Lizeth Carolina Córdoba Camacho

**Caracterização funcional do SNP rs6917 na 3'UTR do gene
Proibitina: associação com quimiorresistência em linhagens
de melanoma humano e melanoma de crescimento vertical**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

São Paulo

2018

Lizeth Carolina Córdoba Camacho

**Caracterização funcional do SNP rs6917 na 3'UTR do gene
Proibitina: associação com quimiorresistência em linhagens
de melanoma humano e melanoma de crescimento vertical**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

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

Córdoba Camacho, Lizeth Carolina

Caracterização funcional do SNP rs6917 na 3'UTR
do gene Proibitina : associação com
quimiorresistência em linhagens de melanoma humano
e melanoma de crescimento vertical / Lizeth

Carolina Córdoba Camacho. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Proibitina 2.Região 3' não
traduzida 3.Rs6917 4.Melanoma 5.Resistência à
medicamentos 6.Temozolomida 7.Cisplatina
8.Vermurafenib

USP/FM/DBD-003/18

Dedico este trabajo a todos los pacientes oncológicos, especialmente a los héroes más pequeños, que día a día son la fuente de inspiración de este y muchos otros estúdios...

A Dios...

A mis padres, hermanos y sobrino...

A mi Padrino Juan José que está en el cielo...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as oportunidades, bênçãos recebidas, por me colocar sempre no lugar certo, no momento certo, com as pessoas certas, por semear no meu coração essa vontade de aprender sobre toda a sua criação e por me dar a missão de pesquisar com o fim de ajudar.

Ao Professor Dr. Roger Chammas, meu Orientador, exemplo de pesquisador e excelente ser humano, obrigada por todos os ensinamentos, todas as discussões, por me abrir as portas do meu segundo lar, me ajudar a construir o início do meu caminho científico, por confiar no meu trabalho e por me incentivar sempre a continuar.

A mis padres, hermanos y sobrino, por todo el apoyo, cariño, comprensión, por ser ejemplo de perseverancia, por tener siempre las palabras correctas cuando desfallecía, por enseñarme que no hay límites para alcanzar los sueños.

À equipe da 3'UTR-PHB “minhas mães” Tuty, Lu Andrade e Pri, por toda a paciência, por me abrirem as portas no lab, me incluírem no seu grupo de pesquisa e me acompanharem no caminho.

À Lu Andrade, minha “Co-orientadora”, obrigada! Pela a infinita paciência que você sempre teve comigo, por tirar o tempo do Gu, das férias, dos fins de semanas e noites, só para me ajudar, por puxar a minha orelha todas as vezes que precisei, por me mandar tantas vezes ao milho, mas sobre tudo, por ser sempre um exemplo, por me ajudar a ser mais crítica com meu trabalho e por me proporcionar todas as ferramentas para aprender e para alcançar meus objetivos.

À Tutis, a primeira pessoa que conheci e que me recebeu no lab, a Japinha mais especial que tem me ensinado tantas coisas ao nível profissional e pessoal, obrigada! Por ser luz em tantos momentos de escuridão, por ser motivo de inspiração no meu caminho, por me motivar a ser cada dia melhor. Obrigada, por me incluir em seus projetos, buscando sempre o meu crescimento profissional, por todas as lições de casa dadas e por os milhões de conselhos que recebi. Eu nunca vou terminar de agradecer a Deus pelo presente tão lindo que é a sua presença e amizade na minha vida.

À Re Saito, por me ajudar desde o planejamento dos experimento como no planejamento do futuro quando parecia incerto, por aparecer magicamente sempre que eu precisava desabafar, por me escutar e aconselhar sempre, por aguentar as minhas lágrimas e compartilhar o seu sorriso comigo.

À Mairita um agradecimento especial, por me aguentar os últimos anos, por ser minha irmãzinha de diferentes pais, por escutar cada uma das minhas histórias, por me aconselhar e segurar minha mão cada vez que precisei.

À Nati por me brindar sua amizade incondicional sempre, por me ajudar em todos os aspectos da minha vida, profissionais e pessoais, por ser motivo de inspiração e me demonstrar que a vontade vence qualquer obstáculo e é combustível suficiente para alcançar as metas.

À Mayarita, você foi um anjinho em todo este processo! Obrigada por estar comigo durante todo o percorrido e por segurar a minha mão sempre. Muchas gracias por a infinidade de conselhos e por me motivar sempre tanto científica como espiritualmente.

Aos meus colegas do laboratório de Oncologia Experimental, que na realidade são mais que colegas, são amigos que compartilham a mesma paixão por fazer ciência, obrigada por todos os “lab meetings/eatings”, por todas as discussões, por me ensinarem em todas as línguas a ser mais crítica e a cultivar a minha competência e profissionalismo.

Ao grupo dos Tumores múltiplos Tuty, Miyuki, Alexis, Rossana, obrigada por todas as reuniões onde aprendi tantas coisas, por abrir a minha mente ao compartilhar suas opiniões e pontos de vista em cada um dos nossos encontros, por me ensinar a “vender o peixe” e por me ensinar que a pesquisa deve ser feita com um sorriso no rosto. Obrigada, por ser esse grupo motivado, levo vocês no meu coração.

À Ema, Adalbertito, Sil, Mari, Jime, Silvina, Angélica minha eterna gratidão a vocês, pela amizade, carinho, por me permitir conhecer vocês e a levar um pedacinho de cada um comigo, por me incentivar e motivar cada dia, obrigada por ser parte desse caminho.

Àos “alpinitos” Mapa, Juan, Mairita, Ruchi, Roger, Lejis, León e á alpinita menor Alicia por estarem comigo em todos momentos, por me fazerem sorrir sempre, por compartilharem as minhas lutas e comemorarem as minhas vitórias.

Aos “maduritos” Wilfre e Anghelito, obrigada por todos os cafés compartilhados, por me mostrarem o outro lado da vida que não enxergava, por tantas risadas e conversas que tiraram todo tipo de preocupação, obrigada por esse toque de loucura e amor que vocês colocaram em cada uma das nossas vivencias.

À comunidade do Regnum Christi por ser parte fundamental no meu crescimento espiritual e pessoal, por me ajudar a andar no caminho sem desistir dos meus sonhos, por fazer pequenos todos os obstáculos que originalmente enxergava muito grandes.

Ao povo brasileiro por me receber e acolher como se tivesse nascido em este lindo solo, por compartilhar comigo toda a história do país na forma de músicas, poemas, comidas, caipirinhas, paisagens e todas as outras riquezas de sua cultura.

À banca examinadora e suplente por aceitar o convite de compartilhar esses resultados com vocês, por o tempo investido em ler este trabalho.

Às agencias financiadoras CAPES, FAPESP e CNPq por fazer este projeto realidade.

"A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara esa gota"

Madre Teresa de Calcuta

NORMATIZAÇÃO UTILIZADA

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
1.1 Melanoma.....	1
1.2 Tratamento.....	4
1.3 Proibitina (PHB) na quimiorresistência em melanoma.....	7
1.4 3'UTR e PHB.....	9
1.5 Importância da 3'UTR.....	11
2 JUSTIFICATIVA.....	16
3 OBJETIVOS.....	17
4 MÉTODOS.....	18
4.1 Pacientes.....	18
4.2 Avaliação dos pacientes.....	18
4.3 PCR em Tempo Real –Ensaio TaqMan®.....	20
4.4 Linhagens celulares.....	22
4.5 Curva de toxicidade a geneticina.....	23
4.6 Geração de células estáveis.....	23
4.7 Atividade do gene repórter Luc2.....	24
4.8 Avaliação de proliferação celular por azul tripan.....	25
4.9 Imunofluorescência.....	26
4.10 Ensaio de morte celular.....	26

4.11 Ensaio clonogênico.....	28
4.12 Obtenção de populações homogêneas (Subclonagem).....	28
4.13 Ensaio de migração por estímulo com risco.....	29
4.14 Análise qualitativa da migração celular.....	30
4.15 Predição de possíveis miRNAs.....	30
4.16 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 O polimorfismo rs6917 está associado com o aparecimento de melanoma de crescimento vertical.....	36
5.2 O polimorfismo rs6917 (UTR/T) modula a atividade transcricional <i>in vitro</i> incrementando os níveis da atividade da luciferase.....	41
5.3 A superexpressão da variante UTR/T modula positivamente a proliferação das células de melanoma humano.....	44
5.4 A superexpressão da variante UTR/T modula a localização subcelular da PHB no núcleo nas células de melanoma humano.....	45
5.5 A superexpressão da variante UTR/T modula positivamente a quimiorresistência em melanoma humano.....	49
5.6 A superexpressão da variante UTR/T modula positivamente a migração nas células de melanoma humano SK-Mel-05.....	55
5.7 A superexpressão da 3'UTR/T da <i>PHB</i> pode atuar como esponja de miRNAs modulando a quimiorresistência em melanoma.....	59
6 CONCLUSÕES.....	65
7 REFERÊNCIAS.....	68
8 ANEXOS.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento do melanoma.

Figura 2. Linha de tempo dos medicamentos aprovados pela (FDA) para melanoma.

Figura 3. Papel da proibitina na célula.

Figura 4. Representação da estrutura do transcrito da proibitina com o polimorfismo rs6917 na 3'UTR.

Figura 5. Frequência alélica das variantes polimórficas na posição 1703 da 3'UTR do gene *PHB*.

Figura 6. Frequência genotípica do polimorfismo rs6917 da *PHB* segundo o HAPMAP Project em diferentes populações no mundo.

Figura 7. Função da 3'UTR.

Figura 8. Regulação da localização subcelular do RNAm dependente de sinais de locação.

