesterol  
17 depletion reduces breast tumor cell migration by a mechanism that involves non-  
18 canonical Wnt signaling and IL-10 secretion. *Translational Medicine*  
19 *Communications*, v. 1, n. 3, p. 1-10, 2016.
- 20
- 21 GUILLAUMOND, F.; BIDAUT, G.; OUAISSI, M.; SERVAIS, S.; GOUIRAND, V.;  
22 OLIVARES, SOPHIE, L.; LAURENCE B.; JULIE R.; ODILE GAYET.; MICHELLE P.;  
23 CYRILLE, G.; JÉRÉMY, N.; CÉLINE, L.; MARIE-NOËLLE, L.; STÉPHANE, G.;  
24 ANNE, T.; BART, S.; EZEQUIEL C.; RICHARD, T.; JUAN, L. I.; SOPHIE, V.  
25 Cholesterol uptake disruption, in association with chemotherapy, is a promising  
26 combined metabolic therapy for pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings of the*  
27 *National Academy of Sciences of the United States of America*, v.112, p. 2473–  
28 2478, 2015.
- 29
- 30 GRZYBEK, M.; KOZUBEK, A.; DUBIELECKA, P.; SIKORSKI, A.F. Rafts—the current  
31 picture. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, v. 43, p. 3–10, 2005.
- 32
- 33 GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Câncer metastasis: Building a Framework. *Cell*, v.  
34 127, p. 679-695, 2006.
- 35 GUSTERSON, B.A.; HUNTER, K.D. Should we be surprised at the paucity of  
36 response to EGFR inhibitors? *The Lancet Oncology*, v. 10, p. 522-527, 2009.
- 37 HAMM, R.; SUGIMOTO, Y.; STEINMETZ, H.; EFFERTH, T. Resistance mechanisms  
38 of cancer cells to the novel vacuolar H(+)-ATPase inhibitor archazolid B.  
39 *Investigational New Drugs*, v. 32, p. 893–903, 2014.
- 40 HATTULA K, et al. Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route  
41 linked to protrusion formation. *Journal of Cell Science*, v.119, p. 4866–77, 2006.
- 42
- 43 HEDGES, A. R. Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, v. 98, p.  
44 2035–2044, 1998.
- 45 HEAD, B. P.; HEMAL, H.; PATEL, H. H.; INSEL, P.A. Interaction of membrane/lipid  
46 rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function Membrane/lipid rafts,

- 1 mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochimica et Biophysica*  
2 *Acta*, v. 1838, p. 532–545, 2014.
- 3
- 4 HEGEDÜS, L.; CHO, H.; XIE, X.; ELICEIRI, G.L. Additional MDA-MB-231 breast  
5 cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. *Journal of Cellular*  
6 *Physiology*, v.216, p. 480–485, 2008.
- 7
- 8 HENDRIX, A.; SORMUNEN, R.; WESTBROEK, W.; LAMBEIN, K.; DENYS, H.; SYS,  
9 G.; BRAEMS, G.; VAN DEN BROECKE, R.; COCQUYT, V.; GESPACH, C.;  
10 BRACKE, M.; DE WEVER, O. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase expression and activity is  
11 required for Rab27B-dependent invasive growth and metastasis of breast cancer.  
12 *International Journal of Cancer*, v. 133, p. 843–854, 2013.
- 13
- 14 HESSELINK, R. W.; FEDOROV, A.; HEMMINGA, M. A.; PRIETO, M. Membrane-  
15 bound peptides from V-ATPases subunit a do not interact with an indole-type  
16 inhibitor. *Journal of Peptide Science*, v. 14, p. 383–388, 2008.
- 17 HERNÁNDEZ, A.; SERRANO-BUENO, G.; R. J.; PÉREZ-CASTIÑEIRA, E.;  
18 SERRANO, A. Intracellular Proton Pumps as Targets in Chemotherapy: V-ATPases  
19 and Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, p.1383-1394, 2012
- 20 HINDENBURG, A. A.; GERVASONI, J. E.; KRISHNA, S.; STEWART, V. J.;  
21 ROSADO, M.; LUTZKY, J.; BHALLA, K.; BAKER, M. A.; TAUB, R.N. Intracellular  
22 distribution and pharmacokinetics of daunorubicin in anthracycline-sensitive and -  
23 resistant HL-60 cells. *Cancer Research*, v. 49, p. 4607–4614, 1989.
- 24
- 25 HILL, M. M.; HEMMING, B.A. Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for  
26 cancer therapy, *Pharmacology & Therapeutics*, v. 93, p. 243-251, 2002.
- 27
- 28 HIGUCHI, A.; TAMAI, M.; KO, Y-A.; TAGAWA, Y-I.; WU, Y-H.; FREEMAN, B. D.;  
29 BING, J-T.; CHANG, Y.; LING, Q-D. Polymeric Membranes for Chiral Separation of  
30 Pharmaceuticals and Chemicals. *Polymer Reviews*, v. 50, n. 2, p. 113-143, 2010.
- 31
- 32 HINTON, A.; SENNOUNE, S. R.; BOND. S.; FANG, M.; REUVENI, M.; SAHAGIAN, G.  
33 G.; JAY, D.; MARTINEZ-ZAGUILAN, R.; FORGAC, M. Function of a Subunit  
34 Isoforms of the V-ATPase in pH Homeostasis and *in Vitro* Invasion of MDA-MB231  
35 Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 24, p.  
36 16400-16408, 2009b.
- 37 HINTON, A.; BOND, S.; FORGAC, M. V-ATPase functions in normal and disease  
38 processes. *European Journal of Physiology*, v. 457, n. 3, p. 589-98, 2009a.
- 39
- 40 HO, Y. K.; SMITH, R. G.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J.L. Low-density lipoprotein  
41 (LDL) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood*, v. 52, n.  
42 6, p. 1099-14, 1978.
- 43
- 44 HOLLIDAY, L.S. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: An Essential Multitasking Enzyme in  
45 Physiology and Pathophysiology. *New Journal of Science*, v. 2014, p. 1-21, 2014.
- 46

