LUCAS EDUARDO BOTELHO DE SOUZA

Células estromais mesenquimais multipotentes promovem a metástase de melanoma pela ativação da transição epitélio-mesenquimal

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas

Programa: Clínica Médica

Opção: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Souza, Lucas Eduardo Botelho de

Células estromais mesenquimais multipotentes promovem a metástase de melanoma pela ativação da transição epitélio-mesenquimal. Ribeirão Preto, 2012.

99 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica. Opção: Investigação Biomédica.

Orientador: Tadeu Covas, Dimas.

1. Células estromais mesenquimais multipotentes.
2. Melanoma. 3. Metástase. 4. Transição epitélio-mesenquimal.
5. Fator de crescimento de hepatócitos.

Nome: SOUZA, Lucas Eduardo Botelho de

Título: Células estromais mesenquimais multipotentes promovem a metástase de melanoma pela ativação da transição epitélio-mesenquimal.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Donizeti e Marlene*,
por me suprirem com tudo o que há de melhor e mais importante na vida:

Amor, apoio e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Donizeti* e *Marlene*, que me ensinaram tanto, que velaram meus sonos, que lutaram para me prover oportunidades, e que me estimularam como ninguém a perseguir meus sonhos. Incansavelmente.

Ao meu irmão, *Júlio*, pela amizade e companheirismo diário.

À minha amada *Lilian Rosa*, pelo apoio de cada minuto, pelo carinho, pelo companheirismo e pelas cores dos meus dias.

Aos meus *professores*. Meus nobres mestres.

Ao *Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas*, pela orientação que me permitiu aprender tantas coisas novas e refletir sobre a ciência em seus mais diversos aspectos. Também agradeço a confiança e as valiosas oportunidades que me concedeu.

À *Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes*, por me abrir as portas da pesquisa científica, pelos ensinamentos, pelas oportunidades e pelo apoio cotidiano.

Aos amigos do Laboratório de Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde este trabalho foi desenvolvido. Muito obrigado *Andrielle*, *Ângelo*, *Daianne*, *Larissa*, *Raquel*, *Ricardo* e *Thaís* pela amizade e companheirismo e pela convivência leve, descontraída e enriquecedora.

À *Patrícia Vianna*, *Camila Menezes* e *Daiane Santos* pelos ensinamentos e pelo suporte essencial durante as análises por citometria de fluxo.

À *Fernanda Ursoli*, pelo companheirismo e amizade durante todo este tempo e pelo auxílio imprescindível nos ensaios de Biologia Molecular.

À *Dra. Danielle Magalhães* e à *Josiane*, pela amizade e por me auxiliarem nos procedimentos de imunofluorescência e microscopia confocal.

À *Profa. Dra. Simone Haddad* e à *Maristela Orellana*, por me abrirem gentilmente as portas de seus laboratórios durante a realização dos experimentos.

Ao *Dr. Deivid Rodrigues*, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por ceder gentilmente o vetor lentiviral codificante da luciferase e pela constante disposição em esclarecer minhas dúvidas.

À *Profa. Dra. Marisa Barbieri* e toda a *equipe da Casa da Ciência do Hemocentro de Ribeirão Preto*. Obrigado por me apresentarem o caminho da Ciência e por proporcionarem tantos momentos de prática pedagógica e de reflexões acerca do ensino e aprendizagem.

À *todos os funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto*, pela companhia cotidiana e por contribuírem das mais diversas maneiras para prover condições essenciais para a execução dos projetos de pesquisa.

A *todos os colegas do Hemocentro de Ribeirão Preto*, pelo companheirismo cotidiano e por proporcionar momentos de descontração e reflexão.

Aos *funcionários do Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto*, pelos cuidados dispensados aos animais e pela notável disposição em colaborar.

Ao *Emerson Quirino*, funcionário da Secretaria de Pós-Graduação em Clínica Médica, que sempre mostrou grande disposição em me auxiliar nas questões burocráticas do departamento.

Aos meus queridos amigos, *Juliana Ueda, Mariana Davanso, Carolina Caliári, Priscilla Carnavale, Flávio Trevisan, Jaqueline Lupi e Sharon Moraes*. Não há palavras capazes de descrever minha gratidão pela amizade e companheirismo de sempre, pela coerência e pelos ótimos momentos que tive ao lado de vocês.

EPÍGRAFE

“Seja lá o que você fizer, ame-o”

Giuseppe Tornatore

RESUMO

Souza, L. E. B. **Células estromais mesenquimais multipotentes promovem a metástase de melanoma pela ativação da transição epitélio-mesenquimal.** 2012. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A interação entre células tumorais e células estromais tem um papel central na progressão neoplásica. As células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) podem se integrar ao microambiente tumoral onde modulam o crescimento dos tumores por meio de distintos mecanismos. Entretanto, pouco se sabe sobre o papel das MSCs na metástase, a principal causa de morte em pacientes com câncer. Utilizando um modelo de melanoma murino ortotópico, nós demonstramos que MSCs obtidas da medula óssea de camundongos (MO-MSCs) ocupam o nicho perivascular nos tumores primários e aumentam 2,5 vezes a incidência de micrometástases pulmonares quando co-infundidas com células de melanoma B16. Observamos ainda que o meio condicionado das MO-MSCs não altera o potencial de colonização pulmonar das células B16 infundidas sistemicamente. Isto indica que as MO-MSCs modulam as fases iniciais da cascata metastática, durante a qual ocorrem os processos de invasão e intravasão nos vasos sanguíneos. Em correlação com estes efeitos pró-metastáticos, o secretoma das MO-MSCs induziu a transição epitélio-mesenquimal (EMT) nas células de melanoma *in vitro*. Após cultivo em meio condicionado das MO-MSCs, as células B16 adquiriram uma morfologia evidentemente fibroblástica. Ao mesmo tempo, houve o rearranjo dos filamentos de actina e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais como fibronectina, vimentina, FSP1, N-caderina e ZEB2, acompanhado da repressão transcricional de E-caderina. A ativação da EMT pelo secretoma das MO-MSCs resultou na aquisição de propriedades metastáticas nas células de melanoma. Após cultivo em meio condicionado de MO-MSCs, as células B16 tiveram seu potencial de ancoragem à fibronectina reduzido, ao passo que houve o aumento na mobilidade e no potencial de invasão em matrizes tridimensionais. Utilizando inibidores competitivos de ATP contra o receptor tirosina-cinase Met, demonstramos que a aquisição de todas as propriedades metastáticas avaliadas e a ativação da EMT nas células de melanoma é mediada pela ativação da via HGF/Met. Estes dados destacam o papel das MO-MSCs no microambiente tumoral como fonte perivascular de moléculas indutoras da EMT, cuja ativação leva a aquisição de traços metastáticos nas células de melanoma. Além disso, a inibição da via HGF/Met pode neutralizar os efeitos das MO-MSCs sobre as células tumorais, contribuindo para a repressão de propriedades fundamentais que sustentam a progressão e a disseminação neoplásica. Estas informações são importantes para o desenvolvimento seguro das MO-MSCs como ferramenta terapêutica e demonstram a importância da sinalização entre MSCs e células tumorais na disseminação metastática. Mais especificamente, estas observações reforçam a inibição da via HGF/Met como uma abordagem promissora para o tratamento da metástase.

Palavras-chave: Células estromais mesenquimais multipotentes, melanoma, metástase, transição epitélio-mesenquimal, fator de crescimento de hepatócitos.

ABSTRACT

Souza, L. E. B. **Multipotent mesenchymal stromal cells promote melanoma metastasis through activation of the epithelial-to-mesenchymal transition.** 2012. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The crosstalk between tumor cells and stromal cells can profoundly impact tumor progression. Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) have been reported to integrate the tumor microenvironment where they are described to modulate tumor growth by distinct mechanisms. However, little is known about the impact of MSCs on metastasis, the main cause of death in patients with cancer. Using an orthotopic mouse melanoma model, we showed that mouse bone marrow-derived MSCs (BM-MSCs) occupy the perivascular niche within primary tumors and increased by 2.5-fold the incidence of lung micrometastases after co-infusion with B16 melanoma cells. Also, MO-MSCs conditioned medium did not affect the lung colonization ability of systemically infused B16 cells. This indicates that MO-MSCs induces the initial steps of the metastatic cascade, during which the invasion and intravasation occurs. Correlating with these metastatic effects, the BM-MSCs' secretome activated the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in B16 cells *in vitro*. After culture in BM-MSCs' conditioned medium, B16 cells acquired an evident fibroblastic morphology. Simultaneously, we observed the rearrangement of actin filaments and the upregulation of mesenchymal markers such as fibronectin, vimentin, FSP1, N-cadherin and ZEB2. In agreement with the loss of epithelial phenotype, BM-MSCs' secretome also suppressed E-cadherin expression in B16 cells. The activation of EMT by BM-MSCs led to the acquisition of metastatic traits in melanoma cells. After culture in BM-MSCs' conditioned medium, B16 cells displayed reduced anchorage to fibronectin and increased motility and invasiveness in three-dimensional matrix plugs. Inhibition of Met receptor with competitive ATP inhibitors demonstrated that the induction of EMT and the resultant acquisition of metastatic traits are driven by activation of HGF/Met signaling pathway. Taken together, these evidences highlight the role of BM-MSCs as a perivascular source of EMT-inductive signals, whose activation leads to acquisition of metastatic traits in melanoma cells. Furthermore, inhibition of HGF/Met signaling pathway can neutralize the effects of BM-MSCs on tumor cells, thereby allowing the repression of fundamental properties which support tumor progression and metastasis. This information is useful to safely develop BM-MSCs as therapeutic tool and demonstrate the relevance of the signaling between MSCs and tumor cells during metastasis. More specifically, it reinforces that inhibition of Met signaling can be a promissory approach for the treatment of metastasis.

Keywords: Multipotent mesenchymal stromal cells, melanoma, metastasis, epithelial-to-mesenchymal transition, hepatocyte growth factor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

293T	Linhagem de células de rim embrionário humano
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
B16 ou B16-F10	Linhagem de células de melanoma murino
B16/luc+ ou B16-F10-luc-G5	Linhagem de células B16 expressando luciferase
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BMP-4	Proteína morfogenética óssea 4
CCL5	Quimiocina ligante de motivo C-C 5
CTTs	Células-tronco tumorais
DAPI	40,6-diamino-2-fenilondole
DMEM	Meio essencial modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
Ep-Ras	Linhagem de células epiteliais mamárias expressando o oncogene Ras
FSP-1	Proteína específica de fibroblasto 1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfônico
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IGF1	Fator de crescimento similar à insulina 1

IgG	Imunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
IVIS	Sistema de processamento de imagem <i>in vivo</i>
mc/MSCs	Meio condicionado das células estromais mesenquimais multipotentes derivadas da medula óssea
MDCK	Células epiteliais renais caninas Madin-Darby
Meio N.C.	Meio não condicionado
MET	Transição mesênquima-epitelial
MMP	Metaloprotease de matriz
MMP-2	Metaloprotease de matriz 2
MO-MSCs	Células estromais mesenquimais multipotentes isoladas da medula óssea
MSC/luc2+	Células estromais mesenquimais multipotentes expressando luciferase 2
MSCs	Células estromais mesenquimais multipotentes
MSCV	Vírus de célula-tronco murina
NO	Ácido nítrico
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE2	Prostaglandina E2
PIBB	Processamento de imagem baseado em bioluminescência
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
ROI	Região de interesse
RPMI 1640	Meio instituto memorial Roswell Park 1640
SF	Fator de dispersão

SFB	Soro fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TDP	Tempo de duplicação da população
TGF β	Fator de crescimento transformante beta
TGF β 1	Fator de crescimento transformante beta 1
TGF β 2	Fator de crescimento transformante beta 2
URE	Unidades relativas de expressão
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VSV-G	Proteína G (capsídeo) do vírus da estomatite humana
Y	Resíduo de tirosina
ZEB1	Fator de transcrição dedo-de-zinco homeótico ligante de E-box 1
ZEB2	Fator de transcrição dedo-de-zinco homeótico ligante de E-box 2
α MEM	Meio essencial mínimo-alfa
α SMA	Alfa-actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da cascata de invasão-metástase de um carcinoma.....	25
Figura 2: Esquema da EMT durante a gastrulação em embriões de galinha.....	26
Figura 3: Ciclo de conversão entre os fenótipos epitelial e mesenquimal	27
Figura 4: Morfologia, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação das MO- MSCs..	46
Figura 5: Caracterização das MSC/luc2 ⁺	48
Figura 6: Avaliação do potencial tumorigênico das MSC/luc2 ⁺	49
Figura 7: Detecção de micrometástases pulmonares de melanoma por PIBB <i>ex vivo</i>	50
Figura 8: MO-MSCs ocupam o espaço perivascular nos tumores primários de melanoma.....	52
Figura 9: Potencial de colonização pulmonar das células B16 após cultivo em mc/MSCs.....	53
Figura 10: Transição morfológica das células B16 cultivadas em mc/MSCs	55
Figura 11: Efeito do mc/MSCs na morfologia de clones de células B16	56
Figura 12: Reorganização dos filamentos de actina em células B16 após cultivo em mc/MSCs.....	57
Figura 13: Expressão de marcadores da EMT em células B16 cultivadas em mc/MSCs.....	59
Figura 14: O secretoma das MO-MSCs reduz a ancoragem das células B16 às superfícies recobertas com fibronectina	60
Figura 15: MO-MSCs aumentam a mobilidade das células de melanoma	61
Figura 16: O secretoma das MO-MSCs não afeta a proliferação das células B16...	62
Figura 17: O secretoma das MO-MSCs aumenta o potencial de invasão das células de melanoma.....	63
Figura 18: Efeito de diferentes ligantes de receptores tirosina-cinase na morfologia de células B16	64
Figura 19: Expressão de HGF avaliada por PCR quantitativo em tempo real.....	65
Figura 20: A inibição do receptor Met impede a transição morfológica das células de melanoma.....	66

Figura 21: Inibidores de Met previnem a expressão de marcadores da EMT nas células B16.....	67
Figura 22: Os inibidores de Met previnem a redução do potencial de ancoragem das células B16 à fibronectina após cultivo em mc/MSCs	68
Figura 23: A inibição de Met suprime o efeito pró-migratório do mc/MSCs sobre as células de melanoma.....	69
Figura 24: A inibição de Met impede que o mc/MSCs aumente o potencial invasivo das células de melanoma.....	70

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Marcação por imunofluorescência de E-caderina em células B16 e MO-MSCs não permeabilizadas.....	98
ANEXO B: Pigmentação das células B16 cultivadas em meio condicionado de MO-MSCs e em meio não condicionado	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bateria de desidratação, diafanização e inclusão em parafina à qual as amostras de pulmão foram submetidas	37
Tabela 2: Relação dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR em tempo real e seus respectivos genes-alvo	41
Tabela 3: Frequência de animais acometidos por micrometástases pulmonares de melanoma.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Células estromais mesenquimais multipotentes: conceito e propriedades biológicas.....	19
1.2. Progressão tumoral e MSCs	22
1.3. O mecanismo da metástase e o papel das MSCs.....	23
 2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. Principais reagentes	31
2.2. Animais.....	32
2.3. Linhagens celulares.....	32
2.4. Processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB).....	33
2.5. Isolamento e cultivo de células estromais mesenquimais multipotentes da medula óssea (MO-MSCs)	33
2.6. Geração de lentivírus portadores do gene da luciferase	34
2.7. Transferência do gene luciferase para as MO-MSCs por transdução lentiviral	35
2.8. Imunofenotipagem e diferenciação das MO-MSCs e MSC/luc2 ⁺	35
2.9. Coloração pelos métodos de Sudan II-Escarlate e von Kossa	36
2.10. Geração e uso do meio condicionado de MO-MSCs (mc/MSCs).....	36
2.11. Modelo de metástase espontânea.....	37
2.12. Análise histopatológica.....	37
2.13. Modelo de colonização metastática.....	38
2.14. Monitoramento das MSC/luc2 ⁺ <i>in vivo</i>	38
2.15. Monitoramento da morfologia das células B16.....	39
2.16. Análise da organização dos filamentos de actina.....	39
2.17. Avaliação da ancoragem às superfícies recobertas com fibronectina.....	39
2.18. Ensaio de migração celular (<i>scratch assay</i>)	40
2.19. Avaliação da proliferação celular <i>in vitro</i>	40
2.20. Análise de expressão de genes modulados na EMT por PCR quantitativo em tempo real	41
2.21. Cultivo de células B16 com citocinas indutoras de EMT	42
2.22. Avaliação da expressão de <i>HGF</i> nas MO-MSCs e nas células B16.....	42
2.23. Inibição do receptor Met	42

2.24. Microscopia confocal	43
2.25. Análises estatísticas	43
3. RESULTADOS	45
3.1. Caracterização das MO-MSCs	45
3.2. Geração e caracterização de MO-MSCs modificadas para expressar luciferase	46
3.3. MO-MSCs ocupam a região perivascular do estroma tumoral e promovem a metástase de melanoma	50
3.4. O secretoma das MO-MSCs não afeta o potencial de colonização pulmonar das células de melanoma	52
3.5. O secretoma das MO-MSCs induz a transição epitélio-mesenquimal nas células de melanoma	54
3.5.1. O secretoma das MO-MSCs induz a aquisição de uma morfologia mesenquimal nas células de melanoma	54
3.5.2. O secretoma das MO-MSCs causa a reorganização dos filamentos de actina nas células de melanoma	56
3.5.3. Células de melanoma adquirem uma assinatura gênica consistente com a EMT após cultivo em mc/MSCs	57
3.6. O secretoma das MO-MSCs induz a aquisição de propriedades pró-metastáticas nas células de melanoma	60
3.7. O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) induz a transição morfológica das células B16 para um fenótipo mesenquimal	63
3.8. Adição de inibidores de Met ao mc/MSCs impede a transição morfológica das células de melanoma	65
3.9. A inibição de Met impede a ativação da EMT nas células de melanoma	66
3.10. A inibição do receptor Met previne a aquisição de propriedades metastáticas nas células de melanoma	67
4. DISCUSSÃO	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
6. ANEXOS	98

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células estromais mesenquimais multipotentes: conceito e propriedades biológicas

O termo células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) é um dos utilizados para definir a população de células identificada em 1970 por Friedenstein e colaboradores¹. Na ocasião, os autores isolaram uma população de células não hematopoéticas da medula óssea e baço de porcos-da-índia. Tais células eram aderentes aos frascos de cultivo, capazes de originar colônias de células fibroblásticas e de se diferenciar em osso após transplante em câmaras de difusão *in vivo*. Em estudos subseqüentes, demonstrou-se que esta população de células era capaz de originar outros tecidos mesenquimais como cartilagem, tecido adiposo e tecido fibroso².

