

**CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO**  
**Curso de Biomedicina**

**Fernanda Oliveira dos Santos**

**CONTRIBUIÇÃO DA ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE NO PROCESSO  
DE MIGRAÇÃO E INVASÃO DAS CÉLULAS DE MELANOMA**

**São Paulo**  
**2022**

**Fernanda Oliveira dos Santos**

**CONTRIBUIÇÃO DA ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE NO PROCESSO  
DE MIGRAÇÃO E INVASÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo prof. Fábio Mitsuo Lima e pela prof<sup>a</sup> Fabiana Henriques Machado de Melo, como requisito parcial para obtenção do título de Biomédica.

**São Paulo**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo**

Santos, Fernanda Oliveira dos  
Contribuição da enzima sepiapterina redutase no processo de migração e invasão de células de melanoma / Fernanda Oliveira dos Santos. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.  
36 p.

Orientação de Fábio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. Enzimas 2. Melanoma 3. Metástase neoplásica 4. Migração celular  
I. Lima, Fábio Mitsuo II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 574.87

## RESUMO

A incidência do melanoma cutâneo vem crescendo nos últimos anos devido ao aumento da expectativa de vida e da maior exposição aos raios ultravioleta. O melanoma é um câncer extremamente agressivo, apresentando alta taxa de metástases e conseqüentemente grande mortalidade. O diagnóstico tardio, a carência de marcadores tumorais e a ineficiência das terapias disponíveis são os principais fatores associados à alta letalidade. A alta capacidade proliferativa das células de melanoma está associada à alteração de inúmeras moléculas, entre elas, fatores de crescimento, proteínas de sinalização e reguladores do ciclo celular. Recentemente foi descrita a ação da enzima sepiapterina redutase no desenvolvimento e proliferação de diferentes tipos de câncer, entre eles, neuroblastoma, carcinoma hepatocelular e câncer de mama. Os resultados sugerem que essa proteína contribua para o desenvolvimento dessas neoplasias e tenha valor no prognóstico dessas doenças. Dados do nosso laboratório mostraram aumento progressivo da expressão da sepiapterina redutase (*SPR*) ao longo da progressão do melanoma, sugerindo que essa enzima contribua para o desenvolvimento da doença. A alta expressão é mais significativa nas linhagens metastáticas o que pode estar associado à agressividade do melanoma. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o papel da sepiapterina redutase (*SR*) ao longo do processo de progressão do melanoma. Ao longo desse projeto foi feito o silenciamento da *SPR* e foram obtidos três clones, no entanto, apenas dois permaneceram viáveis. A redução da quantidade de *SR* induziu aumento do tempo de duplicação das células e de espécies reativas de oxigênio e, diminuição da adesão, migração, invasão e óxido nítrico. Análise de amostras de melanoma cutâneo do banco de dados TCGA (The Cancer Genome Atlas - <https://cancergenome.nih.gov/>) e do Oncomine ([www.oncomine.com](http://www.oncomine.com)) mostrou aumento da expressão da *SPR* no melanoma em relação à contraparte normal, na metástase em comparação com o tumor primário e correlação entre o aumento da expressão da *SPR* e a menor sobrevivência dos pacientes. Esses dados em conjunto indicam o papel oncogênico dessa proteína.

Palavras-chave: melanoma; sepiapterina redutase; metástase; migração; invasão.

## ABSTRACT

The incidence of cutaneous melanoma has been growing in recent years due to increased life expectancy and greater exposure to ultraviolet rays. Melanoma is an extremely aggressive cancer, with a high rate of metastases and consequently high mortality. Late diagnosis, lack of tumor markers and inefficiency of available therapies are the main factors associated with high lethality. The high proliferative capacity of melanoma cells is associated with the alteration of numerous molecules, including growth factors, signaling proteins and cell cycle regulators. Recently, the action of the enzyme sepiapterin reductase in the development and proliferation of different types of cancer was described, including neuroblastoma, hepatocellular carcinoma and breast cancer. The results suggest that this protein contributes to the development of these neoplasms and has value in the prognosis of these diseases. Data from our laboratory showed a progressive increase in sepiapterin reductase (*SPR*) expression along the progression of melanoma, suggesting that this enzyme contributes to the development of the disease. High expression is more significant in metastatic strains, which may be associated with melanoma aggressiveness. Therefore, the objective of this work was to evaluate the role of sepiapterin reductase (*SR*) throughout the melanoma progression process. Throughout this project, *SPR* was silenced and three clones were obtained, however, only two remained viable. The reduction in the amount of *SR* induced an increase in the doubling time of cells and reactive oxygen species, and a decrease in adhesion, migration, invasion and nitric oxide. Analysis of cutaneous melanoma samples from the TCGA database (The Cancer Genome Atlas - <https://cancergenome.nih.gov/>) and Oncomine ([www.oncomine.com](http://www.oncomine.com)) showed increased *SPR* expression in melanoma compared to the normal counterpart, in metastasis compared to the primary tumor, and correlation between increased *SPR* expression and lower patient survival. These data together indicate the oncogenic role of this protein.

Keywords: melanoma; sepiapterin reductase; metastasis; migration; invasion .

## Sumário

RESUMO.....	4
ABSTRACT .....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. MELANOMA .....	6
1.2. SEPIAPTERINA REDUTASE .....	9
2. OBJETIVO.....	13
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
3.1. CULTURA CELULAR .....	14
3.2. SILENCIAMENTO ESTÁVEL DO GENE DA SEPIAPTERINA REDUTASE ...	14
3.2.1. Cultura de bactérias.....	15
3.2.2. Extração de plasmídeos.....	15
3.2.3. Transfecção das células HEK293T .....	16
3.2.4. Titulação viral.....	16
3.2.5. Seleção clonal .....	17
3.3. WESTERN BLOT.....	17
3.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO .....	18
3.5. ENSAIO DE INVASÃO .....	18
3.6. AVALIAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	19
3.6.1. Quantificação de Óxido Nítrico.....	19
3.6.2. Detecção de espécies reativas de oxigênio .....	19
3.7. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR .....	20
3.8. ANÁLISES ESTÁTISTICAS .....	20
4. RESULTADOS .....	20
4.1. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS .....	20

4.2. TITULAÇÃO VIRAL .....	20
4.3. SELEÇÃO CLONAL.....	21
4.4. ANÁLISE E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA SEPIAPTERINA REDUTASE .....	22
4.5. A ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE ESTÁ ENVOLVIDA NO PROCESSO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO .....	23
4.6. A ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE ESTÁ ENVOLVIDA NO PROCESSO DE INVASÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO.....	24
4.7. A REDUÇÃO DE SEPIAPTERINA REDUTASE NA LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO CAUSA DIMINUIÇÃO DA QUANTIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO E AUMENTO DE ÂNION SUPERÓXIDO .....	25
4.8. O SILENCIAMENTO DA ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE PROVOCOU DIMINUIÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MELANOMA .....	25
4.9. O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA SEPIAPTERINA REDUTASE ESTÁ ASSOCIADO AO AUMENTO DA METASTÁSE E DA MENOR SOBREVIVÊNCIA LIVRE DA DOENÇA.....	26
5. DISCUSSÃO .....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

A incidência mundial de vários cânceres tem aumentado nas últimas décadas, tornando-se um problema de saúde pública mundial. De acordo com as estimativas mundiais do projeto Globocan 2018, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram aproximadamente 18,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 9,5 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2018 (Bray et al., 2018). Em 2020, foi estimado 19,3 milhões de novos casos de câncer e aproximadamente 10 milhões de mortes (Sung et al., 2021). A estimativa para o Brasil em 2020 aponta a ocorrência de cerca de 625 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema no país (<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>).

### 1.1.MELANOMA

No Brasil, o câncer de pele representa 30% dos casos de câncer, o que o torna o tipo de câncer mais prevalente no país, com estimativa de 8.450 novos casos em 2020, segundo estimativas do INCA. O câncer de pele contém vários subtipos, destacando-se o carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas e o melanoma (Guerra and Crane, 2021). O melanoma cutâneo é o câncer de pele que tem origem nos melanócitos, que são células produtoras de melanina. A maioria dos melanócitos está presente na camada basal da pele, mas eles podem ser encontrados na mucosa epitelial, nas meninges e nos olhos. A principal função dos melanócitos, na pele, é a produção de melanina, pigmento cujo papel é a proteção contra os raios ultravioletas (Cabrera et al., 2018). O melanoma é a minoria dos tumores malignos de pele, representando 3% dos cânceres de pele (INCA, 2021) e em casos de diagnósticos precoces, têm bom prognóstico, sendo indicada a abordagem cirúrgica, segundo o INCA. Contudo, o melanoma é o tipo de câncer de pele mais grave por alta capacidade de metástase e alta mortalidade nos casos metastáticos. Os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma são o tipo de pele, a presença de nevus displásicos e a exposição à luz ultravioleta (UV) (Strashilov and Uprdanov, 2021).



A incidência do melanoma vem aumentando nos últimos anos devido ao aumento da expectativa de vida e maior exposição à radiação UV (Rastrelli et al., 2014). Entre 2002 e 2006, o aumento da incidência foi dramático, sendo de 33% em homens e 23% em mulheres (Coit et al., 2016). No mundo, ocorreram 287.723 novos casos de melanoma que ocasionaram 60.712 mortes em 2018. No Brasil, ocorreram em 2019, 1.159 óbitos por melanoma em homens e 819 em mulheres (Atlas de Mortalidade por Câncer - SIM).

Dentre todos os tipos histológicos de melanoma, há quatro mais prevalentes: melanoma expansivo superficial (MES), melanoma lentigo maligno (MLM), melanoma nodular (MN) e melanoma acral lentiginoso (MAL) (Lipsker et al., 2007). Desses tipos, o MES é o mais comum e o MAL tem prevalência variável de acordo com a região do país (Cabrera et al., 2018).