- 1 HOLLIDAY, L. S.; LU, M.; LEE, B. S.; NELSON, R. D.; SOLIVAN, S.; ZHANG, L.;  
2 GLUCK, S. L. The Amino-terminal Domain of the B Subunit of Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase  
3 Contains a Filamentous Actin Binding Site. *The Journal of Biological Chemistry*, v.  
4 275, p. 32331-32337, 2000.
- 5  
6 HOLTHUIS, J. C.; JANSEN, E. J.; VAN RIEL, M. C.; MARTENS, G. J. Molecular  
7 probing of the secretory pathway in peptide hormone-producing cells. *Journal of Cell*  
8 *Science*, v. 108, p. 3295–3305, 1995.
- 9 HU, J, et al. Cdc42-interacting protein 4 is a Src substrate that regulates invadopodia  
10 and invasiveness of breast tumors by promoting MT1-MMP endocytosis. *Journal of*  
11 *Cell Science*. 2011; 124:1739–1751.
- 12  
13 HUSS, M.; INGENHORST, G.; KONIG, S.; GASSEL, M.; DROSE, S.; ZEECK, A.;  
14 ALTENDORF, K.; WIECZOREK, H. Concanamycin A, the Specific Inhibitor of V-  
15 ATPases, Binds to the Vo Subunit c. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n.  
16 43, p. 40544-40548, 2002.
- 17  
18 HUSS, M.; SASSE, F.; KUNZE, B.; JANSEN, R.; STEINMETZ, H.; INGENHORST,  
19 G.; ZEECK, A.; WIECZOREK, H. Archazolid and apicularen: Novel specific V-  
20 ATPase inhibitors. *BMC Biochemistry*, 6:13 p. 1-10, 2005.
- 21  
22 IMAMURA, H.; NAKANO, M.; NOJI, H.; MUNHEYUKI, E.; OHKUMA, S.; MASASUKE  
23 YOSHIDA, M.; YOKOYAMA, K. Evidence for rotation of V1-ATPase. *Proceedings of*  
24 *the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, 2312–  
25 2315, 2003.
- 26  
27  
28 INCA- Instituto Nacional do Câncer. Disponível  
29 em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma)>  
30 Acesso em: 02 de maio. 2017.
- 31 INOUE, T.; FORGAC, M. Cysteine-mediated cross-linking indicates that subunit C of  
32 the V-ATPase is in close proximity to subunits E and G of the V1 domain and subunit  
33 a of the V0 domain. *The Journal of Biological Chemistry*, v.280, p. 27896–27903,  
34 2005.
- 35  
36 ITOH, Y, et al. Dimerization of MT1-MMP during cellular invasion detected by  
37 fluorescence resonance energy transfer. *Biochemical Journal*, v. 440, p. 319–26,  
38 2011.
- 39  
40 JAGIELSKA, J.; KAPOPARA, P. R.; SALGUERO, G.; SCHERR, M.; SCHUTT, H.;  
41 GROTE, SCHIEFFER, K.; BAVENDIEK, B. U. Interleukin-1 assembles a  
42 proangiogenic signaling module consisting of caveolin-1, tumor necrosis factor  
43 receptor-associated factor 6, p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), and  
44 MAPK-activated protein kinase 2 in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis,*  
45 *and Vascular Biology*, v. 32, p. 1280–1288, 2012.
- 46  
47 JANSEN, E. J.; SCHEENEN, W. J.; HAFMANS, T. G.; MARTENS, G. J. Accessory  
48 subunit Ac45 controls the V-ATPase in the regulated secretory pathway. *Biochimica*  
*et Biophysica Acta*, v. 17, n. 83, p. 2301–2310, 2008.

- 1 JANSEN.; E. J.; VAN BAKEL, N. H.; COENEN, A. J.; VAN DOOREN, S. H.; VAN  
2 LITH, H. A.; MARTENS, G.J. An isoform of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase accessory  
3 subunit Ac45, *Cellular and Molecular Life Science*, v. 67, p. 629–640, 2010.  
4
- 5 JAUREGUIBERRY, M. S.; TRICERRI, M. A.; SANCHEZ, S. A.; GARDA, H. A.;  
6 FINARELLI, G. S.; GONZALEZ, M. C.; RIMOLDI, O. J. Membrane organization and  
7 regulation of cellular cholesterol homeostasis. *The Journal of Membrane Biology*, v.  
8 234, p.183–194, 2010.  
9
- 10 JEONG, J. B.; HONG, S. C.; KOO, J. S.; JEONG, H.J. Induction of apoptosis and  
11 acetylation of histone H3 and H4 by arctigenin in the human melanoma cell line SK-  
12 MEL-28. *Food and Nutrition Science*, v. 2, p. 128–132, 2011.  
13
- 14 KAMATH, L.; MEYDANI, A.; FOSS, F et al. Migration and Invasion of Breast Cancer  
15 Cells Signaling from Protease activated Receptor-1 Inhibits. *Cancer Research*, v. 61,  
16 p. 5933-5940, 2001.  
17
- 18 KATSAMBAS, A.; NICOLAIDOU, E. Cutaneous malignant melanoma and sun  
19 exposure. *Archives of Dermatology*, v.132, 444-459, 1996.  
20
- 21 KAWASAKI-NISHI, S.; BOWERS, K.; NISHI, T.; FORGAC, M.; STEVENS, T. H. The  
22 amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit  
23 controls targeting and *in vivo* dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects  
24 coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*,  
25 v. 276, p. 47411–47420, 2001.  
26
- 27 KERBER, M. L, et al. A novel form of motility in filopodia revealed by imaging myosin-  
28 X at the single-molecule level. *Current Biology*, v.19, p. 967–73,2009.  
29
- 30 KIHARA, M.; HASEGAWA, K.; SOMEYA, H.; SAKAI, H. Chemoresistance to  
31 Concanamycin A1 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Is Attenuated by an  
32 HDAC Inhibitor Partly via Suppression of Bcl-2 Expression. *Plos One*, v. 8, n. 11, p1-  
33 13, 2013.  
34
- 35 KIM, E.; GORAKSHA-HICKS, P.; LI, L.; NEUFELD, T. P.; GUAN, K.L. Regulation of  
36 TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology*, v. 10, p. 935–  
37 945, 2008.  
38
- 39 KINOUCI, K.; ICHIHARA, A.; SANO, M.; SUN-WADA, G. H.; WADA, Y.; OCHI, H.;  
40 FUKUDA, T.; BOKUDA, K.; KUROSAWA, H.; YOSHIDA, N.; TAKEDA, S.; FUKUDA,  
41 K.; ITOH, H. The role of individual domains and the significance of shedding of  
42 ATP6AP2/(pro)renin receptor in vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase biogenesis, *PLos One*, v. 8, p.  
43 p. 78603-78615, 2013.
- 44 KINOUCI, K.; ICHIHARA, A.; SANO, M.; SUN-WADA, G. H.; WADA, Y.;  
45 KURAUCHI-MITO, A.; BOKUDA, K.; NARITA, T.; OSHIMA, Y.; SAKODA, M.;  
46 TAMAI, Y.; SATO, H.; FUKUDA, K.; ITOH, H. The (pro)rennin receptor/ATP6AP2 is  
47 essential for vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase assembly in murine cardiomyocytes. *Circulation*  
48 *Research*, v. 107, p. 30–34, 2010.  
49

- 1 KIYOSHIMA, T.; YOSHIDA, H.; WADA, H.; NAGATA, K.; FUJIWARA, H.  
2 Chemoresistance to Concanamycin A1 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Is  
3 Attenuated by an HDAC Inhibitor Partly via Suppression of Bcl-2 Expression, *Plos*  
4 *One*, v. 8, n.11, p-1-13, 2013.
- 5  
6 KONSTANTINOV, N. K.; ULFF-MØLLER, C. J.; DIMITROV, S. Histone variants and  
7 melanoma: facts and hypotheses. *Pigment Cell Melanoma Research*, v. 29, p. 426–  
8 433,2016.
- 9  
10 KRAMER, N.; WALZL, A.; UNGER, C.; ROSNER, M.; KRUPITZA, G.;  
11 HENGSTSCHLAGER, M.; DOLZNIG, H. *In vitro* cell migration and invasion assays.  
12 *Mutation Research*, v. 752, p.10–24, 2013.
- 13  
14 LAFONT, F.; NHIEU, G. T. V.; HANADA, K.; SANSONETTI, P.; VAN-DER-GOOT, F.  
15 G. Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol/ sphingolipid raft-  
16 mediated CD44–IpaB interaction. *The EMBO Journal*, v. 21, p. 4449–4457, 2002.
- 17  
18 LAFOURCADE, C.; SOBO, K.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; JÉROME GARIN, F. VAN  
19 DER, G. Regulation of the V-ATPase along the Endocytic Pathway Occurs through  
20 Reversible Subunit Association and Membrane Localization. *PLos One*, v. 3, n. 7, p.1-  
21 14, 2008.
- 22  
23 LANG, D. M., LOMMEL, S.; JUNG, M.; ANKERHOLD, R.; PETRAUSCH, B.;  
24 LAESSING, U.; WIECHERS, M.F.; PLATTNER, H. STUERMER, C. A. Identification  
25 of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster  
26 with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches  
27 in neurons, *Journal of Neurobiology*, v. 37, p.502–523, 1998.
- 28  
29 LANGE, Y. Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *The Journal*  
30 *of Lipid Research*, v.32, p. 329–339,1991.
- 31  
32 LE CLAINCHE, C.; CARLIER, M. F. Regulation of actin assembly associated with  
33 protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological Reviews*, v. 88, p. 489-513,  
34 2008.
- 35  
36 LECOMTE, N.; NJARDARSON, J. T.; NAGORNY, P.; YANG, G.; DOWNEY, R.;  
37 OUFELLI, O.; MOORE, M.A. S.; DANISHEFSKY, S.J. Emergence of potent  
38 inhibitors of metastasis in lung cancer via syntheses based on migrastatin. *PNAS*, v.  
39 108, n. 37, p. 15074-15078, 2011.
- 40  
41 LEE, M. C.; HAMAMOTO, S.; SCHEKMAN, R. Ceramide biosynthesis is required for  
42 the formation of the oligomeric H<sup>+</sup>-ATPase Pma1p in the yeast  
43 endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 22395–22401,  
44 2002.
- 45  
46 LEFRANC, F.; BROTTI, J.; KISS, R. Possible Future Issues in the Treatment of  
47 Glioblastomas: Special Emphasis on Cell Migration and the Resistance of Migrating  
48 Glioblastoma Cells to Apoptosis. *Journal of clinical oncology*, v. 23, p. 2411-2422,  
49 2005.

