Kelly Pedrozo Ferreira

**Caracterização da expressão de CD63 e KAI/CD82 em células
de câncer de vulva metastático e não metastático**

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

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Dra. Kátia Cândido Carvalho

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Kelly Pedrozo

Caracterização da expressão de CD63 e KAI/CD82 em células de câncer de vulva metastático e não metastático / Kelly Pedrozo Ferreira. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas
2.Neoplasias vulvares 3.Tetraspanina 30 4.Proteína kangai-1 5.Técnicas de cultura de células
6.Interferência de RNA

USP/FM/DBD-446/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por sua grande misericórdia e amor, por ter me concedido oportunidades e pelos anjos que colocou em meu caminho e que me acostumei a chamar de pai, mãe e marido, porque me apoiaram com muito carinho e não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Katia Cândido Carvalho**, minha orientadora, agradeço pela principalmente pela confiança que depositou em mim desde o começo dessa jornada. Agradeço por ter sido muitas vezes compreensiva, pelos ensinamentos científicos (prático e teórico) e pela paciência. Obrigada por entregar em minhas mãos uma missão tão bonita quanto essa, pesquisar métodos para tornar melhor a vida de muitas mulheres.

Agradeço aos **Professores Dr. Edmund Chada Baracat e Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel** por terem aberto as portas do laboratório de Ginecologia – LIM 58 e por terem me concedido a oportunidade de fazer parte desta grande família. Agradeço por todo suporte e incentivo em continuar a caminhada da pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha**, pela gentileza em ceder as células de carcinoma de vulva para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Dr. Antônio Augusto Rocha**, pela conduta e suporte científico com os protocolos de extração proteica e transfecção com RNAi, e por todas as vezes que, com muita paciência, respondeu a todos os meus questionamentos.

À **Dra. Mara Hoshida**, e aos funcionários do Laboratório de Fisiologia Obstétrica – LIM57, **Salete, Cristiane e Isaías**, pelo consentimento na utilização do laboratório de cultura celular, enquanto nosso laboratório estava em reforma.

Agradeço ao grande amigo, padrinho de casamento e padrinho científico, **Leonardo Tomiatti da Costa**, pelos anos de amizade, respeito, carinho e consideração que teve por mim quando me indicou para trabalhar no LIM58. Pela

leveza com que leva vida, me ajudando e ensinando diariamente como ser mais doce.

À querida amiga, **Natalia Garcia**, pela amizade sincera que construímos em tão pouco tempo, mas que me passa a sensação de ser algo de infância. Agradeço pelo companheirismo dentro do laboratório, pelas risadas, conversas, pelo suporte, incentivo e guia dentro da ciência. Agradeço por ser ter sido tão presente (mesmo longe). Pelos ensinamentos teóricos e técnicos. Agradeço pela ajuda com as análises estatísticas. E pelo amor que possui pela ciência.

Agradeço também aos alunos, profissionais e grandes amigos do Laboratório de Ginecologia - LIM58 que de várias maneiras auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, obrigada **Juciara da Costa Silva, Marinalva Almeida, Thiago Hideki, Henderson Narciso, Isabela Faria, Dara Ferreira, Denise Ferreira, Aline Aranha, Laura dos Anjos, Luísa Pimenta, Giulia Araújo, Giovana Maffaziolli, Rodrigo Marcondes**. Em especial, **Anamaria Ricci** e **Bruna Almeida** pelo carinho que tem por mim, e pelos momentos de descontração.

Agradeço à **Deus**, por todas as bênçãos, e por mais esta vitória. Pela saúde, por ter me sustentado de pé, pelo amor ao ensino, pela ciência e pela vida.

Ao meu avô **Abdias Raimundo** (*In memoriam*), que deixou muita saudade, agradeço por tudo, mas principalmente pelos ensinamentos, dentre esses, a importância de amar (muito) ao próximo, pois a vida é frágil.

Agradeço aos meus pais, **Adimilson Pedrozo** e **Sandra Pedrozo**, por tudo, mas também pelas orações, pelo amor, pelo carinho, pelo colo e por terem me ensinado a distinguir o certo e o errado.

Ao meu marido, **Hermes Ferreira de Almeida**, agradeço por tudo, mas também pelo respeito, compreensão, pelas orações, os abraços, o companheirismo, o incentivo. Agradeço por sempre me fazer acreditar que sou capaz de alcançar meus sonhos e objetivos.

Aos meus sogros, **Agenor Ferreira e Jeanete Ferreira**, pela amizade e por estarem sempre presentes em minha vida, tendo me acolhido em sua família como uma filha.

Ao meu sobrinho **Pedro Ferreira**, pelos seus lindos olhos e jeitinho único de me amar, sem limites, sem maldade, com muito respeito e ingenuidade. Por me fazer recordar como é bom ser criança.

Aos meus amigos de infância, que foram tão importantes em toda minha formação. Em especial, **Aline Nascimento e Pâmela Pontelli**, duas mulheres e profissionais maravilhosas.

Aos amigos e companheiros que a vida colocou em meu caminho, que estiveram presentes em minha vida, muito obrigada **Adriana Almeida, Eduardo Almeida e Lucas Pires**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pela bolsa de pós-graduação concedida e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pelo auxílio financeiro (2012/17120-6 e 2015/21068-8).

Muito obrigada.

*“Palavras são, na minha nada humilde
opinião, nossa inesgotável fonte de
magia. Capazes de causar grandes
sofrimentos e também de remediá-los.”*

*(Alvo Dumbledore – Harry Potter e as
Relíquias da Morte)*

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	18
2.1.	Geral	18
2.2.	Específicos	18
3.	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1.	Linhagens celulares e condições de cultivo	20
3.2.	Manutenção das linhagens em cultivo	21
3.3.	Congelamento celular e armazenamento das células	21
3.4.	Autenticação das linhagens celulares	22
3.5.	Extração de RNA total pelo método de <i>Trizol</i> ®	22
3.6.	Extração de RNA total - <i>PureLink</i> ® RNA mini kit (Ambion®)	23
3.7.	Síntese do DNA complementar	23
3.8.	PCR quantitativo em tempo real (<i>qRT PCR</i>)	24
3.9.	Extração e quantificação de proteínas	24
3.10.	<i>SDS-PAGE</i> e <i>Western Blot</i> (WB)	25
3.11.	Transfecção das células com o RNA de interferência	27
3.12.	Imunocitoquímica (ICQ)	29
3.13.	Ensaio de proliferação celular	31
3.14.	Ensaio de migração celular	32

3.15.	Análise Estatística	33
4.	RESULTADOS	35
5.	DISCUSSÃO	50
6.	CONCLUSÕES	58
7.	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Composição anatômica da vulva	1
Figura 2 -	Tipos de cirurgia (vulvectomy parcial ou total) utilizados no tratamento de pacientes com diagnóstico de câncer de vulva	6
Figura 3 -	Representação esquemática de uma tetraspanina	11
Figura 4 -	Fotomicrografias representativas das linhagens celulares de carcinoma vulvar de células escamosas (CECV) não metastático (SW954) e metastático (SW962), utilizadas neste trabalho	35
Figura 5 -	Perfil de migração eletroforética do material genético obtido das linhagens celulares em géis de agarose (1%), impregnados com brometo de etídeo. Em A , RNA total extraído das células de CECV não metastático e metastático, respectivamente. As bandas de 28S, 18S e 5S estão indicadas. Em B , perfil de migração dos produtos de PCR das amostras de cDNA sintetizadas a partir de 2 µg do RNA total de cada uma das linhagens. Padrão, padrão de peso molecular. A seta indica o tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb)	37
Figura 6 -	Expressão relativa (<i>RQ</i>) dos transcritos para os genes <i>CD63</i> e <i>KAI1/CD82</i> nas linhagens de células metastáticas, em relação às células não metastáticas. Os asteriscos indicam <i>p</i> valor significativo (<0.05)	39

- Figura 7 -** *Western Blot* realizado com as frações precipitado (Prec) e sobrenadante (Sob) dos extratos proteicos obtidos das linhagens celulares, utilizando anticorpo específico para CD63 40
- Figura 8 -** Expressão relativa, expressa em porcentagem (%), de CD63, em células de CECV não metastático após 24, 48 e 72 horas da transfecção. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). O asterisco indica significância estatística com $p < 0.05$. O grupo Controle Celular foi utilizado como referência 43
- Figura 9 -** Expressão relativa, expressa em porcentagem (%), de CD63, em células de CECV metastático após 24, 48 e 72 horas da transfecção. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). O asterisco indica significância estatística com $p < 0.05$. O grupo Controle Celular foi utilizado como referência 43
- Figura 10 -** Fotomicrografias representativas das reações de imunocitoquímica (ICQ) para avaliação qualitativa da presença de CD63 em células de CECV não metastático e metastático, nos grupos: Controle Celular (sem tratamento), Controle siRNA (EGFP) e tratado com siRNA CD63. Barra equivalente à 100 px de resolução. As fotos em destaque apresentam as células em maior aumento (1000X) 44
- Figura 11 -** Curvas de proliferação das células de CECV não metastática (NM) e metastática (M) antes e após inibição de CD63 por siRNA. Em **A**, os gráficos apresentam os perfis de proliferação das linhagens celulares: sem tratamento - Controle Celular, Controle da Lipofectamina, células tratadas com Controle do siRNA (EGFP) e com siRNA para CD63; Em **B**, gráfico em coluna apresentando a

comparação entre os perfis proliferativos das células tratadas com siRNA *CD63* e não tratadas. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). Os asteriscos indicam valores de *p* significativos. O grupo sem tratamento (Controle Celular) foi utilizado como referência 46

Figura 12 - Ensaio de migração (*wound healing*) das células de CECV não metastática (NM) e metastática (M) antes e após inibição de *CD63* por siRNA. Em **A**, fotomicrografias das linhagens de células nos tempos de 0, 24 ou 48 horas de migração. Foram avaliadas as células crescidas somente em meio - Controle Celular, Controle da Lipofectamina, o Controle do siRNA (EGFP) e o siRNA para *CD63*. Em **B**, gráficos apresentando os cálculos de área migrada com base nas fotomicrografias, utilizando o software *Image J*. Em **C**, gráfico de colunas comparando os perfis migratórios dos grupos tratado com siRNA *CD63* e não tratado. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). O asterisco indica valor de *p* significativo. O grupo sem tratamento (Controle Celular) foi utilizado como referência 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estadiamento da FIGO para o câncer de vulva	4
Tabela 2 -	Estadiamento TNM para o câncer de vulva	5
Tabela 3 -	Quantidade dos reagentes utilizados nos ensaios de RNAi por modelo de placa (Adaptado de <i>Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol</i> 2013)	28
Tabela 4 -	Perfil genético dos alelos de marcadores baseados em regiões curtas de repetição (<i>STRs</i>) obtidos para as linhagens celulares SW954 (CECV não metastático) e SW962 (CECV metastático)	36
Tabela 5 -	Valores da estabilidade dos genes endógenos testados para a seleção do gene normalizador das reações de <i>qRT-PCR</i> . Análises pelo programa <i>NormFinder</i> . Seta indicativa do gene normalizador mais estável (<i>B2M-HUM</i>)	38
Tabela 6 -	Identificação, natureza e finalidade dos controles utilizados nos ensaios de RNA interferente	41
Tabela 7 -	Porcentagem de células positivas para CD63 nas reações de ICQ	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(M)	Metastático
(NM)	Não metastático
±DP	Desvio padrão
≈	Aproximado
°C	Grau Celsius
μg	Micro grama
μL	Micro litro
μM	Micro molar
μm	Micrometro
A	Ampere
Akt	<i>Protein kinase B</i>
AMEL	Amelogenina
ATCC	<i>American type culture collection</i>
B2M	<i>Beta-2-microglobulin</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD63	<i>Cluster of differentiation 63</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1^a</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	DNA complementar
CEC	Carcinoma de células escamosas
CECV	Carcinoma de células escamosas

cm	Centímetro
CO₂	Gás carbônico
C_T	<i>Cycle Threshold</i>
DAB	3,3' Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóido
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i>
dsRNA	<i>Double stranded RNA</i>
dVIN	Neoplasia intraepitelial vulvar diferenciada
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ERK	<i>Extracellular regulated MAP kinase</i>
esiRNA	<i>Endoribonuclease-prepared small interfering RNA</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBXW7	<i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>
FIGO	Federação internacional de ginecologia e obstetrícia
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Grama
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFR	<i>Growth factor receptor</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCM/HCMGV	Citomegalo virus humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPRT	<i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
HPV	Papiloma vírus humano

HPV+	HPV positivo
hrHPV	HPV de alto risco
ICQ	Imunocitoquímica
KAI1/CD82	<i>Kang ai 1 / cluster of differentiation</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
M	<i>Molar</i>
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligrama
miR -	MicroRNA
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MT1-MMP	<i>Matrix metalloproteinase 14</i>
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIV	Neoplasia intraepitelial vulvar
nm	Nanometro
NOS2	<i>Nitric oxide synthase 2</i>
pb	Par de base
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIK3CA/PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase subunits</i>
pRb	Proteína do retinoblastoma

Prec	Precipitado
px	Pixel
qRT PCR	<i>Quantitative real time PCR</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	RNA de interferência
RPM	Rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RQ	<i>Relative quantification</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	<i>Serine</i>
SFB	Soro fetal bovino
Sob	Sobrenadante
STK11	<i>Serine/threonine kinase 11</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TIMP-1	<i>Tissue inhibitor metalloproteinase-1</i>
TNM	Tumor, linfonodo e metástase
TSPAN	Tetraspanina/Tetraspanin
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
VSCC	<i>Vulvar squamous cell carcinoma</i>
WB	<i>Western blot</i>

Ferreira KP. *Caracterização da expressão de CD63 e KAI1/CD82 em células de câncer de vulva metastático e não metastático* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O carcinoma de células escamosas de vulva (CECV) corresponde a cerca de 95% dos tumores vulvares. Apresenta bom prognóstico quando diagnosticado precocemente. O tratamento cirúrgico, embora eficaz, pode ser mutilante e acarreta em sérios danos psicossociais para as pacientes. Embora algumas pesquisas sobre os mecanismos que determinam os comportamentos clínico e biológico dos CECV tenham sido realizadas, ainda há muito a ser investigado. As tetraspaninas (TSPANs) são proteínas de membrana que interagem com diversas moléculas e estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos como proliferação e migração celular. Vários estudos associam sua expressão desregulada ao desenvolvimento de cânceres. Resultados anteriores de nosso grupo mostraram maior expressão de CD63 em amostras de pacientes com CECV, e menor expressão de KAI1/CD82, em relação ao tecido normal adjacente. Porém, seu papel nesses tumores permanece incerto. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os perfis de expressão gênica e proteica de CD63 e KAI1/CD82, bem como avaliar os efeitos de sua manipulação genética no comportamento de células de CECV metastático e não metastático. As linhagens utilizadas neste trabalho foram SW954 (ATCC® HTB-117™, não metastática) e SW962 (ATCC® HTB-118™, metastática). Os ensaios de *qRT PCR* mostraram maior expressão de *CD63*, e menor de *KAI1/CD82*, nas células metastáticas, em relação as não metastáticas. Assim, optou-se pela manipulação transiente somente de *CD63* por RNA interferente (RNAi). Os resultados mostraram efeitos significativos de inibição de expressão gênica e

proteica de CD63 em ambas linhagens, por *qRT PCR* e imunocitoquímica (ICQ), respectivamente, porém, a inibição da TSPAN foi mais proeminente nas células metastáticas. A deleção da tetraspanina acarretou em redução significativa da proliferação das células não metastáticas ($*p<0.05$) e metastáticas ($**p=0.0022$), bem como na migração das células metastáticas ($*p<0.05$). Assim sendo, os resultados apontam CD63 com relevante papel nos CECV, uma vez que sua inibição compromete a proliferação e capacidade de migração das células tumorais. Além disso, a perda de expressão do supressor de metástases KAI1/CD82 corrobora os dados para outros tipos de cânceres. Em conjunto, essas TSPAN, podem ser considerados não só importantes fatores prognósticos no CECV, mas potenciais alvos terapêuticos.