O diagnóstico clínico do melanoma se faz através da anamnese, exame físico, e exames auxiliares, em especial da dermatoscopia para obter melhor visualização da lesão. Na suspeita de melanoma, recomenda-se biópsia excisional (se possível) e exame anatomopatológico para confirmação diagnóstica (Fernandes et al., 2005; Rigel et al., 2010). O melanoma extensivo superficial possui crescimento radial prolongado, estando confinado à epiderme ou derme superficial durante esse período. Logo, o diagnóstico nessa fase é crucial para que a intervenção seja curativa e minimamente invasiva com consequente redução da mortalidade (Maia e Basso, 2006). Durante o exame anatomopatológico, é realizado o microestadiamento com diversos parâmetros recomendados pelo Grupo Brasileiro de Melanoma e pela Sociedade Brasileira de Patologia, dos quais o índice de Breslow tem o maior impacto na predição de sobrevida, avaliando a espessura em milímetros da neoplasia. Medem-se apenas os melanomas invasores, sendo estadiados pela AJCC 2017 em quatro grupos: até 1 mm, de 1,01 a 2 mm, de 2,01 a 4 mm e acima de 4 mm (Gershenwald et al., 2018). Quanto maior for a espessura, maiores serão as chances de metástase (de Braud et al., 2003). Segundo a AJCC 2017, ainda, a ulceração é fator independente como indicador de pior desfecho. Embora o índice mitótico seja fator prognóstico

importante e necessário para o laudo anatomopatológico, não foi incluído como parâmetro utilizado no estadiamento dos melanomas nesta versão da AJCC (Gershenwald et al., 2018).

No melanoma cutâneo já foram descritas alterações genéticas e epigenéticas em inúmeros genes supressores de tumor e oncogenes, as quais levam a desregulação de vias de sinalização que controlam processos biológicos essenciais para a manutenção da homeostase celular, causando o descontrole da proliferação celular, resistência à morte celular, reprogramação metabólica, capacidade de migrar e invadir outros tecidos e uma crescente instabilidade genômica (Ciążyńska et al., 2021). Mais recentemente foi estabelecida uma classificação genômica do melanoma cutâneo em quatro tipos baseando-se nas mutações mais prevalentes e que direcionam o seu desenvolvimento (driver mutations): mutantes BRAF, mutantes RAS, mutantes NF1 e triplo selvagem (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Melanomas com BRAF não mutado, normalmente apresentam mutações oncogênicas em algum gene que está upstream na via de MAPK, entre eles NRAS, KIT, GNAQ ou GNA11 (Hodis et al., 2012; Flaherty et al., 2012). No subtipo triplo selvagem análises integrativas identificaram mutações no gene KIT e complexos rearranjos estruturais (Cancer Genome Atlas Network, 2015). A presença de mutações em V600E BRAF (presente em aproximadamente 50% dos melanomas) predizem a eficiência clínica de inibidores de RAF como o vemurafenib; mutações que levam à ativação de KIT predizem resposta a inibidores de tirosinoquinases como o imatinib, nilotinib e dasatinib, enquanto melanomas que contém mutações em NRAS podem ter sensibilidade a inibidores de MEK como trametinib e cobimetinib (Flaherty et al., 2012; Montor et al., 2018). Outras mutações que podem configurar estratégias terapêuticas são inativações do gene CDKN2A, que codifica o inibidor do ciclo celular p16INK4A; amplificações ou mutações em MITF, resultando na desregulação da apoptose e a inativação de PTEN, levando à ativação da via de PI3K/AKT (Chin et al., 2006; Flaherty et al., 2012). Uma análise mais recente do exoma de amostras de melanoma revelou cinco novos genes candidatos a genes

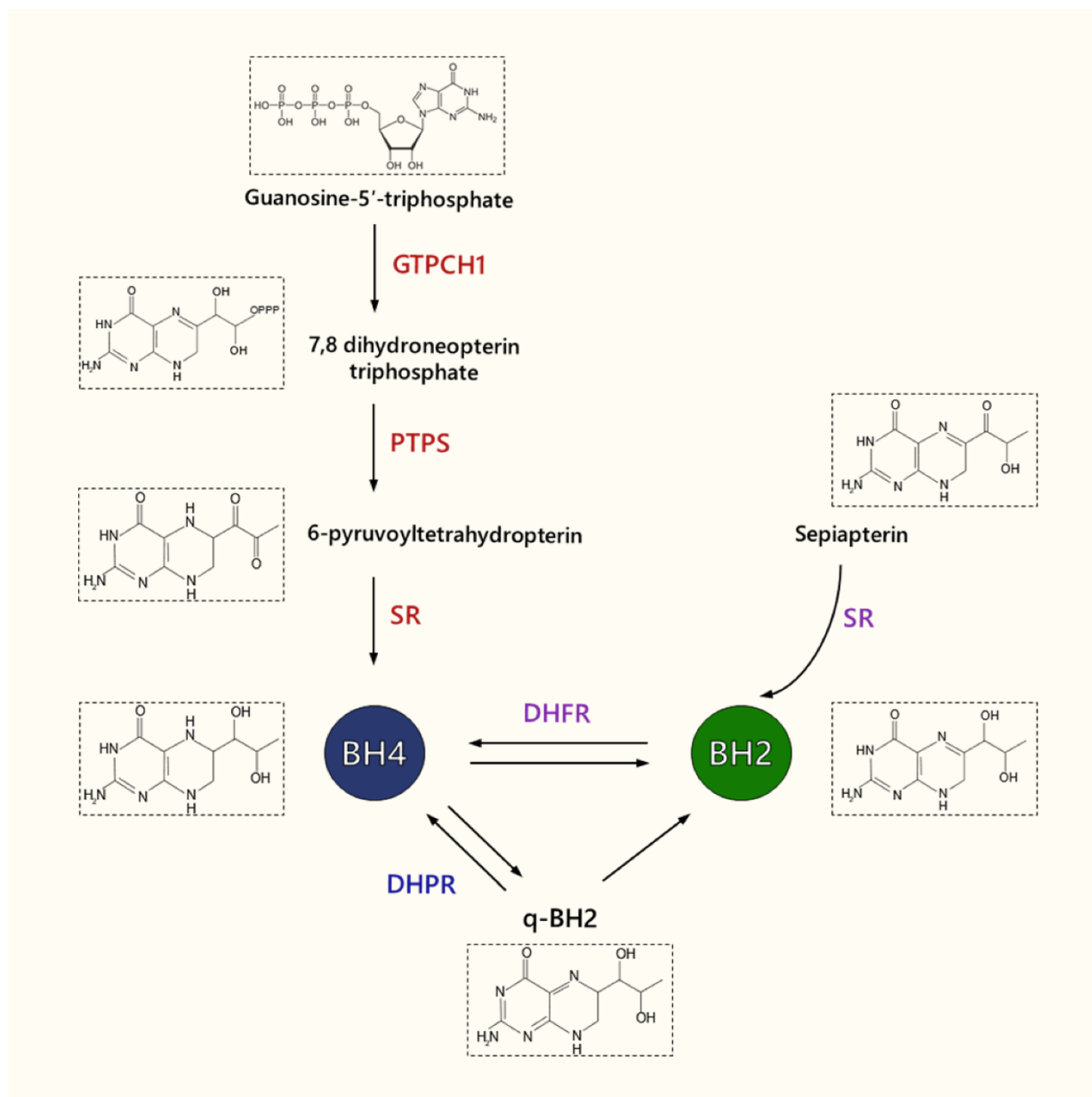
“drivers” do desenvolvimento do melanoma, sendo PPP6C (inibidor do ciclo celular e mitose), RAC1 (membro da família Rho GTPases), SNX31 (possível efetor de RAS), TACC1 (ativação de RAS e P I3K) e STK19 (sem função conhecida), sendo que RAC1, PPP6C e STK19 são alvos potenciais para terapias alvo (Hodis et al., 2012).

Apesar da terapia alvo ter revolucionado o tratamento do melanoma com o uso dos inibidores de BRAF mutado, aproximadamente 100% dos pacientes exibiram progressão da doença após sete meses do fim do tratamento devido à aquisição de resistência (Montor et al., 2018). Portanto, tanto a identificação de novos fármacos para o tratamento de neoplasias e a caracterização de moléculas relacionadas com a transformação maligna e com etapas da progressão tumoral e o seu estabelecimento como marcadores tumorais são de grande interesse e estão sob constante investigação.

## 1.2. SEPIAPTERINA REDUTASE

A sepiapterina redutase (*SPR* – gene, *SR* – proteína) é uma enzima homodimérica que catalisa, de maneira NADPH-dependente, a redução de vários grupos carbonil, pertencendo ao grupo de enzimas chamadas aldo-ceto redutases (Sueoka et al., 1982). É codificada pelo gene *SPR* localizado no cromossomo 2 em humanos e participa da síntese da tetrahydrobiopterina (BH4) tanto pela via *de novo*, onde catalisa a redução do 6-piruvil-tetrahydrobiopterina em BH4, ou na via de salvamento, reduzindo a sepiapterina formada não enzimaticamente a partir do 1-oxo-TP (Sueoka et al., 1982). Além da *SR*, fazem parte da via da síntese *de novo*, a GTP-ciclodrolase I (GTPCH-I), enzima limitante da reação, e a 6-piruvilhdrobiopterina sintase (PTPS) (Channon, 2012; Starr et al., 2013). Apesar da *SR* ser a principal enzima, na maior parte dos tecidos, com exceção do cérebro, as enzimas aldo-ceto reductase e carbonil redutase também são capazes de formar BH4 a partir do 6-piruvil-tetrahydrobiopterina. Alternativamente, a síntese da BH4 ocorre pela enzima dihidrofolato redutase (DHFR) e do cofator ácido fólico na via de salvamento a partir da BH2 (dihydrobiopterina) ou do precursor L-

sepiapterina que é primeiramente oxidado a BH2 pela SR (Figura 1) (Thöny et al., 2000; Werner et al., 2011).



**FIGURA 1. Via da biossíntese da tetrahydrobiopterina.** Pela via *de novo* (vermelho): BH4 é produzida a partir de guanosina-5'-trifosfato pelas enzimas GTP ciclodrolase 1 (GTPCH1), 6-piruvoyl-tetrahydrobiopterina sintase (PTPS) e sepiapterina redutase (SR). Pela via de salvamento (roxo): ocorre redução de

sepiapterina em BH2 pela SR e conversão de BH2 em BH4 pela dihidrofolato redutase (DHFR). Reciclagem (azul): redução do quinóide-BH2 em BH4 pela dihidropteridina redutase (DHPR).

