

Ana Laura Vieira Alves

**CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA WNK2 NO TRÁFEGO VESICULAR
AUTOFÁGICO EM GLIOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane A O Silva

**Barretos, SP
2019**

Ana Laura Vieira Alves

**CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA WNK2 NO TRÁFEGO VESICULAR
AUTOFÁGICO EM GLIOMAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Co-orientadora: Profa. Dra. Viviane A O Silva

**Barretos, SP
2019**

A474c Alves, Ana Laura Vieira.

Caracterização do envolvimento da proteína WNK2 no tráfego vesicular autofágico em gliomas. / Ana Laura Vieira Alves. - Barretos, SP - 2019.
89 f. : il.

Orientador: Rui Manuel Vieira Reis.

Coorientadora: Viviane Aline Oliveira Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

1. WNK2. 2. Gliomas. 3. Glioblastoma. 4. Tráfego vesicular. 4. Autofagia. 5. Linhagens celulares. I. Autor. II. Reis, Rui Manuel Vieira. III. Silva, Viviane Aline Oliveira. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Laura Vieira Alves

CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA WNK2 NO TRÁFEGO VESICULAR AUTOFÁGICO EM GLIOMAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 23/05/2019

Banca Examinadora:

Dr. Peter Jordan

Instituição: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em Lisboa-Portugal

Dr. Guido Lenz

Instituição: Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Orientador

Dra. Viviane Aline Oliveira Silva

Co-Orientadora

Dra. Céline Marques Pinheiro

Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Bolsa de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 2016/18907-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) e do Ministério Público do Trabalho (MPT).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP, CNPq e MPT.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo”.

*Dedico este trabalho a Deus que me sustentou até aqui.
Aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram e
acima de tudo, me amam como eu sou.*

AGRADECIMENTOS

“Gratidão. Característica ou particularidade de quem é grato. Ação de reconhecer ou prestar reconhecimento (a alguém) por uma ação e/ou benefício recebido”.

Gratidão pelas pessoas que conheci, pelos amigos que conquistei, por todo o conhecimento que adquiri e todas as barreiras pessoais e profissionais que eu venci.

Agradeço ao meu orientador **Dr Rui Manuel Reis**, por ter aberto as portas do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular para que eu, apenas uma aluna de graduação, pudesse descobrir o que eu gostaria de ser/fazer pelo resto da vida. Por ter acreditado em meu trabalho, pelo financiamento, pela troca de conhecimento e por toda a confiança depositada em mim para a execução desse estudo.

À minha co-orientadora **Dra Viviane Aline Oliveira Silva**, por TUDO. Absolutamente TUDO. Palavras não são suficientes para colocar no papel toda a minha admiração, respeito e carinho que tenho por ela. Por ter me ensinado tudo que sei até hoje, desde a bancada até ao pensamento científico. Por me apoiar em todos os momentos, me incentivar a vencer todas as barreiras, por acreditar no meu potencial, pela educação e, por todos os dias ter plantado a sementinha do amor e do respeito. Poucas pessoas nesse mundo são tão gentis, humanas e amigas como ela. Deus foi muito generoso comigo quando a colocou em meu caminho.

Aos meus pais **Walter Alves e Sueli Marçal** pela vida. Por me ensinar desde cedo a correr atrás dos meus objetivos. A não desistir, a não me acomodar, sempre tentando ser melhor a cada dia. Por me apoiar em todas as minhas decisões, pelo amor incondicional dedicado a mim todos esses anos, por acreditarem em mim e serem os maiores incentivadores disso tudo.

Agradeço também ao meu noivo **Igor Henrique Camargo Ferreira**, meu companheiro de vida. Por entender os momentos de ausência, os momentos de loucuras, entender meus

finais de semana no laboratório e até meus dias até tarde da noite. Por nunca me deixar desistir, por confiar que eu sou capaz e por me dar força e coragem todos os dias.

Aos meus amigos de laboratório pela parceria e por todos os momentos compartilhados. Especialmente **Ângela Neves, Cíntia Ramos, Paula Felício, Izabela Faria, Marcela Nunes, Murilo Bonatelli, Elisa Messias, Weder Menezes, Ariane Pereira, Natalia Campacci, Rhafaela Causin, Fernanda Cury, Aline Rocha, Marina Dias e Paula Pastrez**. Quando temos amigos, o caminho é muito mais leve. Cada uma dessas pessoas foi essencial na construção de quem sou hoje. Cada um que me ouviu, aconselhou ou simplesmente me estendeu a mão, com certeza tem um lugar reservado em minha vida.

A **Dra Letícia Ferro Leal** pelo carinho, pelas palavras positivas, por enxergar o que temos de melhor. Uma pessoa de luz, que tenho muita admiração.

À banca de acompanhamento **Dr Peter Jordan e Dra Céline Pinheiro** pela disponibilidade. Por todos os ensinamentos e pelas sugestões para que este estudo pudesse ser concluído.

Aos biólogos do CPOM, **Karina Mello, Letícia Braga, Ms André Lengert, Dr Renato Oliveira e Dra Ana Carolina Laus** pelo apoio técnico e científico.

Ao **CPOM, Departamento de pós-graduação, EPIT** (Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica), **PAIP** (Programa de Auxílio e Incentivo ao Pesquisador) e a **Biblioteca** pelo excelente trabalho realizado.

Ao **Dr Filipe Pinto, Dra Mariana Bizarro e Dra Adriane Feijó** pela colaboração nas análises *in silico*.

Ao **Dr Vinícius Duval** pela ajuda nas análises de imagem. Pela disponibilidade para as reuniões, explicações e todos os ensinamento sobre imagem.

À **Dra Ana Carolina Peters, Dr Matias Melendez** e ao **Ms André Lengert** pela ajuda nos experimentos. Pela disponibilidade em me ensinar e discutir os resultados.

Ao **Dr José Manuel Bravo San-Pedro** e ao **Dr Guido Kroemer** pela colaboração com os plasmídeos, pelo conhecimento compartilhado e por todo o suporte científico que ofereceram para que este trabalho fosse concluído.

À **Ms Thaís Sobanski** por ter contribuído nos ensaios de metilação. Por ter me ensinado com toda paciência, se disponibilizado e por toda a dedicação que teve durante a execução nesta etapa do trabalho.

A **FAPESP** e ao **Hospital de Câncer de Barretos** pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse finalizado.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Gliomas	1
1.2	Glioblastomas	3
1.3	Tratamento	4
1.4	Mecanismos de carcinogênese	4
1.5	Proteínas quinases WNK	5
1.6	Gene <i>WNK2</i>	6
1.7	Tráfego vesicular	8
1.7.1	Autofagia	9
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	12
3.1	Objetivo geral	12
3.2	Objetivos específicos	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1	Análises <i>in silico</i>	13
4.2	Linhagens celulares	13
4.3	Avaliação do perfil de metilação e expressão do gene <i>WNK2</i>	15
4.3.1	Extração de DNA e RNA	15
4.3.2	Análise do padrão de metilação do DNA por pirosequenciamento	15
4.3.3	Análise da expressão gênica do gene <i>WNK2</i> por RT-PCR	16

4.3.4	Análise da expressão gênica do gene <i>WNK2</i> por qRT-PCR	16
4.4	Análise da expressão proteica de <i>WNK2</i> pela técnica de western-blot	17
4.5	Análise do processo de autofagia por western-blot	18
4.5.1	Análise do processo autofágico por imunofluorescência	19
4.5.2	Análise do processo autofágico através dos plasmídeos mCherry-GFP-LC3B e mCherry-GFP-p62	20
4.6	Determinação da viabilidade celular após restauração do gene <i>WNK2</i> na resposta à quimioterapia	21
4.7	Análises estatísticas	22
5	RESULTADOS	23
5.1	Análise <i>in silico</i> da expressão do gene <i>WNK2</i> em gliomas	23
5.2	Validação da superexpressão do gene <i>WNK2</i> por RT-PCR e qRT-PCR	24
5.3	Perfil de metilação da região promotora do gene <i>WNK2</i> em linhagens comerciais e primárias de glioma	26
5.4	Expressão do gene <i>WNK2</i> em linhagens comerciais e primárias de glioma	27
5.5	Padronização e avaliação da expressão da proteína <i>WNK2</i>	28
5.6	Avaliação do processo autofágico nas linhagens editadas	29
5.7	Avaliação do efeito da restauração do gene <i>WNK2</i> na resposta a quimioterapia	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	53

REFERÊNCIAS		54
--------------------	--	-----------

ANEXO

Anexo A	Carta de Anuência do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	62
Anexo B	Avaliação das proteínas LCB3 e p62 por western-blot em 4 horas	63
Anexo C	Avaliação das proteínas LCB3 e p62 por western-blot em 6 horas	64
Anexo D	Avaliação das proteínas envolvidas na via de mTOR por western-blot em 4 horas	65
Anexo E	Avaliação das proteínas envolvidas na via de mTOR por western-blot em 6 horas	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Classificação dos gliomas com base em características histológicas e moleculares.	2
Figura 2 –	<i>Hallmarks of Cancer.</i>	5
Figura 3 –	Representação do papel de <i>WNK2</i> nos mecanismos da carcinogênese.	8
Figura 4 –	Representação do processo autofágico.	9
Figura 5	Representação esquemática do fluxo autofágico e o uso de plasmídeos em <i>tandem</i> .	20
Figura 6 –	Análise <i>in silico</i> da expressão de <i>WNK2</i> em diferentes subtipos histológicos de gliomas.	22
Figura 7 –	Correlação da expressão gênica de <i>WNK2</i> e o perfil de metilação da região promotora do gene.	23
Figura 8 –	Validação da superexpressão de <i>WNK2</i> por RT-PCR e qRT-PCR.	24
Figura 9 –	Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene <i>WNK2</i> por pirosequenciamento.	25
Figura 10 –	Avaliação dos níveis endógenos de expressão do gene <i>WNK2</i> por qRT-PCR.	26
Figura 11 –	Detecção da expressão da proteína <i>WNK2</i> nas linhagens editadas por western-blot.	27
Figura 12 –	Detecção da expressão da proteína <i>WNK2</i> em linhagens tumorais.	28
Figura 13 –	Avaliação das proteínas LC3B e p62 por western-blot.	31
Figura 14 –	Avaliação das proteínas envolvidas na via de mTOR por western-blot.	35
Figura 15 –	Avaliação do efeito da restauração do gene <i>WNK2</i> no processo autofágico após o tratamento com cloroquina (CQ).	38

Figura 16 –	Avaliação de LC3B utilizando o plasmídeo pDest.mCherry-GFP-LC3B.	42
Figura 17 –	Avaliação de LC3B utilizando o plasmídeo pDest.mCherry-GFP-p62.	44
Figura 18 –	Avaliação do efeito do tratamento com TMZ nas linhagens editadas.	45
Figura 19 –	Avaliação do efeito do tratamento com TMZ e baf A1 nas linhagens editadas.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Comparação das características moleculares dos 4 genes humanos WNK e suas expressões em diferentes tecidos ⁴⁹ .	6
Tabela 2 –	Painel de linhagens celulares comerciais de diferentes subtipos histológicos e linhagens primárias de glioma utilizadas neste estudo.	14
Tabela 3 –	Sequências dos <i>primers</i> utilizados na reação de pirosequenciamento.	15
Tabela 4 –	Anticorpos primários utilizados para validar expressão da proteína WNK2.	18
Tabela 5 –	Anticorpos primários utilizados para avaliar a via autofágica.	19
Tabela 6 –	Média dos valores de IC ₅₀ para o quimioterápico TMZ nas linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

3-MA	<i>3- methyladadine autophagy inhibitor</i>
4EBP-1	<i>4E binding protein 1</i>
5-aza-Dc	<i>5-aza-2'-deoxycytidine</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATG	<i>Autophagy-related genes</i>
BAF A1	<i>Bafilomycin A1</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cDNA	<i>Complement deoxyribonucleic acid</i>
CQ	<i>Chloroquine</i>
DBPS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
ECACC	<i>European Collection of cell cultures</i>
ECL	<i>Electrochemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EV	<i>Empty vector</i>
GBM	<i>Glioblastoma</i>
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Statistics</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCB	<i>Hospital de Câncer de Barretos</i>
IC₅₀	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
IDH	<i>Isocitrate Dehydrogenase</i>
INCA	<i>Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva</i>
LC3A/B	<i>Microtubule associated protein light chain 3 A/B</i>

LGG	<i>Low grau gliomas</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
miR	<i>MicroRNA</i>
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
MSP	<i>Methylation Specific PCR</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	<i>[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]</i>
NHA	<i>Normal Human Astrocytes</i>
NOS	<i>Not Otherwise Specified</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
P/S	<i>Penicilin/Streptomycin</i>
P62	<i>SQTM1/p62</i>
pH	<i>Potencial hidrogeniônico</i>
p-p70S6K	<i>Phosphor p70 serine 6 kinase</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
Rac1	<i>Rac Family small GTPase 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAm	<i>RNA mensageiro</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SBF	<i>Fetal Bovine Serum</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
SNC	<i>Sistema Nervoso Central</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TBST	<i>Tris Buffer Saline with Tween 20</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TMZ	<i>Temozolamida</i>

WNK *With no Lysine (K)*

WT *Wild type*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Desvio padrão
$\Delta\Delta Ct$	Delta Delta Ct
°C	Graus Celsius
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μM	Micromolar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
α	Alfa
β	Beta
cm²	Centímetro quadrado
+	Mais ou presente
-	Menos ou ausente

RESUMO

Alves, A.L.V. Caracterização do envolvimento da proteína WNK2 no tráfego vesicular autofágico em gliomas. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

JUSTIFICATIVA: O gene *WNK2*, um membro da subfamília quinase WNK (*With No Lysine (K)*) atua como gene supressor tumoral em gliomas. A hipermetilação da região promotora de *WNK2* está reportada em 17,5% dos casos, levando ao seu silenciamento. Estudos prévios do grupo demonstraram que *WNK2* regula processos celulares como proliferação, migração e invasão em gliomas. A autofagia é uma das principais vias de morte celular, associada ao tráfego vesicular, consistindo em um sistema de degradação e reciclagem de moléculas. De realçar, o papel dual da autofagia no processo de tumorigênese, em particular de gliomas. Até momento, o papel da *WNK2* na morte celular ainda é desconhecido, e estudos contraditórios têm revelado *WNK2* como um modulador do fluxo autofágico. Dessa forma, a identificação das vias de sinalização que determinem o papel de *WNK2* na morte celular e em outros processos celulares se faz necessária. **OBJETIVO:** Caracterizar o papel de *WNK2* no tráfego vesicular autofágico em linhagens de glioma. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A análise do perfil gênico de *WNK2* foi realizada *in silico* através da base de dados *OncoPrint* e *cBioPortal*. A caracterização do perfil de metilação da região promotora do gene *WNK2*, bem como sua expressão gênica e proteica foram realizadas por pirosequenciamento, qRT-PCR e western-blot, respectivamente, em um painel de seis linhagens imortalizadas de gliomas (quatro comerciais e duas culturas primárias) incluindo uma linhagem proveniente de astrócito normal (NHA) e uma linhagem de câncer colorretal (SW480), utilizada como controle positivo. A caracterização do papel de *WNK2* no processo autofágico foi realizada nas linhagens editadas A172 WT (*wild-type*), A172 EV (*empty-vector*) e A172 WNK2 (*WNK2 overexpression*) utilizando um bloqueador (baf A1) e um indutor (everolimus) do fluxo autofágico a partir das técnicas de western-blot e imunofluorescência, para os principais marcadores do fluxo autofágico, LC3A/B e SQSTM1/p62. Por fim, a determinação do papel de *WNK2* na resposta a quimioterapia padrão, temozolamida (TMZ), foi avaliada pelo ensaio de viabilidade celular, MTS. **RESULTADOS:** As análises *in silico* demonstraram uma expressão inversamente proporcional do gene *WNK2* em pacientes com glioblastoma (grau IV da OMS). Entretanto, a correlação entre hipermetilação de *WNK2* e a expressão do RNAm do gene não

foi encontrada. A análise molecular do perfil de metilação do gene *WNK2* caracterizou as linhagens NHA, A172, SW1088, U87-MG, U251 e HCB2 como metiladas, e as linhagens HCB151 e SW480 como não metiladas. A expressão do gene *WNK2* foi identificada nas linhagens NHA, HCB151, U87-MG, U251 e SW1088. Dos três novos anticorpos comerciais testados por este estudo, nenhum foi específico para a expressão proteica de *WNK2*. A análise do papel de *WNK2* no processo autofágico demonstrou que após tratamento combinatório de baf A1 + everolimus por 4 e 6 horas, a expressão proteica dos principais marcadores autofágicos, LC3B ($p= 0,0005$) e p62 ($p= 0,0005$) diminuíram significativamente na linhagem A172 *WNK2*, quando comparadas as linhagens WT e EV. A proteína mTOR e seus co-fatores também foram avaliados nas mesmas condições, contudo, não se observou diferenças estatísticas. As análises por imunofluorescência utilizando os plasmídeos conjugados em *tandem* demonstraram uma diminuição de *punctas* vermelhas ($p= 0,05$) e amarelas ($p= 0,005$) no ensaio com mCherry-GFP-p62 após 24 horas de tratamento com HBSS + baf A1. Por outro lado, não houve diferença estatística no ensaio com mCherry-GFP-LC3B. Além do mais, após análise da viabilidade celular, a linhagem *WNK2* demonstrou-se resistente ao tratamento com TMZ comparada as linhagens WT e EV. **CONCLUSÃO:** Neste estudo, as análises *in silico* corroboram com os achados da literatura, revelando uma redução da expressão gênica de *WNK2* em gliomas de alto grau. A análise quantitativa do perfil de metilação da região promotora do gene *WNK2* confirmou a relação da perda de expressão com mecanismos epigenéticos, porém, sugere que outros mecanismos de regulação podem estar envolvidos nesse processo. Além disso, os anticorpos testados não permitiram a identificação fidedigna da expressão proteica de *WNK2*. A avaliação do processo autofágico utilizando diferentes abordagens metodológicas demonstrou que a presença de *WNK2* inibe o processo autofágico em gliomas, e sugere ser de maneira independente da via de mTOR. O impacto clínico dessa inibição pode estar relacionado a resistência ao tratamento com TMZ, evidenciado nos ensaios de citotoxicidade com a linhagem *WNK2*.

PALAVRAS-CHAVES: *WNK2*, gliomas, glioblastomas, tráfego vesicular, autofagia, linhagens celulares.

ABSTRACT

Alves, A.L.V. Characterization of WNK2 protein involvement in autophagic vesicular trafficking in gliomas. Dissertation (Master's degree). Barretos: Barretos Cancer Hospital, 2019.

BACKGROUND: The *WNK2* gene, a member of the WNK (With No Lysine (K)) subfamily, acts as a tumor suppressor gene in gliomas. The hypermethylation of the *WNK2* promoter region is reported in 17.5% of cases, leading to its silencing. Previous studies of the group have demonstrated that *WNK2* regulates cellular processes such as proliferation, migration and invasion in gliomas. Autophagy is one of the major cell death pathways, associated with vesicular trafficking, consisting of a system of degradation and recycling of molecules. Of note, is the dual role of autophagy in the process of tumorigenesis, in particular of gliomas. Until now, the role of *WNK2* in cell death is still unknown, and contradictory studies have revealed *WNK2* as an autophagic flow modulator. Thus, the identification of signaling pathways that determine the role of *WNK2* in cell death and in other cellular processes is necessary. **AIM:** To characterize the role of *WNK2* in autophagic vesicular trafficking in glioma cell lines. **MATERIALS AND METHODS:** Analysis of the gene profile of *WNK2* was performed *in silico* through the OncoPrint and cBioPortal database. Characterization of the methylation profile of the *WNK2* gene promoter region as well as, its gene and protein expression were performed by pyrosequencing, qRT-PCR and western blot, respectively, in a panel of six immortalized gliomas cell lines (four commercial and two primarys (NHA) and a colorectal cancer cell line (SW480), used as a positive control. The characterization of the role of *WNK2* in the autophagic process was performed on A172 WT (wild-type), A172 EV (empty-vector) and A172 WNK2 (WNK2 overexpression) cell lines using a blocker (baf A1) and an inductor (everolimus) autophagic flow from western blot and immunofluorescence techniques for the major markers of autophagic flow, LC3A/B and SQSTM1/p62. Finally, determination of the role of *WNK2* in response to standard chemotherapy, temozolamide (TMZ), was evaluated by the cell viability assay, MTS. **RESULTS:** *In silico* analyzes demonstrated an inversely proportional expression of the *WNK2* gene in patients with glioblastoma (WHO grade IV). However, the correlation between *WNK2* hypermethylation and gene mRNA expression was not found. Molecular analysis of the methylation profile of

the *WNK2* gene characterized the NHA, A172, SW1088, U87-MG, U251 and HCB2 cell lines as methylated, and the HCB151 and SW480 cell lines as unmethylated. *WNK2* gene expression was identified in the NHA, HCB151, U87-MG, U251 and SW1088 cell lines. Of the three new commercial antibodies tested by this study, none were specific for the protein expression of *WNK2*. The analysis of the role of *WNK2* in the autophagic process demonstrated that after combinatorial treatment of baf A1 + everolimus for 4 and 6 hours, protein expression of the major autophagic markers, LC3B ($p = 0.0005$) and p62 ($p = 0.0005$) decreased significantly in the A172 *WNK2* cell line when compared to the WT and EV cell lines. The mTOR protein and its cofactors were also evaluated under the same conditions, however, no statistical differences were observed. Immunofluorescence assays using the *tandem* conjugated plasmids demonstrated a decrease in red ($p = 0.05$) and yellow ($p = 0.005$) *punctas* in the mCherry-GFP-p62 assay after 24 hours of treatment with HBSS + baf A1. On the other hand, there was no statistical difference in the mCherry-GFP-LC3B assay. Furthermore, after cell viability analysis, the *WNK2* cell line was resistant to TMZ treatment compared to WT and EV cell lines. **CONCLUSION:** In this study, the *in silico* analyzes corroborate with the findings of the literature, revealing a reduction of the *WNK2* gene expression in high grade gliomas. Quantitative analysis of the methylation profile of the promoter region of the *WNK2* gene confirmed the relationship of loss of expression with epigenetic mechanisms, but suggests that other regulatory mechanisms may be involved in this process. In addition, the antibodies tested did not allow reliable identification of *WNK2* protein expression. Assessment of the autophagic process using different methodological approaches has demonstrated that the presence of *WNK2* inhibits the autophagic process in gliomas, and suggests to be independently of the mTOR pathway. The clinical impact of this inhibition may be related to resistance to TMZ treatment, as evidenced in the A172 *WNK2* cell line cytotoxicity assays.

KEYWORDS: *WNK2*, gliomas, glioblastomas, vesicular trafficking, autophagy, cell lines.

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos mais importantes problemas de saúde pública e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) ¹, foi responsável por 8,8 milhões de mortes no ano de 2015, sendo a segunda maior causa de mortes no mundo. Segundo o *Global Cancer Statistics 2018* (GLOBOCAN) ², a estimativa é de 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes por câncer para 2018. Para o ano de 2030 a estimativa é de 21,4 milhões de novos casos de câncer ¹. No Brasil, a estimativa para os anos de 2018 e 2019 segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) ³, é de 600 mil novos casos para cada ano, com exceção de pele não melanoma. Neste contexto, as estimativas atuais revelam a necessidade iminente da compreensão da biologia do câncer e, conseqüente, desenvolvimento de novas abordagens antitumorais.