Descritores: carcinoma de células escamosas; neoplasias vulvares; tetraspanina 30; proteína kangai-1; técnicas de cultura de células; interferência de RNA.

Ferreira KP. *Characterization of CD63 and KAI1/CD82 expression profile in metastatic and non-metastatic vulvar cancer cells* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) accounts about 95% of vulvar tumors. When diagnosed at an early stage, prognosis is usually good. Although effective, surgical treatment can be mutilating and entails serious psychosocial damage to patients. Whilst molecular aspects in VSCCs have been investigated, mechanisms underlying the VSCC clinical and biological behavior are poorly understood. Tetraspanins (TSPANs) are membrane proteins, which can interact with several molecules. In addition, they are involved in physiological processes such as proliferation and migration. Besides that, several studies show the deregulated expression of TSPANs associated with cancer development. Previous results of our group showed higher expression of CD63, and lower expression of KAI1/CD82, in VSCC patient samples, compared to adjacent normal tissue. However, the role of these proteins in vulvar tumors remains uncertain. Thus, the aim of this work was to characterize CD63 and KAI1/CD82 gene and protein expression profile in VSCC metastatic and non-metastatic cell lines, and to investigate the effects of genetic manipulation on these cells behavior. The cell lines used in this work were SW954 (Non-metastatic) and SW962 (metastatic). The qRT PCR assays showed *CD63* overexpression and *KAI1/CD82* downexpression in the metastatic cells. Thus, we chose to perform transient manipulation of *CD63* by interfering RNA (RNAi). The RNAi assays showed significant inhibitory effects of gene and protein expression of CD63 in both cell lines, by qRT PCR and immunocytochemistry (ICC), respectively,

however, inhibition of TSPAN was more prominent in metastatic cells. When inhibited, *CD63* showed a significant decrease in proliferation of non-metastatic ($*p<0.05$) and metastatic cells ($**p=0.0022$), as well as migration of metastatic cells ($*p<0.05$). Therefore, the results point to *CD63* playing a relevant role in VSCC, since its inhibition compromises the proliferation and migration capacity of tumor cells. In addition, decrease in the expression of *KAI1/CD82* metastasis suppressor corroborates with other data in different types of cancers. Taken together, these TSPANs may be considered not only important prognostic factors in VSCC, but potential therapeutic targets.

Descriptors: carcinoma, squamous cell; vulvar neoplasms; tetraspanin 30; kangai-1 protein; cell culture techniques; RNA interference.

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A anatomia da parte externa da genitália feminina, também conhecida como vulva, compreende o introito vaginal (vestíbulo), lábios maiores (externos), lábios menores (internos), clitóris, períneo e glândulas de *Bertholin*. Ainda na vulva, está localizada a entrada para o canal da uretra, responsável pela condução da urina da bexiga ao meio externo (Figura 1) ^{1,2}.

Figura 1: Composição anatômica da vulva. Adaptado.

FONTE: Site educação.umcomo.com.br ³.

Dois grupos diferentes de dobras de pele envolvem a abertura vaginal. O conjunto interno, denominado lábios menores, apresentam tamanho reduzido e ausência de pelos. No conjunto externo, os lábios maiores, são maiores em tamanho e neles há crescimento de pelos na superfície. A função destes dois conjuntos de pele é proteger a entrada da vagina, bem como o canal da uretra. As glândulas de *Bertholin* estão localizadas (uma de cada lado)

imediatamente após a entrada da abertura vaginal, e sua finalidade é produzir muco para lubrificação da região durante o ato sexual ².

O prepúcio é uma pequena região identificada em frente ao introito vaginal, representado por uma capa de pele formada da união dos lábios menores. Logo abaixo ao prepúcio, encontra-se o clitóris, órgão de aproximadamente 1 cm, altamente sensível e irrigado por sangue durante a estimulação sexual. O espaço que compreende a área que distancia a vagina do ânus é chamado, períneo ².

Várias desordens podem acometer esse órgão feminino, dentre eles o carcinoma de vulva. Esses tumores representam uma rara neoplasia, abrangendo cerca de 5% dos tumores malignos do trato genital ¹, e menos de 1% das neoplasias em mulheres. Sua incidência estimada é de 1 a 2 casos por 100.000 mulheres ao ano ⁴. Devido ao fato de se tratar de um tumor raro, no Brasil ainda há grande dificuldade de acesso a informações sobre sua etiologia e frequência. O Instituto Nacional do Câncer (NCI) estima, 6.190 (0,4%) novos casos e 1.200 (0,2%) óbitos por câncer de vulva nos Estados Unidos em 2018 ⁵.

O carcinoma de vulva é um tumor maligno que atinge principalmente as bordas internas dos grandes ou pequenos lábios, mas que com menor frequência também pode acometer o clitóris, as glândulas de *Bertholin* ou até mesmo o períneo ^{1,2}.

Embora a porcentagem de sobrevida relativa das pacientes diagnosticadas com este tipo tumoral seja elevada (71%) ⁵, fatores como o tipo, estágio e localização do tumor, bem como a idade da paciente são considerados importantes para diagnóstico, uma vez que se relacionam diretamente com o agravamento dessa neoplasia. Dados do NCI indicaram que os melhores índices

de sobrevida relativa em 5 anos ocorrem nos casos de tumores localizados (sítio primário), com 86,3%, ou com localização indefinida/desconhecida (58,7%). Porém, os valores caem conforme a localização do tumor toma amplitude, sendo regional, quando atinge os linfonodos próximos (53,3%), ou distante/metástase (18,6%)⁵.

O carcinoma de vulva é considerado uma neoplasia de mulheres mais velhas. Embora o diagnóstico possa ser feito à uma mulher com menos de 20 anos (0,1%), a maior frequência ocorre em mulheres entre 65 e 74 anos de idade (22%). Além disso, dados indicam o agravamento da doença conforme a idade da paciente avança. Em mulheres com mais de 85 anos, a incidência de óbitos chega à 30%, enquanto que para aquelas com até 44 anos, os valores caem para 2 - 2,5%⁵.

Embora este tipo de tumor não apresente sinais e sintomas característicos, e que aproximadamente 10% das pacientes sejam assintomáticas⁵⁻⁷, entre os sintomas mais comuns pode-se incluir a presença de nódulos vermelhos, rosa ou branco, de superfície áspera ou rugosa, ardência, longo histórico de prurido, dor ao urinar ou no momento do ato sexual (dispareunia) e sangramento fora do período menstrual^{1,7,9,10}.

O tratamento das lesões e abrandamento do prurido são necessários para o alívio sintomático da paciente, bem como para evitar a progressão da doença. O diagnóstico do câncer de vulva é, na maioria das vezes, feito no estágio inicial da doença (*in situ*)^{5,6,11,12} e precisa ser confirmado por biópsia^{1,6,11} que, com auxílio da vulvoscopia, confirma ou não o diagnóstico de malignidade.

Atualmente, a terapia é determinada pelo médico com base na extensão da doença, recorrência ou primariedade do tumor, histórico médico e atual estado geral de saúde, bem como a opinião da paciente ¹. Outro fator importante para a escolha do tratamento individualizado, é o estadiamento proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). Ele considera critérios como o tamanho do tumor, invasão das estruturas perineais, comprometimento linfonodal e metástases à distância (TNM) ⁴. A Tabela 1 e 2 apresentam os estadiamentos propostos pela FIGO em 2015 para o carcinoma de vulva.

Tabela 1: Estadiamento da FIGO para o câncer de vulva ¹³.

ESTÁDIO	DESCRIÇÃO
I	Tumor confinado à vulva
IA	Lesão ≤ 2 cm, confinada à vulva ou períneo e com invasão estromal $\leq 1\text{mm}^*$, sem metástase linfonodal
IB	Lesão > 2 cm ou com invasão estromal $> 1\text{mm}^*$, confinada à vulva ou períneo, sem metástase linfonodal
II	Tumor de qualquer tamanho, com ou sem extensão a estruturas perineais adjacentes (terço inferior de uretra, terço inferior de vagina, ânus), sem metástase linfonodal
III	Tumor de qualquer tamanho, com ou sem estruturas perineais adjacentes (terço inferior de uretra, terço inferior de vagina, ânus), com metástase para linfonodos inguinofemorais
IIIA	(i) Com um linfonodo comprometido ($\geq 5\text{mm}$), ou (ii) Com um ou dois linfonodos comprometidos ($< 5\text{mm}$)
IIIB	(i) Com dois ou mais linfonodos comprometidos ($\geq 5\text{mm}$), ou (ii) Com três ou mais linfonodos comprometidos ($< 5\text{mm}$)
IIIC	Linfonodos comprometidos com extensão extracapsular

continua

continuação

ESTÁDIO	DESCRIÇÃO
IV	Tumor invade outras estruturas regionais (2/3 superiores da uretra, 2/3 superiores da vagina) ou estruturas distantes
IVA	Tumor invade qualquer das seguintes <ul style="list-style-type: none"> (i) Uretra superior e/ou mucosa vaginal, mucosa vesical, mucosa retal, ou fixo a ossos pélvicos ou (ii) Linfonodos inguinais fixos ou ulcerados
IVB	Quaisquer metástases a distância incluindo linfonodos pélvicos

Tabela 2: Estadiamento TNM para o câncer de vulva ¹³.

FIGO	T (Tumor)	N (Linfonodos)	M (Metástases)
I	T1	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
II	T2/T3	N0	M0
IIIA	T1, T2, T3	N1a, N1b	M0
IIIB	T1, T2, T3	N2a, N2b	M0
IIIC	T1, T2, T3	N2c	M0
IVA	T4	N0-N2	M0
IVB	Qualquer T	N3	M0

A cirurgia com retirada total do tumor é ainda hoje considerada “padrão ouro” no tratamento do câncer de vulva. Mesmo para tumores iniciais, preconiza-se a realização do procedimento cirúrgico. Para tumores avançados, além da remoção do tumor, o mais indicado é adicionar ao tratamento, quimioterapia ou radioterapia. O tratamento das lesões pré-neoplásicas, muitas vezes ocorre por terapia a laser ^{1,13}. Na década de 50, a vulvectomia radical, ou total, era o tratamento preferencial ^{6,7,9,14} para o tratamento do carcinoma

invasivo, com remoção do tumor primário e ampla margem de segurança, além da ressecção dos linfonodos inguinais e pélvicos. Porém, as complicações desse tipo de tratamento são diversas, desde pós-cirúrgicas até comprometimento de aspectos psicossociais das pacientes. Desse modo, atualmente opta-se, sempre que possível, por cirurgias mais conservadoras ¹⁰ (Figura 2).

Figura 2: Tipos de cirurgia (vulvotomia parcial ou total) utilizados no tratamento de pacientes com diagnóstico de câncer de vulva.

FONTE: Site vidasaudavel.one ¹⁵.

Tem se observado que, nos últimos anos, o carcinoma de vulva teve sua incidência aumentada tanto em mulheres mais velhas, acima dos 65 anos, como em mulheres mais jovens, abaixo dos 50 anos ¹⁶⁻¹⁹. Este aumento está relacionado, principalmente, à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e ao consumo excessivo de tabaco ^{20,21}. Ambos são cofatores reconhecidos para o desenvolvimento do carcinoma de vulva. Aparentemente, o tabagismo está associado ao risco aumentado devido as vias imunossupressoras ^{9,20}. Além da

infecção por HPV e do consumo exacerbado de tabaco, outros grupos de risco aumentado para o desenvolvimento desta neoplasia, incluem aspectos comportamentais, como higiene, aspectos reprodutivos, hormonais, genéticos, presença de outros cânceres genitais, tais como, cervical ou neoplasia intraepitelial cervical (NIC), histórico de verrugas genitais, estados de imunossupressão (infecção por HIV), presença de neoplasias intraepiteliais vulvares (NIV), doenças inflamatórias vulvares crônicas, como o líquen escleroso, ^{1,2,6,12,20,22} e idade avançada (devido à ocorrência de mutações no epitélio vulvar ao decorrer do processo de envelhecimento) ^{1,2,7,14}.

Ao que se refere à histologia, o tipo mais recorrente de carcinoma vulvar é o epidermóide, ou de células escamosas (CEC). Esse abrange 80-90% dos casos ^{1,4,13,23,25}, seguido pelos tipos: melanoma (4,8%), sarcoma (2,2%), basocelular (1,4%), glândulas de *Bertholin* (1,2%) e adenocarcinoma (0,6%) ^{1,4}. O carcinoma epidermóide tem início nas células escamosas, principal tipo de células presentes na pele. Dentro desse grupo existem outras três classificações ⁷, o mais comum de todos, carcinoma escamoso queratinizante ^{7,11,24}, que acomete frequentemente mulheres com mais de 50 anos (pós – menopausa), e pode estar associado a desordens inflamatórias ²², além de não estar associado com infecção por HPV. O tipo basalóide é um pouco mais comum entre mulheres mais jovens com histórico de infecção por HPV, e o menos comum, o carcinoma verrucóide, apresenta crescimento lento, e necessita confirmação de malignidade por exame de biópsia ².

Atualmente, sabe-se que existem duas vias etiológicas no desenvolvimento dos carcinomas de células escamosas vulvares (CECV) ²³. A primeira, via mais comum, apresenta uma lesão precursora neoplásica vulvar

intraepitelial diferenciada (*precursor lesion differentiated vulvar intraepithelial neoplasia – dVIN*) e ocorre geralmente na presença de líquen escleroso. A segunda, está diretamente relacionada com a infecção pelo papilomavírus humano de alto risco (hrHVP) e compreende 25-30% de todos os CECV ^{23,25}.

Ao contrário do que se tem para os carcinomas cervicais, pouco se sabe a respeito dos subtipos de HPV relacionados aos CECVs, e qual seu mecanismo de infecção no tecido. Nesse sentido, conhecer a prevalência de subtipos específicos de HPV nas diferentes variantes de carcinoma de vulva será um passo fundamental para o melhor entendimento desta neoplasia ^{22,23,26}. As últimas buscas na literatura, indicaram que os HPVs de alto risco mais comuns, associados com a infecção em CECV são dos tipos 16 e 33 ^{17,23,27}. Em um estudo de revisão sistemática e meta-análise para todo o Brasil, Peder e colaboradores ²⁷ em 2018, encontraram 102 casos de CECV associados à presença de HPV 16, e 57 casos associados ao HPV 33. Um grupo holandês encontrou dados semelhantes que indicaram uma frequência maior dos HPVs de alto risco 16 e 33, respectivamente, relacionados aos CECV ²³.

O principal fator de risco para o desenvolvimento dos CECV em mulheres abaixo dos 50 anos consiste no maior número de parceiros sexuais, aumentando as chances de infecção pelo HPV ⁸ que é facilitada por lesões na mucosa durante a relação sexual ^{6,22,23}. Em infecções causadas pelos HPVs de alto risco (oncogênicos) são expressas oncoproteínas E6 e E7, que induzem defeitos mitóticos, instabilidade genômica e interagem com as proteínas p53 e pRb, responsáveis pela supressão tumoral, regulando-as negativamente ^{22,28,29}. Além disso, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, tais como a pRb (proteína do retinoplastoma) e da via *CDKI* (p16, p21 e p27) mostraram

importante valor prognóstico, porém, sem associação com infecção por HPV^{17,18,30}.

Rodrigues e colaboradores³¹ em 2013, avaliaram entre outras coisas, a associação entre a presença do HPV e o CECV. Os autores inferem que, os tumores HPV+ apresentam melhor prognóstico e não sofrem transição epitélio-mesênquima. Além disso, apontam a β -catenina (proteína envolvida com adesão celular), como importante biomarcador para determinar o prognóstico no câncer de vulva, uma vez que a perda da expressão dessa proteína foi associada com menor sobrevida das pacientes.