Figura 9. Expressão gênica dependente da 3'UTR.

Figura 10. Função da 3'UTR sobre a proteína sintetizada.

Figura 11. Discriminação alélica de algumas das amostras dos casos e controles obtido mediante a genotipagem por PCR em Tempo Real TaqMan®.

Figura 12. Vetores utilizados na transfecção das células.

Figura 13. Representação da metodologia utilizada na elaboração deste trabalho.

Figura 14. Análise de curva de sobrevida (Kaplan-Meier) para os pacientes da UNICAMP.

Figura 15. Aspectos morfológicos das células de melanoma humano SK-MEL-05e UACC-62 transfectadas com o vetor vazio (EV), a variante C (UTR/C) e a variante T (UTR/T) da 3'UTR da *PHB*.

Figura 16. Atividade relativa do gene repórter Luciferase (LUC2/*Renilla*) decorrente do efeito do SNP rs6917.

Figura 17. Representação gráfica da proliferação no tempo das células superexpressando as variantes alélicas 3'UTR/C e 3'UTR/T da *PHB*.

Figura 18. A 3'UTR/T da *PHB* modula a localização subcelular da PHB no núcleo das células de melanoma humano.

Figura 19. Resposta à temozolomida das células UACC-62 (A) e SK-Mel-05(B) transfectadas com o vetor vazio.

Figura 20. Resposta a vemurafenib das células UACC-62 (A) e SK-Mel-05(B) transfectadas com o vetor vazio.

Figura 21. O SNP rs6917 influencia a resposta de morte celular nas células UACC-62 e SK-Mel-05 após tratamento com temozolomida.

Figura 22. O SNP rs6917 influencia a resposta de morte celular nas células UACC-62 e SK-Mel-05 após tratamento com vemurafenib.

Figura 23. O SNP rs6917 influencia a resposta de morte celular nas células UACC-62 após tratamento com cisplatina.

Figura 24. Efeito da 3'UTR/T da *PHB* na migração nas células de melanoma humano SK-Mel-05.

Figura 25. Efeito da 3'UTR/T da *PHB* na migração nas células de melanoma humano UACC-62.

Figura 26. Representação gráfica do percurso migratório individual realizado por as células de melanoma humano.

Figura 27. Possível mecanismo de ação da superexpressão das variantes alélicas da 3'UTR da *PHB*.

Figura 28. Representação gráfica de uma rede biológica de interação gênica que considera os genes envolvidos na regulação pelos microRNAs preditos para as variantes polimórficas 3'UTR/C (A) e 3'UTR/T (B) investigadas nesse estudo.

Figura 29. Representação gráfica dos processos celulares preditos pelo Genecodis onde se encontram enriquecidos os alvos regulados pelos microRNAs preditos para a variante polimórfica 3'UTR/C (A) e 3'UTR/T (B) da *PHB*.

Figura 30. Representação gráfica das vias celulares preditas pelo KEGG onde se encontram enriquecidos os alvos regulados pelos microRNAs preditos para a variante polimórfica 3'UTR/T da *PHB*.

Figura 31. Possível efeito da superexpressão da 3'UTR/T da *PHB*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das linhagens celulares utilizadas

Tabela 2. Descrição do polimorfismo rs6917 do gene da proibitina.

Tabela 3. Clones UACC-62 e SK-Mel-05 escolhidos segundo as unidades de bioluminescência LUC2/*Renilla* apresentadas.

Tabela 4. Associação de variáveis clínicas com a presença de melanoma entre os casos e os controles

Tabela 5. Variáveis clínicas como fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma.

Tabela 6. Distribuição genotípica e frequência alélica para os casos e controles de melanoma.

Tabela 7. Associação do SNP rs6917 (modelo dominante) com o melanoma de crescimento vertical.

Tabela 8. miRNAs preditos para cada variante polimórfica 3'UTR da *PHB*

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μM	Micrometro
2n	Diploide
3'UTR	Região 3' Não traducida do inglês "Untranslated region"
3'UTR/C	Variante común da Região 3' Não traducida da Proibitina (do inglês "Untranslated region")
3'UTR/T	Variante polimórfica da Região 3' Não traducida da Proibitina (do inglês "Untranslated region")
ACT-B:	Actina B
ASE	Expressão alelo específica do inglês "Allelic Specific Expression"
BSA	Albumina de soro bovino do inglês "Bovine Serum Albumin"
C>T	Troca de uma citocina por uma timina
CC	Genótipo homozigoto para o alelo común CC
CEP	Comitê de ética em pesquisa
Chr	Cromossomo
CO₂	Dioxido de carbono
CT	Genótipo heterozigoto CT
CTO	Centro de Investigação Translacional em Oncologia
DMEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EV	Vetor vazio do inglês "Empty vector"
FDA	Food and Drug Administration
Fwd	Primer forward
G418	Antibiótico de selecção genética
h	Horas
hRluc-neo	Região codificadora do gene da luciferase obtido da <i>Renilla</i> , formando um cassete de resistência a neomicin
IC	Intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IL-2	Interleucina 2
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kD	Kilo Dalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KFG	Fator de crescimento de keratinocitos do inglês "Keratinocyte Growth Factor"
LUC2	Luciferase de vagalume
min	Minuto
miRNAs	MicroRNAs
mm	Milimetro
N	Número de indivíduos
ng	Nanogramo
NIH	National Institutes of Health

°C	Grado Celsius
OPTI-MEM	Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium reduzido em soro
OR	Razão de chances do inglês "Odds ratio"
ORF	Open Reading Frame
PANTHER	Protein Analysis Through Evolutionary Relationships
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino do inglês Phosphate buffered saline
PCR	Reacção em cadeia da polimerase do inglês Polymerase Chain Reaction
PHB	Proibitina (proteína)
<i>PHB</i>	Proibitina (gene)
PI	Iodeto de propídio do inglês "Propidium iodate"
PLX-4032	Vemurafenib
qRT-PCR	PCR em tempo real do inglês "Real Time Quantitative Reverse Transcription PCR"
Rb	Retinoblastoma
RBP	Proteína Retinoblastoma
Rev	Primer reverse
RLU	Unidades relativas de luminiscência
RNA	Ácido ribonucleico do inglês "Ribonucleic acid"
RNA_m	ARN mensageiro
rpm	Revoluções por minuto
s	Segundo
SBF	Soro Bovino Fetal do inglês "Fetal Bovine serum"
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
SNP	Polimorfismo de unica base do inglês "Single nucleotide polymorphism"
SUS	Sistema único de saúde
SV40	Promotor do Papovirus
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TT	Genótipo homozigoto para o alelo polimórfico TT
UNICAMP	Universidade de Campinas
UTR	Região não traduzida, do inglês "Untranslated region"
UTR/C	Variante común da Região 3' Não traducida da Proibitina (do inglês "Untranslated region")
UTR/T	Variante polimórfica da Região 3' Não traducida da Proibitina (do inglês "Untranslated region")
UV	Luz ultravioleta

RESUMO

Córdoba Camacho LC. Caracterização funcional do SNP rs6917 na 3'UTR do gene Proibitina: associação com quimiorresistência em linhagens de melanoma humano e melanoma de crescimento vertical [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O melanoma cutâneo é um tipo de tumor formado a partir dos melanócitos, células de origem neuroectodérmica que habitam a epiderme, sendo responsáveis por sua pigmentação. Embora este tumor seja o tipo menos frequente de câncer de pele, ele está associado com altas taxas de mortalidade, principalmente devido a seu comportamento agressivo (alta capacidade metastática) e quimiorresistência aos tratamentos (quimioterapia e radioterapia). Os processos da quimiorresistência em melanoma ainda não são totalmente conhecidos. Estudos prévios de nosso grupo evidenciaram que a expressão da proteína Proibitina (PHB) encontra-se aumentada em células de melanoma frente à exposição a certos quimioterápicos, executando sua função de molécula anti-apoptótica, quando localizada no citoplasma, e/ou supressora tumoral quando no núcleo. Adicionalmente, foi visto que a repressão de PHB sensibiliza as células de melanoma, enquanto a sua superexpressão protege da morte celular induzida por cisplatina. Além disso, estudos de associação genótipo-fenótipo revelaram que o alelo menos frequente/raro do SNP rs6917 (C1703T) na região 3'UTR do gene da *PHB* foi associado com o risco aumentado de desenvolvimento do melanoma. O objetivo do nosso trabalho foi avaliar o envolvimento do SNP rs6917 da 3'UTR do gene *PHB* em linhagens de melanoma humano e sua resposta celular frente ao tratamento com agentes quimioterápicos indutores de estresse celular como temozolomida, cisplatina e

vemurafenib. Para avaliar a contribuição do polimorfismo rs6917 no desenvolvimento de melanoma, foi desenvolvido um estudo tipo caso-controle numa população brasileira. O estudo analisou 198 pacientes com melanoma e 200 controles. Em ensaios *in vitro* as linhagens celulares de melanoma humano SK-Mel 05 e UACC-62 (BRA^{FV600E} mutadas) foram transfectadas com as variantes polimórficas UTR/C e UTR/T clonadas no plasmídeo pmirGLO Dual-Luciferase nos sítios de restrição NheI/XhoI. A Geneticina (G418) foi utilizada para seleção estável das células, ensaios de western Blot, qRT-PCR e luminiscência confirmaram a expressão do transgene. As diferentes doses de cisplatina, temozolomida e vemurafenib foram definidas para o tratamento das células. Para avaliar a morte celular foi realizada a técnica de citometria de fluxo após incorporação com iodeto de propídio. Após os tratamentos, foram realizados ensaios clonogênicos e de imunofluorescência para determinar sobrevivência celular e localização subcelular da proibitina, respectivamente. Nossos resultados revelaram que variáveis clínicas como a presença de cabelos claros (loiros ou ruivos), mais de 20 pintas, exposição solar intermitente, queimaduras solares na infância e adolescência são fatores de risco para o aparecimento de melanoma. Nos casos, os portadores do alelo T mostraram um risco aumentado em 5,6 vezes para o desenvolvimento de melanoma de crescimento vertical em comparação com os pacientes com genótipo CC. Ensaios *in vitro*, mostraram que células de melanoma humano superexpressando o alelo raro 3'UTR/T após tratamento com cisplatina, temozolomida e vemurafenib apresentavam um fenotipo mais proliferativo e clonogênico com menor morte celular quando comparadas com as células 3'UTR/C e vetor vazio. Ensaios de Western blot e bioluminescência mostraram, respectivamente, um aumento na expressão e atividade do gene da luciferase nas células 3'UTR/T. Estes resultados mostram que o SNP rs6917 modula a expressão de PHB e

que o alelo raro T representa um polimorfismo funcional promovendo a quimiorresistência em melanoma.