- 1  
2 LEITINGER, B. E.; HOGG, N. The involvement of lipid rafts in the regulation of  
3 integrin function. *Journal of Cell Science*, v. 115, p. 963–972, 2002.  
4
- 5 LI, C.; LU, N.; QI, Q.; FANNI, L.; YUNG, L.; YAN, C.; YANSU, Q.; ZHIYU, L.;  
6 HAIWEI, Z.; QIDONG, Y.; QUINGLONG, G. Gambogic acid inhibits tumor cell  
7 adhesion by suppressing integrin  $\beta 1$  and membrane lipid rafts-associated integrin  
8 signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*, v. 82, n. 12, p. 1873–1883, 2011  
9
- 10 LI, S. C.; KANE, P. M. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads.  
11 *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1793, p. 650–663, 2009.  
12
- 13 LI, Y.C M.J.; PARK, S.K.; YE, CW.; KIM, Y.; KIM, N. Elevated levels of cholesterol-  
14 rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by  
15 cholesterol-depleting agents. *American Journal of Pathology*, v. 168, 1107-1118,  
16 2006.  
17
- 18 LI, Y. P.; CHEN, W.; LIANG, Y., LI, E.; STASHENKO, P. Atp6i-deficient mice exhibit  
19 severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification.  
20 *Nature Genetic*, v. 23, p. 447–451, 1999.
- 21 LI, Y.; ZHANG, Z.; ZHOU X.; LI, L.; LIU, Q.; WANG, Z.; BAI, X.; YU ZHAO, Y.; SHI,  
22 H.; ZHANG, X.; LIHONG, Y. E L. The oncoprotein HBXIP enhances migration of  
23 breast cancer cells through increasing filopodia formation involving  
24 MEKK2/ERK1/2/Capn4 signaling. *Cancer Letters*, v.355, n.8, p. 288-296, 2014.  
25
- 26 LIN, H. H.; LIN, H.K.; LIN, I.H.; CHIOU, Y.W.; CHEN, H.W.; LIU, C.Y.; HARN, H.I.;  
27 CHIU, W. T.; WANG, Y.K.; SHEN, M.R.; TANG, M.J. Mechanical phenotype of cancer  
28 cells: cell softening and loss of stiffness sensing. *Oncotarget*, v. 6, p. 20946–20958,  
29 2015.  
30
- 31 LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane organising principle  
32 *Science*, v. 327, p. 46–50, 2010.
- 33 LIU, Y.; WANG, B.; WANG, J.; WAN, W.; SUN, R.; ZHAO, Y.; ZHANG, N. Down-  
34 regulation of PKC zeta expression inhibits chemotaxis signal transduction in human  
35 lung cancer cells. *Lung Cancer*, v. 63, p. 210–218, 2009.
- 36 LIU, Y. R.; SUN, W.; WAN, J.; WANG, J.J. Oppenheim, L. Chen, N. Zhang, The  
37 involvement of lipid rafts in epidermal growth factor-induced chemotaxis of breast  
38 cancer cells. *Molecular Membrane Biology*, v. 24, p. 91–101, 2007.  
39
- 40 LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications.  
41 *International Journal of Pharmaceutics*, v. 29, p.1–11, 2007.
- 42 LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. The Wnt signaling pathway in development and disease.  
43 *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 20, p. 781-810, 2004.
- 44
- 45 LÓPEZ, C.; DE VRIES, A. H.; MARRINK, S. J. Molecular Mechanism of Cyclodextrin  
46 Mediated Cholesterol Extraction. *PLoS Computational Biology*, v. 7, n. 3, p. 1-11,  
47 2011.

- 1  
2 LOU, Y.; MCDONALD, P.C.; OLOUMI, A.; CHIA, S.; OSTLUND, C.; AHMADI,  
3 A.; KYLE, A.; AUF DEM KELLER, U.; LEUNG, S.; HUNTSMAN, D.; CLARKE,  
4 B.; SUTHERLAND, B. W.; WATERHOUSE, D.; BALLY, M.; ROSKELLEY,  
5 C.; OVERALL, C. M.; MINCHINTO, A.; PACCHIANO, F.; CARTA, F.; SCOZZAFAVA,  
6 A.; NADIA, TOUISNI.; WINUM, J. Y. ; SUPURAN, C. T.; DEDHA S. Targeting tumor  
7 hypoxia: Suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic  
8 anhydrase IX inhibitors. *Cancer Research*, v. 71, p. 3364–3376, 2011.
- 9 LOZUPONE, F.; BORGHI, M.; MARZOLI, F.; AZZARITO, T.; MATARRESE, P.;  
10 IESSI, E.; VENTURI, G.; MESCHINI, S.; CANITANO, A.; BONA, R.; CARA, A.; FAIS,  
11 S. TM9SF4 is a novel V-ATPase-interacting protein that modulates tumor pH  
12 alterations associated with drug resistance and invasiveness of colon cancer cells.  
13 *Oncogene*, v. 34, p. 5163–5174, 2015.
- 14  
15 LU, X.; QIN, W.; LI, J.; TAN, N.; PAN, D.; HAITAO, Z.; LI, X.; GENFU, H.; HUIQUN,  
16 S.; MING, Y.; DAFAN, W.; JIAN, G.; SHENGLI, Y. The growth and metastasis of  
17 human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA  
18 targeting to the subunit ATP6L of proton pump. *Cancer Research*, v. 65, p. 6843–  
19 6849, 2005.
- 20  
21 LUCIANI, F.; SPADA, A. D. M.; MOLINARI, A.; RIVOLTINI, L.; MONTINARO, A.;  
22 MARRA, M.; LUGINI, L.; LOGOZZI, M.; LOZUPONE, F.; FEDERICI, C.; LESSI, E.;  
23 PARMIANI, G.; ARANCIA, G.; BELARDELLI, F.; FAIS, S. Effect of proton pump  
24 inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *Journal of the*  
25 *National Cancer Institute*, v. 96, p. 22, 2004.
- 26 LUDWIG, J.; KERSCHER, S.; BRANDT, U.; PFEIFFER, K.; GETLAWI, F.; APPS, D.  
27 K.; SCHAGGER, H. Identification and characterization of a novel 9.2-kDa membrane  
28 sector-associated protein of vacuolar proton-ATPase from chromaffin granules. *The*  
29 *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 10939–10947, 1998.
- 30 LUNDBAEK, J.A.; ANDERSEN, O. S.; WERGE, T.; NIELSEN C. Cholesterol-induced  
31 protein sorting: an analysis of energetic feasibility, *Biophysical Journal*, v. 84, p.  
32 2080–2089, 2003.
- 33  
34 LUO, M.; GUAN, J. L. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast  
35 cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Letters*, v. 13, p. 779-808,  
36 2009.
- 37 MACLELLAN, D.L.; STEEN, H.; ADAM, R.M.; GARLICK, M.; ZURAKOWSKI,  
38 D.GYGI, S.P.; FREEMAN, M.R.; SOLOMON, K.R. A quantitative proteomic analysis of  
39 growth factor-induced compositional changes in lipid rafts of human smooth muscle  
40 cells. *Proteomics*, v. 5, p. 4733–4742, 2005.
- 41  
42 MACKIE, R. M. ,HAUSCHILD, A., EGGERMON, A. M. M. Epidemiology of invasive  
43 cutaneous melanoma. *Annals of Oncology*, v. 20, n. 6, p1–7, 2009.
- 44 MAÑES, S., MIRA, E. GÓMEZ-MOUNTON, C.; LACALLE, R. A.; KELEER, P.;  
45 LABRADOR, J. P.; MARTINEZ-A, C. “Membrane raft microdomains mediate front-