Pesquisas têm sugerido a associação entre a expressão de genes como o *TP53*, *RB*, *TP16*, *TP21*, *TP27* e seus produtos, com o prognóstico de CECV^{17,18,30,32-36}. Zięba e colaboradores³⁷ em 2018, investigaram por sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequence* – *NGS*), 50 genes possivelmente relacionados ao desenvolvimento do câncer de vulva, incluindo *FBXW7*, *STK11*, *CDKN2A*, *TP53* e *PIK3CA*. Os genes mais comumente mutados foram o *TP53* (44%) seguido pelo *CDKN2A* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A*, *p16^{Ink4a}*) (23%), ambos denominados, supressores tumorais e importantes reguladores do ciclo celular. Outros trabalhos mostraram desarranjos cromossômicos e alterações na sequência de genes envolvidos com diversas funções celulares na patogênese desses tumores³⁸⁻⁴⁰.

Adicionalmente, sabe-se que eventos epigenéticos também podem estar relacionados ao desenvolvimento desses tumores. Nesse sentido, três trabalhos foram realizados avaliando a expressão de microRNAs (miRNAs) em carcinoma de vulva positivo e negativo para infecção por HPV. O primeiro encontrou forte correlação entre a desregulação de miRNAs e parâmetros

clinicopatológicos das pacientes, quando comparados com o tecido normal ⁴¹. Outro trabalho mostrou que a utilização de construções específicas (*sponges*) para a família *miR-17* (*miR-17*, *miR-20a*, *miR-20b*, *miR-93*, *miR-106a* e *miR-106b*), em cultura de células de CECV, foi capaz de inibir a expressão desses miRNAs oncogênicos, relevantes em cânceres como linfoma ⁴² e tumores sólidos ^{43,44}. O terceiro, também avaliou o perfil de expressão de miRNAs em células de CECV e identificou o *miR-590-5p* como potencialmente oncogênico ⁴⁵.

Embora diversas modificações moleculares tenham sido relatadas no âmbito dos carcinomas de vulva, como relatado anteriormente, até o momento não foram encontrados marcadores moleculares que possam ser aplicados na rotina clínica ou terapêutica. Do mesmo modo, ainda não há evidências de mutações ou desregulação na expressão de genes específicos que sirvam como ferramenta para o diagnóstico ou prognóstico dessas pacientes.

Nesse contexto, as tetraspaninas (TSPANs ou *TM4SF* – *transmembrane 4 superfamily*) são proteínas de membrana envolvidas em diversos processos fisiológicos, como diferenciação de tecidos, proliferação celular, adesão célula-matriz, migração celular, processos de fusão, ativação de vias de sinalização e invasão celular ⁴⁶⁻⁵⁰. Dentre outras funções que este grupo de proteínas pode exercer, podemos incluir também a modulação à resposta imune, que se dá por meio de interações com moléculas efetoras, podendo regular a proliferação de leucócitos, linfócitos T, apresentação de antígenos e produção de citocinas ⁵¹⁻⁵⁴. Desta forma, as TSPANs podem atuar de modo diferente sobre a imunidade contra doenças infecciosas, tais como aquelas provocadas por vírus, como o HPV, HIV, influenza, HCV entre outros ⁵⁵⁻⁵⁸.

A primeira caracterização de um membro da família das TSPAN (ME491/CD63) ocorreu em 1988 ⁵⁹. Porém, o surgimento da família em si, relacionado à estruturação das moléculas, ocorreu em 1990 ^{60,61}. A estrutura típica de uma tetraspanina consiste em quatro domínios transmembrânicos hidrofóbicos conservados, duas curvas (*loop*), sendo uma grande (*large extracellular loop – LEL or EC2*) e outra pequena (*small extracellular loop – SEL or EC1*) e duas caudas curtas e intracelulares (amino e carboxil) (Figura 3). Uma TSPAN apresenta tipicamente 200-300 amino ácidos e 4-8 cisteínas extracelulares conservadas ⁴⁷.

Figura 3: Representação esquemática de uma tetraspanina.

FONTE: Fénéant L, Levy S, Cocquerel L. 2014.

Em humanos, foram identificados 34 membros da família das TSPANs ⁶³. Essas proteínas são amplamente distribuídas e expressas em células e tecidos de organismos eucarióticos, sendo que algumas são consideradas onipresentes, ou seja, expressas em células e tecidos gerais, como é o caso do

CD9, CD63, CD81 e CD82, enquanto outras são expressas somente em tecidos específicos, como o CD37 e o CD53, expressos somente em células do sistema imunológico ^{64,65}.

Foi descrito que a adição de palmitatos aos resíduos de cisteínas (palmitoilação), possui uma influência crucial no que diz respeito à organização das TSPAN e moléculas vizinhas em “microdomínios enriquecidos com tetraspaninas” (*Tetraspanin-enriched microdomains – TEM*) ou também conhecida como “rede de tetraspaninas” (*tetraspanins web*) ^{48,66-68}. Estas estão constituídas na superfície celular, e consistem na associação de várias TSPAN a outros componentes como por exemplo, outras TSPAN, integrinas, proteínas da superfamília das imunoglobulinas (Igs), moléculas de MHC, receptores tirosina quinase e moléculas lipídicas ^{47-49,51,52,67,69-72}. Desse modo, pode-se incluir que essas proteínas desempenham importante papel como moléculas “organizadoras”.

Outra função desempenhada por estas moléculas é a de transportadoras intracelulares ⁶⁷, inclusive de organismos patogênicos. Dentro deste contexto, Protzel e colaboradores ⁷³ em 2008 viram uma possível correlação entre a diminuição da expressão de CD82 com a presença do HPV 16 em amostras de carcinoma de pênis. Estudo subsequente demonstrou *in vitro*, que alguns vírus, incluindo o HPV 16, não penetrariam nas células de modo convencional (via clatrin e caveolinas), sugerindo que tal fato ocorresse por intermédio dos microdomínios enriquecidos com TSPAN, os TEMs, utilizados como plataforma de entrada para o vírus ⁷⁴. Além desses estudos, Scheffer e colaboradores ⁷⁵ em 2014 revisaram pesquisas que indicavam CD63 e CD151 como moléculas envolvidas no processo de internalização dos HPVs 16, 18 e

31. Atualmente, já se sabe que o HPV 16, considerado o de maior potencial oncogênico dentre os HPVs ⁷⁶⁻⁷⁸, requer um combinado de diferentes receptores e proteínas acessórias como TSPAN ^{74,79,80}, integrinas ⁷⁹ e receptores do fator de crescimento (*Growth fator receptors – GFRs*) ⁸¹ para invadir a célula hospedeira. Nesta conjuntura, CD151 pode interagir com esses fatores ⁸² e mediar a entrada do vírus de modo independente de clatrin, caveolinas e dinaminas por via endocítica ^{75,79}. Após o processo de endocitose, os vírus são transportados por estruturas endossomais. Sabe-se que este tráfico pós-endocítico requer a presença de CD63 ⁸³. Um estudo publicado por um grupo da Alemanha verificou a relevância da região C-terminal de CD63 e CD151 no processo de internalização do HPV 16 e do Citomegalovírus humano (*HCMGV*). Os autores ressaltaram, que em suas análises, essa região específica mostrou-se particularmente importante no processo de invasão das células pelos vírus, tornando-a ferramenta útil na investigação da participação das diversas TSPANs em infecções virais ⁷⁸.

Algumas TSPANs (CD9, CD37, CD63, CD82, CD151) exercem sua função via interação com as integrinas, geralmente dentro do contexto dos TEMs ⁸⁴⁻⁸⁹. Essas interações, mediadas por integrinas, são importantes para o processo de adesão das células com a matriz extracelular (MEC) ⁹⁰ que está frequentemente desregulado na fisiologia do câncer.

As TSPANs aparecem frequentemente relacionadas com a presença do câncer. Alterações na expressão dessas moléculas (aumento ou diminuição) já foram observadas em diferentes tumores malignos. Além disso, alguns membros desta família já foram descritos apresentando propriedades indutoras

de malignidade (pró-metastáticas), enquanto outros foram relatados como supressores tumorais ⁹¹.

A expressão reduzida de CD9 e CD82 foi descrita em câncer de bexiga e esofágico, entre outros ⁹²⁻⁹⁵. Baixos níveis de CD63 foram observados em carcinoma do cólon com potencial metastático elevado e pior prognóstico ^{47,53,59,96}. No entanto, expressão aumentada de CD63 foi observada em pacientes com câncer de mama ⁹⁷, astrocitoma ⁹⁸ e melanoma ^{99,100}.

Com apresentação ambígua das alterações de expressão em diferentes tipos de carcinomas, o CD63 foi descrito originalmente como um supressor tumoral ¹⁰¹⁻¹⁰⁶. Porém, posteriormente identificou-se que essa tetraspanina pode agir como receptor para *TIMP-1* (*tissue inhibitor metalloproteinase – 1*) ¹⁰⁷, molécula que apresenta funções promotoras do estado metastático ¹⁰⁸.

O CD63 está localizado na região 12q13 em humanos e foi o primeiro membro da família das TSPANs a ser identificado e caracterizado. Esta molécula é capaz de realizar diversas interações, direta ou indiretamente, com diferentes tipos de proteínas, principalmente, integrinas ^{101,109-112}, outras tetraspaninas ^{72,102,113}, receptores de superfície ^{68,114,115}, quinases ¹¹², proteínas adaptadoras ¹¹⁶, entre outras proteínas, incluindo o antígeno L6 ¹¹⁷, sintenina-1 (*syntenin-1*) ¹¹⁸, *TIMP-1* ¹⁰⁶, H, K-ATPase ¹¹⁹ e *MT1-MMP* ¹²⁰. Além disso, seu envolvimento na sinalização, incluindo mecanismos de ativação das vias *PI3K* (*phosphoinositide 3-kinases*) ¹²¹, *ERK* (*extracellular signal-regulated kinases*) ^{107,122} e *β-catenin* ¹²³, pode indicar que a modulação por CD63 afeta as propriedades de células tumorais pró-metastáticas.

O CD82, também conhecido como KAI1 (*kang ai 1*), é outro membro da superfamília das TSPANs que está localizado na região 11p11.2 e codifica 267 aminoácidos¹²⁴. Foi descrito há mais de 20 anos e caracterizado como supressor de metástase em câncer de próstata, por ser capaz de suprimir apenas a formação de lesões metastáticas sem afetar o crescimento dos tumores primários¹²⁵. Com o avançar das pesquisas foi visto que o KAI1/CD82 suprime metástase em diversos tumores malignos sólidos além do de próstata^{125,126}, como no câncer de bexiga¹²⁷, gástrico^{128,129}, hepatocarcinoma^{130,131}, cólon^{126,132}, mama^{126,133}, laríngeo¹³⁴, tireóide¹³⁵, melanoma¹²⁶ e pancreático¹³⁶. Em resumo, em tumores malignos sólidos, a perda ou diminuição da expressão de CD82 está frequentemente associada a um pior prognóstico.

Miller e colaboradores¹³⁷ em 2018 compararam a proteína KAI1/CD82 selvagem com uma variante que sofreu *splicing* alternativo (processo que consiste na remoção dos íntrons, promovendo a junção dos éxons, porção codificadora do gene) em células de carcinoma mamário humano. Os resultados sugeriram que, além da perda da função supressora, o processo promoveu efeitos biológicos a favor da progressão e metástase nesses tumores.

Tendo em vista a importância dessas moléculas como fatores preditivos/prognósticos e de múltiplas evidências na participação da progressão e disseminação de diferentes tipos tumorais, pode-se inferir que as TSPANs são potenciais alvos para terapia no câncer^{138,139}. Em todo caso, apesar da grande diversidade na expressão das diferentes moléculas da família das TSPAN e de suas funções nos diferentes tipos de tumor¹³⁷, não foram encontrados trabalhos disponíveis na literatura reportando a expressão ou função das TSPANs no carcinoma de vulva.

Em projeto anterior de nosso grupo de pesquisa, foi avaliada a expressão gênica e proteica das TSPANs CD9, CD37, CD63, CD81 e CD82 em amostras de pacientes com CECV. Os resultados mostraram maior expressão de CD63 nas amostras tumorais, em relação ao tecido normal adjacente. Adicionalmente, significativa translocação nuclear dessa molécula foi observada em amostras HPV positivas. Assim, surgiu o interesse em avaliar o papel de CD63 em células de tumores de vulva metastáticos e não metastáticos, objetivando compreender melhor sua participação na patogenicidade desses tumores. Além disso, CD82, por ser um supressor de metástase muito bem estabelecido na literatura, também foi avaliado.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Caracterizar e comparar os perfis de expressão, gênica e proteica, das tetraspaninas CD63 e KAI1/CD82 em linhagens celulares de carcinoma vulvar metastático e não metastático. Adicionalmente, avaliar os efeitos da depleção transiente dessas moléculas no comportamento das células.

2.2. Específicos

- Caracterizar o perfil de expressão gênica de *CD63* e *CD82*, em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de vulva (CECV) metastático (SW962) e não metastático (SW954), por PCR quantitativo em tempo real (*qRT PCR*);
- Caracterizar o perfil de expressão proteica de *CD63* e *CD82*, nas linhagens de CECV metastático e não metastático, por *Western Blot* (*WB*);
- A partir dos resultados de expressão, realizar a inibição transiente do (s) gene (s) nas linhagens celulares, por RNA de interferência (RNAi);
- Avaliar os efeitos da inibição transiente (RNAi) do (s) gene (s) no comportamento das células.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens celulares e condições de cultivo

Para a realização dos ensaios *in vitro* foram utilizadas duas linhagens de celulares. A primeira, SW954 [SW-954, SW954] (ATCC® HTB-117™), linhagem celular oriunda do tecido epitelial de vulva de uma mulher caucasiana com diagnóstico de carcinoma de células escamosas, grau II. A segunda, SW962 [SW 962, SW-962] (ATCC® HTB-118™), linhagem celular de carcinoma de vulva com morfologia mista, derivada de metástase dos linfonodos.

Para o cultivo de ambas linhagens celulares, o meio de cultura completo foi composto por meio RPMI - *Roswell Park Memorial Institute* - 1640 (Vitrocell, Embriolife), suplementado com 2 gramas de bicarbonato de sódio NaHCO_3 (Sigma) por litro (pH próximo à 7,6), 10% de Soro Fetal Bovino – SFB (Invitrogen) inativado à 56°C e antibiótico (ampicilina/streptomicina/anfotericina β) (100 X - Gibco® - Life Technologies), seguindo a proporção, 1:1000.

Para o processo de repique celular, foi utilizado o reagente de dissociação celular, Tripsina-EDTA (10X) (Gibco™), diluído 1X em meio de cultura RPMI 1640, não suplementado. Antes da tripsinização, as células foram lavadas com PBS 1X - *Phosphate-buffered saline* (Sigma-Aldrich®) na intenção de reduzir a presença dos componentes do SFB.

As duas linhagens celulares foram mantidas em nitrogênio líquido até o momento do descongelamento para o cultivo. Para tanto, um tubo criogênico (*vial*) de cada linhagem foi retirado do tambor de nitrogênio e imerso imediatamente em banho maria à 37°C, onde permaneceu por aproximadamente 1 minuto. Sem que houvesse o descongelamento total das células, elas foram

invertidas em garrafas para cultivo de 75 cm², contendo 20 mL de meio de cultura completo. Foram homogeneizadas delicadamente e dispostas em incubadora úmida (Thermo Fisher Scientific), a 37°C com atmosfera de 5% de dióxido de carbono – CO₂. Após 24 horas de incubação, o meio das garrafas (contendo DMSO) foi trocado por 20 mL de meio completo.

3.2. Manutenção das linhagens em cultivo

As células de ambas linhagens foram crescidas durante todos experimentos em garrafas de 75 cm², com meio completo, exceto para os experimentos de RNAi (sem antibióticos) a 37°C e 5% CO₂, em incubadora úmida. As passagens das células de uma garrafa para a outra, ou seja, o repique, foi realizado toda vez que a confluência da monocamada celular atingia 80% ou mais.