1.1 Gliomas

Os tumores do sistema nervoso central (SNC) acometem cerca de 2% de todos os tumores primários e cerca de 3,8% de todas as neoplásicas malignas no mundo ⁴. Apesar da sua baixa frequência, estes tumores apresentam alta taxa de mortalidade, que atinge cerca de 70-76% dos casos ⁵, sendo uma das principais causas de morte relacionada a câncer em adultos e crianças ⁶. Estimam-se para o Brasil, 5.810 casos novos de tumores cerebrais em homens e 5.510 em mulheres para cada ano do biênio 2018-2019, passando a ocupar a décima e a nona posição dos tipos mais frequentes, respectivamente ³.

Gliomas são tumores neuroepiteliais originados das células de suporte do SNC, células da glia ou de células gliais progenitoras ⁷. Entre os tumores cerebrais, os gliomas respondem por quase 26% de todos os tumores cerebrais primários e 81% de todos os malignos, e constituem aproximadamente 60% dos tumores pediátricos ^{8, 9}. Segundo o sistema de classificação da OMS, os gliomas são classificados em vários subtipos histológicos e divididos em graus de malignidade (graus I-IV). No SNC, gliomas de grau I são considerados circunscritos e geralmente se comportam de uma forma benigna e curável por ressecção completa, enquanto gliomas de grau II-IV são considerados malignos e difusos pois infiltram grande parte dos tecidos do cérebro ¹⁰⁻¹². Devido à sua elevada capacidade invasiva (até mesmo nos tumores de baixo grau, OMS - grau II), estes tumores são extremamente difíceis de serem completamente ressecados durante a cirurgia, levando à recorrência do tumor, e, em última instância, à morte do paciente ¹³. Além disso, estes tumores são altamente

resistentes à radiação e quimioterapia, sendo uma das mais letais neoplasias humanas ¹⁰. Em relação às características utilizadas na classificação, encontra-se também o índice mitótico de células tumorais, atipia nuclear, proliferação vascular e necrose ¹⁴, sendo a heterogeneidade deste tipo de tumor (em termos de histologia, grau, resultados clínicos e genômica) um fato que aumenta a complexidade da investigação de fatores de risco ¹⁵. Recentemente, a OMS incluiu as características moleculares na classificação dos gliomas ¹⁶. Além do tipo histológico que se divide em: astrocitoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma (gliomas mistos) e glioblastoma, o *status* de *isocitrate dehydrogenase* (*IDH*), codeleção de *1p/19q*, perda de *ATRX* e mutação de *TP53* passam a ser analisados e utilizados na classificação ¹⁷⁻²⁰ (Figura 1). A nova classificação que incorpora parâmetros histológicos e moleculares não só permite uma nova classificação para tumores cerebrais como inclusive permite mudanças nos critérios de diagnósticos, prognóstico e planejamento do tratamento.

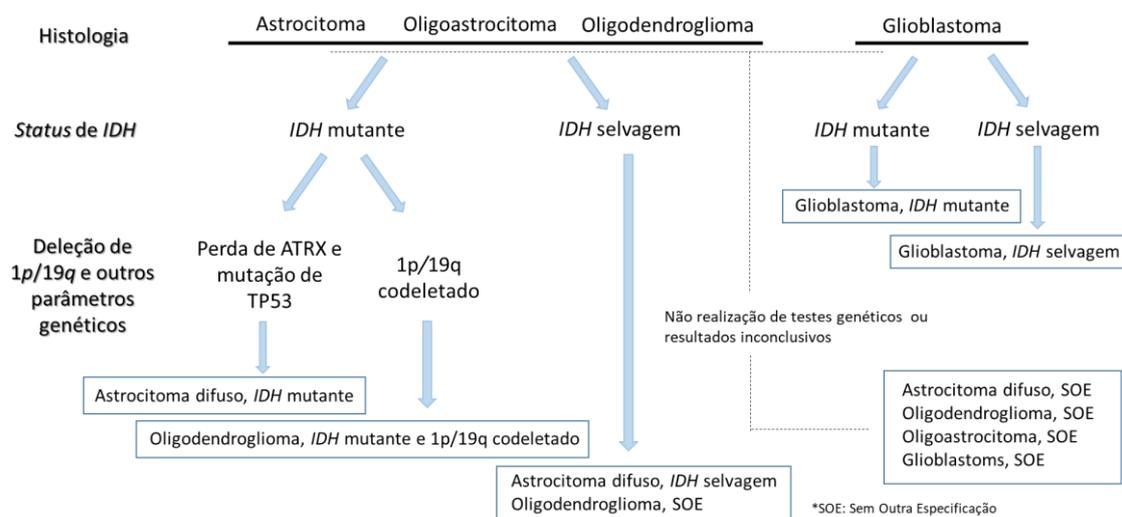


Figura 1. Classificação dos gliomas com base em características histológicas e moleculares. (Adaptação da classificação da OMS, Louis *et al.*, 2016) ¹⁶.

A idade mediana do diagnóstico para os tumores do SNC é de 59 anos ²¹, sendo os astrocitomas pilocíticos frequentemente diagnosticados em crianças e adolescentes, oligodendrogliomas de baixo grau em adultos e os glioblastomas em pacientes com idades avançadas ¹⁵. Dessa forma, a idade avançada do paciente e o tipo histológico do tumor está significativamente associada com a menor sobrevivência após o diagnóstico ^{4, 22}.

1.2 Glioblastomas

O glioblastoma (GBM) (OMS – grau IV) é a forma mais maligna de gliomas e representa o subtipo histológico mais frequente na população adulta ⁴. A sua principal característica é o rápido crescimento e invasividade para o parênquima cerebral adjacente ²³. O glioblastoma pode ocorrer em qualquer idade, sendo, no entanto, mais comum em idosos, com pico de incidência no grupo de 75-84 anos ⁴. Na infância, o GBM é responsável por 15% de todos os tumores cerebrais pediátricos ²⁴. De acordo com a nova classificação da OMS ¹⁶, os GBMs são classificados como: (1) *IDH-wildtype* (cerca de 90% dos casos), que corresponde mais frequentemente ao glioblastoma primário ou *de novo* que ocorre na ausência de uma lesão de baixo grau pré-existente e predomina em pacientes com mais de 55 anos de idade ²⁵; (2) *IDH-mutant* (cerca de 10% dos casos), que corresponde ao chamado glioblastoma secundário que se desenvolve progressivamente de um astrocitoma de baixo grau geralmente ao longo de um período de 5 a 10 anos e, preferencialmente, surge em pacientes mais jovens ²⁶⁻²⁸; e (3) *NOS (Not Otherwise Specified)*, um diagnóstico reservado para aqueles tumores para os quais a avaliação completa do *IDH* não pode ser realizada. Embora os GBMs primários e secundários possuam características histopatológicas e resultados clínicos semelhantes, respondendo da mesma forma às terapias convencionais ¹³, a cinética de desenvolvimento do tumor nestes dois subtipos difere-se em relação a idade do paciente e mutações específicas de cada um ^{26, 28}.

Apesar dos avanços significativos em diagnóstico e terapêutica nas últimas décadas, o prognóstico para pacientes com gliomas de alto grau (OMS - grau III-IV) permanece desfavorável ²⁹. O diagnóstico de glioblastoma está associado a um tempo médio de sobrevida global de 15 a 18 meses e a uma taxa de sobrevida em 5 anos inferior a 5%. Apenas aproximadamente 2% dos pacientes com 65 anos ou mais, e 30% daqueles com idade inferior a 45 anos no diagnóstico sobrevivem por 2 anos ou mais ³⁰, sendo que esta estatística não tem mudado muito durante as últimas décadas ^{4, 23, 26, 28, 31}.

1.3 Tratamento

A terapia padrão para gliomas malignos envolve a ressecção cirúrgica do tumor, quando viável, tratamento com radioterapia e quimioterapia ^{13, 29, 32, 33}. A ressecção cirúrgica, com adição da radioterapia, aumenta a sobrevida em pacientes com glioblastomas de 3 a 4

meses para 7 a 12 meses ^{29, 34}. Dessa forma, este tipo tumoral representa um dos maiores desafios na oncologia. O quimioterápico mais utilizado na prática clínica para gliomas anaplásicos (grau III) e GBMs (grau IV), seja concomitante à radioterapia, ou isolado, é um agente alquilante de DNA, a temozolamida (TMZ), também conhecido por TemodalTM/TemodarTM ¹³ capaz de induzir uma parada no ciclo celular na fase G2/M levando as células à apoptose ³⁵. Este quimioterápico é utilizado tanto no tratamento de neoplasias com diagnóstico inicial quanto para recorrência tumoral ²⁹. Estudos realizados por Stupp e colaboradores (2005) ²⁹, comparando o tratamento de radioterapia com ou sem TMZ em pacientes com diagnóstico recente de GBM, demonstraram uma melhora da sobrevida global média de 2,5 meses (sendo 12,1 meses para radioterapia exclusiva e 14,6 meses para radioterapia mais TMZ), favorecendo os pacientes tratados com TMZ. Embora a TMZ prolongue a sobrevivência do paciente, as alternativas de tratamento atuais não têm sido eficazes devido a múltiplos fatores como, a quimiorresistência e a recorrência do tumor ³⁶, trazendo pouca evolução no quadro clínico, tornando-se até o momento, essencialmente paliativas.

1.4 Mecanismos de carcinogênese

A tumorigênese é decorrente de múltiplas etapas e fatores, envolvendo alterações em genes que podem ser desde mutações, quebras e perdas cromossômicas, ampliações, instabilidade genômica, a mecanismos epigenéticos ^{37, 38}. Os principais genes envolvidos nesse processo são os oncogenes e os genes supressores tumorais ³⁹, responsáveis pelas principais características adquiridas pelas células tumorais (*Hallmarks of Cancer*; Figura 2), tais como a manutenção da sinalização proliferativa, resistência à morte celular assim como os mecanismos de invasão e metástase, e têm se tornado os maiores alvos na busca de estratégias terapêuticas atuais para o tratamento de pacientes com câncer ^{40 41, 42}.

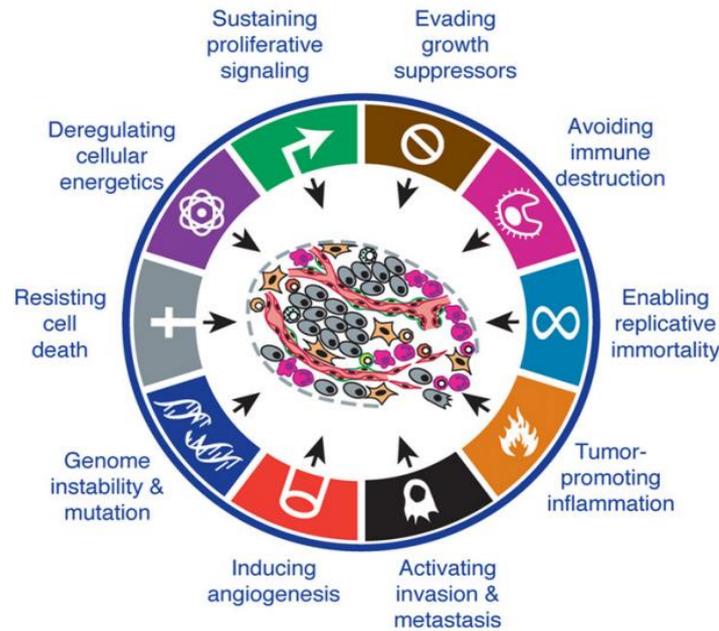


Figura 2. Hallmarks of Cancer. Visão geral das principais características adquiridas durante o processo de transformação neoplásica. (Hanahan & Weinberg, 2011) ⁴².

1.5 Proteínas quinases WNK

As proteínas da subfamília WNK (*With No Lysine (K)*) são serina / treonina quinases que diferentemente das demais proteínas quinases, não possuem um resíduo de lisina conservado no subdomínio II, o qual é importante para a atividade catalítica da maioria das outras quinases ⁴³. Na subfamília WNK, o resíduo de lisina catalítico está presente no subdomínio I, que funcionalmente reconstitui o sítio ativo em WNKs ^{44, 45}. Os domínios catalíticos de quinases WNK estão localizados próximos às suas extremidades N terminais entre os resíduos 195 e 453, incluindo o típico *motif* de assinatura WNK quinases ^{46, 47}. As proteínas quinases WNK são encontradas em organismos multicelulares e o genoma humano contém quatro genes WNK relacionados, *WKN1*, *WKN2*, *WKN3* e *WKN4* ⁴⁷, localizados nos cromossomos 12, 9, X e 17, respectivamente ⁴⁸. Na tabela 1 são evidenciadas as principais características moleculares dos genes que codificam as proteínas WNK ⁴⁹.

Tabela 1. Comparação das características moleculares dos 4 genes humanos *WNK* e suas expressões em diferentes tecidos ⁴⁹.

Gene	Cromossomo	Tamanho (Mb)	Éxon (nº)	Códon (nº nucleotídeos)	Peso (kDa)	Expressão em tecidos
<i>WNK1</i>	12p .13.3	150	28	2.382	251	Amplio
<i>WNK2</i>	9q 22.31	136	31	2.297	243	Cérebro, coração e cólon
<i>WNK3</i>	Xp 11;23-21	165	24	1.743	192	Cérebro, fígado e pequeno intestino
<i>WNK4</i>	17q 21-q22	16	19	1.243	135	Rim, pele, códon, fígado e pulmão

Vários membros da subfamília *WNK* modulam a proliferação celular, atuando em diferentes cascatas de MAPK ^{49, 50}. Além disso, foi descrito seu papel nas vias de sinalização transducional relacionadas com o crescimento e sobrevivência celular ^{49, 51}.

1.6 Gene *WNK2*

O gene *WNK2* codifica uma proteína serina-treonina quinase citoplasmática ^{52, 53}, que geralmente é expressa no músculo do coração, intestino delgado e cólon⁵¹, e predominante em neurônios cerebrais ⁴⁸. Recentemente, foi descrita a perda de expressão de *WNK2* através de mecanismos de metilação anormal da sua região promotora em distintos tumores humanos, tais como leucemia linfocítica crônica, leucemia mieloide aguda, meningioma e gliomas ^{49, 52-56}. Em 2013, o nosso grupo de pesquisa ⁵⁴ detectou a hipermetilação do promotor de *WNK2* em 17,5% de gliomas adultos, entretanto, em gliomas de alto grau pediátricos apenas um caso (1,6%) foi identificado, demonstrando que tumores adultos e pediátricos possuem características geneticamente distintas, o que aumenta a sua complexidade. Até o momento, estudos mostram que a inibição da proteína *WNK2* promove a proliferação celular através das via MAP quinase ⁴⁹, bem como a migração celular e a mortalidade, aparentemente através da ativação de Rac1 ⁵⁴. Foi relatado também, que nas células epiteliais, o silenciamento de *WNK2* aumenta o *GTP-loading* de Rac1, conhecida por conduzir um tipo de migração celular mesenquimal, permitindo a infiltração de células tumorais da glia para dentro da matriz neuronal do cérebro ⁵⁷. A consequente ativação de

Rac1 resultou em um aumento da proliferação mediada pela ativação de MEK e ERK ^{51, 58} (Figura 3). Além do mais, já foi descrito pelo nosso grupo que a metilação do promotor de *WNK2* e o silenciamento da sua expressão também estão associados com o aumento da ativação de JNK e níveis de matrix metaloproteinase-2 (MMP2) em gliomas ⁵⁹, sendo que MMPs são importantes no processo de invasão tumoral para os tecidos circundantes ^{51, 60}. Dessa forma, o envolvimento de *WNK2* em mecanismos essenciais para o desenvolvimento da carcinogênese como proliferação, invasão e metástase, é decorrente da ausência da sua expressão em tumores humanos.

Embora a inibição da proliferação celular assim como da invasão ofereça uma oportunidade para que a doença seja estabilizada, a indução da morte celular apresenta um potencial de eliminar completamente as células neoplásicas, representando assim, uma perspectiva de cura ⁶¹. A morte celular desempenha um papel central na regulação da homeostase do tecido normal, modulando a eliminação de células não funcionais, incluindo precursores de células tumorais ⁴². O papel da *WNK2* na morte celular é desconhecido, e estudos contraditórios têm revelado *WNK2* como um modulador de autofagia, uma importante via de morte celular em células tumorais, que vem ganhando destaque principalmente em tumores cerebrais. Dessa forma, dada a importância da proteína *WNK2* no contexto do câncer, e em especial em gliomas, a identificação das vias de sinalização que determinam o papel de *WNK2* na morte celular e em outros processos celulares se faz necessária.

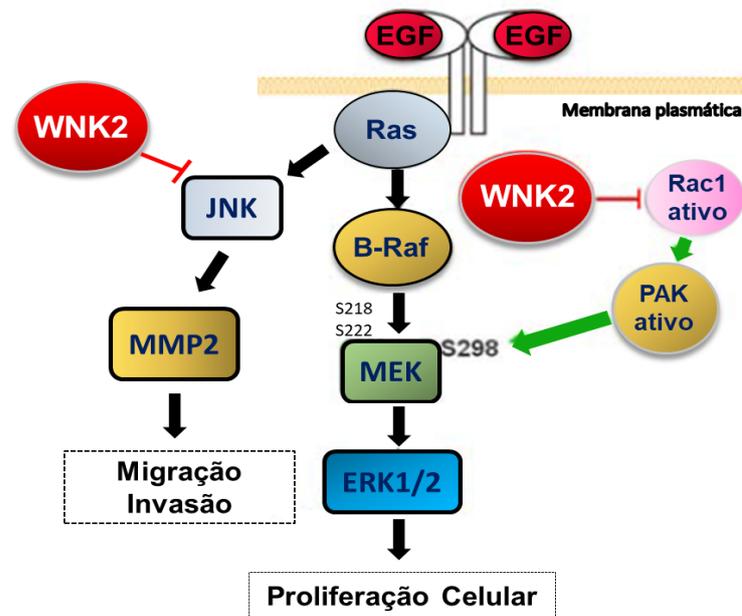


Figura 3. Representação do papel de WNK2 nos mecanismos da carcinogênese. Lado esquerdo: A presença de WNK2 inibe a atividade de JNK, MMP2 e consequentemente inibe a migração e invasão celular. Lado direito: A expressão de WNK2 controla a sinalização mediada por *Rac1/PAK1 GTPase* que aumenta a ativação de ERK1/2. Sem a ativação dessas proteínas a proliferação celular é diminuída. (Adaptado de Moniz, *et al.* 2010) ⁴⁹.

1.7 Tráfego vesicular

Células eucariotas possuem compartimentos intracelulares que desempenham funções específicas e, que são interligados à membrana plasmática. Para que cada compartimento realize suas funções corretamente é necessário que aconteça a comunicação intracelular através do transporte vesicular ou tráfego vesicular. O tráfego vesicular permite que as proteínas específicas deste processo formem vesículas que se movem entre os compartimentos da célula, incluindo entre o exterior da membrana plasmática ⁶².

Dentre os compartimentos intracelulares, os lisossomos são os principais locais de degradação destas vesículas e o transporte pode ocorrer pela membrana plasmática através da via endocítica ou, do citoplasma, através da via autofágica ⁶³.

1.7.1 Autofagia

A autofagia é um processo celular evolutivamente conservado através do qual as proteínas ou organelas citoplasmáticas são sequestradas por vesículas de dupla membrana

conhecidas como autofagossomos, seguido de digestão mediada por lisossomos, levando a um estado de equilíbrio do metabolismo celular ^{64, 65}. Quando o mecanismo homeostático é interrompido, a autofagia também pode promover e acelerar várias doenças, incluindo o câncer. O processo autofágico envolve genes relacionados à autofagia, os *autophagy-related genes* (ATG) e é tipicamente dividido em etapas distintas: iniciação, nucleação, expansão e alongamento da membrana do autofagossomo, fusão com lisossomos e degradação intravesicular (Figura 4).

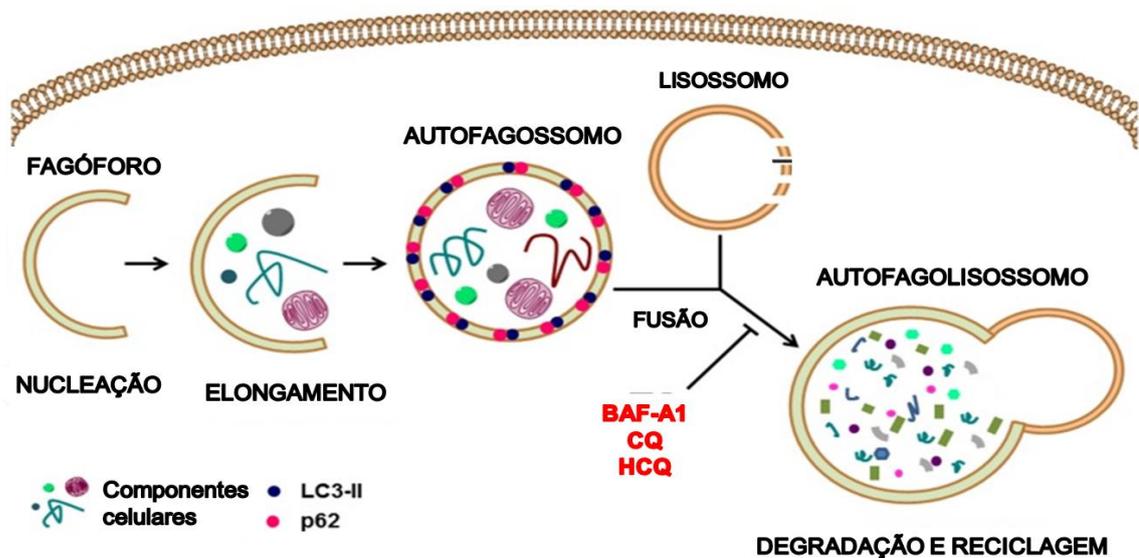


Figura 4. Representação do processo autofágico. O processo autofágico inicia-se com a nucleação, seguida da extensão e alongamento da membrana do autofagossomo e finaliza com a fusão do autofagossomo com o lisossomo formando um autofagolisossomo responsável pela degradação e reciclagem. (Adaptado de Racoma *et al.*, 2013) ⁶⁶.

Em células tumorais, a autofagia é ativada em resposta a estresses, incluindo falta de nutrientes e falta de fatores de crescimento, bem como a hipóxia ⁶⁷. Por outro lado, evidências mostraram que o processo de autofagia foi encontrado ativado em muitos tumores e que quando inibido pode levar tanto ao aumento da morte celular quanto o aumento da sobrevivência, dependendo do tipo de tecido, do grau do tumor e da terapêutica concomitante utilizada ^{68, 69}. A indução da morte celular autofágica tem sido proposta como um possível mecanismo de supressão tumoral, baseado na observação de que a apoptose ocorre concomitantemente com características de autofagia ⁷⁰, e que o estresse prolongado e progressiva autofagia podem levar à morte da célula ⁶⁷, removendo

organelas e proteínas danificadas e limitando o crescimento celular e instabilidade genômica⁷¹. Uma vez que a autofagia desempenha um papel dual e antagônico na tumorigênese, o desenvolvimento terapêutico tendo como alvo este processo requer uma compreensão clara da sua regulação. Embora os componentes moleculares básicos envolvidos na execução da autofagia estejam sendo investigados, as informações sobre vias de sinalização celulares são ainda limitadas, particularmente sobre as quinases que regulam este processo complexo.

Ressalta-se ainda que células de glioma são mais propensas a responder à agentes terapêuticos que induzem o processo autofágico do que aqueles que induzem a morte celular por apoptose³⁵. Drogas citotóxicas como, a temozolamida e a rapamicina, mais frequentemente empregadas na prática clínica no tratamento de gliomas, induzem o processo autofágico⁷². Assim a autofagia em gliomas representa, um mecanismo promissor que pode levar a novas terapias⁷³.

