

**INTERAÇÕES TGF-B – BOMBAS DE PRÓTONS NO PROCESSO  
DE METÁSTASE EM MELANOMA**

**BRUNNA XAVIER MARTINS**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES, RJ  
ABRIL DE 2017**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E TECIDUAL

INTERAÇÕES TGF- $\beta$ -BOMBAS DE PRÓTONS NO PROCESSO DE  
METÁSTASE EM MELANOMA

Tese apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências como parte  
das exigências para a obtenção do  
título de Doutor em Biociências e  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES/RJ  
ABRIL DE 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

684 / 2017

Martins, Brunna Xavier

Interações TGF- $\beta$ -Bombas de prótons no processo de metástase em melanoma / Brunna Xavier Martins. -- Campos dos Goytacazes, 2017.  
iv, 60 f. : il.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e Biotecnologia. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Façanha, Arnaldo Rocha

Bibliografia: f. 49-60

1. Melanoma 2. V-ATPase 3. TGF- $\beta$  I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

571.6

M379i

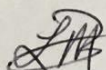
INTERAÇÕES TGF-B – BOMBAS DE PRÓTONS NO PROCESSO  
DE METÁSTASE EM MELANOMA

BRUNNA XAVIER MARTINS

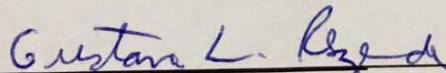
“Tese de Doutorado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

Aprovada em 19 de Abril de 2017

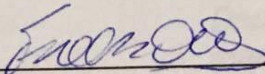
Comissão Examinadora:



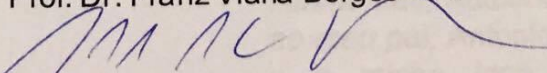
Dr. Luis Miguel Mazorra Morales - UH



Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende - UENF



Prof. Dr. Franz Viana Borges - IFF



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

*Dedico esta conquista a família maravilhosa que Deus me deu, a minha mãe, Audiene Xavier da Silva, ao meu pai, Antonio da Silva Martins e a minha irmã, Camilla Xavier Martins.*

*Libera me ab omni malo, Amen.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao meu anjo da guarda, por sempre iluminarem meu caminho, tornando a minha vida cada dia mais maravilhosa.

Aos meus pais, Antonio Martins e Audiene Xavier, que ao longo da minha vida sempre estiveram ao meu lado me dando apoio, incentivando e ajudando na busca pela realização pessoal e profissional. São, a eles, que dedico as minhas vitórias, pois sem eles nada disso seria possível.

A minha irmã, Camilla Xavier, por todos esses anos de amizade e companheirismo.

Ao meu marido David Gilvan e a nossa “filha” Afrodite por todo o amor e carinho.

As minha família por todo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Professor Arnaldo Rocha Façanha, pela orientação e por sempre ter acreditado na minha capacidade e permitir o desenvolvimento dessa tese com liberdade de pensar, criar e tomar decisões. Foi extremamente importante para o meu crescimento científico.

Ao professor Eulógio Carvalho e ao Hassan Leandro por toda a ajuda para o desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Renato DaMatta e o seu grupo de pesquisa, pelos conselhos e ajuda indispensável nos experimentos mais árduos.

Ao Dr. Antônio Cogo pela revisão deste trabalho.

A todos os meus amigos e as minhas amigas em especial a Pamela Busch e Viviane Gomes, pela amizade, companhia e momentos de descontração.

A todos os outros professores e funcionários que passaram seus conhecimentos com amor fazendo com que eu aprendesse e crescesse cada vez mais.

A UENF, FAPERJ e CNPQ pelo auxílio e suporte.

A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

# SUMÁRIO

ABREVIACÕES .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE GRÁFICOS .....	iv
1- INTRODUÇÃO .....	1
2-REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 – A Carcinogênese e a acidificação celular.....	3
2.2 – A estrutura e a regulação da V-ATPase.....	5
2.3 – A transição epitélio-mesenquimal (EMT) na progressão da metástase do câncer.....	7
2.4- Sinalização do TGF- $\beta$ 1 .....	9
2.5 – Inibidores do receptor de TGF- $\beta$ 1 .....	12
2.6 – O Melanoma .....	13
2.7 – O TGF- $\beta$ 1 e a interação com a V-ATPase.....	15
3 - OBJETIVOS .....	17
3.1 - Objetivo Geral.....	17
3.2 - Objetivos Específicos.....	17
4 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
4.1-Drogas inibitórias .....	18
4.2 - Cultura de Células .....	18
4.3 – Fracionamento e purificação da membrana plasmática .....	18
4.4 – Dosagem de proteína.....	19
4.5 – Determinação do fluxo protônico extracelular .....	19
4.6- Western blot .....	20
4.7- Atividade hidrolítica da V-ATPase.....	21
4.8- Monitoramento do gradiente de prótons .....	21
4.9- Indução e obtenção dos tumores sólidos.....	22
4.10- Histopatologia dos tumores.....	23
4.11- Parâmetros bioquímicos do plasma.....	23
4.12- Análises estatísticas .....	23
5 -RESULTADOS .....	24
5.1-Efeito do TGF- $\beta$ 1 na V-ATPase da membrana plasmática.....	24
5.2-Inibidor do receptor de TGF- $\beta$ 1 reduz o fluxo de prótons.....	28
5.3- Indução metastática nos linfonodos.....	33



5.4- O TGF- $\beta$ 1 interfere na atividade da V-ATPase .....	39
5.5- Ação do LY364947 e do Mirtenal na inibição da metástase.....	41
6 - DISCUSSÃO .....	45
7-CONCLUSÃO.....	48
9- REFERÊNCIAS .....	49

## RESUMO

O melanoma maligno, o mais agressivo dos cânceres de pele, é caracterizado por surgir a partir das transformações dos melanócitos a partir de várias mutações oncogênicas. Diversas vias de sinalização têm sido relacionadas à formação de melanomas, incluindo o TGF- $\beta$ . Este último, o fator de transformação do crescimento  $\beta$ , é expresso em todos os tecidos, sendo responsável pela ativação de fatores essenciais para a manutenção da homeostase celular, desenvolvimento embrionário e também para a formação de cânceres. Recentemente, foi mostrado que a adição de TGF- $\beta$ 1 em células renais normais super expressaram as subunidades da enzima V-H<sup>+</sup>-ATPase. As V-ATPases são bombas de prótons dependentes de ATP, organizadas em um complexo de 13 subunidades, que trabalham para a manutenção da homeostase do pH ácido das vesículas endocíticas e na regulação o pH intracelular quando em condições fisiológicas normais. Em vários tipos de cânceres, incluindo o melanoma, essas enzimas estão presentes na membrana plasmática para a acidificação do meio extracelular e ativação de metaloproteinases, o que favorece o crescimento tumoral e a metástase. No presente estudo, postulamos que o TGF- $\beta$ 1 estaria intimamente ligado a ativação e/ou a inibição da atividade dessas bombas e dessa forma propomos investigar e descrever um mecanismo de ação pelo qual o TGF- $\beta$ 1 estaria interagindo na atividade das V-ATPase e descrever as vias de sinalização correlacionadas ao controle da proliferação de tumores malignos. Nós observamos que o TGF-  $\beta$ 1 estimula atividade protônica da V-ATPase e a indução pelo TGF-  $\beta$ 1 torna os tumores mais agressivos e invasivos, alterando o perfil metastático do melanoma. Contudo, nós observamos que os animais tratados com inibidor de V-ATPase e inibidor do receptor do TGF-  $\beta$ 1 apresentaram respostas positivas a terapia e melhoraram a sobrevida e resistência dos animais quando comparados aos animais não tratados. Esses resultados sugerem que o TGF-  $\beta$ 1 pode estar relacionado a estimulação da atividade da bomba de próton e esta interação pode estar potencializando o perfil metastático do câncer.

Palavras Chaves: V-ATPase; Melanoma; TGF-  $\beta$

## ABSTRACT

Malignant melanoma, a form of skin cancer, arises from the transformation of melanocytes with several oncogene mutations. Several signaling pathways have been implicated in the control of melanoma tumor formation, including TGF  $\beta$ . The TGF-  $\beta$ , transforming growth factor-  $\beta$ , is a growth factor that plays critical roles during embryonic development, normal tissue homeostasis and cancer formation, they are expressed in all tissues. Recently, was shown in normal kidney cells, that TGF- $\beta$ 1 in high concentrations can upregulation the vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase subunits and increase the enzyme activity. This enzyme is ATP-dependent proton pump organized in a multi-subunit complex (13 different subunits). In normal physiological conditions, V-ATPase can contribute to the maintenance of the acidic pH homeostasis and regulation of intracellular organelle pH, in many malignant cancers, including melanoma, V-ATPase are present in the plasma membrane and create a acidified medium that activates metalloproteinases, tumor growth and metastasis. In the present study, we postulate that TGF- $\beta$ 1 would be closely correlated with the activation and/or inhibition of V-ATPase activity and proposed to explore and describe for the first time a novel mechanism of action underlying the V-ATPase/TGF- $\beta$ 1 interactions and the signaling pathway correlated with melanoma tumor proliferation. We observed that TGF-  $\beta$ 1 strongly stimulates the V-ATPase proton activity and the TGF-  $\beta$ 1 induction change the tumor metastatic profile to more aggressive and invasive. However, when we treated these animals with V-ATPase and TGF-  $\beta$ 1 receptor inhibitors had a positive response to therapy and increase their rate survive than compared to untreated animals. These results suggest that TGF-  $\beta$ 1 can be related to stimulation of proton pump activity and this interaction may be potentiating the metastatic cancer profile.

Keywords: V-ATPase; Melanoma; TGF-  $\beta$

## ABREVIACOES

BSA- Albumina srica bovina

BRAF- Proto-oncogene B-raf

CDKN2A- cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO- Dimetilssulfxido

EDTA- cido Etileno diamino tetractico

EGTA- cido Bis (2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetractico

FAD- The US Food and Drug Administration

LAP- latency-associated peptide

GBM- Grupo Brasileiro do Melanoma

MTT- (3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)]

INCA- Instituto Nacional do câncer

NIC- Instituto Nacional do Câncer- EUA

PAGE - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PBS- Tampão fosfato Salino

PMSF- Fenilmetilsulfonil-Fluoreto

RNAi- RNA interferência

SDS- Sodium Dodecyl Sulfate

SFB- Soro Fetal Bovino

TCA- cido tricloroacético

TEMED- Tetramethylethylenediamine

TRIS-Hidroximetil amino metano

WHO-Organização mundial da saúde

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Modelo Esquemático da V-ATPase .....	04
<b>Figura 2-</b> Esquema ilustrativo da ação dos inibidores de bombas de prótons .....	05
<b>Figura 3-</b> Mecanismo de acoplamento da V-ATPase .....	06
<b>Figura 4-</b> Acidificação do meio extracelular nas células tumorais.....	07
<b>Figura 5-</b> Alterações bioquímicas na Transição Epitélio Mesenquimal .....	08
<b>Figura 6-</b> Esquema do desenvolvimento da metástase óssea.....	09
<b>Figura 7-</b> Via de sinalização do TGF- $\beta$ .....	11
<b>Figura 8-</b> Fórmula estrutural dos inibidores do receptor do TGF- $\beta$ . .....	13
<b>Figura 9-</b> Estágios clínicos do melanoma de acordo com o grau de invasão .....	14
<b>Figura 10-</b> Atividade da V-ATPase nas células B16F0, B16F10 e SK-Mel-28 .....	25
<b>Figura 11-</b> Atividade da V-ATPase em na célula B16F0 em diferentes concentrações de TGF- $\beta$ 1 .....	25
<b>Figura 12-</b> Atividade da V-ATPase em na célula B16F10 em diferentes concentrações de TGF- $\beta$ 1 .....	26
<b>Figura 13-</b> Atividade da V-ATPase em na célula SK-Mel-28 em diferentes concentrações de TGF- $\beta$ 1 .....	26
<b>Figura 14-</b> Transporte de prótons da V-ATPase nas células de melanoma.....	27
<b>Figura 15-</b> Determinação do fluxo protônico H <sup>+</sup> nas células de melanoma.....	29
<b>Figura 16-</b> Determinação do fluxo protônico H <sup>+</sup> nas células B16F0.....	29
<b>Figura 17-</b> Determinação do fluxo protônico H <sup>+</sup> nas células B16F10.....	30
<b>Figura 18-</b> Atividade da V-ATPase na presença de LY364947 e TGF- $\beta$ 1.....	30
<b>Figura 19-</b> Atividade da V-ATPase na presença de LY364947 e TGF- $\beta$ 1.....	31
<b>Figura 20-</b> Mensuração do fluxo de prótons na presença de LY364947 e TGF- $\beta$ 1.....	31
<b>Figura 21-</b> Mensuração do fluxo de prótons na presença de LY364947 e TGF- $\beta$ 1.....	32
<b>Figura 22-</b> Tomografia computadorizada .....	35
<b>Figura 23-</b> Taxa de sobrevivência de camundongos tratados com Mirtenal. ....	35
<b>Figura 24-</b> Peso dos tumores .....	36
<b>Figura 25</b> – Corte histológico dos tumores com metástase .....	36

<b>Figura 26</b> – Corte histológico dos tumores com metástase .....	37
<b>Figura 27</b> – Tratamento com Mirtenal pós-indução metastática .....	37
<b>Figura 28</b> – Atividade da V-ATPase em tumores de B16F10 .....	39
<b>Figura 29</b> – Fluxo de prótons nos animais tratados com Mirtenal.....	40
<b>Figura 30</b> – Expressão da subunidade B1/V1 .....	40
<b>Figura 31</b> – Corte histológico dos tumores B16F10 com metástase.....	42
<b>Figura 32</b> - Corte histológico dos tumores B16F10 tratados com Mirtenal e LY364947...	42
<b>Figura 33</b> – Corte histológico dos tumores B16F0 com metástase.....	43
<b>Figura 34</b> – Corte histológico dos tumores B16F0 tratados com Mirtenal e LY364947 ....	44
<b>Figura 35</b> – Peso dos tumores tratados com LY364947 e Mirtenal .....	44
<b>Figura 36</b> – Atividade da V-ATPase em tumores tratados com Mirtenal e LY364947 .....	44
<b>Figura 37</b> – Fluxo de prótons em tumores tratados com Mirtenal e LY364947 .....	44
<b>Figura 38</b> – Esquema final da interação da V-ATPase- TGF- $\beta$ 1 na carcinogênese.....	48

## Lista de Tabelas

**Tabela 1-** Acoplamento do domínio V1 e Vo da V-ATPase nas células de melanoma...27

**Tabela 2-** Acoplamento do domínio V1 e Vo da V-ATPase nas células de melanoma...32

**Tabela 3-** Hemograma com contagem de Plaqueta .....38

## 1 – INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte no mundo, sendo responsável por aproximadamente 1 a cada 6 óbitos, e somente em 2015 os vários tipos desta doença matou 8,8 milhões de pessoas (WHO, 2017). Dentre os cânceres de pele, o melanoma é o mais letal, e só em 2013, foram registrados 76.697 novos casos de melanoma nos EUA, destes, 9.480 foram a óbito (NCI, 2014). Essa alta taxa de letalidade deve-se a sua agressividade, forte resistência as modalidades convencionais de terapias anticâncer, resistência a apoptose e a sua capacidade de desenvolver metástase (Giammarioli et al, 2008; Mckenzie e Grossman, 2012; INCA, 2016).

O melanoma surge de mutações oncogênicas ocorridas nos melanócitos, incluindo as mutações nos oncogenes *BRAF*, *NRAS*, *CKIT* e ciclina-dependente quinase (CDK) e nos supressores de tumor, tais como *CDKN2A* e *p53*. Em tecidos epiteliais normais e nas células do melanoma primário (tecido de origem), o TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor Beta*) pode atuar como um potente inibidor do crescimento celular, pois o TGF- $\beta$ , por meio da cascata SMAD, pode regular a expressão de vários genes pró-apoptóticos que contribuem para os efeitos supressivos do melanoma cutâneo humano (Pardali e Moustakas, 2007; Humbert et. al., 2015).

No entanto, quando o melanoma se encontra na segunda fase de desenvolvimento, a fase mais agressiva, ele inicia a expressão e a secreção de altas quantidades das isoformas TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. A via de sinalização do TGF- $\beta$ 1 tem sido descrita por agir na EMT (Transição Epitelial-Mesenquimal) em cânceres epiteliais desenvolvendo alterações bioquímicas e moleculares que afetam sua capacidade migratória, invasão e metástase carcinogênica (Javelaud et.al, 2008; Moustakas e Heldin, 2014; Wang et.al., 2015). Esse duplo papel do TGF- $\beta$  tem sido muito estudado nos últimos anos, no entanto pouco se sabe sobre os fatores que discriminam o TGF- $\beta$  como inibidor ou ativador metastático na via da EMT (Lebrun, 2012).

Em uma das teorias, acredita-se que a invasão metastática via EMT, seria por meio da ativação de bombas protônicas do tipo V-ATPase, onde o TGF- $\beta$ 1 estaria superexpressando algumas das subunidades dessas bombas



iônicas, e conseqüentemente, aumentando sua atividade enzimática em tecidos epiteliais (Cao et al., 2011; Pamarthy et al., 2016).

A V-ATPase é uma bomba de prótons localizada nas membranas intracelulares, como lisossomos, endossomos e vesículas secretoras, responsável pela acidificação luminal. Além disso, essas enzimas podem ainda estar localizadas na membrana plasmática de algumas células específicas, exercendo importante papel no controle do pH intra e extracelular (Vaupel, 1989; Stransky et al., 2016). Alguns tipos de células cancerígenas expressam essas bombas na membrana plasmática e criam um micro-ambiente de baixo pH extracelular, levando a ativação de proteases que digerem a matriz extracelular durante os processos de invasão e metástase (Martinez-Zaguilán et. al., 1996; Nishi e Forgac, 2002).

O estudo da V-ATPase e das vias de sinalização relacionada aos processos metastáticos no melanoma pode auxiliar a controlar a progressão, invasão, metástase e induzir processos apoptóticos em células tumorais. Dessa forma, nesse trabalho estudamos o mecanismo de ação do TGF- $\beta$ 1 envolvendo as modulações das V-ATPases, e estimulando ou inibindo sua atividade. A determinação da ação do TGF- $\beta$ 1 sobre as bombas expressas nas endomembranas e na membrana plasmática de células tumorais pode vir a contribuir para o desenvolvimento de novos testes de diagnósticos tendo como marcadores moleculares as V-ATPases e/ou elementos reguladores de sua expressão funcional, envolvidos não só com a carcinogênese do melanoma como também de outros tipos de câncer.

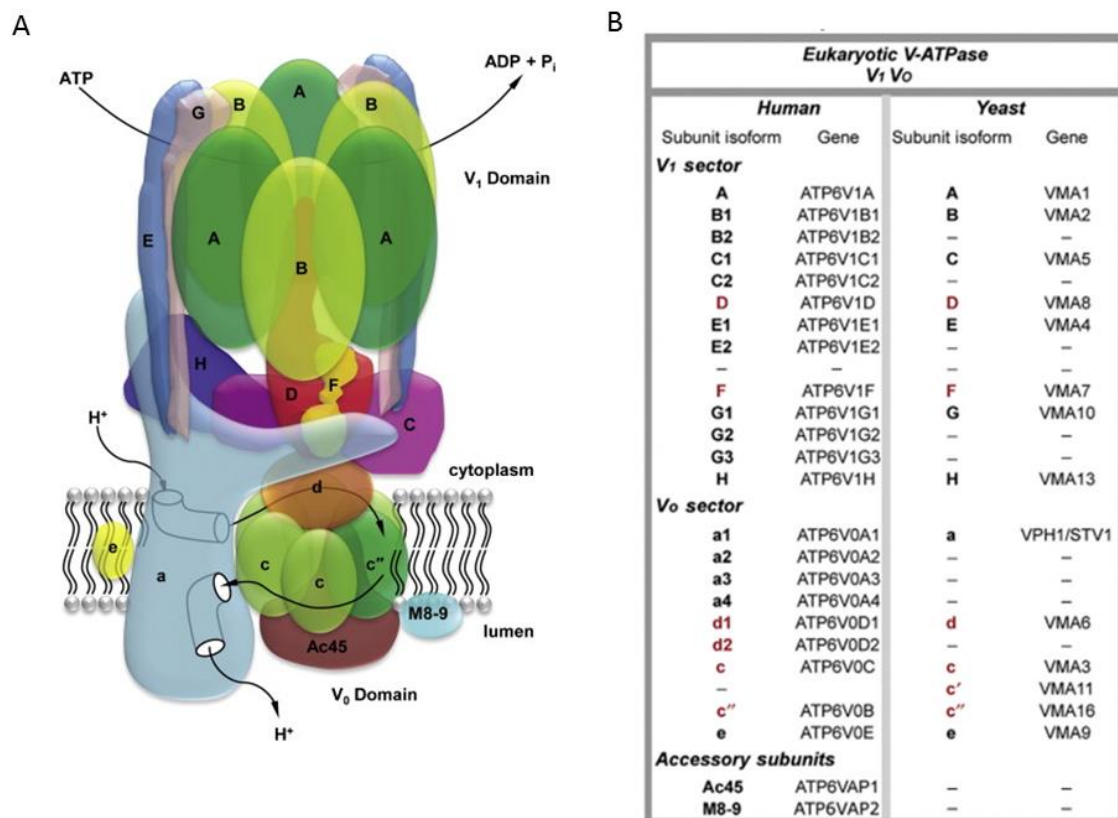
## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – A Carcinogênese e a acidificação celular

Os cânceres são doenças genéticas resultantes de mutações acumuladas no genoma (INCA, 2017). Estas mutações afetam principalmente os proto-oncogenes, os genes de supressão tumoral, e os genes de reparo do DNA (NIC, 2017). Células com várias destas mutações agem de forma independente da programação fisiológica, propagando-se e invadindo os tecidos vizinhos e podendo atingir diferentes tecidos distantes quando em metástase, formando os tumores malignos (WHO, 2017).