Descritores: proibitina; região 3' não traduzida; rs6917; melanoma; resistência à medicamentos; temozolomida; cisplatina; vemurafenib.

ABSTRACT

Córdoba Camacho LC. Functional characterization of SNP rs6917 at Prohibitin 3'UTR: association with chemoresistance in human melanoma cell lines and vertical growth melanoma. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Melanoma is a type of skin tumor formed from melanocytes, cells of neuroectodermal origin that inhabit the epidermis, being responsible for its pigmentation. Although its low incidence, melanoma is associated with high rates of mortality due to its resistance to chemotherapy. The mechanisms involved in melanoma chemoresistance are not well fully understood yet, therefore, the comprehension of this phenomenon may be useful for the development of new treatment strategies. Previous results from our laboratory showed that Prohibitin (PHB), a protein with diverse functions including regulation of cell cycle progression and apoptosis, was overexpressed in human melanoma cells lines when exposed to high-doses of the chemotherapy drug, cisplatin. PHB knockdown sensitized melanoma cells, meanwhile PHB recombinant overexpression protected melanoma cells to cisplatin-induced cell death. Studies of genotype-phenotype association revealed that the Single Nucleotide Polymorphism rs6917 at the portion 3'UTR of the *PHB* gene showed an association with some risk factors for the development of melanoma. The aim of this study was to investigate if the SNP rs6917 affects PHB protein function by modulating cell proliferation and chemoresistance in human melanoma cell lines when exposed to stress inductors agents such as cisplatin, temozolomide and vemurafenib. A hospital-based case-control study was carried out in a Brazilian sample to evaluate the contribution of rs6917 polymorphism in melanoma development. The study comprised 198 melanoma patients and 200 controls. For *invitro*

assays SK-Mel 05 and UACC-62 human melanoma cell lines (both BRAFV600E mutated) were used. The 852bp of *PHB*-3'UTR harboring wild-type (3'UTR/C) or the rare allele (3'UTR/T) were cloned at pmirGLO Dual-Luciferase plasmid at NheI/XhoI restriction sites and stable cell lines were generated. Geneticin (G418) was used for stable selection, qRT-PCR, Western Blot and luciferase assays confirmed the transgene expression. Different doses of cisplatin, temozolomide and vemurafenib were defined to treat the cells. Cell death was evaluated using flow cytometry after propidium iodide incorporation. Cell survival was assessed by clonogenic assay after cells undergone treatment. Our results revealed that clinical variables like presence of light hair, more than 20 moles, intermittent sun exposure and sunburns at childhood are risk factors for melanoma development. We also showed that T allele carriers have a 5,6 times increased risk to develop vertical growth melanoma in comparison with the CC genotype patients. In vitro assays with transfected melanoma cells, SK-Mel 05 and UACC-62, overexpressing the rare allele 3'UTR/T showed a more proliferative and clonogenic phenotype and less induced cell death after cisplatin, temozolomide and vemurafenib treatment when compared to cells overexpressing the wild-type allele 3'UTR/C and empty vector. Western blot and bioluminescence assays showed respectively an increase in the expression and activity of the luciferase gene of the 3'UTR/T cells in comparison with the 3'UTR/C and empty vector cells. All together these results showed that the SNP rs6917 modulates the expression of PHB and that the rare allele T represents a functional polymorphism by promoting a chemoresistance phenotype in melanoma.

Descriptors: prohibitin; 3'untranslated region; rs6917; melanoma; drug resistance; temozolomide, cisplatin, vemurafenib.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

O melanoma cutâneo é um tipo de tumor altamente agressivo formado a partir dos melanócitos, células de origem neuroectodérmica que habitam a epiderme, sendo responsáveis por sua pigmentação (Shain & Bastian, 2016).

O melanoma cutâneo apresenta baixa incidência (4% de todos os tumores de pele), no entanto, sua prevalência tem aumentado progressivamente nas últimas décadas (Menzies & Long, 2013), representando um problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, por exemplo, é o quinto tumor mais frequente em homens e o sexto em mulheres (Rastrelli *et al.*, 2013). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), nos últimos anos no Brasil, a sobrevida dos pacientes com melanoma aumentou devido à detecção precoce do tumor. No ano 2016 foram estimados pelo INCA, 5.670 novos casos, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres. No mesmo ano foram estimadas 1547 mortes, das quais 903 correspondem a homens e 644 a mulheres (INCA, 2017).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento desta doença encontram se relacionados com a exposição excessiva ao sol (raios ultravioleta UV-A: 320-400nm e UV-B, 290-320nm), tipo de pele, olhos e cabelos claros, história familiar de melanoma ou história prévia de câncer de pele, idade maior ou igual a 15 anos, presença de Xeroderma Pigmentoso, nevo congênito ou displásico (Gonçalves *et al.*, 2011)

O risco aumentado para o desenvolvimento desta doença provavelmente está relacionado com mudanças ambientais (aumento no padrão de exposição solar com níveis elevados de radiação ultravioleta -UV) e com certas atividades e hábitos da população. Essas mudanças, associadas com fatores de predisposição genética como fenótipo europeu (olhos, pele e cabelo claros e pele com difícil bronzeamento), história

familiar, nevus atípicos, etc., conferem risco aumentado para o desenvolvimento de melanoma.

Modelos de predição para o desenvolvimento de melanoma têm sido propostos com o objetivo de obter um melhor entendimento da doença, predizer grupos de risco e facilitar a estratégias de prevenção.

Segundo o modelo de Shain & Bastian (2016) os melanócitos transformados podem gerar lesões benignas conhecidas como nevo melanocítico que, por sua vez, podem evoluir a nevo displásico. Esse último pode progredir para o nevo maligno *in situ* e esse pode evoluir para a forma mais invasiva do melanoma (Figura 1). No entanto, a progressão do melanoma pode estar sujeita a variações dependendo da origem da transformação do melanócito iniciador, isto é, a progressão da doença pode ocorrer sem passar por todas estas fases. Mutações patogênicas têm sido determinadas ao longo do desenvolvimento da doença, alterando vias de sinalização importantes na regulação celular. À medida que a doença avança para a forma mais invasiva, ocorre o acúmulo de mutações que originam subpopulações de células malignas com diferentes fenótipos dentro de um mesmo tumor, consequentemente as células tumorais apresentam maior número de clones e variabilidade (Shain & Bastian, 2016).

Na iniciação da doença geralmente ocorrem alterações em genes envolvidos na proliferação celular como *BRAF*, *NRAS* e *NF1*. Na progressão da doença tem se determinado mutações em genes que estão envolvidos no remodelamento da cromatina como *ARID1A*, *ARID1B* e *ARID2*, já em lesões avançadas, podem ser observadas alterações em genes importantes associados a resistência à apoptose, crescimento e metabolismo celular, como *TP53* e *PTEN* (Zaidi, Day, & Merlino, 2008).

Figura 1. Desenvolvimento do melanoma. A. Imagens clínicas mostrando a progressão do melanoma através das etapas de nevo, nevo displásico, melanoma *in situ* e melanoma invasivo. B. Esquema ilustrando as características de invasão de cada uma das lesões mencionadas em A. C. Esquema representando a clonalidade do melanoma em cada uma das etapas de desenvolvimento, cada cor simboliza um clone com características adquiridas específicas. O melanoma torna-se mais policlonal à medida que evolue e as mutações pontuais se acumulam na transição para o melanoma invasivo. Adaptado de Shain H & Bastian B, 2016.

Figura 2. Linha do tempo dos medicamentos aprovados pela (FDA) para melanoma. A dacarbazina e as altas doses de IL-2 foram aprovadas em 1976 e 1998 respectivamente. No ano 2011, tanto vemurafenib como ipilimumab, foram aprovadas. Nivolumab e lambrolizumab foram aprovados em 2014 (Sullivan, Lorusso, & Flaherty, 2013).

1.2 Tratamento

O melanoma é curável na maioria dos casos se detectado nos estádios iniciais da doença. Neste caso o tratamento convencional do melanoma em sua forma radial (menos profundo) é a cirurgia. Quando a doença se torna metastática, o paciente apresenta pior prognóstico. Dependendo do grau, profundidade e espessura do tumor, além de cirurgia, o tratamento por quimioterápicos e/ou drogas com alvo-molecular é indicado. Ainda assim, nos casos de tumores metastáticos e doença refratária, as taxas de respostas são abaixo de 10%, com sobrevida média de seis a nove meses (Menzies & Long, 2013).