No que se diz respeito ao gene *WNK2* e autofagia, um estudo de Szyniarowski e colaboradores (2011)⁷⁴, utilizando uma linhagem de carcinoma mamário (MCF-7) demonstrou que entre 10 quinases que promovem autofagia, apenas o silenciamento de *WNK2* é capaz de resultar na maturação defeituosa de autofagossomos e inibir o fluxo autofágico. Por outro lado, Guo e colaboradores (2015)⁷⁵ utilizando células K562 de leucemia mielóide crônica, reportaram que o silenciamento de *WNK2* é capaz de promover um aumento significativo dos níveis de lipidação de LC3B-II, um importante marcador autofágico, sugerindo ainda que esta quinase interfere na fase inicial do fluxo autofágico. Assim, segundo este trabalho a presença de *WNK2* modula negativamente o processo autofágico. Neste sentido, a associação da proteína quinase *WNK2* com o processo autofágico é contraditória requerendo, portanto, uma melhor investigação.

2 JUSTIFICATIVA

Dada a importância dos mecanismos autofágicos na progressão tumoral, as promissoras respostas terapêuticas de gliomas a agentes que induzem o processo autofágico, bem como a recente e contraditória associação da proteína WNK2 com o processo autofágico, é de fundamental importância uma melhor caracterização dos mecanismos e do papel desta proteína no contexto do câncer e, em especial em gliomas, tumores de elevada taxa de mortalidade e resistência inata às opções terapêuticas atuais.

Este trabalho justifica-se pela busca do entendimento da proteína WNK2 no envolvimento com o tráfego vesicular autofágico e sua relação com a gliomagenese.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o papel da proteína WNK2 no tráfego vesicular autofágico em linhagens de glioma.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Identificar o perfil de expressão gênica de *WNK2* através de análises de bioinformática utilizando a base de dados *Oncomine* e o TCGA;

3.2.2 Padronizar e avaliar o perfil de metilação da região promotora, o perfil de expressão gênica e proteica de *WNK2* em um painel de linhagens comerciais e primárias de gliomas;

3.2.3 Avaliar o processo autofágico nas linhagens de gliomas editadas para *WNK2*;

3.2.4 Avaliar o efeito do quimioterápico temozolamida (TMZ) nas linhagens editadas para *WNK2*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análises *in silico*

O perfil de expressão gênica de *WNK2* foi inicialmente analisado a partir de análises *in silico* utilizando o banco de dados *Oncomine gene Browser software tool* (<http://www.oncomine.org>) na qual para as análises foram estabelecidos valor de $p < 0,0001$, *fold-change* = 2, e top 10% *gene rank*, utilizando a banco de dados *Sun Brain*. As análises de expressão também foram realizadas utilizando o banco de dados *cBioPortal for cancer genomics* (<http://www.cbioportal.org>)^{76, 77}. Foi realizada uma análise de correlação entre os dados de metilação e expressão de amostras de glioblastoma. Os dados de metilação e expressão foram obtidos do banco de dados TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) disponíveis em <http://tcga-data.nci.nih.gov/>. Acesso em 20/10/2018). Para metilação as amostras selecionadas da plataforma *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* ambas com dados no nível 3 (processados e normalizados) foram obtidos a partir da opção “Glioblastoma” no portal TCGA. Para a análise de correlação os valores médios de β de cada CpG foram usados na comparação com os valores de expressão do gene *WNK2* para cada amostra analisada.

4.2 Linhagens celulares

Neste trabalho, foram utilizadas: quatro linhagens comerciais de glioma, duas linhagens primárias de glioma obtidas a partir de tecidos tumorais remanescentes de pacientes do Hospital de Câncer de Barretos, as quais foram estabelecidas previamente pelo nosso grupo⁷⁸, uma linhagem proveniente de astrócito normal bem como uma linhagem comercial de câncer colorretal utilizada como controle positivo de expressão de *WNK2*^{54, 58}. Além do mais, para os ensaios da análise da expressão proteica utilizou-se uma linhagem proveniente de rim embrionário (Tabela 2). As linhagens comerciais foram obtidas a partir da coleção de culturas celulares Europeia (*European Collection of Cell Cultures- ECACC*) e Americana (*American Type Culture Collection- ATCC*). Analisamos também as linhagens A172 WT (*wild-type*), A172 EV (*empty-vector*) e A172 *WNK2* (*WNK2 overexpression*) cedidas gentilmente pelo Dr. Peter Jordan, INSA, Lisboa, e mantidas como previamente descrito por Moniz e colaboradores, 2013⁵⁴. A seleção e o cultivo das células A172 EV e A172 *WNK2* foi realizada pelo antibiótico Higromicina B (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De uma forma geral, as células foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco’s Modified Eagle Medium-Sigma*) e RPMI (*Roswell Park*

Memorial Institute – Sigma), suplementado com 10% SBF (Soro Bovino Fetal - Sigma) e 1% de P/S (Penicilina/estreptomicina - *Life Technologies*) em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² ou em placas de cultura, na densidade média de 1x10⁶/mL, a 37°C, 5% de CO₂ e 90% de umidade, até atingirem confluência. Após confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina 0,05%/EDTA 0,53 mM - *Triple Express* - *Life Technologies*), semeadas e mantidas nas condições descritas para os ensaios. A autenticação das linhagens foi realizada pelo laboratório de Diagnóstico no Hospital Câncer de Barretos (São Paulo, Brasil) a partir da análise pelo perfil de *short tandem repeat* (STR) do DNA ⁷⁹ assim como a identificação das culturas primárias ⁸⁰. As linhagens também foram testadas quanto a contaminação por micoplasma a partir do teste *MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit* – Lonza conforme recomendações do fabricante.

Tabela 2. Painel de linhagens celulares comerciais de diferentes subtipos histológicos e linhagens primárias de glioma utilizadas neste estudo.

Linhagens celulares	Subtipo histológico	Gênero	Idade	Obtenção das linhagens	Tipo tumoral
NHA	Astrócito Normal	Desconhecido	Desconhecido	ECACC	-
A172 WT	Glioblastoma (Grau IV)	Masculino	53	ECACC	Gliomas
A172 EV	Glioblastoma (Grau IV)	Masculino	53	Moniz <i>et al.</i> , 2013; Costa <i>et al.</i> , 2015	
A172 WNK2	Glioblastoma (Grau IV)	Masculino	53	Moniz <i>et al.</i> , 2013; Costa <i>et al.</i> , 2015	
SW1088	Astrocitoma anaplásico (Grau III)	Masculino	72	ATCC	
U-251 MG	Glioblastoma (Grau IV)	Masculino	75	ECACC	
U87-MG	Glioblastoma (Grau IV)	Masculino	44	ATCC	
HCB151 (primária)	Glioblastoma (Grau IV)	Masculino	65	Carloni, A.C. <i>et al.</i> 2017	
HCB2 (primária)	Glioblastoma (Grau IV)	Masculino	49	Carloni, A.C. <i>et al.</i> 2017	
SW480	Adenocarcinoma, tipo B	Masculino	50	ATCC	Colorretal
HEK293FT	Rim embrionário	-	Feto	ECACC	-

4.3 Avaliação do perfil de metilação e expressão do gene *WNK2*

4.3.1 Extração de DNA e RNA

As linhagens celulares cultivadas em frascos T25 foram lavadas com DPBS (Tampão Fosfato Dulbecco) e então adicionado o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com o qual foi realizada a extração de RNA seguindo as informações do fabricante. O DNA

das células foi extraído com um kit comercial *Biopur* conforme instruções do fabricante e ambas as amostras foram então ressuspensas em 20 µL de água ultrapura (MilliQ), quantificadas e qualificadas no espectrofotômetro NanoDrop®2000 (*ThermoScientific*).

4.3.2 Análise do padrão de metilação do DNA por pirosequenciamento.

O DNA genômico (1000 ng) foi submetido ao tratamento de conversão por bissulfato de sódio a partir do kit *EpiTect Bisulfite kit (Qiagen)*, conforme instruções do fabricante, levando à desaminação das citosinas não-metiladas em uracilas (que após a reação de PCR são convertidas em timinas), e mantendo as citosinas metiladas em citosinas. Em seguida, para quantificar o percentual de citosinas metiladas na região promotora do gene *WNK2*, rica em ilhas CpG, foi utilizada a metodologia do pirosequenciamento, no qual os resultados obtidos podem ser avaliados de maneira quantitativa. A técnica foi realizada conforme descrito por Siqueira e colaboradores, 2012⁸¹ utilizando o equipamento *PyroMark Q96 ID System (Qiagen)*. Os *primers* utilizados foram desenhados utilizando o software *PyroMark v.2.0.7 (Qiagen)* como descrito na Tabela 3 e os controles positivos e negativos da reação foram obtidos comercialmente através do kit *EpiTect PCR Control DNA (Qiagen)*. A análise foi realizada a partir de quatro sítios metilados presentes na região promotora. O *cutoff* estabelecido para classificar o perfil de metilação das linhagens foi definido da seguinte forma: linhagens que apresentaram um valor superior à 10% foram consideradas metiladas, e linhagens com valor inferior à 10% foram consideradas não metiladas⁸².

Tabela 3. Sequências dos *primers* utilizados na reação de pirosequenciamento.

<i>Primer</i>	Sequências <i>Forward</i> (5'-3')	Primer s1 (sequenciamento)	Sequências <i>Reverse</i> (5'-3')
<i>WNK2</i>	GTGACGATCCTGAAATCAA+Biotina	CCCTACTCAACCCCAAACACTAC	CAGTTTCTGGGGTCTTCCA

4.3.3 Análise da expressão gênica do gene *WNK2* por RT-PCR

O RNA extraído foi amplificado pela técnica de *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) qualitativa. Da concentração total, 500 ng foi utilizado para síntese do cDNA utilizando o kit *Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen)*. Todas as reações foram padronizadas para volume final de 15 µL, seguindo o protocolo: 0,3 µM de cada *primer* e 2,5

U da enzima *HotStarTaq Master Mix* (Qiagen). Todas as reações foram submetidas a 37 ciclos a 94°C/45 segundos, temperatura de anelamento 60°C/45 segundos, 72°C/1 minuto com denaturação inicial (94°C) de 5 minutos e extensão final (72°C) de 10 minutos para o gene *WNK2*. Para a β -actina utilizada como controle endógeno as reações foram submetidas a 37 ciclos à 94°C/45 segundos, temperatura de anelamento 57°C/45 segundos, 72°C/1 minuto com denaturação inicial (94°C) de 5 minutos e extensão final (72°C) de 10 minutos. Os *primers* iniciadores utilizados para cada gene estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados para as reações de RT-PCR para o gene *WNK2*.

<i>Primers</i>	Sequências <i>Forward</i> (5'-3')	Sequências <i>Reverse</i> (5'-3')	Exon	Tamanho dos Fragmentos (pb)
<i>WNK2</i>	GTGCACGATCCTGAAATCAA	CAGTTTCTTGGGGTCTTCCA	6	198
β -actina	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	3, 4	198

4.3.4 Análise da expressão gênica do gene *WNK2* por qRT-PCR

O RNA extraído foi amplificado pela técnica de *reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time* (qRT-PCR). Da concentração total, 500 ng foi utilizado para síntese do cDNA utilizando o kit *Superscript II reverse transcriptase* (Invitrogen). Posteriormente cada amostra de cDNA foi diluída 10X antes do uso. Todas as reações de PCR foram realizadas através do equipamento *QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System* - (*Thermo Fischer Scientific*), realizadas em duplicatas. Em cada reação foi utilizado 2 μ l de cDNA, 1X *Fast SYBR® Green Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA), 0,2 μ M de *primers* iniciadores conforme descrito no item 4.2.3, em um volume final de 25 μ l. A ciclagem da PCR foi composta por uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, amplificação com 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e temperatura de anelamento de 60°C por 60 segundos.

Todas as placas analisadas continham amostras do gene endógeno, consideradas como controles, cujos valores de CT deveriam ser os mesmos em todas as corridas. Além disso, um *threshold* pré-estabelecido foi utilizado nas reações. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o nível relativo de expressão do gene de interesse foi calculado usando a

equação matemática $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ⁸³. Essa equação permite calcular as mudanças na expressão gênica baseado nas diferenças entre a amostra referência (no caso uma amostra com ausência de expressão de WNK2) e as experimentais (demais linhagens), normalizadas por um gene calibrador (β -actina).

4.4 Análise da expressão proteica de WNK2 pela técnica de western-blot

Para análise da expressão da proteína WNK2 as células foram homogeneizadas em tampão contendo 50 mM Tris pH 7.6–8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 10 mM NaPirofosfato, 1% NP-40, suplementadas com um coquetel de inibidores de protease (1 mM DTT, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina hemissulfato, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, 1 mM PSMF, 1 mM EDTA) por 1 hora, seguido por centrifugação a 13.000 rpm a 4°C por 15 minutos. A quantificação das proteínas totais foi realizada utilizando o reagente *Bradford* (Bio-Rad), de acordo com instruções do fabricante. Em seguida, 30 μg do extrato total de proteínas de cada amostra foi separado por SDS-PAGE 10% e transferido para membranas de nitrocelulose (*Hybond-C™ Extra, Amersham Biosciences*).

Trabalhos recentes avaliaram a expressão da proteína WNK2 a partir de 3 anticorpos disponíveis comercialmente, sendo eles: 25910002 policlonal - NOVUSBIO ⁴⁸, SPT81 policlonal contra o peptídeo sintético WNK2 (¹²⁶⁴DTDAD RGSDPGTSP¹²⁷⁷) originado e purificado por afinidade pela empresa *Eurogentec*, Bélgica ^{51, 54, 58}, e epítipo V5-tag para imunoprecipitação ^{52, 53} e imunocitoquímica ⁵⁵. No entanto, os mesmos demonstraram baixa especificidade e alto *background* (comunicação pessoal). Neste projeto, portanto, avaliamos 3 novos anticorpos comerciais (Tabela 5). Para esta abordagem utilizamos os anticorpos primários específicos para WNK2 incubados com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBST nas suas respectivas diluições a fim de diminuir o *background*. Para confirmar a especificidade dos anticorpos a linhagem HEK293FT foi utilizada para transfecção das isoformas *WNK1*, *WNK2*, *WNK3* e *WNK4* conjugadas com uma *tag-myc* (gentilmente cedidas pelo Dr. Peter Jordan) e a expressão foi confirmada pelo anticorpo anti-*tag-myc* (diluição 1:1000 – *Cell signaling Technology*). Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (anti-*rabbit*) e a membrana foi revelada pelo método de quimioluminescência *ECL* (GE). A detecção do sinal quimioluminescente foi realizado no sistema de fotodocumentação *Image Quant LAS 4000 mini*. As bandas marcadas

foram analisadas e quantificadas a partir da densidade óptica utilizando o software *Image J*. Como controle endógeno foi utilizado a proteína α -tubulina.

Tabela 4. Anticorpos primários utilizados para validar expressão da proteína WNK2.

Anticorpo	Código	Isotipo	Fabricante	Diluição
anti-WNK2	ab28852 policlonal	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Abcam</i>	1/250
anti-WNK2	ab192397 policlonal	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Abcam</i>	1/250
anti-WNK2	07-2261 policlonal	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Millipore</i>	1/250
α -tubulina	#2144 monoclonal	<i>Mouse mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/2000

4.5 Análise do processo de autofagia por western-blot

As células A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 foram semeadas em placa de seis poços a uma densidade de 6×10^5 células/poço e deixadas a aderir pelo menos 24 horas. As células foram colocadas em *starvation* por 3 horas com meio DMEM 0,5% SFB e 1% de P/S. Em seguida, para as células controle, o meio de crescimento foi substituído por meio DMEM 10% SFB 1% P/S. Para avaliar o processo autofágico, as células foram tratadas com *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS - *Thermo Fisher Scientific*) e para bloquear o processo autofágico, 20 nM bafilomicina A1 (baf A1) – Sigma, foi adicionada ao EBSS. A baf A1 é um antibiótico que previne a maturação dos vacúolos autofágicos, inibindo a fusão entre os autofagossomos e os lisossomos. Além do mais, utilizando uma outra abordagem, foi adicionado as células 10 nM de everolimus que atua inibindo o *mammalian target of rapamycin* (mTOR) promovendo autofagia. As células foram incubadas com os respectivos tratamentos durante 4 e 6 horas. Em seguida, as células foram lavadas com DPBS 1X e homogeneizadas em tampão de lise celular e inibidores de protease, e então submetidas à análise de western blot, conforme descrito no item 4.2.5, utilizando os anticorpos primários descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Anticorpos primários utilizados para avaliar a via autofágica.

Anticorpo	Isotipo	Fabricante	Diluição
LC3A/B	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/1000
SQSTM1/p62	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/1000
p-p70S6K	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/1000
p-4EBP1	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/1000
p-mTOR	<i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/1000
β -actina	<i>Mouse mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/2000
α -tubulina	<i>Mouse mAb</i>	<i>Cell signaling</i>	1/2000

4.5.1 Análise do processo autofágico por imunofluorescência

As linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 foram semeadas em placas de vinte e quatro poços a uma densidade de $7,5 \times 10^5$ células/poço e deixadas a aderir pelo menos 24 horas. Posteriormente, as células foram colocadas em *starvation* por 3 horas com meio DMEM 0,5% SBF e 1% de P/S antes do tratamento. Em seguida, as células foram tratadas com 30 μ M de Cloroquina (*Chloroquine diphosphate*) - (*Molecular Probes, Invitrogen*) por 16 horas. De forma semelhante a baf A1, a cloroquina atua como um inibidor da fase tardia do fluxo autofágico, bloqueando a ligação dos autofagossomos com os lisossomos e alterando a acidez dos mesmos ⁸⁴. Após este tempo de tratamento, as linhagens foram incubadas com formaldeído 3,7% em DPBS por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em DBPS também por 15 minutos em temperatura ambiente. As células então foram incubadas com o anticorpo primário LC3, *rabbit polyclonal antibody – unconjugated* (*Molecular Probes, Invitrogen*) diluído em 5% de BSA (*Bovine Serum Albumin*) em DBPS por 2 horas em temperatura ambiente e em seguida com o anticorpo secundário *Alex Fluor 488 anti-rabbit* (*Life Technologies*) por 1 hora em temperatura ambiente. Por fim as células foram marcadas com HOECHST (diluição 1:2000 – *Life Technologies*) para coloração do núcleo e faloidina-rodamina (diluição 1:200 - *Molecular Probes*) para marcação dos filamentos de actina no citoesqueleto. As imagens foram adquiridas pela plataforma *High Content In cell Analyser 2200* (*GE Healthcare Life Sciences*) e a quantificação foi realizada no software *Image-Pro* (*Media Cybernetics*).

4.5.2 Análise do processo autofágico através dos plasmídeos mCherry-GFP-LC3B e mCherry-GFP-p62

Outra abordagem utilizada para avaliar o fluxo autofágico foi a transfecção com os plasmídeos pDest-mCherry-GFP-LC3B e pDest-mCherry-GFP-p62 conjugados em *tandem* cedidos gentilmente pelo Dr Guido Kroemer do *Centre de Recherche des Cordeliers*, França e desenvolvido pelo Dr Johansen Terje (*Molecular Cancer Research group, Institute of Medical Biology, University of Tromsø, Norway*) (Figura 5). Para este ensaio, as linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 foram semeadas em placas de seis poços a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poço e deixadas aderir pelo menos 24 horas. Posteriormente, as células foram transfectadas com 3 μg de cada plasmídeo utilizando *Lipofectamine reagent 3000* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após 5 horas o meio de transfecção foi substituído por meio de cultura fresco e as células foram incubadas por mais 24 horas. Em seguida, as células foram colocadas em *starvation* com a solução salina equilibrada de *Hanks* (HBSS - Invitrogen) por 4 horas antes do tratamento. Posteriormente, as células foram tratadas com 200 μM de baf A1 (Sigma- Aldrich) por 24 horas. Como controle interno de transfecção foram utilizados os plasmídeos pCi.neo_EGFP.clone2 com fluorescência verde e pcDNA3_mCherry com fluorescência vermelha, cedidos gentilmente pelo Dr Matias Melendez do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos, Brasil. Após 24 horas de tratamento as linhagens foram incubadas com HOECHST (diluição 1:2000 – *Life Technologies*) para marcação do núcleo. As imagens foram adquiridas pela plataforma *High content In cell analyser 2200* (GE Healthcare Life Sciences) e a quantificação foi realizada no software *Image-Pro* (*Media Cybernetics*).

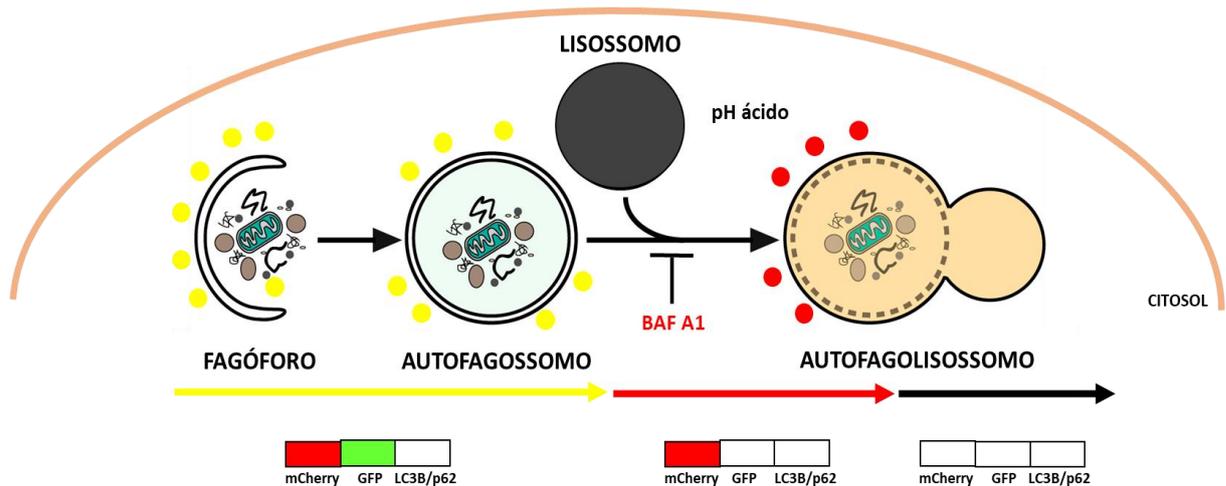


Figura 5. Representação esquemática do fluxo autofágico e o uso de plasmídeos em *tandem*. As proteínas, LC3B e p62 foram conjugadas em *tandem* com uma proteína mCherry que emite uma fluorescência vermelha, e uma proteína *green fluorescent protein* (GFP) que emite uma fluorescência verde. Em condições de pH neutro (autofagossomo) há expressão de ambas as proteínas sendo possível a visualização de uma fluorescência amarela (*merge*). Com a acidificação do meio (autolisossomo), a proteína GFP perde sua fluorescência sendo possível observar apenas a fluorescência vermelha da proteína mCherry. (Adaptado de Hansen *et al.*, 2011) ⁸⁵.