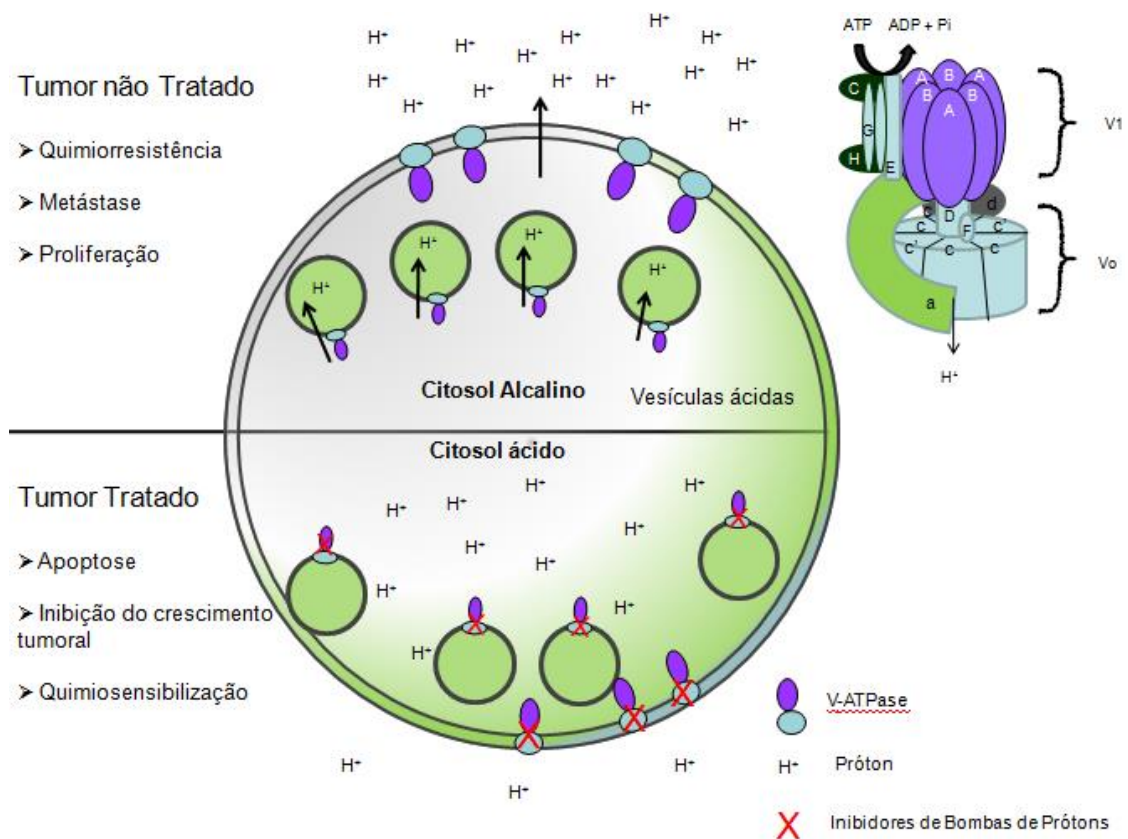
Uma das principais características da proliferação e do desenvolvimento tumoral é a necessidade de altas taxas da síntese de ATP para manter o intenso metabolismo celular. Para atender a tal demanda energética, a taxa de captação de glicose aumenta drasticamente nas células tumorais, o que resulta no aumento da glicólise e da produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio e de mitocôndrias funcionais (Liberti e Locasale, 2016). Esse processo, conhecido como efeito Warburg, diminui o pH extracelular, pois os íons  $H^+$  secretados pelas células se difundem no ambiente extracelular e acidificam o microambiente tumoral, induzindo uma maior invasividade das células metastáticas (De Milito e Fais, 2005; Otto, 2016).

As células tumorais malignas expressam proteínas lisossomais na superfície celular, para realizar a extrusão dos íons  $H^+$  para o meio extracelular (Fais et. al., 2007). Dentre essas enzimas, estão as V-ATPases (figura 1), bombas de prótons dependentes de ATP, comumente localizadas em endomembranas, desempenhando um importante papel na acidificação de organelas como lisossomos, complexo de Golgi e endossomos, por meio da translocação de prótons (Nishi e Forgac, 2002), o que proporciona condições ideais para as vias metabólicas em ambientes distintos (Casey et. al., 2010).



**Figura 1.** Esquema da V-ATPase mostrando as múltiplas subunidades e os domínios  $V_0$  e  $V_1$  (Qin et. al, 2012). Ao lado tabela com os genes de cada subunidade obtida de Marshansky, et. al. 2014.

Nas últimas décadas, ocorreu um aumento considerável no número de publicações sobre o efeito Warburg e a acidificação tumoral (Liberti e Locasale, 2016). Estudos recentes têm demonstrado que a acidificação causada pelas células tumorais é a chave para a progressão e metástase do câncer, pois bloqueando a atividade da V-ATPase e prevenindo a acidificação extracelular (Figura 2), pode-se inibir o crescimento, a sobrevivência e a metástase de células tumorais, além de induzir a apoptose (Fais, et. al. 2007; Cotter, et. al., 2015; Chen et al., 2015).



**Figura 2.** Esquema ilustrativo da ação dos inibidores de bombas de prótons em uma célula tumoral. Fonte Própria.

## 2.2 – A estrutura e a regulação da V-ATPase

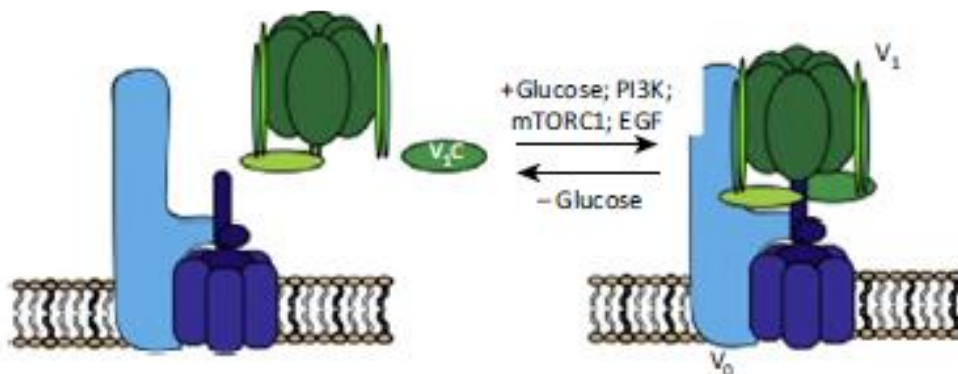
A V-ATPase é um complexo enzimático formado de múltiplas subunidades que constituem dois domínios funcionais, o V<sub>1</sub> responsável pela hidrólise do ATP, e o V<sub>0</sub>, importante no transporte de prótons, figura 1 (Margolles-Clark et. al., 1999; Zhao et al, 2015).

O domínio V<sub>1</sub>, complexo periférico de 570 kDa, é composto de 8 subunidades diferentes, as subunidades A-H (Arai, 1987). Enquanto o domínio integral de membrana V<sub>0</sub> (260 kDa) é formado por cinco subunidades diferentes: a, c, c", d e e (Forgac, 1989; Kawasaki-Nishi et. al., 2001). A hidrólise de ATP ocorre no sítio catalítico localizado na interface das subunidades A e B, cujo ciclo catalítico gera mudanças conformacionais que acionam um mecanismo de rotação na haste central composta pelas subunidades D, F e d, que se propaga induzindo a rotação do anel formado pelas subunidades "a" e os proteolípídeos c e c" constituintes no domínio

transmembrana  $V_0$  (Wang et al. 2007; Stransky et. al., 2016). As V-ATPases são comumente encontradas nas endomembranas celulares, mas em algumas células elas podem ser encontradas na membrana plasmática para exercer funções específicas à célula (Forgac, 2002).

Um dos mecanismos regulatórios mais importantes da atividade das V-ATPases são a associação e a dissociação do domínio catalítico, acoplando e desacoplando do domínio transmembranar de maneira finamente controlada (figura 3). Em células de mamíferos, a associação dos domínios  $V_1$  e  $V_0$  têm sido relacionadas com respostas a diferentes estímulos, como o aumento na concentração de glicose, deficiência de aminoácidos, maturação das células dendríticas e exposição a fatores de crescimento (Fais, 2015; Cotter et. al., 2015).

### Montagem Regulada em Células de Mamíferos

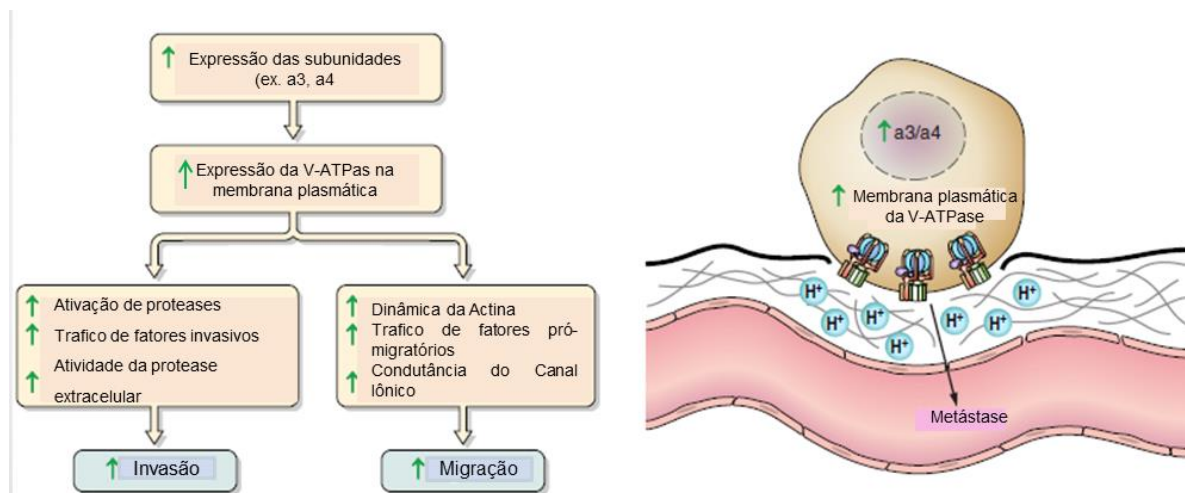


**Figura 3.** Mecanismo de acoplamento da V-ATPase mediado pela concentração de glicose (Fonte: Cotter et al., 2015).

O aumento no acoplamento entre os domínios  $V_0$  e  $V_1$  da V-ATPase na presença de alta concentração de glicose, auxilia a célula a neutralizar mais eficientemente a acidez metabólica gerada pelo efeito Warburg (Sautin et al., 2005; Cotter et.al., 2015).

Este mecanismo de controle da acidez também envolve uma regulação específica do tráfico de vesículas, induzindo a um aumento na expressão de algumas subunidades dessa enzima e ainda, a maior fusão da V-ATPase presente nas vesículas endocíticas a membrana plasmática, (Figura 4). De fato, o aumento da expressão da V-ATPase na membrana plasmática das

células tumorais também já foi relacionado à alta concentração da glicose de diferentes tumores (Klein 1992; Martinez-Zaguilan et al., 1993; Al-Bataineh et al., 2016).



**Figura 4** Acidificação do meio extracelular nas células tumorais. Cotter, et al 2016

### 2.3 - A transição epitélio-mesenquimal (EMT) na progressão da metástase do câncer.

A metástase é um processo complexo que resulta das interações entre as células tumorais e o micro-ambiente tecidual. Durante a disseminação do tumor, as células tumorais apresentam a capacidade de se desprender do tumor primário e escapar do tecido de origem, podendo alcançar a corrente sanguínea ou linfática e se proliferar em um órgão-alvo distante. A invasibilidade requer a ruptura dos mecanismos de adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (Inca, 2016; WHO, 2007; de Melo et al., 2003).

Células cancerígenas epiteliais passam por um processo denominado de Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT - *Ephithelial-Mesenchymal Transition*) que envolve alterações bioquímicas e moleculares na célula que geram a perda de contato célula-célula e a aquisição de propriedades associadas à ação diferencial de transdutores de sinais, fatores de transcrição, RNAs não codificantes, baixa regulação dos marcadores epiteliais, como a E-caderina e

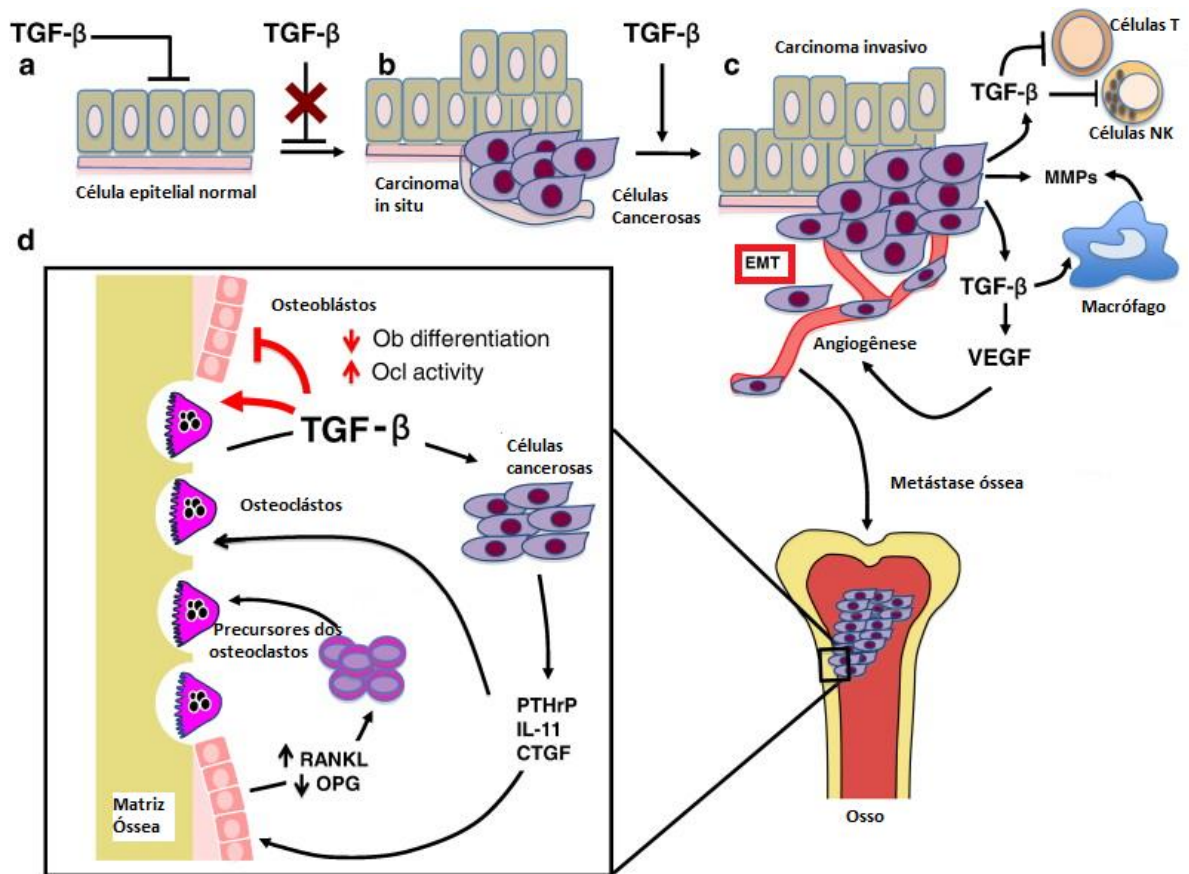
reorganização da actina (figura 5) (Quail e Joyce, 2013; Kimura et al., 2016). Este processo correlaciona-se positivamente com o crescimento tumoral e metastático, no qual a célula tumoral de origem epitelial, passa a expressar um conjunto de genes tipicamente expressos em células mesenquimais, podendo dessa forma invadir e adquirir características de qualquer outro tecido (Moustakas e Heldin, 2014), figura 6.

## EMT / MET

<p><b>Reguladores de Cromatina</b></p> <p>HMGA1,2 DNMT1 G9a MED12 AID</p>	<p><b>Transdutores de sinal</b></p> <p>TGFβ tipo 1, 2, 3 Smad 2,3,4 TRAF6 TAK1 P38, Erk MAPK PI3K Ankt1,2 mTORC1,2 Integrin- β1 Src <b>Ras</b> RhoA,C</p>	<p><b>Fatores de transcrição</b></p> <p>Snail Slug Tewist E12/E47 AP1 (c-Jun,JunB,Fra1) B-catenina FOXC2 Prrx1 C-Myc NFkB ERF,ELES C/Ebpβ ID1,2,3 TP53</p>	<p><b>RNAs não codificante</b></p> <p>miR-200a,b,c miR-141 miR-429 miR-205 miR-34 miR-203 miR-22 miR155 miR-23</p>
<p><b>Fatores de Translação-Splicing</b></p> <p>ESRP1/2 MBNL hnRNP-E1</p>	<p><b>Citoesqueleto</b></p> <p>α -SMA Moesin Zyxin Myosin IIC α -actina Dinamina Calponina Vimetina</p>	<p><b>ECM e Adesão</b></p> <p>Hyaluronan HAS2 Fibronectina CD44 RHAMM Laminina Colageno-I-IV MMPs/TIMP-1 Integrina-α4, β1,3,4 Pyk2</p>	<p><b>Citocinas secretadas/ quimiocinas e receptores</b></p> <p>TGFb 1,2,3 BMP5,7 ILEI FG2,4 PDGF-BB/PDGF-b HGF Jagged1,2 EGF IGF VEGF Wnt</p>

**Figura 5.** O programa EMT–MET (*Ephithelial-Mesenchymal Transition/ Mesenchymal-Ephithelial Transition*). Cinco moduladores regulatórios que induzem ou controlam EMT-MET são mostradas no topo (transdutores de sinais, reguladores de cromatina, fatores de transcrição, *splicing* e fatores de tradução e RNAs não codificantes). Fatores que induzem a EMT são mostrados em laranja enquanto fatores que induzem MET são mostrados em azul; outros fatores que podem regular um ou outro processo estão listados em preto ou verde (Adaptado de Moustakas e Heldin, 2014).





**Figura 6.** Esquema do desenvolvimento de metástase óssea. O TGF-  $\beta$ 1 Regula as principais etapas da cascata metastática, incluindo a angiogênese, a imunossupressão e a remodelação óssea. Adaptado de Juárez e Guise (2011).

## 2.4 - A sinalização do TGF- $\beta$ 1

O fator transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ) é um homodímero protéico estabilizado por interações hidrofóbicas, cuja forma ativa é sintetizada a partir de uma molécula precursora chamada TGF- $\beta$  latente. Este fator possui múltiplas funções fisiológicas e também tem sido relacionado a processos patológicos, incluindo a carcinogênese (Miyazono et al., 1993). O TGF- $\beta$  latente (figura 6) é composto do dímero TGF- $\beta$  ligado a um complexo não covalente com um peptídeo associado à latência (LAP), a contenção do TGF- $\beta$  na forma inativa é realizada por uma ligação a proteína ligante-TGF- $\beta$  (LTBP) que estoca essa molécula na matriz extracelular e age como um reservatório



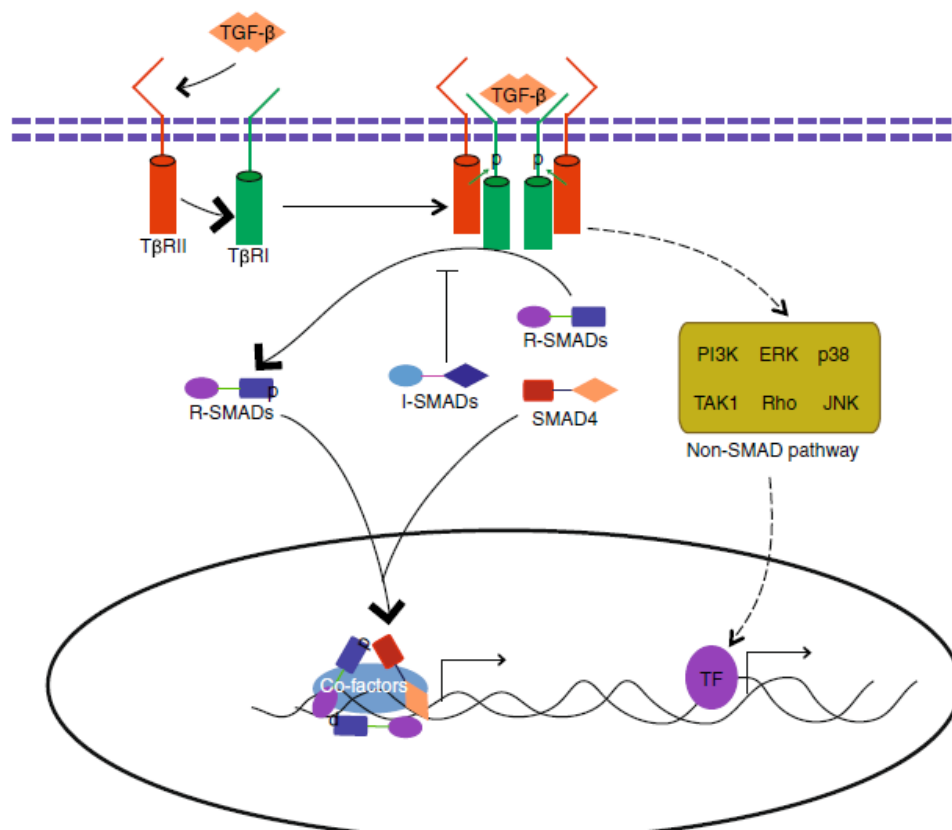
de TGF- $\beta$  (Miyazono et al., 1993). O TGF- $\beta$  pode ser ativado por múltiplos fatores, como glicosidasas, trombospondinas e algumas moléculas terapêuticas. Após sua ativação, ele se liga aos receptores de TGF- $\beta$  tipo I, II e III localizados na superfície celular (Derynck et. al., 2001).