3.3. Congelamento celular e armazenamento das células

Para o congelamento das células, utilizamos meio próprio preparado com 20% de Dimetilsulfóido - DMSO em SFB. Na concentração aproximada de 1.000.000 células (10⁶) por mL e viabilidade > 90%, foi realizado o congelamento de modo gradual, o seja, os criotubos foram mantidos à temperatura de -20°C, por até 3 dias, depois, em -80°C, por mais 3 dias, e por último, em nitrogênio líquido, por tempo indeterminado.

3.4. Autenticação das linhagens celulares

Antes de dar início a cada ciclo de experimentos, foi realizado um ensaio específico de autenticação, por perfil genético, de cada uma das linhagens utilizadas, afim de excluir uma possível contaminação cruzada (intercelular). O ensaio consiste em comparar o perfil genético de cada linhagem em questão, com o perfil disponibilizado em banco de dados (*American Type Culture Collection* – ATCC). Para esta finalidade, foi adquirido o *kit GenePrint 10 System* (Promega) que permite a autenticação das células através da obtenção do perfil de *Short Tandem Repeats* (STRs). As reações identificam 10 marcadores, a saber: *Amelogenin*, *CSF1PO*, *D21S11*, *D5S818*, *D7S820*, *D13S317*, *D16S539*, *TH01*, *TPOx* e *vWA*. As reações foram seguidas conforme instruções do fabricante. Para a reação em cadeia da polimerase (PCR), foi utilizado equipamento *Veriti Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific), enquanto que as análises dos fragmentos STRs foram realizadas em sequenciador genético *ABI 3500 Genetic Analyser* (Applied Biosystems), previamente calibrado com matriz padrão *PowerPlex® 4C Matrix Standard* (Promega).

Os resultados obtidos nas análises dos DNAs, foram comparados com os perfis disponíveis no banco de dados da empresa ATCC®¹⁴⁰.

3.5. Extração de RNA total pelo método do *Trizol®* (Life Technologies)

O RNA (*ribonucleic acid*) total das células foi extraído pelo método de *Trizol®* (Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante. Os RNAs obtidos das células foram avaliados nos aspectos de quantidade e pureza das amostras em espectrofotômetro do tipo *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific). A

qualidade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os RNAs foram armazenados em *freezer* -80°C.

3.6. Extração de RNA total com o *PureLink® RNA Mini Kit* (Ambion®)

Para as células em monocamada ($\leq 5 \times 10^6$) o RNA total das células cultivadas foi extraído com auxílio do *PureLink® RNA Mini Kit* (Ambion® - Life Technologies™), seguindo as instruções do fabricante. Os RNAs obtidos foram avaliados nos aspectos de quantidade e pureza das amostras, pelo aparelho de espectrofotometria tipo *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific). A qualidade das amostras foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os RNAs foram armazenados em *freezer* -80°C.

3.7. Síntese do DNA complementar

Para a avaliação da expressão dos transcritos, fez-se necessária, primeiramente, a transcrição reversa da fita simples do RNA total, previamente extraído das células cultivadas. Para tanto, com o objetivo de sintetizar o DNA (*desoxirribonucleic acid*) complementar (cDNA), foi utilizado o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante a partir de 1 ou 2 µg de RNA total. A eficiência da síntese, e a presença de uma possível contaminação por DNA genômico, foram avaliados por PCR convencional, utilizando iniciadores específicos para o gene endógeno *GAPDH* (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), seguida por eletroforese em gel de agarose a 2%. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

3.8. PCR quantitativo em tempo real (*qRT PCR*)

As reações de qRT-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*) foram corridas em aparelho 7500 *HT Real-Time PCR System* (Life Technologies). Os ensaios foram realizados utilizando o sistema de detecção por sondas fluorescentes *TaqMan* (Life Technologies), seguindo as instruções do fabricante. Como iniciadores da reação de polimerização foram utilizados *assays* (conjunto de iniciadores e sondas), inventariados pela Life Technologies do Brasil, para os genes alvos *CD63* (Hs 00156390_m1) e *CD82* (Hs 00356310_m1). Como controles endógenos foram testados os genes *β -actina* (Hs 99999903_m1), *β -2-microglobulin – B2M* (Hs 99999907_m1), *GAPDH* (Hs 99999905_m1) e *hipoxantina – guanina fosforibosil transferase – HPRT* (Hs 99999909_m1). O endógeno normalizador testado, tido como mais adequado para nossas análises de qRT-PCR foi o *B2M*, escolhido com o auxílio do *software* algoritmo *NormFinder*. A quantificação dos transcritos foi realizada pelo método DDCT, utilizando os programas *SDS 3.0* e *RQ manager LV2.0.6*.

3.9. Extração e quantificação de proteínas

Para as análises das proteínas *CD63* e *CD82*, foi realizado um protocolo de extração capaz de separar as proteínas totais em: 1) proteínas de membrana (precipitado) e 2) proteínas citoplasmáticas e nucleares (sobrenadante). Para isso, quantidade suficiente de tampão de extração (PBS; Triton 0,5%; EDTA 20 mM) foi adicionado ao grumo de células, homogeneizado vigorosamente, até que todo o conteúdo estivesse completamente misturado, e centrifugado à 13.000 rpm por 3 minutos em temperatura ambiente. Esta etapa tornou possível a separação das frações desejadas (sobrenadante e

precipitado). À cada uma das frações foram adicionados $\approx 400 \mu\text{L}$ de tampão de amostra (Tris 0,065 M; Glicerol 10%; SDS 2%; Azul de Bromofenol 0,002%; β -mercaptoetanol 2%, pH 6,8). Em bloco seco com temperatura aproximada à 97°C , as amostras foram mantidas por 3 minutos e posteriormente, homogeneizadas em *Vortex®* durante 1 minuto. Este mesmo processo se repetiu por mais 6X, porém com o tempo reduzido para 1 minuto de fervura (97°C), afim de eliminar a presença de DNA genômico.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de *Bradford - Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro *Bio-Tek Synergy™ HT*, em comprimento de onda de 595 nm.

3.10. SDS-PAGE e Western Blot (WB)

O SDS-PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), ou eletroforese com detergente (SDS- *Sodium Dodecyl Sulfate*), foi realizado segundo descrito por Laemmli ¹⁴¹ em 1970. Um gel de empilhamento contendo 4% de bisacrilamida/acrilamida, 312,5 μL de Tris 1M (pH 6,8) e 12,5 μL de SDS 20%, e um gel de separação contendo 12% de bisacrilamida/acrilamida em 1,25 mL de Tris 1,5 M (pH 8,8) e 25 μL de SDS 20%, foram utilizados para a discriminação proteica das amostras previamente extraídas.

Ao todo, 30 μg de cada amostra foram aplicadas aos géis. Em quantidade suficiente do tampão de corrida 1X (14,4 g Glicina; 3 g Tris; 1 g SDS, para 1 litro de água destilada), a eletroforese foi realizada em 110 volts, por aproximadamente 2 horas. Ao final do processo, o gel foi imerso em solução

corante (50 mg *Coomassie blue R-250*, 50 mL metanol, 10 mL ácido acético, 40 mL água destilada) para avaliação do perfil proteico.

Para seguir com a técnica de *Western Blot*, possibilitando detecção por anticorpos específicos para a pesquisa das tetraspaninas CD63 e KAI1/CD82, as proteínas dos géis foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham™ Protran™ Premium 0.45 µm NC – Ge Healthcare Life science). Para tal procedimento, foi utilizado sistema para transferência *mini Protean Trans Blot* (Bio-Rad). Antes da montagem do sistema para transferência das proteínas, todos os componentes do sistema (filtros, membrana, esponjas e gel) foram incubados em tampão de transferência 1X (14,4 g Glicina; 3 g Tris; 20% Metanol, para 1 litro de solução) por 5 minutos, fazendo com que todo o sistema estivesse em equilíbrio. A transferência ocorreu a 0,25 A por 1 hora. Ao final, a membrana foi corada com *Ponceau* (0,1% *ponceau red* e 10% ácido acético) para verificação da eficiência do processo de transferência. Em seguida a membrana de nitrocelulose foi lavada com água destilada em abundância.

O bloqueio de sítios inespecíficos na membrana foi realizado com a adição de leite desnatado (Molico) à 5% diluído em PBS 1X + *Tween* 1%. A incubação ocorreu por 1 hora, sob agitação constante em temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados foram anti-CD63 de camundongo (MA1-19281, Thermo Fisher Scientific) e anti-CD82 de camundongo (NCL-CD82, Novocastra™ Leica Biosystems), ambos diluídos a 1:1000 em leite desnatado (Molico) 2% em PBS 1X + *Tween* 1%. As membranas permaneceram incubadas com os anticorpos primários por toda noite (≈16 horas), a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X + *Tween* 1%, com agitação constante, por 10 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo secundário

anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase (W402B, Promega) foi diluído como os anteriores, incubado por 1 hora, à temperatura ambiente e protegido da luz, para que neste passo não houvesse perda da função da peroxidase. As lavagens foram feitas como descrito anteriormente.

Para a revelação, foi utilizado o *kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as especificações do fabricante.

3.11. Transfecção das células com o RNA de interferência (RNAi)

Para os ensaios de inibição de *CD63* foi adquirida a construção *MISSION® esiRNA CD63* (EHU032781 – Sigma-Aldrich®), que consiste no silenciamento do gene alvo por meio RNA de interferência. As construções *endoribonuclease-prepared small interfering RNA* (esiRNA) são sintetizadas por transcrição *in vitro* de um gene *double-stranded RNA* (dsRNA) específico, seguida por digestão enzimática com RNases (Technical Bulletin - *Mission® esiRNA* – Sigma-Aldrich®, 2012).

Para este ensaio, quantidade suficiente de células, em fase exponencial, foram cultivadas em placas de ensaio, com meio de cultivo RPMI 1640, suplementado com 10% SFB, sem adição de antibióticos. As células foram cultivadas por 24 horas ou até que alcançassem confluência entre 60 e 80%. No dia da transfecção, foram formados 3 mixes de reagentes. Ao primeiro, foi adicionado o meio de cultura para diluição, *Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium* (31985070 – Thermo Fisher Scientific) juntamente ao reagente de transfecção, *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent* (13778-150 - Invitrogen™) e deixado incubando em temperatura ambiente por 20 minutos. Ao segundo, foram adicionados o meio de diluição *Opti-MEM™* e a construção esiRNA *CD63*. O mix

3 consistiu na junção do volume total da mistura 2 à mistura 1. Este mix foi incubado em temperatura ambiente por 10 minutos. O conteúdo da última mistura (meio de diluição, lipofectamina e esiRNA) foi adicionado às células em monocamada, previamente preparadas para a transfecção. As placas foram levadas à incubadora até o dia seguinte, quando o meio (contendo lipofectamina) foi trocado por volume suficiente de *Opti-MEM*TM. As quantidades e diluições dos reagentes utilizados nos ensaios de transfecção com RNAi, dependeram principalmente do tamanho da placa de ensaio utilizada para cada experimento. A relação tamanho da placa e quantidade de reagentes está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Quantidade dos reagentes utilizados nos ensaios de RNAi por modelo de placa (Adaptado de *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol 2013*).

MIX	COMPONENTE	Placa de 96 poços	Placa de 4 ou 24 poços
	Células Aderentes (por poço)	2×10^4	1×10^5
	REAGENTES	TRIPLICATA	
1	<i>Opti-MEM</i> TM	25 µL	75 µL
	<i>Lipofectamine® RNAiMAX</i>	1,5 µL	4,5 µL
2	<i>Opti-MEM</i> TM	25 µL	75 µL
	esiRNA (10 µM)	5 pmol	15 pmol
3	Mix 1 + Mix 2	10 µL/poço	50 µL/poço

A eficiência da inativação foi checada por *qRT PCR* descrito anteriormente e por imunocitoquímica, como descrito a seguir.

3.12. Imunocitoquímica (ICQ)

Para o ensaio de imunocitoquímica (ICQ), células metastáticas e não metastáticas (10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de quatro poços (NUNC™ Delta em Poliestireno – Thermo Fisher Scientific), contendo uma lamínula de vidro redonda para cada poço utilizado. Foi adicionado meio para cultivo sem antibióticos e as células foram mantidas em incubadora. Ao atingirem confluência aproximada à 60 - 70% (24 horas de cultivo), foram tratadas com o RNAi conforme descrito no item 3.7. Após 48 horas do tratamento, as placas foram retiradas da incubadora para realização do protocolo de ICQ.

O meio foi descartado, e as células, lavadas duas vezes com PBS 1X. Em seguida, 500 µL de Formoldeído 3,7% (Merck, em PBS 1X) foram adicionados e as lamínulas permaneceram a 8°C (geladeira) por 15 minutos, para que obtivéssemos o efeito fixação das células. Após essa etapa, as células foram lavadas três vezes com água destilada, sendo que cada lavagem durou cerca de cinco minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a adição de 500 µL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, VIC pharma®), por 2 vezes de 5 minutos cada. Novamente, foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada, com água destilada. Para o bloqueio de proteínas inespecíficas, as células foram incubadas com 500 µL de PBS 1X + 5% Albumina Sérica Bovina (BSA), durante 20 minutos. O procedimento seguinte consistiu na impermeabilização das células, para isso, foi retirado o tampão de bloqueio, e adicionados 500 µL

de tampão PBS 1X + 0,1% Triton X100 (Merck), incubado por 20 minutos em temperatura ambiente.

Para a incubação com o anticorpo primário, as células não foram lavadas, porém o tampão anterior foi descartado, e às células foram adicionados 200 µL do anticorpo primário anti-CD63, IgG1 de camundongo (MA1-19281, Thermo Fisher Scientific) na diluição 1:100 em tampão PBS 1X + 0,1% Triton X100. A incubação ocorreu em temperatura ambiente por pelo menos uma hora. Após este período, as células foram lavadas três vezes com PBX 1X, sem incubação.

A adição do anticorpo secundário (conjugado), foi realizada com quantidade suficiente para cobrir as lamínulas, em temperatura ambiente por 20 minutos, e após este tempo, foram novamente lavadas três vezes com PBS 1X, sem incubação. Quantidade suficiente do reagente HRP-peroxidase (polímero), também foi adicionado às células, e deixado incubando por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagens com PBS 1X.

A coloração foi realizada com DAB (3,3' Diaminobenzidina, Merck) à 1:50 e a contra coloração foi obtida após incubação com hematoxilina, por 10 minutos, em temperatura ambiente. O excesso da coloração foi eliminado com água corrente e seguiram-se banhos de etanol em concentrações crescentes (70, 80 e 100%) e três banhos com xilol. Para a montagem, as lamínulas foram fixadas em lâminas de vidro, com adição de Entelan (Merck).

As análises e fotografias foram realizadas em microscópio óptico *Nikon Fase Contrast 0.90 Dry – Eclipse Ni* (Nikon – Japão), equipado com câmera fotográfica *Nikon DS-Ri1* (Nikon - Japão) e objetiva de 20X de resolução. As reações foram realizadas em triplicada e os resultados expressos como

porcentagem de células marcadas. Foram avaliados 5 campos por lâmina, no total de 15 campos por condição avaliada.

3.13. Ensaio de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada *in vitro* por conversão do reagente *PrestoBlue® Cell Viability Reagent for Microplates* (Thermo Fisher Scientific). Células não metastáticas ($3,5 \times 10^4$) e metastáticas (2×10^4) foram cultivadas em placas de 96 poços (Corning®) com meio sem adição de antibióticos. Ao atingirem confluência próxima à 60% (24 horas de cultivo), as células foram tratadas com o RNAi conforme descrito. Após 48 horas do tratamento, a cada 24 horas, uma placa foi retirada da incubadora, o meio condicionado foi desprezado e foram adicionados 90 μ L de meio de cultura e 10 μ L do reagente de viabilidade. A placa permaneceu na incubadora, nas mesmas condições anteriores, por 2 horas. Após esse período, a placa foi protegida da luz e mantida em *freezer* - 20°C até o momento da leitura. Um total de 96 horas pós tratamento com RNAi foi verificado em nossos testes. No dia da leitura as quatro placas permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos, para que houvesse o descongelamento total. As leituras foram realizadas em aparelho *GloMax® - Multi Detection System* (Promega).