Baseado no paradigma das células-tronco hematopoéticas, Arnold Caplan cunha o termo células-tronco mesenquimais e o acrônimo MSCs (do inglês, *mesenchymal stem cells*) para definir esta população estromal mantida *ex vivo*³. Esta denominação baseava-se na hipótese de que a população de células-tronco mesenquimais cultivadas seria capaz de se diferenciar em todos os tecidos mesenquimais *in vivo*. O termo ganhou popularidade rapidamente, porém, a referida população celular não é composta apenas por células-tronco *bona fide*, ou seja, células com capacidade de auto-renovação e diferenciação *in vivo*. Ao contrário, trata-se de uma população heterogênea que inclui células com diferentes potenciais de diferenciação⁴. Complicando ainda mais a questão, mesmo a população oriunda de uma única célula-tronco mesenquimal é heterogênea, pois algumas células da progênie se diferenciam ou entram em senescência estocasticamente durante o cultivo².

Diante de tal imprecisão conceitual, a Sociedade Internacional de Terapia Celular publica seu posicionamento⁵ reconhecendo que as chamadas células-tronco mesenquimais apresentam um conjunto particular de propriedades fisiológicas e que, portanto, é adequado diferenciá-las de outras células estromais. Assim, sugerem o termo “células estromais mesenquimais multipotentes” e a manutenção do acrônimo “MSCs” para designá-las, sendo que a designação de “célula-tronco”

deveria ser restrita aos casos em que o potencial de diferenciação e autorrenovação fosse demonstrado *in vivo*.

Assim, as MSCs são células progenitoras não-hematopoéticas capazes de se diferenciar *in vitro* em tecidos como o adiposo, cartilaginoso e ósseo⁶. Não há um marcador molecular específico que identifique as MSCs. Entretanto, diversos estudos sobre a expressão de antígenos de superfície resultaram no reconhecimento de um perfil imunofenotípico peculiar para estas células. Em camundongos, as MSCs não expressam os marcadores hematopoéticos CD11b, CD34 e CD45, tampouco o marcador de células endoteliais CD31. Em contrapartida, são positivas para marcadores como o CD44, CD73, CD90.2, CD105 e Sca-1^{7, 8, 9}.

O conjunto de propriedades citado acima é rotineiramente utilizado para identificar as MSCs cultivadas. Estas, embora primeiramente isoladas da medula óssea, podem ser obtidas de virtualmente todos os órgãos e tecidos⁷. De acordo com evidências apresentadas em diversos trabalhos^{10, 11, 12, 13, 14}, a distribuição ampla das MSCs pelo organismo pode ser explicada pelo fato de que elas ocupam o nicho perivascular, estabelecendo íntima associação com a membrana basal tanto de vasos arteriais quanto venosos.

Em seu nicho perivascular, postula-se que as MSCs mantêm a homeostase tecidual por meio da secreção de um amplo repertório de moléculas com propriedades pró-regenerativas, além da diferenciação direta em tecidos específicos^{15, 16}. De fato, demonstrou-se que muitas das moléculas secretadas pelas MSCs têm propriedades antiapoptótica, imunorregulatória e angiogênica.

Por exemplo, Parekkadan *et al.* (2007)¹⁷ reportaram que ratos conectados à biorreatores contendo MSCs tiveram uma taxa de sobrevida de 71% contra 14% do grupo controle em um modelo de falha hepática letal. Análises histopatológicas revelaram que o meio condicionado das MSCs preveniu a apoptose dos hepatócitos.

As MSCs também podem suprimir a proliferação de linfócitos T e B, a maturação de células dendríticas e promover a proliferação de linfócitos T reguladores. Esta ampla capacidade de modular o sistema imunológico é mediada por mecanismos dependentes de contato célula-célula e/ou da ação de fatores solúveis produzidos pelas MSCs, como a prostaglandina E₂ (PGE₂), o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), a interleucina 10 (IL-10), o ácido nítrico (NO) e o fator de crescimento transformante β (TGF β)¹⁸.

O suporte à angiogênese é outra propriedade fundamental para a ação pró-regenerativa das MSCs. Em modelo murino de isquemia de membro posterior, as MSCs recuperaram a perfusão sangüínea da área lesada. Além disso, a presença de fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) foi detectada no sítio da lesão ao redor das células infundidas, sugerindo um mecanismo parácrino para os efeitos observados¹⁹. As MSCs também podem dar suporte à formação de estruturas similares a vasos sanguíneos *in vitro* pelas células endoteliais em um meio depletado dos fatores angiogênicos VEGF, bFGF e do fator de crescimento similar à insulina-1 (IGF-1). Neste sistema, além de prover os fatores angiogênicos, as MSCs sintetizaram componentes da matriz extracelular que serviram como substrato para as células endoteliais²⁰.

A descoberta dos diversos papéis biológicos do secretoma das MSCs, como os exemplificados acima, ampliou suas possibilidades de aplicação clínica. Devido aos efeitos parácrinos, as MSCs não necessariamente precisariam se domiciliar ou mesmo se diferenciar em tecidos específicos para exercer benefícios terapêuticos. Assim, este potencial promissor traduziu-se no rápido uso das MSCs em ensaios clínicos, especialmente no tratamento da regeneração do sistema esquelético, de doenças autoimunes e de isquemias. Atualmente, 212 ensaios clínicos envolvendo MSCs estão cadastrados no site www.clinicaltrials.gov (acesso em 20 de janeiro de 2012). No Brasil, a equipe do Centro de Terapia Celular de Ribeirão Preto foi pioneira no uso de MO-MSCs para o tratamento da doença do enxerto contra o hospedeiro e, atualmente, dois estudos clínicos estão em andamento: um deles consiste no uso de MO-MSCs para o tratamento da anemia aplástica adquirida e o outro visa o tratamento de pacientes com diabetes tipo I por meio da infusão das MO-MSCs.

Apesar de terapeuticamente promissoras, as propriedades intrínsecas das MSCs, como o potencial angiogênico, imunossupressor e antiapoptótico também podem se desdobrar em efeitos colaterais indesejados. Notavelmente, estas mesmas propriedades são requeridas para sustentar a tumorigênese e a progressão neoplásica, sendo considerados verdadeiros marcos do câncer²¹. Em um estudo clínico randomizado²², MSCs expandidas *in vitro* foram co-transplantadas com células da medula óssea em pacientes portadores de neoplasias hematológicas. Em concordância com as propriedades imunorregulatórias das MSCs, os autores

demonstraram que a infusão das mesmas impediu o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro. Entretanto, a aplicação das MSCs resultou na reincidência da neoplasia em 60% dos pacientes e na redução da sobrevida livre de doença. Relatos como este, apesar de raros, indicam a importância de estudos pré-clínicos para elucidar a segurança da infusão de MSCs em pacientes portadores de neoplasias.

1.2. Progressão tumoral e MSCs

Postula-se que os tumores são originados da expansão clonal de uma única célula²³ e, para que eles sejam efetivamente formados, precisam superar uma miríade de restrições microambientais e fisiológicas por meio da aquisição de uma série de propriedades. Dentre estas propriedades, tumores necessitam de suprimento vascular e as células tumorais são caracterizados pela resistência à apoptose e pela capacidade de se evadir do ataque pelo sistema imunológico²¹.

Os tumores não são apenas massas insulares de células tumorais. Eles são compostos também por células normais como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, neutrófilos, etc., as quais, juntamente com a matriz extracelular, compõem o estroma tumoral. Este estroma, por sua vez, não é simples coadjuvante no microambiente tumoral. Ao contrário, ele interage com as células tumorais auxiliando a aquisição de propriedades que sustentam o estabelecimento e a progressão neoplásica, como as citadas anteriormente. Por exemplo, células derivadas da medula óssea, como os macrófagos, podem ser recrutadas para o microambiente tumoral onde secretam VEGF e outras citocinas angiogênicas contribuindo para o estabelecimento da vasculatura tumoral²⁴. Fibroblastos ativados, por sua vez, podem secretar metaloproteases (MMPs) que degradam as moléculas da matriz extracelular e os componentes da lâmina basal, abrindo espaço para a disseminação das células tumorais²⁵. Além disso, a expressão de determinados marcadores pelo estroma tumoral tem sido correlacionada com a expectativa de vida em pacientes com câncer. Este é o caso da proteína do citoesqueleto paladina, cuja expressão pelas células estromais correlaciona-se com a baixa expectativa de vida em pacientes com carcinoma de células renais²⁶.

Evidências sugerem que as MSCs também têm participação importante na modulação do comportamento tumoral. Após infusão sistêmica, as MSCs podem se

domiciliar em sítios de injúria tecidual^{27, 28} e em tumores primários de diferentes tipos^{29, 30, 31, 32}, onde se tornam componentes do estroma tumoral. Além disso, MSCs têm sido isoladas de biópsias oriundas de diferentes tumores humanos, como carcinoma ovariano³³, carcinoma de cólon³⁴, carcinoma mamário³⁵ e osteossarcoma³⁶, indicando que estas células são componentes naturais do microambiente tumoral.

Considerando as possibilidades de interação entre células tumorais e MSCs, aliadas às propriedades angiogênicas, antiapoptóticas e imunorregulatórias destas últimas, iniciou-se uma extensa investigação a respeito do papel das MSCs na progressão tumoral. De fato, estudos iniciais demonstraram que as MSCs auxiliam a progressão neoplásica protegendo as células tumorais da eliminação pelo sistema imunológico³⁷ e provendo suporte à angiogênese³⁸. No entanto, o grande volume de estudos subsequentes demonstrou que prever o impacto das MSCs no comportamento tumoral não é trivial. Conforme o levantamento recente de Klopp *et al.* (2011)³⁹, as MSCs promoveram o crescimento tumoral em 10 dos 21 estudos analisados. Nos demais 11 trabalhos, as MSCs exerceram papel oposto, inibindo o crescimento tumoral nos modelos animais.

Dentre os fatores responsáveis por esta discrepância, o tipo de tumor é determinante para definir o impacto que as MSCs terão sobre seu crescimento. Por consequência, a compreensão adequada do papel das MSCs na biologia do câncer é altamente dependente da diversificação dos tipos de tumores estudados.

Em contraste com grande número de trabalhos sobre o impacto das MSCs em propriedades que sustentam o crescimento tumoral, pouquíssimos estudos investigaram o papel das MSCs na metástase, que é a principal causa de morte em pacientes com câncer.

1.3. O mecanismo da metástase e o papel das MSCs

Embora a ressecção cirúrgica associada às terapias adjuvantes possa curar pacientes com tumores confinados, o tratamento do câncer em seu estágio metastático é pouco eficiente. Isso é devido à natureza sistêmica da doença e ao fato de que as células tumorais disseminadas apresentam resistência aos agentes terapêuticos utilizados no tratamento. Esta é a razão pela qual aproximadamente

90% das mortes em pacientes com câncer são causadas pelas metástases, e não pelos tumores primários de onde estas foram derivadas⁴⁰.

A metástase é o processo pelo qual células tumorais deixam o tumor primário e colonizam sítios distantes, formando tumores secundários ou metástases. A disseminação metastática é complexa, pois envolve uma série de eventos que, juntos, compõem a chamada cascata de invasão-metástase (figura 1). Durante este processo, algumas células do tumor primário adquirem a capacidade de invadir os tecidos circunjacentes e migram pelo estroma até alcançar um vaso sanguíneo ou linfático. No caso da metástase hematogênica, as células tumorais atravessam a barreira imposta pelas células perivasculares, pela membrana basal e pelas células endoteliais, alcançando o lúmen dos vasos sanguíneos numa etapa denominada intravasão (figura 1B). Uma vez na corrente sanguínea, as células tumorais que sobreviverem ao estresse hemodinâmico e à eliminação pelas células do sistema imunológico (especialmente as *natural-killer*), por exemplo, acabam ficando aprisionadas em capilares ou mesmo aderindo-se preferencialmente à face luminal do endotélio de algum órgão específico (figura 1C). Neste momento, as células tumorais podem proliferar no lúmen do capilar até que a pequena massa de células rompa o endotélio. Alternativamente, elas podem migrar através do endotélio vascular rumo ao estroma do órgão-alvo. Este processo é denominado extravasão (figura 1D). Em seguida, as células tumorais que encontrarem um microambiente permissivo irão iniciar o programa de proliferação e estabelecer micrometástases (etapa de colonização) (figura 1E). Estas, por sua vez, podem ficar quiescentes ou continuar em processo de crescimento levando à formação de macrometástases capazes de causar a morte do indivíduo⁴¹.

Figura 1: Esquema da cascata de invasão-metástase de um carcinoma. (A) Após uma alteração tumorigênica, células normais originam células tumorais que são insensíveis aos mecanismos de controle da proliferação. Estas se multiplicam e originam o tumor primário. (B) Eventualmente, algumas células do tumor primário podem aumentar a produção de proteases e degradar a lâmina basal subjacente. Em seguida, as células tumorais podem migrar através do tecido subjacente e alcançar o lúmen dos vasos sanguíneos. Este processo é denominado intravasão. (C) Após serem levadas pelo fluxo sanguíneo, as células tumorais podem se aderir à parede do endotélio de órgãos específicos. Alternativamente, pode ocorrer o simples aprisionamento das mesmas devido ao pequeno diâmetro dos capilares. (D) As células tumorais que sobreviverem ao estresse hemodinâmico ou à eliminação pelas células do sistema imune, por exemplo, podem iniciar o processo de extravasão, que consiste na colonização do órgão-alvo. (E) Se o microambiente for permissivo, as células tumorais recém-chegadas proliferam-se no órgão-alvo e formam as metástases.

Os mecanismos envolvidos nas etapas finais da cascata de invasão-metástase, como a extravasão e colonização, ainda estão pouco elucidados. Por outro lado, a usurpação do programa celular conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT) tem sido considerada uma solução parcimoniosa e coerente para explicar como as células tumorais iniciam a disseminação metastática.

A EMT consiste basicamente na conversão fenotípica de células epiteliais em células mesenquimais. A definição atual de EMT foi proposta por Elizabeth Hay e colaboradores após estudos sobre a gastrulação em embriões de galinha⁴². Ao final da fase de blastocisto, as células da massa celular interna do embrião organizam-se em um epitélio denominado epiblasto. Como todo epitélio, o epiblasto é composto por células com polaridade apical-basal as quais são fortemente aderidas entre si por meio de complexos de junção intercelular. A proteína E-caderina, por exemplo, é um

componente importante destes complexos de junção. No início da gastrulação, algumas células da porção medial do epiblasto iniciam um processo de invaginação, originando a fenda primitiva. Ao mesmo tempo, as células situadas nas bordas da fenda primitiva passam a emitir filipodia em sua região basal, perdem a forte adesão intercelular que as mantém unidas e iniciam a migração pela matriz extracelular entre o epiblasto e o hipoblasto. Portanto, estas células adquirem um fenótipo mesenquimal, caracterizado pela ausência de polaridade apical-basal, ausência de adesão intercelular e capacidade de migração através da matriz extracelular. Estas células mesenquimais originam, em seguida, a mesoderme e a endoderme do embrião (figura 2). A EMT também dirige outros processos durante a ontogênese dos vertebrados, como a formação da crista neural, das válvulas cardíacas e do palato secundário⁴³.

Figura 2: Esquema da EMT durante a gastrulação em embriões de galinha. O esquema à esquerda representa o corte transversal de um embrião de galinha durante a gastrulação. A fenda primitiva é formada pela invaginação das células epiteliais que compõem o epiblasto. Simultaneamente, as células situadas na porção medial da fenda assumem um fenótipo mesenquimal, se delaminam e migram no espaço entre o epiblasto e o hipoblasto. Estas, por sua vez, irão compor a mesoderme e a endoderme. O esquema à direita representa o corte transversal do embrião em vista frontal. As células epiteliais do epiblasto são firmemente aderidas entre si e apresentam polaridade apical-basal. Estas, por sua vez, originam células mesenquimais por EMT, as quais não apresentam polaridade definida, expressam poucas moléculas de adesão intercelular e tem capacidade de migração e invasão.

Durante a EMT, ocorre a modulação transcricional de diversos genes, notadamente os que definem os fenótipos epitelial e mesenquimal (figura 3). Por exemplo, a redução da expressão de E-caderina⁴⁴, molécula de adesão intercelular típica de células epiteliais, é uma das principais características da EMT. A aquisição do fenótipo mesenquimal também é acompanhada pelo aumento da expressão dos filamentos de citoesqueleto como a vimentina, proteína específica de fibroblasto-1 (FSP-1 ou S100A4) e alfa-actina de músculo liso (α SMA). Além disso, o aumento da

expressão de N-caderina e de genes que codificam proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, caracterizam células em trânsito para o fenótipo mesenquimal⁴⁵. Esta modulação na expressão gênica é dirigida por um conjunto bem conhecido de fatores de transcrição. Dentre eles, destacam-se os fatores de transcrição da família do Snail (Snai1 e Snai2/Slug) e os fatores de transcrição Twist, ZEB1 e ZEB2⁴⁶.

As células mesenquimais originadas a partir da EMT nem sempre se mantêm indefinidamente neste estado. Ao contrário, elas podem eventualmente reassumir o fenótipo epitelial. Durante a formação do rim, por exemplo, células mesenquimais agregam-se ao redor dos ramos do broto ureteral, adquirem polaridade, passam a expressar moléculas de adesão intercelular e diferenciam-se no epitélio dos túbulos renais⁴⁷. O processo de reversão do fenótipo mesenquimal para o epitelial é denominado transição mesênquima-epitelial (MET) (figura 3).

Figura 3: Ciclo de conversão entre os fenótipos epitelial e mesenquimal. O diagrama representa o ciclo de eventos que ocorrem durante a transição do fenótipo epitelial para mesenquimal (EMT) e o processo reverso, em que células mesenquimais reassumem o fenótipo epitelial (MET). As alterações na expressão gênica que ocorrem durante a EMT são governadas por um conjunto de fatores de transcrição, alguns dos quais estão listados no diagrama (retângulo). Os fenótipos epitelial e mesenquimal podem ser diferenciados por meio da expressão de marcadores específicos, como os mencionados na figura. A modulação da expressão de E-caderina, por exemplo, é um dos eventos mais característicos durante a EMT ou a MET. Diagrama modificado de Thiery & Sleeman, 2006⁴⁸.

A EMT não é restrita ao período ontogenético. Evidências indicam que este processo também é responsável pela geração de fibroblastos durante a fibrose e postula-se que as células tumorais ativam o programa da EMT levando à aquisição de propriedades invasivas⁴⁵.