4.6 Determinação da viabilidade celular após restauração do gene *WNK2* na resposta à quimioterapia

O ensaio de viabilidade celular em solução aquosa, *Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega) foi utilizado, conforme descrito pelo fabricante, como um método colorimétrico para determinar o número de células viáveis após os tratamentos com TMZ e TMZ+baf A1. O ensaio MTS baseia-se na redução do composto de tetrazólio em cristais de formazano solúvel em meio de cultura. Essa conversão é realizada por enzimas desidrogenases mitocondriais em células que são metabolicamente ativas. O corante formazano é quantificado pela absorvância de 490-500 nm. Para este ensaio, 5×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços, tratadas com as concentrações crescentes de TMZ (25, 50, 100, 200, 500, 750, 1000 μM) e o veículo DMSO (regra 1% DMSO). Após 24 horas de tratamento com TMZ, as células foram tratadas com 20 nM de baf A1. Em seguida, após 72 horas de tratamento, 10 μL do reagente de MTS diluído em 90 μL de meio de cultura foi adicionado a cada poço e as células foram incubadas a 37°C durante 2 horas. A absorvância

foi mensurada em leitor de placa de ELISA (*Varioskan - Flash-Thermo Scientific*). Os resultados dos valores de absorbância foram convertidos em média de porcentagem \pm desvio padrão de viabilidade celular, sendo as células em presença do veículo (DMSO) utilizadas como controle, correspondendo a 100% de sobrevivência. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e duplicata experimental e, as análises de viabilidade celular e determinação da IC₅₀ (concentração inibitória de 50% das células) foi realizada por análise de regressão não-linear através do *software GraphPad PRISM* versão 5.

4.7 Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios foram expressos por média \pm desvio padrão, analisados de forma independentes por ANOVA seguido de *Tukey-Kramer*. Todas as análises citadas foram realizadas utilizando o *software GraphPad PRISM* versão 5. Um valor de $p < 0,05$ foi denotado como uma diferença significativa.

5 RESULTADOS

5.1 Análise *in silico* da expressão do gene *WNK2* em gliomas

A partir de uma análise *in silico* utilizando a ferramenta OncoPrint e dados do TCGA foi avaliado o perfil de expressão do gene *WNK2* em diferentes subtipos moleculares de gliomas. Foi observado que a expressão deste gene é reduzida em pacientes com glioblastomas (OMS - grau IV) quando comparado com os demais subtipos e com o tecido normal (Figura 6).

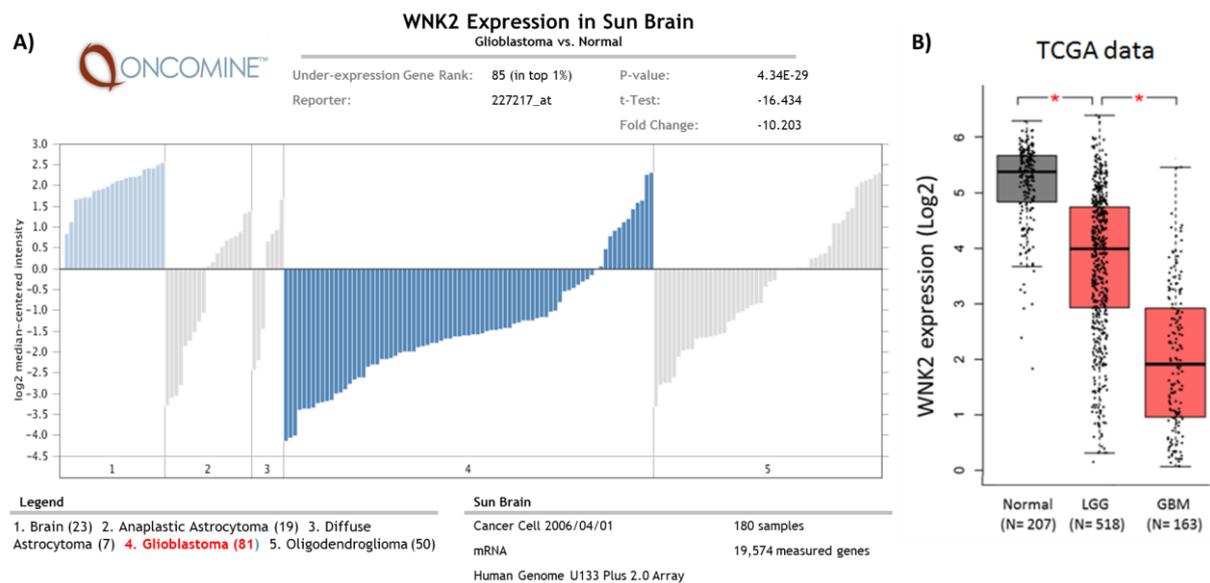


Figura 6. Análise *in silico* da expressão de *WNK2* em diferentes subtipos histológicos de gliomas. A) Expressão de *WNK2* em tecido normal e subtipos histológicos de gliomas utilizando a ferramenta *OncoPrint*. **B)** Expressão de *WNK2* em tecido normal, gliomas de baixo grau (LGG) e glioblastomas (GBM) em pacientes do banco de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

A fim de correlacionar o perfil de metilação com o perfil de expressão gênica, foi realizado uma análise de correlação. Os resultados demonstraram hipermetilação em sua região promotora, entretanto, não foi encontrada correlação com o perfil de expressão de RNAm, uma vez que a expressão de *WNK2* aparece aumentada em pacientes com a hipermetilação do gene (Figura 7).

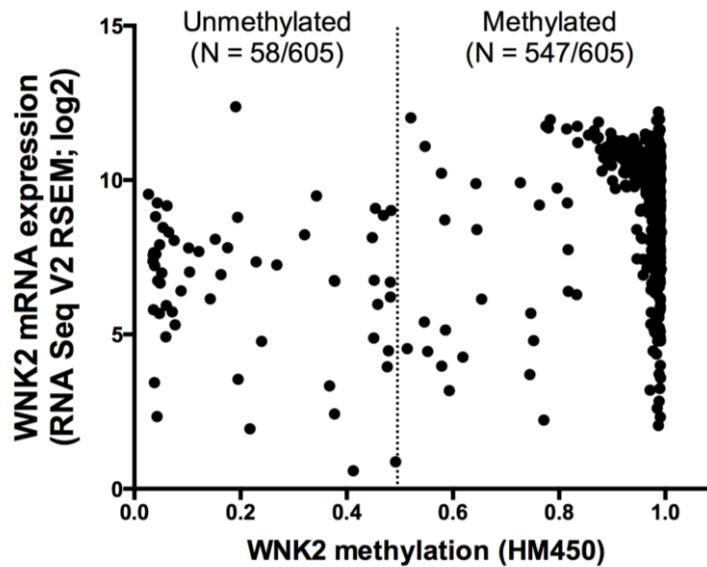
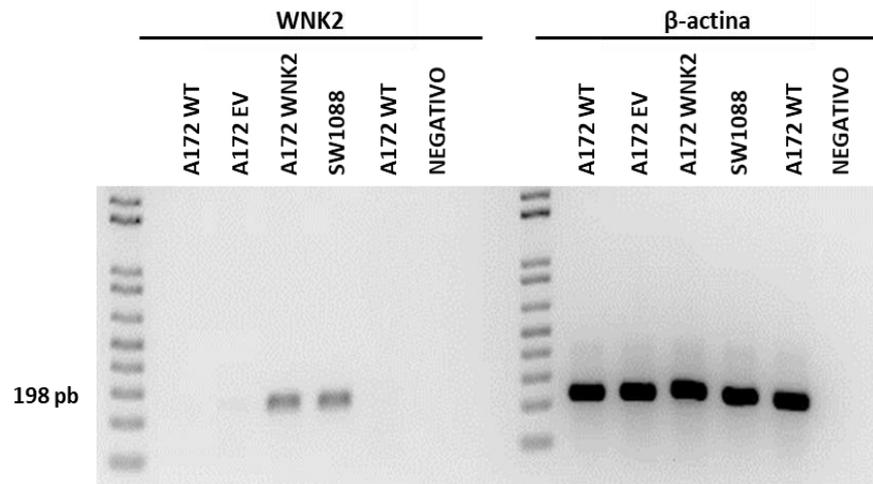


Figura 7. Correlação da expressão gênica de *WNK2* e o perfil de metilação da região promotora do gene. Os dados de expressão gênica (*cBioPortal for cancer genomics*) e metilação *Infinium® Human Methylation450 BeadChip* foram correlacionados. (Eixo x = metilação de *WNK2*. Eixo y = Expressão de RNAm de *WNK2*. N = 605 número total de pacientes incluindo gliomas de baixo e alto grau. O gráfico foi gerado a partir do *software R-Studio*.

5.2 Validação da superexpressão do gene *WNK2* por RT-PCR e qRT-PCR

As linhagens A172 WT, A172 EV e A172 *WNK2* utilizadas em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa^{54, 59} foram validadas quanto a superexpressão do gene *WNK2* a partir das técnicas de RT-PCR e qRT-PCR. Uma linhagem comercial de glioma, SW1088, conhecida por expressar *WNK2*^{54, 59} foi utilizada como controle de expressão (Figura 8).

A)



B)

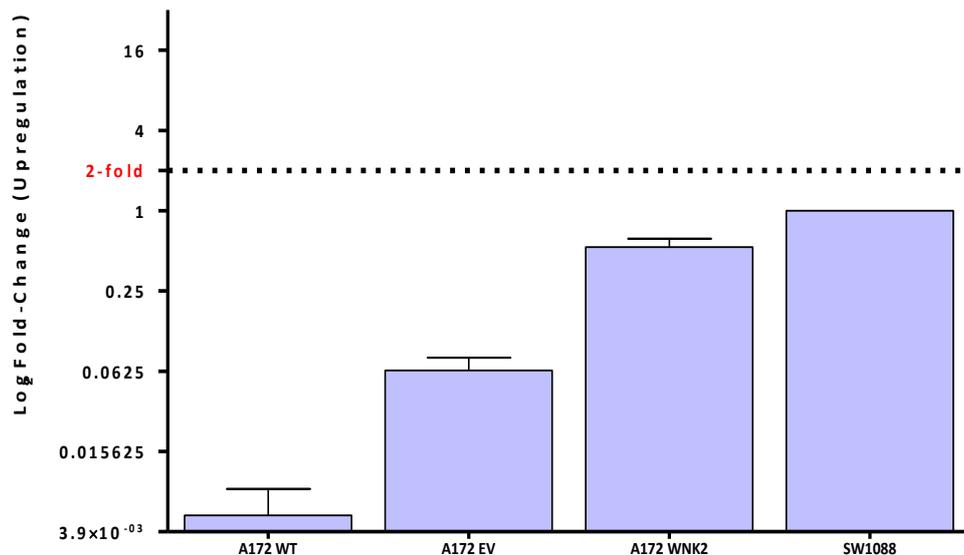


Figura 8. Validação da superexpressão de *WNK2* por RT-PCR e qRT-PCR. A) Detecção da expressão gênica de *WNK2* nas linhagens editadas utilizando RT-PCR. A linhagem SW0188 foi utilizada como controle positivo de expressão do gene *WNK2* enquanto a expressão do gene β -actina foi utilizada como controle endógeno. **B)** Detecção da expressão gênica de *WNK2* nas linhagens editadas utilizando qRT-PCR. A linhagem SW0188 foi utilizada como controle positivo de expressão do gene *WNK2* enquanto a expressão do gene β -actina foi utilizada como controle endógeno. Gráfico representativo de um único experimento realizado em duplicata técnica.

5.3 Perfil de metilação da região promotora do gene *WNK2* em linhagens comerciais e primárias de glioma

O perfil de metilação da região promotora do gene *WNK2* nas linhagens comerciais e primárias de gliomas foi avaliado através da abordagem do pirosequenciamento utilizando como critério um *cutoff* de 10% como mencionado no item 4.2.2. As linhagens primárias de glioma, HCB151 e HCB2, apresentaram uma média de 8% e 21% de metilação sendo consideradas não metilada e metilada, respectivamente. As linhagens comerciais de glioma, A172 e SW1088, apresentaram 95% e 52,6% de metilação, respectivamente. Outras linhagens comerciais de gliomas como U251 e U87-MG apresentaram 96% e 33% de metilação. A linhagem de astrócito normal humano apresentou 66,5%, enquanto a linhagem SW480 utilizada como controle positivo apresentou 2% de metilação (Figura 9). Os controles comerciais MET e UNMET foram utilizados e validados na reação estando em concordância com o *cutoff* determinado.

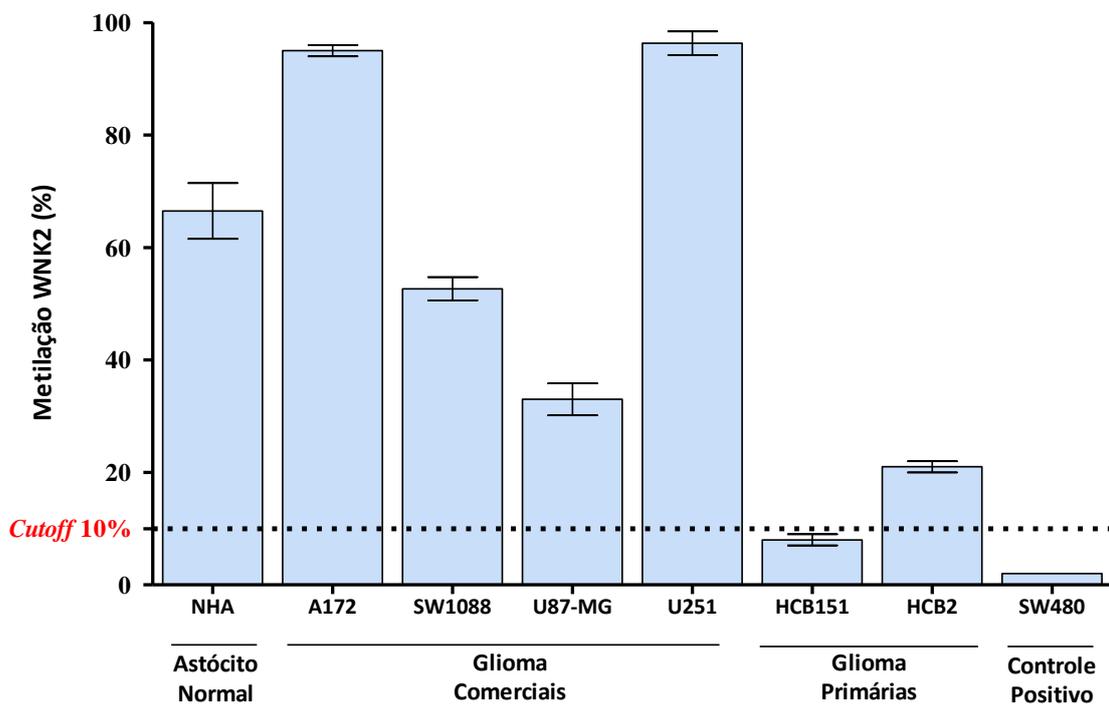


Figura 9. Avaliação do perfil de metilação da região promotora do gene *WNK2* por pirosequenciamento. Perfil de metilação do gene *WNK2* em linhagens de gliomas, comerciais e primárias, assim como em linhagem de cólon (SW480), considerada como controle positivo. Os valores representam a porcentagem média de 2 experimentos em duplicata técnica.

5.4 Expressão do gene *WNK2* em linhagens comerciais e primárias de glioma

A expressão do gene *WNK2* nas linhagens tumorais também foi avaliada utilizando a metodologia de qRT-PCR. A análise do nível de expressão deste gene foi realizada em relação a linhagem NHA por se tratar de uma amostra de astrócito normal, portanto apresentar a expressão de *WNK2* ^{54, 59}. Nossos resultados revelaram que a linhagem comercial de glioma U87-MG apresentou um nível de expressão do gene *WNK2* 5 vezes maior, enquanto a linhagem primária HCB151 e as linhagens comerciais de glioma, SW1088 e U251, apresentaram um aumento do nível de expressão de 50 a 200 vezes. Como esperado, a linhagem comercial de câncer de colorretal, SW480, utilizada como controle positivo apresentou uma expressão maior que 1500 vezes. Ainda como esperado, a linhagem primária HCB2 e a linhagem comercial A172 apresentaram um nível de expressão menor que o valor da linhagem NHA. A expressão do gene β -actina foi utilizada como controle interno (Figura 10).

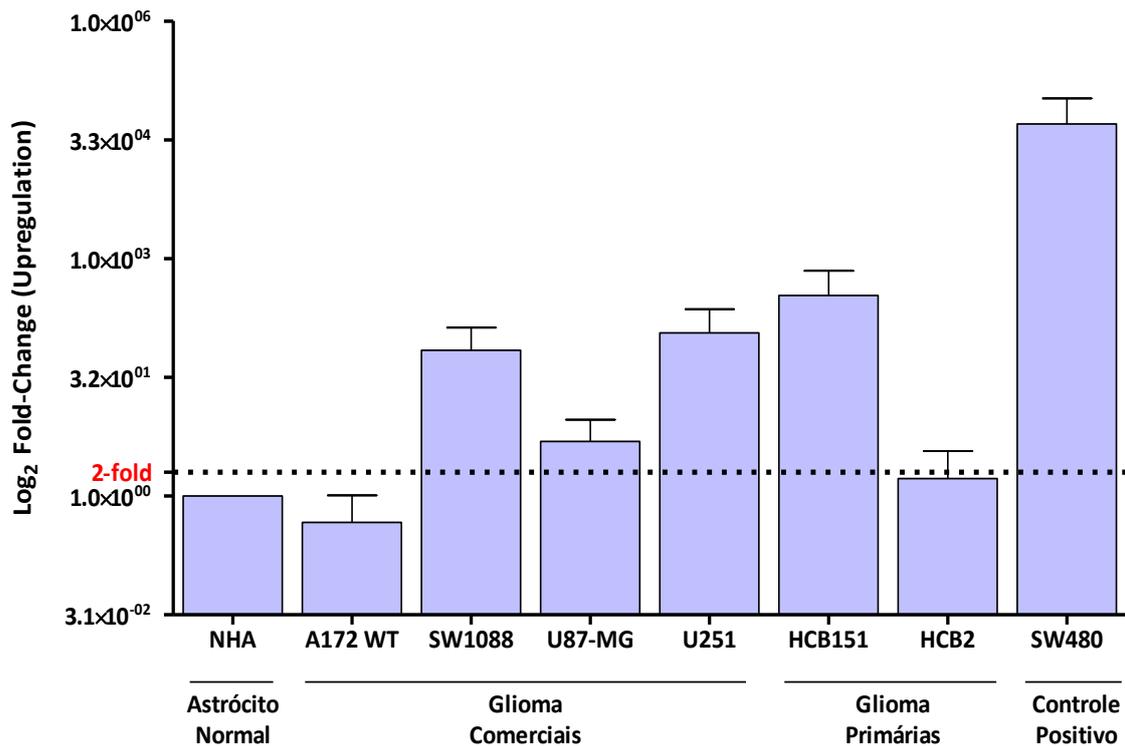


Figura 10. Avaliação dos níveis endógenos de expressão do gene *WNK2* por qRT-PCR. O nível de expressão do transcrito *WNK2* foi avaliado a partir da técnica de qRT-PCR em uma linhagem proveniente de astrócito normal humano (NHA), em linhagens comerciais (A172, SW1088, U87-MG, U251) e primárias (HCB151 e HCB2) de glioma, além de uma linhagem de

câncer de colorretal (SW480 - controle positivo). A expressão do gene β -actina foi utilizada como controle interno. O nível de expressão foi calculado usando a equação matemática $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ ⁸³. O experimento foi realizado uma única vez em duplicata técnica.

5.5 Padronização e avaliação da expressão da proteína WNK2

A expressão da proteína WNK2 foi avaliada nas linhagens editadas bem como nas linhagens comerciais e primária de glioma através da técnica de western-blot utilizando 3 novos anticorpos comerciais. Os resultados demonstraram que os 3 anticorpos testados apresentaram marcação para as outras isoformas WNKs (WNK1, WNK2, WNK3 e WNK4). Além do mais, não foi detectada a expressão da proteína endógena WNK2 na linhagem SW1088 utilizada como controle positivo. Da mesma forma, não foi possível validar a superexpressão da proteína WNK2 na linhagem A172 WNK2 com os anticorpos testados (Figura 11). A validação da expressão de WNK2 bem como das demais isoformas foi realizada a partir da marcação com o anticorpo *anti-tag myc* no extrato proteico da linhagem HEK293ft transfectada com as proteínas WNKs conjugadas com uma *tag-myc*. Cada marcação corresponde ao peso molecular de cada isoforma WNK (WNK1 = 251 kDa; WNK2 = 243 kDa; WNK3 = 192 kDa; WNK4 = 135 kDa). (Figura 11).

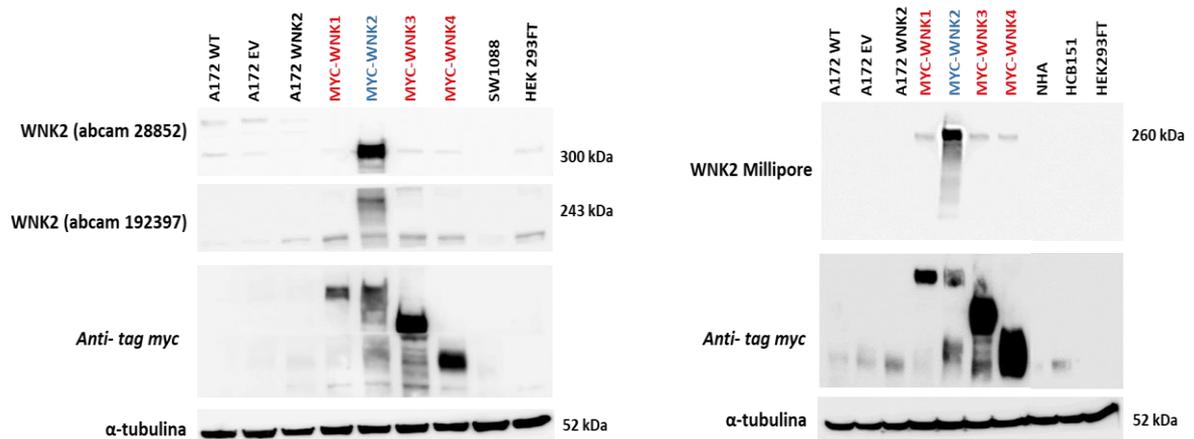


Figura 11. Detecção da expressão da proteína WNK2 nas linhagens editadas. A expressão proteica de WNK2 foi avaliada nas linhagens editadas A172 WT, EV e WNK2 por western-blot. As linhagens de glioma, SW1088 e HCB151 foram utilizadas como controle positivo de expressão da proteína WNK2. A linhagem HEK293FT foi transfectada com plasmídeos contendo as isoformas *WNK1*, *WNK2*, *WNK3* e *WNK4* conjugadas com uma *tag-myc*. Foram utilizados 3 anticorpos comerciais anti-WNK2 propostos pelo estudo (abcam 28852, abcam

192397 e 07-2261 Millipore). Após o *stripping* das membranas foi utilizado o anticorpo *anti-tag-myc* (*Cell signaling*) para validar a expressão das demais isoformas WNK. A proteína α -tubulina foi utilizada como controle endógeno.

Outras linhagens também foram utilizadas para avaliar a expressão proteica de WNK2. A linhagem de câncer de colorretal, SW480, utilizada como controle positivo apresentou marcação da expressão da proteína WNK2 apenas com o anticorpo da *Millipore*. As linhagens de glioma, HCB151 e U251, apresentaram marcação com o anticorpo da *Abcam* 192397 enquanto a linhagem U87-MG apresentou marcação da expressão da proteína WNK2 com todos os anticorpos testados (Figura 12). Estes achados demonstram que estes três anticorpos não são específicos para detectar a proteína endógena de WNK2 de maneira concordante nas linhagens testadas.

