



Cidade Universitária "Zeferino Vaz", 27 de maio de 2021.

SIGAD: Of. CEP nº 78/2021

Juliana Carron
Pesquisador Responsável

REF.: DISPENSA DE APRESENTAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA PARA AVALIAÇÃO DO SISTEMA CEP-CONEP.

Prezado Senhor,

Informamos que a pesquisa intitulada "Análise funcional da proteína do retículo endoplasmático *ERP29* em carcinoma de orofaringe", para fins de tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas, sob a responsabilidade da pesquisadora supracitada, orientação do Prof. Dr. Gustavo Jacob Lourenço e co-orientação da Prof.^a Dra. Carmen Silva Passos Lima, destina-se a avaliar o papel do *ERP29* no CCEOF.

Deste modo, conforme consta no referido projeto, anexado ao documento, o estudo utilizará cultura de linhagens celulares não necessita tramitar pelo Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos, tendo em vista o banco de dados PMAQ-AB é público, disponível no site situado em <https://aps.saude.gov.br/ape/pmaq/ciclo3/> (Microdados da avaliação externa -> Módulo eletrônico). Atenciosamente,

Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini

**COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNICAMP**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

**Análise funcional da proteína do retículo endoplasmático *ERP29* em
carcinoma de orofaringe**

**Functional analysis of reticulum endoplasmic protein *ERP29* in oropharyngeal
carcinoma**

Pesquisadores Responsáveis

Laboratório de Genética do Câncer da FCM da UNICAMP

Juliana Carron (aluna de doutoramento)

Prof. Dr. Gustavo Jacob Lourenço (orientador)

Profa. Dra. Carmen Sílvia Passos Lima (co-orientadora)

**Campinas
2020**



RESUMO

A ERp29 é uma proteína chaperona envolvida no processo de enovelamento e secreção de proteínas. O papel da ERp29 no desenvolvimento e na progressão tumoral é controverso e, no entanto, sua função na carcinogênese de orofaringe ainda é desconhecida. Assim, os objetivos do presente estudo são os de avaliar o papel do gene *ERP29* na carcinogênese do carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEOF), identificar genes modulados pelo *ERP29*, identificar proteínas que interagem com a ERp29, avaliar o papel do *ERP29* no estresse do retículo endoplasmático (RE), e verificar a influência do *ERP29* na sobrevivência dos pacientes com CCEOF. Inicialmente, serão avaliados, em linhagens celulares de CCE de faringe humano, sensível e resistente à cisplatina, a hiperexpressão e o silenciamento do gene *ERP29*, por meio da transfecção de um vetor de expressão e de um RNA de interferência, respectivamente. As células modificadas serão submetidas aos ensaios de detecção do ciclo celular, da apoptose e de migração celular. A possível alteração da expressão de genes, e seus conteúdos proteicos, pelo *ERP29*, será identificada por microarranjos de DNA e validada por meio da PCR quantitativa (qPCR) e *western blotting*. A identificação de proteínas que interagem com a ERp29 será realizada por meio dos ensaios de eletroforese bidimensional e de co-imunoprecipitação. O papel do *ERP29* no estresse do RE será avaliado por meio do tratamento com tunicamicina seguido de análise por qPCR. Os resultados das diferenças entre os grupos serão avaliados por meio dos testes *t* e ANOVA ou Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Assim, esperamos identificar um possível alvo terapêutico para o tratamento do CCEOF, especialmente àqueles que apresentam resistência à cisplatina.

Palavras chave: câncer de orofaringe, *ERP29*, chaperona, estresse do retículo endoplasmático, quimioresistência, cisplatina



INTRODUÇÃO

Considerações gerais

O termo carcinoma de células escamosas (CCE) de cabeça e pescoço (CP) é usado para descrever tumores do tipo histológico identificados na cavidade oral, faringe, fossa nasal, seios paranasais e laringe (Mendenhall et al., 2011).

O CCECP representa um grave problema de saúde no mundo e é o oitavo tipo de neoplasia mais comum (Bray et al., 2018). Cerca de 835.000 novos casos do tumor são identificados a cada ano em todo o mundo com cerca de 431.000 mortes a ele atribuídas (Bray et al., 2018). No Brasil, estimaram-se para os anos de 2018 e 2019, 11.200 casos novos de CCE de cavidade oral em homens e 3.500 casos em mulheres. Para o mesmo período, estimam-se 6.390 casos novos de CCE de laringe em homens e 1.280 casos em mulheres (Instituto Nacional do Câncer, 2018).

Dentre os tumores de CP, o CCE de faringe (CCEF) merece destaque devido às altas taxas de mortalidade (Ferlay et al., 2015). O CCEF inclui tumores de nasofaringe, orofaringe (OF) e hipofaringe (Mittal, 2011), sendo o CCEOF considerado de comportamento mais agressivo entre eles (Lambert et al., 2011). Ele é classificado em tumores da região amigdaliana, da base de língua, da parede posterior da faringe, do palato mole e da úvula (Lambert et al., 2011).

Aspectos clínicos e do tumor

As queixas mais frequentes referidas por pacientes com o CCEOF são a odinofagia, a disfagia, o aumento de volume na região, a dificuldade na ingestão de alimentos, a dor e o sangramento local (Mendenhall et al., 2011). A idade média de apresentação da doença é de 64 anos e cerca de dois terços dos pacientes são homens (Mendenhall et al., 2011).

O CCEOF pode ser classificado de acordo com os graus de diferenciação celular, sendo eles: bem diferenciado (grau I), moderadamente diferenciado (grau II), pouco diferenciado (grau III) ou indiferenciado (Gale & Zidar, 2013).