- 1 rear polarity in migrating cells," *The European Molecular Biology Organization*  
2 *Journal*, v.18, n. 22, p. 6211–6220, 1999.
- 3
- 4 MARINO, M.L., FAIS, S., DJAVAHERI-MERGNY, M., VILLA, A, MESCHINI, S.,  
5 LOZUPONE, F., VENTURI, G., DELLA MINA ,P., PATTINGRE, S., RIVOLTINI, L.,  
6 CODOGNO, P., DE MILITO, A. Proton pump inhibition induces autophagy as a  
7 survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells. *Cell Death*  
8 *& Disease*, v. 1, n. 10, p. 1-9, 2010.
- 9
- 10 MARSHANSKY, V.; RUBINSTEIN, J. L.; GRÜBER, G. Eukaryotic V-ATPase: novel  
11 structural findings and functional insights. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1837, p.  
12 857–879, 2014.
- 13
- 14 MARTINEZ-ZAGUILAN, R.; RAGHUNAND, N.; LYNCH, R. M.; BELLAMY, W.;  
15 MARTINEZ, G. M.; ROJAS, B.; SMITH, D.; DALTON, W. S.; GILLIES, R.J. pH and  
16 drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H<sup>+</sup>-ATPase in  
17 drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, v. 57,  
18 p. 1037–1046, 1999.
- 19 MARTINEZ-ZAGUILAN, R.; SEFTOR, E. A.; SEFTOR, R. E.; CHU, Y. W.; GILLIES,  
20 R. J.; HENDRIX, M. J. Acidic pH enhances the invasive behavior of human  
21 melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, v.14, p. 176–186, 1996.
- 22 MELIKOVA, M. S.; BLAGOVESHCHENSKAIA, A. D.; NIKOL'SKII, N. N.;  
23 KORNILOVA, E.S. Effect of an vacuolar proton pump inhibitor bafilomycin A1 on the  
24 intracellular processing of markers for receptor-mediated and liquid phase  
25 endocytosis. *Tsitologija*, v. 44, p. 807–816, 2002
- 26 MELLMAN, Y. Y. Endocytosis and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in*  
27 *Biology*, v. 5, p.1- 25, 2013.
- 28 MERRIFIELD, C. J.; FELDMAN, M. E.; WAN, L.; ALMERS, W. Imaging actin and  
29 dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits, *Nature Cell*  
30 *Biology*, v.4, p. 691-698, 2002.
- 31
- 32 MERRIFIELD, C. J.; MOSS, S. E.; BALLESTREM, C.; IMHOF, B. A.; GIESE, G.;  
33 WUNDERLICH, I.; ALMERS, W. Endocytic vesicles move at the tips of actin tails in  
34 cultured mast cells, *Nature Cell Biology*, v. 1, p. 72-74, 1999.
- 35
- 36 MEYER, S.; ORSO, E.; SCHMITZ, G.; LANDTHALER, M.; VOGT, T. Lubrol-RAFTs in  
37 Melanoma Cells: A Molecular Platform for Tumor-Promoting Ephrin-B2 Integrin-b1  
38 Interaction. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, p. 1615-1621, 2007.
- 39 MINEO, C.; JAMES, G. L.; SMART, E. J.; ANDERSON, R.G. Localization of  
40 epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *The*  
41 *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p.11930-11935, 1996.
- 42
- 43 MINEO, C.; ANDERSON, R. G. A vacuolar-type proton ATPase mediates  
44 acidification of plasmalemmal vesicles during potocytosis. *Experimental Cell*  
45 *Research*, v. 224, p. 237–242, 1996.
- 46

- 1 MOLLINEDO, F. Antitumor ether lipids: proapoptotic agents with multiple therapeutic  
2 indications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v.17, p. 385-405, 2007.
- 3
- 4 MOLLINEDO, F. Editorial: antitumor alkylphospholipid analogs: a promising and  
5 growing family of synthetic cell membranetargeting molecules for cancer treatment.  
6 *Anti-cancer Agents Medicinal Chemistry*, v.14, p. 495-49, 2014.
- 7
- 8 MOLLINEDO, F.; GAJATE, C. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation  
9 in câncer. *Advances in Biological Regulation*, p. 1-17, 2014.
- 10
- 11 MOLLINEDO, F.; GAJATE, C.; MARTIN-SANTAMARIA, S.; GAGO, F. ET-18-OCH3  
12 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular  
13 activation of Fas/CD95 death receptor. *Current Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 3163-  
14 3184, 2004.
- 15
- 16 MORT, R. L.; JACKSON, I. J.; PATTON, E. E. The melanocyte lineage in  
17 development and disease. *Development*, v. 142, p. 620–632, 2015.
- 18
- 19 MORITA, T.; NAGAKI, T.; FUKUDA, I.; OKUMURA, K. Clastogenicity of low pH to  
20 various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, v. 268, p. 268:297–305, 1992.
- 21 MORIYAMA, K.; YAHARA, I. Two activities of cofilin, severing and accelerating  
22 directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations  
23 around the actin-binding helix. *The European Molecular Biology Organization*  
24 *Journal*, v. 18, p. 6752-6761, 1999.
- 25
- 26 MOSCHETTA, M.; TELEGRAFO, M.; LUCARELLI, N. M.; MARTINO, G.; RELLA, L.;  
27 IANORA, A. A. S.; ANGELELLI, G. Metastatic breast disease from cutaneous  
28 malignant melanoma. *International Journal of Surgery Case Reports*, v. 5, p.34– 36,  
29 2014.
- 30
- 31 MOURITSEN, O. G.; ZUCKERMANN, M.J. What's so special about cholesterol?  
32 *Lipids*, v. 39, p.1101–1113, 2004.
- 33
- 34 MULLER, P. A, et al. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell*,  
35 v. 139, p. 1327–41, 2009.
- 36
- 37
- 38 MUKHERJEE, S.; ZHA, X.; TABAS, I.; MAXFIELD, F. R. Cholesterol distribution in  
39 living cells: fluorescence imaging using dehydroergosterol as a fluorescent  
40 cholesterol analog. *Biophysical Journal*, v. 75, p. 1915–1925, 1998.
- 41 MURAKAMI, T.; SHIBUYA, I.; ISE, T. et al. Elevated expression of vacuolar proton  
42 pump genes and cellular pH in cisplatin resistance. *International Journal of Cancer*,  
43 v. 93, p. 869-874, 2001.
- 44 NANDA, A.; BRUMELL, J. H.; NORDSTROM, T.; KJELDSEN, L.; SENGELOV, H.;  
45 BORREGAARD, N.; ROTSTEIN, O. D.; GRINSTEIN, S. Activation of proton pumping  
46 in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H<sup>+</sup>-  
47 ATPases. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p.15963–15970, 1996.