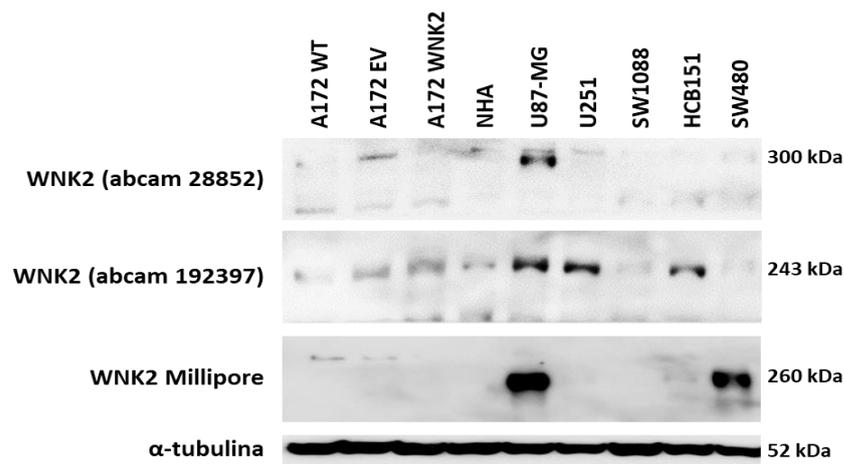


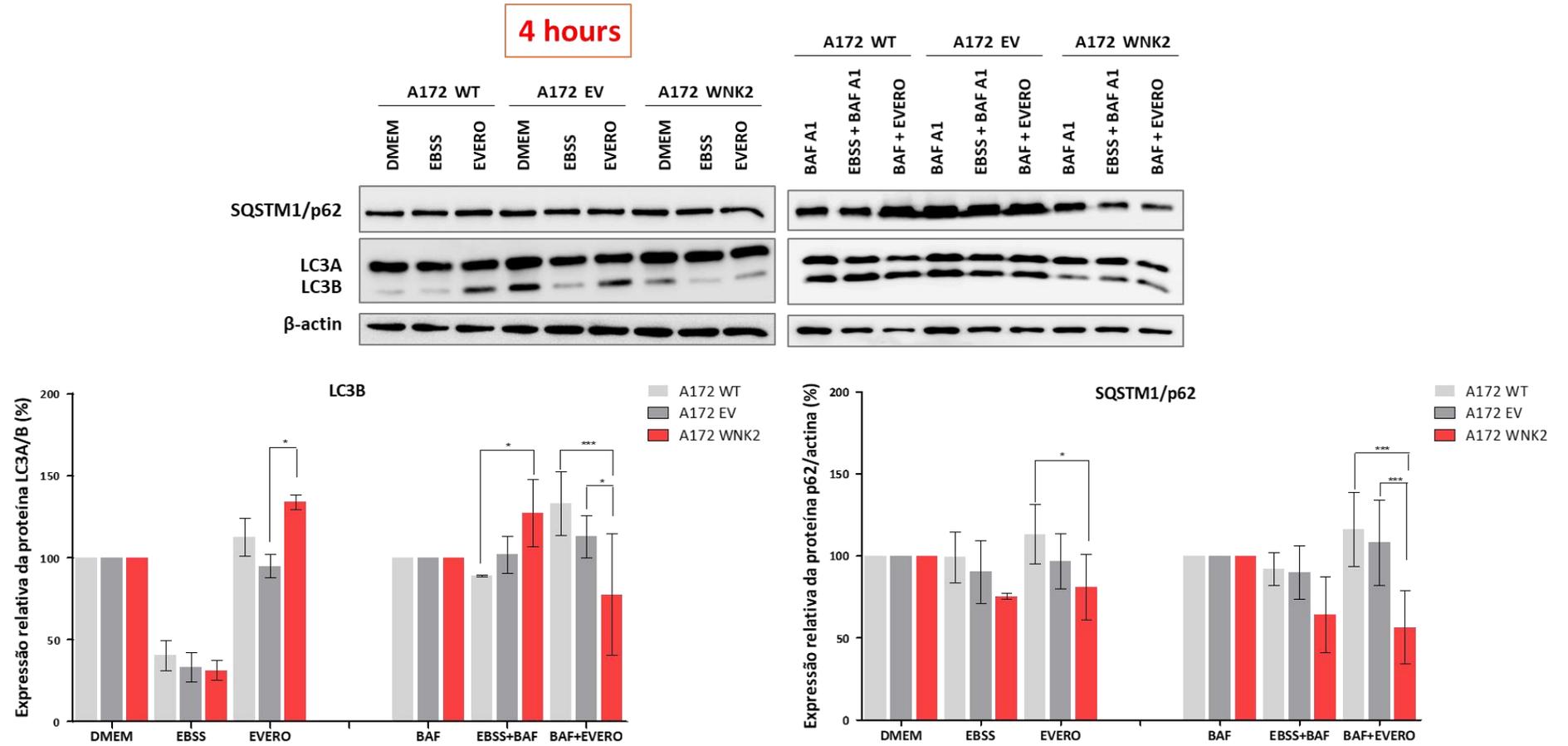
Figura 12. Detecção da expressão da proteína WNK2 em linhagens tumorais. A expressão proteica de WNK2 foi avaliada nas linhagens A172 WT, EV e WNK2, nas linhagens comerciais de glioma (U87-MG, U251, SW1088) e na linhagem primária de glioma (HCB151) por western-blot. A expressão endógena de WNK2 na linhagem de astrócito normal (NHA) e na linhagem de câncer colorretal (SW480) também foi avaliada. Utilizou-se 3 anticorpos comerciais propostos pelo estudo (abcam 28852, abcam 192397 e 07-2261 *Millipore*). A proteína α -tubulina foi utilizada como controle endógeno.

5.6 Avaliação do processo autofágico nas linhagens editadas

O envolvimento do gene WNK2 no fluxo autofágico foi avaliado por western blot a partir dos principais marcadores preconizados pelo *Guidelines for the use and interpretation*

of assays for monitoring autophagy (3rd edition) ⁸⁶: a proteína LC3 (*microtubule associated protein light chain 3*) e a proteína p62 (SQTM1/p62) utilizando as linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2. Os resultados demonstraram que a restauração de WNK2 na linhagem A172 diminui de maneira significativa a lipidação da proteína LC3B e expressão dos níveis de p62 após tratamento combinatório de baf A1 (inibidor) e everolimus (indutor) do fluxo autofágico após 4 e 6 horas de tratamento (Figura 13).

A)



B)

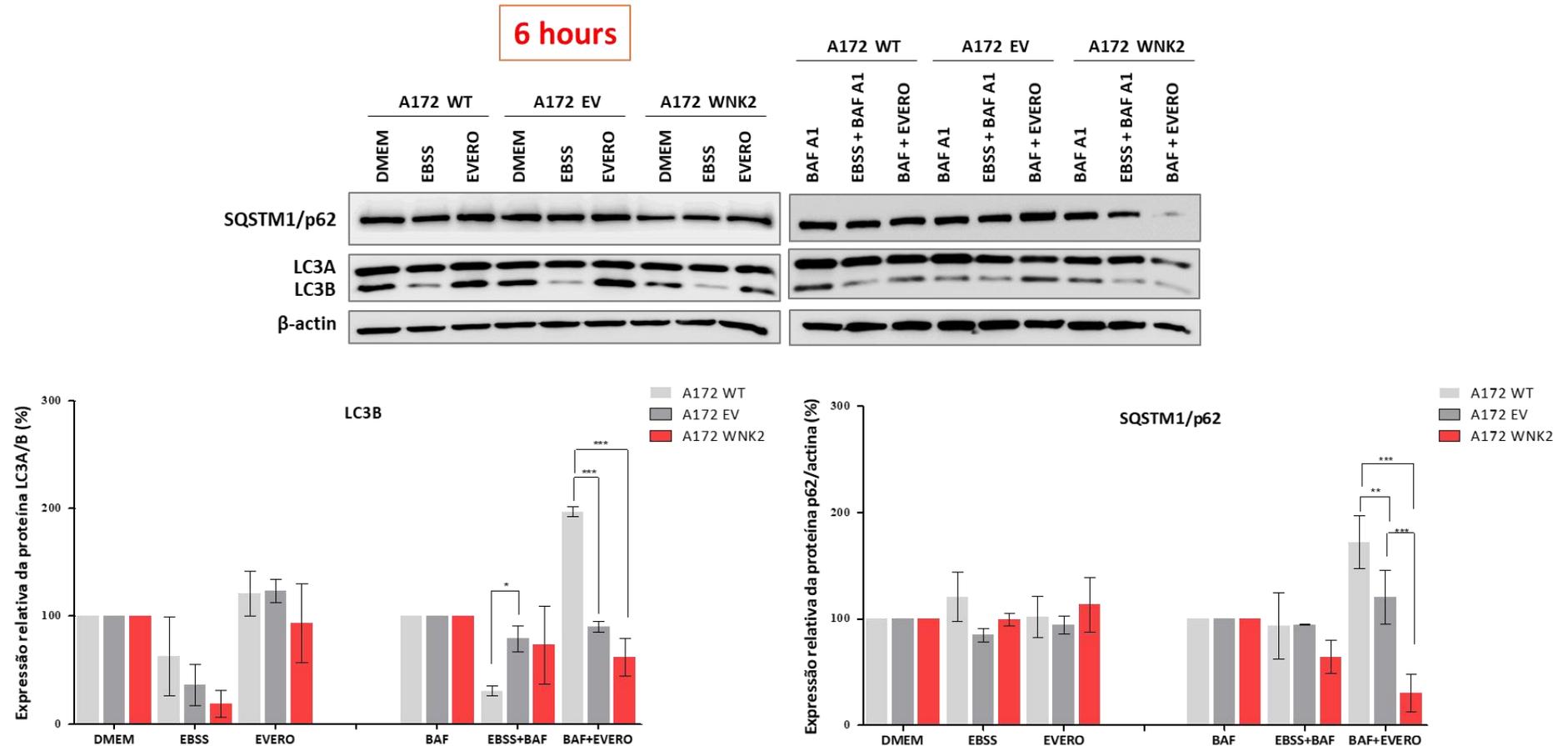
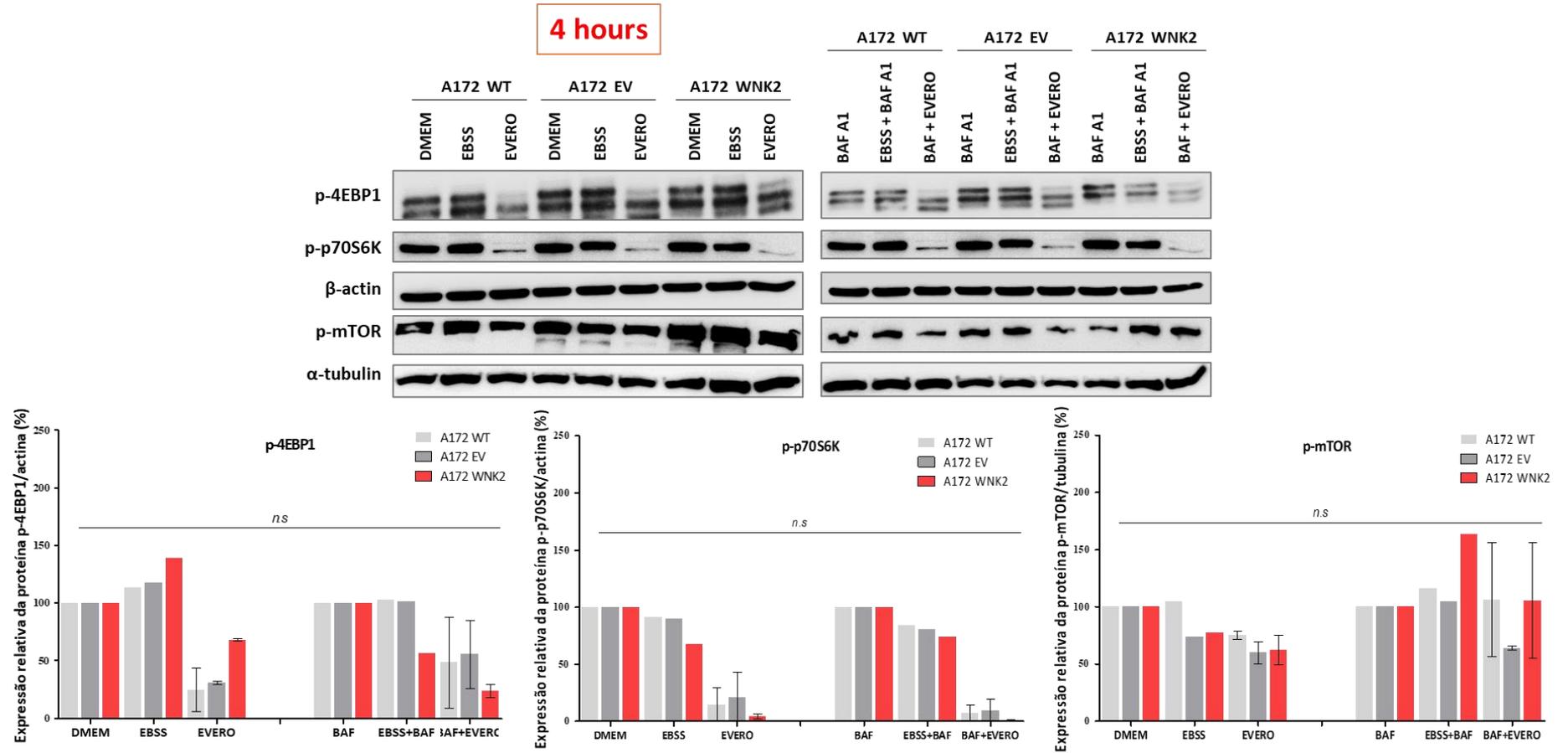


Figura 13. Avaliação das proteínas LC3B e p62 por western-blot. A) As linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 foram tratadas com bafilomicina A1 (20 nM) e everolimus (10 nM) por 4 horas. O extrato proteico foi avaliado quanto a expressão das proteínas LC3A/B, SQSTM1/p62 por western-blot. **B)** Linhagens editadas tratadas com bafilomicina A1 (20 nM) e everolimus (10 nM) por 6 horas. O extrato

proteico foi avaliado quanto a expressão das proteínas LC3A/B, SQSTM1/p62 por western-blot. Os gráficos da expressão das proteínas LC3B/LC3A e p62 são representativos de quatro experimentos biológicos independentes. A proteína α -tubulina foi utilizada como controle endógeno. Os asteriscos significam (*) $p=0,05$; (**) $p=0,005$; (***) $p=0,0005$.

Uma vez que o everolimus, um inibidor da via de mTOR foi utilizado em combinação com o tratamento com baf A1, as proteínas pertencentes a esta via, foram avaliadas por western blot após 4 e 6 horas. Os resultados revelaram que a combinação dos tratamentos não demonstrou alterações em mTOR fosforilado e seus efetores na linhagem editada para WNK2 quando comparada ao controle WT e EV (Figura 14), sugerindo que o mecanismo de inibição do fluxo autofágico na presença de WNK2 é independente da via de mTOR.

A)



B)

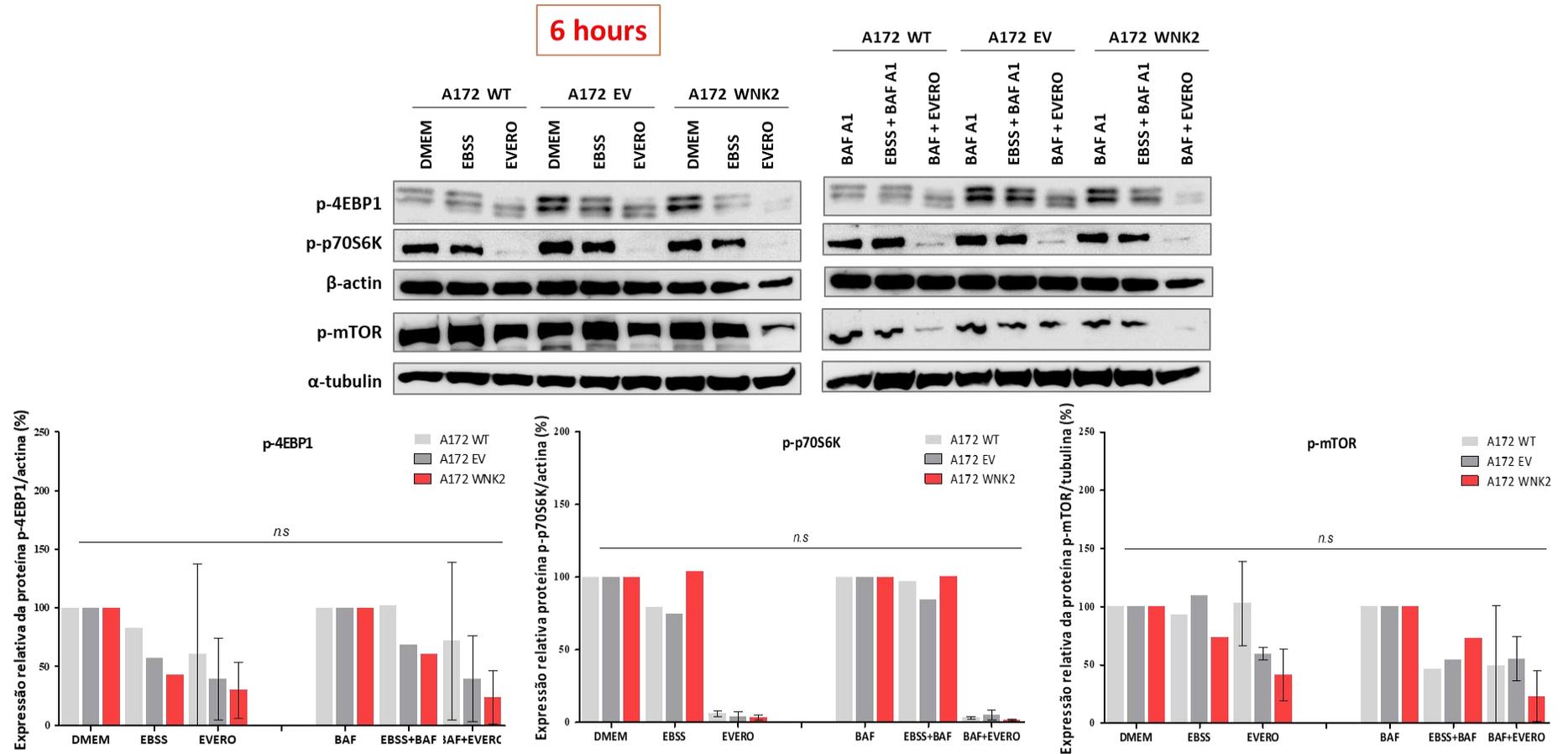
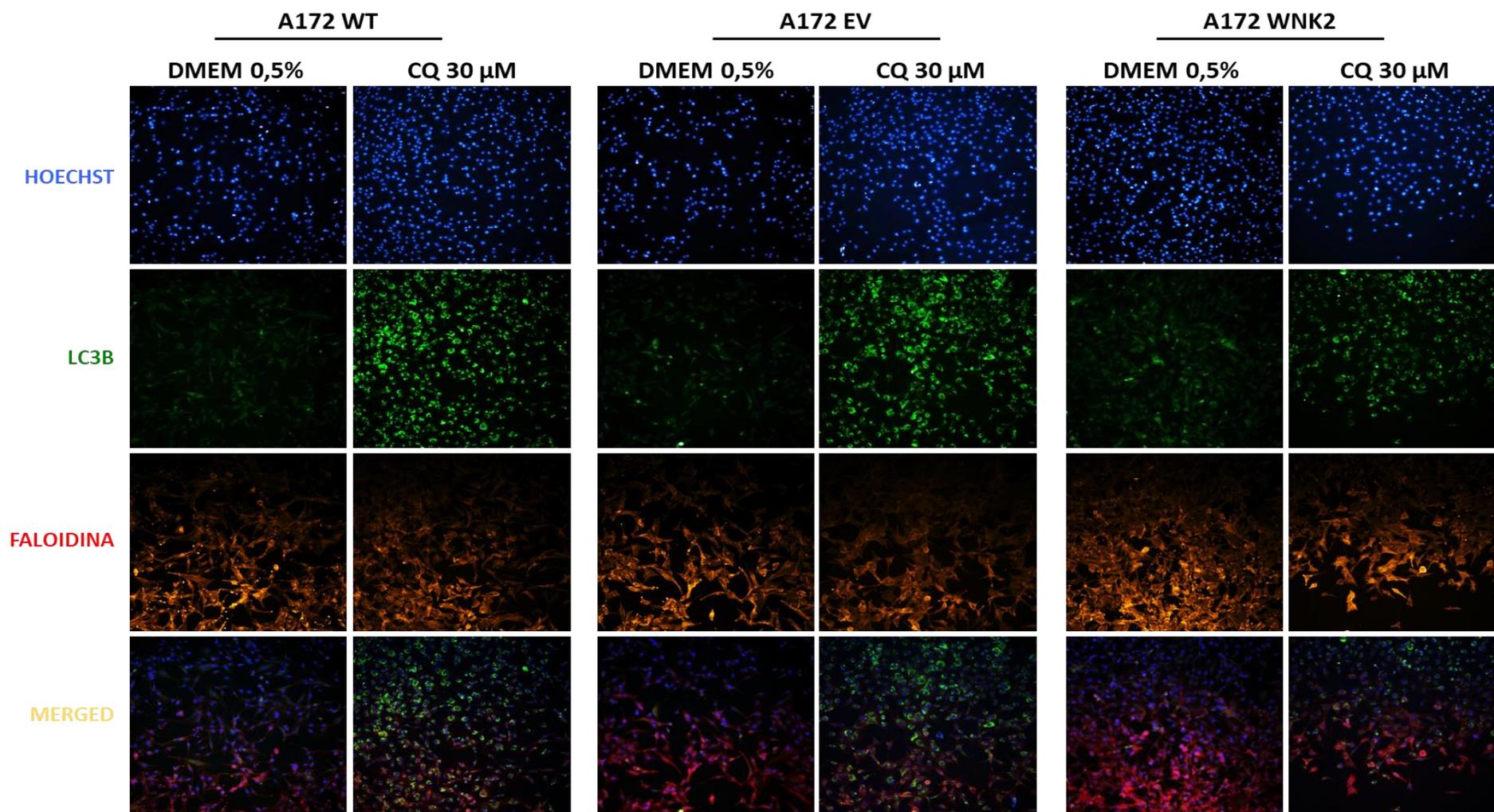


Figura 14. Avaliação das proteínas envolvidas na via de mTOR por western-blot. A) As linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 foram tratadas com bafilomicina A1 (20 nM) e everolimus (10 nM) por 4 horas. O extrato proteico foi avaliado quanto a fosforilação dos cofatores p-p70S6K, p-4EBP1 e p-mTOR por western-blot. **B)** Linhagens editadas tratadas com bafilomicina A1 (20 nM) e everolimus (10 nM) por 6 horas. O

extrato proteico foi avaliado quanto a fosforilação dos cofatores p-p70S6K, p-4EBP1 e p-mTOR por western-blot. Os gráficos são representativos de dois experimentos biológicos independentes. A proteína α -tubulina foi utilizada como controle endógeno. *N.S* = Não significativo.

Ainda com o objetivo de avaliar o fluxo autofágico nas linhagens editadas, utilizou-se o tratamento com o bloqueador autofágico cloroquina (CQ) (30 μ M). Os resultados sugerem uma tendência a redução da lipidação de LC3B na linhagem A172 WNK2 após 16 horas de tratamento com CQ corroborando com os resultados evidenciados por western-blot. Entretanto, a análise de um experimento biológico não revelou significância estatística conforme evidenciado no gráfico (Figura 15).