Os grupos testados foram: Controle siRNA (*MISSION®* esiRNA EGFP); controle do reagente de transfecção, Lipofectamina; Controle Celular sem tratamento e siRNA CD63.

O experimento foi realizado duas vezes e em triplicata. A representação gráfica foi realizada com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0*.

3.14. Ensaio de migração celular

A motilidade celular foi verificada por meio do ensaio *in vitro* denominado “*wound healing assay*”, também conhecido como ensaio por injúria, ou ferida. Células não metastáticas (2×10^5) e metastáticas (10^5), foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning®) com meio para cultivo sem adição de antibiótico/antimicótico. Ao atingirem confluência aproximada à 60 - 70% (24 horas de cultivo), foram tratadas com o RNAi conforme descrito no item 3.7. Após 48 horas do tratamento, a monocamada ($\approx 90\%$ confluenta) foi rasgada com o auxílio de uma pipeta estéril de 200 μL e depois, lavada com PBS 1X e o meio de cultura soro reduzido foi repostado. A placa voltou para incubadora úmida, à 37°C e 5% CO_2 , onde permaneceu por até 48 horas. A migração das células em direção à área ferida foi registrada entre 0, 6, 9, 12, 24, 36 e/ou 48 horas, utilizando microscópio invertido Zeiss (AxioCam ERc 5c), com objetiva de 10X e câmera de celular (MOTO G4) acoplada com adaptador.

Os grupos testados foram: Controle siRNA (*MISSION®* esiRNA EGFP); controle do reagente de transfecção, Lipofectamina; Controle Celular sem tratamento e siRNA CD63.

As análises foram feitas com base nos registros fotográficos e auxílio do programa *ImageJ*. O experimento foi realizado duas vezes e em triplicata. A representação gráfica foi realizada com auxílio do programa *GraphPad Prism 5.0*.

3.15. Análise Estatística

As análises foram realizadas utilizando programa *GraphPad Prism* 5.0. O teste não paramétrico *Mann Whitney* foi aplicado para avaliar diferenças entre dois grupos, sendo o valor de $p < 0.05$ considerado significativo.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

A linhagens utilizadas neste estudo foram cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Rafael Malagoli Rocha do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). O modo como as linhagens celulares foram cultivadas, foi previamente descrito em materiais e métodos. No entanto, ressaltamos que todos os materiais genéticos (RNA e DNA) e proteicos (proteínas) foram obtidos exclusivamente com as células em fase de crescimento exponencial e viabilidade $\geq 95\%$. A Figura 6 apresenta fotomicrografias representativas do perfil de crescimento das duas linhagens celulares utilizadas.

Figura 4: Fotomicrografias representativas das linhagens celulares de carcinoma vulvar de células escamosas (CECV) não metastático (SW954) e metastático (SW962), utilizadas neste trabalho.

Antes de dar início aos ensaios, como recomendado na literatura, foram verificados os perfis genéticos das células. Esta confirmação de autenticidade das células é obtida pela identificação dos alelos de marcadores

STRs específicos (*GenePrint 10 System kit* – Promega), e disponibilização dos perfis genéticos das linhagens, no banco de dados da *ATCC* (*American Type Culture Collection*), de onde as linhagens foram originalmente obtidas. Os alelos de cada marcador referente aos perfis genéticos de *STRs* das duas linhagens, estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4: Perfil genético dos alelos de marcadores baseados em regiões curtas de repetição (*STRs*) obtidos para as linhagens celulares SW954 (CECV não metastático) e SW962 (CECV metastático).

MARCADOR	LINHAGEM			
	SW954 (CECV não metastático)		SW962 (CECV metastático)	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
AMEL	X		X	
CSF1PO	10	11	10	11
D13S317	9	11	11	14
D16S539	11		9	11
D21S11	30	31	30	32
D5S818	11	12	12	
D7S820	11	13	10	11
TH01	8	9.3	6	9.3
TPOX	8		11	
vWA	14	15	15	17

Após nos certificarmos de que não havia contaminação cruzada (intercelular) ou alterações genéticas nas células, nosso objetivo foi avaliar e caracterizar o perfil de expressão gênica das tetraspaninas *CD63* e *KAI1/CD82* nas duas linhagens celulares.

Para que nosso objetivo fosse alcançado, os RNAs foram primeiramente, extraídos de amostras de células em cultura, pelo método de *Trizol®*, como descrito anteriormente. Em seguida, foi necessária a síntese das

fitas de DNA complementar (cDNA) para a execução do PCR em tempo real. Na Figura 5A, estão apresentados os perfis de qualidade e integridade das amostras de RNA total, extraídos pelo método de *Trizol*®. A presença de três bandas (28S, 28S e 5S) nas eletroforeses em géis de agarose a 1%, demonstra boa qualidade/integridade para dar continuidade aos procedimentos. Para as sínteses de cDNA foram utilizados 2 µg de RNA total para cada 20 µL de reação de transcrição reversa. A Figura 5B, representa a eficiência da síntese de cDNA, por PCR convencional, uma vez que podemos observar a presença de banda única na altura esperada (≈ 100 pares de bases) para o conjunto de iniciadores utilizados (GAPDH).

Figura 5: Perfil de migração eletroforética do material genético obtido das linhagens celulares em géis de agarose (1%), impregnados com brometo de etídeo. Em **A**, RNA total extraído das células de CECV não metastático e metastático, respectivamente. As bandas de 28S, 18S e 5S estão indicadas. Em **B**, perfil de migração dos produtos de PCR das amostras de cDNA sintetizadas a partir de 2 µg do RNA total de cada uma das linhagens. Padrão, padrão de peso molecular. A seta indica o tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb).

Na sequência, avaliamos a melhor opção de gene endógeno para ser utilizado como normalizador em nossas reações de PCR quantitativo em Tempo Real. Foram testados, *β-actina*, *β2M*, *GAPDH* e *HPRT*. Os valores de C_T (*cycle threshold*), em duplicata, foram analisados no programa algoritmo *NormFinder*, que por sua vez, indica o gene de normalização ideal com base em modelos matemáticos ¹⁴². O resultado obtido em nossos testes, mostrou que o gene endógeno mais estável e, portanto, utilizado em todos os ensaios de *qRT PCR* deste trabalho, foi o *β2M humano* (Tabela 5).

Tabela 5: Valores da estabilidade dos genes endógenos testados para a seleção do gene normalizador das reações de *qRT PCR*. Análises pelo programa *NormFinder*. Seta indicativa do gene normalizador mais estável (*B2M-HUM*).

Nome do gene	Valor da estabilidade	Melhor gene	B2M-HUM
B-ACTINA-HUM	0,034	Valor de estabilidade	➡ 0,021
B2M-HUM	0,021		
HPRT-HUM	0,023	Melhor combinação de dois genes	B2M-HUM e HPRT-HUM
GAPDH-HUM	0,032		

Uma vez definido o gene endógeno, demos sequência à caracterização do perfil de expressão dos genes de interesse. Réplicas de ensaio de *qRT PCR* foram realizados em duplicata, utilizando uma mistura de iniciadores e sondas inventariados (*assays*), para cada um dos genes codificadores das tetraspaninas *CD63* e *KAI1/CD82*.

Por não haver células de tecido normal para usarmos como referência, nossas análises foram baseadas na comparação entre as duas linhagens de carcinoma vulvar. Como já referido anteriormente, elas apresentam

grau de malignidade diferente, sendo a primeira, carcinoma primário e a segunda, proveniente de metástase de linfonodos.

A Figura 6, apresenta os perfis de expressão relativa (*RQ – Relative Quantification*) de *CD63* e *KAI1/CD82*, normalizados com o endógeno $\beta 2M$. Como amostra referência (valor igual a 1) utilizamos a linhagem celular de carcinoma vulvar primário (CECV não metastático). O valor acima do estipulado pela referência, ou seja, maior que 1 (>1), indica aumento na expressão do gene, enquanto que o valor abaixo de 1 (<1) indica diminuição na expressão.

O resultado da comparação dos perfis de expressão para o gene *CD63* entre as linhagens celulares de CECV não metastático e metastático, mostrou que houve aumento com diferença significativa ($p < 0.05$) nas células metastáticas (Figura 6). Em relação à expressão do gene supressor de metástase *CD82*, vimos que a linhagem mais agressiva (metastática), apresentou diminuição significativa ($p < 0.05$) em relação às células não metastáticas, corroborando com dados obtidos na literatura (Figura 6).

Figura 6: Expressão relativa (*RQ*) dos transcritos para os genes *CD63* e *KAI1/CD82* nas linhagens de células metastáticas, em relação às células não metastáticas. Os asteriscos indicam *p* valor significativo (<0.05).

A avaliação do perfil de expressão das proteínas extraídas das amostras foi realizada por eletroforese em géis de acrilamida 12% (*SDS-PAGE*). O mesmo protocolo de extração foi aplicado para as duas linhagens celulares e os resultados mostraram melhor rendimento na fração do precipitado (proteínas de membrana) para as células não metastáticas, enquanto que para as metastáticas, a fração de sobrenadante (proteínas nucleares e citoplasmáticas) apresentou melhor rendimento. Todos os extratos foram utilizados nas reações de *Western Blot*.

Os ensaios de *Western Blot* (*WB*) foram realizados no intuito de avaliar individualmente a presença das proteínas de interesse, CD63 e KAI1/CD82, nas amostras extraídas das células. As reações, utilizando anticorpo específico para detecção de CD63, apresentaram marcação de duas bandas com altura entre 40 e 50 kDa na fração precipitado (proteínas de membrana), para ambas linhagens celulares. Como esperado, não houve marcação na porção sobrenadante (proteínas nucleares e citoplasmáticas) (Figura 7).

Figura 7: *Western Blot* realizado com as frações precipitado (Prec) e sobrenadante (Sob) dos extratos proteicos obtidos das linhagens celulares, utilizando anticorpo específico para CD63.

Para a detecção da proteína KAI1/CD82, em nossas amostras celulares, nenhum dos testes realizados por *Western Blot* apresentou resultado positivo. Não foi possível detectar a proteína em nenhuma das linhagens testadas.

Baseado nos resultados anteriores, tornou-se interessante investir somente na depleção transiente do gene *CD63* pelo método de transfecção com RNA de interferência (RNAi). Isso para avaliar os aspectos fenotípicos e comportamentais das células não metastáticas (SW954) e metastáticas (SW962) no cenário de redução da expressão dessa molécula.

A eficiência dos ensaios de interferência para a expressão do gene *CD63* foi avaliada pela técnica de *qRT PCR* e ICQ. Todos os controles recomendados pelo fornecedor da construção foram utilizados nos ensaios. Suas descrições e finalidades podem ser visualizadas na Tabela 6.

Tabela 6: Identificação, natureza e finalidade dos controles utilizados nos ensaios de RNA interferente.

IDENTIFICAÇÃO	NATUREZA	FINALIDADE
Controle Celular	Célula sem tratamento	Controle geral
Controle siRNA	siRNA EGFP	Controle da construção siRNA
Lipofectamina	Lipofectamina	Controle da transfecção

A técnica de depleção gênica por RNAi consiste na regulação negativa da expressão de um gene alvo. Trata-se de um processo epigenético que ocorre de modo transiente, ou seja, as células modificadas não transmitem suas alterações para as células filhas. Outro fato que leva o mesmo a ser passageiro, é a própria morte das células que sofreram remodelamento genético.

Tendo em vista estes fatores intrínsecos da técnica utilizada, testamos três diferentes tempos da inibição com RNAi (24, 48 e 72 horas após o momento da transfecção), afim de acessar o melhor ponto da inibição do ensaio.

Os resultados mostraram que, seguindo o mesmo protocolo para as duas linhagens, as células apresentaram diferentes níveis de inibição. Quando comparamos os tempos testados, os níveis também foram diferentes. Para as células de CECV não metastático tivemos 64, 66 e 58% de inibição, após 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Enquanto que para as células metastáticas, os níveis de inibição foram mais expressivos, com 84, 86 e 82%, nos mesmos tempos.

Os protocolos de RNAi foram realizados em triplicata, para cada um dos grupos testados (controles e siRNA alvo), e as reações de *qRT PCR* para detecção dos níveis de inibição, foram feitas em duplicata. As Figuras 8 e 9 apresentam os valores de expressão relativa como porcentagem (%) da quantidade relativa de transcritos para *CD63* nos diferentes tratamentos realizados. Vimos que tanto para as células de CECV não metastático (Figura 8), quanto para as células de CECV metastático (Figura 9), o maior nível de inibição ocorreu após 48 horas da transfecção com o RNA interferente (indicado pela seta preta). O teste não paramétrico (*Mann-Whitney test*), comumente utilizado para avaliar duas amostras independentes, mostrou diferença significativa ($p < 0.05$), quando comparamos os grupos tratados com siRNA e o controle sem tratamento (Controle Celular).

Figura 8: Expressão relativa, expressa em porcentagem (%), de *CD63*, em células de CECV não metastático após 24, 48 e 72 horas da transfecção. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). O asterisco indica significância estatística com $p < 0.05$. O grupo Controle Celular foi utilizado como referência.

Figura 9: Expressão relativa, expressa em porcentagem (%), de *CD63*, em células de CECV metastático após 24, 48 e 72 horas da transfecção. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). O asterisco indica significância estatística com $p < 0.05$. O grupo Controle Celular foi utilizado como referência.

Após os ensaios de RNAi, também avaliamos o efeito na expressão proteica por meio de ensaios de imunocitoquímica (ICQ). Esse método possui vantagens como custo baixo a moderado, alta sensibilidade e especificidade, além de poder ser aplicado às células vivas. As fotomicrografias da Figura 10 foram tiradas das reações das ICQ das duas linhagens celulares, que receberam ou não tratamento com siRNA. Os resultados corroboraram com o esperado, além da redução na expressão dos níveis de transcritos, também houve redução da expressão da proteína CD63 nessas células. Porém, como vimos em resultados anteriores (Figuras 8 e 9), os níveis de interferência foram maiores para a linhagem metastática, em comparação à não metastática.

Figura 10: Fotomicrografias representativas das reações de imunocitoquímica (ICQ) para avaliação qualitativa da presença de CD63 em células de CECV não metastático e metastático, nos grupos: Controle Celular (sem tratamento), Controle siRNA (EGFP) e tratado com siRNA CD63. Barra equivalente à 100 px de resolução. As fotos em destaque apresentam as células em maior aumento (1000X).

Tabela 7: Porcentagem de células positivas para CD63 nas reações de ICQ.

LINHAGEM	Controle Celular *	Controle siRNA *	siRNA CD63
Não metastática	2.002 (2.043) = 98	2.318 (2.354) = 98,5	410 (1966) = 21
Metastática	561 (571) = 98	603 (611) = 98,7	67 (472) = 14

* Número de células positivas (Número total) = % de células positivas

O objetivo seguinte foi avaliar o efeito da manipulação genética de *CD63* na proliferação das linhagens celulares e compará-los com os grupos controles sem tratamento. Para isso, ensaios baseados na atividade do reagente *PrestoBlue® Cell Viability Reagent for Microplates* (Thermo Fisher Scientific) foram realizados conforme já descrito.

Os resultados indicaram que, quando comparadas à linhagem não metastática, as células metastáticas proliferaram menos nas primeiras 72 horas sem tratamento. Ao contrário do que se esperava para o perfil metastático, porém, a proliferação se manteve crescente até o último ponto avaliado (96 horas), quando as células de CECV não metastático apresentaram declínio em todos os grupos (Figura 11A).