O TGF- $\beta$  e seus receptores são amplamente expressos em todos os tecidos, eles são encontrados na forma 1, 2 e 3, no entanto o TGF- $\beta$ 1 é a citocina mais encontrada nos tecidos epiteliais (Walraven, 2015). Numa das vias de sinalização em que participa, o TGF- $\beta$ 1 se liga ao receptor do tipo II, que recruta e fosforila o receptor do tipo I, o qual fosforila os Smads regulados por receptores (R-Smad), e assim, desencadeia uma cascata de sinalização via Smad que translocam o complexo Smad até o núcleo (figura 5). No núcleo, o complexo ativa genes específicos co-ativadores ou co-repressores dos processos da carcinogênese (Miyazono et al., 1993, Lebrun 2012). São relatados na literatura 5 tipos de receptores do tipo II (T $\beta$ R-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II e AMHR-II) e 7 tipos de receptores do tipo I (ALK1-7) em mamíferos, sendo a ligação entre os receptores T $\beta$ R-II (tipo II) e ALK5 (tipo I) os encontrados na maioria dos tipos celulares, ativando a cascata Smads 2/3 (Piek et al., 1999).

As vias de sinalização ativadas por TGF- $\beta$ , independentes de Smad são pouco estudadas, mas tem recebido crescente atenção as que integram TGF- $\beta$  e proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPK) que ativam um sinal extracelular regulado por outras quinases (ERK1 e ERK2), levando a EMT (Lee et al., 2007, Davies et al., 2005). O TGF- $\beta$  também pode participar da transdução de sinal através de mTOR e a via fosfoinositol-3-quinase (PI3K)/AKT que também induziria a EMT (Péron et al., 2001; Lamouille e Derynck, 2007).

Através dessas vias o TGF- $\beta$  atua no controle e na modulação de uma plethora de mecanismos de proliferação e diferenciação celular, desempenhando papéis na embriogênese, síntese hormonal, reprodução, remodelamento e reparo tecidual, entre outros. No câncer humano, ele possui um papel duplo, agindo como supressor ou como estimulante de metástase, que coordena muitas funções celulares através da cascata de sinalização, controlando o crescimento tumoral, a invasão, a angiogênese, a metástase e como um potente indutor de EMT (figura 7) (Cao et al., 2011; Lebrun, 2012).

Não se sabe ao certo quais são os fatores que estariam relacionados à sua função supressora ou pró-metastática, no entanto sabe-se que o aumento da produção/expressão de TGF- $\beta$ 1 é observada em tumores e está correlacionada com sua agressividade e ao avanço nos estágios tumorais (Derynck et al., 1985; Lebrum, 2012). O melanoma é um dos tipos de câncer de pele mais agressivo, e uma das características desse câncer é a secreção de altos níveis de TGF- $\beta$ 1 pelas células, principalmente quando o paciente se encontra nos estágios 3 e 4 (maior grau de metástase) (Perrot et al., 2013; Sun et al., 2014; Tham et al., 2014).



**Figura 7.** Via de sinalização do TGF- $\beta$ . (A) Via TGF- $\beta$ /Smads, o sinal disparado pela ligação do TGF- $\beta$  ao receptor dispara a cascata de Smads que modulam proteínas adaptadoras e ubiquitinadoras. (B) Via independente de Smads, TGF- $\beta$  pode promover a ativação de proteínas quinases (MAPKs), Fosfoinositol-3-quinase (PI3K), TRAF6-TAK1-p38/JNK, Rho-Rock como transdutores de sinal alternativo (Fonte: Zhang 2014).

## 2.5 - Inibidores do receptor de TGF- $\beta$ (SB431542 e LY364947)

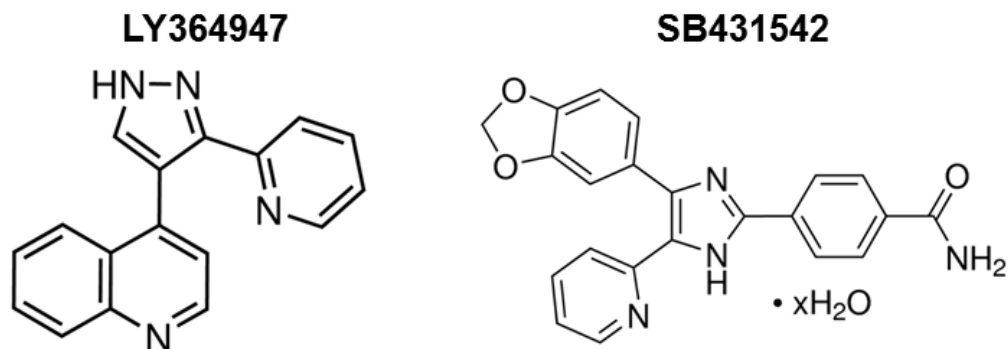
Existem 3 tipos de receptores para a molécula do TGF- $\beta$  se ligar e iniciar a cascata de sinalização: o receptor tipo 1 (T $\beta$ RI), tipo 2 (T $\beta$ RII), e tipo 3 (T $\beta$ RIII). Sabe-se que dos 5 tipos de receptores do tipo II e dos 7 tipos de receptores do tipo I descritos na literatura, a combinação de receptores T $\beta$ RII (tipo II) e ALK5 (tipo I) são os encontrados na maioria dos tipos celulares (Piek et al., 1999).

Os receptores do tipo I (ALK1-7) são os que apresentam os domínios de quinase nos tipos ALK4, ALK5 e ALK7 e possuem, em média, 85% de similaridade, em contrapartida os outros receptores possuem em média 68% de similaridade (Inman et al., 2002). Os receptores ALK4, ALK5 e ALK7 são essenciais para a fosforilação de Smads 2 e 3, que dão continuidade a via de sinalização do TGF- $\beta$  até a transdução de sinais no núcleo (Piek et al., 1999).

O inibidor SB431542, figura 8, foi descrito inicialmente como um seletivo e potente inibidor de ALK5, porém por conta da similaridade do domínio de quinase, ele também atua inibindo os receptores ALK4 e ALK7, não tendo qualquer ação efetora nos demais receptores ALKs ou nas vias de TGF- $\beta$  independentes de Smads (Datta e Mann, 2008; Inman et al., 2002). Portanto, ao utilizar o inibidor SB431542, ocorre o bloqueio da ação de ALK4/ALK5/ALK7, inibindo a fosforilação de Smads 2 e 3 e a formação do complexo R-Smad (Datta e Mann, 2008; Inman et al., 2002). A única via não dependente de Smads que o SB431542 inibe fracamente é a via das MAPKs, pois ele compete com o ATP no seu sítio de ligação na molécula p38 dessa via. Por conta dessa fraca inibição, acredita-se que os sítios de ATP de ALK5 e p38 são semelhantes e que os inibidores de p38 podem também atuar na inibição de ALK5 (Inman et al., 2002).

O inibidor LY364947 da via TGF- $\beta$ , assim como o SB431542, compete pelo domínio de ligação do ATP nas moléculas do tipo I, figura 8, (ALK4, ALK5 e ALK7), inibindo a fosforilação das Smads 2 e 3 e bloqueando a via de sinalização do TGF- $\beta$ . Até o momento ele é descrito como um inibidor seletivo para essas três moléculas do tipo I (Shiou et al., 2006), porém também pode ter

um leve efeito inibitório na sinalização das moléculas de TGF- $\beta$  II (via Smad) e em p38 (via MAPK) quando em concentração mais efetiva (Peng et al., 2005).



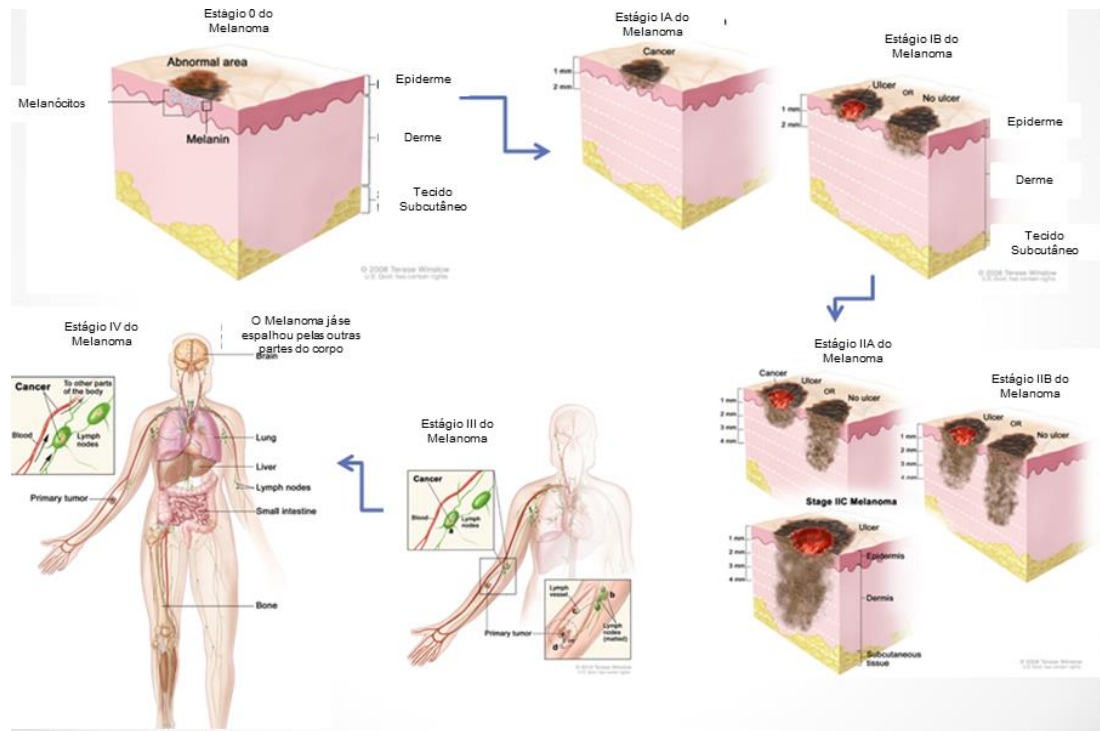
**Figura 8.** Fórmula estrutural dos inibidores do receptor do TGF-  $\beta$ 1, os inibidores atuam competindo com o sitio de ATP. (Fonte: Sigma Aldrich).

## 2.6 – O Melanoma

O melanoma maligno é o mais agressivo dos cânceres de pele, sendo responsável por 60-80% das mortes por câncer de pele (INCA, 2017). Ele surge quando os melanócitos tornam-se malignos após alterações e mutações genéticas (GBM, 2012). O melanoma tem início como uma lesão escura que aumenta de tamanho em extensão, apresentando características de fácil reconhecimento: Assimetria, Bordas irregulares, Coloração variada, e Diâmetro maior que 6 milímetros (ABCD do melanoma) (GBM, 2012). Apenas 14% dos pacientes conseguem sobreviver até 5 anos após o diagnóstico do melanoma maligno. A incidência do melanoma maligno tem aumentado consideravelmente nas últimas duas décadas (Bandarchi et. al., 2013; INCA, 2017).

O melanoma é classificado em quatro estágios clínicos, do I ao IV, figura 9. No estágio I, o melanoma está localizado na superfície da pele sobre a epiderme, na forma de uma pequena mancha; no estágio II o melanoma começa a invadir as camadas da derme e forma pequenas úlceras; no estágio III, o tumor já invade as camadas mais profundas da derme atingindo o sistema linfático; no estágio IV o melanoma já se encontra espalhado por todo o corpo. O nível IV é o que apresenta o maior grau de malignidade e é refratário a terapia convencional (Houghton et al., 2002; Uchicago, 2017, NIC, 2017).

Muitas alterações moleculares e alterações nas vias de sinalização têm sido relacionada a formação e progressão do melanoma. As vias de sinalização TGF- $\beta$ , MAPK, ERK, PI3K/AKT e JAK/STAT são vias que controlam o potencial invasivo e metastático das células através da ativação de mutações genéticas e alterações moleculares (Javelaud et al., 2008; Perrot et al., 2013; Du et al., 2016; Humbert et al., 2015).



**Figura 9.** Os estágios clínicos do melanoma de acordo com o grau de invasão. Adaptado uchingo, 2015.

Nos últimos anos, grandes avanços têm sido realizados na terapia do câncer, reduzindo significativamente o número de mortes e aumentando a sobrevivência do paciente. O Ipilimumab, um anticorpo monoclonal que atinge linfócito T ant-4 (CTLA-4) e Vemurafenib, uma pequena molécula inibidora do mutante *BRAF* aumentaram e melhoraram a sobrevivência dos pacientes com metástase em cerca de 70%. No entanto, a mutação em V600E na enzima *BRAF* é encontrada em 40-50% dos pacientes que possuem o melanoma maligno, e o tratamento isolado com Ipilimumab possui baixas taxas de respostas, cerca de apenas 11% dos pacientes conseguem sobreviver (Bello et al., 2013; Webster e Mentzer, 2014).

A ausência de respostas do melanoma metastático para agentes quimioterápicos convencionais e biológicos em grande parte ocorre devido à resistência a apoptose (Giammariol et al., 2008). O melanoma é composto de muitos subtipos distintos, cada um com características genéticas e clínicas únicas e com a possibilidade de responder diferentemente a qualquer estratégia terapêutica (Curtin et al., 2005).

## 2.7 - O TGF- $\beta$ 1 e a interação com a V-ATPase

Os estudos realizados entre a interação da V-ATPase e o TGF- $\beta$ 1 iniciaram em 2011 com Cao e colaboradores, onde foi detectada a regulação do TGF- $\beta$ 1 na expressão das subunidades da V-ATPase (E, c e B) em células renais, sendo descrito uma estimulação da atividade dessas bombas, interferindo com o pH intracelular, e estimulando a EMT nos modelos de fibrose renal.

Posteriormente, em 2016 Pamarthy e colaboradores, realizaram um estudo em glândulas mamárias e observaram a relação da isoforma  $\alpha$ 2 localizada no domínio  $V_0$  da V-ATPase nos processos de desenvolvimento da glândula mamária em diferentes estágios (virgem, puberdade, lactação e involução pós-lactação). Esta subunidade estaria regulando a via de sinalização *Notch*, uma das principais vias relacionadas ao desenvolvimento do câncer de mama, e conseqüentemente levaria as alterações da via de sinalização do TGF- $\beta$ 1.

O estudo do papel fisiopatológico dessas enzimas, assim como a utilização de inibidores específicos dessa bomba protônica, tem se mostrado promissor, visto que esta bomba possui expressão e atividade diferencialmente amplificadas em vários tipos de tumores (Cotter et al., 2015; Fais, 2015).

Atualmente, além da Bafilomicina e da Concanamicina A1 existem novas moléculas que tem sido caracterizadas como capazes de inibir a V-ATPase, porém em sua maioria são drogas de alto custo e de grande toxicidade (Saroussi et al., 2009; Niikura et al., 2007; Hesselink et. al., 2008; Stransky et. al., 2016). Em estudos anteriores do nosso grupo foi observado que Citral e Mirtenal, ambos monoterpenos derivados de óleos essenciais, são capazes de

inibir a atividade das bombas de prótons (V e F-ATPases), em células de melanoma e induzir a morte celular programada. Seu uso no tratamento quimioterápico associado ao coquetel de drogas terapêuticas pode tornar-se um acréscimo crucial no arsenal farmacêutico, em consideração ao seu baixo custo, toxicidade mínima e alta eficácia.

Os trabalhos citados anteriormente (Cao et al. 2011; Pamarthy et.al., 2016) foram realizados apenas em modelos de células epiteliais normais, não sendo realizado, até o momento, estudos em células e tecidos tumorais. Neste trabalho, descrevemos a ação do TGF- $\beta$ 1 como indutor da atividade ATPásica das bombas de prótons tipo V, levando a indução de EMT em modelos de melanoma murino e induzindo as alterações morfológicas e bioquímicas no tecido melanótico. Adicionalmente, o monoterpene Mirtenal foi testado em modelos de melanoma metastático hiperativados por TGF- $\beta$ 1, para avaliar as suas aplicações terapêuticas por meio da indução do mecanismo de morte celular através da inibição da enzima. Este é o primeiro trabalho a realizar um estudo sobre as interações das TGF- $\beta$ 1-V-ATPases e o câncer. A descrição desta ação integrada abre uma nova linha de investigação com potencial para fazer emergir novas estratégias de combate ao câncer usando as bombas de H<sup>+</sup> como alvos terapêuticos.

## 3 – OBJETIVOS

### 3.1 - Objetivo Geral

Investigar o mecanismo de ação pelo qual o TGF- $\beta$ 1 participaria do processo metastático em melanoma, via indução da atividade da V-H<sup>+</sup>-ATPase, aumentando subsequentemente a metástase tumoral.

### 3.2 - Objetivos específicos

- Testar a ação do TGF- $\beta$ 1 na indução da atividade e expressão das subunidades da V-ATPase;
- Caracterizar possíveis mudanças no acoplamento da bomba pela ação do TGF- $\beta$ 1 através do estudo integrado da atividade hidrolítica de ATP e transporte de prótons;
- Realizar ensaios com inibidores específicos de V-ATPase como Concanamicina A1 e Mirtenal nos tecidos e células tumorais tratadas com TGF- $\beta$ 1;
- Induzir a metástase em camundongos para testes de eficácia quimioterápica do Mirtenal;
- Nos camundongos tratados, identificar as alterações na bioquímica clínica por meio de exames de hemograma;
- Usar o inibidor seletivo de TGF- $\beta$ 1 (LY364947) visando revelar o papel do TGF- $\beta$ 1 na ativação da V-ATPase e do gradiente de H<sup>+</sup> nas células tumorais.



## 4 –MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Drogas inibitórias

O monoterpene Mirtenal , a Concanamicina A1(Inibidores da V-ATPase), e o inibidor seletivo do receptor de TGF- $\beta$ 1 (LY364947) foram obtidos comercialmente (Sigma Aldrich). O Myrtenal e a Concanamicina A1 foram diluídos no solvente DMSO a 0.97%.

### 4.2 - Cultura de células

Foram cultivadas as linhagens tumorais de melanoma de camundongo B16F10, com alto potencial metastático; e B16F0, caracterizado pelo baixo potencial metastático (Sloane et al.,1982), e SKmel-28, melanoma humano. As linhagens foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As células foram mantidas em meio DMEM com SFB a 10% em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (TPP) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade controlada. Todas as linhagens utilizadas caracterizam-se por serem aderentes.

Nos ensaios as células tratadas com de TGF- $\beta$ 1 receberam 10 ng/ml (Sigma Aldrich) e foram incubados por 24 horas.

### 4.3 - Fracionamento celular e purificação da membrana plasmática

As células foram raspadas das garrafas de culturas e centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm para posterior retirada do meio DMEM e aplicação do tampão de lavagem com 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e 3 mM de benzamidina em pH 7,4. Posteriormente, as células foram centrifugadas seguindo uma sequência de lavagem com o tampão de lavagem em centrífuga refrigerada a 500 rpm por 5 minutos e 4°C, o processo foi repetido duas vezes. O precipitado foi então rompido em Potter e o homogenato submetido à nova centrifugação de lavagem a 500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado numa ultracentrífuga a 100.000 x g por 30 minutos a 4°C para isolar a fração microssomal. O *pellet* foi ressuspensão

em tampão de ressuspensão contendo 250 mM de sacarose, 1 mM de EGTA e 50 mM de Tris-HCl em pH 7,2. A fração microsomal foi então depositada cuidadosamente no topo de um gradiente descontínuo de sacarose (46% e 25% de sacarose, 1 mM de EGTA e 50 mM de Tris-HCl em pH 7,2) e submetida à nova centrifugação a  $100.000 \times g$  por 30 minutos a 4°C, sendo coletada a fração da interface que constitui a fração enriquecida com vesículas oriundas da membrana plasmática. O material foi congelado em N<sub>2</sub> líquido e armazenado a -70°C.

#### 4.4 - Dosagem de proteína

A fração de vesículas purificadas teve o seu conteúdo de proteínas totais dosado pelo método de Bradford (1976). A solução de Bradford foi realizada pela diluição de 100 mg de *comassie blue* em 50 mL de etanol em agitação durante 1 hora, e posterior adição de 100 mL de ácido ortofosfórico. O volume foi completado para 1000 mL com H<sub>2</sub>O destilada e a solução foi então filtrada em papel filtro 4 vezes. A curva padrão de proteínas foi obtida utilizando solução de BSA (1 mg/mL) diluída a concentrações variando de 2 a 18 µg, completando o volume para 100 µL de H<sub>2</sub>O ultra-pura e adicionando 900 µL da solução de Bradford. As amostras (10 µL) foram colocadas em 90 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura e 900 µL de Bradford, após 15 minutos foi realizada a leitura a 595 nm em espectrofotômetro.

#### 4.5 - Determinação do fluxo protônico extracelular

As células de melanoma foram preparadas com 24 hs de antecedência em meio DMEM. Foram realizadas 4 amostras diferentes: células não tratadas, células com TGF-β1 (10 ng/ml), células com TGF-β1 (10 ng/ml) e LY364947 (10 nM/ml) e células com TGF-β1 (10 ng/ml).

O fluxo extracelular de prótons foi aferido próximo as células utilizando uma microsonda vibrátil seletiva a prótons (SIET – *Scanning Ion-selective Electrode Technique*). Os sinais foram obtidos a partir de alterações na corrente elétrica aferida pelo eletrodo.