A)



B)

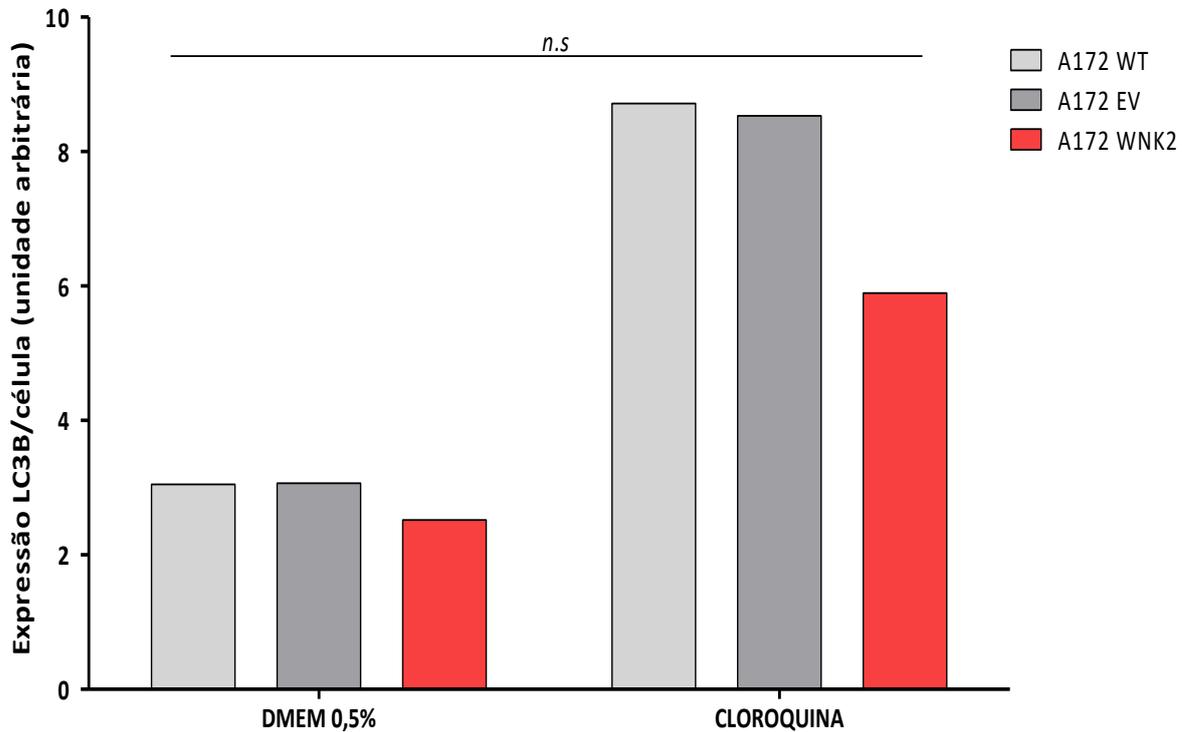


Figura 15. Avaliação do efeito da restauração do gene *WNK2* no processo autofágico após o tratamento com cloroquina (CQ). **A)** As linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 foram tratadas com DMEM 0,5% SFB + 1% S/P e DMEM 0,5% SFB + 1% S/P + 30 μ M de Cloroquina por 16 horas, após *starvation* de 3 horas. As imagens foram adquiridas em comprimentos de ondas DAPI (azul, núcleo), FITC (verde, vesículas) e CY3 (laranja, citoplasma) pela plataforma *In cell Analyzer*. **B)** Gráfico representativo da quantificação de vesículas LC3B na condição controle e tratadas com CQ por 16 horas. As imagens foram quantificadas utilizando o *software Image-Pro*. O gráfico é referente a um experimento biológico. n.s = Não significativo.

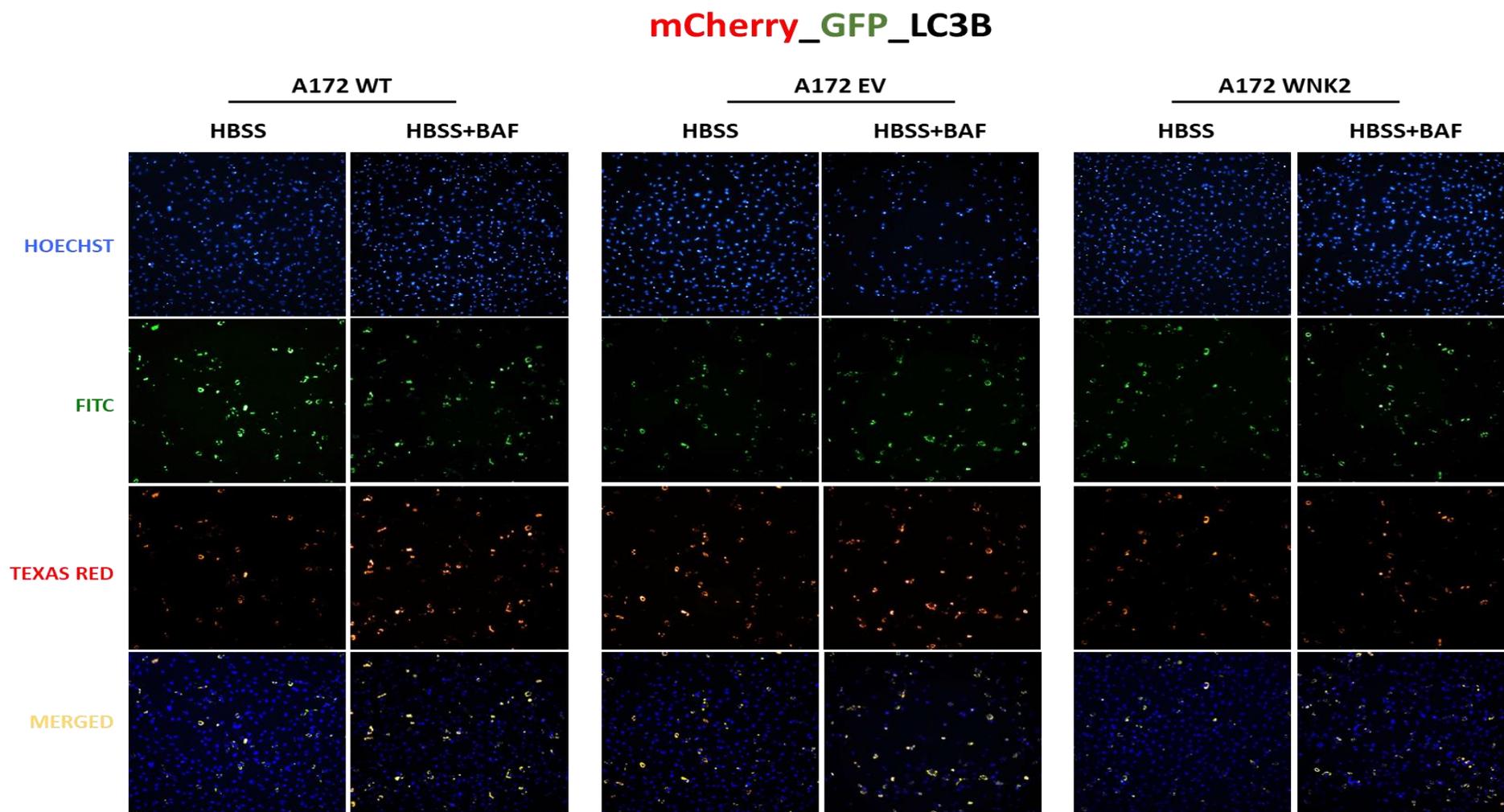
Outra abordagem utilizada para avaliar o fluxo autofágico nas linhagens editadas foi a transfecção de plasmídeos pDest.mCherry-GFP-LC3B e pDest.mCherry-GFP-p62 conjugados em *tandem*, os quais utilizam como princípio, a sensibilidade das proteínas GFP (sensível) e mCherry (insensível) ao pH intracelular⁸⁷ (Figura 5).

O aumento da quantidade de células que emitem fluorescência verde e vermelha (*merge* - amarelo) na condição de tratamento HBSS+baf A1 é esperado e é decorrente do bloqueio do fluxo autofágico pela baf A1, que impede a fusão dos autofagossomos com os

lisossomos. Foi demonstrado que a restauração de WNK2 na linhagem A172 não altera o fluxo autofágico, evidenciado pela marcação de *punctas* de mCherry-GFP-LC3B vermelhas e amarelas na condição HBSS+baf A1 quando comparado com as linhagens A172 WT e A172 EV. Embora as imagens demonstrem uma tendência a redução, estes achados não revelaram significância estatística conforme evidenciado no gráfico (Figura 16).

Por outro lado, a expressão de *punctas* mCherry-GFP-p62 vermelhas e amarelas na condição tratada com HBSS+baf A1 na linhagem WNK2 foi reduzida quando comparado com as linhagens controles A172 WT e A172 EV. A diminuição foi considerada estatisticamente significativa tanto para as linhagens WT e WNK2, quanto para EV e WNK2 (Figura 17).

A)



B)

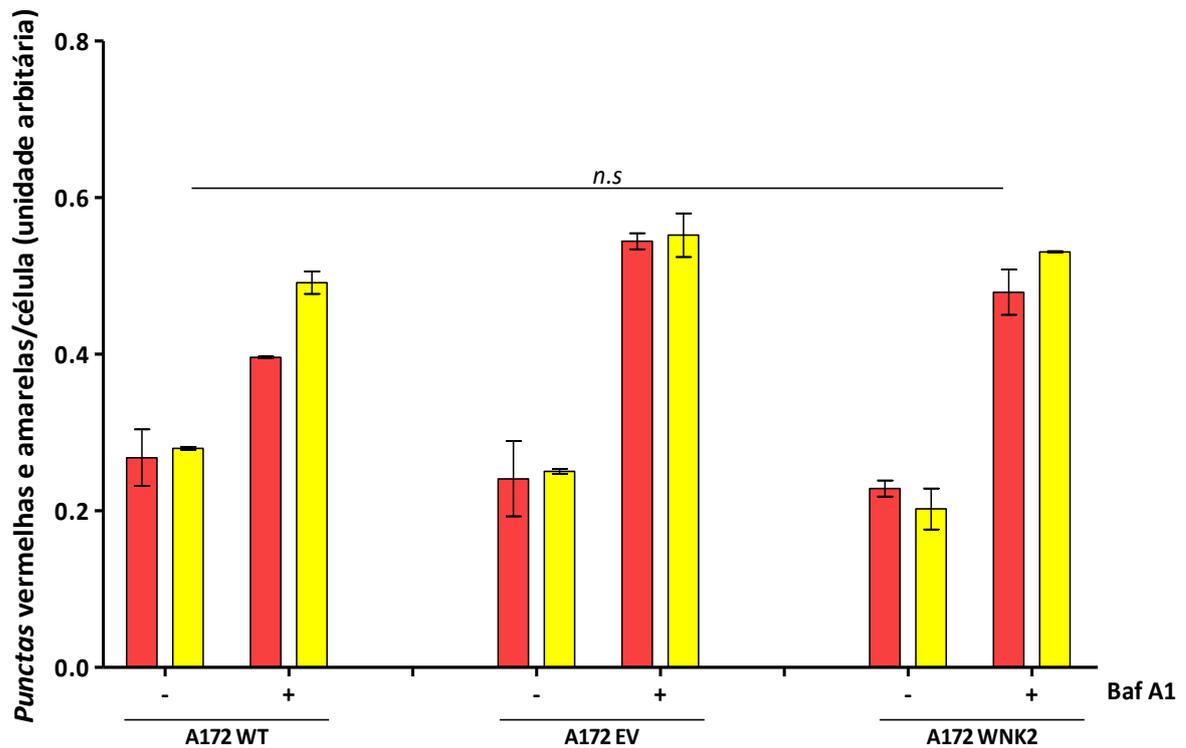
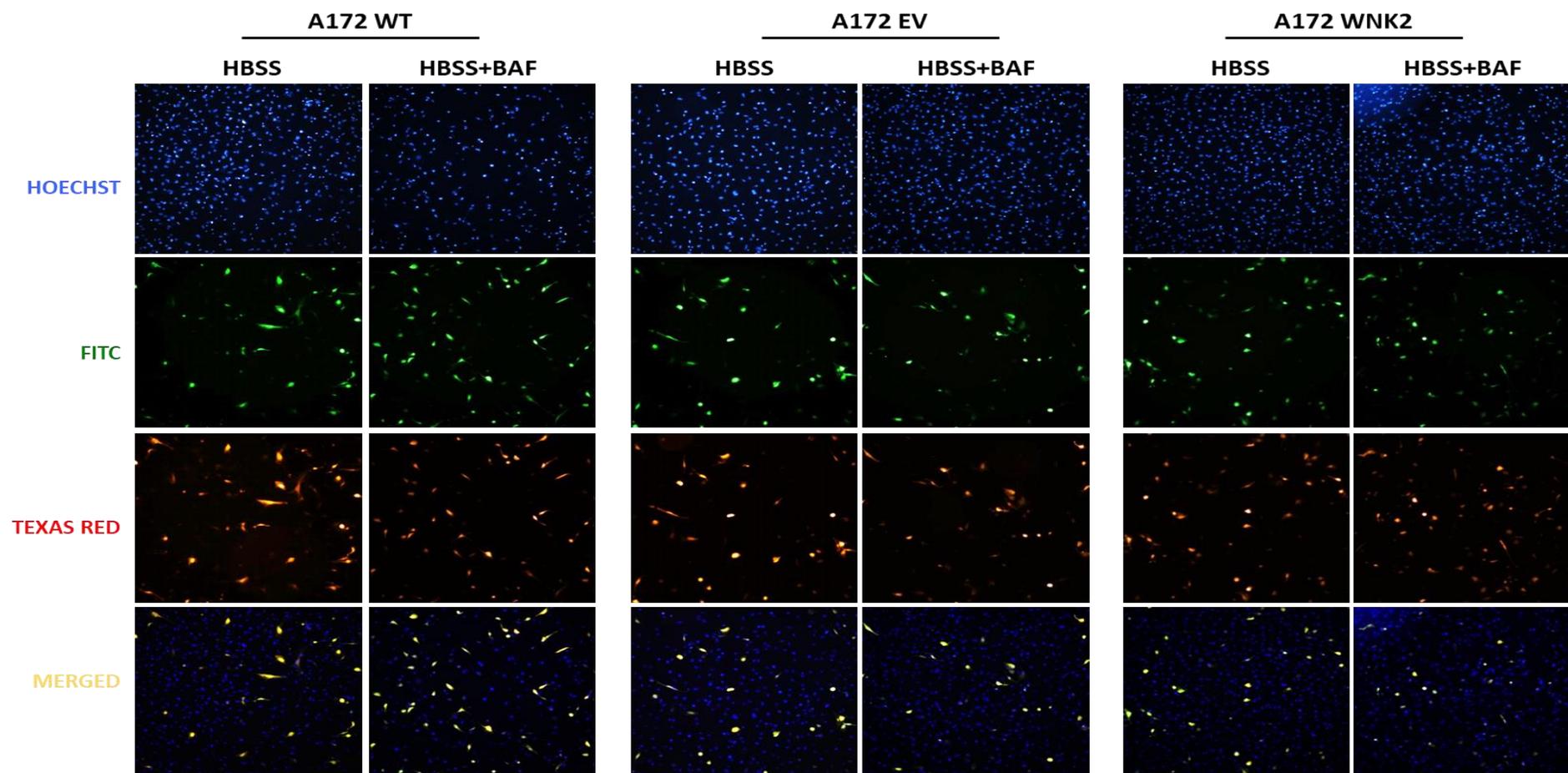


Figura 16. Avaliação de LC3B utilizando o plasmídeo pDest.mCherry-GFP-LC3B. A) Figura representativa do ensaio de transfecção com o plasmídeo pDest.mCherry-GFP-LC3B nas linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 após 24 horas de tratamento com baf A1. Hoechst (DAPI) indica fluorescência azul. FITC indica fluorescência verde. Texas Red indica fluorescência vermelha e *MERGE* indica a junção de todas as fluorescências. **B)** Gráfico representativo do número de vesículas autofágicas lisossomais mCherry (vermelhas) e autofagossômicas GFP+mCherry (amarelas). As imagens foram quantificadas utilizando o *software Image-Pro*. Média de dois ensaios independentes. n.s = Não significativo.

A)

mCherry_GFP_p62

B)

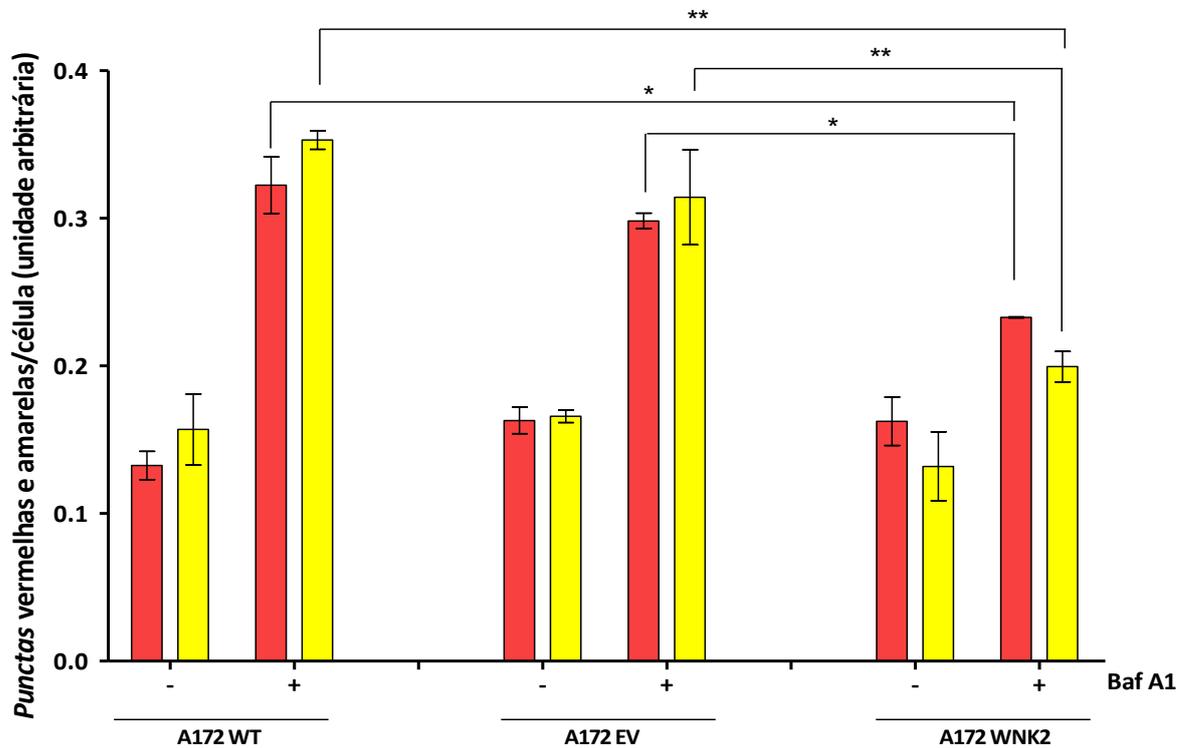


Figura 17. Avaliação de p62 utilizando o plasmídeo pDest.mCherry-GFP-p62. A) Figura representativa do ensaio de transfecção com o plasmídeo pDest.mCherry-GFP-p62 nas linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2 após 24 horas de tratamento com bafilomicina A1. Hoechst (DAPI) indica fluorescência azul. FITC indica fluorescência verde. Texas Red indica fluorescência vermelha e *MERGE* indica a junção de todas as fluorescências. **B)** Gráfico representativo do número de vesículas autofágicas lisossomais mCherry (vermelhas) e autofagossômicas GFP+mCherry (amarelas). As imagens foram quantificadas utilizando o *software Image-Pro*. Média de dois ensaios independentes. Os asteriscos significam (*) $p=0,05$; (***) $p=0,005$.

5.7 Avaliação do efeito da restauração do gene *WNK2* na resposta a quimioterapia

Para avaliar o impacto terapêutico da restauração do gene *WNK2*, as linhagens foram tratadas com o quimioterápico, TMZ, e avaliadas quanto à viabilidade celular. A linhagem com a expressão de *WNK2* restaurada (A172 WNK2) demonstrou um valor de IC_{50} quase 5 vezes superior a linhagem controle A172 WT e 2 vezes superior a linhagem A172 EV (Tabela 6) (Figura 18).

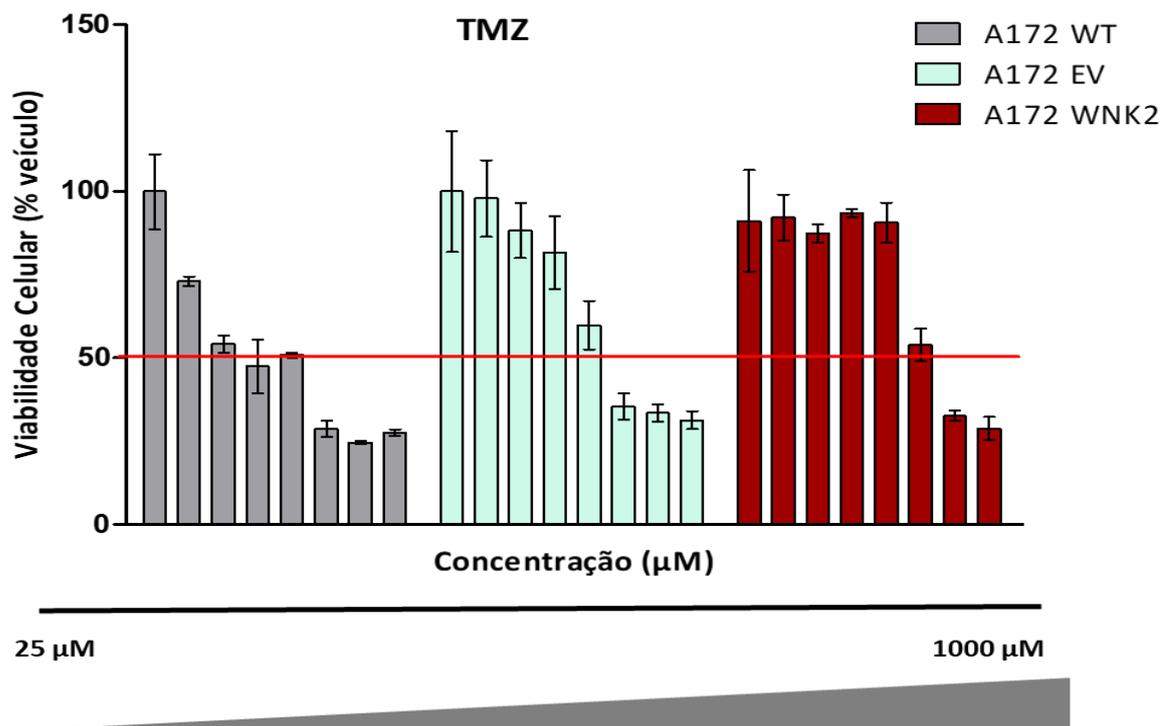


Figura 18. Avaliação do efeito do tratamento com TMZ nas linhagens (A172 WT e A172 EV e A172 WNK2). As linhagens (A172 WT e A172 EV e A172 WNK2) foram tratadas com TMZ em concentrações de 25 a 1000 μM. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas a partir do ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média ± desvio padrão de viabilidade de células relativo ao DMSO (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de dois ensaios realizado em triplicata.

Tabela 6. Média dos valores de IC₅₀ para o quimioterápico TMZ nas linhagens A172 WT, A172 EV e A172 WNK2.