- 1 NIIKURA, K. Effect of a V-ATPases inhibitor, FR202126, in syngeneic mouse model  
2 of experimental bone metastasis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 60,  
3 555–562, 2002.
- 4 NIIKURA, K.; TAKANO, M.; SAWADA, M. A novel inhibitor of vacuolar ATPase,  
5 FR167356, which can discriminate between osteoclast vacuolar ATPase and  
6 lysosomal vacuolar ATPase. *British Journal of Pharmacology*, v.142, p. 558–566  
7 2004.
- 8 NISHI, T.; FORGAC, M. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases -nature's most versatile proton  
9 pumps. *Nature Reviews Cellular Molecular Biology*, v.3, p. 94–103, 2002.
- 10 NISHI, T.; SHOKO KAWASAKI-NISHI, S.; FORGAC, M. Expression and Function of  
11 the Mouse V-ATPase d Subunit Isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, v.  
12 278, n. 47, p. 46396–46402, 2003.
- 13 NISISHO, T.; HATA, K.; NAKANIHI, M.; MORITAY, SUN-WADA G-H,WADA Y,  
14 YASUI N.; YONEDA, T. The  $\alpha 3$  isoform vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase promotes distant  
15 metastasis in the mouse B16 melanoma cells. *Molecular Cancer Research*,v. 9, p.  
16 845–855, 2011.
- 17  
18 OATES, A.J.; SCHUMAKER, L.M.; JENKINS, S.B.; PEARCE, A.A.; DACOSTA, S.A.;  
19 ARUN, B.; ELLIS, M. J. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2  
20 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer*  
21 *Research and Treatment*, v. 47, p. 269-281, 1998.
- 22  
23 OHVO, H.; SLOTTE, J. P. Cyclodextrin-mediated removal of sterols from  
24 monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate.  
25 *Biochemistry*, v. 35, p. 8018–8024, 1996.
- 26  
27 OKA, T.; MURATA, Y.; NAMBA, M.; YOSHIMIZU, T.; TOYOMURA, T.; YAMAMOTO,  
28 A.; SUN-WADA, G. H.; HAMASAKI, N.; WADA, Y.; FUTAI, M.  $\alpha 4$ , a unique kidney-  
29 specific isoform of mouse vacuolar H<sup>+</sup> -ATPase subunit a. *The Journal of Biological*  
30 *Chemistry*, v. 276, p. 40050–40054, 2001.
- 31  
32 OKOROKOV, L. A.; LICHKO, L. P. The identification of a proton pump on vacuoles of  
33 the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. ATPase is electrogenic H<sup>+</sup>- translocate. *FEBS*  
34 *Letters*, v. 155, p. 102-106, 1983.
- 35  
36 OSHIMA, Y.; KINOUCI, K.; ICHIHARA, A.; SAKODA, M.; KURAUCHI-MITO, A.;  
37 BOKUDA, K.; NARITA, T.; KUROSAWA, H.; SUN-WADA, G.-H.; WADA, Y.;  
38 YAMADA, T.; TAKEMOTO, M.; SALEEM, M.; QUAGGIN, S.; ITOH, H. Prorenin  
39 receptor is essential for normal podocyte structure and function. *Journal of the*  
40 *American Society of Nephrology*, v. 22, p. 2203–2212, 2011.
- 41  
42 OUAR, Z.; BENS, M.; VIGNES, C.; PAULAIS, M.; PRINGEL, C.; FLEURY, J.;  
43 CLUZEAUD, F.; LACAVE, R.; VANDEWALLE, A. Inhibitors of vacuolarH<sup>+</sup>-ATPase  
44 impair the preferential accumulation of daunomycin in lysosomes and reverse the  
45 resistance to anthracyclines in drugresistant renal epithelial cells. *Biochemical*  
46 *Journal*, v. 370, p.185–193, 2003.

- 1 PALUNIC, J.; KOVACEVIC, Z.; JANSSON, P.J.; KALINOWSKI, D.; MERLOT, A. M.;  
2 HUANG, M.L. H.; LOK, H. C.; SAHNI, S.; LANE, D.J. R.; RICHARDSON, D. R. Roads  
3 to melanoma: key pathways and emerging players in melanoma progression and  
4 oncogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1863, p. 770–784, 2016.
- 5  
6 PANDE, G. “The role of membrane lipids in regulation of integrin functions,” *Current*  
7 *Opinion in Cell Biology*, v.12, n. 5, p. 569–574, 2000.
- 8  
9 PARTON, R. G. Caveolae—from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nature*  
10 *Reviews Cellular Molecular Biology*, v. 4, p.162–167, 2003.
- 11  
12 PASTOREKOVA, S. J.; KOPACEK, J. PASTOREK. Carbonic anhydrase inhibitors  
13 and the management of cancer. *Current Topics in Medicinal*, v. 7, p.865–878, 2007.
- 14  
15 PASTOR-SOLER, N.; BEAULIEU, V.; LITVIN, T. N.; DA SILVA, N.; CHEN, Y.;  
16 BROWN, D.; BUCK, J.; LEVIN, L. R.; BRETON, S. Bicarbonate-regulated adenyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *The*  
17 *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p-49523–49529, 2003.
- 18  
19 PEREZ-CASTIÑEIRA, J. R.; APPS, D. K. Vacuolar H(+)-ATPase of adrenal secretory  
20 granules. Rapid partial purification and reconstitution into proteoliposomes.  
21 *Biochemical Journal*, v. 271, n.1, p. 127-31, 1990.
- 22  
23 PEREZ-SAYANS, M.; SOMOZA-MARTIN, J. M.; BARROS-ANGUEIRA, F.; REY, J.  
24 M.; GARCIA-GARCIA, A. V-ATPase inhibitors and implication in cancer treatment.  
25 *Cancer Treatment Reviews*, v. 35, p.707–713, 2009.
- 26  
27 PETRANGOLINI, G.; SUPINO, R.; PRATESI, G.; BO, L. D.; DAL, B. O. L.;  
28 TORTORETO, M., CROCE, A. C.; MISSIANO, P.; BELFIORE, P.; FARINA,  
29 C.; ZUNINO, F. Effect of a novel vacuolar-H<sup>+</sup> ATPase inhibitor on cell and tumor  
30 response to camptothens. *Journal of Pharmacology and Experimental*  
31 *Therapeutics*, v.318, p. 939-946, 2006.
- 32  
33 PIETREMENT, C.; SUN-WADA, G-H.; DA SILVA, N.; MCKEE, M.; MARSHANSKY,  
34 V.; BROWN, D.; FUTAI, M.; BRETON, S. Distinct Expression Patterns of Different  
35 Subunit Isoforms of the V-ATPase in the Rat Epididymis. *Biology of Reproduction*, v.  
36 74, p.185–194, 2006.
- 37  
38 PIKE, L. J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and  
39 Cell Function, *Journal of Lipid Research*, v. 47, p. 1597–1598, 2006.
- 40  
41 POLLAK, M. N.; SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S.E. Insulin-like growth  
42 factors and neoplasia. *Nature Reviews Cancer*, v.4, p. 505-518, 2004.
- 43  
44 POWELL, B.; GRAHAM, L. A.; STEVENS, T.H. Molecular characterization of the  
45 yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase proton pore. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275,  
46 p. 23654–23660, 2000.