O estabelecimento do planejamento terapêutico e do prognóstico do CCEOF baseiam-se principalmente em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos (Barnes et al., 2005), e no sistema de estágio TNM, de acordo com os critérios definidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (Amin et al., 2017). O sistema TNM considera o tamanho do tumor (T), a presença de metástase em linfonodos cervicais (N) e de metástase a distância (M) (Amin et al., 2017). A presença de metástase em linfonodos cervicais é o principal fator prognóstico adverso independente (Licitra & Felip, 2009).



O objetivo do tratamento dos pacientes com CCECP, incluindo o CCEOF, é a cura com a máxima preservação de estruturas anatômicas e suas respectivas funções. No caso de tumores em estágio inicial, o tratamento fundamenta-se na cirurgia ou radioterapia (RT) (Leemans et al., 2011). Entretanto, a maioria dos pacientes apresenta ao diagnóstico o tumor em estágio avançado (estágios III ou IV), sendo preconizada a terapêutica multimodal com cirurgia, RT e quimioterapia (QT) a base de platina (Belcher et al., 2014; Zhu et al., 2017).

Apesar das abordagens de tratamento agressivas e multidisciplinares, o índice de sobrevivência de cinco anos permanece pouco alterado nos últimos 40 anos e apenas 40 a 50% dos pacientes com CCECP atingem tal índice (Amar et al., 2012). Para os pacientes com CCEOF, o índice de sobrevida global é de apenas 30% em cinco anos (Farias et al., 2006; Philouze et al., 2017). A insensibilidade intrínseca ou a resistência adquirida à cisplatina (CDDP) e, assim, a recorrência do tumor continuam a impedir o sucesso do tratamento dos pacientes com CCEOF (Shen et al., 2012).

Fatores predisponentes

Os principais fatores envolvidos com a origem do CCEOF são o tabagismo e o etilismo (Mendenhall et al., 2011; Fotopoulos & Pavlidis, 2015). O consumo de álcool e tabaco, atuando sinergicamente, aumenta o risco de desenvolvimento de CCEOF quando comparados aos indivíduos sem os referidos hábitos (Lambert et al., 2011). Os carcinógenos químicos presentes no tabaco e no álcool, como o benzopireno e o acetaldeído, induzem o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que resulta em danos oxidativos do DNA de células epiteliais e a associação com o CCEOF (Ziech et al., 2011).

O papilomavírus humano (HPV) foi detectado em cerca de 25% no CCECP e 60% no CCEOF, e parece constituir um fator prognóstico favorável para seus portadores (Dayyani et al., 2010). A inserção do DNA viral no DNA das células epiteliais determina a inativação das proteínas supressoras tumorais p53 e retinoblastoma e, possivelmente, o surgimento do tumor (Psyrrri & Cohen, 2011). A apresentação clínica e o comportamento dos tumores de OF associados ao HPV são distintos dos tumores não associados ao HPV (Panwar et al., 2017). Pacientes com CCEOF associado ao HPV são tipicamente mais jovens, com menos comorbidades e com o hábito de tabagismo menos frequente do que os pacientes com CCEOF não associado ao HPV (Mehanna et al., 2010; Chaturvedi et al., 2011). Além disso, o prognóstico dos pacientes com CCEOF associado ao HPV é mais favorável do que



os CCEOF não associado ao HPV, sendo que cerca de 80% dos pacientes atingem o índice de sobrevivência global de 5 anos (Fossum et al., 2017; Lee et al., 2017; Norregaard et al., 2018). Entretanto, a prevalência do HPV em diversas regiões do Brasil, incluindo a região de Campinas, é baixa (López et al., 2014; Costa et al., 2016).

Múltiplos eventos genéticos, como a perda ou a aquisição de funções de moléculas que regulam o controle do ciclo celular, os sistemas de reparo do DNA, a apoptose, e a angiogênese são responsáveis pela ocorrência e agressividade do CCECP, incluindo o CCEOF (Leemans et al., 2011; Tan et al., 2013; Martin et al., 2014; Zhu et al., 2017). Ainda, foram identificadas alterações genéticas associadas à resistência ao tratamento com CDDP nos pacientes de CCECP, incluindo os de OF (McDermott et al., 2018; Roy et al., 2018).

Proteína do retículo endoplasmático 29

Localizado no cromossomo 12, região q24.13, o gene *ERP29* codifica a proteína do retículo endoplasmático 29 (ERp29), que é composta por 261 aminoácidos (Ferrari et al., 1998). A ERp29 é uma proteína chaperona constituída por um domínio N-terminal, onde está localizado uma região de dimerização, requerida na formação de homo ou heterodímeros com outras proteínas (Barak et al., 2009) e por um domínio C-terminal, essencial para o acoplamento e a secreção de substratos (Rainey-Barger et al., 2009).

As chaperonas estão envolvidas no processo de enovelamento e secreção de proteínas celulares do retículo endoplasmático (RE) para o complexo de Golgi ou superfície das células eucarióticas (Sargsyan et al., 2002). O processo de enovelamento de proteínas permite a conformação funcional da proteína, no qual as cadeias lineares de polipeptídeos são convertidas em estruturas tridimensionais, conferindo estabilidade e permitindo a ligação covalente a outras proteínas (Wilkinson & Gilbert, 2004). Erros nesse processo induzem a expressão das chaperonas GRP94 e GRP78 e podem acarretar perda de função ou o acúmulo de proteínas, interferindo na homeostase da síntese e do transporte de proteínas por meio do RE das células (Wilkinson & Gilbert, 2004).