O primeiro fármaco aprovado pelo United States Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de melanoma foi a dacarbazina (Figura 2) O uso desta droga como monoterapia apresenta uma remissão completa em somente 5-10% dos pacientes. Embora, esta porcentagem seja baixa, a terapia com dacarbazina ainda se mantém como opção viável para tratamento de pacientes com melanoma no âmbito do Sistema Único de Saúde no Brasil (SUS). (Serrone, Zeuli, Sega, & Cognetti, 2000).

A dacarbazina, ou seu análogo temozolomida (também usado para o tratamento de melanoma metastático), atuam como agentes alquilantes de DNA. A temozolomida como monoterapia apresenta maior potencial de ação em relação à dacarbazina por ser mais penetrável em tumores do sistema nervoso central, o que aumenta a progressão livre de doença nos pacientes afetados com tumores deste tipo (1,5 meses para 1,9 meses) (Mouawad *et al.*, 2010).

Outro quimioterápico utilizado como opção para melanoma metastático é a cisplatina, conhecido como um agente indutor de dano no DNA (Cullen, Yang, Schumaker, & Guo, 2007). Este tratamento possui ação citotóxica por formar adutos de

DNA que afetam a replicação de DNA, não entanto, este quimioterápico não aumenta em forma significativa a resposta da sobrevida dos pacientes.

Outras estratégias terapêuticas focadas no estímulo da resposta imunológica do paciente foram incorporadas no âmbito clínico. O tratamento com altas doses de IL-2 foi aprovado pela FDA para melanoma metastático no ano 1998. Essa citocina estimula a proliferação e função das células T, aumenta a proliferação e atividade citotóxica das células *natural killer*, sendo benéfico para o paciente. No entanto, esse tratamento apresenta uma remissão completa somente em 5 a 10% dos pacientes tratados. Além da baixa resposta, as altas doses dessa citocina são altamente tóxicas (Mouawad *et al.*, 2010; Sullivan *et al.*, 2013).

Um dos maiores avanços no tratamento deste tumor foi baseado na descoberta de terapia alvo dirigida contra a mutação *BRAFV600E*. Como mencionado a biologia do melanoma inclui alteração em proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Entre 40-60% dos melanomas apresentam uma mutação ativadora no gene *BRAF* (via MAPK) (Keating, 2012): A mutação *BRAFT1799A* origina uma substituição de uma valina por ácido glutâmico (V600E) no domínio quinase da proteína BRAF, induzindo uma ativação desregulada da via MAPK e fosforilação em efetores *downstream* (MEK-ERK), originando uma proliferação celular aberrante e independente de fatores de crescimento (Holderfield, Deuker, McCormick, & McMahon, 2014; Keating, 2012; Miller, Flaherty, & Tsao, 2014). A inibição de BRAF quinase mutado em tumores BRAFV600E positivos como alvo terapêutico tem sido alcançada por meio de doses orais do inibidor de BRAFV600E denominado vemurafenib (PLX-4032). Este medicamento aprovado pela FDA no ano 2011, tem demonstrado uma alta taxa de resposta (superior a 50%) e aumento de sobrevida global em pacientes com melanoma metastático ou irresssecável e portadores da mutação V600E. (Menzies & Long, 2013).

Outros fármacos com ação immunomoduladora têm sido adotados para o tratamento de melanoma ultimamente. O ipilimumab, anticorpo monoclonal antiCTLA-4, foi aprovado pela FDA no ano 2011 e permite a manipulação da resposta antitumoral por linfócitos T. O bloqueio do antígeno de linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), que é expresso em linfócitos T ativados, atua como um regulador positivo da ativação dessas células. A resposta ao anti-CTLA-4 em estudos de fase II mostrou um aumento na sobrevida global dos pacientes tratados, no entanto, mostrou também uma baixa atividade antitumoral e alta toxicidade (Ribas *et al.*, 2015).

Fármacos como nivolumab e lambrolizumab tem ação anti PD-1. A inibição da união entre o receptor PD-1 das células T e o PD-1L nas células tumorais restora a resposta antitumoral imunológica das células T. Esses medicamentos foram aprovados em 2014 e mostraram maior eficiência que outros tratamentos utilizados para melanoma devido à alta taxa de resposta ao tratamento e a uma tolerância aumentada ao mesmo com menor quantidade de eventos adversos (Hamid *et al.*, 2013; Topalian *et al.*, 2014).

No entanto, o melanoma continua apresentando resistência a todas as modalidades terapêuticas existentes, o que reflete em suas altas taxas de mortalidade. Este tipo tumoral desenvolve táticas intrínsecas que promovem a sobrevivência celular mesmo após a exposição á agentes estressores. Sendo assim, atualmente o maior desafio para o melanoma é o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que superem os mecanismos de evasão da morte celular do tumor na busca da melhores taxas de sobrevida dos pacientes.

A combinação das monoterapias comerciais existentes com outras estratégias terapêuticas podem ser uma alternativa na sensibilização à morte celular que promoveria o ganho significativo de sobrevida para os pacientes.

1.3 Proibitina (PHB) na quimiorresistência em melanoma

Estudos prévios de nosso grupo revelaram a indução da expressão de proibitina (*PHB*) após tratamento com cisplatina, dacarbazina e temozolomida em linhagens quimiorresistentes de melanoma humano LB373-Mel, SK-Mel-37 e SK-Mel-85 (Citrangulo Tortelli Junior *et al.*, 2017). Os resultados revelaram o acúmulo de PHB no citoplasma e no núcleo, este acúmulo de PHB provavelmente é um mecanismo de resposta frente a agentes quimioterápicos para sobrevivência das células de melanoma.

A proibitina (Figura 3) é uma proteína codificada pelo gene da Proibitina (*PHB*) (17q21), que possui peso molecular de aproximadamente 30-32 kD (Manjeshwar, Branam, Lerner, Brackett, & Jupe, 2003; McClung, Jupe, Liu, & Dell’Orco, n.d.; Mishra, Murphy, Nyomba, & Murphy, 2005; Tang, Zhao, Nie, Wang, & Guan, 2013). Inicialmente, a PHB foi descrita como inibidora do ciclo celular, o que originou o seu nome “Proibitina” e a classificou como uma molécula supressora tumoral. Experimentos iniciais utilizando o RNAm da *PHB*, microinjetado em fibroblastos e células HeLa, revelaram o bloqueio do ciclo celular na fase S (Jupe, Liu, Kiehlbauch, McClung, & Dell’Orco, 1996; Mishra *et al.*, 2005; Nuell *et al.*, 1991).

No entanto o papel da PHB como molécula supressora de tumor ainda é controverso, pois os níveis de esta proteína parecem ser variáveis entre os tipos tumorais. A expressão aumentada de PHB tem sido observada em tumores de cervix, esôfago, mama, pulmão, bexiga, tireóide, ovário e próstata. Contudo, a expressão diminuída da PHB tem sido observada em glioma (Qian *et al.*, 2013).

Além de sua ação como potencial supressora tumoral, a PHB também participa dos processos de regulação da proliferação, anti-apoptóticos e da transcrição de genes regulatórios do ciclo celular (Jupe, Liu, Kiehlbauch, McClung, & Dell’Orco, 1995).

O papel que a PHB desempenha no meio celular depende da sua localização. A PHB pode se localizar na mitocôndria, núcleo e citoplasma (Rajalingam e Rudel, 2005). Quando encontra-se na mitocôndria, atua como chaperona e faz parte da estrutura da membrana da organela. No núcleo, a PHB atua como supressora do crescimento tumoral mediante sua interação com a proteína supressora tumoral Rb, que ocasiona a inibição e repressão da atividade transcricional de E2F (Wang, Fusaro, Padmanabhan, & Chellappan, 2002). Por outro lado, quando a PHB está localizada no citoplasma, esta proteína promove a proliferação celular mediante a participação na cascata de sinalização RAS/RAF. PHB se une diretamente a CRAF, o que garante a organização espacial entre RAS e RAF na membrana plasmática, levando a ativação de efetores *downstream* (Rajalingam e Rudel, 2005).

Figura 3. Papel da proibitina na célula. A proibitina é codificada pelo cromossomo 17q21. Uma vez sintetizada como proteína de 30KDa, pode se situar em diferentes compartimentos celulares. O papel da proibitina depende da sua localização subcelular. No núcleo PHB funciona como supressora do ciclo celular ao atuar com a proteína

Retinoblastoma (Rb), suprimindo a atividade do fator de transcrição E2F. Na mitocôndria, PHB atua como chaperona e faz parte da estrutura da membrana desta organela. Já quando PHB esta localizada na membrana citoplasmática, esta *proteína* participa da cascata de sinalização RAS/RAF que promove a proliferação celular. Adaptado de (Chatterjee & Pal, 2009; Chowdhury, Thompson, & Thomas, 2014).

1.4 3'UTR e PHB

Embora o produto proteico codificado pela ORF da *PHB* tenha funções específicas na célula, a atividade antiproliferativa/supressora foi atribuída à 3'UTR do seu transcrito (Jupe *et al.*, 2001, 1995; Manjeshwar *et al.*, 2003). No estudo realizado por Manjeshwar *et al.* 2003, este RNA foi proposto como elemento trans com função regulatória. De acordo com os autores, a introdução na célula unicamente do RNA codificado pela região 3'UTR da *PHB* é capaz de inibir a progressão e proliferação da célula entre as fases G1 e S em linhagens de câncer de mama e células epiteliais.