- 1 QIU, B.; ACKERMAN, D.; SANCHEZ, D. J.; LI, B.; OCHOCKI, J. D.;  
2 GRAZIOLI, BOBROVNIKOVA-MARJON, E.; DIEHL, J. A.; KEITH, B.; SIMON, M. C.  
3 HIF2 $\alpha$ dependent lipid storage promotes endoplasmic reticulum homeostasis in  
4 clearcell renal cell carcinoma. *Cancer Discovery*, v. 5, p. 652–667, 2015.
- 5  
6 RAINERO, E, et al. Diacylglycerol kinase alpha controls RCP-dependent integrin  
7 trafficking topromote invasive migration. *Cell Biology*, v. 196, p. 277–95, 2012.
- 8  
9 RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of  
10 inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in  
11 macrophage J774A.1. *Life Sciences*, v. 68, p. 921–931, 2001.
- 12  
13 RAZANI, B.; WOODMAN, S. E.; LISANTI, M. P. Caveolae: from cell biology to animal  
14 physiology. *Pharmacological Reviews*, v. 54, p. 431–467, 2002.
- 15  
16 RIEDIGER, F.; QUACK, I.; QADRI, F.; HARTLEBEN, B.; PARK, J.K.; POTTHOFF S.  
17 A, et al. Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *Journal*  
18 *of the American Society of Nephrology*, v. 22, p. 2193–2202, 2011.
- 19  
20 RIDLEY, A. J., SCHWARTZ, M. A., BURRIDGE, K., FIRTEL, R. A., GINSBERG, M.  
21 H., BORISY, G., PARSONS, J. T., HORWITZ, A. R. Cell migration: integrating  
22 signals from front to back, *Science*, v. 302, p.1704–1709, 2003.
- 23  
24 RIDSDALE, A.;DENIS, M.; GOUGEON, P.Y.; NGSEE, J. K.; PRESLEY, J. F.; ZHA,  
25 X. Cholesterol is required for efficient endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of  
26 secretory membrane proteins. *Molecular Biology of the Cell*, v. 17, p. 1593–1605,  
2006.
- 27  
28 RINGERIKE, T.; BLYSTAD, F. D.; LEVY, F. O.; MADSHUS, I. H.; STANG, E.  
29 Cholesterol is important in control of EGF receptor kinase activity but EGF receptors  
30 are not concentrated in caveolae. *Journal of Cell Science*, v.115, p. 1331-1340,  
2002.
- 31  
32 ROEPSTORFF, K.; THOMSEN, P.; SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Sequestration of  
33 epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding.  
34 *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 18954-18960, 2002.
- 35  
36 RODUIT, C.; VAN DER, GOOT.; F. G.; DE LOS RIOS, P.; YERSIN, A.; STEINER,  
37 P.; DIETLER, G.; CATSICAS, S.; LAFONT, F.; KASAS, S. Elastic membrane  
38 heterogeneity of living cells revealed by stiff nanoscale membrane domains,  
39 *Biophysical Journal*, v. 94, p. 1521–1532, 2008.
- 40  
41 ROJAS, J. D.; SENNOUNE, S. R.; MAITI, D.; BAKUNTS, K.; REUVENI, M.; SANKA,  
42 S. C.; MARTINEZ, G. M.; SEFTOR, E. A.; MEININGER, C. J.; WU, G.; WESSON, D.  
43 E.,; M. HENDRIX, J. C.; MARTINEZ-ZAGUILAN, R. Vacuolar-type H-ATPases at the  
44 plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells.  
45 *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, v. 291, p. 1147–  
46 1157, 2006.

- 1 ROJAS, J. D.; SENNOUNE, S.; MARTINEZ, G.M.; BAKUNTS, K.; MEININGER, C.J.;  
2 WU, G.; WESSON, D. E.; SEFTOR, E. A.; HENDRIX, M.J.C.; MARTÍNEZ-  
3 ZAGUILÁN, R. *Journal of Cellular Physiology*, v. 201, p.190–200, 2004.
- 4 ROUX,M.; AUZELY-VELTY, R.; DJEDAINI-PILARD, F.; PERLY, B. Cyclodextrin-  
5 induced lipid lateral separation in DMPC membranes: 2H nuclear magnetic  
6 resonance study. *Biophysical Journal*, v. 82, p. 813–822, 2002.
- 7  
8 ROZELLE, A. L.; MACHESKY, L. M.; YAMAMOTO, M.; DRIESSENS, M. H.; INSALL,  
9 R. H.; ROTH, M. G.; LUBY-PHELPS, K.; MARRIOTT, G.; HALL, A.; YIN, H.  
10 L.Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft  
11 enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Current Biology*, v. 10, p. 311-320, 2000.
- 12  
13 RUNZ, H.; MIURA, K.; WEISS, M.; PEPPERKOK, R. Sterols regulate ER-export  
14 dynamics of secretory cargo protein ts-O45-G. *The Euroepan Molecular Biology*  
15 *Organization Journal*, v. 25, p. 2953–2965, 2006.
- 16  
17 RUSH, J. S.; QUINALTY, L. M.; ENGELMAN, L.; SHERRY, D. M.; CERESA, B.P.  
18 Endosomal accumulation of the activated epidermal growth factor receptor (EGFR)  
19 induces apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 287, p.712–722, 2012.
- 20 RYLAND, L. K.; FOX, T. E.; LIU, X.; LOUGHRAN, T. P.; KESTER, M. Dysregulation  
21 of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, v.11, n. 2, p. 138-  
22 49, 2011.
- 23  
24 SAGERMANN, M.; STEVENS, T. H.; MATTHEWS, B. W. Crystal structure of the  
25 regulatory subunit H of the V-type ATPase of *S. cerevisiae*. *Proceedings of the*  
26 *National Academy of Sciences of the United States of America*, v.98, p.7134–7139,  
27 2001.
- 28  
29 SAMARÃO, S. S.; TEODORO, C. E. S.; SILVA, F. E.; CAMILA C. RIBEIRO, C. C.;  
30 GRANATO, T. M.; BERNARDES, N. R.; RETAMAL, C. A.; FAÇANHA, A. R.;  
31 OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; OKOROKOV, L. A. V H<sup>+</sup>-ATPase along the yeast  
32 secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes. *Biochimica et*  
33 *Biophysica Acta*, v. 1788, p. 303–313, 2009.
- 34  
35 SAMBADE, M.; KANE, P. M. The yeast vacuolar proton-translocating ATPase  
36 contains a subunit homologous to the *Manduca sexta* and bovine esubunits that is  
37 essential for function. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 17361–17365,  
38 2004.
- 39  
40  
41 SANTOS, C. R.; SCHULZE A. Lipid metabolism in cancer. *The FEBS Journal* ,v.  
42 279, p. 2610–23, 2012.
- 43 SANTOS, J.M.C.O. Caracterização morfológica e bioquímica de linhagens e tumores  
44 de melanoma e câncer de próstata com diferentes potenciais metastáticos. (Tese) –  
45 Campos dos Goytacazes – Rj, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF,  
46 125p, 2014.