A hiperexpressão da ERp29 foi relatada em condições em que há o aumento na produção e na secreção de proteínas requeridas pelo microambiente celular (Sargsyan et al., 2002).

O papel da ERp29 no desenvolvimento e na progressão tumoral ainda é controverso (Chen & Zhang, 2015). A expressão do *ERP29* foi inversamente proporcional à proliferação das células de linhagem de câncer de pulmão (Shnyder et al., 2008), de câncer de mama (Bambang et al., 2013) e em células de carcinoma gástrico (Wu et al., 2017). Em contraste,



foi observado o aumento da expressão do *ERP29* em linhagem de células de melanoma, de adenocarcinoma de mama, de câncer de pulmão, de colo uterino (Myung et al., 2004), de fígado (Feng et al., 2007), de leucemia mielóide aguda (Banjerdpongchai et al., 2010), de tumores colorretais metastáticos (Deng et al., 2014) e em células tumorais de pacientes com câncer colorretal (Fan et al., 2015).

Zhang et al. (2008) observaram que linhagem de células epiteliais do intestino de ratos, quando expostas a radiação ionizante, apresentaram hiperexpressão da ERp29, sugerindo um potencial papel protetor contra o estresse oxidativo celular, evitando que as células entrassem em apoptose (Zhang et al., 2008). Em contraste, a hipoexpressão da ERp29 foi associada com a diminuição da apoptose em linhagens tumorais de mama tratadas com a curcumina, um potencial agente anti-tumoral (Fang et al., 2011) e em células epiteliais da tireoide e fibroblastos de ratos nulos para o gene *ERP29* (Hirsch et al., 2014).

A hiperexpressão da ERp29 foi associada ao aumento da resistência ao tratamento por RT em linhagem celular e em células do tumor de carcinoma de nasofaringe (Qi et al., 2012; Wu et al., 2012).

A hipoexpressão da ERp29 foi associada com a recorrência e com o perfil metastático em tumores de mama, melanoma e colorretal (Chen & Zhang, 2015). Em linhagem tumoral de mama, a hipoexpressão da ERp29 foi associada à ativação da transição epitélio-mesênquima, evento em que as células epiteliais adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes (mesenquimais) e assim, gerar metástases (Bambang et al., 2009). Em contraste, a hiperexpressão da ERp29 foi observada em linhagem celular de câncer de mama metastático (Xu et al., 2010) e em células tumorais de pacientes com melanoma metastático (Linge et al., 2012), quando comparados aos tecidos não-metastáticos correspondentes.

Em pacientes com tumor colorretal, a hiperexpressão da ERp29, juntamente com a hiperexpressão das proteínas CLIC4 e Smac/DIABLO, relacionadas com o mecanismo de metástase, foram associadas ao pior prognóstico da doença (Deng et al., 2014). Em contraste, em pacientes com adenocarcinoma de pâncreas, a hipoexpressão da ERp29 foi associada a invasão tumoral e pior sobrevida global dos pacientes (Zhang et al., 2016). Em carcinoma gástrico, a hipoexpressão da ERp29 também foi associada ao pior prognóstico dos pacientes com a doença, possivelmente pela ativação de vias da proliferação celular e eventos metastáticos (Wu et al., 2017).



Zhang et al. (2017) observaram que a hipoexpressão do gene *ERP29* aumentou a eficácia ao tratamento quimioterápico a base de CDDP de células da linhagem de câncer de pulmão com a deleção do gene *TP53* (Zhang et al., 2017).

Porém, não há na literatura relatos sobre a função do gene *ERP29* e sua relevância na carcinogênese do CCEOF.

Frente ao exposto, nos pareceu de interesse identificar o papel do gene *ERP29* no surgimento e tratamento de tumores de CCEOF.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar o papel do *ERP29* no CCEOF.

Objetivos específicos

- Verificar a influência da superexpressão e do silenciamento do *ERP29* no ciclo celular, na apoptose e na migração de células de linhagens de CCEOF sensível e resistente à CDDP;
- Identificar genes associados com a expressão diferencial do *ERP29* em linhagens de CCEOF sensível e resistente à CDDP;
- Identificar proteínas que interagem com a ERp29 em linhagens de CCEOF sensível e resistente à CDDP;
- Avaliar o papel do *ERP29* no estresse do RE em linhagens de CCEOF sensível e resistente à CDDP.

MATERIAL E MÉTODOS

A superexpressão e o silenciamento do *ERP29* serão induzidos em linhagens de CCEOF sensível e resistente à CDDP denominadas FaDu (HTB-43™, *American Type Culture Collection*®) e UT-SCC-26A (CVCL-7829), respectivamente. Os procedimentos contarão com a inserção de um vetor de clonagem específico para a superexpressão do gene e com a inserção de um pequeno RNA de interferência (siRNA) específico para o silenciamento do *ERP29*.

1. Cultura de células

As células das linhagens FaDu e UT-SCC-26A serão cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco®, EUA), suplementado com 10% de soro fetal



bovino (Cultilab, BRA), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina (Cultilab, BRA). As células serão cultivadas em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Para a avaliação da quimioresistência, as células serão tratadas com diferentes concentrações de CDDP (10, 20 e 40µM) (Sigma[®], EUA) por 48 horas.

2. Superexpressão do ERP29

A indução da superexpressão do *ERP29* será realizada por meio da clonagem do RNA mensageiro (mRNA) do *ERP29* no vetor de expressão pcDNA3.1(+) que será transfectado nas linhagens FaDu e UT-SCC-26A. Vale comentar que o pcDNA3.1(+) possui genes de resistência à ampicilina e à neomicina.