A coleta de dados da microsonda fornece informações necessárias para calcular o fluxo iônico de um determinado ponto no espaço do eixo tridimensional x, y e z por meio da lei de Fick ( $J = D (dc/dx)$ ), sendo D um coeficiente de difusão tabelado para cada íon (de acordo com *Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co.*). A diferença espacial, determinada por dx, resulta no cálculo da distância entre os dois pontos que são as medições das concentrações para o cálculo do fluxo. A diferença de concentração, representada por dc, é um vetor que varia durante o ensaio. Em cada ponto a concentração pode ser calculada a partir do valor de mV registrado no ponto e na equação determinada para o ionóforo durante a calibração.

#### 4.6 - Western Blot

O preparo de gel de SDS (*Main gel* 10%: H<sub>2</sub>O, 1,5 M Tris-HCl pH 8,7, SDS 20%, acrilamida 30%, metilbisacrilamida 0,8%, PSA 10% e TEMED 10 µL). Após a polimerização, foi adicionado o *stacking gel* (H<sub>2</sub>O, 1,5 M de Tris-HCl pH 6,8, SDS 20%, acrilamida 30%, metilbisacrilamida 0,8%, PSA 10%, TEMED 10 µL). As amostras foram precipitadas utilizando uma quantidade de proteína na concentração de 30 µg/mL e TCA 50%. Posteriormente, o material foi aplicado em cada poço. A cuba foi preenchida com tampão de corrida contendo 250 mM de Tris e 1,92 M de glicina. Após a corrida no gel, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi lavada com PBS, e posteriormente deixada sob agitação em solução contendo caseína de leite especial a 5% por 1 hora. Finalmente, as membranas foram incubadas, cada uma com um anticorpo primário diferente, diluídos em leite desnatado 3% com PBS (1:1000). O anticorpo utilizado foi: (1) Anti-V-ATPase B1/2, a incubação feita *overnight* à 4 °C. Posteriormente, as membranas foram colocadas em um agitador por 30 minutos antes de iniciar as lavagens. As membranas foram lavadas por 1 hora com leite 5% em PBS, trocando-se a solução a cada 15 minutos. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado com a proteína peroxidase, na diluição 1:100 em leite 3% com PBS. Após incubação de 1 hora, as membranas foram lavadas com solução de

leite 5% com PBS por 1 hora, trocando a solução a cada 15 minutos. A última lavagem foi realizada com PBS puro. A revelação ocorreu com o kit para revelação (colocar marca).

#### 4.7 - Atividade hidrolítica da V-H<sup>+</sup>-ATPase

Para mensurar a atividade enzimática foram utilizadas as frações de membrana plasmática enriquecida com a V-ATPase. Para tal, o meio de reação básico é composto por: 10 mM de tampão Hepes-Tris (pH 7,0 para plasmalema ou 8,0 para mitocôndrias), 1 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM de molibdato de sódio e 1 mM de ATP. O volume final foi ajustado com água ultra-pura. Para cálculo da atividade específica da V-ATPase foi feita a diferença entre as atividades obtidas com e sem o inibidor específico (10nM, Concanamicina A1). A reação foi disparada com a adição de cada fração de membranas (na concentração de 0,030 mg/mL de proteína) e parada após 30 minutos de incubação, pela transferência de 5% de TCA, mantido em gelo. Para revelar o fosfato liberado durante a hidrólise de ATP, foi utilizado o método descrito por Fiske e Subbarow (1925), com molibdato de amônio e ácido ascórbico (100:1) e a leitura realizada em leitor de Elisa a 750 nm.

#### 4.8 - Monitoramento do gradiente de prótons

A determinação do gradiente de H<sup>+</sup> foi realizada seguindo o protocolo de Okorokov & Lichko (1983) e realizado em fluorímetro (Hitachi F 45000 ou Shimadzu RF-5301 PC) com abertura de 5/10 nm no comprimento de onda para excitação 415 nm e para emissão 485 nm. Foi utilizada uma solução contendo: 20 µL de KCl 2 M (20 mM concentração final); 100 µL de MgSO<sub>4</sub> 50 mM (2,5 mM concentração final); 50 µL de vesículas de membranas (este volume foi dependente da atividade obtida); quantidade suficiente de tampão MOPS-KOH (Sacarose 12,5%; MOPS-KOH 20 mM, pH 7,4) para completar o volume final para 2,0 mL. Foram adicionados 3 µL de ACMA 1 mM (estoque dissolvido em etanol). Esta reação foi preparada direto na cubeta e incubada diretamente no fluorímetro a 37 °C por 5 min. Após esta incubação, foi inicializada a reação no

aparelho aguardando-se aproximadamente 50 s (tempo de estabilização do platô da fluorescência) e adicionando-se imediatamente 20  $\mu$ L de ATP-NaOH 100 mM pH 7,2 (concentração final 1 mM). A cinética da extinção da fluorescência (“quenching”) foi observada até o tempo de aproximadamente 600 segundos (ou tempo necessário para atingir a completa extinção da fluorescência), sendo então adicionados 20  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2 M (concentração final de 20 mM) a fim de refazer a fluorescência inicial, ou seja, desfazer o gradiente de  $\text{H}^+$  formado. A determinação da velocidade inicial ( $V_0$ ) e da fluorescência máxima ( $\Delta F_{\text{máx}}$ ) na suspensão das vesículas das membranas foram analisadas utilizando os dados do gráfico obtido durante as análises.

#### 4.9 – A indução e a obtenção de tumores sólidos

A indução dos tumores sólidos de melanoma, com alto e baixo potenciais metastáticos (B16F10 e B16F0, respectivamente), foram realizados em camundongos machos do tipo Black C57Bl6 com 5 a 6 semanas, através da injeção de 50  $\mu$ L de solução com  $1 \times 10^6$  de célula/mL na porção apical da orelha do animal (para a metástase no linfonodo mais próximo). Os animais foram divididos em 15 grupos com  $n=7$ : 1-Controle; 2-Controle+DMSO; 3-Controle+Mirtenal; 4-Melanoma; 5-Melanoma+DMSO; 6-Melanoma+Mirtenal; 7-Melanoma+TGF- $\beta$ 1; 8-Melanoma+TGF- $\beta$ 1 +DMSO; 9-Melanoma+TGF- $\beta$ 1 +Mirtenal; 10-Controle+LY364947; 11-Controle+LY364947+DMSO; 12-Melanoma+LY364947; 13-Melanoma+LY364947+Mirtenal; 14-Melanoma+TGF- $\beta$ 1 +LY364947 e 15-Melanoma+TGF- $\beta$ 1 +LY364947+Mirtenal.

Após 21 dias da indução subcutânea no ápice da orelha, os animais foram sacrificados na câmara de  $\text{CO}_2$  e o tumor foi retirado para o isolamento da membrana plasmática (seguindo as etapas já descritas no item 4.3 e 4.4) e os linfonodos utilizados para as análises histopatológicas. Os camundongos C57Bl6/Black foram mantidos no biotério do LBCT, em caixas próprias com ração e água *ad. Libitum*.

#### 4.10 - Histopatologia dos tumores

Os linfonodos dos animais inoculados com as linhagens B16F10 e B16F0 foram retirados e fixados em formol 10% tamponado e posteriormente clivados, desidratados em séries crescentes de etanol (70%, 80%, 90% e 100%), clarificados com xilol, impregnados e incluídos em parafina e as seções foram obtidas em micrótomo. As lâminas foram então montadas e coradas com hematoxilina e eosina. As amostras foram observadas em microscópio Zeiss Axioplan e fotografadas no sistema Axiovision.

#### 4.11 - Parâmetros bioquímicos do plasma

Amostras de sangue foram coletadas dos camundongos, após 21 dias de experimento, e encaminhadas para laboratório de análise clínica especializado para proceder a análise padrão do hemograma completo.

#### 4.12- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do *programa Graph Pad Prism* versão 5.0. Nos testes foi utilizado o teste estatístico tukey's multiple comparison test, one-way ANOVA. Para as análises de grupos utilizamos o teste estatístico de Bonferroni, Two-away ANOVA. As diferenças significativas foram consideradas como \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , e \*\*\* $P < 0,001$ .

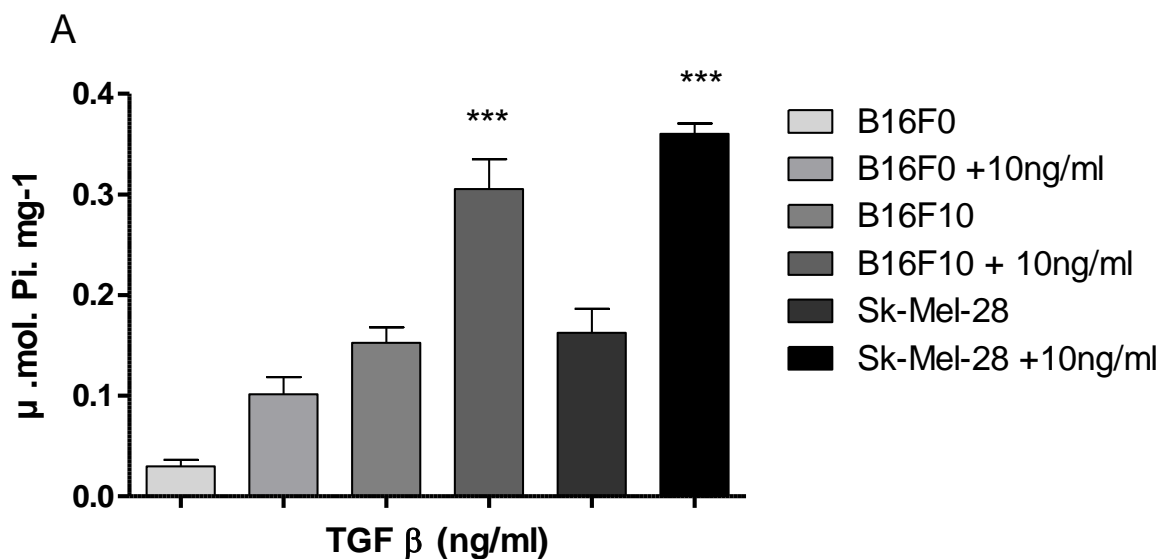
## 5- RESULTADOS

### 5.1- Efeito do TGF- $\beta$ 1 na V-ATPase da Membrana Plasmática

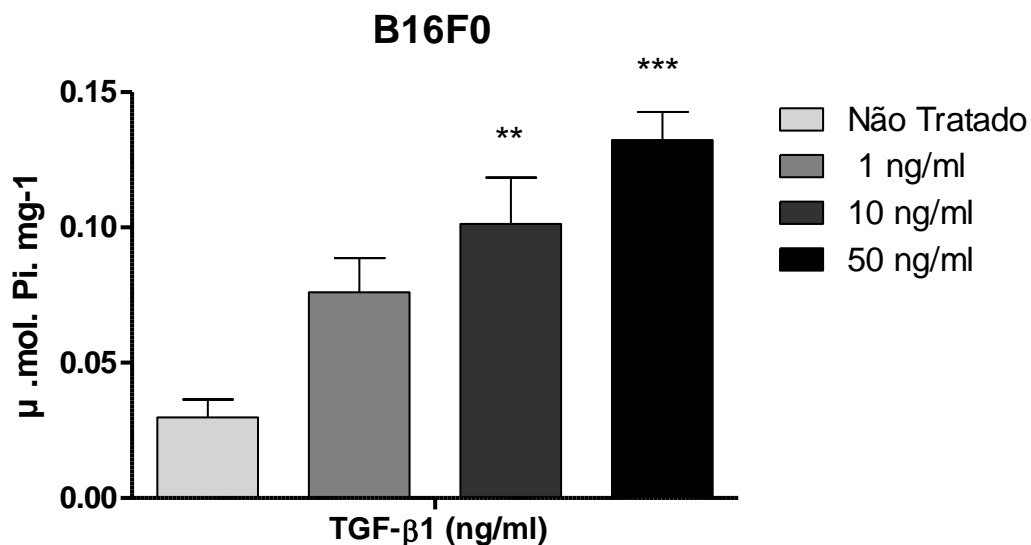
Foram realizadas as análises comparativas das atividades das bombas V-ATPase presentes na membrana plasmática das células de melanoma tratadas por 24hs com 10ng/ml de TGF- $\beta$ 1. Observou-se, que as três linhagens apresentaram estímulo da atividade hidrolítica induzida por TGF-  $\beta$ 1, (Figura 10). No entanto, apesar das células B16F0 apresentarem um perfil caracterizado como melanoma de baixo potencial metastático e pouco invasivo, essas células ao serem submetidas ao tratamento com TGF- $\beta$ 1 por 24hs aumentaram significativamente a atividade da bomba atingindo valores próximos as células de alto potencial metastático B16F10 (Figura 10). Posteriormente diferentes concentrações de TGF- $\beta$ 1 (1, 10 e 50ng/ml) foram adicionados as três linhagens celulares por um tempo de 24hs. Nas figuras 11-13 é possível observar o estímulo da bomba semelhante ao aumento da concentração do TGF- $\beta$ 1 nas células carcinogênicas.

Ao analisar os dados do transporte protônico ( $V_0$ , velocidade inicial) observamos que os resultados corroboram com os resultados encontrados na atividade hidrolítica (Figura 14). Em 24 horas de exposição das células ao TGF- $\beta$ 1 foi possível observar o estímulo de transporte protônico nas três linhagens de células de melanoma, entretanto, embora a célula B16F10 tenha apresentado um estímulo significativo, o mesmo foi bem inferior quando comparado as demais linhagens de células.

Com base nos resultados das hidrólises e dos gradientes de prótons podemos analisar o grau de acoplamento funcional da bomba (razão: velocidade inicial do transporte de  $H^+$  / hidrólise de ATP) e observar a eficiência da enzima em utilizar a energia liberada do substrato no transporte iônico (Tabela 1). A razão entre o transporte de prótons e a atividade ATPásica mostrou que a incubação das células por 24hs com TGF- $\beta$ 1 interferiu na atividade enzimática de todas as células, aumentando em até 3 vezes o acoplamento funcional da enzima (Tabela 1).

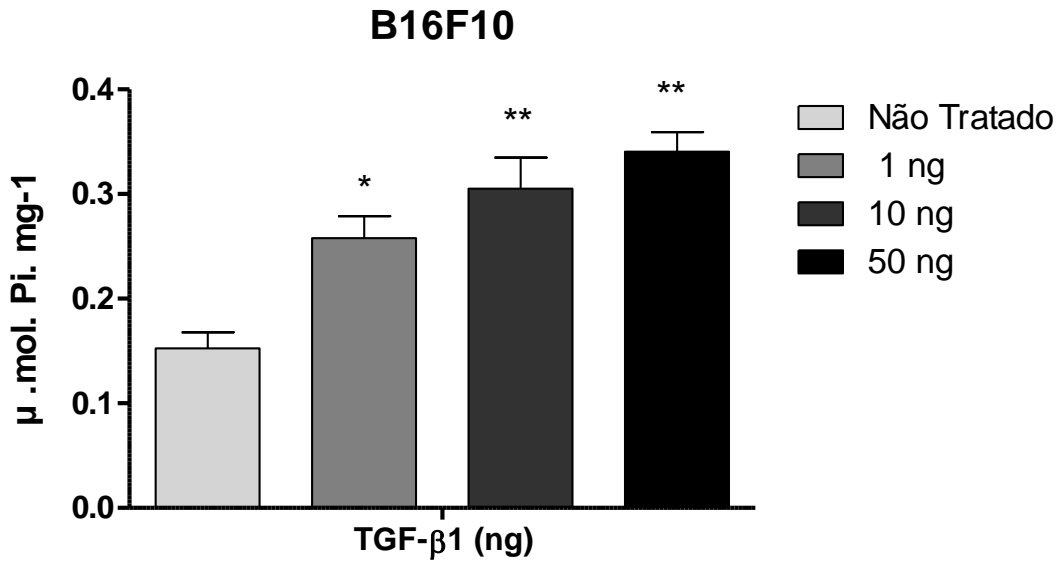


**Figura 10.** Atividade comparativa da V-ATPase das células B16F0, B16F10 e SK-Mel-28 na presença do TGF-  $\beta$ 1 a 10ng/ml por 24hs. A presença do TGF-  $\beta$ 1 estimulou a atividade hidrolítica da bomba V-ATPase em todas as células de melanoma. N=4. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

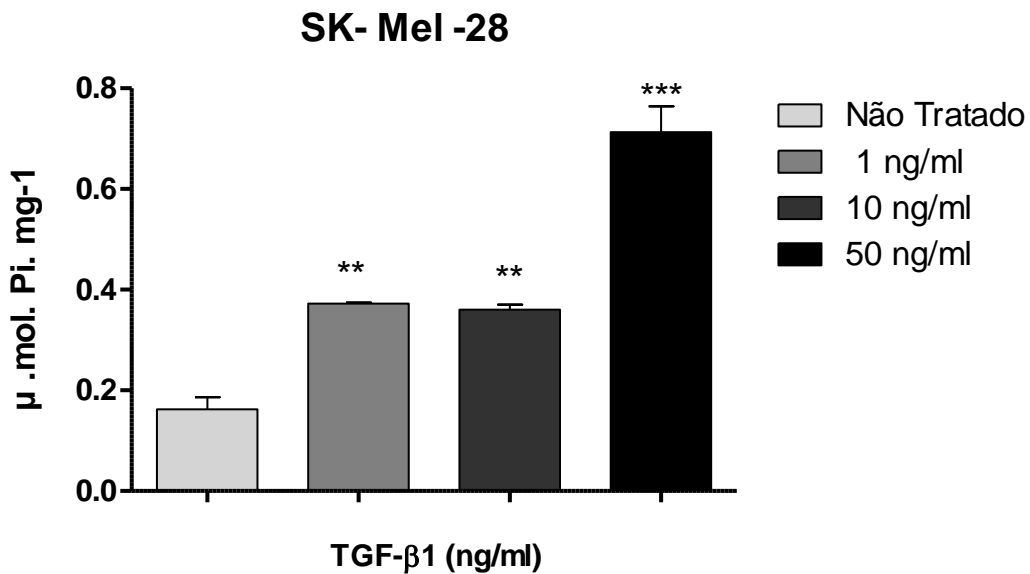


**Figura 11.** Atividade comparativa da V-ATPase das células B16F0 em diferentes concentrações de TGF-  $\beta$ 1. O TGF-  $\beta$ 1 aumentou significativamente a atividade da enzima em todas as concentrações testadas. N=4 \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

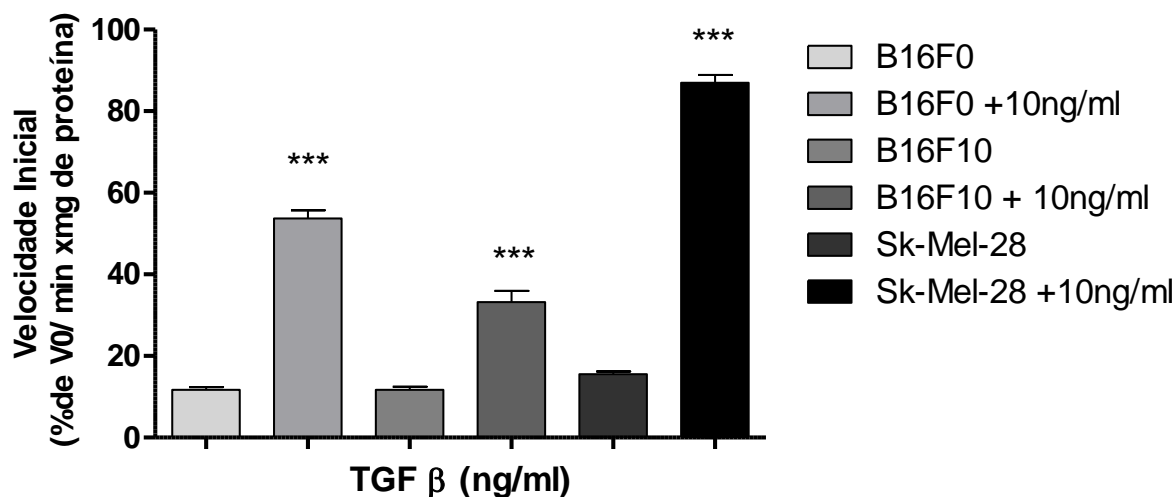




**Figura 12.** Atividade comparativa da V-ATPase das células B16F10 em diferentes concentrações de TGF- β1. O TGF- β1 aumentou significativamente a atividade da enzima em todas as concentrações testadas. N=4 \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 13.** Atividade comparativa da V-ATPase das células Sk-Mel-28 em diferentes concentrações de TGF- β1. O TGF- β1 aumentou significativamente a atividade da enzima em todas as concentrações testadas. N=4 \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 14.** Comparação do transporte de prótons da V-ATPase nas células B16F0, B16F10 e Sk-Mel-28 na presença de TGF-β1. A presença do TGF-β1 estimulou o aumento no transporte de prótons em todas as células de melanoma. As células SK-MEL-28 apresentaram maior sensibilização a ação da citocina. N=4 \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

[TGF-β1]	B16F0	B16F10	SK-Mel-28
<b>Não Tratado</b>	1	1	1
<b>1ng/ml</b>	1	1,2	0,8
<b>10ng/ml</b>	1,4	1,8	2,4
<b>50ng/ml</b>	1,5	3,0	2,7

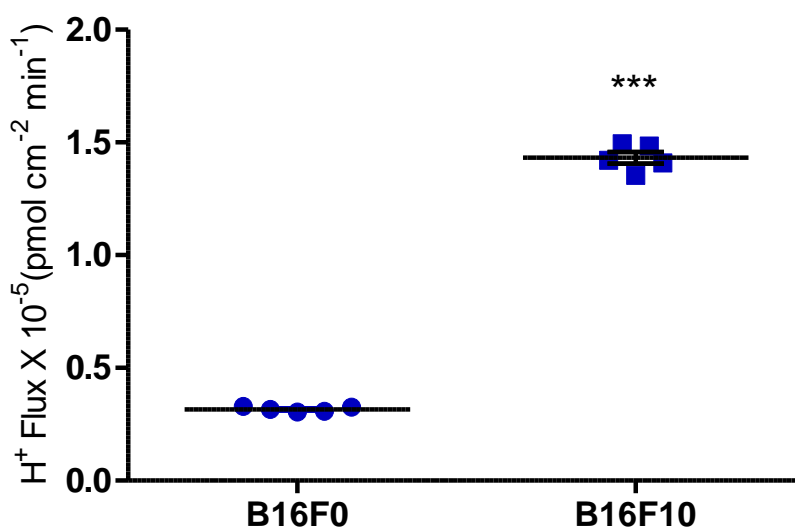
**Tabela 1.** Acoplamento funcional do domínio Vo e V1 da bomba V-ATPase das células de melanoma. A razão razão(Vo H<sup>+</sup>/Vo ATP) é medida entre os valores do transporte de prótons/ valores da hidrólise de ATP. O aumento da concentração de TGF-β1 aumenta o acoplamento funcional da bomba V-ATPase.