- 1 SASSE, F.; STEINMETZ, H.; HOFLE, G.; REICHENBACH, H. Archazolids, new  
2 cytotoxic macrolactones from *Archangium gephyra* (Myxobacteria). Production,  
3 isolation, physico-chemical and biological properties. The *Journal of Antibiotics*, v.  
4 56, p. 520–525, 2003.  
5
- 6 SCHADENDORF, D.; HODI, F. S.; ROBERT, C.; WEBER, J. S.; MARGOLIN,  
7 K.; HAMID, O.; PATT, D.; CHEN, T. T.; BERMAN, D. M.; WOLCHOK, J. D. Pooled  
8 Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of  
9 Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*,  
10 v.10. n. 33, p.1-17, 2015.
- 11  
12 SCHAFFER, D. A.; WEED, S. A.; BINNS, D.; KARGINOV, A. V.; PARSONS, J. T.;  
13 COOPER, J. A. Dynamin 2 and cortactin regulate actin assembly and filament  
14 organization. *Current Biology*, v.12, p. 1852-1857, 2002.  
15
- 16 SCHMORANZER, J.; SIMON, S. M. Role of microtubules in transport and fusion of  
17 post-Golgi vesicles at the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, v. 14,  
18 p.1558–1569, 2003.  
19
- 20 SCHNEIDER, L.S.; VON SCHWARZENBERG, K.; LEHR, T.; ULRICH, M.; KUBISCH-  
21 DOHMEN, R.; LIEBL, J.; TRAUNER, D.; MENCHE, D.; VOLLMAR, A.M. Vacuolar-  
22 ATPase Inhibition Blocks Iron Metabolism to Mediate Therapeutic Effects in Breast  
23 Cancer. *Cancer Research*, v.75, p. 2863–2874, 2015.
- 24 SCHROEDER, A.; LEVINS, C. G.; CORTEZ, C.; LANGER, R.; ANDERSON,  
25 D.G. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. *Journal of Internal Medicine*, v.  
26 267, n. 1, p. 9-21, 2010.  
27
- 28 SENNOUNE, S. R.; BAKUNTS, K.; MARTINEZ, G.M.; CHUA-TUAN, J. L.; KEBIR,  
29 Y.; ATTAYA, M. N.; MARTINEZ-ZAGUILAN, R. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in human  
30 breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional  
31 activity. *American Journal of Physiology- Cell Physiology*, v. 286, p. 1443–1452,  
32 2004a.
- 33 SENNOUNE, S. R.; LUO, D.; MARTÍNEZ-ZAGUILÁN, R. Plasmalemmal Vacuolar-  
34 Type H<sup>+</sup>-ATPase in Cancer Biology. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v. 40, p. 185-  
35 206, 2004b.
- 36 SENNOUNE, S. R.; MARTINEZ-ZAGUILAN, R. Plasmalemmal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases  
37 in angiogenesis, diabetes and cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*,  
38 v. 39, p. 427–433, 2007.
- 39 SERRA-PEINADO, C.; SICART, A.; LLOPIS, J.; EGEA, G. Actin filaments are  
40 involved in the coupling of V<sub>0</sub>-V<sub>1</sub> domains of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase at the Golgi  
41 Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 291, p. 7286-7299, 2016.  
42

- 1 SETTEMBRE, C.; ZONCU, R.; MEDINA, D. L.; VETRINI, F.; ERDIN, S.; ERDIN, S;  
2 HUYNH, T.; FERRON, M.; KARSENTY, G.; VELLARD, M. C.; FACCHINETTI, V.;  
3 SABATINI, D. M.; BALLABIO, A. A lysosome-tonucleus signalling mechanism senses  
4 and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The Euroepan Molecular Biology*  
5 *Organization Journal*, v. 31, p. 1095–1108, 2012.
- 6
- 7 SHAO, E.; FORGAC, M. Involvement of the nonhomologousregion of subunit A of  
8 the yeast V-ATPasein coupling and *in vivo* dissociation. *The Journal of Biological*  
9 *Chemistry*, v. 279, p. 48663–48670, 2004.
- 10
- 11 SHAO, E.; NISHI, T.; KAWASAKI-NISHI, S.; FORGAC, M. Mutational analysis of the  
12 non-homologous region of subunit A of the yeast V-ATPase. *The Journal of Biological*  
13 *Chemistry*, v.278, p. 12985–12991, 2003.
- 14
- 15 SHEN, W.; ZOU, X.; CHEN, M.; LIU, P.; SHEN, Y.; HUANG, S.; GUO, H.; ZHANG, L.  
16 Effects of diphyllin as a novel V-ATPase inhibitor on gastric adenocarcinoma.  
17 *European Journal of Pharmacology*, v.667, p. 330–338, 2011. SIMONS, K.;  
18 SAMPAIO, J. L. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor*  
19 *Perspectives in Biology*, v. 3, p. 1–17, 2011.
- 20
- 21 SILVA, D. M., MERINO, C. G. Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of  
22 mature cerebellargranule neurons are microcompartments for calcium/reactive  
23 oxygenand nitrogen species cross-talk signaling. *Cell Calcium*, v. 56, p. 108-123,  
24 2014.
- 25 SIMONS, K.; E SAMPAIO, J. L. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold*  
26 *Spring Harb Perspect Biol*, v. 3, p 1-10, 2011.
- 27 SIMONS, K.; VAZ, W. L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annual*  
28 *Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, v.33, p. 269–295, 2004.
- 29
- 30 SINGH, B.P.; SALAMA, A. K. S. Updates in therapy for advanced melanoma.  
31 *Cancers*, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2016.
- 32
- 33 SKINNER, M. A.; WILDEMAN, A.G.  $\beta$ 1 Integrin Binds the 16-kDa Subunit of  
34 Vacuolar H1-ATPase at a Site Important for Human Papillomavirus E5 and Platelet-  
35 derived Growth Factor Signaling. *The journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 33, p.  
36 23119–23127, 1999.
- 37 SLOANE, B. F.; HONN. K. V.; SADLER, J.G.; TURNER, W. A.; KIMPSON, J.J.  
38 TAYLOR, J.D. Catepsin B activity in B16 melanoma cells: A possible marker for  
39 metastatic potencial. *Cancer Research*, v. 42, p. 980-986, 1982.
- 40 SMARDON, A. M., TARSIO, M.; KANE, P. M. The RAVEcomplex is essential for  
41 stable assembly of the yeastV-ATPase. *The journal of Biological Chemistry*,  
42 p.13831–13839, 2002.
- 43
- 44 SMITH, A. N.; BORTHWICK, K. J.; KARET. F. E. Molecular cloning and  
45 characterization of novel tissue-specific isoforms of the human vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase



- 1 C, G and d subunits, and their evaluation in autosomal recessive distal renal tubular  
2 acidosis. *Gene*, v. 297, p. 169–177, 2002.
- 3
- 4 SMITH, A. N.; FINBERG, K. E.; WAGNER, C. A.; LIFTON, R. P.; DEVONALD, M. A.;  
5 SU, Y.; KARET, F. E. Molecular cloning and characterization of Atp6n1b: a novel  
6 fourth murine vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -subunit gene. *The Journal of Biological*  
7 *Chemistry*, v.276, p. 42382–42388, 2001.
- 8
- 9 SMITH, M. B.; KIUCHI, T.; WATANABE, N.; VAVYLONIS, D. Distributed Actin  
10 Turnover in the Lamellipodium and FRAP Kinetics. *Biophysical Journal*, v.104, p.  
11 247–257, 2013.
- 12
- 13 SPRENGER, R. R.; FONTIJN, R. D.; van MARLE, J.; PANNEKOEK, H.;  
14 HORREVOETS, A. J. G. Spatial segregation of transport and signalling functions  
15 between human endothelial caveolae and lipid raft proteomes. *Biochemical Journal*,  
16 v.400, p. 401–410, 2006.
- 17
- 18 STAUBACH, S.; HANISCH, F.G. Lipid rafts: signaling and sorting platforms of cells  
19 and their roles in cancer. *Expert Review of Proteomics*, v. 8, p. 263-277, 2011.
- 20
- 21 STRACCI, F.; MINELLI, L.; D'ALO, D.; FUSCO-MOFFA, I.; FALSETTINI, E.;  
22 CASSETTI, T.; ROMAGNOLI, C.; LA ROSA, F. Incidence, mortality and survival  
23 trends of cutaneous melanoma in Umbria, Italy. 1978–82 and 1994–98. *Tumori*, v.  
24 91, p. 6–8, 2005.
- 25
- 26 STRANSKY, L.; COTTER, K.; FORGAC, M. The function of V-ATPases in cancer.  
27 *Physiological Reviews*, v.96, p. 1071–1091, 2016.
- 28
- 29 STRANSKY, L. A.; FORGAC, M. Amino acid availability modulates vacuolar H<sup>+</sup>-  
30 ATPase assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, v.290, p. 27360–27369,  
31 2015.
- 32
- 33 SUN, M.; NORTHUP, N.; MARGA, F.; HUBER, T.; BYFIELD, F.J.; LEVITAN, I.;  
34 FORGACS, G. The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton  
35 adhesion. *Journal of Cell Science*, v. 120, p. 2223–2231, 2007.
- 36
- 37 SURMACZ, E. Growth factor receptors as therapeutic targets: strategies to inhibit the  
38 insulin-like growth factor I receptor. *Oncogene*, v.22, p. 6589-6597, 2003.
- 39
- 40 SUPINO, R.; PETRANGOLI, G.; PRATESI, G.; TORTORETO, M.; FAVINI, E.; BO D.  
41 L.; CASALINI, P.; RADAELLI, E.; CROCE, A. C.; BOTTIROLI, G.; MISIANO, P.;  
42 FARINA, C.; ZUNINO, F. Antimetastatic effect of a small-molecule vacuolar H<sup>+</sup>-  
43 ATPase inhibitor in *in vitro in vivo* preclinical studies. *The Journal of Pharmacology*  
44 *and Experimental Therapeutics*, v. 324, p. 15-22, 2008.
- 45
- 46 SUN-WADA, G. H.; TOYOMURA, T.; MURATA, Y.; YAMAMOTO, A.; FUTAI, M.;  
47 WADA, Y. The  $\alpha 3$  isoform of V-ATPase regulates insulin secretion from pancreatic  
48 beta-cells. *Journal of Cell Science*, v.119, p. 4531–4540, 2006.