2.1 Clonagem do ERP29

Informamos que a padronização do método de clonagem do *ERP29* foi inicialmente realizada. A amplificação do mRNA do *ERP29* (NM_006817) (maior isoforma com 1.623 pares de bases (pb)) excluindo-se a região 3' não traduzida (**Anexo 1**) foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos (**Anexo 1**) que incluem os sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *XhoI* que permitem a correta ligação dos fragmentos do *ERP29* no vetor de clonagem. A PCR foi realizada com o DNA genômico humano controle (Applied Biosystems[®], EUA), com a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Scientific[®], EUA) e com reagentes de otimização da reação, seguindo as recomendações do fabricante.

Os fragmentos obtidos por meio da PCR e o vetor pcDNA3.1(+) foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*. A reação de digestão ocorreu por 2 horas a 37°C. Após a digestão enzimática, os fragmentos foram purificados por meio do kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen[®], GER). O vetor pcDNA3.1(+) foi purificado por meio do kit *QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen[®], GER).

Em seguida, os fragmentos do *ERP29* foram clonados no vetor pcDNA3.1(+) por meio da enzima *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs[®], EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Após a clonagem, o plasmídeo pcDNA3.1(+)_{ERP29} foi obtido.

O plasmídeo pcDNA3.1(+)_{ERP29} foi transformado em bactérias *E. coli* DH5α (Life Technologies[®], EUA) por meio de choque térmico a 42°C por 30 segundos, seguindo o protocolo do fabricante. As colônias das bactérias foram selecionadas por meio do tratamento das bactérias com o antibiótico ampicilina. Os clones obtidos foram submetidos



à extração do DNA plasmidial por meio do kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen®, GER). A inserção e a orientação do fragmento com o *ERP29* foram confirmadas por meio do sequenciador Sanger 3730xL (Applied Biosystems®, EUA).

2.2 Transfecção do *ERP29*

As linhagens FaDu e UT-SCC-26A serão cultivadas em condições ideais descritas previamente até atingirem 70% de confluência. Posteriormente, o meio de cultura DMEM será substituído pelo meio de cultura Opti-MEM® (Gibco®, EUA), sem antibióticos e com concentrações mínimas de soro fetal bovino, para a realização dos experimentos.

O plasmídeo pcDNA3.1(+)*_ERP29* e o vetor pcDNA3.1(+) vazio (controle da reação) serão transfectados nas respectivas linhagens utilizando o reagente Lipofectamina 2000™ (Life Technologies®, EUA), por meio do processo de endocitose, seguindo as instruções do fabricante.

Informamos que a padronização do método de transfecção do *ERP29* foi inicialmente realizada em células da linhagem FaDu e a superexpressão do *ERP29* foi analisada pela PCR quantitativa (qPCR). Ainda, a padronização também será realizada em células da linhagem UT-SCC-26A, posteriormente. Será realizada, também, a confirmação da porcentagem de células corretamente transfectadas com o plasmídeo por meio da análise da proteína verde fluorescente (GFP) por citometria de fluxo.

Após 48 e 72 horas, o mRNA das células FaDu foi extraído por meio do reagente Trizol® (Invitrogen®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A superexpressão do *ERP29* foi confirmada pela qPCR, utilizando o reagente *SYBR Green PCR Master Mix*® (Applied Biosystems®, EUA) e iniciadores específicos, de acordo com o protocolo do fabricante. A superexpressão da proteína ERp29 será confirmada por meio da técnica de WB, de acordo com protocolo padrão, utilizando anticorpos específicos e os reagentes do kit *SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific®, EUA). Vale comentar que o gene *GAPDH* e sua proteína serão utilizados como controle endógeno nas reações de qPCR e WB, respectivamente.

Nossos resultados de padronização demonstraram que, de fato, houve aumento na expressão do gene *ERP29* nas células FaDu transfectadas com o plasmídeo *pcDNA3.1(+)-ERP29* tanto em 48 horas (476,00 unidades arbitrárias (UAs) ± 45,95 desvio padrão (DP) vs. 0,96 UAs ± 0,06 DP; $p=0,004$), quanto em 72 horas (1072,13 UAs ± 242,25 DP vs. 0,77 UAs ± 0,20 DP; $p=0,003$) após a transfecção quando comparadas às células FaDu sem transfecção (**Figura 1**).



3. Silenciamento do *ERP29*

A indução do silenciamento do *ERP29* nas respectivas linhagens será realizada por meio do siRNA_*ERP29* (ensaio nº 136101, Invitrogen®, EUA), de acordo com o protocolo descrito por Chen et al. (2015). O siRNA controle negativo (ensaio nº AM4611, Invitrogen®, EUA) será utilizado como controle dos experimentos.

3.1 siRNA

As linhagens FaDu e UT-SCC-26A serão cultivadas em condições ideais descritas previamente até atingirem 70% de confluência. Posteriormente, o meio de cultura DMEM será substituído pelo meio de cultura Opti-MEM® (Gibco®, EUA), sem antibióticos e com concentrações mínimas de soro fetal bovino, para a realização dos experimentos.

Informamos que a padronização do método de silenciamento do *ERP29* foi inicialmente realizada em células da linhagem FaDu e analisadas por qPCR. A padronização também será realizada em células da linhagem UT-SCC-26A, posteriormente.