Média dos valores de IC ₅₀ (μg/mL)			
Quimioterápico	A172 WT	A172 EV	A172 WNK2
TMZ	129.3	321.8	548.0

Vários estudos têm evidenciado que a inibição da autofagia é capaz de sensibilizar as células para o tratamento com TMZ em gliomas^{35, 88-90}. A partir deste princípio, as linhagens editadas foram tratadas com TMZ e, após 24 horas o inibidor da fase tardia do fluxo autofágico, baf A1, foi adicionado por mais 48 horas. Os resultados revelaram que o tratamento combinado com a baf A1 também foi capaz de sensibilizar a linhagem A172

WNK2 ao quimioterápico TMZ não sendo possível calcular o valor de IC₅₀ para três linhagens a partir das doses utilizadas. Entretanto, quando tratada a linhagem A172 WNK2 sugere um perfil mais resistente da curva-resposta ao tratamento comparada as demais linhagens (A172 WT e A172 EV) (Figura 19).

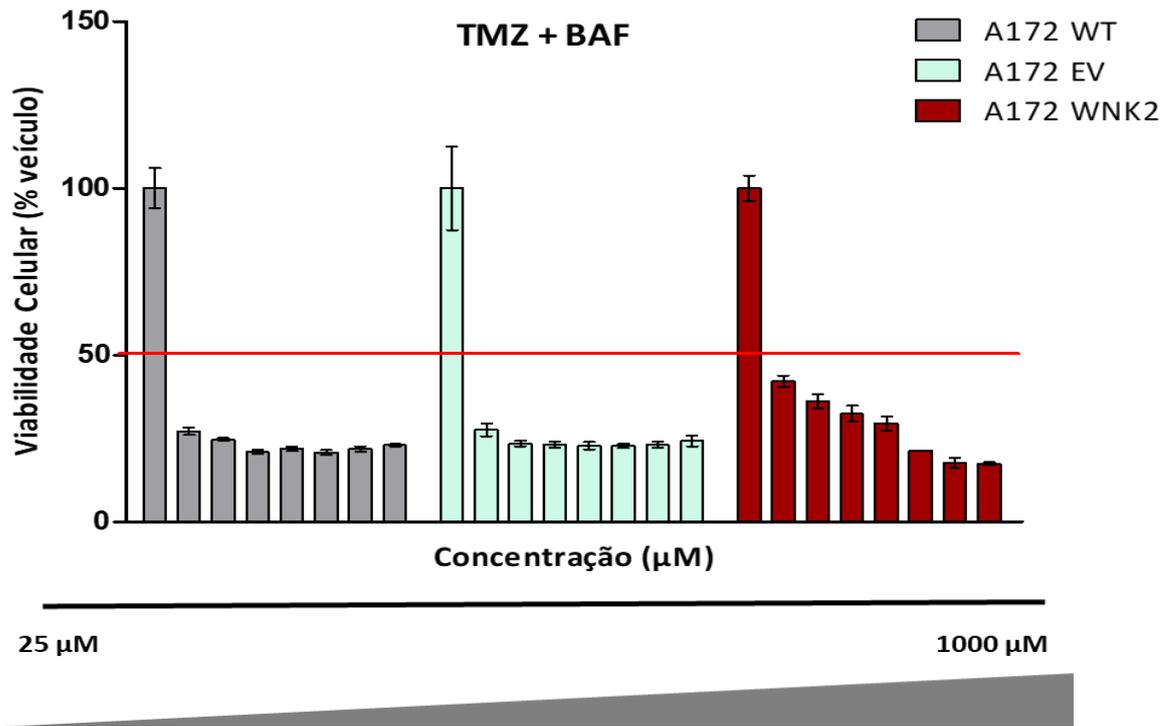


Figura 19. Avaliação do efeito do tratamento com TMZ e baf A1 nas linhagens (A172 WT e A172 EV e A172 WNK2). As linhagens (A172 WT e A172 EV e A172 WNK2) foram tratadas com TMZ em concentrações de 25 a 1000 µM. Após 24 horas de tratamento, foi adicionado 20 nM de baf A1. A viabilidade celular foi avaliada após 72 horas através de ensaio de MTS. Os resultados estão expressos por porcentagem média \pm desvio padrão de viabilidade de células relativa ao tratamento com BAF (considerando 100% de viabilidade). Os dados representam a média de um ensaio realizado em triplicata.

6 DISCUSSÃO

O estudo do perfil de expressão de genes chaves no processo da carcinogênese tem contribuído para o entendimento das funções e processos celulares, além do direcionamento de novas estratégias terapêuticas ⁹¹.

O presente trabalho traz informações do perfil de expressão gênica de *WNK2* em gliomas a partir de duas importantes bases de dados: *Oncomine* e *cBioPortal* ^{76, 77, 92}. As análises demonstraram que a redução da expressão de *WNK2* é inversamente proporcional ao aumento do grau de malignidade do tumor, sendo menor em glioblastomas (OMS - grau IV). Estes achados vão ao encontro do perfil de expressão gênica observado anteriormente por Hong e colaboradores (2007) ⁵³ que observaram a redução de *WNK2* em 29 dos 31 gliomas infiltrativos analisados por RT-PCR. Além disso, a expressão de *WNK2* também foi avaliada por Jun e colaboradores (2008) ⁵⁵ que ao comparar 209 tumores provenientes de 13 tipos tumorais observou que *WNK2* teve sua expressão reduzida em grande parte dos meningiomas de grau II e III, e em oligodendrogliomas e, maior frequência de expressão em gliomas de baixo grau, como astrocitomas, meningiomas de grau I e, amostras de cérebro normal. Por se tratar de uma alteração somente encontrada em gliomas, *WNK2* vem sido descrito como um supressor tumoral específico para tumores cerebrais ^{50, 51, 54}.

A hipermetilação é um dos principais mecanismos de regulação epigenética que acomete regiões ricas em ilhas CpG geralmente concentradas na região promotora de um gene ⁹³. Este mecanismo, desempenha um papel significativo no silenciamento de genes supressores tumorais ⁹⁴. Neste estudo, o perfil de metilação da região promotora e o perfil de expressão gênica de *WNK2* em um painel de linhagens comerciais e primárias de gliomas ⁸⁰ e uma linhagem de câncer de colorretal foi padronizado e avaliado. Para isso, foi realizada a técnica do pirosequenciamento, uma metodologia de análise quantitativa, que é superior ao método qualitativo *MSP (Methylation Specific PCR)* que havia sido realizado anteriormente ⁵⁴. Os resultados demonstram que as duas linhagens primárias possuem um perfil oposto de metilação, sendo a linhagem HCB151 considerada não metilada e, portanto, com expressão de *WNK2* e a linhagem HCB2 considerada metilada com ausência da expressão do gene *WNK2*. A linhagem A172 WT demonstrou quase 100% de hipermetilação, não apresentando expressão corroborando com a literatura ^{54, 59} e, embora as linhagens SW1088, U87-MG e U251 tenham apresentado hipermetilação na região promotora do gene

WNK2, também apresentaram expressão gênica significativa. O mesmo aconteceu com a linhagem proveniente de astrócito normal (NHA), diferindo-se do estudo de Hong e colaboradores ⁵³ que encontraram uma amostra de cérebro normal com baixo nível de hipermetilação. Contudo, deve-se levar em consideração o fato da linhagem de tecido normal utilizada neste estudo, ser uma linhagem imortalizada ⁹⁵ e, portanto, ao longo dos anos, algumas de suas características iniciais terem sido alteradas. Segundo Hong e colaboradores ⁵³ a hipermetilação na porção 5' da região promotora do gene *WNK2* demonstra forte associação com o seu *status* silenciado nas células. Essa associação foi confirmada após o tratamento com o desmetilante 5-aza-dC (*5-Aza-2'-deoxycytidine*) demonstrar reexpressão do transcrito *WNK2* em todas as linhagens utilizadas ^{52, 53, 55}. Moniz e colaboradores (2013) ⁵⁴ também encontraram significativa correlação entre a redução da expressão de *WNK2* e a presença de região promotora metilada a partir de análises *in silico*. Entretanto, no que se diz respeito a essa correlação, nossos achados *in silico* não demonstraram correlação entre expressão e metilação em uma *coorte* mais ampla de 605 pacientes de baixo e alto grau. Uma possível explicação para estes achados, é a existência de outros mecanismos regulatórios para *WNK2*, como a acetilação de histonas, um mecanismo que permite a maquinaria de transcrição acessar o promotor do gene com maior facilidade iniciando a transcrição ⁹⁶. Este mecanismo foi observado por Hong e colaboradores (2007) ⁵³ em um estudo anterior que demonstrou o aumento da histona H3 acetilada no promotor de *WNK2* após o tratamento com o inibidor trichostatin-A (*histone deacetylase inhibitor trichostatin A*) sozinho ou combinado com 5'aza-dC, sugerindo que a reativação de *WNK2* poderia acontecer a partir de mecanismos de acetilação de histonas de maneira direta ou indiretamente. A regulação de *WNK2*, pode ainda ser influenciada por fatores de transcrição e diversos mecanismos pós-transcricionais ⁹⁷.

Uma das limitações dos estudos anteriores foi a ausência de anticorpos fidedignos e específicos para detectar a expressão proteica de *WNK2* ^{48, 51, 52, 54, 58}. Dessa forma, neste estudo adquirimos 3 novos anticorpos comerciais disponíveis e propusemos avaliar a especificidade dos mesmos. A utilização de uma *tag-myc* conjugada à sequência genômica dos quatro genes da família WNK permite detectar a proteína de interesse pelo método de western-blot, e garantir a efetividade da técnica utilizando apenas um anticorpo que detecta a *tag-myc*. A detecção da proteína *WNK2* conjugada a *tag-myc* foi identificada pelos 3

anticorpos testados, entretanto, as demais proteínas da família (WNK1, WNK3 e WNK4) conjugadas com a *tag*, também foram identificadas. Embora as quinases WNKs apresentem pesos moleculares diferentes, estas, compartilham homologia em várias regiões altamente conservadas^{50, 53, 98}. Além disso, a linhagem HEK293ft utilizada na transfecção das quinases sabidamente possui a expressão de *WNK2*⁵⁴. Estes achados sugerem, portanto, que os 3 novos anticorpos testados não foram específicos para *WNK2*. Ressalta-se ainda que dois estudos de Moniz e colaboradores^{51, 54} identificaram a expressão proteica de *WNK2* utilizando um peptídeo sintético em um painel de linhagens de gliomas, incluindo a linhagem SW1088 bem como na linhagem de cólon (HT-29) utilizada como controle positivo. No entanto, em nosso trabalho, não foi possível identificar a expressão da proteína endógena *WNK2* nas linhagens utilizadas como controle positivo de expressão para gliomas (SW1088) e colorretal (SW480), bem como não validamos a expressão proteica de *WNK2* na linhagem editada^{54, 59} sugerindo que embora inúmeras alterações de protocolo em relação a concentração das amostras e diluições dos anticorpos, não foi possível detectar a expressão da proteína endógena com os anticorpos testados. Diferentes marcações encontradas pelos anticorpos testados no painel de linhagem proposto sugerem até o momento, a inexistência de um anticorpo específico para *WNK2* que detecte a expressão endógena da proteína. Outra hipótese discutida para este achado são as isoformas do transcrito *WNK2*. Estudos anteriores evidenciaram a existência de dois transcritos *WNK2* que diferem em seu éxon C-terminal⁵¹ a partir de um mecanismo de *splicing* alternativo, que podem afetar o *turnover* dos transcritos ou codificar diferentes proteínas. Outros genes da família WNK possuem mecanismo semelhante como os genes *WNK1* e *WNK3*^{47, 99}. Os mecanismos pós transcricionais, como anteriormente mencionado, constituem outra hipótese para a diferença de expressão proteica de *WNK2* entre as linhagens utilizadas neste estudo. Recentemente, foi identificado um microRNA, o miR-18a, que quando superexpresso em células de câncer cervical, reduz a expressão da proteína *WNK2*, sendo definida como um candidato alvo deste miRNA⁹⁷. Este achado sugere que mecanismos de regulação pós transcricionais podem estar envolvidos na expressão da proteína *WNK2* identificada pelo nosso estudo.

O papel de *WNK2* tem sido elucidado em diversos processos celulares envolvidos na carcinogênese como proliferação, migração e invasão^{51, 54, 58, 59}, no entanto, o seu papel

ainda é contraditório/desconhecido em vários mecanismos, como no tráfego vesicular autofágico e endocítico. No processo autofágico, alguns importantes marcadores nos permitem estimar a atividade autofágica, tais como o LC3 e o p62. Tipicamente, LC3A é convertido em LC3B por lipidação e está presente na formação de autofagossomos ⁸⁶. Já a proteína p62 se liga a proteínas ubiquitiniladas, ou seja, que estão marcadas para degradação e as encaminha até o lisossomo. Os resultados de western-blot e imunofluorescência a partir dos plasmídeos mCherry-GFP-LC3 e mCherry-GFP-P62 demonstraram de uma forma geral uma diminuição dos níveis dos marcadores LC3B e p62 com os inibidores autofágicos, baf A1 e CQ. Estes achados sugerem que o gene *WNK2* quando expresso, atua como um inibidor do fluxo autofágico. Estudos anteriores apontam *WNK2* atuando nas fases iniciais do fluxo autofágico, entretanto, com funções contraditórias. Szyniarowski e colaboradores (2011), silenciaram *WNK2* através de siRNA e reportaram o acúmulo de p62, portanto, inibição do fluxo autofágico ¹⁰⁰. O acúmulo desta proteína indica maturação defeituosa dos autofagossomos ⁷⁴, desta forma, a presença de *WNK2* atuaria como um regulador positivo do processo autofágico. Por outro lado, Guo e colaboradores (2015) silenciaram *WNK2* através de shRNAs que induziu o aumento significativo de LC3B por imunofluorescência ⁷⁵ resultado semelhante ao encontrado pelo nosso estudo. Ressalta-se ainda que segundo Yoshii *et al.*, 2017, células que apresentam um baixo número de *punctas* positivas na condição basal, e, que não sofrem alterações após o tratamento com baf A1 são sugestivas de defeitos no processo de indução da autofagia ¹⁰¹. Sendo assim, a hipótese mais plausível é de que a presença de *WNK2* atua inibindo o fluxo autofágico.

É sabidamente conhecido, que uma das principais alterações biológicas em glioma é a alteração da via PI3K/AKT/mTOR ¹⁰². A inibição de mTOR, pode ser indicada pela desfosforilação de seus substratos p70S6K quinase e 4EBP1 (4E *binding protein* 1) ¹⁰³ e, estão correlacionadas com o processo autofágico em gliomas ^{104, 105}. Para avaliar o impacto desta via, utilizamos o tratamento com o indutor autofágico (everolimus), um análogo de rapamicina que inibe a sinalização de mTOR em combinação com um inibidor autofágico (baf A1). Os resultados sugerem que a inibição da autofagia mediada por *WNK2* acontece de maneira independente da via de mTOR, embora os dados não tenham apresentado significância estatística. Estudos anteriores que relacionam *WNK2* e autofagia foram

contraditórios também quanto ao efeito deste gene na atividade de mTOR e o *status* de fosforilação de seus substratos ^{74, 75}.

Desde que a autofagia induzida pelo tratamento com TMZ demonstrou um papel citoprotetor ³⁵, vários ensaios clínicos de fase I/II utilizando inibidores autofágicos como CQ e hidroxicloroquina em combinação com TMZ e radiação tem demonstrado um aumento na sobrevida de pacientes diagnosticados com GBM ⁷². Neste sentido foi avaliado aqui o efeito da modulação negativa do fluxo autofágico pelo gene *WNK2* no tratamento com TMZ. Surpreendentemente, os resultados revelaram uma redução da viabilidade celular das linhagens A172 WT e A172 EV, e uma resistência ao tratamento com TMZ da linhagem A172 *WNK2*. De forma semelhante, embora o tratamento combinado de TMZ+baf A1 tenha sido efetivo e reduzido a viabilidade nas três linhagens avaliadas, a linhagem que reexpressa *WNK2* mostrou uma tendência a resistência ao tratamento. Uma hipótese para os nossos achados seria que *WNK2* promoveria defeitos no processo inicial do fluxo ou na maturação autofagossômica ^{74, 75}. Neste sentido, o mecanismo utilizado por *WNK2* na inibição do fluxo autofágico seria semelhante ao inibidor *3-methyladenedine autophagy inhibitor* (3-MA), um inibidor da fase de iniciação autofagossômica. Conforme descrito por Kanzawa e colaboradores (2004) ¹⁰⁶, o tratamento combinado de TMZ e 3-MA, aumentou a viabilidade de 37 para 52% em células de glioma. Da mesma forma, um estudo prévio observou que o tratamento com baf A1 não foi capaz de sensibilizar as células tumorais para TMZ, quando o processo autofágico foi bloqueado anteriormente pelo 3-MA ⁸⁹. Dessa forma, na presença de *WNK2* a resposta das células ao tratamento com TMZ seria revertida, apresentando um fenótipo resistente. A confirmação dessa hipótese validaria o efeito inibitório do gene *WNK2* no estágio inicial do fluxo autofágico. É importante ressaltar que os mecanismos de resistência ao tratamento com TMZ não constituem um único evento molecular ¹⁰⁷, e que muitos processos podem estar envolvidos nessa resposta. Portanto, mais estudos devem ser realizados a fim de entender este mecanismo de resistência na linhagem com reexpressão de *WNK2* e seu potencial impacto clínico.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, as análises *in silico* utilizando os bancos de dados *Oncomine* e *TCGA* demonstraram a diminuição da expressão de *WNK2* em gliomas de alto grau, corroborando com os achados da literatura. A análise do perfil de metilação da região promotora a partir de uma metodologia quantitativa, confirmou a relação da perda de expressão com mecanismos epigenéticos, porém, sugere que outros mecanismos de regulação podem estar envolvidos nesse processo. Além disso, foram testados três novos anticorpos, entretanto, não foi possível a identificação fidedigna da expressão proteica de *WNK2*. A avaliação do processo autofágico utilizando diferentes abordagens metodológicas demonstrou que a presença de *WNK2* inibe o processo autofágico em gliomas, e sugere ser de maneira independente da via de mTOR. O impacto clínico dessa inibição pode estar relacionado a resistência da linhagem com a restauração da expressão do gene *WNK2* apresentar resistência ao tratamento com o quimioterápico padrão para GBM, a temozolamida, evidenciado nos ensaios de citotoxicidade. Entretanto, mais estudos são necessários para que o papel de *WNK2* no tráfego vesicular autofágico e na resposta a terapia seja elucidado.

8 REFERÊNCIAS

1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. . *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base*. [Internet] Lyon, France: GLOBOCAN2012; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. 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.
3. Ministério da Saúde INCA. *Estimativa 2018/2019 - Incidência de Câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro, INCA: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>; 2018.
4. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, et al. *CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014*. **Neuro Oncol**. 2017;19(suppl_5):v1-v88.
5. Jones C, Perryman L, Hargrave D. *Paediatric and adult malignant glioma: close relatives or distant cousins?* **Nat Rev Clin Oncol**. 2012;9(7):400-13.
6. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012*. **Neuro Oncol**. 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
7. Davis ME. *Epidemiology and Overview of Gliomas*. **Semin Oncol Nurs**. 2018;34(5):420-9.
8. Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2011-2015*. **Neuro Oncol**. 2018;20(suppl_4):iv1-iv86.
9. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, et al. *Glioma*. **Nat Rev Dis Primers**. 2015;1:15017.
10. Zhu Y, Parada LF. *The molecular and genetic basis of neurological tumours*. **Nat Rev Cancer**. 2002;2(8):616-26.
11. Cruceru ML, Neagu M, Demoulin JB, Constantinescu SN. *Therapy targets in glioblastoma and cancer stem cells: lessons from haematopoietic neoplasms*. **J Cell Mol Med**. 2013;17(10):1218-35.
12. Lapointe S, Perry A, Butowski NA. *Primary brain tumours in adults*. **Lancet**. 2018;392(10145):432-46.
13. Wen PY, Kesari S. *Malignant gliomas in adults*. **N Engl J Med**. 2008;359(5):492-507.

14. Pojo MC, B.M. *Molecular hallmarks of gliomas*. In: Garami M, editor. *Molecular targets of CNS tumors* 2011. p. 177-200.
15. Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. *Epidemiology of gliomas*. **Cancer Treat Res**. 2015;163:1-14.
16. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. **Acta Neuropathol**. 2016;131(6):803-20.
17. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, et al. *CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010*. **Neuro Oncol**. 2013;15 Suppl 2:ii1-56.
18. Lee CH, Jung KW, Yoo H, Park S, Lee SH. *Epidemiology of primary brain and central nervous system tumors in Korea*. **J Korean Neurosurg Soc**. 2010;48(2):145-52.
19. Gigineishvili D, Shengelia N, Shalashvili G, Rohrmann S, Tsiskaridze A, Shakarishvili R. *Primary brain tumour epidemiology in Georgia: first-year results of a population-based study*. **J Neurooncol**. 2013;112(2):241-6.
20. Dubrow R, Darefsky AS. *Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992-2007*. **BMC Cancer**. 2011;11:325.
21. McNeill KA. *Epidemiology of Brain Tumors*. **Neurol Clin**. 2016;34(4):981-98.
22. Schwartzbaum JA, Fisher JL, Aldape KD, Wrensch M. *Epidemiology and molecular pathology of glioma*. **Nat Clin Pract Neurol**. 2006;2(9):494-503; quiz 1 p following 16.
23. Alelu-Paz R, Ashour N, Gonzalez-Corpas A, Ropero S. *DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology*. **J Signal Transduct**. 2012;2012:956958.
24. Faury D, Nantel A, Dunn SE, Guiot MC, Haque T, Hauser P, et al. *Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors*. **J Clin Oncol**. 2007;25(10):1196-208.
25. Ohgaki H, Kleihues P. *The definition of primary and secondary glioblastoma*. **Clin Cancer Res**. 2013;19(4):764-72.
26. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, et al. *Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter*. **Genes Dev**. 2001;15(11):1311-33.
27. Perry AB, D.J. *Practical Surgical Neuropathology. A Diagnostic Approach*. Philadelphia 2010.

28. Holland EC. *Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models*. **Nat Rev Genet**. 2001;2(2):120-9.
29. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. **N Engl J Med**. 2005;352(10):987-96.
30. States CBTRotU.
31. Han SJ, Englot DJ, Birk H, Molinaro AM, Chang SM, Clarke JL, et al. *Impact of Timing of Concurrent Chemoradiation for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Critical Review of Current Evidence*. **Neurosurgery**. 2015;62 Suppl 1:160-5.
32. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, Kesari S, Steinberg DM, Toms SA, et al. *Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial*. **JAMA**. 2015;314(23):2535-43.
33. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, et al. *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. **J Clin Oncol**. 2007;25(30):4722-9.
34. Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., et al. *Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial*. **J Neurosurg**. 1978;49(3):333-43.
35. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. *Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment*. **J Exp Clin Cancer Res**. 2016;35:23.
36. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. *Temozolomide and treatment of malignant glioma*. **Clin Cancer Res**. 2000;6(7):2585-97.
37. Yokota J. *Tumor progression and metastasis*. **Carcinogenesis**. 2000;21(3):497-503.
38. Weinberg RA. *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis*. **Cancer Res**. 1989;49(14):3713-21.
39. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. *Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction*. **Cell**. 2009;136(5):823-37.
40. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. *DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology*. **Nat Rev Cancer**. 2016;16(1):20-33.
41. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. **Cell**. 2000;100(1):57-70.
42. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.