## 5.2- Inibidor do receptor de TGF- $\beta$ 1 reduz o fluxo de prótons

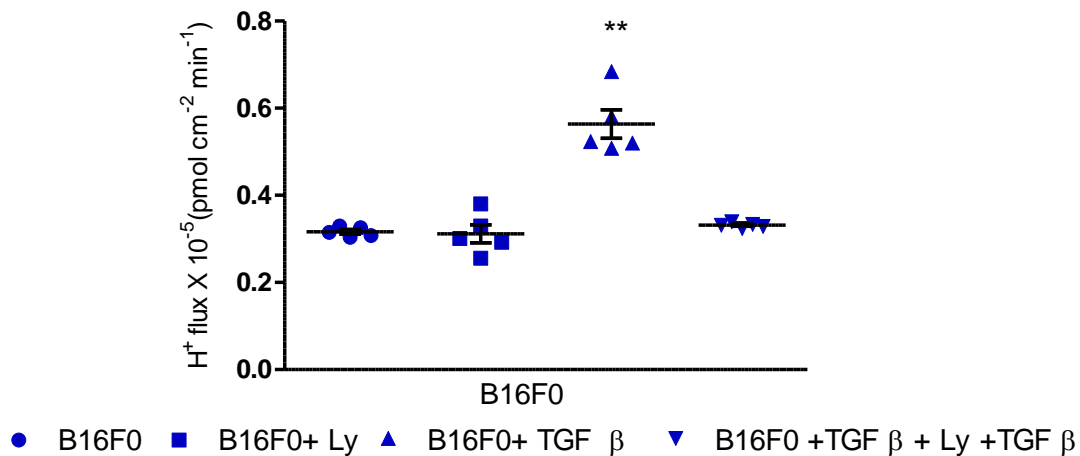
Foram mensuradas as análises no fluxo de íons e a atividade da bomba V-ATPase quando submetida a presença do inibidor do receptor de TGF-  $\beta$  o LY364947 (LY).

Primeiramente foram realizados ensaios para o monitoramento do Fluxo de prótons na cultura celular *in vivo* através do uso da microsonda vibrátil que capta as oscilações no fluxo de prótons. Os dados mostram que a célula mais metastática apresenta um fluxo de prótons 3 vezes maior do que a linhagem menos metastática, figura 15, surpreendentemente, ao analisar o tratamento com o TGF- $\beta$ 1 (50ng/ml) observamos que há um aumento do fluxo de íons  $H^+$ . Ao observar o monitoramento das células pré-tratadas com o inibidor LY notamos que há uma redução significativamente esse fluxo, figura 16 e 17. Esses dados sugerem que há uma interação entre a presença do TGF-  $\beta$ 1 por 24hs com a extrusão de prótons e consequente a acidificação extracelular.

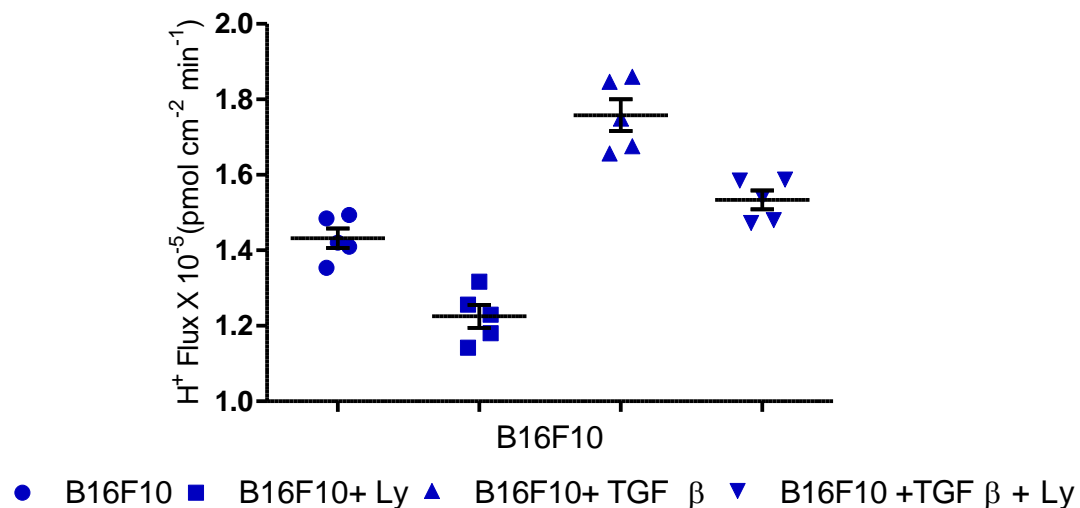
De maneira semelhante, quando analisamos as atividades enzimáticas e o fluxo de prótons, *in vitro*, percebemos que o LY quando combinado ao TGF- $\beta$ 1 inibe a atividade e o fluxo de prótons apenas na célula menos metastática, de forma intrigante o inibidor interfere pouco na atividade da enzima, figura 18-21. Porém ao observar o acoplamento funcional da bomba vemos que o LY reduziu o funcionamento total da enzima quando comparado aos tratamentos apenas com o TGF-  $\beta$ 1, Tabela 2.



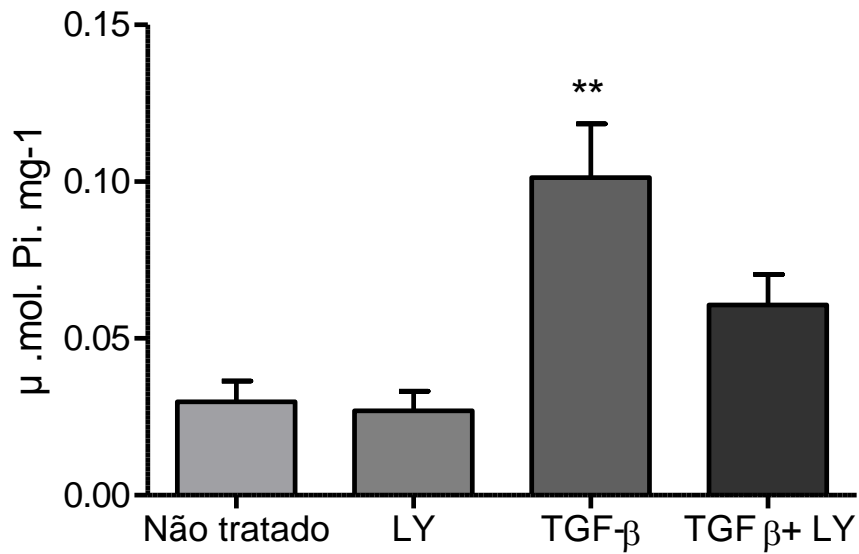
**Figura 15.** Determinação do fluxo protônico  $H^+$  por meio da microsonda vibrátil na cultura celular. As duas células com diferentes potenciais metastáticos demonstram diferentes valores no fluxo de prótons, as células menos metastáticas B16F0 apresentam menor fluxo, já as células mais metastáticas apresentam maior fluxo de prótons. N=5 \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



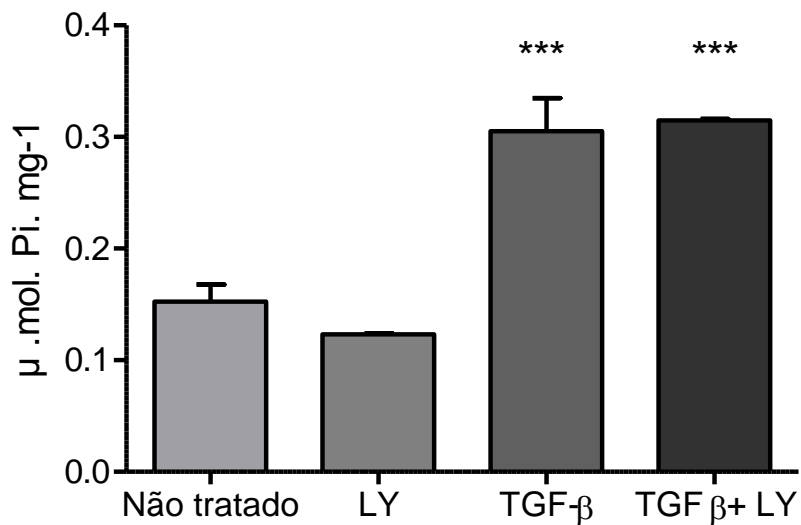
**Figura 16.** Determinação do fluxo protônico  $H^+$  por meio da microsonda vibrátil na cultura celular. Células de B16F0 foram submetidas a adição de TGF- $\beta$ 1 e LY364947 por 24hs. A presença do TGF- $\beta$ 1 estimulou o fluxo de prótons, como esperado o LY364947 reduziu o fluxo de  $H^+$  na B16F0. N=5 \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



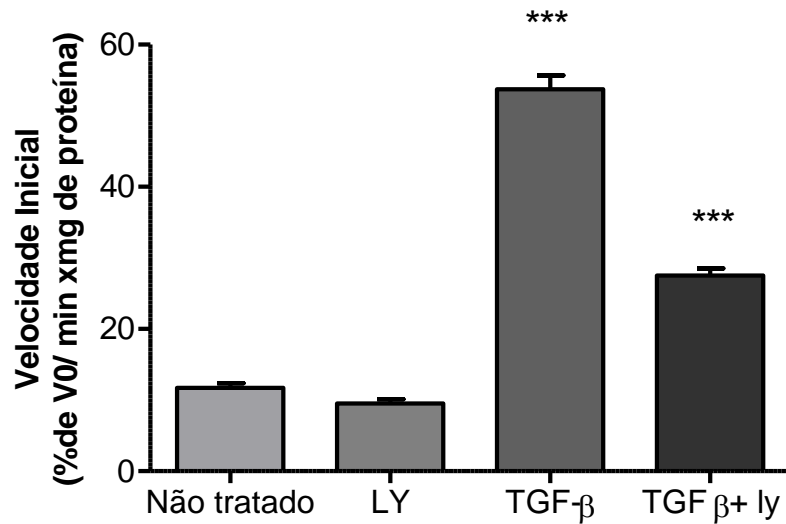
**Figura 17.** Determinação do fluxo protônico  $H^+$  por meio da microsonda vibrátil na cultura celular. Células de B16F10 foram submetidas a adição de TGF-  $\beta$ 1 e LY364947 por 24hs. O fluxo  $H^+$  foi maior na presença de TGF-  $\beta$ 1 e sofreu uma pequena redução na presença do LY364947. N=5 \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



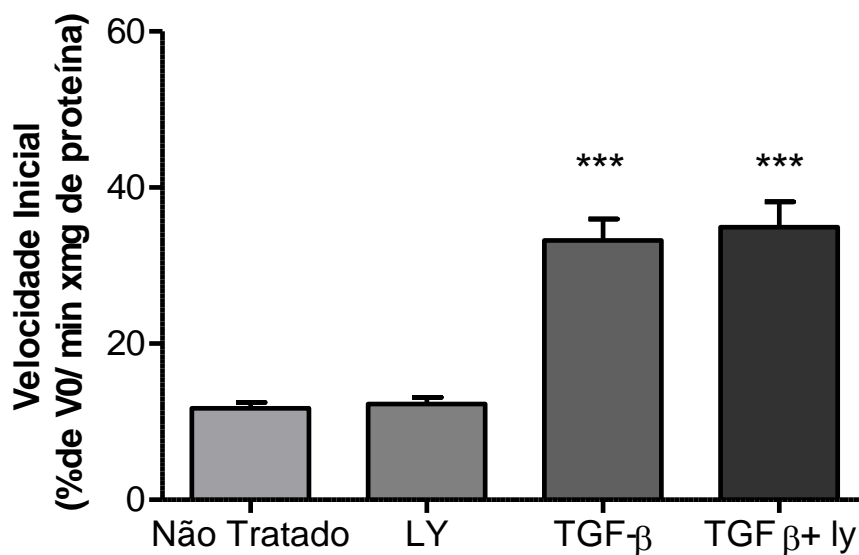
**Figura 18.** Atividade comparativa da V-ATPase da célula B16F0 na presença do LY364947 e TGFβ-1. O TGFβ-1 estimulou fortemente a atividade da bomba, e como esperado o LY364947 reduziu a atividade hidrolítica da bomba. N=5 \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 19.** Atividade comparativa da V-ATPase da célula B16F10 na presença do LY364947 e TGFβ-1. O TGFβ-1 estimulou fortemente a atividade da bomba, e o LY364947 não interferiu na atividade hidrolítica da bomba. N=5 \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 20.** Mensuração do fluxo de prótons da V-ATPase na célula B16F0 na presença do LY364947 e TGF-β1. O TGF-β1 aumentou o fluxo de prótons nas células, e o LY364947 reduziu significativamente o fluxo de prótons. N=5 \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 21.** Mensuração do fluxo de prótons da V-ATPase na célula B16F0 na presença do LY364947 e TGF-β1. O TGF-β1 aumentou o fluxo de prótons nas células, mas o LY364947 não interferiu no fluxo de prótons. N=5 \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

Razão $V_o/V_1$	B16F0	B16F10
Não Tratado	1	1
TGF $\beta$ 1 10 ng/ml	1,4	1,8
TGF $\beta$ 1 50 ng/ml	1,5	3,0
LY364947	0	1,2
LY364947 + TGF $\beta$ 1 (10ng/ml)	1,1	1,4

**Tabela 2.** Acoplamento do domínio V1 e  $V_o$  da bomba V-ATPase das células de melanoma. A razão ( $V_o H^+/V_o ATP$ ) é medida entre os valores do transporte de prótons/ valores da hidrólise de ATP. O aumento da concentração de TGF- $\beta$ 1 aumenta o acoplamento funcional da bomba V-ATPase.

### 5.3- Indução metastática nos linfonodos.

A fim de avaliar a capacidade migratória e invasiva das células e relacionar a malignidade tumoral à interação de TGF-  $\beta$ 1- V-ATPase, foram realizados testes de indução tumoral sub-cutânea na orelha externa do animal em sua face caudal. De modo que fosse possível avaliar a metástase tumoral em linfonodo mandibular.

Inicialmente acompanhamos o crescimento do tumor nos animais durante as três semanas de indução através dos exames de tomografia, figura 22. Nas imagens em cortes transversais na região da cabeça, podemos observar que os tumores que tiveram adição de TGF-  $\beta$ 1 24hs antes da indução começaram a apresentar o crescimento da massa tumoral já com uma semana de indução, enquanto os animais que tiveram indução de células sem TGF-  $\beta$ 1 apresentaram apenas 2 semanas após a indução. Nota-se ainda que a massa tumoral com TGF-  $\beta$ 1 são maiores e mais invasivos, poucos animais conseguiram chegar até o final do tratamento devido a agressividade da doença, figura 24.

Após avaliar o crescimento do tumor iniciamos os tratamentos com inibidores de V-ATPase, os animais foram tratados em doses alternadas de 3 dias com Mirtenal a 10mg/ml durante 21 dias de tratamento. A figura 23 mostra a taxa de sobrevivência dos diferentes grupos dos camundongos tratados com base em sua dose letal 50%, dado retirado da dissertação de mestrado do Msc. Rauls Ferraz Arruda, 2015. Os animais do grupo (50mg/kg) apresentaram 40% de sobrevivência após 4 dias de tratamento, já os animais do grupo tratado com 20mg/kg apresentaram uma sobrevivência de 60 % após 4 dias. Acredita-se que a dose letal 50% esteja entre 30-35mg/Kg, com base nisso, utilizamos a dose de 10mg/kg para os tratamentos dos tumores, visto que essa concentração nos tratamentos *in vivo* não foi letal aos camundongos.

Após a determinação das concentrações, os animais foram divididos em grupos com 7 animais em cada: 1-Controle; 2- Controle+ DMSO; 3-Controle+ Mirtenal; 4-Melanoma; 5-Melanoma+ DMSO; 6- Melanoma+ Mirtenal; 7- Melanoma+ TGF- $\beta$ 1; 8-Melanoma+ TGF- $\beta$ 1+ DMSO; 9- Melanoma+ TGF- $\beta$ 1+ Mirtenal; 10 -Controle+ LY364947; 11- Controle+ LY364947+ DMSO; 12-



Melanoma+ LY364947; 13- Melanoma+ LY364947+ Mirtenal; 14- Melanoma+ TGF- $\beta$ 1+ LY364947 e 15- Melanoma+ TGF- $\beta$ 1+ LY364947+ Mirtenal.

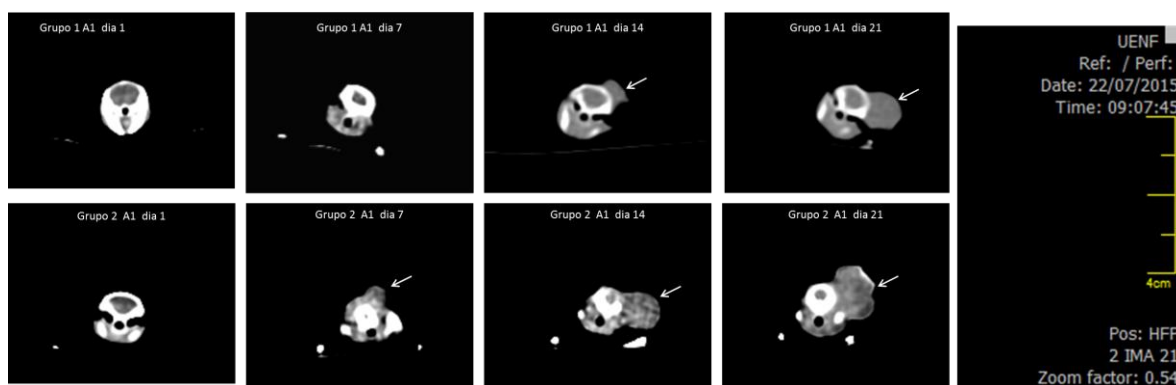
Foram realizados cortes histológicos dos linfonodos mandibulares dos animais. Observa-se nitidamente nas imagens a invasão metastática do melanoma em todo o linfonodo, observa-se também extensas regiões de necrose, a presença de melanina e a perda da capsula do tecido conjuntivo que reveste o linfonodo, figura 25. Quando tratados com Mirtenal (figura 25-C), observamos a reconstituição da cápsula e a invasão metastática limitada a periferia do linfonodo, no entanto, quando avaliamos os animais que sofreram adição de TGF- $\beta$ 1 (figura 25-D), observamos que o órgão encontra-se completamente tomado pelo melanoma, e com grandes regiões de necrose ocasionando a completa alteração do tecido. Em contrapartida, os animais que tiveram indução de células com TGF-  $\beta$ 1 e foram tratados com Mirtenal apresentaram os linfonodos menos afetados pelo melanoma, e com o crescimento metastático limitado a periferia do órgão, figura 25-E.

Utilizando um aumento de 40x (figura 26), nós observamos com maior nitidez as características do tecido e a invasão metastática. Nós contamos o número de células em fase mitótica/ corte histológico e chegamos a numeração: A- animais com B16F10 sem tratamento 7 células/ corte, B- animais com B16F10 + Mirtenal 4 células/ corte, C- animais com B16F10+TGF- $\beta$ 1 11 células/ corte, e D- animais com 9 células/ corte. Esses dados indicam que os animais que tiveram a adição de TGF- $\beta$ 1 apresentaram o tecido tumoral com maior número de divisão celular, característica marcante do melanoma maligno. Em contraste, quando comparamos com os animais que tiveram o tratamento com o Mirtenal observamos redução no número de células em divisão celular. Para garantir a neutralidade do experimento, esta contagem e a obtenção de sua média foi realizada pelo patologista Hassan J. Leandro (LSA/CCTA/UENF).

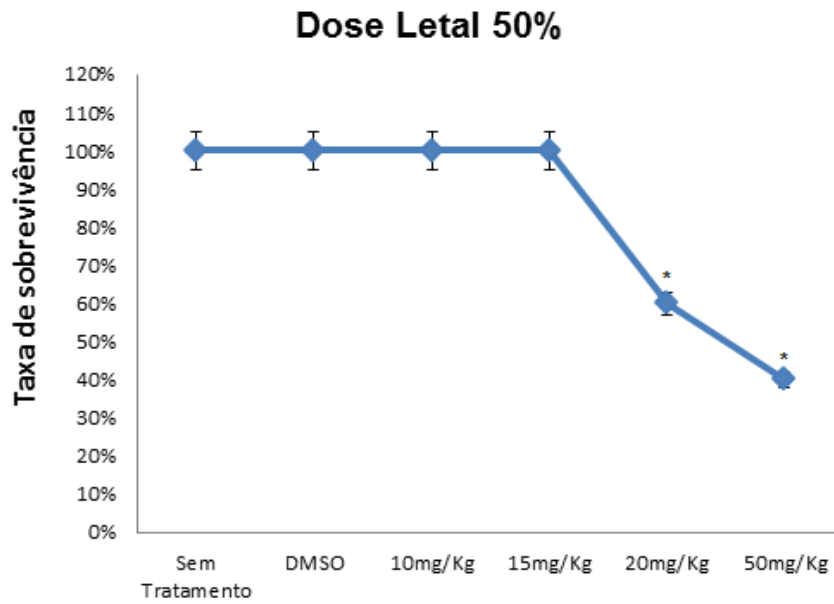
Durante o tratamento avaliamos a sobrevida dos diferentes grupos de animais utilizados, os dados mostraram que TGF- $\beta$ 1 reduziu o tempo e a qualidade de vida dos animais, poucos conseguiram sobreviver até o final do tratamento, figura 27. Quando os animais foram tratados com Mirtenal, observou-se um aumento na taxa de sobrevivência desses animais. Vale resaltar que o grupo dos animais TGF- $\beta$ 1+ Mirtenal embora tenham sobrevivido

ate o final do tratamento estavam pouco ativos, porém não estavam tão debilitados quanto os animais ainda vivos dos grupos sem tratamento. A sobrevivência do animal tratado é visivelmente maior quando comparada aos animais sem tratamento.