O siRNA_*ERP29* e o siRNA controle negativo foram transfectados nas células utilizando o reagente Lipofectamina 2000™ (Life Technologies®, EUA). Após 48 e 72 horas, o mRNA das células foi extraído por meio do reagente Trizol® (Invitrogen®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O silenciamento do *ERP29* foi confirmado por meio dos ensaios de qPCR e serão, também, confirmados por WB.

Nossos resultados de padronização demonstraram que, de fato, houve diminuição na expressão do gene *ERP29* nas células transfectadas com o siRNA-*ERP29* em 72 horas após a transfecção (0,08 UAs ± 0,03 DP vs. 0,77 UAs ± 0,20 DP; $p= 0,004$) quando comparadas às células FaDu sem transfecção (**Figura 1**). Com base nesses resultados, selecionamos o período de 72 horas para realizar os próximos experimentos propostos no presente projeto.

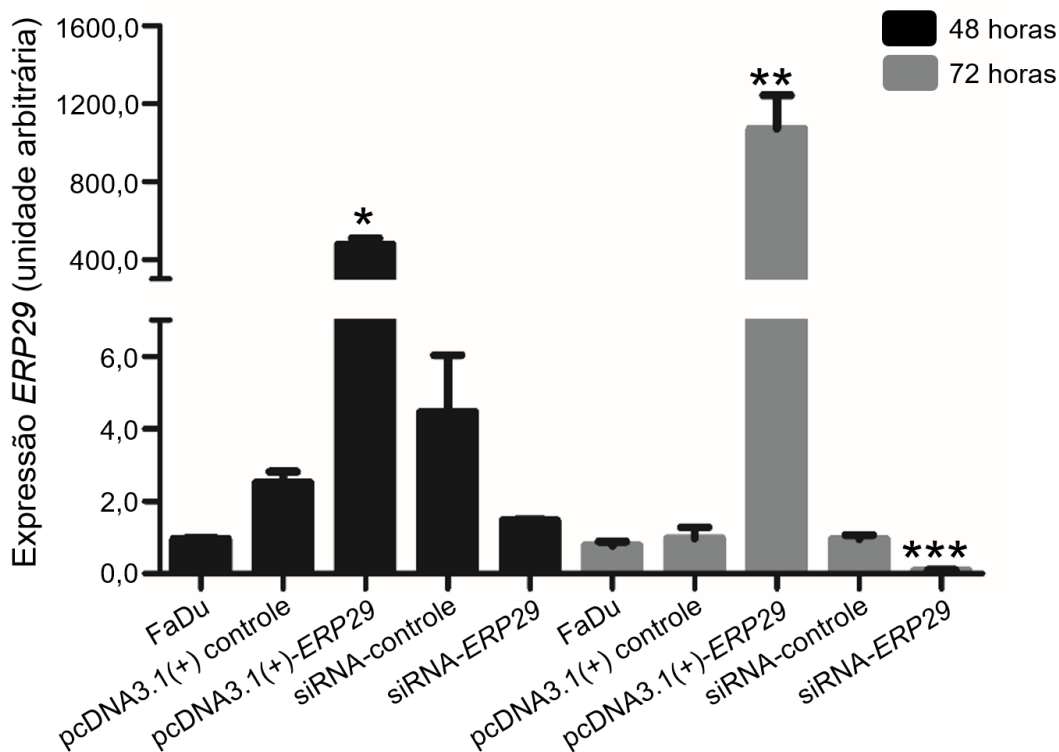


Figura 1. Expressão do gene *ERP29* de acordo com os grupos de células da linhagem de carcinoma de células escamosas de faringe humano (FaDu). Houve aumento na expressão gênica nas células transfectadas com o plasmídeo *pcDNA3.1(+)-ERP29* tanto em 48 horas (476,00 unidades arbitrárias (UAs) \pm 45,95 desvio padrão (DP) vs. 0,96 UAs \pm 0,06 DP; $p= 0,004$)(*), quanto em 72 horas (1072,13 UAs \pm 242,25 DP vs. 0,77 UAs \pm 0,20 DP; $p= 0,003$)(**), e diminuição na expressão gênica nas células transfectadas com o siRNA-*ERP29* em 72 horas (0,08 UAs \pm 0,03 DP vs. 0,77 UAs \pm 0,20 DP; $p= 0,004$)(***) após a transfecção, quando comparadas às células FaDu

4. Ensaio funcionais

Os ensaios para detecção do ciclo celular, da apoptose e de migração celular serão realizados em células das linhagens FaDu e UT-SCC-26A que superexpressam e que silenciam o *ERP29*, obtidas anteriormente. Os referidos ensaios serão avaliados por meio de citometria de fluxo. Vale comentar que o citômetro de fluxo está disponível para utilização em nosso laboratório. Os experimentos serão realizados em triplicata e em três experimentos independentes.



4.1 Ensaio para detecção do ciclo celular

As células das referidas linhagens serão cultivadas em condições ideais descritas anteriormente durante 24 horas. O ciclo celular será quantificado por meio da marcação do DNA celular com 7-amino actinomicina D (BD Biosciences[®], EUA) e avaliado por citometria de fluxo no sistema *FACS Verse* (BD Biosciences[®], EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

4.2 Ensaio para detecção da apoptose

As células das referidas linhagens serão cultivadas em condições ideais descritas previamente durante 72 horas. Em seguida, o meio de cultura será substituído com DMEM acrescido de água oxigenada (Sigma[®], EUA), isento de soro fetal bovino, por seis horas. A apoptose será quantificada por meio da marcação das células com o kit *Phycoerythrin [PE]-annexin V apoptosis detection I* (BD Biosciences[®], EUA) e avaliada por citometria de fluxo no sistema *FACS Verse* (BD Biosciences[®], EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

4.3 Ensaio para detecção da migração celular

O ensaio de migração celular será realizado em placa *transwell* com a utilização do kit *BioCoat Matrigel Invasion Chambers* (BD Biosciences[®], EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As células serão cultivadas em meio de cultura DMEM, sem SFB, na câmara superior da placa *transwell*. Na câmara inferior, será adicionado meio de cultura contendo 10% de SFB a fim de induzir a migração das células. A placa será incubada em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C por seis horas. Após esse período, o conteúdo da câmara superior será descartado e as células que migraram serão fixadas em formaldeído e coradas com cristal violeta em metanol. As imagens das células serão obtidas em microscópio invertido.