Estudos demonstrando a importância da EMT na metástase acumularam-se exponencialmente após o trabalho seminal de Yang *et al.* (2004)⁴⁹. Os autores demonstraram que a expressão ectópica do fator de transcrição Twist, um importante regulador da EMT na morfogênese, induz a aquisição de um fenótipo mesenquimal, aumento da mobilidade e do potencial metastático em células de carcinoma mamário. Além disso, a correlação entre a expressão de Twist e o diagnóstico de carcinoma lobular invasivo, caracterizado pela baixa expressão de E-caderina, reforçou a ligação entre EMT e metástase tumoral. Este conceito ganhou cada vez mais aceitação à medida em que se demonstrava a correlação entre o fenótipo metastático das células tumorais e o aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como FSP1⁵⁰ e fibronectina⁵¹, aliado à redução da expressão de E-caderina⁵². De fato, a perda parcial de E-caderina tem sido correlacionada com o mau prognóstico em tumores murinos e humanos⁵³.

Apesar das evidências disponíveis, a maioria dos patologistas mantém-se céticos quanto à ativação da EMT durante a metástase. A primeira razão para tal é que não há qualquer demonstração conclusiva da EMT em tumores humanos. Argumenta-se que a instabilidade genômica em tumores ocorre em diferentes níveis, sendo possível a expressão de marcadores de linhagens específicas sem que isso signifique uma completa transição para o fenótipo mesenquimal⁵⁴. Deste modo, identificar a EMT por meio da análise da expressão de poucos marcadores mesenquimais pode levar a conclusões errôneas sobre a importância deste processo na biologia do câncer. Além disso, as metástases de carcinomas possuem células com morfologia epitelial ao invés de mesenquimal. Disto decorre que a EMT deve possuir um papel transiente na disseminação das células tumorais e a reversão do processo (MET) é necessária nos sítios de colonização para gerar tumores secundários epiteliais. No entanto, embora a reversão do fenótipo mesenquimal tenha sido demonstrada *in vitro*⁵⁵ e em modelos de xenoenxertos tumorais^{56, 57}, evidências desta plasticidade em tumores espontâneos ainda não foram reportadas.

Os sinais oriundos das células estromais dirigem muitas das EMTs que ocorrem durante a morfogênese. Analogamente, postula-se que o comportamento

invasivo das células tumorais seja determinado pela sinalização entre elas e as células do estroma tumoral. De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que o co-cultivo com MSCs induz a ativação da EMT em células de carcinoma mamário⁵⁸. Por outro lado, um estudo anterior havia demonstrado que as MSCs promovem a disseminação metastática das células de carcinoma mamário MDA-MB-231 sem que haja a ativação da EMT⁵⁹. Ao invés disso, propôs-se que a secreção de CCL5 pelas MSCs induzia o aumento da mobilidade das células tumorais, sem alterar a expressão de marcadores mesenquimais ou epiteliais.

Devido a estes resultados conflitantes e à ausência de estudos em outros tipos de tumor, o papel das MSCs na disseminação metastática permanece obscuro. A compreensão do papel das MSCs na metástase tumoral pode auxiliar no desenvolvimento das MSCs como ferramenta terapêutica segura. Além disso, tendo em vista a importância do estroma para a progressão tumoral, elucidar os mecanismos de sinalização entre MSCs e células tumorais pode ampliar as opções de intervenção terapêutica contra o câncer.

Por esta razão, investigamos se MSCs isoladas da medula óssea (MO-MSCs) seriam capazes de promover a metástase em um modelo murino de melanoma utilizando células B16.

Nossos achados demonstram que as MO-MSCs aumentam a incidência de micrometástases pulmonares de melanoma após a co-infusão subcutânea com células B16. Esta indução da metástase correlacionou-se com a ativação da EMT nas células de melanoma *in vitro* pelo secretoma das MO-MSCs. Tal efeito é mediado pela ativação da via HGF/Met nas células B16, levando-as a adquirir propriedades metastáticas como redução da ancoragem à fibronectina e aumento da mobilidade e do potencial de invasão.

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Principais reagentes

MEIOS DE CULTURA

Meio para MSCs: Meio α MEM (Gibco) suplementado com 15% em volume de SFB (Hyclone), 26 mM de bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 10 mM de HEPES (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 μ M de estreptomicina (Gibco), pH 7,2.

Meio para células B16: Meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% em volume de SFB, 26 mM de bicarbonato de sódio, 25 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

Meio para células 293T: Meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% em volume de SFB, 26 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

Meio indutor de diferenciação em adipócitos: Meio α MEM suplementado com 15% em volume de SFB, 26 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 20 μ g/mL de insulina (Sigma), 200 μ M de indometacina (Sigma), 2 μ M de dexametasona (Sigma), 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

Meio indutor de diferenciação em osteoblastos: Meio α MEM suplementado com 7,5% em volume de SFB, 26 mM de bicarbonato de sódio, 10 mM de HEPES, 400 μ M de ácido ascórbico (Sigma), 20 mM de β -glicerolfosfato (Sigma), 2 nM de dexametasona, 100 U/mL de penicilina e 100 μ M de estreptomicina, pH 7,2.

ANTICORPOS

Anticorpos primários: anticorpos conjugados com ficoeritrina anti-CD11b, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD44, anti-CD90.2, anti-Sca-1 (BD Pharmingen); anticorpos não conjugados IgG de coelho anti-firefly luciferase (Abcam), IgG de rato anti-CD31 (BD Pharmingen), IgG de rato anti E-caderina (Invitrogen) e IgG de coelho anti-fibronectina (Abcam).

Anticorpos secundários: anti-IgG de coelho conjugado com Alexa 594 e anti-IgG de rato conjugado com Alexa 488 (BD Pharmingen).

2.2. Animais

Todos os procedimentos envolvendo experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (protocolo número 154/2008).

Foram utilizados camundongos fêmeas (*Mus musculus*) da linhagem C57BL/6J com 8-12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos no Biotério II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto. No mínimo três dias antes dos experimentos, os animais a serem utilizados foram transferidos para a sala de aclimação do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto. Na sala de aclimação, dotada de ciclo claro/escuro (12h/12h) e controle de temperatura (23°C), os animais foram mantidos em caixas de polipropileno autoclavadas (30cm x 20cm x 13cm – comprimento x largura x altura), dotadas de grade superior, filtro de ar e acondicionadas em estante ventilada. Os animais tiveram acesso à água filtrada e ração autoclavada (Purina) *ad libitum* e foram acondicionados em grupos de três a cinco por caixa.

A eutanásia foi realizada por meio da administração de doses excessivas de anestésico (375 mg/kg de ketamina e 37,5 mg/kg de xilazina). As referidas drogas foram administradas por via intramuscular, no quadríceps dos animais.

2.3. Linhagens celulares

Para os ensaios de monitoramento do crescimento celular e identificação de metástases por processamento de imagem baseado em bioluminescência, foi utilizada a linhagem de melanoma B16-F10-luc-G5 (aqui referida como células B16/luc⁺) (Caliper LifeSciences) a qual expressa o gene que codifica a proteína repórter luciferase. Nos experimentos em que foram utilizadas MSCs modificadas para expressar luciferase, células de melanoma B16-F10 não modificadas (referidas neste trabalho como células B16) foram utilizadas para evitar a sobreposição de sinal bioluminescente. Ambas as linhagens de melanoma foram mantidas em meio para células B16 até serem utilizadas nos experimentos.

A linhagem de células humanas de rim embrionário 293T foi utilizada para geração de lentivírus portadores do gene da luciferase.

2.4. Processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB)

O PIBB foi realizado com o equipamento IVIS Lumina System® (Caliper LifeSciences). Para o PIBB *in vitro*, foi adicionada D-luciferina (Caliper LifeSciences) às placas de cultura a uma concentração final de 150 µg/mL em meio de cultivo. Em seguida, as placas foram submetidas à captura de imagens, cujo tempo de exposição variou entre 10 s e 5 min, dependendo da intensidade do sinal bioluminescente.

Para o PIBB *in vivo*, os camundongos foram anestesiados em 2,5% de isoflurano (Forane, Laboratórios Abbot) e infundidos com 150 mg/kg de D-luciferina por via intraperitoneal. Em seguida, os animais foram posicionados no interior da câmara escura do equipamento IVIS e mantidos sob constante sedação em 1,5% de isoflurano. A captura de imagens foi então iniciada e o tempo de exposição variou de 10 s a 5 min.

Para o PIBB *ex vivo*, os animais foram infundidos com 150 mg/kg de D-luciferina e, após 10 min, os pulmões foram removidos, colocados individualmente em placas de 35 mm e imersos em solução contendo 300 µg/mL de D-luciferina em PBS. A seguir, os espécimes foram submetidos à captura de imagens com tempo de exposição de 5 min.

A intensidade de bioluminescência foi quantificada por meio uso da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do software Living Image 3.0, utilizado para operar o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi manualmente desenhada para abranger o sinal bioluminescente, cuja unidade de intensidade é o fluxo de fótons, expresso em fótons/s.

2.5. Isolamento e cultivo de células estromais mesenquimais multipotentes da medula óssea (MO-MSCs)

Para o isolamento das MO-MSCs, 4 camundongos da linhagem C57BL/6J foram mortos por administração de dose excessiva de anestésico, as tíbias e fêmures foram isolados e as epífises cortadas. Em seguida, com o auxílio de uma seringa dotada de uma agulha 25 gauge, foi propelido meio de cultivo para MSCs através da cavidade dos ossos isolados, removendo a medula óssea de seu interior.

A medula óssea isolada foi homogeneizada por meio da cuidadosa aspiração e expiração da mesma usando uma seringa com agulha 25 gauge. A suspensão de

células resultante foi plaqueada em placas de seis poços a uma densidade de 2.10^6 células nucleadas/cm² e cultivadas em meio para MSCs. Após 72 h, todo o meio de cultura foi substituído, visando à remoção das células não aderentes. Ao atingirem 80-90% de confluência, as células aderentes foram desprendidas por meio da incubação com solução tripsina-EDTA 0,05% durante 5 min à 37 °C e subcultivadas a uma densidade de $1,6-2,0.10^4$ células/cm². Cada tratamento com tripsina-EDTA seguido do subcultivo caracteriza uma passagem. A partir da 5ª passagem, as células foram subcultivadas a uma densidade de $6,6.10^3$ células/cm². Ao atingir a 7ª passagem, a cultura de MO-MSCs já se apresentava livre de células hematopoéticas e endoteliais, permitindo, portanto, seu uso nos experimentos.

As culturas foram mantidas a 37 °C, 5% CO₂, 95% de ar e 75% de umidade relativa. O meio de cultivo era renovado a cada 48-72 h.

2.6. Geração de lentivírus portadores do gene da luciferase

Para a geração de vírions portadores do gene da luciferase, células 293T foram plaqueadas em placas de Petri de 100 mm e cultivadas até atingirem aproximadamente 70% de confluência. Em seguida, as células foram transfectadas simultaneamente com três plasmídeos utilizando o lipídio catiônico Lipofectamine 2000® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Dois dos plasmídeos utilizados foram os vetores acessórios pMD2.G e pCMV_dr8.91 que codificam, respectivamente, o envelope do vírus da estomatite humana (VSV-G) e o capsídeo do vírus HIV juntamente com os componentes enzimáticos virais. O terceiro plasmídeo utilizado foi o vetor lentiviral pMSCV_Luc2_T2A_Puro (gentilmente cedido pelo Dr. Deivid de Carvalho Rodrigues, da Universidade Federal do Rio de Janeiro). Este vetor contém o gene puromicina N-acetiltransferase, o qual confere resistência ao antibiótico puromicina. Além disso, o vetor codifica o gene da luciferase 2 sob o comando do promotor do vírus de células-tronco murino (MSCV). A quantidade utilizada de cada plasmídeo na transfecção foi a seguinte: pMD2.G = 3,5 µg, pCMV_dr8.91 = 6,5 µg e pMSCV_Luc2_T2A_Puro = 10 µg.

Após o procedimento de transfecção, as células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% em volume de SFB durante 72 h. Em seguida, o sobrenadante contendo os vírions foi coletado, filtrado em filtros de 0,22 µm e estocado à -80 °C até seu uso na transdução das MO-MSCs.

2.7. Transferência do gene luciferase para as MO-MSCs por transdução lentiviral

Para a transdução lentiviral, 1,5 mL do sobrenadante contendo vírions portadores do gene da luciferase e 5,5 µg/mL de polibreno (Sigma) foram adicionados a cada poço de uma placa de 6 poços contendo MO-MSCs. O meio contendo os vírions e polibreno foi repostado diariamente durante 3 dias. Após o terceiro dia, as MO-MSCs foram expandidas em meio para MSCs e, após uma passagem, foram incubadas em 2 µg/mL de puomicina (Sigma) durante 6 dias para a eliminação das células em que não houve a integração do vetor. Após este período, as células obtidas (aqui referidas como MSC/luc2⁺) foram avaliadas quanto à expressão de luciferase por PIBB *in vitro*.

2.8. Imunofenotipagem e diferenciação das MO-MSCs e MSC/luc2⁺

Após sua obtenção, as MO-MSCs e MSC/luc2⁺ foram submetidas à caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo e à diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*, para confirmar sua multipotencialidade.

Para a caracterização imunofenotípica, suspensões contendo 5.10⁵ células foram incubadas com 0,5 µg dos anticorpos anti-CD11b, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD45, anti-CD90.2, anti-Sca-1 e IgG1 de rato durante 15 min, no escuro e à TA. Imediatamente após o período de incubação, as células foram lavadas em PBS e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences).

Para o ensaio de diferenciação em adipócitos e osteoblastos, 1.10³ MO-MSCs ou MSC/luc2⁺ foram plaqueadas sobre lamínulas circulares de vidro (~2cm²) e cultivadas em meio para MSCs durante 24 h. Em seguida, o meio de cultivo foi substituído por meio indutor de diferenciação em adipócitos ou osteoblastos. Células cultivadas em meio para MSCs serviram como controles do experimento.

Durante a indução da diferenciação, os meios indutores foram renovados a cada 48 h e as células foram mantidas em cultura por 21 dias. Após este período, a diferenciação das MO-MSCs e MSC/luc2⁺ em adipócitos ou em osteoblastos foi avaliada por meio das colorações de Sudan II-Escarlate e de von Kossa, respectivamente.

2.9. Coloração pelos métodos de Sudan II-Escarlate e von Kossa

Para verificar a ocorrência de diferenciação adipocítica, as MO-MSCs e MSC/luc2⁺ foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% durante 15 min à TA. Em seguida, as células foram incubadas em etanol 70% por 3 min, seguida da incubação com o corante Sudan II-Escarlate por 5 min e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 min. O corante Sudan II-Escarlate cora os depósitos lipídicos em alaranjado.

A diferenciação em osteoblastos foi avaliada por meio da coloração de von Kossa. Para tanto, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 15 min à TA. Após lavagem com água destilada, as células foram incubadas em solução de nitrato de prata 5% no escuro durante 30 min e, em seguida, novamente lavadas com água destilada. As amostras foram expostas à luz branca de uma lâmpada de 100W posicionada a 30 cm de distância por 45 min. Após este período, as células foram incubadas durante 5 s em solução de tiosulfato de sódio 5%, lavadas com água destilada e, por fim, contra coradas com hematoxilina de Harris durante 1 min. A coloração de von Kossa cora os depósitos de cálcio em preto ou marrom-escuro.

Após a coloração, as lâminas foram analisadas e fotografadas em um microscópio óptico (Axioskop 2 plus[®], Carl Zeiss) equipado com uma câmera digital (Axiocam[®], Carl Zeiss).

2.10. Geração e uso do meio condicionado de MO-MSCs (mc/MSCs)

Para a geração do meio condicionado, MO-MSCs foram plaqueadas a uma densidade de $6,7 \times 10^3$ células/cm² e cultivadas em meio para MSCs e por 24 h. Em seguida, o meio de cultura foi substituído por 2,2 mL/10⁵ células de meio fresco e as células foram mantidas em cultivo por mais 24 h. Após este período, o meio condicionado foi removido, filtrado em filtros com poros de 0,22 µm de diâmetro e estocado à -80 °C até seu uso nos experimentos.

As células B16 foram cultivadas em mc/MSCs sob diferentes condições com o objetivo de avaliar diferentes propriedades celulares. Estas peculiaridades estão indicadas na descrição de cada ensaio. Em todos os experimentos, o mc/MSCs foi renovado diariamente e o meio para MSCs (meio não condicionado) foi utilizado como controle.

2.11. Modelo de metástase espontânea

Para o estabelecimento do modelo de metástase espontânea, uma mistura contendo 2.10^5 células B16/luc⁺ e 1.10^6 MO-MSCs em 100 µL de PBS foi infundida subcutaneamente na região dorsal anterior de camundongos C57BL/6J (n = 13 animais por grupo). Animais que receberam apenas células B16/luc⁺ serviram como controles do experimento.

Após 16 dias da infusão, os animais foram mortos, os pulmões foram analisados por PIBB *ex vivo* para a detecção de micrometástases de melanoma. Após o PIBB, os pulmões foram fotografados, fixados e processados para análise histopatológica convencional.

2.12. Análise histopatológica

Para confirmar a presença de micrometástases de melanoma, os pulmões dos animais portadores de tumor foram removidos, inflados por infusão endotraqueal de formalina 3,7% e incubados na mesma solução fixadora por 36 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas à seguinte bateria para desidratação, diafanização e inclusão em parafina:

Tabela 1: Bateria de desidratação, diafanização e inclusão em parafina à qual as amostras de pulmão foram submetidas.

Solução	Tempo de incubação
Álcool 50%	30 min
Álcool 70%	1 h
Álcool 80%	1 h
Álcool 90%	1 h
Álcool 95%	1 h
Álcool absoluto 1	1 h
Álcool absoluto 2	1 h
Álcool absoluto 3	1 h
Xilol + Álcool absoluto (1:1)	30 min
Xilol 1	30 min
Xilol 2	30 min
Parafina líquida 1	2 h
Parafina líquida 2	2 h

Após inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 5 µm de espessura e os mesmos foram submetidos à coloração com hematoxilina e eosina. Por fim, as lâminas resultantes foram analisadas em microscópio óptico convencional e fotografadas.

2.13. Modelo de colonização metastática

Após cultivo em mc/MSCs ou em meio não condicionado por 72 h, suspensões contendo $3 \cdot 10^5$ células B16 em 100 µL de PBS foram infundidas na veia caudal lateral de camundongos C57BL/6J (n = 5 animais). Antes da infusão, a cauda dos animais foi imersa em água a 45 °C durante 30 s a fim de permitir a vasodilatação local.