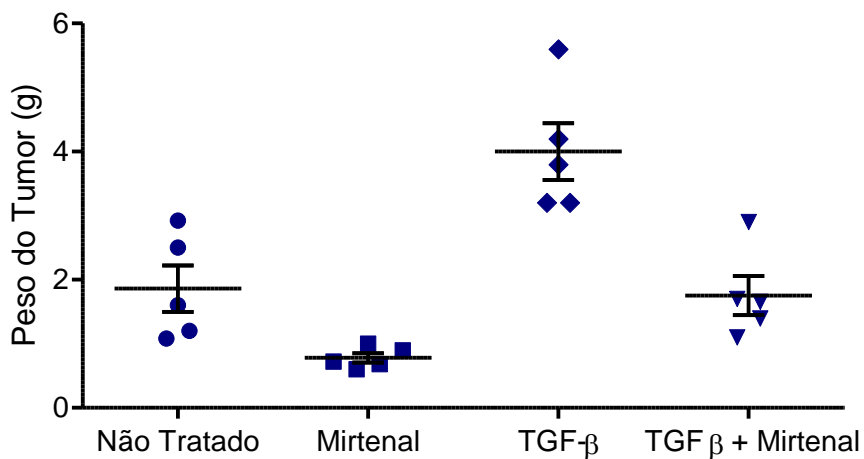
Foram ainda realizadas análises do hemograma completo dos diferentes grupos de animais tabela 3. Observamos pela contagem do número de plaquetas uma nítida trombocitose nos animais que tiveram indução de TGF- $\beta$ 1, fator indicativo de alteração na medula óssea, ou ocorrência de uma leucemia, e/ou melanoma.



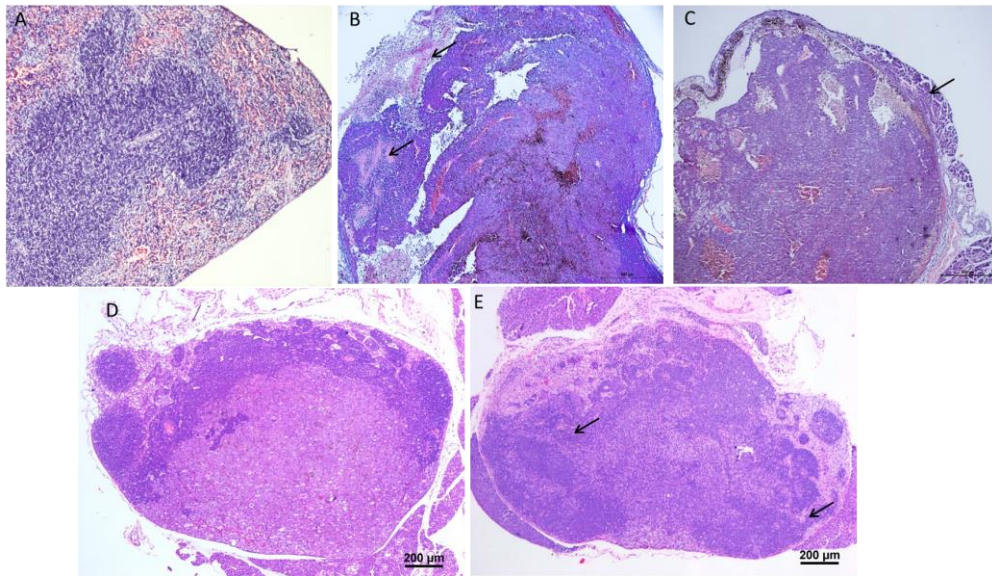
**Figura 22.** Tomografia computadorizada para acompanhamento da evolução da metástase tumoral em cortes transversais na região da cabeça. Os animais tiveram os tumores induzidos por via subcutânea no dorso próximo a região da orelha. Durante os 21 dias do crescimento tumoral os animais foram observados e avaliados por tomografia, as imagens apresentam cortes transversais e zoom 0.54. O grupo 1 representa os animais com indução de B16F10 e o grupo 2 mostra os animais com indução de B16F10+ TGF- $\beta$ 1.



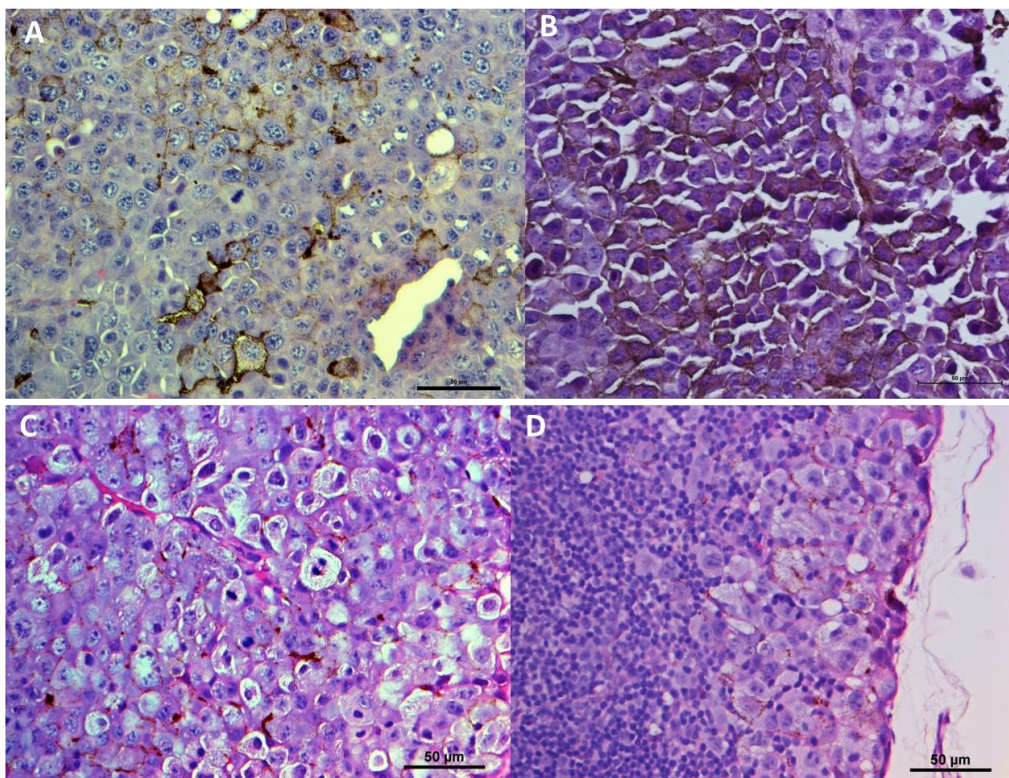
**Figura 23:** Taxa de sobrevivência de camundongos tratados com diferentes concentrações de Mirtenal para a obtenção da Dose Letal 50%. Gráfico retirado da dissertação de mestrado do Msc. Raul Ferraz Arruda, 2015.



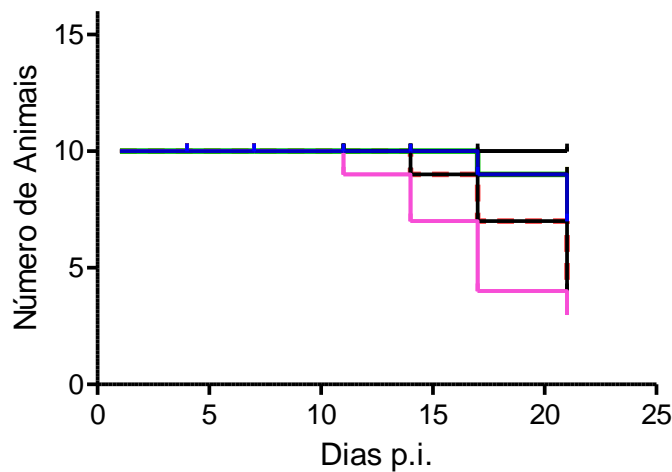
**Figura 24.** Peso dos tumores (B16F10) após 21 dias de tratamento com Mirtenal. N= 5  
 $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 25.** Cortes histológicas dos linfonodos com metástase. Os animais fora divididos nos seguintes grupos (7 animais cada grupo): (A) grupo controle, (B) grupo com indução de B16F10, (C) grupo com indução de B16F10 e tratados com Mirtenal, (D) Grupo com indução de B16F10 +TGF  $\beta$ 1, e (E) grupo com indução de B16F10 + TGF  $\beta$ 1 tratados com Mirtenal. Aumento de 10x H&E.



**Figura 26.** Cortes histológicas dos linfonodos com metástaseA- Animais com indução de B16F10 e não tratados, B- Animais com indução de B16f10 e tratados com Mirtenal, C- Animais com indução de B16F10 +TGF  $\beta$ 1 D- Animais com indução de B16F10 + TGF  $\beta$ 1 tratados com Mirtenal. Aumento de 40x H&E.



— Animais Normais      — Mirtenal      — B16F10+TGf β  
 - - Não Tratado      — B16F10+ Mirtenal      — B16F10+TGf β+ Mirtenal

**Figura 27** Análise comparativa do tratamento animal pós indução metastática. Os animais tratados com Mirtenal demonstraram maior sobrevida mesmo quando pré tratados com TGF-β1. Os animais com TGF-β1 e sem tratamento foram os que apresentaram maior mortalidade N= 10.

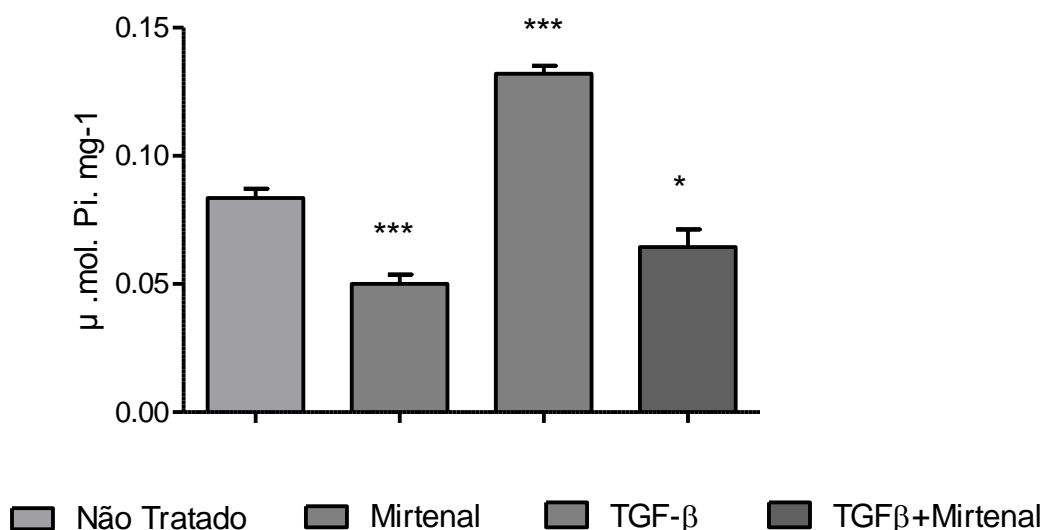
Hemograma	Número de Plaquetas
<b>Animais Saudáveis</b>	300.000/ μL
<b>Sem tratamento+ B16F10</b>	934.000/ μL
<b>Mirtenal</b>	849.000/ μL
<b>TGF- β1</b>	2.181.000/ μL
<b>TGF- β1+ Mirtenal</b>	1.251.000/ μL

**Tabela 3.** Hemograma dos diferentes grupos de animais quanto a alteração nos níveis de plaquetas. N=7. Valor referencial: 130.000 a 400.000/ μL.

#### 5.4- O TGF- $\beta$ 1 interfere na atividade da V-ATPase

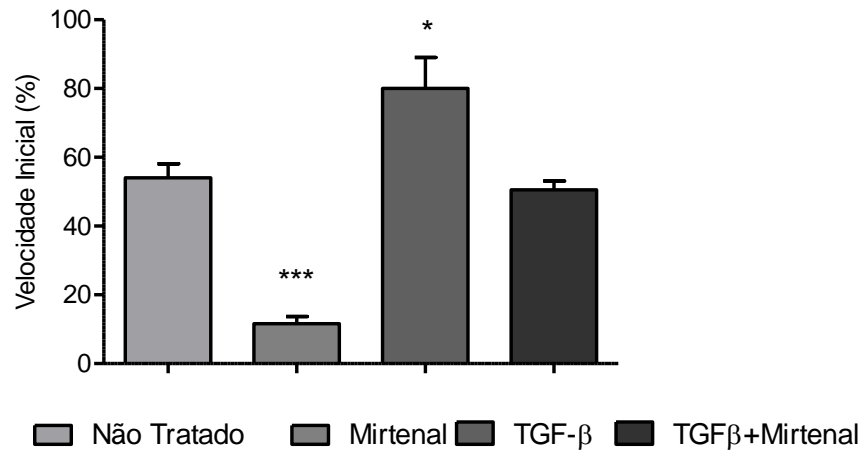
Após as análises histológicas dos animais, isolamos os tumores dos animais com B16F10 e testamos a atividade da bomba. Os dados mostram que o TGF-  $\beta$ 1 interferiu na atividade da bomba aumentando significativamente a atividade e o transporte da enzima. Os animais tratados com Mirtenal apresentaram atividade hidrolítica e gradiente de prótons menor do que os demais tipos de tratamento, até mesmo os animais tratados com o TGF-  $\beta$ 1, figura 28 e 29. Demonstrando que o tratamento em dias alternados de mirtenal resultou em um efeito nessa enzima.

O TGF- $\beta$ 1 também aumentou a expressão da subunidade B1, integrante do domínio catalítico V1 da V-ATPase, nos animais que tiveram indução com as células B16F0 e nos animais inoculados com B16F10. Surpreendentemente, a expressão de B1/V1, em tumores provenientes da indução das células B16F0 de menor potencial metastático tiveram o aumento da expressão em cerca de 5 vezes maior (Figura 30). Sugerindo que a adição de TGF- $\beta$ 1 interage com maior eficiência em células de menos potencial metastático.

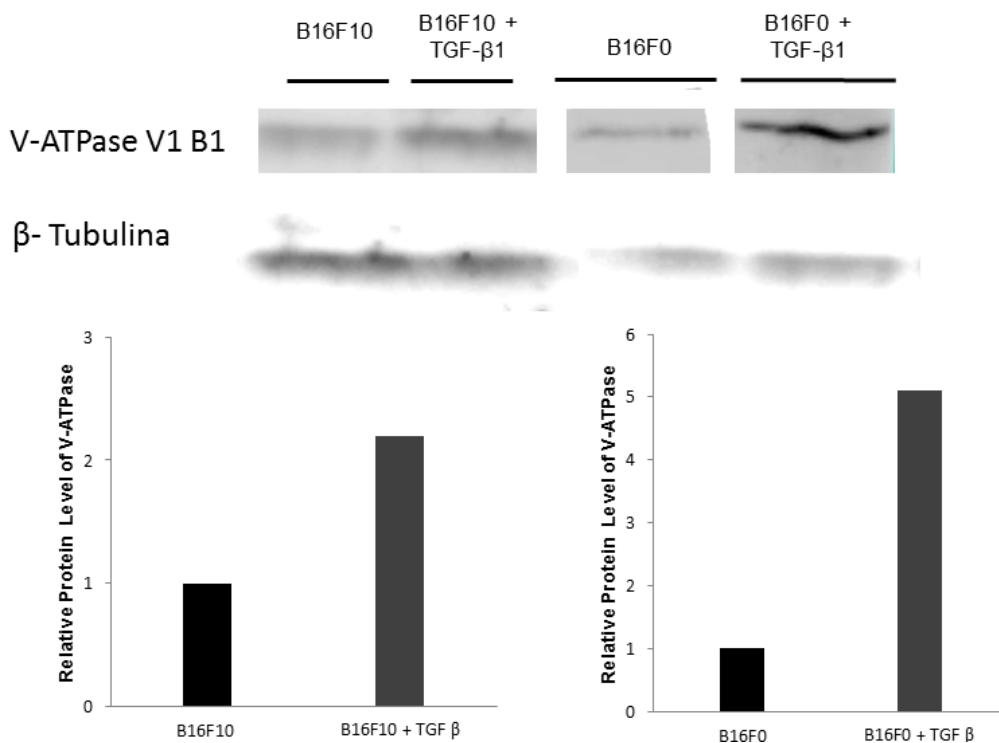


**Figura 28.** Atividade enzimática da V-ATPase em tumores de B16F10. Os animais foram tratados por 21 dias com Mirtenal e as células pré-tratadas com TGF- $\beta$ 1 por 24hs. O TGF- $\beta$ 1 estimulou a atividade hidrolítica da V-ATPase, e, como esperado, o inibidor da enzima, o Mirtenal, reduziu a atividade. N= 5 p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.





**Figura 29.** Mensuração do fluxo de prótons da V-ATPase nos animais tratados por 21 dias com Mirtenal. O TGF-β1 estimulou o fluxo de prótons H<sup>+</sup> da V-ATPase, e, como esperado, o inibidor da enzima, o Mirtenal, reduziu a atividade N= 5 p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 30.** Expressão da subunidade B1/V1 dos tumores induzidos com células B16F0 e B16F10 incubadas com TGF-β1 a 10ng/ml por 24hs. O TGF-β1 super estimulou o aumento da expressão da subunidade B1/V1 principalmente na célula B16F0.

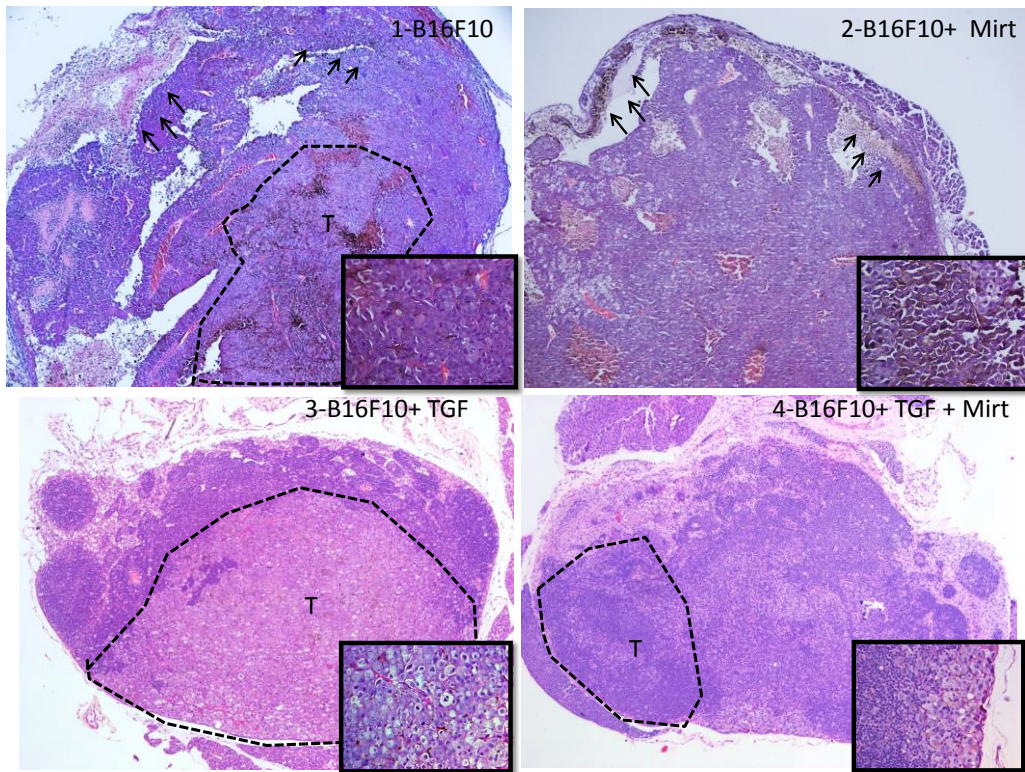
## 5.5- Ação do LY364947 e do Mirtenal na inibição da metastase

Examinamos o potencial do inibidor do receptor de TGF- $\beta$ 1, o LY364947 (LY), e do LY conjugado ao Mirtenal (capaz de inibir a V-ATPase), na redução da metástase e da atividade da bomba V-ATPase nos animais com tumores induzidos. Nas análises histopatológicas, observamos que os animais que tiveram indução tumoral com TGF- $\beta$ 1 aumentaram o foco metastático chegando a atingir o córtex e a medula do linfonodo mandibular. Nas imagens em aumento de 40x é possível observar os melanócitos na fase de citocinese da mitose, Figuras 31 e 33.