5. Identificação de genes associados com a expressão diferencial do *ERP29*

A identificação da expressão de genes associados com a expressão diferencial do *ERP29* será realizada por meio da análise do mRNA de células das linhagens FaDu e UT-SCC-26A que superexpressam e que silenciam o *ERP29*, obtidas anteriormente. O mRNA das referidas células será analisado por meio de ensaios com microarranjos de DNA



complementar (cDNA) da empresa Affymetrix®. O conjunto de equipamentos, incluindo o scanner *GeneChip™ 3000 7G*, da referida empresa está disponível em nosso laboratório.

5.1 Microarranjos de cDNA

Serão utilizados os microarranjos denominados *Clariom™ S Assay* (ensaio nº 902926, Affymetrix®, EUA), que permitem a análise de mais de 20 mil genes relacionados com as principais vias da carcinogênese. Os ensaios com os microarranjos serão realizados com os reagentes do kit *GeneChip® WT PLUS* (Applied Biosystems®, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os procedimentos incluem a síntese de cDNA e de RNA complementar, a fragmentação, a marcação com biotina, a hibridização, a lavagem e a leitura dos dados dos microarranjos.

5.2 Processamento dos dados obtidos por meio dos microarranjos

As imagens captadas pelo scanner serão submetidas à análise de controle de qualidade geral por meio do programa computacional *Expression Console* (Affymetrix®, EUA). Os valores médios de expressão gênica serão obtidos por meio do algoritmo denominado *Robust Multiarray Average* (RMA) disponível no programa *Bioconductor* (bioconductor.org).

5.3 Seleção dos genes associados com a expressão diferencial do *ERP29*

A seleção dos genes diferencialmente expressos será realizada por meio do algoritmo *RankProd*, disponível no programa Bioconductor, entre os grupos de células: 1) FaDu com a superexpressão do *ERP29* e FaDu com o silenciamento do *ERP29*, 2) UT-SCC-26A com a superexpressão do *ERP29* e UT-SCC-26A com o silenciamento do *ERP29*, 3) FaDu com a superexpressão do *ERP29* e UT-SCC-26A com a superexpressão do *ERP29*, 4) FaDu com o silenciamento do *ERP29* e UT-SCC-26A com o silenciamento do *ERP29*, e 5) FaDu e UT-SCC-26A.

Valores com $p < 0,01$ serão considerados significativos após o ajuste com a razão de falsas descobertas (FDR). Ainda, a correlação e a interação de vias com os genes serão analisadas por meio do programa *MetaCore* (Thomson Reuters®, EUA). Serão selecionados três genes de interesse em cada um dos cinco grupos para validação dos resultados por meio dos métodos de qPCR e de WB, descritos anteriormente.

6. Identificação de proteínas que interagem com a ERp29



A identificação de proteínas que interagem com a ERp29 será, inicialmente, realizada por eletroforese bidimensional para identificação de proteínas alvo utilizando as células das linhagens FaDu e UT-SCC-26A. Após a seleção das proteínas alvo, as células serão submetidas ao ensaio de co-immunoprecipitação (Co-IP). As referidas células serão lisadas em tampão de lise (50mM TrisHCL pH 7,4; 1% de NP40; 0,2% de deoxicolato de sódio) acrescido dos inibidores de proteases e de fosfatases (Sigma[®], EUA). Os lisados de células serão incubados com anticorpos específicos a 4°C *overnight*, seguido de incubação com a proteína A/G sefarose (Santa Cruz[®], EUA). Os complexos imunes serão analisados por WB, descrito anteriormente.

Os experimentos de identificação de proteínas que interagem com a ERp29 serão realizados em colaboração com o Centro de Biologia Química de Proteínas Quinases SGC (*Structural Genome Consortium*), localizado na UNICAMP, sob a supervisão do Dr. Rafael Couñago.

7. ERP29 e o estresse do retículo endoplasmático

O papel do *ERP29* no estresse do RE será avaliado por meio do tratamento com tunicamicina (Sigma[®], EUA), indutor clássico do estresse do RE. O estresse do RE também será induzido por meio do tratamento com CDDP (Sigma[®], EUA) em células das linhagens FaDu e UT-SCC-26A, sensível e resistente à CDDP, respectivamente. Será utilizado também o tratamento com ácido 4-fenilbutírico (4-PBA) (Sigma[®], EUA), composto capaz de neutralizar os efeitos do estresse do RE. As células após atingirem confluência, terão o meio trocado para DMEM suplementado com tunicamicina ou CDDP ou 4-PBA por 48 horas. Os níveis de GRP94 e GRP78, proteínas representativas do RE, e do *ERP29* serão quantificados por meio da qPCR e WB, como descritos anteriormente.