Após 16 dias da infusão, os animais foram mortos e os pulmões removidos, fotografados e pesados. O peso de cada pulmão foi corrigido pelo peso do respectivo animal utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{Peso corrigido} = [\text{Peso do pulmão (g)} \times 100] \div \text{Peso do animal (g)}$$

Camundongos infundidos apenas com PBS (n = 3 animais) serviram como controles do procedimento.

2.14. Monitoramento das MSC/luc2⁺ *in vivo*

Para avaliar a permanência e distribuição das MO-MSCs no microambiente tumoral, uma mistura contendo $2 \cdot 10^5$ células B16 e $1 \cdot 10^6$ MSC/luc2⁺ em 100 µL de PBS foi aplicada subcutaneamente na região dorsal anterior de camundongos C57BL/6J (n = 4 animais por grupo). Animais que receberam apenas MSC/luc2⁺ foram usados como controles do experimento. Após a infusão, os camundongos foram monitorados por PIBB *in vivo* durante 16 dias. Em seguida, os tumores primários foram removidos, imersos em meio crioprotetor (Tissue-Tek, Sakura) e congelados em acetona resfriada com gelo seco. Os tumores foram seccionados em cortes de 4 µm de espessura e submetidos à marcação com anticorpos anti-luciferase e anti-CD31 para revelar a localização das MSC/luc2⁺ e do endotélio vascular, respectivamente.

2.15. Monitoramento da morfologia das células B16

Células B16 foram plaqueadas a uma densidade de 2.10^3 células/cm² e cultivadas durante 24 h em meio para células B16. Em seguida, o meio foi substituído por mc/MSCs e a morfologia das células de melanoma foi monitorada e fotografada durante 3 dias com o auxílio de um microscópio de contraste de fase (IX71®, Olympus) equipado com uma câmera fotográfica digital.

As fotografias obtidas no terceiro dia de monitoramento foram utilizadas para calcular a circularidade das células B16 com o software ImageJ. Após a delimitação do perímetro das células, o software calcula a circularidade das mesmas baseando-se na seguinte função:

$$\text{Circularidade} = 4.\pi.(\text{área} \div \text{perímetro})^2$$

2.16. Análise da organização dos filamentos de actina

Para avaliar o efeito do mc/MSCs na organização dos filamentos de actina, 6.10^3 células B16 foram plaqueadas em lamínulas de vidro circulares com (~ 2 cm²) e mantidas em meio para cultivo de células B16 durante 24 h. Após este período, o meio foi substituído por mc/MSCs e as células mantidas nesta condição por 72 h. Em seguida, as células foram fixadas e marcadas com faloidina conjugada com o fluorocromo Texas Red.

As amostras foram submetidas à análise por microscopia confocal para revelar a organização dos filamentos de actina.

2.17. Avaliação da ancoragem às superfícies recobertas com fibronectina

Após cultivo em mc/MSCs por 3 dias, 10^6 células B16/luc⁺ foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 6 poços recobertos com 3 µg/cm² de fibronectina (Sigma). As células foram mantidas em mc/MSCs ou meio não condicionado por 1 h à 37 °C. Após este período, os poços foram lavados duas vezes com PBS e a placa foi agitada em vortex a 2400 rpm por 30 s. As células em suspensão foram descartadas e o número de células aderentes foi estimado por PIBB *in vitro*. Em seguida, as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% por 10 min à T.A., coradas com hematoxilina de Harris por 10 min à T.A. e fotografadas.

2.18. Ensaio de migração celular (*scratch assay*)

Para monitorar a mobilidade das células B16, as mesmas foram plaqueadas ($5 \cdot 10^5$ células/poço) em placas de 6 poços recobertas com $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de fibronectina e cultivadas por 24 h, quando a monocamada de células ficou confluenta. Em seguida, foi utilizada uma ponteira estéril de 1 mL para fazer uma falha na monocamada de células em forma de linha reta. As células desprendidas foram removidas com duas lavagens em PBS. As células aderentes foram então mantidas em mc/MSCs ou em meio não condicionado por 16 h. Três regiões de falha em cada poço foram fotografadas no início e ao final do experimento, com o objetivo de monitorar a migração das células de melanoma. As espessuras final e inicial em cinco pontos distintos das falhas foram quantificadas com o software ImageJ. A média aritmética destes cinco valores obtidos foi considerada a espessura da falha em cada região fotografada. A migração celular foi então estimada utilizando o seguinte cálculo:

$$\text{Migração} = (d_i - d_f) \div 2$$

Sendo que: d_i = espessura inicial da falha em micrômetros e d_f = espessura final da falha também em micrômetros.

2.19. Avaliação da proliferação celular *in vitro*

Para avaliar o impacto do mc/MSCs na proliferação das células de melanoma, $6 \cdot 10^3$ células B16/luc⁺ foram plaqueadas em placas de 6 poços ($n = 3$ poços por grupo) e cultivadas por 24 h. Em seguida, o meio foi substituído por mc/MSCs ou meio não condicionado e a proliferação celular foi monitorada por PIBB *in vitro* diariamente durante 4 dias. Depois deste período, as células foram coletadas por tripsinização e quantificadas para o cálculo do tempo de duplicação da população (TDP) utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{TDP} = t \div 3,3 [\log_{10}(N_i \div N_f)]$$

Sendo que: t = tempo de cultivo em horas, N_i = número inicial de células e N_f = número final de células.

2.20. Análise de expressão de genes modulados na EMT por PCR quantitativo em tempo real

Células B16 foram plaqueadas a uma densidade de 2.10^3 células/cm² e cultivadas durante 24 h em meio para células B16. Em seguida, o meio foi substituído por mc/MSCs. As células B16 foram mantidas em mc/MSCs por 3 ou 6 dias. Ao final dos respectivos períodos, o RNA total das amostras foi extraído com o kit RNeasy mini kit (Qiagen) acrescido da enzima DNase RNase-free DNase Set (Qiagen) para evitar a contaminação do extrato com DNA genômico. Dois microgramas do RNA total foram utilizados para a reação de transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com a instruções do fabricante. Duplicatas dos cDNAs obtidos de cada amostra foram utilizadas em reações de PCR em tempo real com o kit SYBR Green Master PCR Mix (Applied Biosystems). A expressão dos genes-alvo foi normalizada pela expressão do gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), sendo que a quantificação relativa dos transcritos, denominada como unidades relativas de expressão ou URE, foi feita por meio do uso da fórmula⁶⁰:

$$URE = 10.000 \div 2^{(Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ GAPDH})}$$

Os *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real estão listados na **tabela 2**.

Tabela 2: Relação dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real e seus respectivos genes-alvo. ¹Proteína específica de fibroblasto-1, ²Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, ³Fator de transcrição dedo-de-zinco homeótico ligante de *E-box* 2.

Nome do gene	Seqüência dos <i>primers</i> (5' → 3')	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
E-caderina	AGAGTCGAAGTGCCCGAAGA	GTGTCCCTCCAAATCCGATA
Fibronectina	ATCACCTGTATGCTGTCACT	TCTGTACCTGCATCTGGGA
<i>FSP1</i> ¹	AAGGAGCTACTGACCAGGG	GGCAATGCAGGACAGGAAGA
<i>GAPDH</i> ²	CAGCAACAGGGTGGTGGAC	TGTGAGGGAGATGCTCAGTG
N-caderina	ACGGACAAAGATCAGCCCC	CTGTGACTAGCCCATCATTGCT
Vimentina	CAGCAGTATGAAAGCGTGGC	GCAGGGCATCGTTGTTCCG
<i>ZEB2</i> ³	AGCACCACTGAAAGAACACC	GACCCAGAATGAGAGAAGCGT

2.21. Cultivo de células B16 com citocinas indutoras de EMT

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade das células B16 a indutores conhecidos de EMT, estas foram cultivadas na presença de fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), proteína morfogenética óssea 4 (BMP4), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento transformante $\beta 2$ (TGF $\beta 2$) ou do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF). As citocinas foram adquiridas da empresa Peprotech e adicionadas ao meio para células B16 a uma concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Após a 72 h da adição das citocinas, as células B16 foram monitoradas quanto a alterações morfológicas por microscopia de contraste de fase e fotografadas.

2.22. Avaliação da expressão de *HGF* nas MO-MSCs e nas células B16

A transcrição do gene *HGF* nas células B16 e nas MO-MSCs foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real. Na reação de PCR quantitativo foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems) para os genes *GAPDH* e *HGF*.

A extração do RNA total, a reação de transcrição reversa e o cálculo da abundância relativa de transcritos foram feitos como relatado na seção 2.20.

2.23. Inibição do receptor Met

Para os ensaios envolvendo a inibição de Met, foram utilizados dois tipos de inibidores competitivos de ATP: o inibidor PF-04217903 (Pfizer), aqui referido como iMet-a, e o inibidor JNJ-38877605 (Johnson & Johnson), referido como iMet-b. Ambos os inibidores foram diluídos em DMSO e adicionados ao mc/MSCs nas concentrações indicadas em cada experimento. A mistura de mc/MSCs e DMSO foi utilizada como controle nos ensaios de inibição.

Todos os ensaios realizados para avaliar o impacto do mc/MSCs na morfologia, adesão, migração, invasão e expressão de marcadores da EMT nas células B16 foram repetidos na presença dos inibidores de Met.

2.24. Microscopia confocal

Células B16 cultivadas foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% por 10 min à TA e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% (Sigma) por 10 min à TA. Para a visualização dos filamentos de actina, as células foram incubadas com 66 mU/mL de faloidina conjugada com Texas-red (Molecular Probes) por 1 h à TA. Para a avaliação da expressão de E-caderina e fibronectina, as células B16 foram incubadas com 10 µg/mL dos anticorpos primários anti-E-caderina e anti-fibronectina por 2 h à TA seguido pela incubação com 6,7 µg/mL dos anticorpos secundários conjugados com Alexa 594 ou Alexa 488 por 1 h à TA.

Para a identificação de células MSC/luc2⁺ nos tumores primários, cortes congelados foram bloqueados em solução de albumina 1% durante 1 h à TA e, em seguida, permeabilizados com Triton X-100 0,2% por 10 min à TA. As amostras foram incubadas com 10 µg/mL dos anticorpos primários anti-luciferase e anti-CD31 por 2 h à TA seguida pela incubação com 6,7 µg/mL dos anticorpos secundários conjugados com Alexa 594 ou Alexa 488 por 1 h à TA.

Para a visualização dos núcleos, as amostras foram coradas com DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole – VYSIS).

Os espécimes foram analisados em microscópio confocal de escaneamento à laser (LSM 710, Carl Zeiss) e a aquisição das imagens foi feita com o auxílio do software ZEN 2008 (ZEN, version 2.5).

2.25. Análises estatísticas

Os dados quantitativos estão expressos como média ± erro padrão. O teste de correlação linear foi usado para modelar a relação linear entre duas variáveis. Para a comparação de médias, foram utilizados os testes t de Student e análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. A comparação de frequências foi feita por meio do teste exato de Fisher. Os gráficos foram construídos com o auxílio do software Graphpad 5.0 e as análises estatísticas foram realizadas com o software Origin Pro 8. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização das MO-MSCs

A população de MO-MSCs livre de células hematopoéticas e endoteliais foi obtida após sete passagens em cultura, quando apresentaram um aspecto morfológico uniforme e tipicamente fibroblástico (figura 4A). Conforme os dados obtidos após imunofenotipagem por citometria de fluxo, as MO-MSCs não expressaram os antígenos hematopoéticos CD11b, CD34 e CD45 e o antígeno de células endoteliais CD31, ao passo que foram positivas para os marcadores CD44, CD90.2 e Sca-1 (figura 4B). Este perfil imunofenotípico está de acordo com o padrão reportado para MSCs murinas em trabalhos anteriores^{7, 8, 9}.

Após o cultivo em meios indutores de diferenciação específicos, as MO-MSCs foram capazes de acumular vesículas lipídicas citoplasmáticas e de sintetizar matriz extracelular calcificada, evidenciando seu potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico, respectivamente, confirmando, portanto, sua multipotencialidade *in vitro* (figura 4C).

Figura 4: Morfologia, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação das MO-MSCs. (A) Fotomicrografia de contraste de fase demonstrando a morfologia fibroblástica das MO-MSCs. Escala = 100 μ m. **(B)** Perfil imunofenotípico das MO-MSCs avaliado por citometria de fluxo. As populações obtidas de MO-MSCs ($n = 4$ culturas independentes) foram positivas para os marcadores CD44, CD90.2 e Sca-1, ao passo que não expressaram o marcador de células endoteliais CD31 tampouco os marcadores de células hematopoéticas CD11b, CD34 e CD45. Linha verde: fluorescência das células incubadas com os anticorpos específicos contra os antígenos de interesse. Linha vermelha: fluorescência correspondente às células incubadas com anticorpos isotipos inespecíficos. **(C)** Fotomicrografias demonstrando a diferenciação adipogênica e osteogênica das MO-MSCs. A adipogênese foi confirmada pela presença de gotículas citoplasmáticas lipídicas coradas em alaranjado pelo método de Sudan II – Escarlata (painel superior esquerdo). A diferenciação osteogênica foi evidenciada pela presença de focos ricos em matriz extracelular contendo cálcio e que são corados em preto pelo método de von Kossa (painel inferior esquerdo). As MO-MSCs cultivadas em meio de cultivo para MSCs não se diferenciaram (painéis à direita).

3.2. Geração e caracterização de MO-MSCs modificadas para expressar luciferase

A fim de possibilitar seu rastreamento *in vivo* por PIBB, parte das MO-MSCs foram transduzidas com o vetor lentiviral codificante da enzima luciferase 2. Assim, foram obtidas MO-MSCs expressando a enzima repórter luciferase, as quais receberam a denominação de MSC/luc2⁺.

As MSC/luc2⁺ expressaram luciferase biologicamente ativa e a intensidade média de bioluminescência emitida foi de 920 ± 46 fótons/s/célula, conforme

avaliado por PIBB *in vitro*. Além disso, a intensidade de bioluminescência foi diretamente proporcional ao número de MSC/luc2⁺ (figura 5B), demonstrando que a quantificação da bioluminescência pode servir como parâmetro para estimar o número de células.

A fim de investigar se o processo de transdução não alterou as propriedades das MO-MSCs, as MSC/luc2⁺ foram avaliadas quanto à manutenção da morfologia, do perfil imunofenotípico e do potencial de diferenciação. Adicionalmente, o potencial tumorigênico destas células foi avaliado em um ensaio de transplante subcutâneo singênico.

As MSC/luc2⁺ mantiveram a morfologia fibroblástica (figura 5A) e seu perfil imunofenotípico não foi alterado em relação às MO-MSCs parentais (figura 5C). Além disso, as MSC/luc2⁺ retiveram o potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro* (figura 5D). Em conjunto, estes dados demonstram que a transdução lentiviral não alterou as propriedades biológicas que permitem classificar as MSC/luc2⁺ como células estromais mesenquimais multipotentes.

Figura 5: Caracterização das MSC/luc2⁺. (A) Fotomicrografia de contraste de fase demonstrando a morfologia fibroblástica das MSC/luc2⁺. (B) Avaliação da atividade biológica da luciferase nas MSC/luc2⁺. Após a transdução lentiviral, as MSC/luc2⁺ expressaram luciferase biologicamente ativa e a intensidade de sinal bioluminescente foi diretamente proporcional ao número de células (teste de regressão linear). (C) Comparação do perfil imunofenotípico das MSC/luc2⁺ e das MO-MSCs parentais. Após a modificação gênica, as MSC/luc2⁺ não alteraram seu perfil imunofenotípico em relação às MO-MSCs. (D) Fotomicrografias demonstrando a diferenciação adipogênica e osteogênica das MSC/luc2⁺. Após a modificação gênica, as MSC/luc2⁺ retiveram sua capacidade de se diferenciar em adipócitos (painel superior esquerdo) e em osteoblastos (painel inferior esquerdo).

Após a infusão subcutânea em camundongos singênicos, as MSC/luc2⁺ proliferaram no sítio de infusão durante os 15 primeiros dias (figura 6A-B). Após este período, seu número caiu gradativamente e, 186 dias após o implante, foi detectada apenas 2,94% ± 0,38% da quantidade inicial de células infundidas (figura 6A-B), conforme estimado por PIBB *in vivo*. Durante este período, não houve a formação de nódulos tumorais palpáveis em qualquer um dos animais infundidos (figura 6C), demonstrando que as MSC/luc2⁺ não apresentam potencial tumorigênico.

Figura 6: Avaliação do potencial tumorigênico das MSC/luc2⁺. (A) Imagens de um camundongo representativo demonstrando a localização das MSC/luc2⁺ após infusão subcutânea ao longo de 186 dias. As imagens foram obtidas por PIBB *in vivo* e as cores representam a intensidade de bioluminescência, conforme a escala posicionada à direita das imagens. (B) Cinética de proliferação das células MSC/luc2⁺ estimada pela quantificação da bioluminescência emitida (n = 4 animais). Após o transplante subcutâneo, as células MSC/luc2⁺ proliferaram-se durante 15 dias e, em seguida, a bioluminescência emitida caiu gradativamente até atingir um valor correspondente à cerca de 3% da bioluminescência inicial. (C) Fotografias da região dorsal dos animais 186 dias após o transplante subcutâneo de MSC/luc2⁺. Não houve a formação de nódulos tumorais palpáveis na região onde as MSC/luc2⁺ foram aplicadas.

3.3. MO-MSCs ocupam a região perivascular do estroma tumoral e promovem a metástase de melanoma

Para avaliar o impacto das MO-MSCs na metástase de melanoma, camundongos foram infundidos subcutaneamente com uma mistura contendo células de melanoma B16/luc⁺ e MO-MSCs. Após 16 dias da infusão, os pulmões foram removidos e examinados quanto à presença de micrometástases por PIBB *ex vivo*. Este método permitiu a identificação de micrometástases as quais eram indetectáveis mediante inspeção macroscópica. A presença de micrometástases indicada pelo PIBB foi posteriormente validada por análises histopatológicas em 3 animais de cada grupo (figura 7).

Figura 7: Detecção de micrometástases pulmonares de melanoma por PIBB *ex vivo*. Após 16 dias da infusão de células de melanoma, não foi possível identificar metástases macroscópicas nos pulmões dos animais (painéis à esquerda). Porém, as micrometástases puderam ser detectadas por meio do PIBB *ex vivo* (painéis centrais) e tais resultados foram validados por análises histopatológicas em 3 animais de cada grupo (painéis à direita; escala = 10 µm). Estereomic. = Estereomicroscópio. A linha pontilhada delimita uma micrometástase de melanoma.