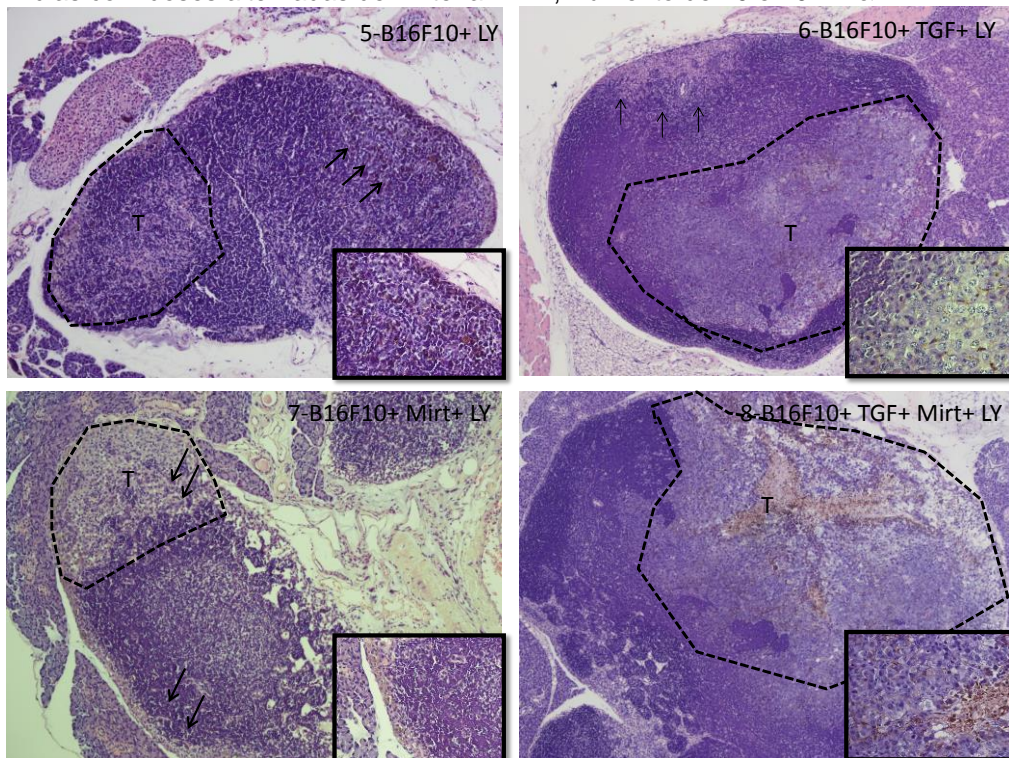
Ao realizar o tratamento dos animais com LY e Mirtenal observamos que os animais que tiveram a indução com célula mais metastática (B16F10) adicionado a TGF- $\beta$ 1 não tiveram muitas respostas positivas a redução da metástase e tamanho do tumor, figura 32. Os tumores apresentaram grande foco metastático que atingiu grande parte do linfonodo (Figura 31-3) e o tratamento reduziu parcialmente o foco metastático na medula e no cortex do linfonodo, Figura 32- 6 e 8. Já os animais que foram induzidos com B16F0 e inoculado com TGF- $\beta$ 1, mostraram que além do aumento do perfil metastático nessas células com o TGF-  $\beta$ 1, figura 33, os tratamentos com LY e Mirtenal conseguiram reduzir o foco da metástase na periferia do linfonodo atingindo apenas o córtex figura 34-14 e 16.

Observamos ainda, que o tamanho da massa tumoral foi significativamente reduzido quando o animal é tratado com Mirtenal, LY e com o conjugado LY+ Mirtenal (Figura 35). Nos animais que tiveram a indução com TGF-  $\beta$ 1, os tratamentos com LY, Mirtenal e LY+ Mirtenal se apresentaram bem menos efetivos quando comparados aos animais não tratados. Contudo, quando comparamos estes dados com o grupo de animais tratados com TGF- $\beta$ 1 observamos uma redução significativa na massa do tumor e na metástase (Figura 34 e 35). O mesmo é observado nos dados da atividade do tumor e do transporte da bomba, o LY possui uma eficiência maior nos tratamentos dos animais sem TGF-  $\beta$ 1 (Figura 36 e 37).



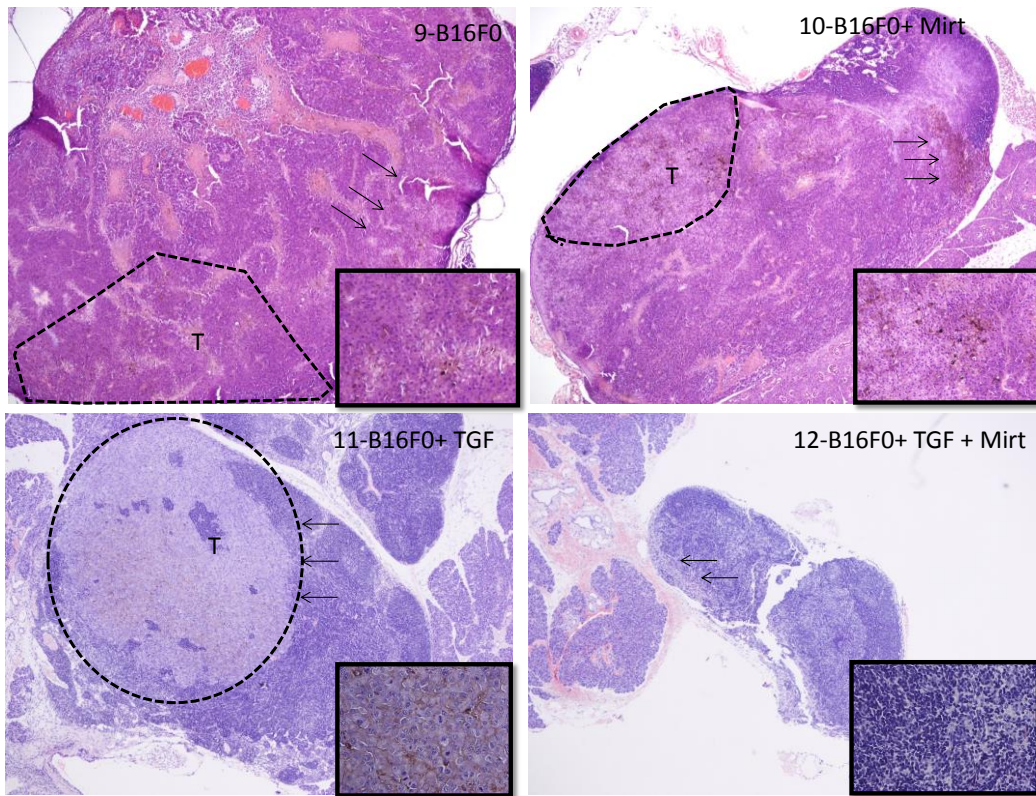


**Figura 31.** Cortes histológicas dos linfonodos com metástase de células B16F10. As células foram pré-tratadas por 24hs com TGF- $\beta$ 1 e induzidas nos animais. Os animais foram tratados por 21 dias com doses alternadas de Mirtenal. N=7, Aumento de 10 e 40x H&E.

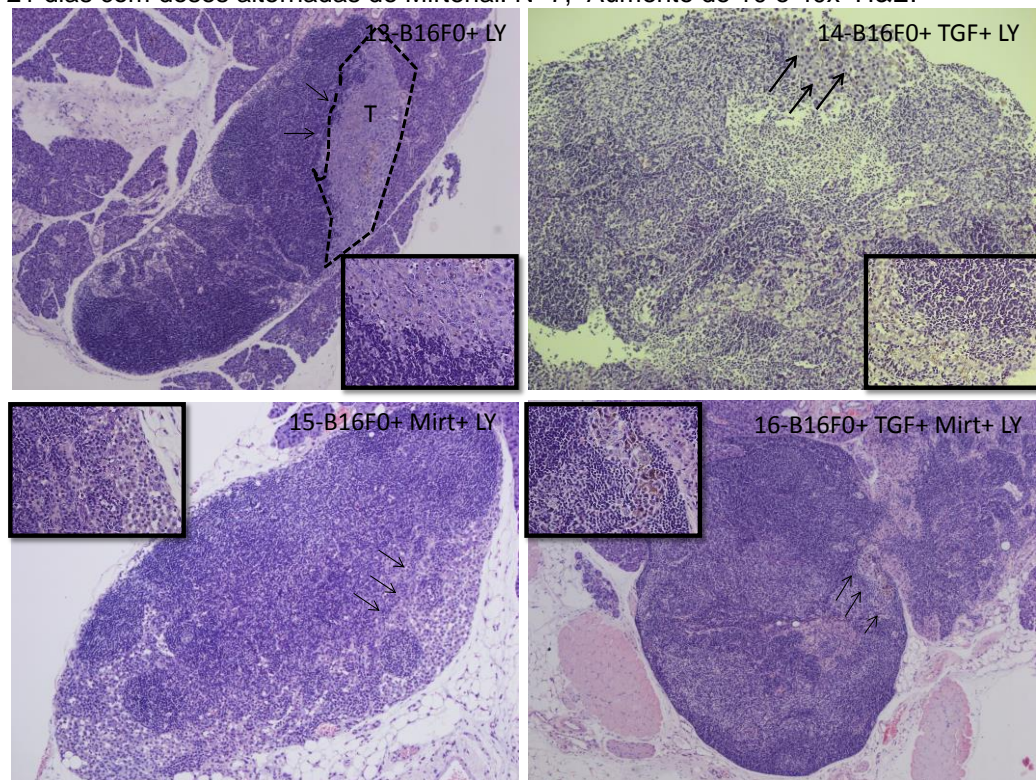


**Figura 32.** Cortes histológicas dos linfonodos com metástase de células B16F10 tratados com LY364947 e Mirtenal. As células foram pré-tratadas por 24hs com TGF- $\beta$ 1 e induzidas nos animais. Os animais foram tratados por 21 dias com doses alternadas de LY364947 e Mirtenal. N=7, Aumento de 10 e 40x H&E.

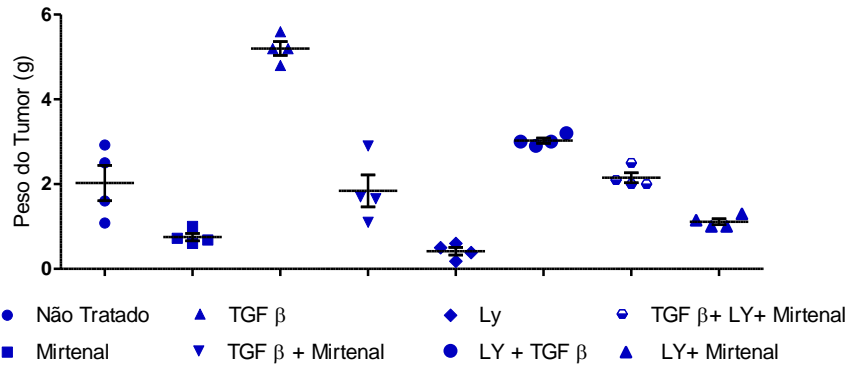




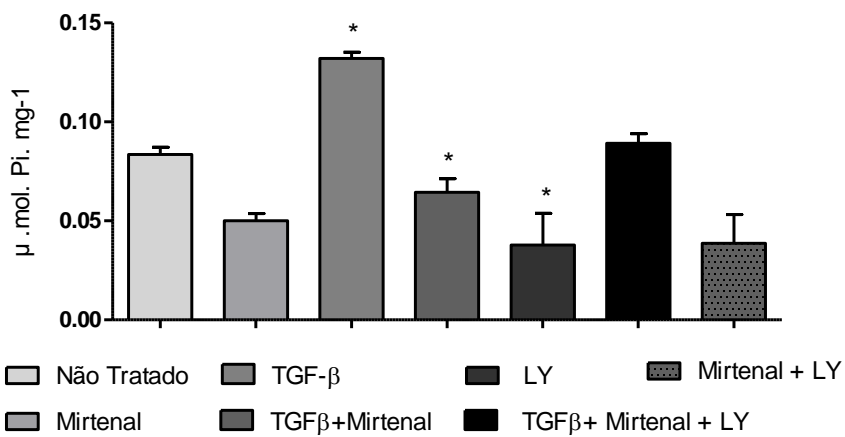
**Figura 33.** Cortes histológicas dos linfonodos com metástase de células B16F0. As células foram pré-tratadas por 24hs com TGF- $\beta$ 1 e induzidas nos animais. Os animais foram tratados por 21 dias com doses alternadas de Mirtenal. N=7, Aumento de 10 e 40x H&E.



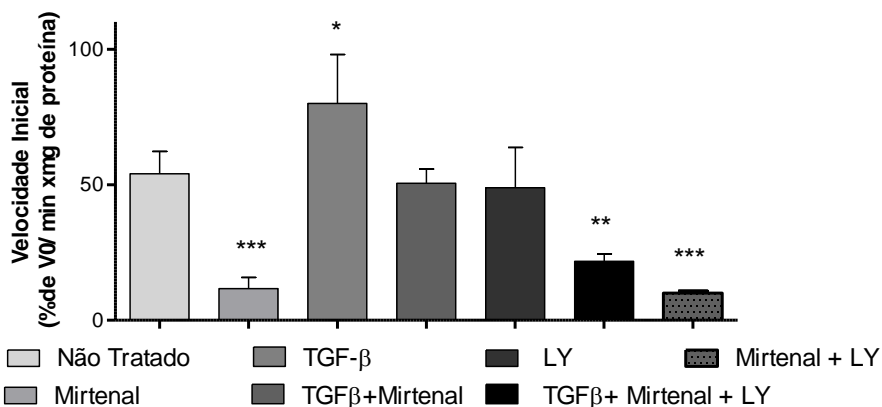
**Figura 34.** Cortes histológicas dos linfonodos com metástase de células B16F0 tratados com LY364947 e Mirtenal. As células foram pré-tratadas por 24hs com TGF- $\beta$ 1 e induzidas nos animais. Os animais foram tratados por 21 dias com doses alternadas de LY364947 e Mirtenal. N=7, Aumento de 10 e 40x H&E.



**Figura 35.** Peso dos tumores B16F0 tratados com LY364947 e Mirtenol após 21 dias. O tratamento com o LY364947 e o Mirtenol foram capazes de reduzir o peso da massa tumoral nos animais quando comparados aos animais tratados apenas com TGF-β1. n=5 p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 36.** Análise da Atividade da V-ATPase nos animais tratados por 21 dias com Mirtenol e LY364947. O tratamento com o LY364947 e o Mirtenol foram capazes de reduzir a atividade hidrolítica da bomba nos tumores dos animais tratados. n=5 p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.



**Figura 37.** Análise do Fluxo de prótons na enzima V-ATPase nos animais tratados com Mirtenol e LY364947 por 21 dias. O tratamento com o LY364947 e o Mirtenol foram capazes de reduzir o transporte de prótons H<sup>+</sup> na V-ATPase. n=5 p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

## 6- DISCUSSÃO

As alterações no pH citoplasmático e a acidificação extracelular têm sido relacionadas nos, últimos anos, a malignidade das células carcinogênicas, assim como, o aumento da glicose e da hipóxia característicos do microambiente tumoral. Todavia, os mecanismos de adaptação da bioenergética das células tumorais responsivos a tais condições necessitam ser mais bem explorados (Warburg, 1956, Lozupone et al., 2015, Alfarouk, 2016). Sabe-se que a acidificação celular é uma das condições nas quais o LAP se desnatura resultando em significativa ativação do TGF- $\beta$  (Lyons et al., 1988), e que uma das principais características dos tumores de melanoma maligno é a presença de pH extracelular baixo e das altas concentrações de TGF- $\beta$  (Krasagkis et.al. 1998, Nishishio et. al. 2011).

Neste trabalho identificamos a citocina TGF- $\beta$ 1 como uma proteína ativadora da V-ATPase (figura 10), induzindo a super expressão dessa bomba e aumentando a sua eficiência catalítica. Observamos que tal efeito foi dependente da concentração de TGF- $\beta$ 1, tanto no aumento da atividade hidrolítica da bomba, quanto no transporte dos prótons (figura 14). Porém é notório que a efetividade foi maior nesta última atividade, o que resultou em um maior acoplamento funcional destas bombas (Tabela 1) em função da presença de TGF-  $\beta$ 1. Esses dados corroboram com os dados de Cao et. al., realizados em 2011, que sugere o mesmo efeito do TGF- $\beta$ 1 na atividade da V-ATPase de células renais.

O uso do inibidor do receptor do TGF- $\beta$ 1, LY364947 (LY), nos ensaios da enzima mostrou a redução da atividade enzimática até mesmo nas células suplementadas com TGF- $\beta$ 1. Em todas as situações testadas, a linhagem celular menos metastática (B16F0), se mostrou mais sensível ao tratamento com a citocina, o grupo das células tratadas com o inibidor do receptor de TGF- $\beta$ 1 apresentou resultados semelhantes ao grupo de células que não sofreram a adição de TGF-  $\beta$ 1, figura 16 e 18. Contudo, as células B16F10 não demonstraram as mesmas alterações perante o LY adicionado ao TGF-  $\beta$ 1, figura 17 e 19. Esse dado sugere que o efeito do TGF- $\beta$ 1 no câncer não é

somativo, acreditamos que o TGF- $\beta$ 1 possui um efeito até o nível limite, e posterior a isso o efeito na atividade da V-ATPase é estabilizado ou saturado.

Os inibidores de bombas de prótons reduziram a metástase em linfonodos e aumentaram a sobrevivência dos animais, indo de acordo com a proposição prévia de que a inibição desta bomba seria uma estratégia efetiva na apoptose, quimiosensibilização e redução da metástase (Wiedmann et.al. 2012, Azzarito et. al., 2014, Schempp, et.al., 2014, Cotter, 2015).

Os animais tratados com o inibidor do receptor do TGF- $\beta$ 1 (figura 31) mostraram significativa redução na metástase, na atividade e no transporte da bomba, porém, no tratamento conjugado (LY + Mirtenal) as células B16F10 pré-tratadas com TGF- $\beta$ 1 não demonstraram resultados equivalentes aos demais tratamentos, já os animais com indução das células B16F0 apresentaram resultados positivos ao tratamento. No entanto é importante destacar que células carcinogênicas malignas já possuem maior produção de TGF- $\beta$ 1 e, portanto, acreditamos que os tratamentos com os inibidores sem o acréscimo da proteína já demonstra a sua ação sobre a bomba de H<sup>+</sup> (Perrot et al., 2013; Constam, 2014).

Nos tratamentos dos tumores de B16F0 com inibidor do receptor de TGF- $\beta$ 1 observamos uma redução significativa da massa tumoral na região da metástase nos linfonodos Figura 35, o que corrobora com os dados encontrados por Mohammad et. al. 2011 que afirma que o bloqueio da sinalização do TGF- $\beta$ 1 retarda o crescimento do tumor de melanoma.

Foi visto que a adição do TGF- $\beta$ 1 nas células aumentou a expressão da subunidade B1, componente do domínio V1 (Figura 30). Esse domínio é essencial para a hidrólise do ATP, e a sua alta expressão está correlacionada a maior atividade da bomba, e dessa forma proporciona o melhor desempenho na invasão tumoral e metástase (Chung et.al. 2011, Lozupone et. al., 2015).

O aumento das subunidades é um dos fatores essenciais relacionados a interação TGF- $\beta$ 1-V-ATPase, e sabe-se que essa interação é descrita principalmente nas subunidades B2/V1, E/V1, c/Vo e  $\alpha$ 2/Vo (Cao et. al. 2011 e Pamarty et. al. 2016) para tecidos epiteliais de rim e mama. Merece destaque o fato de que esse aumento na expressão da B1 foi de até 5 vezes nas células de menor potencial metastático, o que em conjunto com a menor expressão induzida nas células mais metastáticas, sugere uma íntima relação entre o

potencial metastático diferencial destas células e a indução metastática via TGF- $\beta$ 1.

O TGF-  $\beta$  é descrito por apresentar um duplo papel no câncer, podendo atuar ora como supressor tumoral e ora como um potente indutor metastático (Pang et. al. 2013, Lebrum 2012). O que observamos é que o uso de altas concentrações de TGF- $\beta$ 1 em trabalhos científicos mostraram a correlação dessa citocina ao aumento da metástase no câncer (Walsh e Damjanovski 2011, Wang et.al., 2015, Han et. al, 2017), porém, quando utilizadas baixas concentrações de TGF- $\beta$ 1 observa-se um efeito supressor no tratamento do câncer ( Yu et. al 2002, Valderrama-Carvajal et. al., 2002, Humbert et. al. 2015).

Acreditamos o perfil metastático das células carcinogênicas esteja associado as concentrações de TGF-  $\beta$ 1 secretadas. É descrito que pacientes com melanoma possuem elevados níveis de TGF- $\beta$ 1 e essa alta concentração permite a fuga das respostas imunológicas, fazendo com que esse câncer seja um dos mais agressivos e de difícil cura. (Martin et.al. 1987, Krasagakis et.al. 1998, Spender et. al. 2016). As altas concentrações de TGF-  $\beta$ 1 excretadas pelos exossomos e o baixo pH extracelular gerado pela atividade das V-ATPases super expressas nas células malignas, aumentam a capacidade metastática das células tornando-as malignas (Fais e Milito, 2007, Rong et.al., 2016).