8. Análise estatística

Inicialmente será avaliada a distribuição normal dos valores das amostras por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os resultados que apresentarem distribuição normal serão analisados por meio do teste *t* de Student ou ANOVA. Os resultados que apresentarem distribuição não-normal serão analisados por meio do teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

A SLE será calculada a partir da data do diagnóstico até a data da primeira progressão ou recidiva da doença, ou óbito determinado pela doença ou perda de segmento. A SG será calculada a partir da data do diagnóstico até a data do óbito por



qualquer causa ou perda de segmento. Os tempos de SLE e SG serão estimados por meio da curva de Kaplan-Meier (KM) e a comparação entre as curvas de sobrevivência será realizada por meio do teste de log-rank.

Fatores com valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos. Todas as análises serão realizadas por meio do programa estatístico SPSS 21.0 (SPSS Incorporation®, EUA).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amar A, Chedid HM, Rapoport A, Dedivitis RA, Cernea CR, Brandão LG, et al. Update of assessment of survival in head and neck cancer after regional recurrence. *J Oncol.* 2012; 2012:154303.
- Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(2):93-99.
- Bambang IF, Lee YK, Richardson DR, Zhang D. Endoplasmic reticulum protein 29 regulates epithelial cell integrity during the mesenchymal–epithelial transition in breast cancer cells. *Oncogene.* 2013; 32(10):1240–51.
- Bambang IF, Xu S, Zhou J, Salto-Tellez M, Sethi SK, Zhang D. Overexpression of endoplasmic reticulum protein 29 regulates mesenchymal–epithelial transition and suppresses xenograft tumor growth of invasive breast cancer cells. *Lab Invest.* 2009; 89(11):1229–42.
- Banjerdpongchai R, Kongtawelert P, Khantamat O, Srisomsap C, Chokchaichamnankit D, Subhasitanont P, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *J Hematol Oncol.* 2010; 3:50.
- Barak NN, Neumann P, Sevvana M, Schutkowski M, Naumann K, Malesević M, et al. Crystal structure and functional analysis of the protein disulfideisomerase-related protein ERp29. *J Mol Biol.* 2009; 385(5):1630–42.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. IARC Press: Lyon, 2005.
- Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol.* 2014; 110(5):551-74.
- 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;68(6):394-424.



Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011; 29(32):4294-301.

Chen S, Zhang D. Friend or foe: Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29) in epithelial cancer. *FEBS Open Bio*. 2015; 5:91–98.

Chen S, Zhang Y, Zhang D. Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29) confers radioresistance through the DNA repair gene, O6-methylguanine DNA-methyltransferase, in breast cancer cells. *Sci Rep*. 2015; 5:14723.

Costa EF, Santos ES, Liutti VT, Leal F, Santos VC, Rinck-Junior JA, et al. Association between polymorphisms in genes related to DNA base-excision repair with risk and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016; 142(9):1917–26.

Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010; 2:15.

Deng Y, Tang N, Liu C, Zhang JY, An SL, Peng YL, et al. CLIC4, ERp29, and Smac/DIABLO derived from metastatic cancer stem-like cells stratify prognostic risks of colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(14):3809-17.

Fan N, Gao J, Liu Y, Song W, Zhang ZY, Gao CF. Label-free quantitative mass spectrometry reveals a panel of differentially expressed proteins in colorectal cancer. *BioMed Res Int*. 2015; 2015:365068.

Fang HY, Chen SB, Guo DJ, Pan SY, Yu ZL. Proteomic identification of differentially expressed proteins in curcumin-treated MCF-7 cells. *Phytomedicine*. 2011; 18(8-9):697–703.

Farias TP, Dias FL, Florindo E, Manfro G, Freitas EQ, Carneiro MP, et al. Fatores prognósticos preditivos de resposta ao tratamento radioterápico paliativo em pacientes não cirúrgicos com carcinoma espinocelular de orofaringe. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2006; 35(3):155-9.



Feng Y, Tian Z, Wan M, Zheng ZB. Protein profile of human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721: Identification and functional analysis. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(18):2608-14.]

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5):E359–E86.

Ferrari DM., Nguyen VP, Kratzin HD, Soling HD. ERp28, a human endoplasmic-reticulum-luminal protein, is a member of the protein disulfide isomerase family but lacks a CXXC thioredoxin-box motif. *Eur J Biochem.* 1998; 255(3):570-9.

Fossum GH, Lie AK, Jepsen P, Sandlie LE, Mork J. Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma in South-Eastern Norway: prevalence, genotype and survival. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017; 274(11):4003–10.

Fotopoulos G, Pavlidis N. The role of human papilloma virus and p16 in occult primary of the head and neck: A comprehensive review of the literature. *Oral Oncol.* 2015; 51(2):119-23.

Gale N, Zidar N. Tumours of the head and neck. In: Damjanov I, Fan F. *Cancer grading manual.* 2 ed. Heidelberg New York Dordrecht London: Springer; 2013. p.9-29.

Hirsch I, Weiwad M, Prell E, Ferrari DM. ERp29 deficiency affects sensitivity to apoptosis via impairment of the ATF6–CHOP pathway of stress response. *Apoptosis.* 2014; 19(5):801–15.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas de câncer 2018. Ministério da Saúde, Brasil, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>.

Lambert R, Sauvaget C, Cancela MC, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 23(8):633–41.

Lee S, Lee S, Park S, Yoon SM, Park J, Song SY, et al. Refining prognostic stratification of human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma: different prognosis between T1 and T2. *Radiat Oncol J.* 2017; 35(3):233-40.



Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(1):9-22.

Licitra L, Felip E, ESMO Guidelines Working Group. Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2009; 20(S4):121-2.