A BH4 é cofator das enzimas fenilalanina hidrolase, metabolizando a fenilalanina em tirosina; das enzimas tirosina hidrolase e triptofano hidrolase, sendo importante na síntese de neurotransmissores como a epinefrina, L-DOPA e serotonina; e da síntese de óxido nítrico (NO), que catalisa a transformação da arginina e do oxigênio em NO e citrulina (Channon et al., 2012).

A diminuição dos níveis plasmáticos de BH4 está associada ao desenvolvimento de inúmeras patologias que envolvem alterações vasculares, entre elas: diabetes, arterioesclerose, hipercolestoremia e doenças cardiovasculares como hipertensão, hipertrofia do coração e falência cardíaca (Stanhewicz et al., 2011; Weinmann et al., 2011; Faria et al., 2012). Além disso, a diminuição de BH4 também está relacionada a fenilcetonúria, depressão, distonia responsiva à dopa, mal de Parkinson e Doença de Alzheimer (Levy et al., 2014).

Em células endoteliais, a SR é importante para manter os níveis de BH4 e NO *in vitro* e *in vivo*, já que o silenciamento da proteína causa diminuição da concentração de ambos e prejudica a vasodilatação de anéis de aorta (Gao et al., 2009). Nas células endoteliais de animais hipertensos se observou diminuição da expressão da *SPR*, o que contribuiu para a diminuição dos níveis de BH4 nesses animais (Youn et al., 2012).

Animais nulizigotos para o gene *SPR* nascem normais, mas desenvolvem nanismo no período pós-natal inicial. Esses animais também apresentam níveis reduzidos de BH4 no cérebro e fígado. Além disso, observou-se diminuição da concentração de dopamina, noraepinefrina e serotonina em áreas importantes do cérebro o que está relacionado com o prejuízo de locomoção. Os níveis séricos de fenilalanina, diferentemente do que encontrado em humanos, está aumentado nesses animais. A suplementação oral com BH4 reverteu

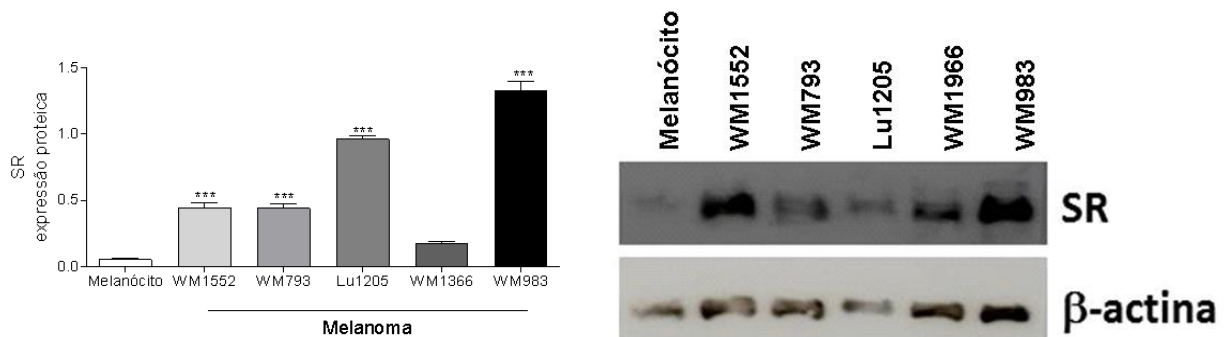
completamente o nanismo e diminui os níveis séricos de fenilalanina (Yang et al., 2006).

Já foram descritas mutações no gene da *SPR* que resultam na diminuição da atividade da enzima, causando diminuição dos níveis de BH4. Como no cérebro não foram descritas vias alternativas a SR, pacientes com deficiência de *SPR* não produzem BH4 nesse tecido, o que leva à redução da síntese de dopamina e serotonina (Thöny et al., 2006). Mutações que levam a perda de um alelo do gene *SPR* causam a distonia responsiva à dopa, enquanto pacientes com mutações que danificam os dois alelos, desenvolvem a deficiência de sepiapterina redutase que é a forma mais severa. A deficiência de *SPR* é uma patologia autossômica recessiva rara, sendo que até hoje somente 30 casos foram descritos na literatura. É caracterizada por problemas progressivos de movimento, na maioria das vezes com padrão de contrações musculares involuntárias e sustentadas conhecidas como distonia. Outros problemas de movimentos podem incluir rigidez muscular (espasticidade), tremores, problemas de coordenação e equilíbrio (ataxia) e movimentos de empurrão involuntários (corea). Pessoas com deficiência de SR podem experimentar episódios de crises oculogíricas. Esses episódios envolvem rotação anormal dos globos oculares; extrema irritabilidade e agitação; e dor, espasmos musculares e movimentos descontrolados, especialmente da cabeça e pescoço. Podem ter sinais e sintomas adicionais, apresentando microcefalia, deficiência intelectual, convulsões, sono excessivo e mudanças de humor (Blau et al., 2003; Bonafé et al., 2001; Friedman et al., 2012).

Dados mais recentes sugerem o papel da SR no desenvolvimento do neuroblastoma, câncer de mama e hepatocarcinoma por diferentes mecanismos (Mooney et al., 2019; Wu, Yao et al., 2020; Zhang, Xiaojing et al., 2020).

No modelo de melanoma humano estudado no nosso grupo de pesquisa, composto por linhagens de melanoma de crescimento radial, melanoma vertical e melanoma metastático, observamos aumento da expressão da *SPR* e da

quantidade da proteína nas linhagens de melanoma quando comparadas aos melanócitos (Figura 2). Mais interessante, a expressão foi maior ainda nas linhagens mais agressivas, sugerindo o papel da SR em etapas adquiridas durante o papel metastático como a migração e a invasão.



**FIGURA 2. A expressão da enzima sepiapterina redutase está aumentada nas linhagens de melanoma.** Por western blot com o uso de anticorpo específico anti-sepiapterina redutase foi avaliado a expressão da proteína SR nas linhagens de melanoma humano, respectivamente. Wm1552 – crescimento radial; Wm793 e Wm1366 – crescimento vertical; Lu1205, Wm983 – metastático. Os valores estão representados em gráficos de barras e expresso como médias  $\pm$  desvio padrão. Os experimentos foram realizados em triplicata e o teste estatístico realizado foi o ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . O western blot é representativo de três experimentos realizados.

## 2. OBJETIVO

Avaliar a contribuição da enzima sepiapterina redutase na migração e invasão de células de melanoma metastático.

### 2.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Silenciamento estável do gene *SPR* na linhagem de melanoma metastático Wm983;

- Investigar a migração individual da linhagem de melanoma metastático Wm983 silenciada em comparação com as células controle (selvagem e scramble);
- Investigar a invasão em matrigel da linhagem de melanoma metastático Wm983 silenciada em comparação com as células controle (selvagem e scramble).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1.CULTURA CELULAR**

A linhagem de melanoma metastático humana Wm 983 gentilmente cedida pelo Dr. Meenhard Herlyn pesquisador do Instituto Wistar foi cultivada em meio TU [20% de meio Leibovitz (Gibco) + 80% de meio MCDB 153 (SigmaAldrich)] suplementado com 2% de soro fetal bovino e 1.68mM de CaCl<sub>2</sub>. O perfil dessa célula está no site: <https://wistar.org/our-scientists/meenhardherlyn>. Essa linhagem foi isolada de uma lesão definida por critérios clínicos e histológicos e já foi previamente descrita (Garman et al., 2017).

#### **3.2.SILENCIAMENTO ESTÁVEL DO GENE DA SEPIAPTERINA REDUTASE**

O silenciamento do RNAm do gene da sepiapterina redutase foi realizado utilizando-se MISSION shRNA Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich). Foram adquiridas partículas lentivirais que representam cinco sequências distintas já validadas do gene *SPR* humano. Este procedimento foi realizado em laboratório com nível de segurança adequado para o manuseio de lentivírus (NBII) em colaboração com a Dra. Sofia Nascimento dos Santos do IPEN. A linhagem Wm983 também foi transduzida com partículas lentivirais contendo o vetor sem alvo gênico (TRC) (scramble). Ao final do processo de seleção na presença do antibiótico puromicina, a supressão da expressão do RNAm e da proteína foram avaliadas por Western Blot. Esta metodologia não gerou Organismos Geneticamente Modificados (OGMs), tendo em vista que o RNA de interferência não foi produzido ou amplificado.



### 3.2.1.Cultura de bactérias

A bactérias utilizada para a realização da extração dos plasmídeos para a realização do silenciamento estável da linhagem Wm983 foi a *Escherichia coli* cultivadas em meio LB Broth e ampicilina na concentração de 100µg/µL mantidas por 24h em estufa com atmosfera umidificada a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> e em agitação de 180 rpm.

### 3.2.2.Extração de plasmídeos

Os plasmídeos pMDG2 e pPAX2 (ambos com a informação genética para o empacotamento lentiviral), TRC1 (scramble), sh84 (sequência que tem como alvo o RNAm da sepiapterina redutase) e sh86 (sequência que tem como alvo o RNAm da sepiapterina redutase) foram extraídos a partir das bactérias cultivadas utilizando o Kit Promega - PureYield™ Plasmid Miniprep System.. Primeiro as bactérias em meio de cultura foram submetidas a centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspenso em 600µL de água. O conteúdo foi então transferido para um Eppendorf e foi adicionado 100µL de tampão de lise, em seguida o Eppendorf foi invertido 6 vezes para homogeneizar o conteúdo. Após isso, foi adicionado 350µL de tampão de neutralização e o Eppendorf voltou a ser invertido até que a solução fosse completamente homogeneizada. Feito isso, a solução foi centrifugada por 3 minutos em 15.000rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo uma coluna (constituída de uma resina na qual o DNA se liga) e para que passasse pela coluna, o complexo (tubo, coluna e sobrenadante) foi submetido a centrifugação por 15 segundos em 15.000rpm. O líquido resultante foi descartado e foram adicionados 200µL de solução de lavagem para retirada de contaminantes como RNA, proteínas e endotoxina da coluna e uma nova centrifugação de 15 segundos na velocidade máxima foi realizada. O líquido foi novamente descartado e foram colocados 400µL de solução de lavagem na coluna e uma nova centrifugação foi realizada, agora de 30 segundos em velocidade máxima. O líquido e o tubo foram descartados, a coluna foi colocada

em um Eppendorf e foram adicionados 30µL de solução de eluição na coluna, a qual agiu por 1 minuto. Após isso, uma nova centrifugação de 15 segundos a velocidade máxima foi realizada para eluir o plasmídeo da coluna.