Ao longo da 3' UTR foram mapeados 14 *Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)* (<http://genome.ucsc.edu/>, Janeiro 2017). Até o momento, apenas o SNP rs6917 (troca de uma citosina por uma timina na posição 1703) possui relevância clínica (Figura 4). Estudos recentes mostram que a variante 3'UTR da *PHB* que contém o alelo raro T (3'UTR/T) esta fortemente associada com o risco no desenvolvimento de câncer de mama (Jakubowska *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2013) Além disso, estudos prévios de nosso grupo também revelaram a associação deste alelo raro com o risco aumentado no desenvolvimento de melanoma e câncer gástrico. (Gonçalves *et al.*, 2011; Leal *et al.*, 2014).

A frequência alélica de este polimorfismo na população é de 83% e 17% para o alelo selvagem C e o alelo polimórfico T respectivamente (Figura 5). As diferentes frequências genótípicas em diferentes populações no mundo são sumarizadas na Figura

6, sendo que a frequência do genotipo homozigotos dominantes (CC) na população é de 68%, para os heterozigotos (CT) de 28% e para os homozigotos recessivos (TT) 4%.

Figura 4. Representação da estrutura do transcrito da proibirina com o polimorfismo rs6917 na 3'UTR. C>T (Troca de uma citosina por uma timina na posição 1703 do transcrito). Os exons são representados como blocos azuis e os introns como linhas azuis. UTR: *Untranslated region*.

Figura 5. Frequência alélica das variantes polimórficas na posição 1703 da 3'UTR do gene *PHB*. Modificado de 1000 Genome Project (<http://www.internationalgenome.org/>).

Figura 6. Frequência genotípica do polimorfismo rs6917 da *PHB* segundo o HAPMAP Project em diferentes populações no mundo. CC: Homozigoto para o alelo selvagem C (laranja), CT: Heterozigoto (verde), TT: Homozigoto para o alelo raro T (azul). As diferentes populações analisadas estão contidas no eixo Y e as

porcentagens de cada genótipo encontram-se no eixo X. As porcentagens mostradas correspondem à média de todas as populações. CEU- European - 180 amostras de Utah com ancestralidade Europeia, HCB - Han Chinese - 90 amostras de Han Chinese em Beijing, China, JPT - Japanese Tokyo - 91 amostras de Japoneses em Tokyo, Japan , YRI - Yoruba African - 180 amostras de Yoruba em Ibadan, Nigeria, ASW - 90 amostras de descendentes africanos em Southwest, USA, CHD - 100 amostras de Chineses em Metropolitan Denver, Colorado, GIH - 100 amostras de indígenas Gujarati em Houston, Texas, LWK - 100 amostras de Luhya em Webuye, Kenya, MEX - 90 amostras de descendentes mexicanos em Los Angeles, California, MKK - 180 amostras de Maasai em Kinyawa, Kenya, TSI: 100 amostras de Toscana na Italia, AVG: Média de todas as amostras dos grupos mencionados. Modificado de HAPMAP Project e SNPedia (<https://www.snpedia.com/index.php/Rs6917>).

Estudos de Manjeshwar *et al.*, 2003 descrevem que a presença do SNP rs6917 na região 3'UTR da *PHB* gera uma variante que pode inativar o RNAm, o que resulta na perda da função pró-apoptótica e um subsequente risco de crescimento maligno, aumentando tanto a atividade proliferativa como o risco de desenvolvimento tumoral. A variação alélica de este locus pode estar associada com a variação quantitativa do transcrito.

Estudos prévios do nosso laboratório (Processo FAPESP 2011/18337-6) revelaram que em linhagens de melanoma heterozigotas (CT) expostas à cisplatina o alelo raro é expresso preferencialmente nas células quimiorresistentes como SK-Mel-05 e UACC-62, comparadas com células sensíveis como SK-Mel-19. Estes resultados mostram que o SNP rs6917, além de potencialmente promover um risco aumentado para o desenvolvimento de melanoma, também pode estar associado com quimiorresistência ao tratamento.

1.5 Importância da 3'UTR

O dogma central da biologia molecular descreve que uma sequência de DNA gera uma proteína tendo como intermediário uma sequência de mRNA. Quando este

dogma foi descrito, o papel do RNA estava limitado a ser apenas um molde para o produto proteico codificado. Não entanto, em eucariotas uma vez ocorre a transcrição de DNA para RNA, o transcrito primário sofre modificações pós-transcricionais como a eliminação dos introns (splicing) e a incorporação da cauda poli-A e do 5'Cap, dando lugar a um RNA maduro (RNAm). A sequência resultante da união de exons (ORF) é logo traduzida dando origem a uma proteína. Antigamente consideravam-se importantes unicamente as regiões codificantes, e assim surgiu o termo “DNA lixo” (*DNA Junk*) designado a toda sequências não codificante de um produto protéico. No transcrito, os introns, as regiões 3'UTR, 5'UTR, a cauda poli-A, entre outros são consideradas regiões não codificantes, não entanto estas têm uma grande importância na regulação da expressão gênica por meio do controle pos-transcricional.

Especificamente, a região 3'UTR que se localiza imediatamente depois da ORF e antes da cauda poli-A, controla a estabilidade e localização do mRNA e a eficiência da tradução. Este controle se da por meio de sequências s específicas dentro da 3'UTR conhecidas como elementos cis. Estes elementos atuam como sítio de união de elementos regulatórios como *RNA binding proteins* (RBPs), microRNAs e complexos protéicos (Figura 7). O reconhecimento de estas sequências s dentro das 3'UTR por elementos regulatórios influenciam o destino tanto do transcrito como da proteína sintetizada, diversificando a localização subcelular e a meia vida do transcrito o que confere a complexidade biológica de um organismo.

Figura 7. Função da 3'UTR. Representação do transcrito maduro (RNAm). Zipcodes representados como estrelas verdes dentro da 3'UTR reconhecidos por elementos

regulatórios (Círculos amarelo, laranja e vermelho). 5'UTR: 5' *Untranslated region*, ORF: *Open Reading Frame*, 3'UTR: 3' *Untranslated region*, Poli-A: Cauda poli-A.

A regulação da localização celular do transcrito é mediada pela interação de sequências específicas dentro da 3'UTR com elementos trans como as RBPs, que a sua vez interagem com proteínas efetoras como por exemplo proteínas motoras (Figura 8). (Berkovits & Mayr, 2015; Meer *et al.*, 2012; Mitra, Johnson, & Collier, 2015; Rajalingam *et al.*, 2005). A 3'UTR como uma sequência específica atua como elemento de localização importante para direcionar o transcrito dentro da célula (Hirokawa, 2006). Assim, pequenas alterações na sequência como a troca de um único nucleotídeo (SNP) podem alterar o destino final do transcrito e, portanto, o compartimento celular onde a proteína será sintetizada (Mitra *et al.*, 2015).

Figura 8. Regulação da localização subcelular do RNAm dependente de sinais de localização. A 3' UTR contém elementos cis que são reconhecidos por *RNA-binding protein* (RBP) (laranja). A RBP é reconhecida por uma proteína motor (azul clara), que interage com uma fibra de actina (verde) permitindo o movimento e localização do transcrito dentro da célula.

A meia vida e a taxa de tradução de um transcrito também podem ser afetadas pelos elementos cis dentro da 3'UTR (Gruber *et al.*, 2014). Se este elemento é reconhecido por uma RBP, este pode formar um complexo que recruta fatores regulatórios como deadenilases ou fatores *decapping*, o que induz a remoção da cauda poli-A ou o 5'Cap, respectivamente, o que resultaria na desestabilização do transcrito e na repressão da atividade traducional. Os miRNAs podem também reconhecer

sequências específicas dentro da 3'UTR, o que induz uma posterior degradação do transcrito e afeta a meia vida do mesmo (Berkovits & Mayr, 2015; Mitra *et al.*, 2015; Sandberg, Neilson, Sarma, Sharp, & Burge, 2008) (Figura 9).

Figura 9. Expressão gênica dependente da 3' UTR. A Figura mostra a desestabilização do mRNA e sua repressão traducional por conta de complexos protéicos que recrutam enzimas com atividade desadenilase e “decapping”. O efeito do reconhecimento por miRNAs leva a posterior degradação do transcrito.

Além de ter um impacto sobre a atividade do transcrito, tem sido evidenciado que a 3'UTR interage com a proteína recém codificada mediante proteínas efetoras (Choi *et al.*, 2008; Choi, Lim, & Seong, 2011). A 3'UTR funciona como andaime para a interação proteína-proteína. Um sequências que atua como “zipcode” dentro da 3'UTR pode ser reconhecida por RBPs, que a sua vez podem recrutar outras proteínas efetoras ao sítio da tradução. Estas ultimas, podem apresentar afinidade eletroquímica com a cadeia peptídica nascente, o que facilita a formação de um complexo protéico que pode definir a função ou localização protéica a qual poderia diferir da proteína sintetizada por um transcrito sem o mesmo “zipcode” dentro da 3'UTR (Figura 10) (Berkovits & Mayr, 2015; Choi *et al.*, 2008, 2011; Mitra *et al.*, 2015).

Figura 10. Função da 3'UTR sobre a proteína sintetizada. A presença de uma sequência “*zipcode*” na 3'UTR do transcrito pode recrutar proteínas que eventualmente se unirão na proteína sintetizada por possuir maior afinidade com esta que com a 3'UTR, formando um complexo proteico que pode ter uma função diferente que a proteína sintetizada a partir de um transcrito sem “*zipcode*”.

A modificação de uma sequências específica na região 3'UTR de um transcrito importante na regulação do ciclo celular (oncogenes, citocinas e outros reguladores) pode alterar o controle do sítio de reconhecimento de elementos regulatórios (Berkovits & Mayr, 2015; Mayr & Bartel, 2009; Sandberg *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009) e dar lugar à carcinogênese. No caso da PHB, ainda não foi reportado na literatura nenhum elemento regulatório que reconheça a região 3'UTR onde se localiza o polimorfismo rs6917 e que possa alterar o sítio de reconhecimento de elementos regulatórios.