No que diz respeito à comparação entre os grupos com e sem tratamento (Figura 11B), nossos resultados apontaram reduções significativas ($p < 0.05$) no crescimento das células não metastáticas, em todos os pontos avaliados. Para as células metastáticas, observamos reduções ainda mais significativas ($p = 0.0022$), quando comparamos as células tratadas com as que não receberam tratamento. Porém, os resultados foram significantes somente após as 48 horas.

Figura 11: Curvas de proliferação das células de CECV não metastática (NM) e metastática (M) antes e após inibição de *CD63* por siRNA. Em **A**, os gráficos apresentam os perfis de proliferação das linhagens celulares: sem tratamento - Controle Celular, Controle da Lipofectamina, células tratadas com Controle siRNA (EGFP) e com siRNA para *CD63*; Em **B**, gráfico em coluna apresentando a comparação entre os perfis proliferativos das células tratadas com siRNA *CD63* e não tratadas. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). Os asteriscos indicam valores de p significativos. O grupo sem tratamento (Controle Celular) foi utilizado como referência.

Posteriormente, avaliamos outro aspecto comportamental muito importante no que diz respeito à biologia tumoral, o potencial migratório das células. O *wound healing assay*, ou “ensaio da ferida”, consiste em rasgar a monocamada de células e registrar, a partir de fotomicrografias, o processo de migração em tempos determinados. Por meio deste, nossa intenção foi, principalmente, avaliar se a inativação de CD63 influenciaria também, na capacidade de migração das células.

Os resultados mostraram que as células não metastáticas migraram mais rápido, além de atingirem confluência máxima (100 %) em apenas 24 horas, enquanto as células metastáticas levaram mais de 48 horas para tal (Figura 12A e B). Quando confrontamos os valores do grupo tratado (siRNA *CD63*), com aqueles do grupo não tratado, vimos que nos dois casos houve redução do potencial migratório, porém, apenas o CECV metastático mostrou diferença relevante, com $*p < 0.05$ (6 e 48 horas pós transfecção), ressaltando que, em 48 horas esta redução foi de aproximadamente 40% se comparado ao controle (Figura 12C).

Figura 12: Ensaio de migração (*wound healing*) das células de CECV não metastática (NM) e metastática (M) antes e após inibição de *CD63* por siRNA. Em **A**, fotomicrografias das linhagens de células nos tempos de 0, 24 ou 48 horas de migração. Foram avaliadas as células crescidas somente em meio - Controle Celular, Controle da Lipofectamina, o Controle do siRNA (EGFP) e o siRNA para *CD63*. Em **B**, gráficos apresentando os cálculos de área migrada com base nas fotomicrografias, utilizando o software *Image J*. Em **C**, gráfico de colunas comparando os perfis migratórios dos grupos tratado com siRNA *CD63* e não tratado. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP). O asterisco indica o valor de p significativo. O grupo sem tratamento (Controle Celular) foi utilizado como referência.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em resposta às amplas possibilidades de ligações e funções que as tetraspaninas (TSPAN) podem desempenhar, alguns membros dessa família são frequentemente descritos na presença e/ou desenvolvimento de diversos tumores ⁹¹. Dentro de nossos conhecimentos e pesquisas realizadas na literatura, este foi o primeiro estudo que se propôs investigar o envolvimento das tetraspaninas CD63 e KAI1/CD82 no câncer de vulva. Para tanto, foram utilizadas duas linhagens celulares com graus de malignidade diferentes, a primeira de CECV primário e a segunda de CECV metastático.

Dentre as TSPAN com funções bem caracterizadas, está o supressor metastático KAI1/CD82. Nossa avaliação de sua expressão gênica mostrou significativa redução na quantidade transcritos nas células da linhagem metastática, em relação à não metastática. Nossas análises de caracterização da proteína por *Western Blot*, não resultou em reação positiva, o que acreditamos estar relacionado ao fato do KAI1/CD82 estar frequentemente diminuído em tumores. Embora algumas dificuldades técnicas tenham ocorrido, a não detecção da proteína corrobora o dado de expressão do mRNA para KAI1/CD82.

Inúmeras pesquisas correlacionam a perda da proteína KAI1/CD82 com um pior prognóstico em diversos tumores sólidos. Sendo assim, nossas análises corroboram pesquisas como a realizada por Yu e colaboradores ¹²⁷ em 1997, que encontrou correlação entre a perda de expressão de KAI1/CD82 e a progressão do grau histológico e estágio clínico em tumores de bexiga humanos. Outros grupos demonstraram que células de câncer de próstata em ratos ¹⁴⁴ e

de carcinoma nasofaríngeo em camundongos, ¹⁴⁵ com KAI1/CD82 aumentado por bioengenharia, são capazes de inibir a ocorrência de metástase, mas não interferem no crescimento do tumor primário.

Devido ao grande número de estudos que correlacionam o KAI1/CD82 com características como invasão tumoral, diferenciação celular, estágio TNM, metástase à distância e metástase linfonodal, este gene tem sido alvo de estudos para novas terapias anticâncer. Exemplo disso é o trabalho de Wang e colaboradores ¹⁴⁵ realizado em 2018, que modificaram células progenitoras endoteliais (EPC) com um lentivirus contendo o gene *KAI1/CD82*. Os autores implantaram as EPCs como tratamento em camundongos com tumores induzidos por células de carcinoma nasofaríngeo e verificaram a redução significativa da quantidade de metástases. O trabalho sugere que novas terapias podem ser desenvolvidas utilizando KAI1/CD82. Sendo assim, estudos mais aprofundados sobre a função desse gene/proteína em CECV ajudariam de forma significativa, uma vez que aproximadamente um terço das pacientes apresenta recidiva local ou metastática ⁵. Nosso projeto não abrangeu a indução de expressão do CD82 nas células, mas certamente será interessante avaliar seus efeitos em nosso modelo.

Considerando os resultados para CD63, maior expressão relativa do gene nas células metastáticas foi encontrada, nas análises de *qRT PCR*, quando comparadas com a linhagem não metastática. Outros estudos publicaram dados semelhantes para diferentes tipos tumorais, indicando um pior prognóstico quando houve o ganho da expressão dessa TSPAN. Por exemplo, a presença da proteína foi avaliada em 10 amostras normais de cérebro e 471 amostras de pacientes com gliomas de diferentes classificações histopatológicas,

rearranjadas em TMA (*tissue microarray*) e avaliadas por imunohistoquímica (IHQ) ⁹⁸. Nesse estudo, foi observado que as amostras de tecidos normais não expressaram CD63, enquanto que os astrocitomas e glioblastomas apresentaram expressão significativa. Ridnour ⁹⁷ e colaboradores em 2012, avaliaram também por IHQ, a presença das proteínas TIMP-1 e de seu receptor de superfície celular, CD63, em 217 ressecções cirúrgicas de carcinoma de mama não metastático. Os autores reportaram que as reações para TIMP-1 e CD63 apresentaram expressão moderada a forte em 42 e 41% dos casos, respectivamente. Embora a porcentagem represente menos da metade das amostras, houve correlação entre o aumento da expressão de CD63 com maior grau de diferenciação dos tumores.

Enquanto algumas TSPAN apresentam funções bem definidas na biologia tumoral, outras podem ser ambíguas. O CD63 é um exemplo típico disso. Estudos utilizando linhagens celulares de melanoma humano, transfectadas ou não com CD63, indicaram que esta proteína está inversamente associada com a progressão desse tumor e apresenta função supressora de metástase e invasão ^{96,104}. No entanto, Hotta e colaboradores ⁵⁹ em 1988, avaliaram a expressão do CD63 em linhagens celulares de diferentes estágios de progressão do melanoma humano, e apresentaram dados que indicam que esta proteína é expressa em estágios específicos nesse tumor. Por exemplo, células normais (melanócitos) não expressaram CD63, enquanto níveis elevados foram vistos em estágio inicial do desenvolvimento tumoral. Já os tumores mais avançados, apresentaram perda de expressão dessa proteína. Por outro lado, um estudo recente demonstrou que amostras normais de língua apresentavam forte expressão da proteína CD63, enquanto tumores indiferenciados mostravam

fraca ou nenhuma expressão. Nesse estudo, os autores reportaram que a inibição do CD63, com RNA interferente, em células humanas de carcinoma de língua induziu progressão para um quadro de pior prognóstico, com aumento da motilidade e invasão celular ¹⁴⁶.

Se considerarmos o fato de existirem várias diferenças entre o microambiente criado para um protocolo *in vitro* e aquele criado pelo próprio processo de transformação celular em um organismo vivo; além de todas as possibilidades de interação e sinalização que CD63 pode realizar, pode-se supor que, de fato, ela possa desempenhar diferentes funções, ora supressora, ora pró-tumoral.

Nosso protocolo de extração específico para a separação de proteínas de membrana e as reações de *Western Blot* para a quantificação de CD63 nas linhagens celulares, resultou na presença de duas bandas localizadas entre 40 e 50 kDa. Embora as especificações do anticorpo utilizado não incluam reações de *Western Blot*, a altura da banda, mostrada pelo marcador de peso molecular, indica a presença de CD63 em nossas amostras. Embora não fosse esperada a presença de duas bandas, avaliando outros estudos que incluíam pesquisa de CD63 pelo mesmo método, e com o mesmo anticorpo (clone e marca), encontramos um resultado semelhante ¹⁴⁷. O autor não discutiu o dado, porém, sabe-se que bandas com tamanho menor que o predito pode sugerir produto de degradação. Ao passo que bandas maiores podem sugerir que as condições de redução e separação dos complexos proteicos não tenham sido suficientes para desfazer alguns tipos de interação.

Com base nos dados de expressão e sabendo da importância de CD63 em outros tumores, foi realizada a inativação do gene pelo o método de

RNAi. Este representa uma ferramenta indispensável para estudos que visam avaliar a perda de funções de um gene em organismos eucariotos. O sistema possibilita silenciar um gene alvo de modo estável e reversível, o que viabiliza a pesquisa de fenótipos em médio prazo, triagens genéticas e avaliação das consequências da inibição temporária *in vitro* ou *in vivo* ¹⁴⁸.

Nosso objetivo com o RNAi para CD63 foi, especificamente, avaliar e comparar os seus efeitos no comportamento das duas linhagens celulares. As análises por *qRT PCR* confirmaram a redução significativa de expressão do CD63 nas amostras tratadas com RNAi, em comparação àquelas que não receberam tratamento. Por se tratar de uma técnica transiente, preconiza-se que as análises sejam feitas entre 24 e 96 horas após a transfecção ¹⁴⁸. Em nossas análises, os níveis de inibição transcricional mais significativos ocorreram após 48 horas da transfecção, sendo 66 e 86 % para as células não metastáticas e metastáticas, respectivamente. O sistema de silenciamento dos siRNAs utilizado em nosso estudo, garante níveis de inibição $\geq 70\%$ ¹⁴⁹. Nossos testes foram realizados conforme o protocolo indicado pelo fabricante do reagente de transfecção (lipofectamina) e sempre em triplicata. A eficácia do silenciamento também foi avaliado por imunocitoquímica (ICQ), que refletiu níveis de inibição da proteína de 69% nas células não metastáticas e 85% nas células metastáticas, similar ao verificado nas análises de mRNA (*qRT PCR*). As reações de *Western Blot* não foram realizadas devido ao rendimento de material das células tratadas que inviabilizou o protocolo, porém, as reações de ICQ foram capazes de fornecer os resultados necessários para nossa avaliação.

Avaliando o comportamento das células, o tratamento para inibição de CD63 resultou na redução significativa de seu potencial proliferativo. O efeito

foi mais proeminente nas células metastáticas ($**p=0.0022$), em relação ao controle. Mas também foi significativo nas células não metastáticas ($*p<0.05$), comparadas às células do controle.

Ademais, o tratamento induziu redução da capacidade de migração das duas linhagens testadas, porém, diferença significativa só foi observada para a linhagem metastática.

Dentro de nossas pesquisas na literatura, este foi o primeiro trabalho a avaliar a expressão da TSPAN CD63 em carcinoma de vulva. Assim, nossos resultados foram comparados a estudos realizados em diferentes tipos de câncer. Como já explicitado, a regulação positiva de CD63 pode apresentar resposta supressora ou pró-tumoral. Nossos resultados indicam que esta molécula auxilia na sinalização de modo oncogênico, ou seja, a favor da progressão do carcinoma de vulva. Rorive e colaboradores ⁹⁸ em 2010, correlacionaram a presença aumentada de CD63 com o quadro de pior prognóstico em amostras de pacientes com astrocitomas, devido à formação do complexo TIMP-4/CD63. Recentemente, outro estudo demonstrou que a ligação formada por TIMP-1/CD63, promove o aumento da capacidade migratória e sobrevivência das células tumorais em amostras de pacientes com leucemia mielóide aguda ¹⁴⁹. Em teoria, quando formado o complexo de ligação TIMP-1;-4/CD63, a cauda citoplasmática de CD63 interage com a molécula FAK (*focal adhesion kinase*) que dá início à ativação de uma série de reações químicas dentro da via de sinalização PI3K/Akt. Outra pesquisa descreve que a isoforma NOS2 (óxido nítrico sintase 2), um mediador pró-inflamatório correlacionado com inflamação crônica e progressão tumoral e que promove a regulação da síntese de TIMP-1, apresenta associação com a fosforilação de Akt-(ser473), levando

ao aumento da capacidade de migração e sobrevivência de células tumorais ⁹⁷. Outra possível via de sinalização ativada pela formação do complexo TIMP-1;-4/CD63 é a PI3K/ERK, que promove estado proliferativo, migratório e de resistência às células tumorais ^{107,122}.

Nossos resultados, por si só, não permitem afirmar o mecanismo pelo qual CD63 promove ou favorece o estado tumoral nas células de CECV. Porém, permitem afirmar que essa molécula está envolvida tanto no processo tumoral, quanto em potencial metastático. Nesse sentido, importante dado a ser considerado é que NOS2 (molécula reguladora de TIMP-1) está relacionada com inflamações crônicas, como líquen escleroso (participante ligado à principal via etiopatogênica dos carcinomas de vulva não virais); e CD63 (receptor de TIMP-1;-4) mostrou expressão aumentada tanto nas amostras de pacientes (dados não apresentados) como nas linhagens celulares de CECV.

Em conjunto, nossos resultados abrem perspectivas para novos e mais aprofundados estudos em carcinoma de vulva. O desenvolvimento de modelos animais poderia ajudar a confirmar nossos resultados para o papel deduzido de supressor tumoral do KAI1/CD82 no CECV; bem como no melhor entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos nessa neoplasia.

Embora seja necessário ampliar e aprofundar as pesquisas, a caracterização de CD63 e KAI1/CD82, bem como a inibição de CD63, abrem caminhos para uma linha de pesquisa visando sua aplicação para fins prognósticos e terapêuticos no CECV.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- A linhagem celular metastática (SW962) apresentou maior expressão gênica de *CD63* e menor expressão de *KAI1/CD82*, quando comparada à não metastática (SW954);
- A expressão da proteína *CD63* foi detectada nas células metastáticas e não metastáticas, com maior quantidade na metastática. Para *CD82* não foi obtida reação positiva, para ambas linhagens;
- A inibição transiente (RNAi) do gene *CD63* nas linhagens celulares metastática (SW962) e não metastática (SW954) apresentou eficiência de até 90%, verificada por *qRT PCR* e ICQ;
- A inibição transiente de *CD63* nas linhagens celulares resultou em redução significativa da proliferação celular (não metastáticas $*p<0.05$ e metastáticas $**p=0.0022$). De mesmo modo, houve redução proeminente na capacidade de migração das células metastáticas ($*p<0.05$).