Ao final das análises, observamos que as MO-MSCs aumentaram dramaticamente a incidência de micrometástases de melanoma (tabela 3). Os animais portadores de tumor co-infundidos com MO-MSCs apresentaram uma incidência de micrometástases pulmonares 2,5 vezes superior em relação aos animais que receberam apenas as células de melanoma.

Tabela 3: Frequência de animais acometidos por micrometástases pulmonares de melanoma. A co-infusão de MO-MSCs resultou em uma incidência de micrometástases 2,5 vezes superior em relação aos animais infundidos apenas com células de melanoma (n = 13 animais; Teste exato de Fisher).

Grupo	Incidência de micrometástases pulmonares	
B16/luc ⁺	31% (4/13)	p = 0,04
B16/luc ⁺ + MO-MSCs	77% (10/13)	

Após a demonstração do efeito pró-metastático das MO-MSCs, as mesmas foram rastreadas durante a progressão tumoral com o objetivo de verificar sua permanência e distribuição no microambiente tumoral. Para tanto, camundongos foram infundidos subcutaneamente com uma mistura de células de melanoma B16 e células MSC/luc2⁺. Em seguida, os animais foram monitorados por PIBB *in vivo* durante os 16 dias de progressão tumoral e, ao final do monitoramento, as MSC/luc2⁺ foram identificadas *in situ* por imunofluorescência utilizando um anticorpo anti-luciferase.

Após a co-infusão, as MSC/luc2⁺ permaneceram localizadas exclusivamente na região do tumor primário, onde proliferaram por nove dias. No décimo sexto dia, entretanto, o número de células MSC/luc2⁺ caiu 75,8% ± 0,9% em relação à quantidade inicial de células infundidas (figura 8A-B). Conforme avaliado por microscopia confocal, as células MSC/luc2⁺ ocuparam o espaço perivascular nos tumores primários. Em alguns casos, elas apareciam perfeitamente justapostas às células endoteliais (figura 8C, asterisco). Em outras situações, as MSC/luc2⁺ não se encontravam justapostas ao endotélio, mas sempre muito próximas aos vasos sanguíneos (figura 8C, setas).

Figura 8: MO-MSCs ocupam o espaço perivascular nos tumores primários de melanoma. (A) Biodistribuição das MSC/luc2⁺ avaliada por PIBB *in vivo* após infusão subcutânea. As MSC/luc2⁺ permaneceram no sítio de infusão durante todo o período de monitoramento. **(B)** Cinética de crescimento das MSC/luc2⁺ estimada por PIBB *in vivo*. O número de MSC/luc2⁺ caiu abruptamente entre os dias 9 e 16 após a co-infusão com as células tumorais (*linha vermelha*). Quando infundidas sozinhas, as MSC/luc2⁺, proliferaram no sítio de infusão durante os primeiros 16 dias (*linha azul*). **(C)** Localização *in situ* das MSC/luc2⁺ nos tumores primários de melanoma. Análises de microscopia confocal revelaram que as MSC/luc2⁺ ocuparam a região perivascular no microambiente tumoral. As MSC/luc2⁺ foram encontradas ou em íntima associação com as células endoteliais (*asterisco*), ou situadas muito próximas aos vasos sanguíneos (*setas*). Escala = 10 μ m.

3.4. O secretoma das MO-MSCs não afeta o potencial de colonização pulmonar das células de melanoma

O aumento da incidência de micrometástases poderia ter sido consequência do aumento no potencial de colonização pulmonar das células B16 causado pelas MO-MSCs. Para investigar esta possibilidade, células B16 foram cultivadas durante 3 dias em mc/MSCs ou em meio não condicionado e infundidas na veia caudal lateral de camundongos C57. Após 16 dias, os pulmões foram removidos e analisados quanto ao acometimento por macrometástases de melanoma.

Conforme a análise macroscópica dos pulmões, o cultivo em mc/MSCs não aumentou a incidência de metástases pulmonares de melanoma (figura 9A). Além disso, o peso dos pulmões foi equivalente entre os animais que receberam a infusão de células B16 mantidas em meio não condicionado ou em mc/MSCs (figura 9B). Portanto, o secretoma das MO-MSCs não alterou o potencial de colonização pulmonar das células B16.

Figura 9: Potencial de colonização pulmonar das células B16 após cultivo em mc/MSCs. (A) Aspecto macroscópico dos pulmões 16 dias após infusão das células B16. O cultivo em mc/MSCs não fez com que as células B16 formassem mais macrometástases pulmonares em comparação com as células mantidas em meio não condicionado. **(B)** Comparação entre o peso corrigido dos pulmões. O peso dos pulmões dos animais que receberam células B16 foi maior devido à presença de metástases. As células B16 mantidas em mc/MSCs colonizaram os pulmões de modo equivalente às células mantidas em meio não condicionado ($p < 0,003$, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

3.5. O secretoma das MO-MSCs induz a transição epitélio-mesenquimal nas células de melanoma

Postula-se que a aquisição do comportamento metastático nas células tumorais pode ser mediada pela usurpação do programa morfogenético conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT). Durante este processo, as células tumorais sofrem uma série de alterações peculiares, tanto morfológicas como na transcrição gênica. Assim, com o objetivo de identificar os mecanismos envolvidos na indução da metástase pelas MO-MSCs, avaliamos o efeito do secretoma das MO-MSCs nas células de melanoma com relação à aquisição de algumas características relacionadas à EMT.

3.5.1. O secretoma das MO-MSCs induz a aquisição de uma morfologia mesenquimal nas células de melanoma

Uma característica marcante de células que sofrem EMT é a transição da morfologia epitelial para a morfologia mesenquimal. Para avaliar se as MO-MSCs seriam capazes de induzir tal transição fenotípica nas células de melanoma, células B16 foram cultivadas em mc/MSCs e tiveram sua morfologia monitorada durante 3 dias por microscopia de contraste de fase.

As células de melanoma cultivadas em mc/MSCs apresentaram alterações morfológicas evidentes: a morfologia epitelióide inicial alterou-se para uma morfologia fibroblástica com consequente redução na circularidade e dispersão pela placa de cultura (figura 10A, painéis à esquerda; figura 10B). Em contrapartida, as células mantidas em meio não condicionado mantiveram sua morfologia epitelial e poligonal, formando grupos de células agregadas de maneira coesa (figura 10A, painel superior esquerdo).

A fim de testar se as alterações morfológicas observadas eram reversíveis, as células de melanoma mantidas em mc/MSCs foram replaqueadas em meio para células B16 durante 48 h. Após a remoção do mc/MSCs, a morfologia das células B16 reverteu-se para a configuração epitelial (figura 10A, painéis à direita), demonstrando que a alteração morfológica causada pelo secretoma das MO-MSCs é reversível.

Figura 10: Transição morfológica das células B16 cultivadas em mc/MSCs. (A) Aspecto morfológico das células de melanoma cultivadas em mc/MSCs e em meio não condicionado (meio N.C.). O cultivo durante 72 h em mc/MSCs alterou a morfologia das células B16 de um aspecto epitelial (painel superior esquerdo) para um aspecto mesenquimal (painel inferior esquerdo). Dois dias após a remoção do mc/MSCs, a morfologia das células de melanoma retomaram o aspecto epitelial (painéis à direita). **(B)** Circularidade das células B16 quantificada com o software ImageJ. O valor de circularidade igual a 1 indica um círculo perfeito. Conforme a forma se torna mais alongada, o valor se aproxima de 0. As células de melanoma adquiriram uma morfologia mais alongada, portanto, fibroblástica, quando cultivadas em mc/MSCs ($n = 150$ células; $p < 0,0001$, teste t de Student).

Sabe-se que a população de células tumorais é heterogênea. Frente a isso, objetivamos estimar a frequência de células B16 que sofria a transição morfológica para o aspecto mesenquimal em resposta ao mc/MSCs.

Após cultivar as células B16 a uma densidade baixa (15 células/cm^2) para gerar colônias derivadas de células individuais, observou-se que $29\% \pm 5\%$ dos clones eram constitutivamente formados por células não unidas de modo coeso. Tais clones, mesmo que formados por células minimamente espaçadas uma das outras, foram classificados como clones mesenquimais e o exemplo mais extremo encontrado está demonstrado na figura 11A (painel esquerdo). O cultivo em mc/MSCs por 72 h aumentou a frequência de clones mesenquimais para $93\% \pm 5\%$ (figura 11B) e os $7\% \pm 5\%$ clones restantes eram insensíveis ao mc/MSCs, mantendo sua morfologia epitelial sob a forma de colônias coesas (figura 11A, painel direito). Assim, a predominância de células B16 com morfologia mesenquimal após cultivo em mc/MSCs não é devido ao enriquecimento da população com as células constitutivamente mesenquimais. Ao contrário, os dados obtidos a partir da análise

dos clones confirmam que o secretoma das MO-MSCs induz a transição morfológica nas células de melanoma.

Figura 11: Efeito do mc/MSCs na morfologia de clones de células B16. (A) Fotomicrografias de contraste de fase demonstrando um clone de células B16 com morfologia mesenquimal constitutiva (painel esquerdo) e um clone que manteve sua morfologia epitelial, mesmo sendo cultivado em mc/MSCs (painel direito). (B) Quantificação de clones com morfologia epitelial e mesenquimal após cultivo em mc/MSCs. O secretoma das MO-MSCs aumentou a frequência de clones com morfologia mesenquimal resultando na diminuição do número de clones com morfologia epitelial (n = 50 clones; $p < 0,0001$, teste t de Student).

3.5.2. O secretoma das MO-MSCs causa a reorganização dos filamentos de actina nas células de melanoma

As alterações morfológicas que ocorrem durante a EMT são acompanhadas pelo rearranjo do citoesqueleto. Além disso, sabe-se que a reorganização dos filamentos de actina relaciona-se com a aquisição de propriedades metastáticas pelas células tumorais. Assim, analisamos a organização dos filamentos de actina em células de melanoma após cultivo em mc/MSCs.

As células B16 mantidas em meio não condicionado apresentaram um arranjo de F-actina compacto e distribuído corticalmente, sem a ocorrência de quaisquer protrusões (figura 12, painéis superiores). Em contrapartida, os filamentos de actina das células B16 cultivadas em mc/MSCs se distribuíram de modo esparsos no citoplasma, formando alguns feixes ocasionais os quais davam suporte à formação de longas protrusões (figura 12, painéis inferiores, setas).

Figura 12: Reorganização dos filamentos de actina em células B16 após cultivo em mc/MSCs. Fotomicrografias de microscopia confocal demonstrando a organização dos filamentos de actina nas células B16. Os filamentos de actina são normalmente distribuídos de maneira compacta e cortical nas células B16, como ocorre em células de fenótipo epitelial (painéis superiores). Após 72 h de cultivo em mc/MSCs, a F-actina das células B16 apresentou-se distribuída de maneira dispersa pelo citoplasma, organizando-se ocasionalmente em feixes que deram suporte à formação de protrusões (painéis inferiores - setas). O corante DAPI foi utilizado para corar os núcleos e os filamentos de actina foram marcados com faloidina. Escala = 10 μ m.

3.5.3. Células de melanoma adquirem uma assinatura gênica consistente com a EMT após cultivo em mc/MSCs

A EMT caracteriza-se pela modulação da transcrição de um conjunto conhecido de genes. Portanto, estes genes servem como marcadores para identificar células que sofrem a referida transição fenotípica. Em decorrência disso, avaliamos se as células de melanoma adquiriam um perfil de expressão gênica consistente com EMT após cultivo em mc/MSCs.

As células de melanoma cultivadas em mc/MSCs por três dias apresentaram um aumento na transcrição dos genes fibronectina e vimentina (figura 13A). O aumento da expressão de fibronectina ao nível de tradução proteica foi confirmado por imunofluorescência (figura 13B, painéis superiores). Não houve alteração significativa da transcrição e tradução de E-caderina, um componente importante dos complexos de junção intercelular (figura 13A e figura 13B, painéis inferiores). A incubação em mc/MSCs por 3 dias também não resultou na translocação das moléculas de E-caderina para o citoplasma, conforme verificado após imunomarcagem de sua porção extracelular em células B16 não permeabilizadas (anexo A).

A assinatura transcricional mais consistente com a EMT foi obtida após estendermos o tempo de incubação das células B16 em mc/MSCs para 6 dias (figura 13A). Neste caso, a transcrição dos genes fibronectina e FSP-1 aumentou 12 e 10 vezes, respectivamente. A expressão de E-caderina também reduziu, ao passo que houve aumento da transcrição do gene que codifica a N-caderina. Além disso, observou-se um aumento de 50% na expressão de ZEB2, um dos fatores de transcrição conhecidos por modular a transcrição de genes envolvidos na EMT. Outros fatores de transcrição testados, como Twist, ZEB1, Slug e Snail não tiveram sua expressão alterada (dados não apresentados).

Figura 13: Expressão de marcadores da EMT em células B16 cultivadas em mc/MSCs. (A) Expressão relativa de RNAm. Após cultivo em mc/MSCs, as células B16 adquiriram uma assinatura transcripcional consistente com a EMT, caracterizada pelo aumento da expressão de fibronectina, FSP-1, N-caderina e ZEB2 e pela redução na expressão de E-caderina. Os asteriscos indicam genes diferencialmente expressos em relação às células mantidas em meio N.C. ($n = 3$ amostras; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; teste t de Student). **(B)** Fotomicrografias demonstrando a expressão de fibronectina e E-caderina por imunofluorescência. O aumento na expressão de fibronectina após 3 dias de cultivo em mc/MSCs foi confirmado ao nível de proteína (painéis superiores). Também em concordância com os dados de expressão de RNAm, a quantidade das moléculas de E-caderina não reduziu-se significativamente após 3 dias de incubação em mc/MSCs. Escala = 20 μ m.

3.6. O secretoma das MO-MSCs induz a aquisição de propriedades pró-metastáticas nas células de melanoma

Após a constatação de que as MO-MSCs induzem a EMT nas células de melanoma, avaliamos se a ativação do referido programa celular correlacionava-se com a aquisição de propriedades metastáticas. Assim, investigamos o efeito do secretoma das MO-MSCs na adesão, mobilidade e no potencial de invasão das células B16 *in vitro*.

Para o ensaio de adesão, as células de melanoma foram testadas quanto a seu potencial de ancoragem à superfície recoberta por fibronectina, um componente abundante da matriz extracelular. O cultivo em mc/MSCs reduziu em aproximadamente 50% o número de células B16 aderidas às superfícies recobertas com fibronectina, conforme estimado por PIBB *in vitro* (figura 14A, painéis superiores; figura 14B). Fotomicrografias obtidas após a coloração das células aderidas com hematoxilina corroboraram estas evidências (figura 14A, painéis inferiores).

Figura 14: O secretoma das MO-MSCs reduz a ancoragem das células B16 às superfícies recobertas com fibronectina. (A) Sinal bioluminescente (painéis superiores) e fotomicrografias após coloração com hematoxilina (painéis inferiores) das células B16 aderidas às placas de cultura recobertas com fibronectina. O cultivo em mc/MSCs (painéis à direita) reduziu o potencial das células de melanoma em se ancorar à fibronectina. Escala = 100 μ m. **(B)** Número de células B16 aderidas estimado por PIBB. O secretoma das MO-MSCs reduziu em aproximadamente 50% o número de células B16 aderidas à fibronectina (n = 3 amostras; p=0,0013, teste t de Student).

O aumento da mobilidade é outra característica de células metastáticas a qual permite que as mesmas deixem o tumor primário e colonizem sítios secundários. Utilizando um ensaio em que parte da monocamada de células cultivadas é removida (conhecido como “ensaio do arranhão” ou *scratch assay*), observamos que as células de melanoma cultivadas em mc/MSCs migraram mais rapidamente do que as células mantidas em meio não condicionado (Meio N.C. = $84,8 \pm 6,1 \mu\text{m}$; mc/MSCs = $157,7 \pm 6,8 \mu\text{m}$) (figura 15A-B). Além disso, foram observadas várias células de melanoma isoladas distribuídas no espaço aberto após a indução da falha (figura 15A, painel inferior direito), sugerindo que, nestes casos, o secretoma das MO-MSCs ativou a migração individual das células ao invés da migração coletiva.

Figura 15: MO-MSCs aumentam a mobilidade das células de melanoma. (A) Fotomicrografias de contraste de fase demonstrando a região da falha na monocamada de células no início (0 h, painéis superiores) e ao final do experimento (16 h, painéis inferiores). O secretoma das MO-MSCs aumentou a migração das células de B16 em comparação às células mantidas em meio não condicionado. (B) Quantificação da migração das células B16 com o auxílio do software ImageJ. Foram traçadas 5 retas paralelas em posições fixas para o cálculo da espessura média das falhas. As células B16 cultivadas em mc/MSCs migraram aproximadamente o dobro da distância em relação às células mantidas em meio não condicionado (n = 6 amostras; *p<0,00001, teste t de Student).

O fechamento mais rápido da falha na monocamada celular não pode ser atribuído ao aumento na proliferação das células B16, já que o mc/MSCs não afeta a cinética de crescimento das mesmas, conforme avaliado por PIBB *in vitro* e pelo cálculo do tempo de duplicação da população (figura 16).

Figura 16: O secretoma das MO-MSCs não afeta a proliferação das células B16. (A) Cinética de proliferação das células B16 estimada por PIBB *in vitro*. Acima: sinal bioluminescente das células B16. Abaixo: quantificação da bioluminescência das células B16 durante quatro dias de cultivo. **(B)** Cálculo do tempo de duplicação da população de células B16. Ambos os métodos indicaram que o mc/MSCs não afeta o crescimento das células de melanoma *in vitro* (n = 3 amostras, teste t de Student).

Por fim, investigamos o impacto do mc/MSCs no potencial de invasão das células B16 em um matrizes tridimensionais de Matrigel. As células de melanoma mantidas em meio não-condicionado eram praticamente incapazes de invadir a matriz circunjacente, formando estruturas compactas e esferóides (figura 17, painéis superiores). Em contrapartida, as células B16 já emitiam protrusões na matriz circundante após 12h de cultivo em mc/MSCs. À medida em que as células se proliferavam, elas distribuíam-se de maneira dispersa pela matriz, mantendo uma morfologia ramificada (figura 17, painéis inferiores).