2. JUSTIFICATIVA

A incidência de melanoma maligno na população mundial tem aumentado progressivamente. A quimioterapia, terapia alvo dirigida e a radioterapia não são suficientes para a remissão total deste tumor em estádio mais avançados. Devido à baixa sobrevida dos pacientes e às baixas taxas de resposta ao tratamento, torna-se crucial uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na quimiorresistência do melanoma. Estudos prévios do nosso grupo revelaram que o SNP rs6917 mapeado na região 3'UTR do gene da *PHB*, pode estar associado com o desenvolvimento de melanoma e à quimiorresistência à cisplatina. É pertinente, portanto, investigar o papel deste polimorfismo na quimiorresistência de melanoma frente ao tratamento com outras drogas utilizadas para o tratamento deste tumor, como temozolomida, vemurafenib e cisplatina, tentando esclarecer se a presença do alelo T na região 3'UTR do gene da proibitina é um fator modificador para a resposta a quimioterápicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto teve como objetivo geral avaliar o envolvimento do SNP rs6917 da região 3'UTR do gene *PHB* em linhagens de melanoma humano e sua resposta celular frente ao tratamento com temozolomida, cisplatina e vemurafenib.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a associação do polimorfismo rs6917 do gene *PHB* com o risco e desenvolvimento de melanoma em um estudo caso-controle em uma amostra da população brasileira;
- Avaliar o efeito funcional do polimorfismo rs6917 do gene *PHB* sobre a expressão, atividade, localização subcelular da proteína codificada assim como sobre a migração celular mediante o uso de bioluminescência, western blot, imunofluorescência e ensaio do risco respectivamente;
- Avaliar o efeito do polimorfismo rs6917 do gene *PHB* nas linhagens de melanoma humana transfectadas (3'UTR/C e 3'UTR/T) e sua resposta celular frente ao tratamento com temozolomida, cisplatina ou vemurafenib por meio de:
 - ✓ Ensaios de morte celular por citometria de fluxo;
 - ✓ Formação de colônias por ensaio clonogênico;
- Predizer os mecanismos regulatórios e processos celulares envolvidos na mudança fenotípica mediante a super expressão da 3'UTR da *PHB* por meio de análise *in silico*;

4. MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram coletadas 198 amostras de DNA de sangue periférico de pacientes (casos) diagnosticados com melanoma atendidos no ambulatório de Oncologia Clínica e de Dermatologia do Hospital de Clinicas (HC) da Universidade de Campinas (UNICAMP). Foram excluídos pacientes sem tumor primário definido, tumor localizado em mucosas e na região ocular, e aqueles que não aceitaram participar do estudo. Foram avaliados também 200 pacientes (controles), doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) da UNICAMP, pareados aos casos por idade, sexo e raça e que aceitaram participar do estudo. Esta coleta foi feita em colaboração com a Dra. Carmen Silvia Passos Lima e Gabriela Gomez da Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Clínica Médica. O projeto foi aprovado pelo CEP da UNICAMP (Parecer 1.432.848) em 02/03/2016. Todos os pacientes assinaram TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) para participação no projeto.

4.2 Avaliação dos pacientes

Foi aplicado um questionário (Anexo) aos casos e controles. O questionário continha perguntas referentes aos dados como a identificação, idade, sexo, cor da pele, cor dos olhos, cor do cabelo, presença de sardas e nevus, fotótipo cutâneo, exposição solar, queimaduras solares prévias e tipo de exposição solar. A classificação dos pacientes foi feita de acordo com as respostas dos questionários de acordo com a cor da pele em brancos e não brancos (pardos e negros). O fototipo foi definido usando critérios definidos por Fitzpatrick, 1988. (Fitzpatrick, 1988). Sendo considerados

portadores de olhos claros (indivíduos com olhos azuis e verdes) e portadores de olhos escuros (aqueles com olhos castanhos e pretos). Quanto a cor do cabelo, foram considerados portadores de cabelos claros (indivíduos com cabelos loiros e ruivos naturais) e portadores de cabelos escuros (Indivíduos com cabelos castanhos e pretos naturais).

Os indivíduos foram classificados também dependendo da exposição solar em expostos ao sol (exposição solar por mais de duas horas ao dia e por mais de 10 anos), sendo a exposição classificada como intermitente (exposição solar relacionada a atividades recreativas em menos de 50% na semana ou férias) ou crônica (atividade laboral ou domiciliar em mais de 50% do tempo sob a exposição solar), e não expostos (não enquadramento nas definições anteriores). Foram considerados indivíduos que sofreram queimadura solar aqueles que relataram a ocorrência de dor, eritema com ou sem formação de bolhas por mais de 24 horas em pelo menos um evento em qualquer fase da vida.

Indivíduos considerados portadores de nevos foram aqueles que apresentaram pelo menos um nevo melanocítico maior que 2 mm de diâmetro em qualquer área do corpo (exceto no couro cabeludo, púbis e região perineal, que não foram avaliadas ao exame físico). Os pacientes foram categorizados em: sem nevos ou com poucos nevos (≤ 20), e com moderado número de nevos ou muitos nevos (> 20). Também foram classificados como portadores de sardas, os indivíduos que apresentam manchas hiperocrômicas pequenas (de até 5 mm de diâmetro) e de limites bem nítidos.

Os pacientes foram classificados de acordo com a localização topográfica do melanoma cutâneo em: acral (palma das mãos e planta dos pés), tronco, membros e cabeça e pescoço, como descrito previamente por Stierner *et al.* (1991) (Stierner, Augustsson, Rosdahl, & Suurküla, 1991). O diagnóstico de melanoma cutâneo e estágio

do tumor foi realizado através do exame anatomopatológico realizado em cortes histológicos de fragmentos do tumor incluídos em parafina e corados por hematoxilina e eosina. Os dados da localização primária do tumor, da ulceração, do tipo de crescimento (vertical ou horizontal), dos níveis de Clark e dos índices de Breslow (classificados em $\leq 1,5$ mm ou $> 1,5$ mm) foram coletados do laudo do exame anatomopatológico.

4.3 PCR em Tempo Real –Ensaio TaqMan®

Os diferentes genótipos do SNP rs6917 (Tabela 1) do gene *PHB* (Homozigoto para o alelo frequente CC, homozigoto para o alelo polimórfico TT e Heterozigoto CT) foram determinados nos casos e controles por meio de PCR em Tempo Real TaqMan (Applied Biosystems). Primers e sondas customizados foram utilizados para os ensaios. As reações foram feitas utilizando 5,25µL de *TaqMan Universal Master Mix* (Life Technologies, EUA), 0,25µL de sondas e primers (40X), 3,5µL de água e 1µL de amostra com concentração de 50ng/µL de DNA genômico dos pacientes. As reações foram feitas utilizando os equipamentos para PCR em Tempo Real StepOne Plus 7500 da Life Technologies (EUA) do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO/ICESP), com as seguintes condições de ciclagem: desnaturação a 95°C por 10 min e 40 ciclos de: 15s de desnaturação a 95°C e 1 min de anelamento a 60°C, seguido de uma extensão final a 60°C por 3 min. Foram utilizados controles para cada genótipo. Após cada reação se obteve um produto final amplificado com tamanho de 131pb. As sequências de *primers* utilizados na qRT-PCR foram:

PHB1: Fwd: 5'-GTGTGGTTGGGGAATTCATGTGG-3';

Rev: 5'-CAGGCCAAACTTGCCAATGGAC-3'

ACT-B: Fwd: 5'-CTGGCACCCAGCACAAT-3';

Rev: 5'-GGGCCGGACTCGTCATACT-3',

As sondas utilizadas para os alelos C e T foram, respectivamente:

5'-FAMCTGCCAAAGACGTGTMGBNFQ-3' e

5'-VICCTGCCAAAGATGTGTMGBNFQ-3'

Após a reação, os resultados das amostras dos pacientes foram colocados em um gráfico (Figura 11) que as separou em clusters dependendo do produto amplificado e a fluorescência emitida, representando de essa maneira os genótipos de cada uma.

Tabela 1. Descrição do polimorfismo rs6917 do gene da proibirina.

Gene	Nomenclatura padronizada	Outro nome descrito na literatura	Alelo polimórfico	Coordenada cromossômica	Localização gênica
<i>PHB</i>	rs6917	1703>T	T	Chr17:47481543	3'-UTR

Figura 11. Discriminação alélica de algumas das amostras dos casos e controles obtido mediante a genotipagem por PCR em Tempo Real TaqMan®. As amostras representadas em vermelho são homozigotas para o alelo C (genótipo CC) ao apresentar somente a detecção da fluorescência VIC. As amostras representadas em azul são homozigotas para o alelo T (genótipo TT) já que apresentaram unicamente detecção da fluorescência FAM. As amostras em verde apresentaram ambas fluorescências sendo heterozigotas (genótipo CT).

4.4 Linhagens celulares

As seguintes linhagens celulares foram utilizadas: linhagens de melanoma humano SK-Mel-05 e UACC-62 (Tabela 2), as quais foram caracterizadas e genotipadas anteriormente. Estas linhagens foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C.

Tabela 2. Características das linhagens celulares utilizadas.

Linhagem	HETEROZIGOTA S PARA rs6917- <i>PHB</i>	ASE	MUTAÇÃO BRAF^{V600E}
SK-MEL-5	Sim	T>C	Sim
UACC-62	Sim	T>C	Sim

ASE: *Allelic specific expression* (expressão alelo-específica). O sinal > indica que o alelo em questão é mais expresso em relação ao outro.