### **3.2.3. Transfecção das células HEK293T**

As células da linhagem HEK293T foram utilizadas para a produção das partículas virais. Foram cultivadas em meio DMEM (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) High Glucose suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB – Invitrogen), 100µL/mL de antibiótico-antimicótico, 100 µM de piruvato de sódio e 100 µM de glutamina em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. No dia da transfecção as células estavam em uma confluência de 65%, seu meio de cultivo foi substituído por meio OPTI-MEM (Gibco) e nele foram adicionados 10µg do vetor de interesse (sh84 ou scramble), 7,5µg de pPAX2, 2,5µg de pPMD2G e 250µL de lipofectamina (reagente de transfecção utilizado para aumentar a eficiência da transfecção). As células foram incubadas por 6 horas em estufa com atmosfera umidificada a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub> e ao final desse período o meio de transfecção foi trocado por 10mL de meio de cultivo das células HEK293T. Após 48 horas de transfecção, o sobrenadante das células foi coletado, armazenado em um tubo falcon e estocado a -80°C. Foram adicionados mais 10mL de meio de cultura às células e após 72 horas da transfecção uma nova coleta do sobrenadante viral foi feita e colocado no mesmo tubo anterior. O sobrenadante foi filtrado em filtro de 0.22µm para retirada de possíveis debris celulares e por fim foi adicionado polibreno (polímero catiônico utilizado para aumentar a eficiência da infecção viral) ao sobrenadante viral da concentração de 8µg/mL.

### **3.2.4. Titulação viral**

Em uma placa de 6 poços foram semeadas  $1 \times 10^4$  células da linhagem Wm983 e após 48 horas foi realizada a infecção viral com, em média, 45% de confluência em cada poço, sendo que foi realizada da seguinte maneira: em cada poço foram adicionados 4mL de meio de cultivo das células e polibreno na

concentração de 8µg/mL. Após isso, em cada poço foi adicionada determinada quantidade de sobrenadante viral (50µL, 100µL, 200µL e 500µL), além de ter dois poços controles (um com antibiótico de seleção – puromicina (Gibco) na concentração de 200µg/mL e outro sem) e as células foram incubadas por 16 horas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após as 16 horas o meio com o vírus foi substituído por meio contendo puromicina na concentração de 200µg/mL. O meio com antibiótico foi trocado a cada dois dias até que todas as células do poço controle com antibiótico morressem. Após isso, as células do poço controle e dos poços infectados com o vírus foram contadas para o cálculo da multiplicidade de infecção (MOI).

### **3.2.5. Seleção clonal**

Para o estabelecimento de linhagens clonais, as células infectadas foram cultivadas em placas de 96 poços contendo 1 ou meia célula por poço. Foram plaqueadas duas placas de 96 poços para aumentar as chances de estabelecimentos de clones. Após atingir a confluência de 90%, as células foram desaderidas e passadas para uma placa de 24 poços, em seguida para uma placa de 6 poços e finalmente para uma placa de 10 cm quando parte das células foram congeladas e a outra parte expandida para a extração de proteína.

### **3.3. WESTERN BLOT**

Para realização dos extratos proteicos das células Wm983, silenciadas para o gene *SPR* e scramble foram desaderidas da placa de cultura usando solução de tripsina 0.25%, centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e, então, duplamente lavadas com PBS 1x. Cada amostra celular foi ressuspensa em 300 µl de tampão de lise – Pierce™ IP Lysis Buffer (25 mM de Tris HCL [pH 7,4]; 150mM de NaCl; 1% de NP40 10%; 1mM EDTA; 5% glicerol) com adição de inibidores de protease (1 µL/mL) e fosfatase (10 µL/mL). As amostras foram, então, centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C. A quantidade da proteína SR na linhagem humana foi avaliada por western blotting com o uso de anticorpos específicos.

Resumidamente, os extratos protéicos foram quantificados através do método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye, Bio- Rad). Quantidades iguais de proteína de cada amostra foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e, em seguida, transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida a membrana foi bloqueada, incubada com o anticorpo anti-sepiapteria redutase (GeneTex [N2C3]) e posteriormente com o anticorpo anti-rabbit (RayBiotech [ABCB5]) conjugado à peroxidase. As membranas foram reveladas com o uso de reagente de detecção de quimioluminescência (SuperSignal® West Pico Chemoluminescent Substrate, Thermo Scientific) e as bandas foram analisadas e quantificadas pelo programa Image J.

### **3.4. ENSAIO DE MIGRAÇÃO**

Para avaliar a migração individual foram utilizadas câmaras de Boyden modificadas Transwell® com membranas de policarbonato contendo poros de 8 µm de diâmetro (Costar). A membrana foi sensibilizada com meio contendo 10% de SFB por 2 horas e em seguida incubada por 1 hora com BSA 1% em PBS. Posteriormente,  $1 \times 10^5$  células foram adicionadas no compartimento superior e no compartimento inferior foi colocado o agente quimiotático, ou seja, 10% de SFB. Após 24 horas, as membranas foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 3,7%, coradas com azul de toluidina 1% em borax 1% e lavadas com água. A parte superior foi limpa com cotonetes para retirada das células que não migraram. Para quantificação das células que migraram, o corante foi solubilizado em SDS 1% e em seguida a absorbância a 620 nm foi avaliada.

### **3.5. ENSAIO DE INVASÃO**

Para a realização do ensaio de invasão, foram utilizadas câmaras de Boyden modificadas Transwell® (Costar) com membranas de policarbonato contendo poros de 8 µm de diâmetro. Cada membrana foi recoberta com 80 µL de matrigel (E1270-5ML - SIGMA). O matrigel foi polimerizado em estufa a 37°C por 30 minutos e o inserto adsorvido com colágeno permaneceu em repouso no fluxo laminar até a evaporação de todo o líquido. No compartimento superior foi

adicionado  $1 \times 10^5$  células/250 $\mu$ L/inserto já previamente incubadas por 20 min em meio de cultivo contendo 2% de SFB. No compartimento inferior foram adicionados 300  $\mu$ L de meio TU contendo 10% de SFB. A placa foi então incubada em estufa 37° C sob tensão de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. As células que permaneceram no compartimento superior da membrana foram removidas com auxílio de um cotonete. As células que invadiram em direção ao compartimento inferior foram fixadas em metanol 100% gelado por 30 minutos e coradas por 15 minutos com corante azul de toluidina 1%. As membranas foram então lavadas em PBS para remoção do excesso de corante. Para quantificação do ensaio, o corante foi solubilizado em SDS 1% e em seguida a absorbância a 620 nm foi avaliada.

### **3.6. AVALIAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

#### **3.6.1. Quantificação de Óxido Nítrico**

Para a detecção e quantificação de óxido nítrico (NO), foi utilizada a sonda fluorescente diaminofluoresceína-2-171 diacetato (DAF-2DA) (Invitrogen). As células foram plaqueadas em placa de 96 poços em meio TU contendo 2% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em condições de cultura (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>). Após 48 horas, os níveis intracelulares de NO foram avaliados por fluorimetria (comprimento de excitação 485 nm; comprimento de emissão 538 nm) (MELO et al., 2011).

#### **3.6.2. Detecção de espécies reativas de oxigênio**

Os níveis de ânion superóxido foram avaliados por fluorimetria usando-se o DHE, um indicador de fluorescência (Molecular Probes) conforme protocolos estabelecidos (MELO et al., 2011). As células foram plaqueadas em placa de 96 poços até aderirem ao substrato em meio TU contendo 2% de soro fetal bovino (SFB), mantidas em estufa (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>). Após adesão, foram adicionados 70 $\mu$ L do reagente DHE (Invitrogen) em uma concentração de 25 $\mu$ M diluído em meio OPTI-MEN e incubados por 40 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Sua

fluorescência foi avaliada através do equipamento espectrofotômetro com comprimento de excitação 488nm e comprimento de emissão 620nm.

### **3.7. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR**

A taxa de viabilidade foi estimada por ensaio colorimétrico utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico (MTT) (Sigma). As células WM983, silenciadas para o gene *SPR* e scramble foram cultivadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^2$  células por poço) e após 72 horas a viabilidade celular foi avaliada. Após as 72 horas, foram acrescentados ao meio de cultivo 20  $\mu$ L de MTT 5 mg/mL, a placas foi mantida em estufa (37°C e 5% de CO<sub>2</sub>) por 1 hora. Posteriormente, o meio com MTT foi retirado dos poços através da inversão da placa e foram adicionados 100  $\mu$ L de dimetilsufóxido (DMSO) em todos os poços. Após homogeneização, a absorbância foi medida com auxílio de espectrofotômetro a 620 nm.

### **3.8. ANÁLISES ESTÁTISTICAS**

Os parâmetros avaliados nos experimentos biológicos in vitro foram comparados por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni quando foram mais de dois grupos e foi considerada significativa para  $p < 0.05$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. EXTRAÇÃO DE PLASMÍDEOS**

Os plasmídeos extraídos foram quantificados utilizando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) sendo que o pPAX2 teve um rendimento de 177,6 ng/ $\mu$ L, o pMD2G foi de 128,8 ng/ $\mu$ L, o TRC1 de 103,7ng/ $\mu$ L, o sh84 foi de 266,6 ng/ $\mu$ L e o sh86 foi de 131,4 ng/ $\mu$ L.