7 REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. A.C. Camargo Cancer Center. Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa [on-line]. Brasil. 2018. Disponível em: <<http://www.accamargo.org.br/tipos-de-cancer/vulva>>
2. [ACS] American Cancer Society. Key Statistics for Vulvar Cancer. 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/vulvar-cancer/about/key-statistics.html>>
3. Viega S. Anatomia humana. Quais são as partes da vagina [on-line]. 16 janeiro 2017. Educação.umcomo.com.br. Disponível em: <<https://educacao.umcomo.com.br/artigo/quais-sao-as-partes-da-vagina-23035.html>> Acessado em: 12 outubro 2018
4. Sallun LFTA, Derchain SFM, Fonseca RP. Diretrizes Clínicas na Saúde Suplementar. Câncer de Vulva. Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Suplementar. 2011. 1-16
5. [NCI] National Cancer Institute. National Institutes of Health. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER). Estimated new cancer cases and deaths for 2018. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/vulva.html>>
6. Fundação Oncocentro de São Paulo. Registro de Câncer no Estado de São Paulo. 1990
7. Pinto A. Etiopatogenia do Câncer Vulvar. *J Bras de Patol e Med Lab*. 2002. Vol.38, n.1, 55-63
8. Fonseca-Moutinho J. Neoplasia intraepitelial vulvar: um problema atual. *Revista Brasileira de Oncologia e Obstetrícia*. 2008. Vol.30, n.8, 420-6
9. Hussain SK, Madeleine MM, Jhonson LG, Du Q, Galloway DA, Daling JR et al. Nucleotide variation in IL-10 and IL-12 and their receptors and cervical and vulvar cancer risk: a hybrid case-parent triad and case-control study. *Int J Cancer*. 2008. 133:201-13. Doi: 10.1002/ijc.28000
10. Alkatout I, Schubert M, Garbrecht N, Weigel MT, Jonat W, Mundhenke C et al. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. Review. *Int J Womens Health*. 2015. 20;7:305-13. Doi: 10.2147/IJWH.S68979
11. Stroup AM, Harlan LC, Trimble EL. Demographic, clinical, and treatment trends among women diagnosed with vulvar cancer in the U.S. *Gynecologic Oncology*, 2008. Vol.108, n.3, 577-83

12. Wang Z, Tropè C, Suo Z, Trøen G, Yang G, Nesland JM et al. The clinicopathological and prognostic impact of 14-3-3 sigma expression on vulvar squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 2008. Vol.8. 308. Doi: 10.1186/1471-2407-8-308
13. Denny L, Quinn M. FIGO Cancer Report 2015. *Int J Gynecol Obstet*. 2015. 2:S75. Doi: 10.1016/j.ijgo.2015.06.024
14. RCOG Publications. Management of vulval cancer. London, Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. 2006
15. [Vida Saudável] Sintomas e Doenças. Câncer de vulva: tipos, sintomas e como se tratar [on line]. 2018. Disponível em: <https://www.vidasaudavel.one/cancer-de-vulva-tipos-sintomas-e-como-se-tratar/> Acessado em: 12 outubro 2018
16. Schuurman MS, van den Einden LC, Massuger LF, Kiemeny LA, van der Aa MA, de Hullu JA. Trends in incidence and survival of Dutch women with vulvar squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2013. 49:3872-80. Doi: 10.1016/j.ejca.2013.08.003
17. Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Melo Maia B, Stiepcich MM, Baicocchi G, Carvalho KC et al. Cell cycle supressor proteins are not related to HPV status or clinical outcome in patients with vulvar carcinoma. *Tumour Biol*. 2013. 34:3713-20. Doi: 10.1007/s13277-013-0955-0
18. Wang Z, Slipicevic A, Førsund M, Trope CG, Nesland JM, Holm R. Expression of CDK1(Tyr15), pCDK1(Thr161), Cyclin B1 (total) and pCyclin B1(Ser126) in vulvar squamous cell carcinoma and their relations with clinicopatological features and prognosis. *PLoS One*. 2015. 10:e01211398. Doi: 10.1371/journal.pone.0121398
19. Zhang J, Zhang Y, Zhang Z. Prevalence of human papillomavirus and its prognostic value in vulvar cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018. 13:e0204162. Doi: 10.1371/journal.pone.0204162
20. Eke AC, Alabi-Isame LI, Akabuike JC. Management options for vulvar carcinoma in a low resource setting. *World J Surg Oncol*. 2010. 8:94
21. Hussain SK, Madeleine MM, Johnson LG, Du Q, Malkki M, Wilkerson HW, et al. Cervical and vulvar cancer risk in relation to the join effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008. 17:1790-9. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07—2753

22. Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008. 17:1611-22. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2922
23. Hinten F, Molijn A, Eckhardt L, Massuger LFAG, Quint W, Bult P, et al. Vulvar cancer: Two pathways with different localization and prognosis. *Gynecol Oncol.* 2018. 149:310-7. Doi: 10.1016/j.ygyno.2018.03.003
24. Hami LT, Lampe B, Mallman P, Forner DM. The impact of age on the prognosis of vulvar cancer. *Oncol Res Treat.* 2018. 41:520-4. Doi: 10.1159/000488800
25. van der Avoort IA, Shirango H, Hoevenaars BM, Grete HM, de Hullu JA, de Wilde PC et al. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol.* 2006. 25:22-9
26. Ueda Y, Enomoto T, Kimura T, Yoshino K, Fujita M, Kimura T. Two distinct pathways to development of squamous cell carcinoma of the vulva. *J Skin Cancer.* 2011. 2011:951250. Doi: 10.1155/2011/951250
27. Peder LD, Silva CM, Boeira VL, Plewka J, Turkiewicz M, Consolaro MEL et al. Association between human papillomavirus and non-cervical genital cancers in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018. 19:2359-71
28. Davidson EJ, Morris LS, Scott IS, Rushbrook SM, Bird K, Laskey RA et al. Minichromosome maintenance (Mcm) proteins, cyclin B1 and D1, phosphohistone H3 and in situ DNA replication for functional analysis of vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer.* 2003. 88:257-62
29. Pietruszewska W, Klatla J, Borzecki A, Rieske P. *Folia Histochem Cytobiol.* 2008. 46:479-85. Doi: 10.2478/v10042-008-0076-6
30. Hay C, Lachance JA, Lucas FL, Smith KA, Jones MA. Biomarkers p16, HPV, and p53 predict recurrence and survival in early stage squamous cell carcinoma of the vulva. *J Low Genit Tract Dis.* 2016. 20:252-6. Doi: 10.1097/LGT.0000000000000182
31. Rodrigues IS, Lavorato-Rocha AM, de M Maia B, de Carvalho FM, Baiocchi G, Soares FA et al. Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV. *Br J Cancer.* 2013. 109:184-94. Doi: 10.1038/bjc.2013.273

32. de Melo Maia B, Fontes AM, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Brot L, Baiocchi G et al. EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity. *Hum Pathol*. 2014. 45:917-25. Doi: 10.1016/j.humpath.2014.01.015
33. Mayer A, Schmidt M, Seeger A, Serras AF, Vaupel P, Schmidberger H. *BCM Cancer*. 2014. 14:760. Doi: 10.1186/1471-2407-14-760
34. Dong F, Kojiro S, Borger DR, Growdon WB, Oliva E. Squamous cell carcinoma of the vulva: A subclassification of 97 cases by clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features (p16, p53, and EGFR). *Am J Surg Pathol*. 2015. 39:1045-53. Doi: 10.1097/PAS.0000000000000454
35. Agostini A, Panagopoulos I, Andersen HK, Johannesen LE, Davidson B, Tropé CG et al. HMGA2 expression pattern and TERT mutations in tumors of the vulva. *Oncol Rep*. 2015. 33:2675-80. Doi: 10.3892/or.2015.3882
36. Folpe AL, Schoolmeester JK, McCluggage WG, Sullivan LM, Castagna K, Ahrens WA et al. SMARCB1-deficient vulvar neoplasms: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 14 cases. *Am J Surg Pathol*. 2015. 39:836-49. Doi: 10.1097/PAS.0000000000000397
37. Zięba S, Kowalik A, Zalewski K, Rusetska N, Goryca K, Piaścik A et al. Somatic mutation profiling of vulvar cancer: exploring therapeutic targets. *Gynecol Oncol*. 2018. 150:552-61. Doi: 10.1016/j.ygyno.2018.06.026
38. Aulmann S, Schleibaum J, Penzel R, Schirmacher P, Gebauer G, Sinn HP. Gains of chromosome region 3q26 in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the vulva are frequent and independent of HPV status. *J Clin Pathol*. 2008. 61:1034-7. Doi: 10.1136/jcp.2008.056275
39. van der Avoort IA, van de Nieuwenhof HP, Otte-Höller I, Nirmala E, Bulten J, Massuger LF et al. High levels of p53 expression correlate with DNA aneuploidy in (pre)malignancies of the vulva. *Hum Pathol*. 2010. 41:1475-85. Doi: 10.1016/j.humpath.2009.12.015
40. Micci F, Panagopoulos I, Haugom L, Dahlback HS, Pretorius ME, Davidson B et al. Genomic aberration patterns and expression profiles of squamous cell carcinomas of the vulva. *Gen Chromos Cancer*. 2013. 52:551-63. Doi: 10.1002/gcc.22053

41. de Melo Maia B, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues LS, Coutinho-Camillo CM, Baiocchi G, Stiepcich MM et al. microRNA portraits in human vulvar carcinoma. *Cancer Prev res (Phila)*. 2013. 6:1231-41. Doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0121
42. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*. 2004. 64:3087-95
43. Chang CC, Yang YJ, Chen ST, Lin BR, Wo TS, Lin SK et al. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013. 49:923-31. Doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.03.430
44. de Melo Maia B, Ling H, Monroig P, Ciccone M, Soares FA, Calin GA et al. Design of a miRNA sponge for the miRNA-17 miRNA family as a therapeutic strategy against vulvar carcinoma. *Mol Cell Probes*. 2015. 29:420-6. Doi: 10.1016/j.mcp.2015.08.002
45. Yang X, Wu X. miRNA expression. Profile of vulvar squamous cell carcinoma and identification of the oncogenic role of miR-590-5p. *Oncol Rep*. 2016. 35:398-408. Doi: 10.3892/or.2015.4344
46. Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*. 2001. 58:1189-205. Review
47. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003. 19:397-422
48. Berditchevski F. Complexes of tetraspanins with integrins: more than meets the eye. *J Cell Sci*. 2001. 114:4143-51
49. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat. Rev*. 2005. 5:136-48
50. Yang YG, Sari N, Zia MF, Lee SR, Song SJ, Kwon HY. Tetraspanins: Spanning from solid tumors to hematologic malignancies. *Exp Hematol*. 2016. 44:322-8. Doi: 10.1016/j.exphem.2016.02.006
51. van Spriel AB. Tetraspanins in the humoral immune response. *Biochem Soc Trans*. 2011. 39:512-7
52. Jones EL, Demaria MC, Wright MD. Tetraspanins in cellular immunity. *Biochem Soc Trans*. 2011. 39:506-11

53. Wright MD, Moseley GW, van Spriël AB. Tetraspanin microdomains in immune cell signaling and malignant disease. *Tissue Antigens*. 2004. 64:533-42
54. Vences-Catalán F, Rajapaska R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo CC, Levy R et al. Tetraspanin CD81 promotes tumor growth and metastasis by modulating the functions of T regulatory and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 2015. 75:4517-26. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1021
55. van Spriël AB, Figdor CG. The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes Infect*. 2010. 12:106-12
56. Thali M. The roles of tetraspanins in HIV-1 replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009. 339:85-102
57. Thali M. Tetraspanins functions during HIV-1 and influenza virus replication. *Biochem Soc Trans*. 2011. 39:529-31
58. Bonander N, Jamshad M, Hu K, Farquhar MJ, Stamatakis Z, Balfe P et al. Structural characterization of CD81-Claudin-1 hepatitis C virus receptor complexes. *Biochem Soc Trans*. 2011. 39:537-40. Doi: 10.1042/BST0390537
59. Hotta H, Ross AH, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao MV et al. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res*. 1988. 48:2955-62
60. Wright MD, Henkler KJ, Mitchell GF. An immunogenic Mr 23,000 integral membrane protein of *Schistosoma mansoni* worms that closely resembles a human tumor-associated antigen. *J Immunol*. 1990. 144:3195-200
61. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*. 1990. 10:4007-15
62. Fénéant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses*. 2014. 6:535-72. Doi: 10.3390/v6020535
63. Fast LA, Lieber D, Lang T, Florin L. Tetraspanins in infection by human cutomegalo- and papillomaviruses. *Biochem Soc Trans*. 2017. 45:489-97. Doi: 10.1042/BST20160295
64. Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol*. 2001. 155:1103-7. Review

65. Saiz ML, Rocha-Perugini V, Sánchez-Madrid F. Tetraspanins as organizers of antigen-presenting cell function. *Front Immunol.* 2018. 9:1074. Doi: 10.3389/fimmu.2018.01074
66. Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci.* 2003. 28:106-12
67. Hemler ME. Tetraspanin unctions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005. 6:801-811
68. Levy S, Shoram T. Protein-protein interactions in the tetraspanina web. *Physiology (Bethesda).* 2005. 20:218-24
69. Berditchevski F, Odintsova E, Sawada S, Gilbert E. Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanina-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem.* 2002. 277:36991-37000
70. Yáñez-Mó M, Barreiro O, Gordon-Alonso M, Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trend Cell Biol.* 2009. 19:434-46. Doi: 10.1016/j.tcb.2009.06.004
71. Imai TM, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol.* 1995. 155:1229-39
72. Hammond C, Denzin LK, Pan M, Griffith JM, Geuze HJ, Cresswell P. The tretaspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol.* 1998. 161:3282-91
73. Protzel C, Kakies C, Kleist B, Poetsch M, Giebel J. Down-regulation of the metastasis suppressor protein KAI1/CD82 correlates with occurrence of metastasis, prognosis and presence of HPV DNA in human penile squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2008. 452:369-75. Doi: 10.1007/s00428-008-0590-0
74. Spoden G, Freitag K, Husmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C et al. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16--involvement of tetraspanina-enroched microdomains (TEMs). *PLoS One.* 2008. 3:e3313. Doi: 10.1371/journal.pone.0003313
75. Scheffer KD, Berditchevski F, Florin L. The tetraspanin CD151 in papillomavirus infection. *Viruses.* 2014. 6:863-908. Doi: 10.3390/v6020893. Review

76. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013. 445:2-10. Doi: 10.1016/j.virol.2013.04.023
77. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. *Rev Med Virol*. 2015. 1:2-23. Doi: 10.1002/rmv.1822. Review
78. Fast LA, Mikiličić S, Fritzen A, Schwickert J, Boukhallouk F, Hochdorfer D et al. Inhibition of tetraspanin functions impairs human papillomavirus and cytomegalovirus infection. *Int J Mol Sci*. 2018. 19. Doi: 10.3390/ijms19103007
79. Scheffer KD, Gawlitza A, Spoden GA, Zhang XA, Lambert C, Berditchevski F et al. Tetraspanin CD151 mediates papillomavirus tupe 16 endocytosis. *J Virol*. 2013. 87:3435-46. Doi: 10.1128/JVI.02906-12
80. Homsy Y, Schloetel JG, Scheffer KD, Schimidt TH, Destainville N, Florin L et al. The extracellular δ -domain is essential for the formation of CD81 tetraspanin webs. *Biophys J*. 2014. 107:100-13. Doi.: 10.1016/j.bpj.2015.05.028
81. Surviladze Z, Dzidusko A, Ozbun MA. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS Pathog*. 2012. 8:e1002519. Doi: 10.1371/journal.ppat.1002519
82. Bailey RL, Herbert JM, Khan K, Heath VL, Bicknell R, Tomlinson MG. The emerging role of tetraspanin microdomains on endothelial cells. *Biochem Soc Trans*. 2011. 39:1667-73. Doi: 10.1042/BST20110745
83. Gräβel L, Fast LA, Scheffer KD, Boukhallouk F, Spoden GA, Tenzer S et al. The CD63-Syntenin-1 complex controls post-endocytic trafficking of oncogenic human papillomaviruses. *Sci Rep*. 2016. 6:32337. Doi: 10.1038/srep32337
84. Reyes R, Monjas A, Yáñez-Mó M, Cardeñes B, Morlino G, Gilsanz A et al. Different states of integrin LFA-1 aggregation are controlled through its association with tetraspanina CD9. *Biochim Biophys Acta*. 2015. 1853:2464-80. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.018
85. Wee JL, Schulze KE, Jones EL, Yeung L, Cheng Q, Pereira CF et al. Tetraspnin CD37 regulates β 2 integrin-mediated adhesion and migration in neutrophils. *J Immunol*. 2015. 195:5770-9. Doi: 10.4049/jimmunol.1402414
86. Jones EL, Wee JL, Demaria MC, Blakeley J, Ho PK, Vega-Ramos J et al. Dendritic cell migration and antigen presentation are coordinated by the opposing functions of the tetraspanin CD82 and CD37. *J Immunol*. 2016. 196:978-87. Doi: 10.4049/jimmunol.1500357