4.5 Curva de toxicidade a geneticina

As linhagens SK-Mel-05 e UACC-62 foram cultivadas em uma densidade de 7×10^6 células por poço em placa de 12 poços contendo meio DMEM High glicose, suplementado com 10% de SBF. O meio de cultura foi substituído por meio contendo diferentes concentrações de geneticina (G418 – Invitrogen®) após 24 horas do plaqueamento. Por um período de 7 dias foram feitas observações diárias de densidade e morfologia das células em cada um dos poços correspondente as distintas concentrações de geneticina. Dessa forma, foi selecionada a menor concentração de G418 capaz de induzir 100% de morte celular em cada uma das linhagens avaliadas. As concentrações selecionadas foram: 0,6 mg/mL para as células SK-MEL-05 e 0,8 mg/mL para as células UACC-62.

4.6 Geração de células estáveis

As sequências 3'UTR da *PHB* (852pb) contendo o alelo C (3'UTR/C da *PHB*) ou o alelo T (3'UTR/T da *PHB*) foram clonadas em vetores *pmiR-GLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* (Promega®) nos sítios de restrição *NheI* e *XhoI* (Figura 12). Foram plaqueadas $0,6 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços. Após

24h, as células foram transfectadas com 500 ng dos construtos 3'UTR/C-*PHB*, 3'UTR/T-*PHB* e o vetor “vazio” (controle) utilizando 1µL do veículo Lipofectamina 3000 (Invitrogen®) na presença de 1 µL de Reagente P3000 e 50uL de OPTI-MEM. Após 48hs, foi trocado o meio de cultura por meio completo (DMEM, suplementado com 10% SFB, 100µg/mL de estreptomicina e 10mg/mL de ampicilina), contendo Geneticina (G418 – Invitrogen®) nas seguintes concentrações: 0,6 mg/mL para as células SK-Mel-05 e 0,8 mg/mL para as células UACC-62 para a seleção de clones resistentes. As células foram mantidas durante todo o período na presença de G418.

Figura 12. Vetores utilizados na transfecção das células. A. Vetor pmiR-GLO vazio (Promega®), EV (*empty vector*) B. Vetor pmiR-GLO contendo o alelo selvagem 3'UTR/C. C. Vetor pmiR-GLO contendo o alelo raro 3'UTR/T. SV40 *promoter* = promotor; *hRluc-neo* = região codificadora do gene da luciferase obtido da *Renilla*, formando um cassete de resistência a neomicina. Esta proteína fusionada é usada como controle repórter endógeno para normalização de expressão gênica para seleção de células estáveis; *Poly A signal* = Cauda de poliadenilato; PGK = segundo promotor do vetor pmiR-GLO; *luc2* = região codificadora do gene da luciferase de vagalume.

4.7 Atividade do gene repórter Luc2

A confirmação da transfecção das células contendo os construtos pmiR-GLO-EV, 3'UTR/C-*PHB* e 3'UTR/T-*PHB* foi feita mediante a detecção da luciferase de vagalume clonada *up-stream* ao inserto (Luc2) e normalizada pela atividade do segundo gene repórter, luciferase de *Renilla* (hRluc). As linhagens transfectadas para cada um dos vetores pmiR-GLO, SK-Mel-05 e UACC-62, assim como suas respectivas linhagens

selvagens, foram plaqueadas na quantidade de 4×10^3 células por poço em placa de 96 poços. Após 48 horas, as células foram lavadas com 80µL de PBS 1X e foram adicionados 50µL de tampão passivo de lise celular 1X (Promega®). As placas foram submetidas a agitação por 15min a 600 rpm e depois foram armazenadas em freezer - 80°C por pelo menos 1h. Após este período, 10 µL de cada amostra foi transferido para placas brancas de 96 poços para leitura da luminescência, através do sistema GloMax®-Multi+Detection System (Promega®). As placas foram adaptadas no leitor e programadas para injeção primeiramente de 30uL de substrato para luciferase *luc2* (LARII, Promega®). Após a leitura da luminescência da *luc2*, o sistema injeta 30uL de substrato para a segunda luciferase, *Renilla* (Stop and GLO, Promega®). Planilhas com dados independentes de *luc2* e *Renilla* foram geradas e o resultado final foi baseado na razão *luc2/Renilla* normalizado pelo controle (amostra de célula selvagem sem vetor) para eliminação do ruído de fundo.

4.8 Avaliação de proliferação celular por azul tripan.

As linhagens SK-Mel-05 e UACC-62 transfectadas com as variantes alélicas 3'UTR/C, 3'UTR/T e o vetor vazio EV foram incubadas em placas de 24 poços com uma densidade de 2×10^4 células por poço o número de células viáveis foi mensurado cada 24 horas por 5 dias. As células foram tripsinizadas e coradas com 0,2% 2X azul tripan. Um total de 10 µl da mistura celular foi observada e contada no microscópio convencional (TE2000-S; Nikon, Tokyo, Japan) usando a câmara de Neubauer. As células não coradas foram consideradas vivas.

4.9 Imunofluorescência

Foram plaqueadas 6×10^3 das células SK-Mel-05 e UACC-62 transfectadas com os construtos pmiR-GLO-EV, 3'UTR/C e 3'UTR/T em lamínulas contidas em poços de placa de 12 poços, onde foram tratadas com temozolomida e/ou vemurafenib, ou com o veículo DMSO 0,1%, de acordo com dose e tempo determinados previamente. Após os tratamentos o meio de cultura foi substituído por meio de cultura com Mitotracker Red (1:200) por 30 min a 37°C; após este período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS e permeabilização com TRITON X (0,2%) por 5 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado através da incubação com PBS/BSA 5% por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-PHB (1:100) (Santa Cruz) em PBS/BSA (5%) e deixadas durante a noite a 4°C. Depois, foram realizadas 3 lavagens com PBS/BSA (1%) e foi realizada a incubação com anticorpo secundário (1:500) (anti-goat conjugado à Alexa 488) junto com marcador de núcleo celular Hoestch (1:500), por 1h à temperatura ambiente. Após a incubação com os anticorpos secundários, foram realizadas 3 lavagens com PBS/BSA 1% e em seguida foi realizada a análise de fluorescência em microscópio de fluorescência confocal (Carl Zeiss).

4.10 Ensaio de morte celular

Com o objetivo de observar a resposta aos tratamentos das células contendo as variáveis polimórficas da *PHB* (3'UTR/C e 3'UTR/T), primeiro foram determinadas as doses dos quimioterápicos temozolomida e vemurafenib. As linhagens celulares de melanoma humano SK-Mel-05 e UACC-62 transfectadas com os construtos vazios (pmiR-GLO-EV) foram cultivadas em uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço em

triplicata, em placas de 12 poços e foram tratadas com diferentes concentrações de cada um dos quimioterápicos por 48 e 72 h para análise de cinética de morte celular. Para temozolomida foram testadas as concentrações de 50 μ M, 250 μ M, 360 μ M e 450 μ M, e para vemurafenib, 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M. Após o tratamento, as células foram peletadas, fixadas em etanol 70% e mantidas em freezer à -20°C. Os ensaios de morte celular foram feitos por meio da análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing Cytometer, ThermoFisher Scientific) após incorporação de solução de iodeto de propídeo (PI, do inglês *propidium iodide*) (200 μ g/ml de RNase A, 20 μ g/ml de PI, 0,1% de Triton X-100 em PBS), que permitiu evidenciar as fases do ciclo celular ao incorporar-se estequiometricamente ao DNA, permitindo uma quantificação relativa do conteúdo de DNA da população de células avaliadas, assim as células que apresentaram uma quantidade de DNA inferior a 2n (hipodiplóides =H0) foram consideradas em morte celular. A análise de citometria de fluxo foi realizada utilizando o programa Attune® Cytometric Software®. A porcentagem das células hipodiplóides (indicativo de morte celular) foi quantificada e os dados foram representados em gráficos de barras.

Após a determinação das diferentes doses dos quimioterápicos, foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ células dos clones estáveis das linhagens celulares SK-Mel-05 e UACC-62 3'UTR/C e 3'UTR/T com seus respectivos vetores vazios pmirGLO EV em placa de 6 poços e foram tratadas com temozolomida (50 μ M por 72 hrs) e vemurafenib (1 μ M por 72 hrs). Além disso, foram feitos ensaios de morte celular com cisplatina (5 μ M por 48 hrs) (a determinação das concentrações de cisplatina foram previamente estabelecidas por nosso laboratório no projeto 2011/18337-6). Tratamento com DMSO 0,1% foi utilizado como controle negativo para temozolomida e vemurafenib, e PBS 1X para

cisplatina. Após o fim dos tratamentos, as células foram coletadas para avaliação de morte celular segundo o protocolo do PI descrito anteriormente.

4.11 Ensaio clonogênico

Para avaliar a capacidade das células superexpressando as variantes alélicas (3'UTR/C e 3'UTR/T) de sobreviver por um longo período de tempo após o tratamento com agentes citotóxicos como vemurafenib, temozolomida e cisplatina, foram feitos ensaios clonogênicos nas células sobreviventes dos experimentos de morte celular, as quais foram tripsinizadas em condições estéreis e replaqueadas em baixa densidade (300 células por poço) em triplicata em placas de 6 poços. Após 20 dias, as células foram fixadas em formol 10% e coradas com cristal violeta 0,5%. As colônias foram contadas e os dados apresentados em gráficos de barras.