43. Hanks SK, Hunter T. *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. **FASEB J**. 1995;9(8):576-96.
44. Xu B, English JM, Wilsbacher JL, Stippec S, Goldsmith EJ, Cobb MH. *WNK1, a novel mammalian serine/threonine protein kinase lacking the catalytic lysine in subdomain II*. **J Biol Chem**. 2000;275(22):16795-801.
45. Min X, Lee BH, Cobb MH, Goldsmith EJ. *Crystal structure of the kinase domain of WNK1, a kinase that causes a hereditary form of hypertension*. **Structure**. 2004;12(7):1303-11.
46. Lenertz LY, Lee BH, Min X, Xu BE, Wedin K, Earnest S, et al. *Properties of WNK1 and implications for other family members*. **J Biol Chem**. 2005;280(29):26653-8.
47. Verissimo F, Jordan P. *WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms*. **Oncogene**. 2001;20(39):5562-9.
48. Rinehart J, Vazquez N, Kahle KT, Hodson CA, Ring AM, Gulcicek EE, et al. *WNK2 kinase is a novel regulator of essential neuronal cation-chloride cotransporters*. **J Biol Chem**. 2011;286(34):30171-80.
49. Moniz S, Jordan P. *Emerging roles for WNK kinases in cancer*. **Cell Mol Life Sci**. 2010;67(8):1265-76.
50. McCormick JA, Ellison DH. *The WNKs: atypical protein kinases with pleiotropic actions*. **Physiol Rev**. 2011;91(1):177-219.
51. Moniz S, Verissimo F, Matos P, Brazao R, Silva E, Kotelevets L, et al. *Protein kinase WNK2 inhibits cell proliferation by negatively modulating the activation of MEK1/ERK1/2*. **Oncogene**. 2007;26(41):6071-81.
52. Dutruel C, Bergmann F, Rooman I, Zucknick M, Weichenhan D, Geiselhart L, et al. *Early epigenetic downregulation of WNK2 kinase during pancreatic ductal adenocarcinoma development*. **Oncogene**. 2014;33(26):3401-10.
53. Hong C, Moorefield KS, Jun P, Aldape KD, Kharbanda S, Phillips HS, et al. *Epigenome scans and cancer genome sequencing converge on WNK2, a kinase-independent suppressor of cell growth*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007;104(26):10974-9.
54. Moniz S, Martinho O, Pinto F, Sousa B, Loureiro C, Oliveira MJ, et al. *Loss of WNK2 expression by promoter gene methylation occurs in adult gliomas and triggers Rac1-mediated tumour cell invasiveness*. **Hum Mol Genet**. 2013;22(1):84-95.
55. Jun P, Hong C, Lal A, Wong JM, McDermott MW, Bollen AW, et al. *Epigenetic silencing of the kinase tumor suppressor WNK2 is tumor-type and tumor-grade specific*. **Neuro Oncol**. 2009;11(4):414-22.

56. Tao R, Li J, Xin J, Wu J, Guo J, Zhang L, et al. *Methylation profile of single hepatocytes derived from hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma*. **PLoS One**. 2011;6(5):e19862.
57. Hirata E, Yukinaga H, Kamioka Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Okada T, et al. *In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion*. **J Cell Sci**. 2012;125(Pt 4):858-68.
58. Moniz S, Matos P, Jordan P. *WNK2 modulates MEK1 activity through the Rho GTPase pathway*. **Cell Signal**. 2008;20(10):1762-8.
59. Costa AM, Pinto F, Martinho O, Oliveira MJ, Jordan P, Reis RM. *Silencing of the tumor suppressor gene WNK2 is associated with upregulation of MMP2 and JNK in gliomas*. **Oncotarget**. 2015;6(3):1422-34.
60. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. *The protein kinase complement of the human genome*. **Science**. 2002;298(5600):1912-34.
61. Lemke J, von Karstedt S, Zinngrebe J, Walczak H. *Getting TRAIL back on track for cancer therapy*. **Cell Death Differ**. 2014;21(9):1350-64.
62. Tokarev AA, Alfonso A, Segev N. *Overview of intracellular compartments and trafficking pathways*. *Trafficking Inside Cells*: Springer; 2009. p. 3-14.
63. Wang CW, Klionsky DJ. *The molecular mechanism of autophagy*. **Mol Med**. 2003;9(3-4):65-76.
64. Mizushima N, Levine B. *Autophagy in mammalian development and differentiation*. **Nat Cell Biol**. 2010;12(9):823-30.
65. Yuanchao SX, Q.; Hong, C.; Wei, S. *Epigenetic control of autophagy*. 2014:447–55.
66. Racoma IO, Meisen WH, Wang QE, Kaur B, Wani AA. *Thymoquinone inhibits autophagy and induces cathepsin-mediated, caspase-independent cell death in glioblastoma cells*. **PLoS One**. 2013;8(9):e72882.
67. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. *Role of autophagy in cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2007;7(12):961-7.
68. Eskelinen EL. *The dual role of autophagy in cancer*. **Curr Opin Pharmacol**. 2011;11(4):294-300.
69. Notte A, Leclere L, Michiels C. *Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer*. **Biochem Pharmacol**. 2011;82(5):427-34.
70. Kroemer G, Levine B. *Autophagic cell death: the story of a misnomer*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2008;9(12):1004-10.

71. Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, et al. *Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62*. **Cell**. 2009;137(6):1062-75.
72. Golden EB, Cho HY, Jahanian A, Hofman FM, Louie SG, Schonthal AH, et al. *Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy*. **Neurosurg Focus**. 2014;37(6):E12.
73. Jiang H, White EJ, Conrad C, Gomez-Manzano C, Fueyo J. *Autophagy pathways in glioblastoma*. **Methods Enzymol**. 2009;453:273-86.
74. Szyniarowski P, Corcelle-Termeau E, Farkas T, Hoyer-Hansen M, Nylandsted J, Kallunki T, et al. *A comprehensive siRNA screen for kinases that suppress macroautophagy in optimal growth conditions*. **Autophagy**. 2011;7(8):892-903.
75. Guo S, Liang Y, Murphy SF, Huang A, Shen H, Kelly DF, et al. *A rapid and high content assay that measures cyto-ID-stained autophagic compartments and estimates autophagy flux with potential clinical applications*. **Autophagy**. 2015;11(3):560-72.
76. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. **Cancer Discov**. 2012;2(5):401-4.
77. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. *Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal*. **Sci Signal**. 2013;6(269):p11.
78. Cruvinel-Carlioni A, SilvaOliveira R, Torrieri R, Bidinotto LT, Berardinelli GN, Oliveira-Silva VA, et al. *Molecular characterization of short-term primary cultures and comparison with corresponding tumor tissue of Brazilian glioblastoma patients*. **Translational Cancer Research**. 2017;6(2):332-45.
79. Silva-Oliveira RJ, Silva VA, Martinho O, Cruvinel-Carlioni A, Melendez ME, Rosa MN, et al. *Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker*. **Cell Oncol (Dordr)**. 2016;39(3):253-63.
80. Carlioni CA. *Estabelecimento e caracterização citogenética e molecular de culturas primárias de glioblastomas*. Barretos-SP2013.
81. Siqueira JF, Jr., Fouad AF, Rocas IN. *Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes*. **J Oral Microbiol**. 2012;4.
82. Panagopoulos I, Gorunova L, Leske H, Niehusmann P, Johannessen LE, Staurseth J, et al. *Pyrosequencing Analysis of MGMT Promoter Methylation in Meningioma*. **Cancer Genomics Proteomics**. 2018;15(5):379-85.

83. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* **Methods.** 2001;25(4):402-8.
84. Mushtaque M, Shahjahan. *Reemergence of chloroquine (CQ) analogs as multi-targeting antimalarial agents: a review.* **Eur J Med Chem.** 2015;90:280-95.
85. Hansen TE, Johansen T. *Following autophagy step by step.* **BMC Biol.** 2011;9:39.
86. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition).* **Autophagy.** 2016;12(1):1-222.
87. Bravo-San Pedro JM, Niso-Santano M, Gomez-Sanchez R, Pizarro-Estrella E, Aiastui-Pujana A, Gorostidi A, et al. *The LRRK2 G2019S mutant exacerbates basal autophagy through activation of the MEK/ERK pathway.* **Cell Mol Life Sci.** 2013;70(1):121-36.
88. Hsu SPC, Kuo JS, Chiang HC, Wang HE, Wang YS, Huang CC, et al. *Temozolomide, sirolimus and chloroquine is a new therapeutic combination that synergizes to disrupt lysosomal function and cholesterol homeostasis in GBM cells.* **Oncotarget.** 2018;9(6):6883-96.
89. Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. *Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells.* **Cell Death Differ.** 2004;11(4):448-57.
90. Lee SW, Kim HK, Lee NH, Yi HY, Kim HS, Hong SH, et al. *The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells.* **Cancer Lett.** 2015;360(2):195-204.
91. Murray D, Doran P, MacMathuna P, Moss AC. *In silico gene expression analysis--an overview.* **Mol Cancer.** 2007;6:50.
92. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. *ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform.* **Neoplasia.** 2004;6(1):1-6.
93. Newell-Price J, Clark AJ, King P. *DNA methylation and silencing of gene expression.* **Trends Endocrinol Metab.** 2000;11(4):142-8.
94. Esteller M. *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future.* **Oncogene.** 2002;21(35):5427-40.
95. Azizi SA, Krynska B. *Derivation of neuronal cells from fetal normal human astrocytes (NHA).* **Methods Mol Biol.** 2013;1078:89-96.
96. Eberharter A, Becker PB. *Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics.* **EMBO Rep.** 2002;3(3):224-9.

97. Dong P, Xiong Y, Yu J, Chen L, Tao T, Yi S, et al. *Control of PD-L1 expression by miR-140/142/340/383 and oncogenic activation of the OCT4-miR-18a pathway in cervical cancer.* **Oncogene**. 2018;37(39):5257-68.
98. Xu BE, Min X, Stippec S, Lee BH, Goldsmith EJ, Cobb MH. *Regulation of WNK1 by an autoinhibitory domain and autophosphorylation.* **J Biol Chem**. 2002;277(50):48456-62.
99. Verissimo F, Silva E, Morris JD, Pepperkok R, Jordan P. *Protein kinase WNK3 increases cell survival in a caspase-3-dependent pathway.* **Oncogene**. 2006;25(30):4172-82.
100. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. *p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy.* **J Biol Chem**. 2007;282(33):24131-45.
101. Yoshii SR, Mizushima N. *Monitoring and Measuring Autophagy.* **Int J Mol Sci**. 2017;18(9).
102. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. *Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment.* **Genes Dev**. 2007;21(21):2683-710.
103. Saxton RA, Sabatini DM. *mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease.* **Cell**. 2017;168(6):960-76.
104. Ito H, Daido S, Kanzawa T, Kondo S, Kondo Y. *Radiation-induced autophagy is associated with LC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells.* **Int J Oncol**. 2005;26(5):1401-10.
105. Iwamaru A, Kondo Y, Iwado E, Aoki H, Fujiwara K, Yokoyama T, et al. *Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells.* **Oncogene**. 2007;26(13):1840-51.
106. Kahle KT, Wilson FH, Leng Q, Lalioti MD, O'Connell AD, Dong K, et al. *WNK4 regulates the balance between renal NaCl reabsorption and K⁺ secretion.* **Nat Genet**. 2003;35(4):372-6.
107. Lee SY. *Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme.* **Genes Dis**. 2016;3(3):198-210.

ANEXOS

Anexo A



Comitê de Ética em Pesquisa Parecer *Ad Referendum*

Para: Rui Manuel Vieira Reis

De: Thiago Buosi Silva
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 10/11/2016

Projeto de pesquisa: **1286/2016**

Prezado (a) Senhor (a),

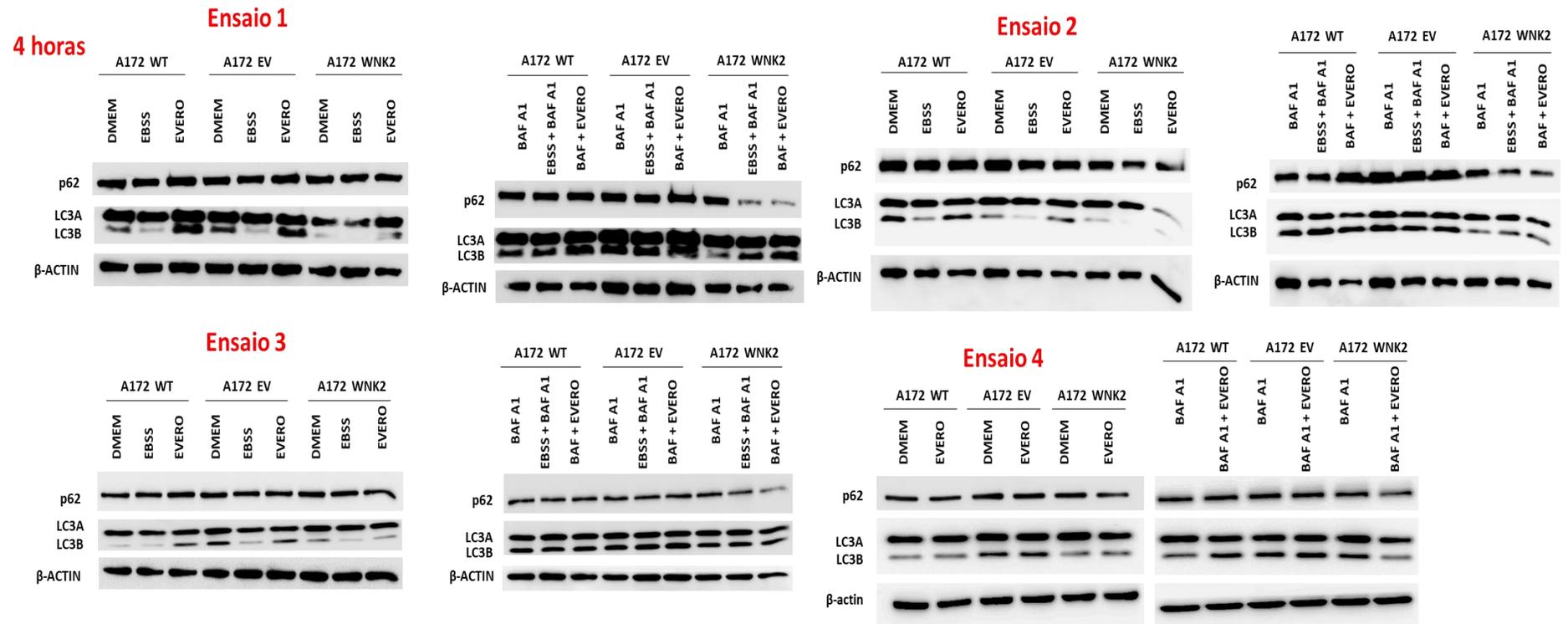
Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos recebeu o estudo intitulado “**Caracterização do envolvimento da proteína WNK2 no tráfego vesicular autofágico e endocítico em gliomas.**”, o qual foi cadastrado sob o número **1286/2016**.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por utilizar linhagens celulares comerciais e não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não há necessidade de apreciação/aprovação do CEP.

Atenciosamente,

Thiago Buosi Silva
Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

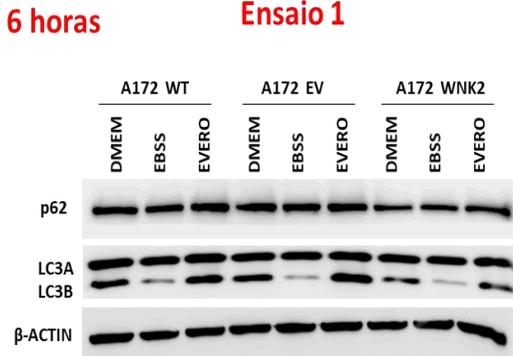
Anexo B



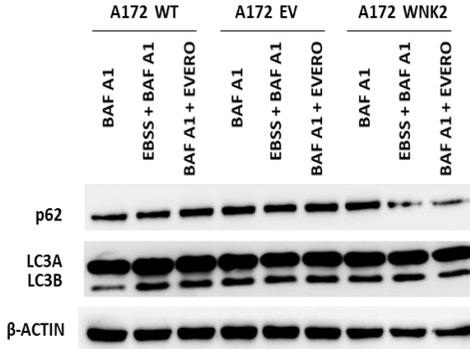
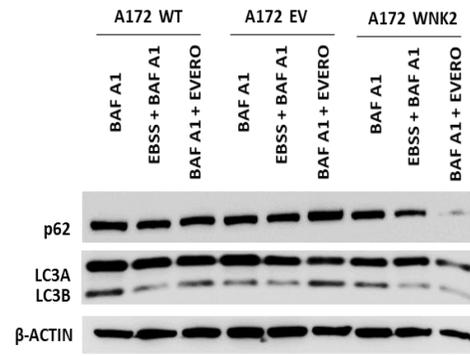
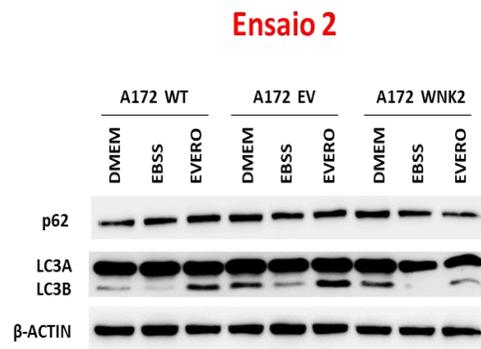
Anexo C

6 horas

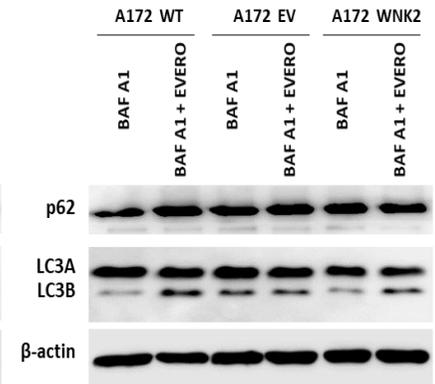
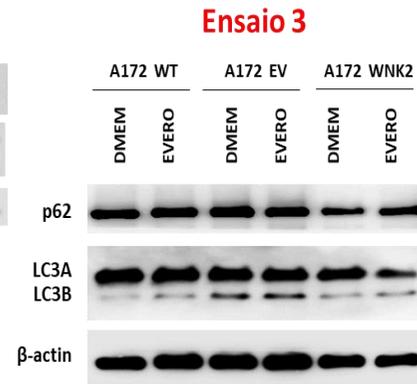
Ensaio 1



Ensaio 2



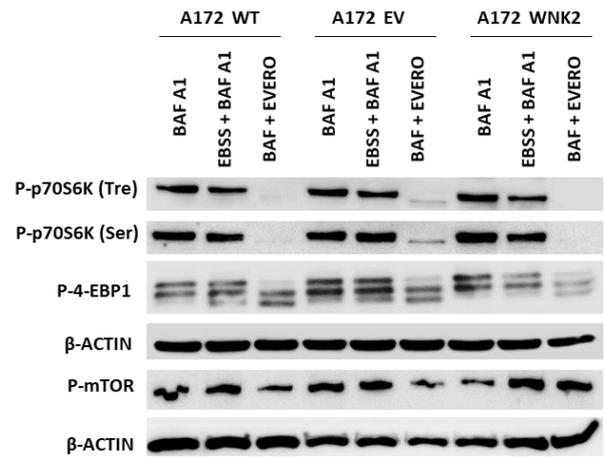
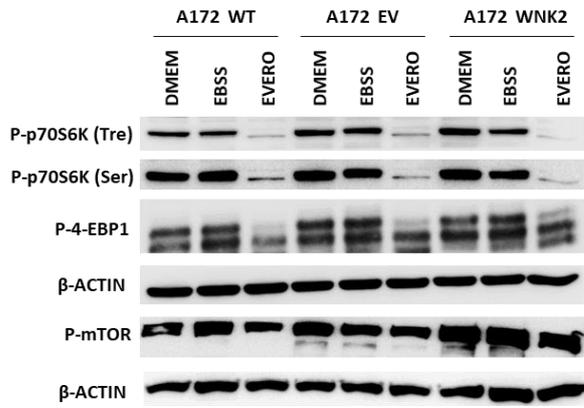
Ensaio 3



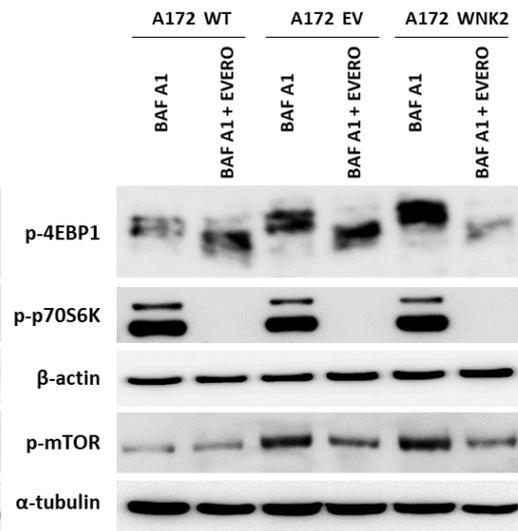
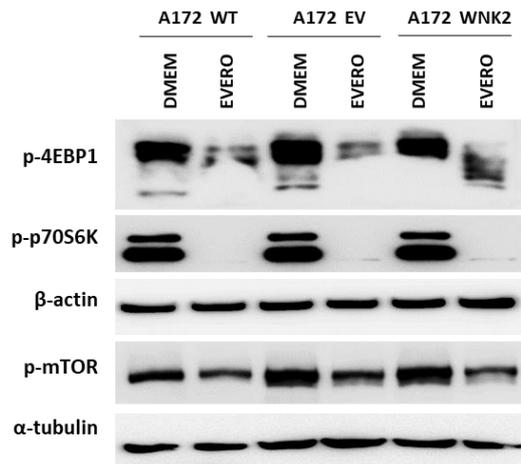
Anexo D

4 horas

Ensaio 1



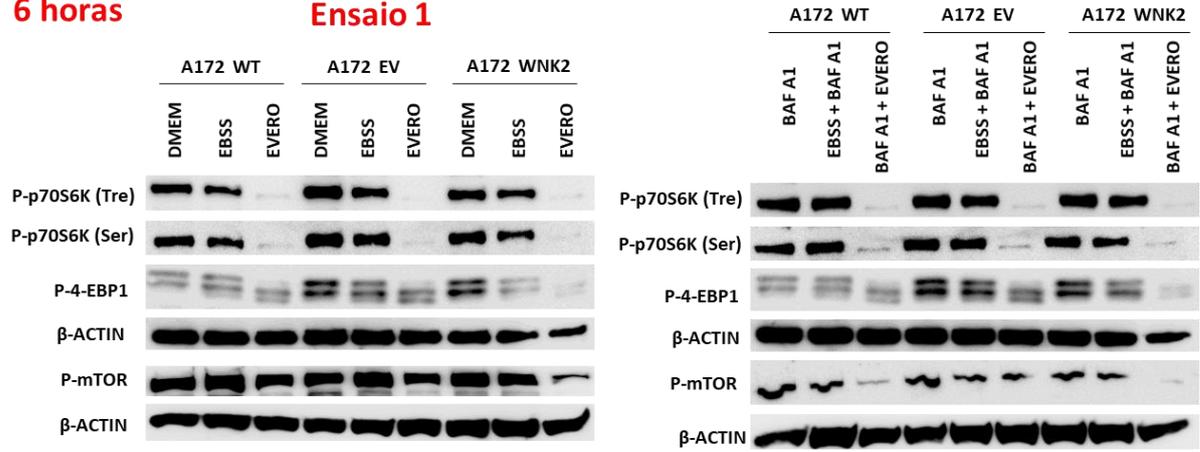
Ensaio 2



Anexo E

6 horas

Ensaio 1



Ensaio 2