Figura 17: O secretoma das MO-MSCs aumenta o potencial de invasão das células de melanoma. Fotomicrografias representativas de células B16 imersas em Matrigel. Enquanto as células mantidas em meio não condicionado são incapazes de invadir a matriz, formando estruturas compactas (painéis superiores), as que são cultivadas em mc/MSCs rapidamente emitem protrusões na matriz e se dispersam à medida que proliferam (painéis inferiores).

3.7. O fator de crescimento de hepatócitos (HGF) induz a transição morfológica das células B16 para um fenótipo mesenquimal

As cascatas de sinalização que levam à EMT podem ser iniciadas pela ativação de receptores tirosina-cinase por meio de uma grande variedade de ligantes. A fim de investigar o mecanismo pelo qual as MO-MSCs induzem a EMT nas células B16, estas últimas foram cultivadas na presença de diferentes indutores conhecidos de EMT. Assim, seria possível identificar à qual(is) do(s) ligante(s) as células B16 responderiam, sofrendo a transição morfológica para um estado mesenquimal.

Dentre os seis ligantes testados, apenas o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) alterou a morfologia das células B16 de modo similar ao mc/MSCs (figura 18).

Figura 18: Efeito de diferentes ligantes de receptores tirosina-cinase na morfologia de células B16. Fotomicrografias de contraste de fase demonstrando a morfologia de células B16 cultivadas na presença de diferentes indutores de EMT. Dentre os seis ligantes testados, apenas o fator de crescimento de hepatócitos (HGF) alterou a morfologia das células B16 para um fenótipo mesenquimal. Nos demais casos, as colônias de células permaneceram coesas. Escala = 50 μ m.

A fim de melhor elucidar o potencial do HGF como a molécula mediadora dos efeitos do mc/MSCs, a expressão do referido gene foi quantificada nas MO-MSCs e nas células B16 por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados demonstram que as MO-MSCs expressam altos níveis de HGF, ao passo que as células de melanoma tem uma expressão praticamente indetectável (B16 = $0,29 \pm 0,29$ URE; MO-MSCs = $821,8 \pm 59,57$ URE) (figura 19).

Figura 19: Expressão de HGF avaliada por PCR quantitativo em tempo real. Ao passo que as células B16 expressam quantidades praticamente indetectáveis de HGF ($0,29 \pm 0,29$ URE), a expressão deste gene nas células MO-MSCs é abundante ($821,8 \pm 59,57$ URE).

3.8. Adição de inibidores de Met ao mc/MSCs impede a transição morfológica das células de melanoma

O HGF exerce seus efeitos biológicos por meio da ligação em seu receptor Met. A fim de verificar se a transição fenotípica causada pelas MO-MSCs envolve a ativação da via HGF/Met, as células de melanoma foram cultivadas em mc/MSCs na presença de inibidores competitivos de ATP específicos contra Met.

Quando mantidas em uma concentração de inibidores igual ou superior à 1 μ M, as células B16 mantiveram sua morfologia epitelial comparável àquelas cultivadas em meio não condicionado. Além disso, o composto DMSO, que é usado como solvente dos inibidores, não reverteu os efeitos morfológicos causados pelo mc/MSCs (figura 20). Assim, a inibição da via de sinalização HGF/Met impede a aquisição da morfologia fibroblástica nas células B16 causada pelo secretoma das MO-MSCs.

Figura 20: A inibição do receptor Met impede a transição morfológica das células de melanoma. Fotomicrografias demonstrando a morfologia das células B16 após 72 h de cultivo em mc/MSCs na presença de dois inibidores de Met. As células de melanoma mantiveram sua morfologia epitelial quando cultivadas em mc/MSCs na presença de inibidores de Met a partir da concentração de 1 μ M (painéis das duas fileiras inferiores).

3.9. A inibição de Met impede a ativação da EMT nas células de melanoma

As evidências morfológicas apresentadas acima sugerem que a inibição da via HGF/Met pode impedir que as células B16 sofram EMT em resposta ao secretoma das MO-MSCs. Para testar esta hipótese, as células de melanoma foram cultivadas em mc/MSCs durante 6 dias na presença de 2 μ M de inibidores de Met. Após o período de incubação, a expressão gênica de marcadores da EMT foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real.

Conforme apresentado na figura 21, as células B16 cultivadas em mc/MSCs e DMSO adquiriram uma assinatura gênica consistente com EMT, caracterizada pelo aumento na transcrição de marcadores mesenquimais como fibronectina, FSP-1, vimentina, N-caderina e ZEB2 e pela redução na expressão de E-caderina. O uso dos inibidores de Met preveniu completamente o aumento da expressão dos marcadores mesenquimais fibronectina, vimentina, FSP-1, N-caderina e ZEB2. Por outro lado, nenhum dos inibidores de Met impediu significativamente a repressão transcricional da E-caderina.

Figura 21: Inibidores de Met previnem a expressão de marcadores da EMT nas células B16. O gráfico representa os níveis de expressão de RNAm normalizados pela expressão dos respectivos genes nas células B16 cultivadas em meio não condicionado. A inibição de Met preveniu completamente o aumento da expressão dos marcadores mesenquimais fibronectina, FSP-1, vimentina, N-caderina e ZEB2 (* $p < 0,02$, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni). Por outro lado, a repressão transcricional de E-caderina não pôde ser evitada pelo cultivo em inibidores de Met. Os asteriscos duplos (**) indicam os genes diferencialmente expressos nas amostras mantidas em inibidores de Met em relação às mantidas em meio não condicionado ($p < 0,01$, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

3.10. A inibição do receptor Met previne a aquisição de propriedades metastáticas nas células de melanoma

Conforme demonstrado anteriormente, o secretoma das MO-MSCs acentua as propriedades metastáticas das células de melanoma *in vitro*. Para avaliar se tais efeitos eram mediados pela ativação da via HGF/Met, células B16 cultivadas em mc/MSCs na presença de inibidores de Met foram avaliadas quanto ao seu potencial de ancoragem à fibronectina, de migração e de invasão em matrizes tridimensionais.

Os inibidores de Met preservaram completamente o potencial das células B16 em se ancorar a superfícies recobertas com fibronectina, prevenindo a redução do potencial de adesão causado pelo secretoma das MO-MSCs (figura 22).

Figura 22: Os inibidores de Met previnem a redução do potencial de ancoragem das células B16 à fibronectina após cultivo em mc/MSCs. (A) Sinal bioluminescente (painéis superiores) e fotomicrografias após coloração com hematoxilina (painéis inferiores) de células B16 aderidas aos poços recobertos com fibronectina. O uso dos inibidores de Met inibiu completamente a redução da adesão das células de melanoma causada pelo secretoma das MO-MSCs. **(B)** Estimativa do número de células B16 aderidas por quantificação da bioluminescência. A intensidade de bioluminescência confirma que o mc/MSCs não reduziu o número de células ancoradas às superfícies recobertas por fibronectina na presença de inibidores de Met (* $p < 0,02$, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni). Escala = 100 μ m.

A inibição de Met também preveniu significativamente o aumento da migração das células B16 em resposta ao mc/MSCs (figura 23). Os inibidores iMet-a e iMet-b suprimiram, a mobilidade das células de melanoma estimulada pelo secretoma das MO-MSCs em $62,3\% \pm 0,02\%$ e $65,3\% \pm 0,04\%$, respectivamente.

Figura 23: A inibição de Met suprime o efeito pró-migratório do mc/MSCs sobre as células de melanoma. (A) Fotomicrografias demonstrando a região da falha na monocamada de células no início (0 h) e ao final (24 h) do experimento. O mc/MSCs induz a migração das células de melanoma a qual é reprimida por meio da incubação em inibidores de Met. Escala = 100 μm. **(B)** Estimativa da migração feita com o auxílio do software ImageJ. A inibição de Met preveniu em aproximadamente 60% o aumento da migração causado pelo secretoma das MO-MSCs (* $p < 0,0005$, ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni).

Por fim, a inibição da via HGF/Met impediu completamente que o secretoma das MO-MSCs aumentassem o potencial invasivo das células de melanoma. As células B16 cultivadas em mc/MSCs na presença dos inibidores de Met foram incapazes de invadir a matriz circundante, formando estruturas compactas comparáveis àquelas formadas pelas células mantidas em meio não condicionado. Em contrapartida, as células incubadas em mc/MSCs + DMSO emitiram prolongamentos na matriz circundante e se dispersaram à medida que proliferavam (figura 24).

Figura 24: A inibição de Met impede que o mc/MSCs aumente o potencial invasivo das células de melanoma. Fotomicrografias representativas de células B16 imersas em Matrigel. Células de melanoma cultivadas em mc/MSCs + DMSO emitiram protrusões na matriz circundante e se dispersaram à medida que se proliferavam. A inibição do receptor Met impediu completamente o aumento da invasão causado pelo mc/MSCs, fazendo com que as células B16 formassem estruturas compactas idênticas às formadas pelas células mantidas em meio não condicionado. Escala = 20 µm.

Discussão

4. DISCUSSÃO

As evidências obtidas neste trabalho demonstram que as MO-MSCs no estroma tumoral promovem a disseminação metastática das células de melanoma. Em concordância com este efeito pró-metastático, o secretoma das MO-MSCs induziu a EMT nas células B16 *in vitro*, fenômeno este que é mediado pela ativação da via HGF/Met e leva à aquisição de propriedades que facilitam a disseminação metastática.

A secreção de diversos fatores bioativos fez das MO-MSCs excelentes candidatas à aplicação clínica para o tratamento de diferentes doenças. Em decorrência disto, nosso grupo foi pioneiro no país no que tange à pesquisa e aplicação clínica das MO-MSCs no campo da terapia celular. Entretanto, elucidar os riscos do uso das MO-MSCs é tão importante quanto compreender suas propriedades terapêuticas.

Os efeitos biológicos do secretoma das MO-MSCs são diversos e incluem a inibição da apoptose, indução da angiogênese e supressão do sistema imunológico. Embora estas propriedades sejam relevantes para a regeneração, elas também são responsáveis por facilitar a progressão neoplásica. Isto resultou na publicação de diversos trabalhos reportando o impacto das MSCs na progressão tumoral, cujos resultados, entretanto, foram surpreendentemente controversos. Por exemplo, Djouad *et al.* (2003)³⁷ reportaram que a imunossupressão mediada pelas MO-MSCs permite o crescimento de tumores alogênicos em camundongos sem que haja rejeição. Por outro lado, Khakoo *et al.* (2006)⁶¹ demonstraram que as MO-MSCs inibem o crescimento tumoral em um modelo de sarcoma de Kaposi. Neste estudo, os autores demonstraram que o contato com as MO-MSCs inibe a atividade da proteína-quinase Akt nas células do sarcoma, impedindo o crescimento dos tumores. Portanto, apesar de apresentar propriedades capazes de sustentar a progressão neoplásica, o efeito das MSCs no crescimento tumoral é dependente de elementos contextuais, como o tipo de tumor. O trabalho de Khakoo *et al.*, por exemplo, sugere que as MO-MSCs podem ter propriedades antitumorais em neoplasias que são sustentadas pela desregulação da via Akt.

A exemplo dos dados reportados sobre o crescimento tumoral, os poucos estudos que buscaram elucidar o papel das MSCs na metástase também relatam

informações controversas. Ao passo que as MO-MSCs promovem a metástase da linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-231⁵⁹, demonstrou-se o efeito oposto em um modelo de carcinoma hepatocelular⁶². A interpretação destas discrepâncias é dificultada por dois fatores principais: primeiro, pelo número restrito de tipos tumorais estudados até o momento e, segundo, pela ausência de informações sobre os mecanismos de sinalização entre MSCs e células tumorais que são relevantes para a disseminação metastática. Apenas Karnoub *et al.* (2007)⁵⁹ demonstraram que a disseminação das células de carcinoma mamário ocorre em resposta à quimiocina CCL5 (RANTES) secretada pelas MO-MSCs.

Considerando que a metástase é responsável por 90% das mortes em pacientes com câncer⁴⁰, é imperativo que se compreenda o papel das MO-MSCs na disseminação metastática para que estas sejam utilizadas como um recurso terapêutico de modo seguro. Além disso, MSCs já foram isoladas de diversos tipos de neoplasias^{36, 34, 33, 35} e sabe-se que as MO-MSCs originam miofibroblastos que dão suporte ao crescimento tumoral⁶³. Assim, avaliar o papel das MO-MSCs na metástase pode trazer novas informações sobre a relevância desta classe de células estromais na disseminação metastática e, conseqüentemente, revelar novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer.

O processo de disseminação metastática é complexo e composto por múltiplos eventos que podem ser simplificados em duas etapas principais. Primeiro, a translocação das células tumorais para sítios distantes e, segundo, a colonização destes sítios secundários levando à formação de metástases. Utilizando um modelo de melanoma ortotópico, o qual recapitula todos os passos da cascata de invasão-metástase⁶⁴, nós demonstramos que as MO-MSCs facilitam a disseminação metastática das células de melanoma, aumentando a incidência de micrometástases nos pulmões.

Os melanomas são tumores com grande propensão para sofrer metástase, inclusive nos estágios iniciais da progressão neoplásica⁶⁵. Este comportamento agressivo pode ser explicado em parte pela reativação interna do circuito molecular responsável pela migração dos melanócitos durante a ontogênese. Gupta *et al.* (2005)⁶⁶ demonstraram que a introdução de genes oncogênicos faz com que os melanócitos originem tumores mais metastáticos do que fibroblastos e células epiteliais mamárias que receberam os mesmos genes. Mas a despeito dos fatores inerentes à linhagem melanocítica, sabe-se que moléculas secretadas pelo estroma,

como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF e metaloproteases, são essenciais para a progressão e invasão das células de melanoma⁶⁷. Este trabalho, por sua vez, provê evidências diretas de que as MO-MSCs são capazes de promover a metástase de melanoma, reforçando a importância das células estromais para a disseminação deste tipo de tumor.

A modulação da metástase pode ocorrer em diferentes etapas da cascata de invasão-metástase. A etapa de colonização metastática, por exemplo, é extremamente ineficiente. Ainda que alguns tumores liberem milhões de células tumorais por dia na corrente sangüínea⁶⁸, poucas metástases clinicamente detectáveis são formadas⁶⁹. Além disso, a meia-vida de uma célula tumoral circulante é curta. Estima-se que células circulantes de carcinoma mamário, por exemplo, tem uma meia-vida de no máximo 2,4 horas⁷⁰. Estas informações indicam que a colonização metastática é um evento limitante da incidência de metástases. Apesar disso, demonstramos que o secretoma das MO-MSCs não aprimora o potencial de colonização pulmonar das células B16 infundidas sistemicamente. Portanto, a ação pró-metastática das MO-MSCs ocorreu durante a fase inicial da cascata de invasão-metástase, quando as células tumorais invadem o tecido circunjacente até alcançar a circulação sistêmica.

A ativação da EMT nas células tumorais tem sido um conceito amplamente aceito para explicar o mecanismo inicial da disseminação metastática, não apenas para carcinomas, mas também para melanomas⁷¹. Assim, na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na promoção da metástase pelas MO-MSCs, investigamos se estas teriam servido como fonte de biomoléculas capazes de ativar a EMT nas células de melanoma.

A transição fenotípica que caracteriza a EMT envolve a modulação da transcrição de diversos genes⁴⁵. Estes, portanto, servem como marcadores biológicos para identificar células que ativaram o programa da EMT. Notavelmente, o secretoma das MO-MSCs induziu a aquisição de uma assinatura gênica consistente com a EMT nas células de melanoma. Observamos o aumento da expressão dos marcadores mesenquimais fibronectina, FSP-1 e N-caderina nas células de melanoma, fenômeno que também foi correlacionado com a aquisição de propriedades metastáticas durante a ativação da EMT em outros modelos de câncer^{72, 51}.

A redução transcricional de E-caderina, considerada um marco importante da EMT e frequentemente relacionada ao risco de metástase⁷³, também foi observada neste trabalho. Este fenômeno também foi reportado em dois modelos de indução da EMT utilizando células B16. A expressão ectópica do fator de transcrição Snail⁷⁴ ou o cultivo na presença de TGF β 1⁷⁵ faz com que haja a redução da expressão de E-caderina concomitante à transição para um fenótipo mesenquimal em células B16.

A modulação transcricional durante a EMT é dirigida por um conjunto bem conhecido de fatores de transcrição⁴⁶. Dentre eles, o fator de transcrição dedo-de-zinco homeótico ligante de E-box 2 (ZEB2), cuja expressão foi aumentada nas células de melanoma após cultivo em mc/MSCs. ZEB2 possui dois conjuntos conservados de dedos-de-zinco que se ligam à região promotora de genes-alvo e suprimem sua expressão⁷⁶. A ligação de ZEB2 ao promotor da E-caderina reduz a expressão deste gene, leva à desagregação intercelular e aumenta o potencial de invasão das células epiteliais MDCK⁷⁷. Em um estudo amplo envolvendo 60 linhagens de células tumorais, a expressão de ZEB2 foi inversamente proporcional à expressão de E-caderina⁷⁸. O mesmo pôde ser observado no presente estudo, e, como os demais fatores de transcrição testados não tiveram sua expressão alterada, ZEB2 parece ter atuado como o principal efetor da repressão transcricional de E-caderina nas células B16. Em concordância com esta proposta, no estudo citado anteriormente feito com 60 linhagens neoplásicas, a expressão simultânea de ZEB1 e ZEB2 ocorre em todas as células tumorais exceto nas células de melanoma, as quais são as únicas que expressam apenas ZEB2⁷⁸.

A aquisição do perfil de expressão gênica consistente com a EMT foi acompanhada por uma transição morfológica nas células de melanoma. Estas, depois de mantidas em contato com o secretoma das MO-MSCs, alteraram sua morfologia do estado epitelial para o formato fibroblástico. Durante esta alteração fenotípica, houve a reorganização dos filamentos de actina, os quais deixaram de se distribuir corticalmente e passaram a dar suporte à formação de estruturas protrusivas, típicas de células mesenquimais. Portanto, estas observações provêm as evidências morfológicas de que a EMT foi ativada.

Durante a realização deste trabalho, dois outros grupos de pesquisa também reportaram evidências de que as MO-MSCs podem ativar a EMT em células tumorais. Martin *et al.* (2010)⁵⁸ demonstraram que as MO-MSCs induzem a expressão de marcadores da EMT em células de carcinoma mamário após co-cultivo

in vitro. Em seguida, Klopp *et al.* (2010)⁷⁹ observaram que MO-MSCs induzem a redução da expressão de E-caderina em células epiteliais mamárias normais e tumorais. Nosso trabalho, por sua vez, demonstra que MO-MSCs também ativam o programa da EMT em células de melanoma.