### **4.2. TITULAÇÃO VIRAL**

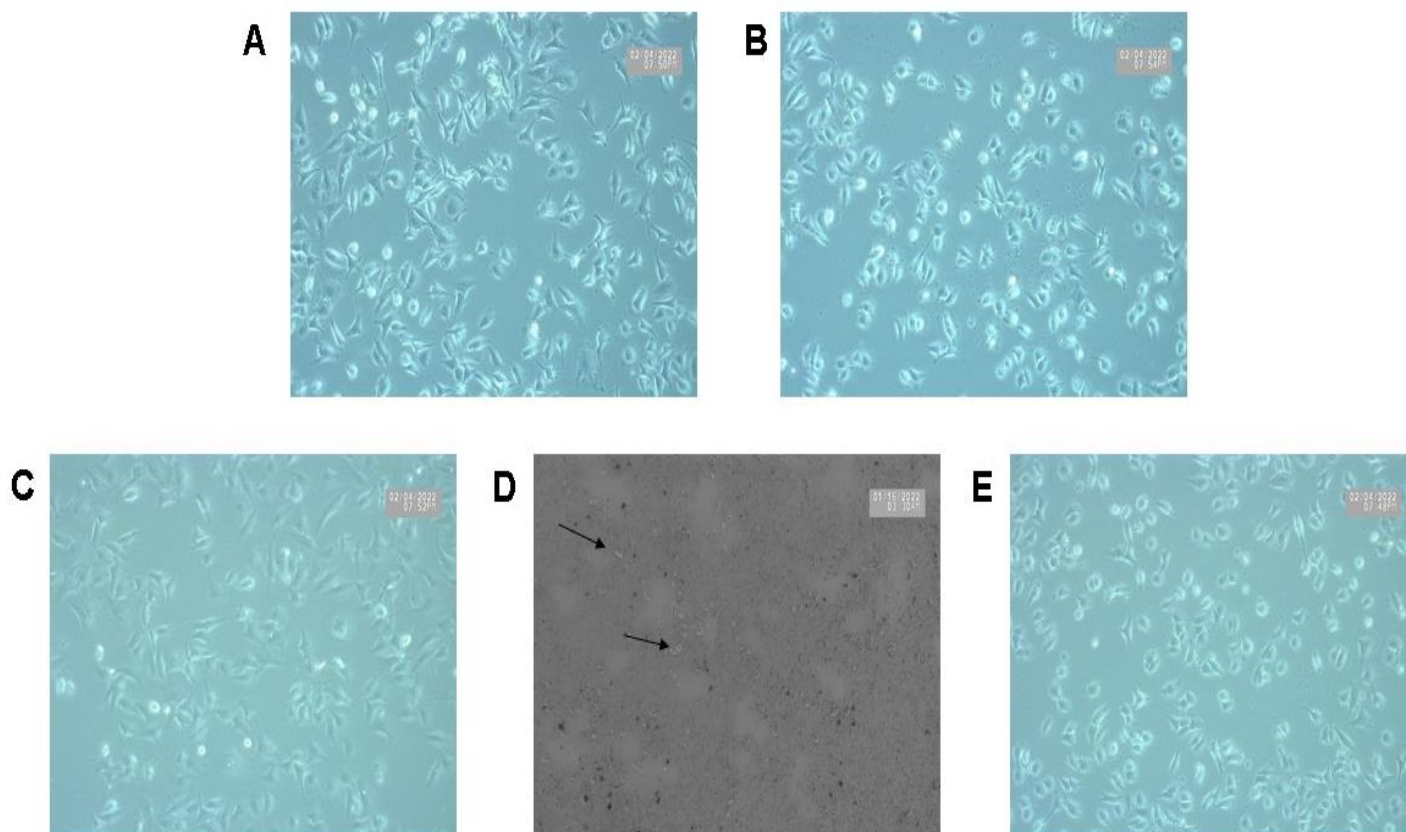
Todas as células infectadas tiveram o MOI calculado e todos foram superiores a 90%.

### 4.3. SELEÇÃO CLONAL

Como as diferentes quantidades de sobrenadante obtiveram um MOI superior a 50%, a escolha das células para realizar a seleção clonal foram as que receberam 500 $\mu$ L de sobrenadante viral. As células que tiveram o gene da *SPR* silenciado deram origem a 14 clones, os quais estavam na placa de 96 poços e posteriormente foram passados para uma placa de 24 poços. Dos 14 clones, apenas quatro sobreviveram e foram passados para a placa de 6 poços. Desses quatro, apenas três sobreviveram e foram colocados em uma placa de 10 centímetros, os quais foram denominados de Wm983SR1, Wm983SR2 e Wm983SR3. Os três clones apresentaram diferença na morfologia quando comparados com a célula parental Wm983 (Figura 3A). As células infectadas com o scramble formaram 52 clones na placa de 96 poços, dentre esses, 24 foram escolhidos aleatoriamente e transferidos para uma placa de 24 poços, dos quais 12 foram para uma placa de 12 poços, em seguidas 6 clones foram selecionadas para a placa de 6 poços e por fim, 3 clones foram colocadas em uma placa de 10 centímetros e foram chamados de Wm983SCR3 (Figura 3B), Wm983SCR5 e Wm983SCR6.

As células Wm983SR1 e Wm983SR3 mantiveram um crescimento constante, no entanto, foi observado em cultura, maior tempo de duplicação quando comparadas com a célula parental, dessa forma é possível deduzir que de alguma forma o gene da *SPR* está realmente envolvido no processo de proliferação celular dessa linhagem. Importante ressaltar que a célula Wm983SR1 duplica mais lentamente que a célula Wm983SR3. Com relação a Wm983SR2 (Figura 3D) houve uma instabilidade em sua proliferação. Após a passagem para a placa de cultura, houve um momento em que ficaram em um estágio estacionário e com o passar dos dias em cultura, voltaram a proliferar, mas mais lentamente em comparação com as outras células silenciadas e também com a parental, após esse período voltaram para um estágio estacionário e morreram sem que houvesse tempo para o congelamento dessa célula, bem como a realização da extração de proteínas. Quanto a morfologia, a

Wm983SR1 (Figura 3C) apresentou morfologia mais fusiforme, enquanto a Wm983SR3 (Figura 3E) passou a ser mais heterogenea, algumas fusiformes e outras mais arredondadas, ambas com menos prolongamentos em relação a Wm983, célula parental.

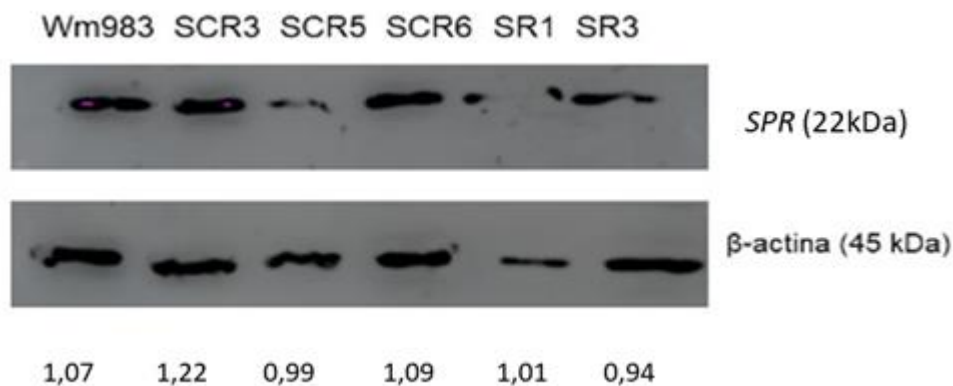


**FIGURA 3. O silenciamento do gene da sepiapterina redutase alterou a morfologia da linhagem de melanoma metastático. (A) Wm983 – linhagem parental. (B) Wm983SCR3. (C) WM983SR1, (D) WM983SR2 e (E) Wm983SR3.**

#### 4.4. ANÁLISE E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA SEPIAPTERINA REDUTASE

A análise da SR pelo western blot confirmou o silenciamento de *SPR* (Figura 4) nos clones Wm983SR1 e SR3. Em relação as células scramble, observamos que somente as linhagens Wm983SCR3 e Wm983SCR6 mantiveram a expressão de SR.

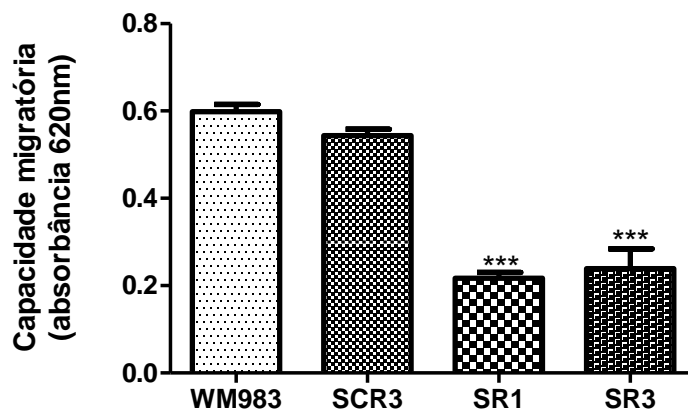




**FIGURA 4. A quantidade de sepiapterina redutase está reduzida nas linhagens silenciadas.** A quantidade de proteína foi avaliada por western blot com o uso do anticorpo específico anti-sepiapterina redutase na linhagem de melanoma metastático Wm983, linhagens silenciadas para o gene da sepiapterina redutase (Wm983SR1 e SR3) e linhagens scramble (Wm983SCR3, SCR5 e SCR6). O controle interno utilizado foi a  $\beta$ -actina.

#### 4.5.A ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE ESTÁ ENVOLVIDA NO PROCESSO DE MIGRAÇÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO

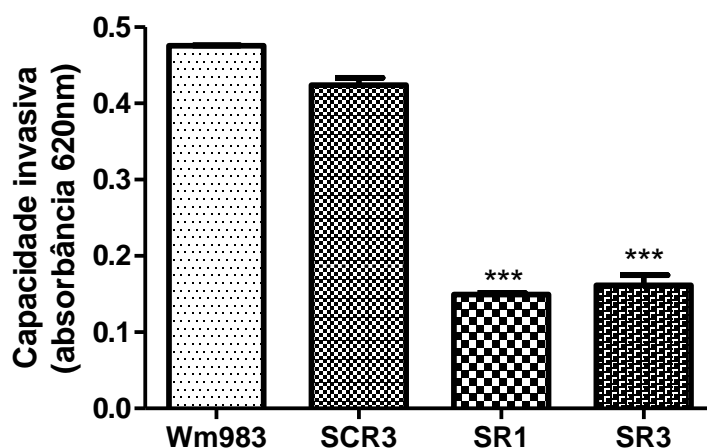
Após 24h de incubação, foi observado que o silenciamento da *SPR* reduziu a capacidade migratória das células de melanoma metastático Wm983 (Figura 5). Esse ensaio foi realizado duas vezes em duplicata técnica.