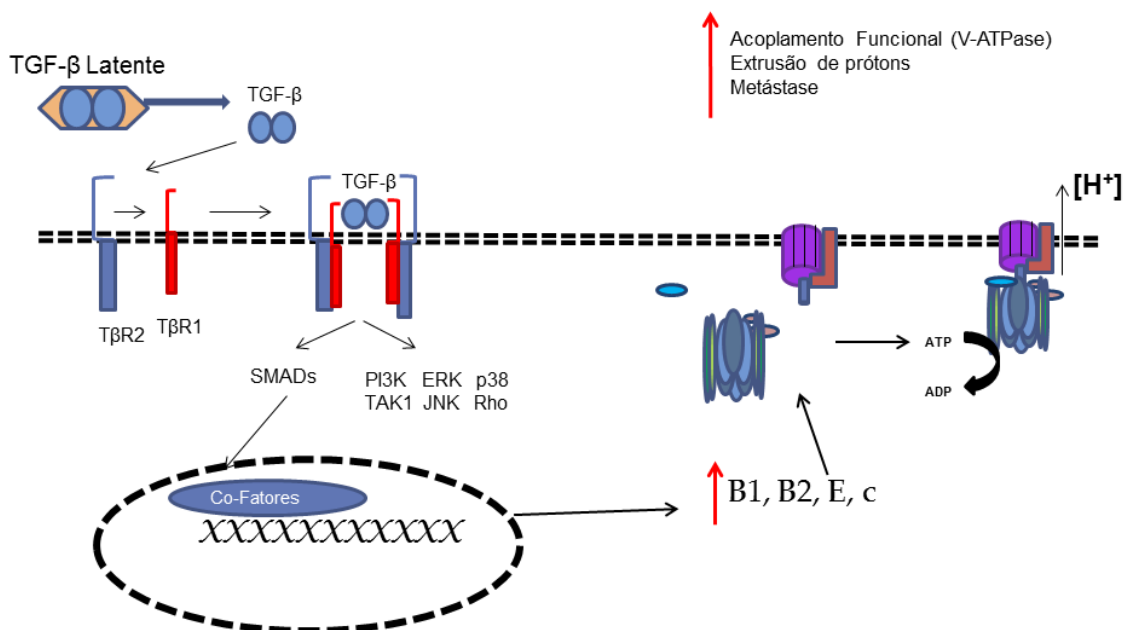
Os resultados deste estudo demonstram uma interação entre o TGF- $\beta$ 1 e a V-ATPase presente na membrana plasmática das células tumorais. Acreditamos que essa interação possa aumentar o funcionamento dessas enzimas pelo aumento das suas subunidades, a atividade catalítica e do transporte de prótons, gerando um meio extracelular mais ácido e assim consequentemente aumentam o perfil metastático maligno do melanoma.



## 7- CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados do nosso estudo indicam que o TGF- $\beta$ 1 interage com as V-ATPases das células carcinogênicas alterando os mecanismos chaves da regulação iônica e do pH tumoral, representando um dos mecanismos de modulação da bioenergética tumoral que potencializa o processo de metástase em melanomas murino e humano, e provavelmente em outros tipos de cânceres, figura 38.

Este é o primeiro trabalho a realizar um estudo funcional da enzima V-ATPase mediante a exposição de TGF- $\beta$ 1 no perfil metastático do câncer. O desenvolvimento desse trabalho pode contribuir para a progressão nos estudos do câncer de pele e o uso dos inibidores do receptor do TGF- $\beta$ 1 e da V-ATPase que podem proporcionar uma melhor qualidade de vida e novas oportunidades terapêuticas para os pacientes do melanoma.



**Figura 38.** Esquema final sugerindo a interação da V-ATPase- TGF- $\beta$ 1 na metástase carcinogênica. O TGF- $\beta$  estimula por alterações genéticas o aumento na expressão das subunidades da V-ATPase gerando como consequência: o maior acoplamento funcional da bomba, o aumento na extrusão de prótons e, consequentemente, levando a célula carcinogênica a apresentar um perfil metastático mais invasivo.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-bataineh, M.M., Alzamora, R., Ohmi, K., Ho, P. Y., Marciszyn, A.L., Gong, F., Li, H., Hallows, K.R., Pastor-Soler, N.M. Aurora kinase A activates the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) in kidney carcinoma cells. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 310:1216-1228. 2016;

Alfarouk, K.O. Tumor metabolism, cancer cell transporters, and microenvironmental resistance. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 1-8. 2016;

Arai, H., Berne, M, Forgac, M. Inhibition of the coated vesicle proton pump and labeling of a 17,000-dalton polypeptide by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *Journal of Biological Chemistry*. 262:11006-11011. 1987;

Arruda, R.F. Potencial quimioterápico do Mirtenal e de sua atividade inibitória sobre a V-ATPase na contenção do processo de Metástase em Melanoma Murino. Dissertação de mestrado. Centro de Biociências e Biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 47p. 2015;

Azzarito, T., Venturi, G., Cesolini, A., Fais, S. Lansoprazole induces sensitivity to suboptimal doses of paclitaxel in human melanoma. *Cancer Letter*. 356:697-703. 2014;

Bandarchi, B., Jabbari, C.A., Vedadi, A., Navab, R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *Journal Clinical Pathology*. 66: 644-648. 2013;

Bello, D.M., Ariyan, C. E., Carvajal, R.D. Melanoma mutagenesis and aberrant cell signaling. *Cancer Control*. 20: 261-281. 2013;

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemical*, 248-254.1976;



Cao, X., Yang, Q, Qin, J., Zhao, S., Li, X., Fan J., Wenfang, C., Zhou, Y., Mao, H., e Yu, X. V-ATPase promotes transforming growth factor-B-induced epithelial-Mesenchymal transition of rat proximal tubular epithelial cells. *American Physiological Society*. 302: 1121-1132. 2011;

Casey, J.R., Grinstein, S., and Orlowski, J. Sensors and Regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11: 50-60. 2010;

Chen, X., Qian, Y, Wu, S. The Warburg effect: Evolving interpretations of an established concept. *Free Radical Biology and Medicine*. 79: 253-263. 2015;

Chung, C., Mader, C.C., Schmitz, J.C., Atladottir, J., Fitchev, P., Cornwell, M.L., Koleske, A. J., Crawford, S. E., Gorelick, F. The vacuolar-ATPase modulates matrix metalloproteinase isoforms in human pancreatic cancer. *Laboratory Investigation*. 91:732-743. 2011;

Constam, D. Regulation of TGFB and related signals by precursors processing. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 32: 85-97. 2014;

Cotter, K., Capecci, J., Sennoune, S., Huss, M., Maier, M., Martinez-Zaguilan, R., Forgac, M. Activity of plasma membrane V-ATPase is critical for the invasion of MDA-MB231 Breast Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 290: 3680-3692. 2015;

Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Hetal, N., Patel, M.S., Busam, K.L., Kutzner, H., Cho, K.H., Aiba, S., Brocker, E.B., LeBoit, P.E., Pinkel, D., Bastian, B.C. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *The new England Journal of Medicine*. 353: 2135-2147. 2005;

Datta, P.K., Mann, J.R. Transforming growth factor-b (TGF-b) signaling inhibitors in cancer therapy. *Springer*. 35: 573-587. 2008;

Davies M., Robinson, E., Smith, S., Huntley S., Prime S., and Paterson. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF- $\beta$  involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. 95: 918-931. 2005;

De Milito A., and Fais S. Tumor acidity, chemoresistance and proton pump inhibitors. *Future Oncology*. 1: 779-786. 2005;

De Melo, F.H.M. Junqueira, M.S., Chammas, R. Mecanismos de Invasão e Metástases. In: Brentani, M.M, Kowalski, L.P., Coelho, F.R.G. *Bases da Oncologia*. São Paulo: Editora Marina e Tedmedd Editora, 2 ed. 201-226. 2003;

Derynck, R., J. A. Jarrett, E. Y. Chen, D. H. Eaton, J. R. Bell, R. K. Assoian, A. B. Roberts, M. B. Sporn, and D. V. Goeddel. Human transforming growth factor- $\beta$  complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature*. 316:701-705.1985;

Derynck, R., Akhurst, R.J., Balmain, A. TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics*. 2:117-129. 2001;

Du, L. Chen X., Cao Y., Lu L, Zhang, F., Bornstein S., Li Y., Owens P., Malkoski S, Said S., Jin F, Kulesz-Martin M, Gross N, Wang X J and Lu S. Overexpression of PIK3CA in murine head and neck epithelium drives tumor invasion and metastasis through PDK1 and enhanced TGF- $\beta$  signaling. *Oncogene*. 1-12. 2016;

Fais, S. Evidence-based support for the use of proton pump inhibitors in cancer therapy. *Journal of Translational Medicine*. 13: 368. 2015;

Fais, S.; Milito, A. D.; You, H.; Qin, W. Targeting Vacuolar H<sup>+</sup>- ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Research*. 67:10627- 10630. 2007;

Fais, S. Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism. *Journal of Internal medicine*. 267: 515-521. 2010;

Fiske, C. H., e Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*. 66: 375-400.1925;

Forgac, M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven próton pumps. *Physiological Reviews*. 69: 765-796. 1989;

Giammarioli, A. M, Maselli, A., Casagrande, A., Gambardella, L., Gallina, A., Spada, M., Giovannetti, A., Proietti, E., Malorni, W., e Pierdominici, M. Pyrimethamine Induces Apoptosis of Melanoma Cells via a Caspase and Cathepsin Double-Edged Mechanism. *Cancer Research*. 68: 5291–5300. 2008;

Grupo Brasileiro de Melanoma: É importante saber que. Disponível em: [www.gbm.org.br/gbm/publico/artigos](http://www.gbm.org.br/gbm/publico/artigos). Acessado em: 18 de Janeiro de 2012;

Han, G., Lu, S., Li, A.G, He, W., Corless, C.L. Kulesz-Martin, M. e Wang, X.J. Distinct mechanisms of TGF- $\beta$ 1–mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. 115: 1714–1723. 2005;

Han L., Wang W., Ding W. Zhang L. MiR-9 is involved in TGF-b1-induced lung cancer cell invasion and adhesion by targeting SOX7. *Journal of Cellular and molecular Medicine*. 1-9. 2017;

Hesselink, R.W., Fedorov, A., Hemminga, M.A., and Prieto, M. Membrane-bound peptides from V-ATPase subunit a do not interact with an indole-type inhibitor. *The Journal of Peptide Science*.14: 383–388. 2008;

Houghton, A.N., Polsky, D. Focus on melanoma. *Cancer Cell*. 2:275-278. 2002;

Humbert L., Ghozlan M., Canaff L., Tian J., Lebrun, J.J. The Leukemia inhibitory factor (LIF) and p21 mediate the TGFV tumor suppressive effects in human cutaneous melanoma. *BioMed Central*. 1-16. 2015;

Instituto Nacional do Câncer: Vigilância do câncer e fatores de risco. Instituto Nacional do Câncer- INCA. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acessado em 15 de Junho de 2016;

Instituto Nacional do Câncer: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer- INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acessado em: 09 de fevereiro de 2014;

Inman, G.J., Nicolas, F.J., Callahan, J.F., Harling, J.D., Gaster, L.M., Reith, A.D., Laping, N. J. Hill, C.S. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  superfamily type I activating receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK 5, and ALK7. *Molecular Pharmacology*. 62: 65-74. 2002;

Javelaud, D., Alexaki, V.I. Mauviel, A. Transforming growth factor- $\beta$  in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Research*. 21: 123-132. 2008;

Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgacs, M., Stevens, T. H. The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocation ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 276:47411-47420. 2001;

Kimura I., Kitahara H., Ooi K., Kato K, Noguchi N., Yoshizawa K., Nakamura H., Kawashiri S. Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cells carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition. *Oncology Letters*. 11: 201-207. 2016;

Klein, U. The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: Immunological evidence for the occurrence of a V-ATPase in insect ion-transporting epithelia. *Journal of Experimental Biology*. 172: 345-354. 1992;

Krasagakis K., Tholke D., Farthmann B., Eberie J., Mansmann U., Orfanos C.E. Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF- $\beta$ )-B1 and (TGF- $\beta$ )-B2 in patients with disseminated malignant melanoma. *British Journal of Cancer*. 9: 1492-1494. 1998;

Lamouille S. and Derynck, R. Cells size and invasion in TGF- $\beta$ - induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *Journal of Cell Biology*. 178: 437-451, 2007;

Lee M.K, Pardoux M.C, Hall. TGF  $\beta$  activates Erk MAP Kinase signaling through direct phosphorylation of ShcA. The *EMBO Journal*. 26: 3957-3967. 2007;

Lebrun, J.J. The dual role of TGF $\beta$  in human cancer: From tumor suppression to cancer metastasis. *International Scholarly Research Network*. 2012:1-28. 2012;

Liberti M. V., Locasale, J. W. The Warburg Effect: How does it benefit cancer cells?. *Trends in Biochemical Sciences*. 41: 211-2019. 2016;

Lozupone, F., Borghi, M., Marzoli, F., Azzarito, T., Matarrese, P., Lessi, E., Venturi, G., Meschini, S., Canitano, A., Bona, R., Cara, A., Fais, S. TM9SF4 is a novel V-ATPase-interacting proteing that modulates tumor pH alterations associated with drugs resistance and invasiveness of colon câncer cells. *Oncogene*. 1-12. 2015;

Lyons R.M. , Keski-Oja J. , Moses H.L. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *The Journal of Cell Biology*. 106: 1659-1665. 1988;

Margolles-Clark, E., Tenney K., Bowman, E. J., Bowman, B. J. The Structure of Vacuolar ATPase in *Neurospora crassa*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 31:29-37. 1999;

Marshansky, V., Rubinstein, J., Guber, G., Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights. *Biochemical et Biophysical Acta-Bioenergetics*. 1837: 857-879. 2014

Martin R., Haendle B., Hofer-Warbinek R., Gaugitsch H., Warnn M., Schlusener H., Seifert J.M., Bodmer S., Fontana A., and Hofer E. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T Cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-B gene family. *The EMBO Journal*. 6:3673-3678. 1987;

Martinez-Zaguilan, R., Lynch, R.M. Martinez, G.M., Gillies, R.J. Vacuolar-type(+)- ATPase are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 265: 1015-1029. 1993;

Martinez-Zaguilan, R., Seftor, E.A, Seftor, R.E, Chu, Y.W., and Hendrix, M.J. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical and Experimental Metastasis*. 176-186.1996;

Mckenzie, J. A. and Grossman D. Role of the apoptotic and mitotic regulator surviving in melanoma. *Anticancer Research*. 32: 397-404. 2012;

Miyazono, K., Jchijo, H, Heldin, C. H. Transforming growth factor-b: Latent forms, binding proteins and receptors. *Growth Factors*. 8:11-22. 1993;

Miyazono, K., Duke, P.T., Ichijo, H, Heldin, A.H. Receptors for transforming growth factor-b. *Advances in Immunology*. 55:181-220.1993;

Mohammad, K. S., Javelaud D., Fournier P.G.J., Niewolna M., McKenna R.C. Peng X.H., Doung V., Dunn L. K., Mauviel A., Guise t.A. TGF-B-RI Kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. *Cancer Research*. 1:175-184. 2011;

Moustakas A., and Heldin, P. TGF $\beta$  and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Acta*. 4: 1-14. 2014;

National Cancer Institute: Melanoma types. NCI. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/skin>. Acessado em: 09 de fevereiro de 2017;

Niikura, K. Effect of a V-ATPase inhibitor, FR202126, in syngeneic mouse model of experimental bone metastasis. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 60: 555–562. 2007;

Nishi, T. and Forgac, M. The vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 3, 94-103. 2002;

Nishisho T., Hata K., Nakanishi M., Morita Y., Sun-Wada G. H., Wada Y., Yasui N., and Yoneda T. The  $\alpha$ 3 Isoform Vacuolar Type H<sup>+</sup>-ATPase Promotes Distant Metastasis in the Mouse B16 Melanoma Cells. *Molecular Cancer Research*. 9: 845-855. 2011;

Okorokov, L. A. e Lichko, L. P. The identification of a proton pump on vacuoles of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* :ATPase is electrogenic H<sup>+</sup>-translocase. *FEBS Letters*. 155: 102-106. 1983;

Otto, M A .Warburg effect (s)- a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer & Metabolism*. 4: 5. 2016;

Pamarthy, S., Mao, L., Katara, G.K., Fleetwood, S., Kulshresta, A, Gilman-Sanchs, A., Beaman, K.D. The V-ATPase  $\alpha$ 2 isoform controls mammary gland development through notch and TGF- $\beta$  signaling. *Cell Death and Disease*. 7:1-13. 2016;

Pang Y., Gara, S.K., Achyut B.R., Li Z., Yan H. H., Day C.P. Weiss J.M., Trinchier G., Morris J.C. Yang L. TGF- $\beta$  signaling in myeloid cells is required for tumor metastasis. *Cancer Discovery*. 937-949. 2013;

Pardali K., Moustakas A. Actions of TGF- $\beta$  as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1775: 21-62, 2007;

Peng, S.B., Yan, L., Xia, X., Watkins, S.A., Brooks, H.B., Beight, D., Herron, D.K., Jones, M.L., Lampe, J.W., Mcmillen, W.T., Mort, N., Sawyer, J.S., Yingling, J.M. Kinetic characterization of novel pyrazole TGF- $\beta$  receptor I kinase inhibitors and their blockade of the epithelial-mesenchymal transition. *Biochemistry*.44: 2293-2304. 2005;

Péron P, Rahmani M., Zagar, A.M., Durand-Schneider, LardeuxB., Bernuau. Potentiation of Smad transactivation by jun proteins during a combined treatment with epidermal growth factor and transforming growth factor B in rat hepatocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase-induced AP-1 activation. *Journal of Biological Chemistry*. 276: 10524-10531. 2001;

Perrot, C.Y., Javelaud, D., Mauviel, A. Insights into the transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway in cutaneous melanoma. *Review Article, Annual Dermatology*. 25: 135-143. 2013;

Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C.H., Dijke, P.T. TGF- $\beta$  type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *Journal of cell Science*. 112: 4557-4568. 1999;

Qin, A., Cheng, T.S., Pavlos, N.J., Lin, Z., Dai, K.R., Zheng, M. H., V-ATPase in osteoclasts: Structure, function and potential inhibitors of bone resorption. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 44:1422-1435. 2012;

Quail D.F. and Joyce A.J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*. 11: 1423-1437. 2013;



Rong, L., Li, R., Li, S., Luo, R. Immunosuppression of breast cancer cells mediated by transforming growth factor- $\beta$  in exosomes from cancer cells. *Oncology Letter*. 11:500-504. 2016;

Saroussi, S., and Nelson, N. Vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase-an enzyme for all seasons. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 457: 581–587. 2009;

Sautin, Y.Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L., Gluck, S.L. Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated effects of glucose on vacuolar H<sup>(+)</sup>-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*. 25:575-589. 2005;

Schempp, C., Schwarzenberg, K.V., Schreiner, L., Kubisch, R, Muller, R., Wagner, E, Vollmar, A.M. V-ATPase inhibition regulates anoikis resistance and metastasis of cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. 4: 926-937. 2014;

Shiou, S.R., Datta, P.K., Dhawan, P., Law, B.K., Yingling, J.M., Dixon, D.A., Beauchamp, R.D. Smad4-dependent regulation of urokinase plasminogen activator secretion and RNA stability associated with invasiveness by autocrine and paracrine transforming growth factor- $\beta$ . *Journal of Biological Chemistry*. 281:33971-33981. 2006;

Sloane. B. F., Honn, K. V., Sadler, J. G., Turner, W. A., Kimpson, J. J., and Taylor, J. D. Cathepsin B activity in B16 melanoma cells: a possible marker for metastatic potential. *Cancer Research*. 42: 980-986. 1982;

Spender L., Ferguson G.J., Liu S., Cui C., Girotti, M.R., Sibbet G., Higg E.B., Shuttleworth M.K., Hamilton T., Lorigan, Weller M., Vincent D.F., Sansom O.J., Frame M., Dijke P.T., Marais R.5 and Inman D.J. Mutational activation of BRAF confers sensitivity to transforming growth factor beta inhibitors in human cancer cells. *Oncotarget*. 7:81995-81912.2016;

Stransky L., Cotter K., Forgac M. The Function of V-ATPases in Cancer. *Physiology Review*. 96: 1071-1091, 2016;

Sun L. X., Lin, Z. B., Duan X. S, Qi, H. H., Yang, N., Li M., Xing, E. Sun Yu, Yu Min, Li W, Lu J. Suppression of the production of transforming growth factor b1, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in the B16F10 cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 34: 1-9. 2014;

Tham, M., Tan K.W., Keeble Jo, Wang X., Hubert, S., Barron L., Tan, N. S.Kato, M., Prevost-Blondel A., Angeli V, Abastado. Melanoma-initiating cells exploit M2 macrophage TGF-b and arginase pathway for survival and proliferation. *Oncotarget*. 5:12027-12033. 2014;

Valderrama-Carvajal H., Cocolakis E., Lacerte A., Lee E., Krystal G., Ali S., Lebrun J.J. Activin/TGF-b induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nature Cell Biology*. 4: 963-969. 2002;

Vaupel, P.W., Kallinowski F., and Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research*. 49: 6449-6465. 1989;

Walsh L.A. and Damjanovski S. IGF-1 increases invasive potential of MCF 7 breast cancer cells and induces activation of latent TGF-B1 resulting in epithelial to mesenchymal transition. *Cell Communication Signaling*. 9: 1-11. 2011;

Wang H.X., Sharma C., Knoblich K., Granter S.R., Hemer N.E. EWI-2 negatively regulates TGF-B signaling leading to altered melanoma growth and metastasis. *Cell Research*. 1-16. 2015;

Wang, Y., Cipriano, D.J., Forgac, M. Arrangement of subunits in the proteolipid ring of the V-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*. 47: 34058-65. 2007;

Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science*. 123:309-314. 1956;

Webster, R.M., Mentzer, E.F. The malignant melanoma landscape. *Nature Reviews Drug Discovery*. 13:491-492. 2014;

World Health Organization. Cancer mortality and morbidity. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. acessado em: 05 junho de 2007;

World Health Organization. Cancer mortality and morbidity. Disponível em: [http://www.who.int/gho/ncd/mortality\\_morbidity/cancer\\_text/en/index.html](http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html). acessado em: 05 de Março de 2017;

Yu, L., Hebert, M.C. Zhang, Y.E. TGF- $\beta$  receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- $\beta$  responses. *European Molecular Biology Organization*. 21:3749-3759. 2002;

Zhao, J., Benlekbir, S., Rubinstein, J.L. Electron cryomicroscopy observation of rotation states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature*. 521:214-245. 2015;