Os melanócitos não formam um epitélio contínuo *in vivo* e, portanto, não são considerados células epiteliais. Entretanto, eles possuem muitas características de células epiteliais como a expressão de E-caderina e a formação de junções aderentes com os queratinócitos⁸⁰. Por consequência, é plausível supor que a ativação da EMT seja relevante na biologia dos melanomas, tal como ocorre nos carcinomas. De fato, Alonso *et al.* (2007)⁷¹ demonstraram que o risco de metástase em pacientes com melanoma correlaciona-se com a expressão de marcadores da EMT, como a N-caderina, a osteopontina e a osteonectina.

A identificação dos marcadores típicos e a transição morfológica em si não indicam a relevância da EMT para a metástase. Para isso, a ativação da EMT deve implicar na aquisição de propriedades funcionais que permitem a disseminação das células tumorais.

Durante a metástase, as células tumorais sofrem grandes alterações em seu repertório de integrinas, o que afeta diretamente sua interação com as moléculas da matriz extracelular⁸¹. Nós demonstramos que o secretoma das MO-MSCs reduz a ancoragem das células B16 às superfícies recobertas com fibronectina. Este mesmo efeito foi observado em células B16 induzidas a ativar o programa EMT pela expressão ectópica do fator de transcrição Snail⁷⁴.

Ao mesmo tempo em que a forte ancoragem às moléculas da matriz extracelular dificulta o escape das células, é importante que ainda haja afinidade suficiente para permitir a migração, a qual é mediada principalmente por integrinas⁸¹. Em concordância com estas observações, a redução da afixação à fibronectina não prejudicou a mobilidade das células B16. Ao contrário, as células de melanoma migraram mais rapidamente nas superfícies recobertas por fibronectina quando incubadas com o secretoma das MO-MSCs. Neste ensaio, a presença de células individuais dissociadas da monocamada de células de melanoma está de acordo com a ativação completa da EMT, que induz a migração individual das células ao invés da migração coletiva. Estes achados implicam que as MO-MSCs são capazes de reduzir a ancoragem das células B16 às proteínas da matriz extracelular, o que as permitiria deixar o sítio primário e se disseminar. Ao mesmo tempo, a afinidade à

fibronectina é mantida em um nível suficiente que permita a migração das células de melanoma.

Para que ocorra a disseminação das células tumorais, é essencial que a mobilidade das mesmas seja acompanhada pela capacidade de invadir o tecido circunjacente. A trama de moléculas da matriz extracelular oferece uma barreira mecânica para a disseminação das células tumorais. Assim, estas precisam degradar as proteínas extracelulares de modo balanceado, pois é necessário liberar espaço suficiente para a invasão sem destruir completamente as moléculas que servem como substrato para a migração⁸¹. Ao mesmo tempo, as células tumorais devem ser capazes de estabelecer uma dinâmica de migração condizente com o ambiente tridimensional onde estão inseridas e que não pode ser recapitulado em placas de cultura bidimensionais. Nós demonstramos que o secretoma das MO-MSCs é capaz induzir a rápida invasão das células de melanoma em um modelo tridimensional de matriz extracelular. Portanto, a ativação da EMT pelo secretoma das MO-MSCs correlaciona-se com a aquisição de propriedades metastáticas nas células de melanoma.

Este conjunto de observações indica que o secretoma das MO-MSCs pode ativar a EMT nas células de melanoma, fazendo-as adquirir traços metastáticos que contribuem para sua disseminação *in vivo*. Este cenário inevitavelmente implica em uma próxima questão: qual ou quais os fatores secretados pelas MO-MSCs ativam o programa da EMT nas células de melanoma? A identificação destes fatores pode permitir estabelecer uma relação causal entre ativação da EMT e aquisição de traços metastáticos e ainda fornecer potenciais alvos para intervenção terapêutica contra a metástase.

Dentre os seis possíveis indutores da EMT testados, apenas o HGF induziu a aquisição de uma morfologia fibroblástica nas células de melanoma.

O HGF, também conhecido como fator de dispersão (SF, do inglês *scatter factor*), é uma glicoproteína capaz de modular diversos fenômenos celulares, como a proliferação, migração, invasão, morfogênese e angiogênese⁸². O HGF exerce seus efeitos por meio da ligação ao receptor Met, o qual foi identificado na década de 1980 como um proto-oncogene⁸³. Met é um receptor tirosina-cinase formado pela união entre as cadeias α e β por uma ponte dissulfeto. A cadeia β é a mais longa e encerra o domínio cinase do receptor, localizado em sua porção citoplasmática⁸⁴. A ligação do HGF leva à homodimerização de Met e a subsequente fosforilação de

três resíduos de tirosina (Y1230, Y1234 e Y1235) do domínio cinase do receptor, aumentando sua atividade catalítica⁸⁵. Em seguida, ocorre a fosforilação de outros dois resíduos de tirosina na porção C-terminal do receptor (Y1349 e Y1356) levando-os a servirem como sítios de ancoragem para proteínas intracelulares adaptadoras que iniciam a transdução de sinal intracelular⁸⁶. Estes eventos de fosforilação consistem na transferência de grupamentos fosfato liberados após a hidrólise de ATP. Assim, o uso de inibidores competitivos de ATP bloqueia a atividade do domínio cinase do receptor Met e, conseqüentemente, impede a transdução de sinal intracelular.

Alguns inibidores competitivos de ATP apresentam a inconveniência de serem altamente inespecíficos, já que os sítios de ligação de ATP possui domínios conservados entre as tirosina-cinases. No entanto, ajustes estruturais nos inibidores competitivos de ATP podem conferir alta especificidade aos mesmos⁸⁷. Este é o caso dos inibidores utilizados neste estudo, os quais são considerados específicos para Met. O inibidor iMet-a possui uma especificidade para o receptor Met 1000 vezes superior em relação a outras 208 cinases testadas⁸⁷ e o inibidor iMet-b demonstrou ser seletivo para Met em um painel composto por outras 229 cinases⁸⁸.

A adição de inibidores de Met ao mc/MSCs inibiu completamente a dispersão e a aquisição da morfologia fibroblástica nas células de melanoma de maneira dose-dependente. Assim, a ativação da via HGF/Met é o mecanismo fundamental que medeia a rápida transição morfológica das células de melanoma em resposta ao secretoma das MO-MSCs. Esta rápida indução da dispersão celular e da transição morfológica são de fato as primeiras propriedades que definiram o fator de dispersão (SC), identificado na década de 1980. O SC, mais tarde revelado como sendo equivalente ao HGF⁸⁹, demonstrou ser capaz de induzir a aquisição de uma morfologia fibroblástica em diversas linhagens de células epiteliais⁹⁰.

Mutações que causam a ativação constitutiva do receptor Met são associadas com a ocorrência de tumores invasivos e de múltiplas metástases em diferentes tipos de carcinomas^{91, 92}. Além disso, hiper-expressão de HGF, de seu receptor Met ou de ambos origina tumores metastáticos cuja progressão e disseminação são mantidas pela ativação autócrina e persistente da via HGF/Met^{93, 94}. Em humanos, tumores como osteossarcomas e rabdomiossarcomas expressam HGF constitutivamente, devido à sua origem mesenquimal. Assim, a disseminação metastática destes tumores também é resultante da ativação autócrina consequente

da hiper-expressão de Met^{95, 96}. No caso das células B16, observamos que a expressão de HGF é praticamente indetectável, o que impossibilita a ativação autócrina de Met nos tumores de melanoma. Contudo, as MO-MSCs expressam altos níveis de HGF, indicando que elas devem ser uma importante fonte desta molécula no microambiente tumoral. Assim, em um microambiente onde co-existam MO-MSCs e as células B16, a sinalização entre ambas é importante para a ativação da EMT mediada por HGF.

Alguns trabalhos propõem que o HGF promove apenas a dispersão das células-alvo, e não a verdadeira EMT⁹⁷. A dispersão é caracterizada pela aquisição de uma morfologia fibroblástica, capacidade de invasão e ruptura das junções intercelulares, porém sem o aumento da expressão de marcadores mesenquimais. A EMT, por sua vez, é identificada também pelo aumento na expressão dos marcadores mesenquimais⁹⁸. Todavia, a concepção de que o HGF não promove a EMT não pode ser generalizada. Sabe-se que o HGF tem papel central durante a EMT na ontogênese, pois camundongos transgênicos *Hgf*^{-/-} não se desenvolvem devido à inibição da delaminação e da migração de células progenitoras⁹⁹. Além disso, o uso de HGF recombinante pode ser usado para a indução experimental da EMT *in vitro*¹⁰⁰. Por outro lado, a linhagem de células epiteliais mamárias expressando o gene Ras (Ep-Ras) ativa o programa de dispersão ao invés da EMT quando cultivadas na presença de HGF. Neste caso, o TGFβ é capaz de induzir a EMT, porém depende da expressão do oncogene Ras para tal⁹⁷. Assim, a expressão prévia de determinados genes pode definir a ativação ou não da EMT em resposta a fatores extracelulares. Portanto, os mecanismos de ativação da EMT são dependentes de elementos contextuais como, por exemplo, o perfil de expressão gênica das células-alvo.

Nós demonstramos que o uso de inibidores de Met impede o aumento da expressão de marcadores mesenquimais induzido pelo mc/MSCs nas células de melanoma. Portanto, a aquisição da assinatura transcricional típica da EMT é dependente da ativação da via HGF/Met nas células B16. O aumento na transcrição da E-caderina foi o único que não pode ser evitado pela adição dos inibidores de Met ao mc/MSCs. Pelo menos duas razões podem justificar esta observação. Primeiro, outros fatores secretados pelas MO-MSCs, além do HGF, podem ter contribuído para a repressão transcricional da E-caderina nas células de melanoma. Segundo, a concentração utilizada dos inibidores pode não ter sido suficiente para

impedir a completa transdução de sinal dos receptores Met. Para resolver entre estas duas possibilidades, pode-se utilizar uma concentração de inibidores suficiente para impedir de modo completo fosforilação de Met. Isto pode ser avaliado por meio do uso de anticorpos contra os sítios fosforilados de Met em ensaios de *immunoblotting*.

A restauração da morfologia epitelial e a supressão do aumento dos marcadores mesenquimais indicam, portanto, que a via HGF/Met exerce papel importante na EMT induzida pelas MO-MSCs nas células de melanoma. Além disso, observamos que os inibidores de Met impedem que as MO-MSCs induzam a aquisição de propriedades metastáticas nas células de melanoma. Estes dados indicam que o HGF é a molécula efetora por meio da qual as MO-MSCs induzem a redução da ancoragem à fibronectina e o aumento da mobilidade e invasão das células de melanoma.

Em muitos casos, a repressão da E-caderina é essencial para permitir a disseminação das células durante a EMT. Entretanto, observamos que as células B16 se dispersam após 3 dias de incubação com o mc/MSCs, sem que haja a repressão da expressão de E-caderina ou seu deslocamento para o meio intracelular (anexo A). Portanto, a E-caderina parece não ser limitante para a disseminação das células B16-F10. De fato, a baixa expressão de E-caderina nesta linhagem ($2,28 \pm 0,16$ URE, $n = 6$) condiz com esta hipótese e já foi observada em estudos anteriores⁷⁵. Isto explica porque a inibição de Met impediu que as células B16 acentuassem suas propriedades metastáticas mesmo sem recuperar a expressão de E-caderina.

Fato interessante é que a via HGF/Met também é essencial para a ativação da EMT durante a migração dos melanócitos a partir da crista neural em mamíferos. A expressão de HGF e Met é um evento descrito durante a formação da crista neural¹⁰¹ e a expressão inapropriada de *Hgf* em camundongos transgênicos altera a distribuição dos melanócitos¹⁰². Assim, nossas observações indicam que o HGF produzido pelas MO-MSCs induz a recapitulação do comportamento migratório e invasivo das células de melanoma, tal como ocorre com os melanócitos durante a ontogênese. De fato, a hiper-expressão de *Hgf* em camundongos transgênicos resulta no desenvolvimento de melanomas durante a vida adulta¹⁰³. Neste modelo, a fração dos tumores metastáticos tem expressão aumentada do receptor Met, indicando que a sensibilização ao HGF está envolvida com a disseminação

metastática dos melanomas. Em concordância com estas evidências, a hiperexpressão de Met também ocorre em melanomas humanos e é associada ao risco de metástase e ao mau prognóstico^{104, 105}.

Além da secreção de HGF, a localização das MO-MSCs no microambiente tumoral pode ter contribuído para a disseminação das células de melanoma. Nós observamos que as MO-MSCs ou sua progênie ocupam o espaço perivascular nos tumores primários de melanoma. Resultados similares foram obtidos em um modelo de glioma em ratos²⁹. Esta distribuição recapitula a localização normal das MO-MSCs na medula óssea¹⁰⁶ e está de acordo com a observação de que tumores originados por células B16 possuem um estroma composto principalmente por células mesenquimais Sca-1⁺ e células perivasculares¹⁰⁷.

Por ocuparem o espaço perivascular, as MO-MSCs formam uma interface entre as células de melanoma e o lúmen dos vasos sanguíneos. Por consequência, o HGF secretado pelas MO-MSCs pode induzir o comportamento invasivo das células de melanoma adjacentes, as quais já se situam próximas aos vasos sanguíneos. Assim, a tarefa das células de melanoma em alcançar uma rota de disseminação sistêmica pode ser facilitada pela localização perivascular das MO-MSCs.

As moléculas de HGF têm alta afinidade por proteoglicanos extracelulares conjugados com sulfato de heparan, onde são frequentemente aprisionadas e degradadas antes de exercer suas funções¹⁰⁸. Assim, a difusão do HGF para sítios distantes do local onde foi secretado é bastante limitada. Deste modo, baseando-se em nosso modelo, espera-se que a ativação da EMT pelas MO-MSCs ocorra nas imediações dos vasos onde elas estão localizadas. Disto decorre que, em um dado momento, apenas uma pequena subpopulação das células tumorais pode estar com o programa da EMT ativado. Isto pode ter implicações importantes para o estudo da EMT e para a determinação de sua relevância na metástase. Neste contexto, a avaliação da expressão gênica a partir do RNA extraído de fragmentos de tumores pode ser insuficiente para a detecção dos marcadores da EMT, os quais serão infimamente representados em meio à grande quantidade de transcritos obtidos da amostra.

A ativação duradoura da EMT parece ser prejudicial para as etapas finais da cascata metastática. Em um modelo de carcinoma de bexiga urinária, Chaffer *et al.* (2006)⁵⁷ compararam o potencial metastático de linhagens com fenótipo epitelial e

mesenquimal. Os autores demonstraram que células com fenótipo epitelial são capazes de formar mais metástases após infusão intra-cardíaca. Em contrapartida, estas células epiteliais formavam menos metástases quando aplicadas subcutaneamente. Em outro estudo, Tsuji *et al.* (2008)¹⁰⁹ induziram a expressão de p12CDK2-AP1, uma proteína efetora da via do TGF β , levando a ativação constitutiva da EMT na linhagem HPCP-1 de queratinócitos orais de hamster. Após infusão subcutânea, os autores observaram que apenas as células p12CDK2-AP1⁺ eram aptas a alcançar a circulação sanguínea. Em contrapartida, apenas as células p12CDK2-AP1⁻ eram capazes de formar metástases após infusão sistêmica. Recentemente, Bonnomet *et al.* (2011)⁵⁶ demonstraram por meio de experimentos elegantes *in vivo* que a EMT origina células tumorais mamárias circulantes, mas o retorno ao fenótipo epitelial é essencial para a formação das metástases nos sítios secundários.

Nós observamos que as células de melanoma mantêm o fenótipo mesenquimal enquanto estão em contato com o secretoma das MO-MSCs. No entanto, após a remoção deste estímulo, o qual identificamos como sendo o HGF, as células de melanoma reassumem o fenótipo epitelial. Assim, as MO-MSCs provêm o estímulo necessário para que as células de melanoma iniciem o processo de invasão no tumor primário e alcancem o lúmen dos vasos sanguíneos. Após se alojarem nos capilares de órgãos distantes do sítio primário, as células de melanoma podem não estar mais sujeitas aos fatores secretados pelas MO-MSCs. A alta afinidade do HGF pelos proteoglicanos extracelulares, por exemplo, pode fazer com que ele seja retido em grande quantidade no sítio primário, limitando sua concentração sistêmica. Assim, a ausência do estímulo das MO-MSCs nos sítios secundários pode permitir a reversão das células de melanoma para o fenótipo epitelial, permitindo-as executar os passos finais da cascata de invasão-metástase. Em concordância com esta proposta, Karnoub *et al.* (2007)⁵⁹ também demonstraram que as MO-MSCs aumentam de modo transiente a capacidade de invasão das células de carcinoma mamário MDA-MB-231.

O conjunto de evidências apresentadas indica que as MO-MSCs situadas no microambiente tumoral podem induzir a EMT em células de melanoma por meio da secreção de HGF e, assim, promover a metástase. É importante considerar este potencial pró-metastático para o desenvolvimento das MO-MSCs como uma ferramenta terapêutica segura. Sabe-se que MSCs infundidas sistemicamente são

capazes de se domiciliar em tumores, principalmente em virtude da produção de fatores quimiotáticos pelo microambiente tumoral¹¹⁰. Além disso, a incidência de tumores humanos clinicamente ocultos não é baixa. Por exemplo, estudos envolvendo análises histológicas detalhadas estimam que a frequência de tumores clinicamente ocultos de próstata em homens com 40 anos seja 34%¹¹¹. No caso de câncer de mama em mulheres, a frequência estimada é 39%¹¹². Portanto, a infusão de MO-MSCs para fins terapêuticos pode resultar em efeitos colaterais indesejados, pois elas podem suprir tumores incipientes com os recursos necessários para progredir e se disseminar.

A observação de que as MO-MSCs servem como fonte de sinais indutores da EMT também pode ter implicações que vão além do suporte à disseminação metastática. Um número crescente de estudos vem demonstrando que a ativação da EMT leva à origem de células-tronco tumorais (CTTs), que são definidas pela capacidade de formar novos tumores e de se auto-renovar no microambiente tumoral¹¹³. O trabalho seminal de Mani *et al.* (2008)¹¹⁴ demonstrou que a indução da EMT em células epiteliais mamárias leva à aquisição de marcadores de células-tronco mamárias (CD44^{alto}/CD24^{baixo}) e o aumento na capacidade de formar mamosferas *in vitro*. Em paralelo, a ativação da EMT em células de carcinoma mamário culminou no aumento da frequência de CTTs. Em seguida, outros trabalhos também demonstraram correlação entre ativação da EMT e a origem de CTTs em carcinoma de próstata¹¹⁵ e carcinoma ovariano¹¹⁶, por exemplo. Além disso, evidências apontam que as CTTs são resistentes à eliminação por radioterapia e quimioterapia¹¹⁷.