**FIGURA 5. O silenciamento do gene da sepiapterina redutase reduziu a capacidade migratória das células de melanoma metastático Wm983.** As células parentais (Wm983), scramble (SCR3) e silenciadas para o gene da *SPR* (SR1 e SR3) foram estimuladas a migrar por 24h com 10% de soro fetal bovino. A quantificação das células que migraram para o compartimento inferior foi realizada por solubilização do azul de toluidina em borax 1% utilizado para corar a membrana do transwell. O experimento foi realizado três vezes em duplicata técnica. Os dados foram obtidos a partir do teste estatístico ANOVA de uma via seguida do pós teste de Bonferroni, \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.6.A ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE ESTÁ ENVOLVIDA NO PROCESSO DE INVASÃO DE CÉLULAS DE MELANOMA METASTÁTICO

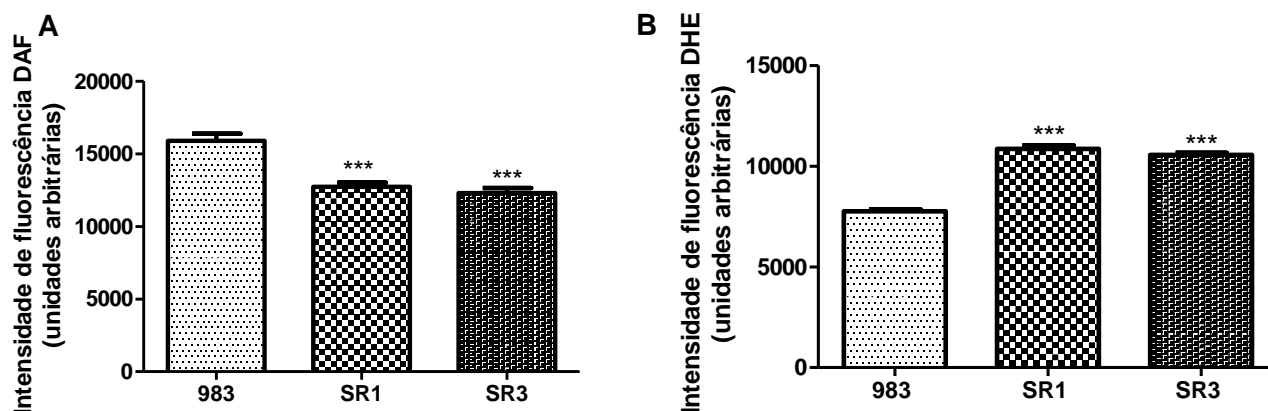
Após 24h, foi observado que o silenciamento da *SPR* reduziu a capacidade invasiva das células de melanoma metastático Wm983 (Figura 6). Esse ensaio foi realizado uma vez em duplicata técnica.



**FIGURA 6. O silenciamento do gene da sepiapterina redutase reduziu a capacidade invasiva das células de melanoma metastático Wm983.** As células parentais (Wm983), scramble (SCR3) e silenciadas para o gene da *SPR* (SR1 e SR3) foram estimuladas a invadir por 24h com 10% de soro fetal bovino. A quantificação das células que invadiram o compartimento inferior foi realizada por solubilização do azul de toluidina em borax 1% utilizado para corar a membrana do transwell. O experimento foi realizado três vezes em duplicata técnica. Os dados foram obtidos a partir do teste estatístico ANOVA de uma via seguida do pós teste de Bonferroni, \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.7.A REDUÇÃO DE SEPIAPTERINA REDUTASE NA LINHAGEM DE MELANOMA METASTÁTICO CAUSA DIMINUIÇÃO DA QUANTIDADE DE ÓXIDO NÍTRICO E AUMENTO DE ÂNION SUPERÓXIDO

Como já sabido, a SR faz parte da via *de novo* e de salvamento da síntese da BH4, a qual é cofator da sintase de óxido nítrico. A diminuição de BH4 leva à disfunção da enzima, a qual passa a produzir ânion superóxido e reduz a síntese de NO. Dado isso, após silenciamento de *SPR* a quantidade de NO foi avaliada e como esperado os níveis de NO diminuíram em comparação a célula parental (Figura 7A). Em contraste, o nível de EROs intracelular basal foi aumentado após silenciamento de *SPR*. (Figura 7B).

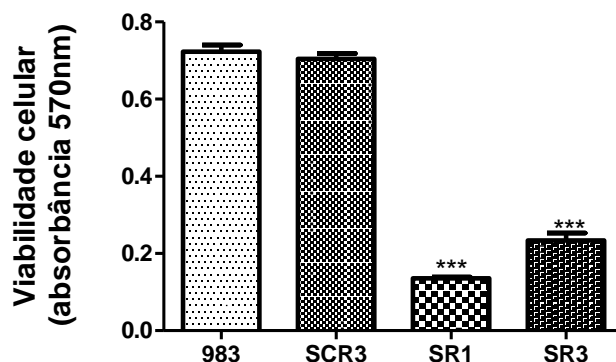


**FIGURA 7. A redução da expressão de sepiapterina redutase diminuiu os níveis de óxido nítrico e aumentou de ânion superóxido.** Após identificação e quantificação de NO foi observada diminuição da concentração intracelular nas células silenciadas em relação a célula parental (A). Detecção do aumento na produção de ânion superóxido intracelular nas células silenciadas basal (B). Os dados foram obtidos a partir do teste estatístico ANOVA de uma via seguida do pós teste de Bonferroni, \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.8.O SILENCIAMENTO DA ENZIMA SEPIAPTERINA REDUTASE PROVOCOU DIMINUIÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MELANOMA

Como foi observado diminuição da produção de NO e aumento da produção de EROs, foi avaliado se a mudança na homeostase redox das células silenciadas causou alguma alteração na viabilidade celular. Após o silenciamento,

foi visto redução na viabilidade da SR1 e SR3 após 72 horas de plaqueamento (Figura 8).

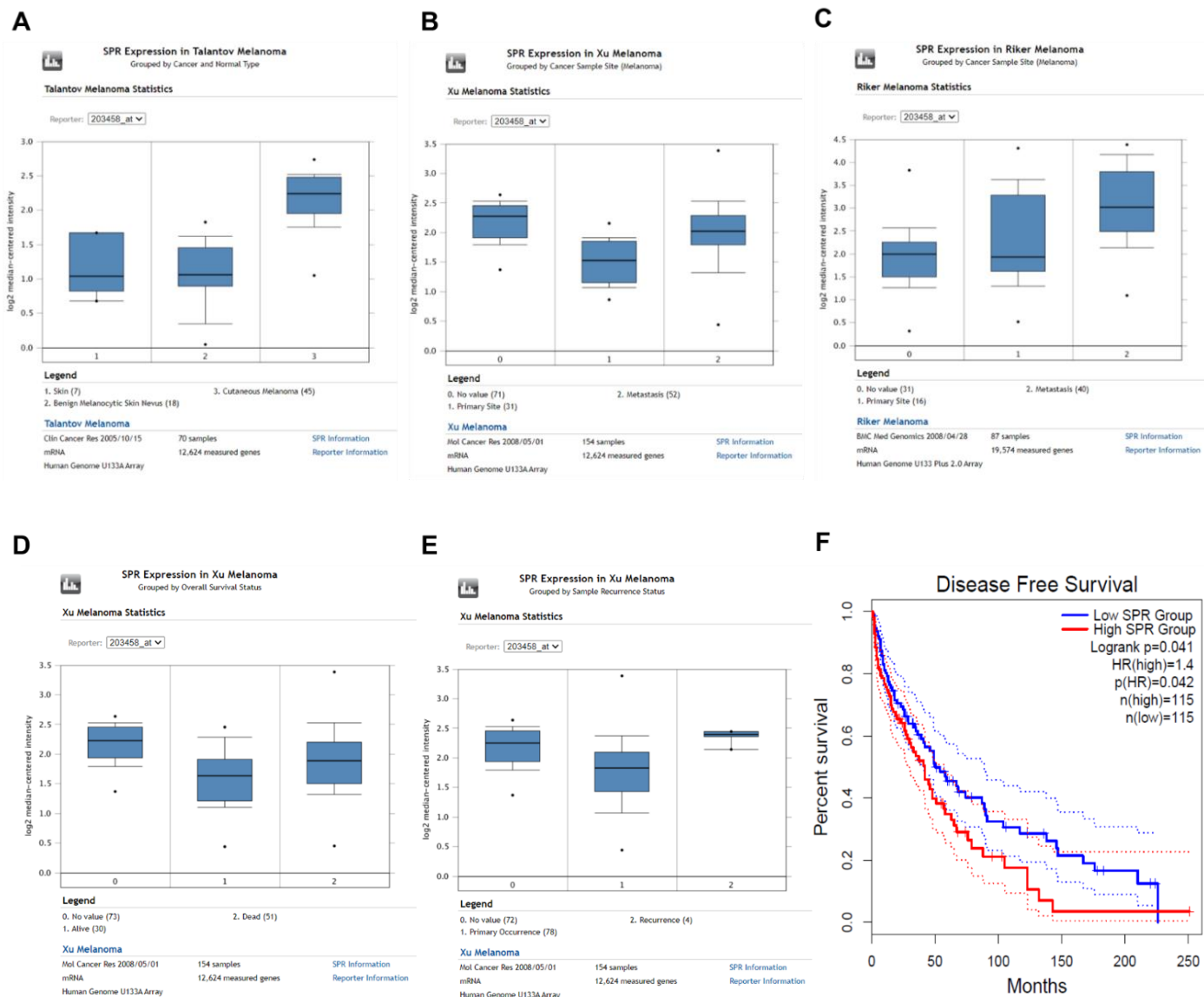


**Figura 8. O silenciamento da sepiapterina redutase diminuiu a viabilidade da linhagem de melanoma metastático.** As células foram mantidas por 72 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e foi feita a avaliação da viabilidade celular com o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Os valores estão representados em gráficos de barras e expressos como médias ± desvio padrão. O experimento foi realizado uma vez e o teste estatístico realizado foi o ANOVA de duas vias seguidas do pós-teste de Bonferroni, \*\*\*p<0,0001.