Linge A, Kennedy S, O'Flynn D, Beatty S, Moriarty P, Henry M, et al. Differential expression of fourteen proteins between uveal melanoma from patients who subsequently developed distant metastases versus those who did not. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53(8):4634-43.

López RV, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control*. 2014; 25(4):461–71.

Martin D, Abba MC, Molinolo AA, Vitale-Cross L, Wang Z, Zaida M, et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget*. 2014; 5(19):8906-23.

McDermott SC, Rodriguez-Ramirez C, McDermott SP, Wicha MS, Nör JE. FGFR signaling regulates resistance of head and neck cancer stem cells to cisplatin. *Oncotarget*. 2018; 9(38): 25148–25165.

Mehanna H, Jones TM, Gregoire V, Ang KK. Oropharyngeal carcinoma related to human papillomavirus. *BMJ*. 2010; 340:c1439.

Mendenhall WM, Werning JW, Pfister DG. Treatment of head and neck cancers. In: De Vita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.729-80.

Mittal RK. Motor function of the pharynx, esophagus and its sphincters. *Pharynx - Anatomy, neural innervation, and motor pattern*. 1 ed. Morgan & Claypool Life Sciences; 2011.

Myung J, Afjehi-Sadat L, Felizardo-Cabatic M, Slavic I, Lubec G. Expressional patterns of chaperones in ten human tumor cell lines. *Proteome Sci*. 2004; 2(1):8.



- Norregaard C, Gronhoj C, Jensen D, Friberg J, Andersen E, von Buchwald C. Cause-specific mortality in HPV+ and HPV- oropharyngeal cancer patients: insights from a population-based cohort. *Cancer Med.* 2018; 7(1):87-94.
- Panwar A, Interval E, Lydiatt WM. Emergence of a novel staging system for oropharyngeal squamous cell carcinoma based on HPV status. *Oncology.* 2017; 31(12):e33-e40.
- Philouze P, Péron J, Poupart M, Pujo K, Buiret G, Céruse P. Salvage surgery for oropharyngeal squamous cell carcinomas: Aretrospective study from 2005 to 2013. *Head Neck.* 2017; 39(9):1744–50.
- Psyrrri A, Cohen E. Oropharyngeal cancer: clinical implications of the HPV connection. *Ann Oncol.* 2011; 22(5):997-9.
- Qi L, Wu P, Zhang X, Qiu Y, Jiang W, Huang D, et al. Inhibiting ERp29 expression enhances radiosensitivity in human nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Med Oncol.* 2012; 29(2):721-8.
- Rainey-Barger EK, Mkrтчian S, Tsai B. The C-terminal domain of ERp29 mediates polyomavirus binding, unfolding, and infection. *J Virol.* 2009; 83(3):1483–91.
- Roy S, Roy S, Kar M, Padhi S, Saha A, Anuja K, Banerjee B. Role of p38 MAPK in disease relapse and therapeutic resistance by maintenance of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018; 47(5):492-501.
- Sargsyan E, Baryshev M, Szekely L, Sharipo A, Mkrтчian S. Identification of ERp29, an endoplasmic reticulum luminal protein, as a new member of the thyroglobulin folding complex. *J Biol Chem.* 2002; 277(19):17009–15.
- Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, Gottesman MM. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 2012; 64(3):706-21.
- Shnyder SD, Mangum JE, Hubbard MJ. Triplex profiling of functionally distinct chaperones (ERp29/PDI/BiP) reveals marked heterogeneity of the endoplasmic reticulum proteome in cancer. *J Proteome Res.* 2008; 7(8):3364–72.
- Tan M, Myers JN, Agrawal N. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma genomics. *Otolaryngol Clin North Am.* 2013; 46(4):545-66.



Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1699(1-2):35-44.

Wu J, Yang Y, Gao S, Jiang H, Wang X, Xiao Y, et al. ERp29 inhibits tumorigenicity by suppressing epithelial mesenchymal transition in gastric cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(45):78757-66.

Wu P, Zhang H, Qi L, Tang Q, Tang Y, Xie Z, et al. Identification of ERp29 as a biomarker for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy. *Oncol Rep*. 2012; 27(4):987-94.

Xu S, Yan P, Shao Z. Differential proteomic analysis of a highly metastatic variant of human breast cancer cells using two-dimensional differential gel electrophoresis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136(10):1545–56.

Zhang B, Wang M, Yang Y, Wang Y, Pang X, Su Y, et al. ERp29 is a radiation-responsive gene in IEC-6 cell. *J Radiat Res*. 2008; 49(6):587–96.

Zhang K, Yao H, Yang Z, Li D, Yang L, Zou Q, et al. Comparison of ILK and ERP29 expressions in benign and malignant pancreatic lesions and their clinicopathological significances in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Clin Transl Oncol*. 2016; 18(4):352-9.

Zhang Y, Hu Y, Wang J, Yao H, Wang H, Liang L, et al. Proteomic identification of ERP29 as a key chemoresistant factor activated by the aggregating p53 mutant Arg282Trp. *Oncogene*. 2017; 36(39):5473-83.

Zhu L, Sturgis EM, Zhang H, Lu Z, Tao Y, Wei Q, et al. Genetic variants in microRNA-binding sites of DNA repair genes as predictors of recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer*. 2017; 141(7):1355–64.

Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive Oxygen Species (ROS) - Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res*. 2011; 711(1–2):167–73.

Documento assinado eletronicamente por **Renata Maria dos Santos Celeghini, COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNICAMP**, em 28/05/2021, às 13:09 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
6068B0F0 178C4221 B99F6E4E 98662084