- 1 SUN-WADA, G.H.; WADA, Y. Role of vacuolar-type proton ATPase in signal  
2 transduction. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1847, p. 1166–1172, 2015.
- 3 SUN-WADA, G. H., WADA, Y. FUTAI, M. Lysosome and lysosome-related organelles  
4 responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on  
5 vacuolar-type proton ATPase. *Cell Structure and Function*, v. 28, p. 455–463, 2003.
- 6
- 7 TEODORO, C. E. DE S. Bombas protônicas de organelas da via secretória:  
8 Comparação entre leveduras e plantas. Tese (Doutorado em Biociências e  
9 Biotecnologia)- Campos dos Goytacazes-RJ , UENF, 151p, 2004.
- 10 TOEI, M.; SAUM, R.; FORGAC, M. Regulation and isoform function of the V-  
11 ATPases. *Biochemistry*, v.49, p. 4715–4723, 2010.
- 12 TOSI, M. R.; TUGNOLI, V. Cholesteryl esters in malignancy. *Clinica Chimica Acta*, v.  
13 359, n.1-2, p. 27-45, 2005.
- 14
- 15 TOYOMURA, T.; MURATA, Y.; YAMAMOTO, A.; OKA, T.; SUN-WADA, G. H.;  
16 WADA, Y.; FUTAI, M. From lysosomes to the plasma membrane: localization of  
17 vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase with the  $\alpha 3$  isoform during osteoclast differentiation. *The*  
18 *journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 22023–22030, 2003.
- 19
- 20 TOYOMURA, T.; OKA, T.; YAMAGUCHI, C.; WADA, Y.; FUTAI, M. Three subunit  $\alpha$   
21 isoforms of mouse vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. Preferential expression of the  $\alpha 3$  isoform  
22 during osteoclast differentiation. *The journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 8760–  
23 8765, 2000.
- 24
- 25 TUONG, W.; CHENG, L. S.; ARMSTRONG, A. W. Melanoma: Epidemiology,  
26 Diagnosis, Treatment, and Outcomes. *Dermatologic Clinics*, v. 30, p.113-24, 2012.
- 27
- 28 VEATCH, S. L.; KELLER, S. L. Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary  
29 mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophysical Journal*, v. 85, p. 3074–3083,  
30 2003.
- 31
- 32 VINCENT, C.; SIDDIQUI, T. A.; SCHLICHTER, L. C. Podosomes in  
33 migrating microglia: components and matrix degradation. *Journal of*  
34 *Neuroinflammation*, v. 9, n. 190, p. 1-15, 2012
- 35
- 36 VON SCHWARZENBERG, K.; WIEDMANN, R.M.; OAK, P.; SCHULZ, S.; ZISCHKA,  
37 H.; WANNER, G.; EFFERTH, T.; TRAUNER, D.; VOLLMAR, A.M. Mode of cell death  
38 induction by pharmacological vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) inhibition. *The journal*  
39 *of Biological Chemistry*, v. 288, 1385–1396, 2013.
- 40 XU, T.; FORGAC, M. Subunit D (Vma8p) of the yeast V-ATPase plays a role in  
41 coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*,  
42 v. 275, p 22075-22081, 2000.
- 43
- 44 ZAMIR, E.; GEIGER, B. Focal Adhesions and Related Integrin Contacts.  
45 *Encyclopedia of Biological Chemistry*, v. 2, p. 318-323, 2013.
- 46

- 1 ZHANG, K.; CHEN, J.F. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell*  
2 *Adhesion & Migration*, v. 6, n. 1, p.20–29,2012.
- 3 ZIDOVETZKI, R.; LEVITAN, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane  
4 cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et*  
5 *Biophysica Acta*, v. 1768, p.1311–1324, 2007.
- 6
- 7 WAGNER, C. A.; FINBERG, K. E.; BRETON, S.; MARSHANSKY, V.; BROWN, D.;  
8 GEIBEL, J. P. Renal vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Physiological Reviews*, v. 84, p.1263–  
9 1314, 2004.
- 10 WANG, R.; JIAJIA, B. I. J.; AMPAH, K. K.; BA, X.; LIU, W.; ZENG, X. Lipid rafts  
11 control human melanoma cell migration by regulating focal adhesion disassembly.  
12 *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1833, p.3195–3205, 2013.
- 13
- 14 WANG, Y; CIPRIANO, D. J.; FORGAC, M. Arrangement of Subunits in the  
15 Proteolysis Ring of the V-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 47,  
16 p. 34.058-34.065, 2007.
- 17
- 18 WIEDMANN, R. M.; VON SCHWARZENBERG, K.; PALAMIDESSI, A.;  
19 SCHREINER, L.; KUBISCH, R.; LIEBL, J.; SCHEMPP, C.; TRAUNER, D.; VEREB, G.;  
20 ZAHLER, S.; WAGNER, E.; MULLER, R.; SCITA, G.; VOLLMAR, A. M. The V-ATPase-  
21 inhibitor archazolid abrogates tumor metastasis via inhibition of endocytic activation  
22 of the Rho-GTPase Rac1. *Cancer Research*, v. 72, p. 5976–87, 2012.
- 23
- 24 WILLIAMSON, W. R.; HIESINGER, P. R. On the role of V-ATPase V0a1- dependent  
25 degradation in Alzheimer disease. *Communicative & Integrative Biology*, v. 3, n. 6, p.  
26 604-7. 2010.
- 27
- 28 WILKENS, S.; INOUE, T.; FORGAC, M. Three-dimensional structure of the vacuolar  
29 ATPase — localization of subunit H by difference imaging and chemical cross-linking.  
30 *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 41942–41949, 2004.
- 31
- 32 YAMAGUCHI, H.; TAKEO, Y.; YOSHIDA, S.; KOUCHI, Z.; NAKAMURA, Y.;  
33 FUKAMI, K. “Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and  
34 extracellular matrix degradation by human breast cancer cells”. *Cancer Research*, v.  
35 69, n. 22, p. 8594–8602, 2009.
- 36
- 37 YOSHINAKA, K.; KUMANOGOH, H.; NAKAMURA, S.; MAEKAWA, S. Identification  
38 of V-ATPase as a major component in the raft fraction prepared from the synaptic  
39 plasma membrane and the synaptic vesicle of rat brain. *Neuroscience Letters*, v.  
40 363, p. 168–172, 2004.
- 41 YOUNG, C. D.; ANDERSON, S. M. Sugar and fat - that's where it's at: metabolic  
42 changes in tumors. *Breast Cancer Research*, v. 10, n. 1, p. 202-217, 2008.
- 43