#### 4.9.O AUMENTO DA EXPRESSÃO DA SEPIAPTERINA REDUTASE ESTÁ ASSOCIADO AO AUMENTO DA METASTÁSE E DA MENOR SOBREVIVÊNCIA LIVRE DA DOENÇA

Análises do microarray do estudo de Talantov com 70 amostras a partir do Oncomine ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org)) mostraram aumento da expressão da *SPR* no melanoma em relação ao nevus benigno (Figura 9A). Nas análises do trabalho de Xu com 154 amostras (Figura 9B) e de Riker com 87 amostras (Figura 9C) observou-se maior expressão de *SPR* no melanoma metastático em relação ao sítio primário. No estudo de Xu também foi visto que os melanomas dos pacientes que vieram a óbito têm aumento da expressão de *SPR* em relação aos vivos (Figura 9D) e também nos melanomas com recidiva em comparação aos primários (Figura 9E). Análises do GEPIA que usa o TCGA como banco de dados revelaram que a sobrevivência livre de doença é menor nos pacientes com maior

expressão de SPR (Figura 9F), sugerindo que a *SPR* se comporte como um oncogene. Todos os dados foram significativamente estatísticos.



**FIGURA 9. A maior expressão de sepiapterina redutase está associada à progressão tumoral.** Dados de microarray do estudo de Talantov obtidas do Oncomine com 70 amostras (A), do estudo de Xu com 154 amostras (B, D, E) e de Riken com 87 amostras (C). Dados do GEPIA obtidos do TCGA com 230 amostras. As caixas representam o intervalo interquartil (percentil 25th-75th).

## 5. DISCUSSÃO

O espectro fenotípico da deficiência de *SPR*, que varia de déficits motores e cognitivos significativos a apenas achados mínimos tem sido estudado há anos e já é bem conhecido, apesar de não estar totalmente elucidado. As características clínicas na maioria dos indivíduos afetados incluem atraso motor e de fala, hipotonia axial, distonia, fraqueza, crises oculogíricas e sinais parkinsonianos (tremor, bradicinesia, face mascarada, rigidez). Com a diminuição da atividade da SR, que participa tanto da via *de novo*, como da via de salvamento da síntese de BH<sub>4</sub>, causa redução da concentração do cofator e, conseqüentemente da atividade das enzimas que ele modula. Esses sintomas estão associados à disfunção das enzimas tirosina e triptofano hidroxilase, sendo essencial na síntese de dopamina e serotonina, respectivamente (Friedman et al., 2015).

Trabalhos mais recentes mostraram que o aumento da expressão e/ou atividade da SR contribui para o desenvolvimento de diferentes cânceres, no entanto, os dados ainda não são conclusivos (Lange et al., 2014; Wu et al., 2020).

Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram aumento da expressão da *SPR* e da quantidade de proteína ao longo da progressão do melanoma, sendo mais expressivo nas linhagens mais agressivas (Figura 2). Análises do banco de dados do TCGA mostraram que o aumento da expressão da *SPR* está correlacionado com a maior ocorrência de metástase, recidiva e pior prognóstico (Figura 9), sugerindo a contribuição da enzima no processo de progressão do melanoma. A inibição farmacológica da SR com sulfazalazina (SSZ) e SP*R*i3 inibiu a proliferação e reduziu a capacidade clonogênica das células de melanoma de crescimento radial, vertical e metastático, indicando a importância da enzima no desenvolvimento do melanoma. Também foi observado diminuição da migração coletiva das células de melanoma de crescimento vertical na presença de SSZ, indicando o papel da enzima nesse processo. Como a linhagem metastática tem a maior expressão de *SPR*, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar a contribuição da enzima sepiapterina redutase nas capacidades migratória e invasiva dessas células, processos essenciais no

processo metastático. Inicialmente foi realizado o silenciamento do gene da *SPR* e foram obtidos somente três clones, isso porque observamos que as células apresentaram maior dificuldade de adesão e maior tempo de duplicação. Enquanto as linhagens Wm983 e Wm983SCR3 demoram em média 12 horas para aderir à placa, as linhagens WM983SR1 e WM983SR3 levam de 72 a 96 horas, sugerindo alteração na dinâmica de formação/turnover de contatos focais e placas de adesão, o que está relacionado ao processo de migração e invasão. Essa característica das células silenciadas também está relacionada à alteração da morfologia, visto elas que passaram de poligonal à mais alongadas ou arredondadas, ou seja, menos espalhadas após a redução da expressão de *SPR*. Esses aspectos estão relacionados porque o citoesqueleto de actina fornece as forças mecânicas que impulsionam as mudanças na forma da célula e a migração celular (Svitkina et al., 2018). Após o silenciamento também foi observado redução de NO e aumento dos níveis de EROs – dados que vão ao encontro com uma das funções da SR, que é fazer parte das vias de biossíntese de BH4. Alteração da homeostase redox após a redução de SR já foi observado em células endoteliais e de carcinoma de mama (Gao et al., 2009; Chang et al., 2020). A pré-incubação com L-sepiapterina (10  $\mu$ M por 30 min) falhou em melhorar a biodisponibilidade de NO em aortas hipertensas enquanto aumentava a produção de NO nos vasos controle, implicando deficiência associada à hipertensão da SR, enzima limitante para conversão de sepiapterina em BH4. De fato, a expressão diminuída de SR foi observada em células endoteliais aórticas, mas não na aorta desprovida de endotélio, implicando a redução de SR específica do endotélio. A administração de aortas hipertensivas 10  $\mu$ M de BH4 restaurou parcialmente a produção vascular de NO (Youn et al., 2012), mostrando a importância da enzima na síntese de BH4 e consequentemente da função da eNOS e do endotélio. Já foi demonstrado que o aumento de EROs pode induzir ou inibir o processo de migração de células de melanoma (Díaz-Valdivia et al., 2020; Zarei et al., 2022), o que está relacionado a sua quantidade e quais proteínas de vias de sinalização são alteradas. A redução de SR causou diminuição da capacidade migratória (Figura 5) e invasiva (Figura 6) da linhagem

metastática Wm983, sugerindo seu papel no processo de progressão do melanoma. Mais estudos são necessários para avaliar se a modificação do estado redox da célula está associado à inibição da migração. No câncer de mama, foi mostrado que o silenciamento do gene *SPR* promoveu a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, o que ativa a via apoptótica mitocondrial (Zhang et al., 2020). Foi mostrado também que é o aumento de EROs via mitocôndria que está associado ao processo de apoptose dessas células. Esses resultados são muito interessantes, pois os dados da literatura mostram o papel da SR na proliferação e apoptose e não nas características de células tumorais mais agressivas. Além disso, os mecanismos associados ao papel da *SPR* no melanoma estão sendo investigados pelo nosso grupo.

A diminuição na concentração de NO e o aumento da concentração de EROs, nos fez avaliar a viabilidade celular das células silenciadas. Isso porque NO e EROs atuam em diferentes vias de sinalização no melanoma e são capazes de regular diversos fenótipos tumorais, ou seja, a alteração da homeostasia redox pode estimular ou inibir o desenvolvimento tumoral (Gonçalves et al., 2021). Após o silenciamento, foi observado diminuição da viabilidade celular dos clones SR1 e SR3, não se sabe, mas isso pode ter ocorrido pelo aumento da produção de EROs após o silenciamento, tal em razão de EROs atuar como um indutor de apoptose mediada pela via mitocondrial, mesmo mecanismo observado no câncer de mama, uma vez que o silenciamento de *SPR* inibiu a produção de BH4 e induziu apoptose mediada por EROs através da via mitocondrial, pela liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol (Zhang et al., 2020).

Foi mostrado que o aumento da expressão da *SPR* em amostras de neuroblastoma humano está correlacionado com o pior prognóstico dessa neoplasia. Esse mesmo grupo evidenciou que o tratamento com SSZ, fármaco aprovado pelo FDA para o tratamento de artrite reumatoide e colite ulcerativa, inibiu a SR, diminuiu a proliferação de células de neuroblastoma e o crescimento de tumores *in vivo* (Lange et al., 2014; Mooney et al., 2019). No neuroblastoma foi mostrado que a SR interage com a ornitina descarboxilase (ODC), enzima limitante na síntese de poliaminas, de forma a estimular sua atividade e levar ao



aumento da produção de poliaminas (Lange et al., 2014). Poliaminas são cátions alifáticos derivados de aminoácidos que interagem com diferentes moléculas e regulam proliferação, diferenciação, remodelamento da cromatina, entre outras atividades celulares (Li et al., 2020; Chia et al., 2022). Esses resultados mostram que a SR controla positivamente o processo de proliferação de células de neuroblastoma, agindo como um oncogene. Importante ressaltar que o neuroblastoma é um câncer de células do sistema nervoso simpático e o melanoma é originário dos melanócitos, ambos possuem origem embrionária na crista neural, o que sugere que a sepipterina redutase contribua para o desenvolvimento do melanoma.

As funções biológicas da SR também foram estudadas na progressão do CHC (carcinoma hepatocelular) e foi observado que o mecanismo pelo qual a enzima contribui para o desenvolvimento desse câncer é independente da sua atividade. Os resultados obtidos mostram que a alta expressão dessa enzima está relacionada com o crescimento de células de CHC e redução da apoptose, tanto por experimentos *in vitro* como por modelo de xenoenxerto de camundongo atímico. Diferentemente da ação no neuroblastoma, no hepatocarcinoma, o tratamento com inibidores de atividade catalítica da enzima não inibiu a proliferação das células tumorais e não obteve efeito sobre a apoptose, mostrando que a SR possui ação não enzimática nesse tipo de câncer. Com o silenciamento do gene da *SPR*, os resultados encontrados mostraram que a depleção de *SPR* promove apoptose das células de CHC através da ativação da via de sinalização FoxO3a/Bim (Wu et al., 2020).