Assim, é possível que a indução da EMT pelo secretoma das MO-MSCs estimule não somente a invasão, mas também a manutenção do compartimento de CTTs o qual pode conferir radio e quimiorresistência aos tumores. Notavelmente, foi demonstrado que o HGF produzido por miofibroblastos é capaz de ativar a via Wnt e a conseqüente aquisição de propriedades de CTTs em células de carcinoma de cólon tanto *in vitro* como *in vivo*¹¹⁸. Durante nossos experimentos, observamos que o secretoma das MO-MSCs impede a síntese de melanina nas células B16 (anexo B), o que pode indicar o retorno ao fenótipo indiferenciado das células de melanoma. Entretanto, esta observação só poderá ser confirmada mediante a realização de ensaios funcionais e de uma caracterização mais detalhada.

Portanto, a associação entre as evidências obtidas neste trabalho e o conhecimento atual sobre EMT e CTTs indica que o potencial metastático e a quimiorresistência tumoral podem depender, ao menos em parte, da sensibilidade das células neoplásicas aos fatores produzidos pelas MSCs no microambiente tumoral. Mais especificamente, a inibição da via HGF/Met pode neutralizar os efeitos das MSCs sobre as células tumorais, contribuindo para a repressão de propriedades fundamentais que sustentam a progressão e a disseminação neoplásica.

Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K. e LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v.3, n.4, p.393-403, 1970.
2. BIANCO, P., ROBEY, P. G. e SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v.2, n.4, p.313-319, 2008.
3. CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**, v.9, n.5, p.641-650, 1991.
4. RUSSELL, K. C. *et al.* In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. **Stem Cells**, v.28, n.4, p.788-798, 2010.
5. HORWITZ, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5, p.393-395, 2005.
6. PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.
7. DA SILVA MEIRELLES, L., CHAGASTELLES, P. C. e NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v.119, n.Pt 11, p.2204-2213, 2006.
8. FLAGLER, K. *et al.* Site-specific gene modification by oligodeoxynucleotides in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Gene Ther**, v.15, n.14, p.1035-1048, 2008.
9. VAN DER BOGT, K. E. *et al.* Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. **Transplantation**, v.87, n.5, p.642-652, 2009.
10. COVAS, D. T. *et al.* Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Exp Hematol**, v.36, n.5, p.642-654, 2008.

11. CRISAN, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**, v.3, n.3, p.301-313, 2008.
12. HIRSCHI, K. K. e D'AMORE, P. A. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovasc Res**, v.32, n.4, p.687-698, 1996.
13. SACCHETTI, B. *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. **Cell**, v.131, n.2, p.324-336, 2007.
14. TRAKTUEV, D. O. *et al.* A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. **Circ Res**, v.102, n.1, p.77-85, 2008.
15. CAPLAN, A. I. e CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Cell Stem Cell**, v.9, n.1, p.11-15, 2011.
16. MEIRELLES LDA, S. *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.20, n.5-6, p.419-427, 2009.
17. PAREKKADAN, B. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **Plos One**, v.2, n.9, p.e941, 2007.
18. SHI, M., LIU, Z. W. e WANG, F. S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. **Clin Exp Immunol**, v.164, n.1, p.1-8, 2011.
19. KINNAIRD, T. *et al.* Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. **Circulation**, v.109, n.12, p.1543-1549, 2004.
20. SORRELL, J. M., BABER, M. A. e CAPLAN, A. I. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. **Tissue Eng Part A**, v.15, n.7, p.1751-1761, 2009.
21. HANAHAN, D. e WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p.646-674, 2011.

22. NING, H. *et al.* The correlation between cotransplantation of mesenchymal stem cells and higher recurrence rate in hematologic malignancy patients: outcome of a pilot clinical study. **Leukemia**, v.22, n.3, p.593-599, 2008.
23. GREAVES, M. e MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v.481, n.7381, p.306-313, 2012.
24. QIAN, B. Z. e POLLARD, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. **Cell**, v.141, n.1, p.39-51, 2010.
25. KALLURI, R. e ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.5, p.392-401, 2006.
26. GUPTA, V. *et al.* Elevated expression of stromal palladin predicts poor clinical outcome in renal cell carcinoma. **Plos One**, v.6, n.6, p.e21494, 2011.
27. SASAKI, M. *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. **J Immunol**, v.180, n.4, p.2581-2587, 2008.
28. SATAKE, K., LOU, J. e LENKE, L. G. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. **Spine (Phila Pa 1976)**, v.29, n.18, p.1971-1979, 2004.
29. BEXELL, D. *et al.* Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stroma Cells Act as Pericyte-like Migratory Vehicles in Experimental Gliomas. **Molecular Therapy**, v.17, n.1, p.183-190, 2009.
30. SPAETH, E. L. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. **Plos One**, v.4, n.4, p.-, 2009.
31. SUN, B. *et al.* Correlation between melanoma angiogenesis and the mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells derived from bone marrow. **Stem Cells and Development**, v.14, n.3, p.292-298, 2005.
32. WANG, H. *et al.* Trafficking Mesenchymal Stem Cell Engraftment and Differentiation in Tumor-Bearing Mice by Bioluminescence Imaging. **Stem Cells**, v.27, n.7, p.1548-1558, 2009.

-
33. LIS, R. *et al.* Tumor associated mesenchymal stem cells protects ovarian cancer cells from hyperthermia through CXCL12. **Int J Cancer**, v.128, n.3, p.715-725, 2010.
34. CAO, H. *et al.* Mesenchymal stem cell-like cells derived from human gastric cancer tissues. **Cancer Lett**, v.274, n.1, p.61-71, 2009.
35. YAN, X. L. *et al.* Mesenchymal stem cells from primary breast cancer tissue promote cancer proliferation and enhance mammosphere formation partially via EGF/EGFR/Akt pathway. **Breast Cancer Res Treat**, 2011.
36. BRUNE, J. C. *et al.* Mesenchymal stromal cells from primary osteosarcoma are non-malignant and strikingly similar to their bone marrow counterparts. **Int J Cancer**, 2011.
37. DJOUAD, F. *et al.* Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. **Blood**, v.102, n.10, p.3837-3844, 2003.
38. ZHU, W. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. **Exp Mol Pathol**, v.80, n.3, p.267-274, 2006.
39. KLOPP, A. H. *et al.* Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? **Stem Cells**, v.29, n.1, p.11-19, 2011.
40. GUPTA, G. P. e MASSAGUE, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v.127, n.4, p.679-695, 2006.
41. VALASTYAN, S. e WEINBERG, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v.147, n.2, p.275-292, 2011.
42. HAY, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anat (Basel)**, v.154, n.1, p.8-20, 1995.
43. YANG, J. e WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: At the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental Cell**, v.14, n.6, p.818-829, 2008.

-
44. HAY, E. D. e ZUK, A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. **Am J Kidney Dis**, v.26, n.4, p.678-690, 1995.
 45. ZEISBERG, M. e NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **J Clin Invest**, v.119, n.6, p.1429-1437, 2009.
 46. PEINADO, H., OLMEDA, D. e CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer**, v.7, n.6, p.415-428, 2007.
 47. DAVIES, J. A. Mesenchyme to epithelium transition during development of the mammalian kidney tubule. **Acta Anat (Basel)**, v.156, n.3, p.187-201, 1996.
 48. THIERY, J. P. e SLEEMAN, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.7, n.2, p.131-142, 2006.
 49. YANG, J. *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. **Cell**, v.117, n.7, p.927-939, 2004.
 50. SALEEM, M. *et al.* S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, n.40, p.14825-14830, 2006.
 51. YANG, Z. *et al.* Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. **Biochem Biophys Res Commun**, v.358, n.3, p.925-930, 2007.
 52. ONDER, T. T. *et al.* Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. **Cancer Res**, v.68, n.10, p.3645-3654, 2008.
 53. VINCENT-SALOMON, A. e THIERY, J. P. Host microenvironment in breast cancer development: epithelial-mesenchymal transition in breast cancer development. **Breast Cancer Res**, v.5, n.2, p.101-106, 2003.
 54. TARIN, D., THOMPSON, E. W. e NEWGREEN, D. F. The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. **Cancer Res**, v.65, n.14, p.5996-6000; discussion 6000-5991, 2005.

-
55. OLMEDA, D. *et al.* Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness. **Oncogene**, v.26, n.13, p.1862-1874, 2007.
56. BONNOMET, A. *et al.* A dynamic in vivo model of epithelial-to-mesenchymal transitions in circulating tumor cells and metastases of breast cancer. **Oncogene**, 2011.
57. CHAFFER, C. L. *et al.* Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. **Cancer Res**, v.66, n.23, p.11271-11278, 2006.
58. MARTIN, F. T. *et al.* Potential role of mesenchymal stem cells (MSCs) in the breast tumour microenvironment: stimulation of epithelial to mesenchymal transition (EMT). **Breast Cancer Res Treat**, v.124, n.2, p.317-326, 2010.
59. KARNOUB, A. E. *et al.* Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. **Nature**, v.449, n.7162, p.557-563, 2007.
60. ECKHARDT, B. L. *et al.* Genomic analysis of a spontaneous model of breast cancer metastasis to bone reveals a role for the extracellular matrix. **Mol Cancer Res**, v.3, n.1, p.1-13, 2005.
61. KHAKOO, A. Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. **J Exp Med**, v.203, n.5, p.1235-1247, 2006.
62. LI, G. C. *et al.* Human mesenchymal stem cells inhibit metastasis of a hepatocellular carcinoma model using the MHCC97-H cell line. **Cancer Sci**, v.101, n.12, p.2546-2553, 2010.
63. QUANTE, M. *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. **Cancer Cell**, v.19, n.2, p.257-272, 2011.
64. FRANCIA, G. *et al.* Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. **Nat Rev Cancer**, v.11, n.2, p.135-141, 2011.
65. BEDROSIAN, I. *et al.* Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma ($\leq$ 1 mm) with vertical growth phase. **Ann Surg Oncol**, v.7, n.4, p.262-267, 2000.

-
66. GUPTA, P. B. *et al.* The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. **Nat Genet**, v.37, n.10, p.1047-1054, 2005.
67. RUITER, D. *et al.* Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. **Lancet Oncol**, v.3, n.1, p.35-43, 2002.
68. BUTLER, T. P. e GULLINO, P. M. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. **Cancer Res**, v.35, n.3, p.512-516, 1975.
69. TARIN, D. *et al.* Mechanisms of human tumor metastasis studied in patients with peritoneovenous shunts. **Cancer Res**, v.44, n.8, p.3584-3592, 1984.
70. MENG, S. *et al.* Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. **Clin Cancer Res**, v.10, n.24, p.8152-8162, 2004.
71. ALONSO, S. R. *et al.* A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. **Cancer Res**, v.67, n.7, p.3450-3460, 2007.
72. XUE, C. *et al.* The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. **Cancer Res**, v.63, n.12, p.3386-3394, 2003.
73. NIJKAMP, M. M. *et al.* Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Radiother Oncol**, v.99, n.3, p.344-348, 2011.
74. KUDO-SAITO, C. *et al.* Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. **Cancer Cell**, v.15, n.3, p.195-206, 2009.
75. MURAKAMI, M. *et al.* Regulatory expression of genes related to metastasis by TGF-beta and activin A in B16 murine melanoma cells. **Mol Biol Rep**, v.37, n.3, p.1279-1286, 2010.
76. REMACLE, J. E. *et al.* New mode of DNA binding of multi-zinc finger transcription factors: deltaEF1 family members bind with two hands to two target sites. **EMBO J**, v.18, n.18, p.5073-5084, 1999.

-
77. COMIJN, J. *et al.* The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. **Mol Cell**, v.7, n.6, p.1267-1278, 2001.
78. PARK, S. M. *et al.* The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. **Genes Dev**, v.22, n.7, p.894-907, 2008.
79. KLOPP, A. H. *et al.* Mesenchymal stem cells promote mammosphere formation and decrease E-cadherin in normal and malignant breast cells. **Plos One**, v.5, n.8, p.e12180, 2010.
80. TANG, A. *et al.* E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. **J Cell Sci**, v.107 (Pt 4), p.983-992, 1994.
81. HOOD, J. D. e CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.2, p.91-100, 2002.
82. JIANG, W. G. *et al.* Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.53, n.1, p.35-69, 2005.
83. COOPER, C. S. *et al.* Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. **Nature**, v.311, n.5981, p.29-33, 1984.
84. BIRCHMEIER, C. *et al.* Met, metastasis, motility and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.4, n.12, p.915-925, 2003.
85. LONGATI, P. *et al.* Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). **Oncogene**, v.9, n.1, p.49-57, 1994.
86. PONZETTO, C. *et al.* A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. **Cell**, v.77, n.2, p.261-271, 1994.
87. UNDERINER, T. L., HERBERTZ, T. e MIKNYOCZKI, S. J. Discovery of small molecule c-Met inhibitors: Evolution and profiles of clinical candidates. **Anticancer Agents Med Chem**, v.10, n.1, p.7-27, 2010.

-
88. COMOGLIO, P. M., GIORDANO, S. e TRUSOLINO, L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. **Nat Rev Drug Discov**, v.7, n.6, p.504-516, 2008.
89. WEIDNER, K. M. *et al.* Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.16, p.7001-7005, 1991.
90. STOKER, M. *et al.* Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. **Nature**, v.327, n.6119, p.239-242, 1987.
91. LORENZATO, A. *et al.* Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. **Cancer Res**, v.62, n.23, p.7025-7030, 2002.
92. PARK, W. S. *et al.* Somatic mutations in the kinase domain of the Met/hepatocyte growth factor receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. **Cancer Res**, v.59, n.2, p.307-310, 1999.
93. GALLEGGO, M. I., BIERIE, B. e HENNIGHAUSEN, L. Targeted expression of HGF/SF in mouse mammary epithelium leads to metastatic adenosquamous carcinomas through the activation of multiple signal transduction pathways. **Oncogene**, v.22, n.52, p.8498-8508, 2003.
94. RONG, S. *et al.* Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.11, p.4731-4735, 1994.
95. FERRACINI, R. *et al.* The Met/HGF receptor is over-expressed in human osteosarcomas and is activated by either a paracrine or an autocrine circuit. **Oncogene**, v.10, n.4, p.739-749, 1995.
96. Retrogenic expression of the MET proto-oncogene correlates with the invasive phenotype of human rhabdomyosarcomas. **Oncogene**, v.12, n.8, p.1697-1705, 1996.
97. JANDA, E. *et al.* Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. **J Cell Biol**, v.156, n.2, p.299-313, 2002.

98. GRUNERT, S., JECHLINGER, M. e BEUG, H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.4, n.8, p.657-665, 2003.
99. DIETRICH, S. *et al.* The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. **Development**, v.126, n.8, p.1621-1629, 1999.
100. SAVAGNER, P., YAMADA, K. M. e THIERY, J. P. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Biol**, v.137, n.6, p.1403-1419, 1997.
101. ANDERMARCHER, E., SURANI, M. A. e GHERARDI, E. Co-expression of the HGF/SF and c-met genes during early mouse embryogenesis precedes reciprocal expression in adjacent tissues during organogenesis. **Dev Genet**, v.18, n.3, p.254-266, 1996.
102. TAKAYAMA, H. *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor as a regulator of skeletal muscle and neural crest development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.12, p.5866-5871, 1996.
103. OTSUKA, T. *et al.* c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype. **Cancer Res**, v.58, n.22, p.5157-5167, 1998.
104. CRUZ, J. *et al.* Expression of c-met tyrosine kinase receptor is biologically and prognostically relevant for primary cutaneous malignant melanomas. **Oncology**, v.65, n.1, p.72-82, 2003.
105. NATALI, P. G. *et al.* Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression. **Br J Cancer**, v.68, n.4, p.746-750, 1993.
106. MENDEZ-FERRER, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v.466, n.7308, p.829-834, 2010.
107. TREVINO-VILLARREAL, J. H. *et al.* Host-derived pericytes and Sca-1+ cells predominate in the MART-1- stroma fraction of experimentally induced melanoma. **J Histochem Cytochem**, v.59, n.12, p.1060-1075, 2011.

-
108. HARTMANN, G. *et al.* Engineered mutants of HGF/SF with reduced binding to heparan sulphate proteoglycans, decreased clearance and enhanced activity in vivo. **Curr Biol**, v.8, n.3, p.125-134, 1998.
109. TSUJI, T. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. **Cancer Res**, v.68, n.24, p.10377-10386, 2008.
110. SPAETH, E. *et al.* Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. **Gene Ther**, v.15, n.10, p.730-738, 2008.
111. SAKR, W. A. *et al.* The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. **J Urol**, v.150, n.2 Pt 1, p.379-385, 1993.
112. NIELSEN, M. *et al.* Breast cancer and atypia among young and middle-aged women: a study of 110 medicolegal autopsies. **Br J Cancer**, v.56, n.6, p.814-819, 1987.
113. NGUYEN, L. V. *et al.* Cancer stem cells: an evolving concept. **Nat Rev Cancer**, v.12, n.2, p.133-143, 2012.
114. MANI, S. A. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v.133, n.4, p.704-715, 2008.
115. AHMED, N. *et al.* Epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like phenotypes facilitate chemoresistance in recurrent ovarian cancer. **Curr Cancer Drug Targets**, v.10, n.3, p.268-278, 2010.
116. KONG, D. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition is mechanistically linked with stem cell signatures in prostate cancer cells. **Plos One**, v.5, n.8, p.e12445, 2010.
117. KURREY, N. K. *et al.* Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. **Stem Cells**, v.27, n.9, p.2059-2068, 2009.
118. VERMEULEN, L. *et al.* Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. **Nat Cell Biol**, v.12, n.5, p.468-476, 2010.

Anexos

6. ANEXOS

ANEXO A: Marcação por imunofluorescência de E-caderina em células B16 e MO-MSCs não permeabilizadas.

A figura acima demonstra a marcação por imunofluorescência utilizando um anticorpo monoclonal contra a porção extracelular da E-caderina. As amostras não foram permeabilizadas para impedir a marcação de moléculas intracelulares. Conforme demonstrado na figura, a incubação com mc/MSCs não reduziu a quantidade de E-caderina na membrana plasmática das células B16. MO-MSCs, as quais não expressam E-caderina, foram utilizadas como controle da especificidade do anticorpo primário.

ANEXO B: Pigmentação das células B16 cultivadas em meio condicionado de MO-MSCs e em meio não condicionado.

Após cultivo em mc/MSCs, as células de melanoma apresentaram uma redução evidente na produção de melanina (amostras à direita).