87. Quast T, Eppler F, Semmling V, Schild C, Homsi Y, Levy S et al. CD81 is essential for the formation of membrane protrusions and regulates Rac1-activation in adhesion-dependent immune cell migration. *Blood*. 2011. 118:1818-27. Doi: 10.1182/blood-2010-12-326595
88. Doyle EL, Ridger V, Ferraro F, Turmaine M, Safting P, Cutler DF. CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood*. 2011. 118:4265-73. Doi: 10.1182/blood-2010-11-321489
89. Zelman-Toister E, Bakos E, Cohen S, Zigmond E, Shezen E, Grabovsky V et al. CD151 regulates T-cell migration in health and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016. 22:257-67. Doi: 10.1097/MIB.0000000000000621
90. Nishiuchi R, Sanzen N, Nada S, Sumida Y, Wada Y, Okada M et al. Potentiation of the ligand-binding activity of integrin alpha3beta1 via association with tetraspanin CD151. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 102:1939-44
91. Zoller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009. 9:40-55
92. Huang CI, Kohno N, Ogawa E, Adachi M, Taki T, Miyake M. Correlation of reduction in MRP-1/CD9 and KAI1/CD82 expression with recurrences in breast cancer patients. *Am J Pathol*. 1998. 153:973-83
93. Erovcic BM, Pammer J, Hollemann D, Woegerbauer M, Geleff S, Fischer MB et al. Motility-related protein-1/CD9 expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2003. 25:848-57
94. Mhawech P, Herrmann F, Coassin M, Guillou L, Iselin CE. Motility-related protein 1 (MRP-1/CD9) expression in urothelial bladder carcinoma and its relation to tumor recurrence and progression. *Cancer*. 2003. 98:1649-57
95. Saito Y, Tachibana Y, Yamane H, He P, Suzuki M, Minami S et al. Absence of CD9 enhances adhesion-dependent morphologic differentiation, survival, and matrix metalloproteinase-2 production in small cell lung cancer cells. *Cancer Res*. 2006. 66:9557-65
96. Hong IK, Jin YJ, Bun HJ, Jeoung DI, Kim YM, Lee H. Homophilic interactions of tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cell through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J Biol Chem*. 2006. 281:24279-92

97. Ridnour LA, Barasch KM, Windhausen AN, Dorsey TH, Lizardo MM, Yfantis HG et al. Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-mediated Akt activation. *PLoS One*. 2012. 7:e44081. Doi: 10.1371/journal.pone.0044081
98. Rorive S, Lopez XM, Maris C, Trepant AL, Sauvage S, Sadeghi N et al. TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas. *Mod Pathol*. 2010. 23:1418-28. Doi: 10.1038/modpathol.2010.136
99. Lewis TB, Robison JE, Bastien R, Milash B, Boucher K, Samlowski WE et al. Molecular classification of melanoma using real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer*. 2005. 104:1678-86
100. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabrò L, Spada M et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One*. 2009. 4:e5219. Doi: 10.1371/journal.pone.0005219
101. Radford KJ, Mallesch J, Hersey P. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int J Cancer*. 1995. 62:631-5
102. Radford KJ, Thorne RF, Hersey P. CD63 associates with transmembrane 4 superfamily members, CD9 and CD81, and with beta 1 integrins in human melanoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996. 222:13-8
103. Radford KJ, Thorne RF, Hersey P. Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J Immunol*. 1997. 158:3353-8
104. Jang HI, Lee H. A decrease in the expression of CD63 tetraspanin protein elevates invasive potential of human melanoma cells. *Exp Mol Med*. 2003. 35:317-23
105. Kwon MS, Shin SH, Yim SH, Lee KY, Kang HM, Kim TM et al. CD63 as a biomarker for predicting the clinical outcomes in adenocarcinoma of lung. *Lung Cancer*. 2007. 57:46-53
106. Zhijun X, Shulan Z, Zhuo Z. Expression and significance of the protein and mRNA of metastasis suppressor gene ME491/CD63 and integrin alpha5 in ovarian cancer tissues. *Eur J Gynaecol*. 2007. 28:179-83
107. Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 cell surface protein. *EMBO J*. 2006. 25:3934-42

108. Cruz-Munoz W, Khokha R. The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tumorigenesis and metastasis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008. 45:291-338
109. Rubstain E, Le Naour F, Lagaudriere-Gesbert C, Billard M, Conjeaud H, Boucheix C. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol.* 1996. 26:2657-65
110. Berditchevski F, Bazzoni G, Hemler ME. Specific association of CD63 with the VL-3 and VLA-6 integrins. *J Biol Chem.* 1995. 270:17784-90
111. Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell.* 1996. 7:193-207
112. Skubitz KM, Campbell KD, Iida J, Skubitz AP. CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits and activation signal in neutrophils. *J Immunol.* 1996. 157:3617-26
113. Berditchevski F, Odintsova E. Tetraspanins as regulators of proteins trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark).* 2007. 8:89-96
114. Kitani S, Berenstain E, Mergenhagen S, Tempst P, Siraganian RP. A cell surface glycoprotein of rat basophilic leukemia cells close to the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI). Similarity to human melanoma differentiation antigen ME491. *Biol Chem.* 1991. 266:1903-9
115. Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y et al. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic (Copenhagen, Denmark).* 2008. 9:540-58
116. Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell.* 1999. 10:2787-2802
117. Lekishvili T, Fromm E, Mjoomdar M, Berditchevski F. The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. *J Cell Sci.* 2008. 121:685-94. Doi: 10.1242/jcs.020347
118. Latysheva N, Muratov G, Rajesh S, Padgett M, Hotchin NA, Overduin M et al. Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Mol Cell Biol.* 2006. 26:7707-18

119. Duffield A, Kamsteeg EJ, Brown AN, Pagel P, Caplan MJ. The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H, K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100:15560-5
120. Takino T, Miyamori H, Kawaguchi N, Uekita T, Seiki M, Sato H. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commu*. 2003. 304:160-6
121. Toricelli M, Melo FH, Peres GB, Silva DC, Jasiulionis MG. Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Mol Cancer*. 2013. 12:22. Doi: 10.1186/1476-4598-12-22
122. Jung YS, Liu XY, Chirco R, Warner RB, Frigman R, Kim HR. TIMP-1 induces an EMT-like phenotypic conversion in MDCK cells independent of its MMP-inhibitory domain. *PLoS One*. 2012. 7:e38773. Doi: 10.1371/journal.pone.0038773
123. Egea V, Zahler S, Rieth N, Neth P, Popp T, Kehe K et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012. 109:E309-16. Doi: 10.1073/pnas.1115083109
124. Lee JH, Seo YW, Park SR, Kim YJ, Kim KK. Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res*. 2003. 63:7247-55
125. Kawana Y, Komiya A, Ueda T, Nihei N, Kuramochi H, Suzuki H et al. Location of KAI1 on the short arm of human chromosome 11 and frequency of allelic loss in advanced human prostate cancer. *Prostate*. 1997. 32:205-13
126. Liu WM, Zhang XA. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppressor. *Cancer Letters*. 2006. 240:183-94. Doi: 10.1016/j.canlet.2005.08.018
127. Yu Y, Yang JL, Markovic B, Jackson P, Yardley G, Barrett J et al. Loss of KAI1 messenger RNA expression in both high-grade and invasive human bladder cancers. *Clin Cancer Res*. 1997. 3:1045-9
128. Hinoda Y, Adachi Y, Takaoka A, Mitsuuchi H, Satoh Y, Itoh F et al. Decreased expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in gastric cancer. *Cancer Lett*. 1998. 129:229-34
129. Koener M, Krech T, Puls F, Lehmann U, Kreipe H, Christgen M. Limited value of KAI1/CD82 protein expression as a prognostic marker in human gastric cancer. *Dis Mark*. 2012. 32:337-42. Doi: 10.3233/DMA-2012-0896

130. Guo XZ, Friess H, Di Mola FF, Heinicke JM, Abou-Shady M, Graber HU et al. KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1998. 28:1481-8
131. Yang JM, Peng ZH, Si SH, Liu WW, Luo YH, Ye ZY. KAI1 gene suppresses invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma MHCC97-H cells in vitro and in animal models. *Liver Int*. 2008. 28:132-9. Doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01620.x
132. Maurer CA, Graber HU, Friess H, Beyermann B, Willi D, Netzer P et al. Reduced expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in advanced colon cancer and its metastases. *Surgery*. 1999. 126:869-80
133. Yang X, Wei L, Tang C, Slack R, Montgomery E, Lippman M. KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2000. 6:3424-9
134. Zhang B, Liu W, Li L, Lu J, Liu M, Sun Y et al. KAI1/CD82 and cyclin D1 as biomarkers of invasion, metastasis and prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2013. 6:1060-7
135. Scarpino S, Duranti E, Giglio S, Di Napoli A, Galafate D, Del Bufalo D et al. Papillary carcinoma of the thyroid: high expression of COX-2 and low expression of KAI1/CD82 are associated with increased tumor invasiveness. *Thyroid*. 2013. 23:1127-37. Doi: 10.1089/thy.2011.0421
136. Xu JH, Guo XZ, Ren LN, Shao LC, Liu MP. KAI1 is a potential target for anti-metastasis in pancreatic cancer cells. *World J Gast*. 2008. 14:1126-32
137. Miller J, Dreyer TF, Bächer AS, Sinner EK, Heinrich C, Bengé A et al. Differential tumor biological role of the tumor suppressor KAI1 and its splice variant in human breast cancer cells. *Oncotarget*. 2018. 9:6369-90. Doi: 10.18632/oncotarget.23968
138. Romanska HM, Berditchevski F. Tetraspanins in human epithelial malignancies. *J Pathol*. 2011. 223:4-14. Doi: 10.1002/path.2779
139. Hassuna N, Monk PN, Moseley GW, Partridge LJ. Strategies for targeting tetraspanin proteins: potential therapeutic applications in microbial infections. *BioDrugs*. 2009. 23:341-59. Doi: 10.2165/11315650-000000000-00000
140. [ATCC] American Type Culture Collection. The global biosource center. 2018. Disponível em: <https://www.atcc.org/STR_Database.aspx>
141. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970. 227:680-5

142. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004. 64:5245-50
143. Dong JT, Lamb WP, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, et al. KAI 1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science (Washington DC)*. 1995. 268: 884-886
144. Wang G, Zhang L, Zhou Y, Sun Q, Xu H, Cai F et al. KAI1/CD82 genetically engineered endothelial progenitor cells inhibit metastasis of human nasopharyngeal carcinoma in a mouse model. *Med Sci Monit.* 2018. 24:3146-52. Doi: 10.12659/MSM.907219
145. Liu WH, Li X, Zhu XL, Hou ML, Zhao W. CD63 inhibits the cell migration and invasion ability of tongue squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2018. 15:9033-42. Doi: 10.3892/ol.2018.8499
146. Kreger BT, Johancen ER, Cerione RA, Antonyak MA. The enrichment of surviving in exosomes from breast cancer cells treated with paclitaxel promotes cell survival and chemoresistance. *Cancer (Basel)*. 2016. 8(12)
147. Fellman C, Lowe SW. Stable RNA interference rules for silencing. *Nat Cell Biol.* 2014. 16:10-8. Doi: 10.1038/nbc 2895. Review
148. [Sigma Aldrich] MISSION® esiRNA powered by Euphoria Biotech. esiRNA/esiFLEX/Non-coding – Benefits. 2018. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mission-esirna.html#top>>
149. Forte D, Salvestrini V, Corradi G, Rossil L, Catani L, Lemoni RM et al. The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) promotes survival and migration of acute myeloid leukemia cells through CD63/PI3K/Akt/p21 signaling. *Oncotarget.* 2017. 8:2261-74. Doi: 10.18632/oncotarget.13664

APÊNDICE

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Tetraspaninas em carcinoma de vulva: Correlação da expressão de CD63 e CD82 com a infecção pelo HPV

Pesquisador: KÁTIA CANDIDO CARVALHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55761016.2.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.540.225

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo in vitro onde linhagem de células de tumor de vulva serão analisadas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o perfil de expressão das tetraspaninas CD63 e CD82 em células de carcinoma de vulva, com e sem infecção pelo HPV, utilizando a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR);

Avaliar a expressão de CD63 e CD82 em células de carcinoma de vulva, com e sem infecção pelo HPV, por Western Blot;

Avaliar os efeitos da depleção transiente das tetraspaninas CD63 e CD82, por RNAi (RNA de Interferência), em células com e sem infecção pelo HPV;

Avaliar os efeitos dessa depleção na viabilidade, capacidade de migração e proliferação das células em cultura

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

este estudo não será feito com amostras de seres humanos apenas com linhagens de células comerciais

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa in vitro sem necessidade de avaliação da comissão de ética

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 1.540.225

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

nao ha necessidade de termo uma vez que nao existe sujeito de pesquisa

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendencia

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_688630.pdf	02/05/2016 18:12:09		Acelto
Outros	cadastroOnlineDepart.pdf	02/05/2016 18:09:16	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Acelto
Outros	aprovacaoCepdog.pdf	02/05/2016 18:08:40	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Acelto
Folha de Rosto	FRdepart.pdf	02/05/2016 18:07:08	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DISPENSA_TCLE.doc	01/04/2016 09:18:43	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_KELLY.pdf	30/03/2016 12:25:04	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Maio de 2016

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Kolke Folgueira
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 35
 Bairro: PACAEMBU CEP: 01.245-903
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3893-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. Ferreira KP, Almeida BC, Garcia N, Rodrigues I, Rocha RM, Baracat EC, Carvalho KC. **“Expressão de ONCOMIRs como potenciais marcadores de agressividade em carcinoma vulvar”**. A.C. Camargo Cancer Center – *Next Frontiers to Cure Cancer* (2º edição). São Paulo/Brasil. 20 – 22 abril 2017
2. Ferreira KP, Narciso HJ, Garcia N, Baracat EC, Carvalho KC. **“Metastatic vulvar carcinoma cells show rs4986938 polymorphism in Estrogen Receptor β ”**. AACR - International Conference on Translational Cancer Medicine. São Paulo/Brasil. 04 – 06 maio 2017
3. Ferreira KP, Garcia N, Baracat EC, Carvalho KC. **“Tetraspanins CD63 and CD82 as markers of prognosis in vulvar carcinoma cells”**. ISGE – Gynecological endocrinology. The 18TH world congress. Firenze/Italy. 7 – 10 março 2018
4. Ferreira KP, Garcia N, Baracat EC, Carvalho KC. **“Non-canonical activation of SHH signaling as a metastatic marker in vulvar cancer”**. ISGE – Gynecological endocrinology. The 18TH world congress. Firenze/Italy. 7 – 10 março 2018
5. Garcia N, Ferreira KP, Rocha AA, Baracat EC, Carvalho KC. **“New therapeutic targets for uterine leiomyosarcoma: Gant61 as a blocker to non-canonical activation of Sonic Hedgehog pathway”**. ISGE – Gynecological endocrinology. The 18TH world congress. Firenze/Italy. 7 – 10 março 2018