No presente estudo foi avaliado o papel da SR no processo de migração e invasão de células de melanoma. Por ter sido observada a diminuição na capacidade migratória e invasiva dessas células, é preciso verificar se a ausência ou diminuição da SR alterou os marcadores mesenquimais e epiteliais das células neoplásicas. Ademais, é imprescindível que os mecanismos pelos quais a SR atua sejam investigados, visto que os resultados obtidos sugerem um papel oncogênico para SR no desenvolvimento do melanoma, contribuindo, por

mecanismos ainda não conhecidos, tanto no crescimento como em etapas mais tardias da progressão tumoral, como na migração e invasão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Blau N, Barnes I, Dhondt JL. International database of tetrahydrobiopterin deficiencies. *J Inher Metab Dis*. 1996;19(1):8-14. Capozza F, Williams TM, Schubert W, McClain S, Bouzahzah B, Sotgia F, Lisanti MP. *Am J Pathol*. 2003 Jun;162(6):2029-39.

Bonafé L, Thöny B, Penzien JM, Czarnecki B, Blau N. Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. *Am J Hum Genet*. 2001 Aug;69(2):269-77.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

Cabrera R, Recule F. Unusual Clinical Presentations of Malignant Melanoma: A Review of Clinical and Histologic Features with Special Emphasis on Dermatoscopic Findings. *Am J Clin Dermatol*. 2018 Nov;19(Suppl 1):15-23.

Channon KM. Tetrahydrobiopterin: a vascular redox target to improve endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012 Nov;10(6):705-8.

Chia TY, Zolp A, Miska J. Polyamine Immunometabolism: Central Regulators of Inflammation, Cancer and Autoimmunity. *Cells*. 2022 Mar 5;11(5):896.

Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. 2006;20:2149–2182.

Ciążyńska M, Olejniczak-Staruch I, Sobolewska-Sztychny D, Narbutt J, Skibińska M, Lesiak A. Ultraviolet Radiation and Chronic Inflammation-Molecules and

Mechanisms Involved in Skin Carcinogenesis: A Narrative Review. *Life (Basel)*. 2021 Apr 8;11(4):326. doi: 10.3390/life11040326.

Coit DG, Thompson JA, Algazi A, Andtbacka R, Bichakjian CK, Carson WE 3rd, Daniels GA, DiMaio D, Ernstoff M, Fields RC, Fleming MD, Gonzalez R, Guild V, Halpern AC, Hodi FS Jr, Joseph RW, Lange JR, Martini MC, Materin MA, Olszanski AJ, Ross MI, Salama AK, Skitzki J, Sosman J, Swetter SM, Tanabe KK, Torres-Roca JF, Trisal V, Urist MM, McMillian N, Engh A. Melanoma, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2016 Apr;14(4):450-73.

de Braud F, Khayat D, Kroon BB, Valdagni R, Bruzzi P, Cascinelli N. Malignant melanoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2003 Jul;47(1):35-63.

Díaz-Valdivia N, Simón L, Díaz J, Martínez-Meza S, Contreras P, Burgos-Ravanel R, Pérez VI, Frei B, Leyton L, Quest AFG. Mitochondrial Dysfunction and the Glycolytic Switch Induced by Caveolin-1 Phosphorylation Promote Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 10;14(12):2862. doi: 10.3390/cancers14122862.

Faria AM, Papadimitriou A, Silva KC, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. Uncoupling endothelial nitric oxide synthase is ameliorated by green tea in experimental diabetes by reestablishing tetrahydrobiopterin levels. *Diabetes*. 2012 Jul;61(7):1838-47.

Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cuzzi T, da Silva CSC (2005). Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 80(1), 25-34.

Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr 5;12(5):349-61.

Friedman J, Roze E, Abdenur JE, Chang R, Gasperini S, Saletti V, Wali GM, Eiroa H, Neville B, Felice A, Parascandalo R, Zafeiriou DI, Arrabal-Fernandez L, Dill P,

Eichler FS, Echenne B, Gutierrez-Solana LG, Hoffmann GF, Hyland K, Kusmierska K, Tijssen MA, Lutz T, Mazzuca M, Penzien J, Poll-The BT, Sykut-Cegielska J, Szymanska K, Thöny B, Blau N. Sepiapterin reductase deficiency: a treatable mimic of cerebral palsy. *Ann Neurol*. 2012 Apr;71(4):520-30.

Friedman J. Sepiapterin Reductase Deficiency. 2015 Jul 1. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews*<sup>®</sup> [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022. PMID: 26131547.

Gao L, Pung YF, Zhang J, Chen P, Wang T, Li M, Meza M, Toro L, Cai H. Sepiapterin reductase regulation of endothelial tetrahydrobiopterin and nitric oxide bioavailability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Jul;297(1):H331-9. doi: 10.1152/ajpheart.00007.2009.

Gershenwald JE, Scolyer RA. Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Ann Surg Oncol*. 2018 Aug;25(8):2105-2110.

Gonçalves DA, Jasiulionis MG, Melo FHM. The Role of the BH4 Cofactor in Nitric Oxide Synthase Activity and Cancer Progression: Two Sides of the Same Coin. *Int J Mol Sci*. 2021 Sep 2;22(17):9546. doi: 10.3390/ijms22179546. PMID: 34502450; PMCID: PMC8431490.

Guerra KC, Crane JS. Skin Cancer Types. 2021 Jul 18. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie

K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, StemkeHale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):251-63.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Atlas On-line de Mortalidade [internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde . [acesso em 2021 jun 28]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml#panelResultado>

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estatísticas do câncer: Atualização 2021. Brasília: INCA; 2021. [acesso em 2021 jun 28]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>

Lange I, Geerts D, Feith DJ, Mocz G, Koster J, Bachmann AS. Novel interaction of ornithine decarboxylase with sepiapterin reductase regulates neuroblastoma cell proliferation. *J Mol Biol*. 2014 Jan 23;426(2):332-46. doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.037.

Levy HL. Newborn screening: the genomic challenge. *Atherosclerosis*. 2014 Sep 9;237(1):208-219.

Li J, Meng Y, Wu X, Sun Y. Polyamines and related signaling pathways in cancer. *Cancer Cell Int*. 2020 Nov 5;20(1):539.

Lipsker D, Engel F, Cribier B, Velten M, Hedelin G. Trends in melanoma epidemiology suggest three different types of melanoma. *Br J Dermatol*. 2007 Aug;157(2):338-43. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.08029.x.

Maia M, Basso M. (2006). Quem descobre o melanoma cutâneo. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 81(3), 244-248.

Montor WR, Salas AROSE, Melo FHM. Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Mol Cancer*. 2018 Feb 19;17(1):55.

Mooney MR, Geerts D, Kort EJ, Bachmann AS. Anti-tumor effect of sulfasalazine in neuroblastoma. *Biochem Pharmacol*. 2019 Apr;162:237-249.

Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*. 2014 NovDec;28(6):1005-11.

Rigel DS, Russak J, Friedman R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):301-16.

Stanhewicz AE, Bruning RS, Smith CJ, Kenney WL, Holowatz LA. Local tetrahydrobiopterin administration augments reflex cutaneous vasodilation through nitric oxide-dependent mechanisms in aged human skin. *J Appl Physiol*. 2011 Dec 8.

Strashilov S, Yordanov A. Aetiology and Pathogenesis of Cutaneous Melanoma: Current Concepts and Advances. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 15;22(12):6395. doi: 10.3390/ijms22126395. PMID: 34203771; PMCID: PMC8232613.

Sueoka T, Katoh S. Purification and characterization of sepiapterin reductase from rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1982 Aug 6;717(2):265-71.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.

Svitkina, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, 10.1101/cshperspect.a018267 (2018)

Thöny B, Blau N. Mutations in the BH4-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-

4adehydratase, and dihydropteridine reductase. *Hum Mutat.* 2006 Sep;27(9):870-8.

Weinmann A, Post M, Pan J, Rafi M, O'Connor DL, Unger S, Pencharz P, Belik J. Tetrahydrobiopterin is present in high quantity in human milk and has a vasorelaxing effect on newborn rat mesenteric arteries. *Pediatr Res.* 2011 Apr;69(4):325-9.

Werner ER, Blau N, Thöny B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J.* 2011 Sep 15;438(3):397-414.

Wu, Y., Du, H., Zhan, M., Wang, H., Chen, P., Du, D., Liu, X., Huang, X., Ma, P., Peng, D., Sun, L., Yuan, S., Ding, J., Lu, L., & Jiang, J. (2020). Sepiapterin reductase promotes hepatocellular carcinoma progression via FoxO3a/Bim signaling in a nonenzymatic manner. *Cell death & disease*, 11(4), 248. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2471-7>

Yang S, Lee YJ, Kim JM, Park S, Peris J, Laipis P, Park YS, Chung JH, Oh SP. A murine model for human sepiapterin-reductase deficiency. *Am J Hum Genet.* 2006 Apr;78(4):575-87.

Youn JY, Wang T, Blair J, Laude KM, Oak JH, McCann LA, Harrison DG, Cai H. Endothelium-specific sepiapterin reductase deficiency in DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Jun 1;302(11):H2243-9.

Zarei M, Hajihassani O, Hue JJ, Graor HJ, Loftus AW, Rathore M, Vaziri-Gohar A, Asara JM, Winter JM, Rothermel LD. Wild-type IDH1 inhibition enhances chemotherapy response in melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Sep 24;41(1):283. doi: 10.1186/s13046-022-02489-w.

Zhang, X., Chen, Y., Wang, K., Tang, J., Chen, Y., Jin, G., & Liu, X. (2020). The knockdown of the sepiapterin reductase gene suppresses the proliferation of breast cancer by inducing ROS-mediated apoptosis. *International journal of clinical and experimental pathology*, 13(9), 2228–2239.