4.12 Obtenção populações homogêneas (Subclonagem)

Para a obtenção de populações transfectadas menos heterogêneas, os *pools* celulares 3'UTR/C e 3'UTR/T das células SK-Mel-05 e UACC-62 foram tripsinizadas em condições estéreis e replaqueadas em baixa densidade (50 células por poço em placa de 96), as células foram expandidas e submetidas a um ensaio de bioluminescência para medir a atividade do gene repórter Luc2 (metodologia descrita anteriormente). Os resultados obtidos foram usados como critério de escolha dos diferentes subclones UTR/C1, UTR/C2, UTR/T1 e UTR/T2 de cada linhagem celular. Foram selecionados subclones com unidades similares de bioluminescência entre linhagens celulares. Foram escolhidas unidades de bioluminescência entre 153 e 188 para as células UACC-62 e entre 15 e 16 para as células SK-Mel-05 (Tabela 3).

Tabela 3. Clones UACC-62 e SK-Mel-05 escolhidos segundo as unidades de bioluminescência LUC2/*Renilla* apresentadas.

Linhagem celular	Clone	Unidades de bioluminescência LUC2/<i>Renilla</i>
UACC 62	UTR/C1	152
	UTR/C2	147
	UTR/T1	110
	UTR/T2	226
SK-Mel-05	UTR/C1	15
	UTR/C2	16
	UTR/T1	16
	UTR/T2	16

4.13 Ensaio migração por estímulo com risco

Os subclones UTR/C1, UTR/C2, UTR/T1, UTR/T2 de cada uma das linhagens celulares SK-Mel 05 e UACC-62 e seus respectivos vetores vazios EV foram plaqueadas em duplicata em placas de 12 poços. $2,5 \times 10^4$ células foram cultivadas em cada poço e mantidas em meio DMEM *high* glucose com 1% de SFB. Após 24 horas e 100% de confluência, cada um dos poços foi submetido ao risco com ponteira de 10uL. As células foram transferidas ao equipamento EVOS Cell Imaging System (Thermo Fisher) para avaliação do tempo do fechamento do risco. O análise foi feito usando imagens de cada poço capturadas no intervalo de 30 mins por 24 horas usando o programa ImageJ (*NIH image software*). A migração celular foi determinada pela área invadida do risco: medida da distância percorrida pela célula na frente da área riscada em comparação com o tempo zero.

4.14 Análise qualitativa da migração celular

Os subclones C1, C2, T1 e T2 de cada uma das linhagens celulares SK-Mel-05 e UACC-62 e seus respectivos vetores vazios EV foram cultivadas em poços de placa de 6 poços contendo meio de cultura DMEM-High Glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram deixadas aderendo durante a noite antes da captura de imagens. Os dados de migração celular foram coletados por imagem mediante o uso do EVOS Cell Imaging System (Thermo Fisher) em intervalos de 15 minutos por um total de 24 horas em um microscópio confocal (20x) de disco giratório Olympus IX81ZDC (Olympus) sob condições controladas de temperatura e CO₂. As imagens foram depois processadas usando o programa ImageJ Fiji (*NIH image software*) e o rastreamento celular foi realizado usando o plugin Manual Tracking. Após o rastreamento manual de cada célula, os dados de posição em X e Y de cada célula foram coletados e plotados no Tracking plot usando excel, todos os dados de trajetórias foram ajustados relativos a mesma origem mantendo a orientação e direcionalidade de cada célula.

4.15 Predição de possíveis miRNAs.

Para determinar se a alteração em um único alelo das sequências 3'UTR/C e 3'UTR/T geraria um possível sítio alvo de reconhecimento para elementos regulatórios como miRNAs, foram realizadas análises de predição *in silico* para cada sequência utilizando o software MicroSNiPer (<http://cbdb.nimh.nih.gov/microsniper>).

As listas de predição de miRNAs geradas para cada variante foram filtradas adotando os seguintes critérios: os miRNAs deveriam ter no mínimo 20 pares de bases e as variantes 3'UTR/C e 3'UTR/T não poderiam possuir os mesmos miRNAs como elementos regulatórios.

Com o objetivo de determinar os possíveis genes alvos que não estariam sendo regulados pelo sequestro de miRNAs pelo papel esponja da super expressão de ambas UTR, foi realizada a análise preditiva de genes alvos para cada miRNAs através do software Mirbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu>).

A lista dos genes alvos e miRNAs para cada variante foi analisada quanto a função biológica, doenças associadas e redes de interação utilizando o *software* Ingenuity (IPA- Pathway Analysis, Qiagen). Além disso, foi considerada a análise de enriquecimento de diversos processos celulares, função molecular e vias de sinalização envolvidas através do software Genecodis <http://genecodis.cnb.csic.es>, que adota o banco de dados do PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) e KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), para a análise de enriquecimento de vias de sinalização.

4.16 Análise estatística

As análises estatísticas dos experimentos funcionais foram realizados no programa GraphPad Prism v6. O teste ANOVA, seguido do pós teste de Bonferroni, foi utilizado para análise entre grupos. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo e foi representado com asterisco (*).

O *software* estatístico SPSS® Statistical Package for the Social Sciences versão 18.0 (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA) foi utilizado para análise dos dados de genotipagem dos pacientes, a hipótese nula foi rejeitada com valores de $p < 0,05$. As frequências alélicas e os genótipos foram calculados por contagem de alelos. As análises foram realizadas baseando-se em modelos genéticos descritos na literatura para estudos de associação, considerando o alelo polimórfico como o alelo menos frequente,

foram assumidos 4 principais modelos de análise: (1) Modelo por contagem de Genótipos (comparação das frequências dos homozigotos para o alelo selvagem, heterozigotos e homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados); (2) Modelo por contagem de Alelos (comparação das as frequências do alelo selvagem e alelo polimórfico entre os grupos estudados); (3) Modelo Dominante (comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem e de heterozigotos + homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados), em que se avalia se o alelo polimórfico possui efeito dominante e somente uma cópia é necessária para manifestação do fenótipo avaliado; e (4) Modelo Recessivo (comparação da frequência de homozigotos para o alelo selvagem + heterozigotos e de homozigotos para o alelo polimórfico entre os grupos estudados), em que se avalia se o alelo polimórfico é recessivo e são necessárias duas cópias do alelo para manifestar o fenótipo. Foram utilizados os testes de qui-quadrado (χ^2) ou Exato de Fisher para verificar associação entre os genótipos e as características clinicopatológicas do estudo (idade, idade ao diagnóstico, tipo de crescimento, localização do tumor, tipo histológico, Breslow [mm], Clark, índice mitótico, ulceração, regressão, invasão, estadiamento, envolvimento de linfonodo sentinela, linfadenectomia, recidiva (distante ou regional), história familiar de câncer de pele não-melanoma, história familiar de melanoma, tumor em outros órgãos. Modelos de regressão logística foram utilizados nos cálculos das razões de chances (do inglês *Odds ratio*) (OR) e dos respectivos intervalos de confiança com 95% de confiança.

A Sobrevida global (SG) foi calculada considerando a data do diagnóstico até a data do óbito por qualquer causa ou perda de seguimento. A sobrevida livre de progressão (SLP) foi obtida a partir da data do tratamento à data da primeira recidiva, progressão, óbito por qualquer causa ou perda de seguimento. Ambas sobrevidas foram

calculadas por meio das curvas de probabilidades estimadas de Kaplan-Meier e as diferenças entre curvas pelo teste do log-rank. Os dados de sobrevida foram também avaliados por meio das análises univariada e multivariada de Cox. O nível de significância para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

As análises estatísticas dos experimentos funcionais foram realizados no programa GraphPad Prism v6. O teste ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni foi utilizado para análises de três ou mais grupos. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A metodologia utilizada neste trabalho encontra-se resumida no esquema da Figura 13.

Figura 13. Representação da metodologia utilizada na elaboração deste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 O polimorfismo rs6917 está associado com o aparecimento de melanoma de crescimento vertical.

Foram coletadas e avaliadas 198 amostras de casos de melanoma e 200 amostras controle da UNICAMP. A Tabela 4 mostra a associação de variáveis clínicas com a presença de melanoma na amostra em estudo, sendo que a idade, cor dos olhos e cabelo, presença de sardas/acne e pintas, exposição solar, tipo de exposição solar, queimadura solar na infância e/ou adolescência, história familiar de câncer de pele não-melanoma, melanoma ou outros tumores, foram associadas com a presença de melanoma ao apresentar uma diferença estatisticamente significativa entre os casos e os controles ($p \leq 0,05$). Estas variáveis já foram associadas previamente com o aparecimento e desenvolvimento de melanoma em amostras brasileiras (Goncalves *et al.*, 2011).

Análise de *odds ratio* foi realizada (Tabela 5) para a avaliação das variáveis clínicas como fatores de risco. Sendo que, a presença de cabelos claros (loiros ou ruivos), presença de mais de 20 pintas, exposição solar intermitente e queimaduras solares na infância e adolescência foram associadas a fatores de risco para melanoma ($p \leq 0,05$), o que confirma dados prévios publicados por nosso laboratório (Francisco *et al.*, 2013; Luiz *et al.*, 2012). Dentro dos dados analisados, se evidencia que a presença de mais de 50 pintas e a exposição solar apresentam os riscos mais altos para aparecimento de melanoma, com um risco aumentado em 10,08 e 12,50 vezes, respectivamente.

Quando analisada a sobrevida para os 198 pacientes (Figura 14), foi encontrada uma sobrevida Média de $134,46 \pm 5,76$ meses e uma sobrevida livre de doença de $112,94 \pm 6,08$ meses.

Tabela 4. Associação de variáveis clínicas com a presença de melanoma entre os casos e os controles

Variáveis	Controles (N=200)		Casos (N=198)		χ^2/t	p
	N	%	N	%		
Idade						
Média em anos (DP)	46,6 (6,96)		54,9 (16,4)		-6,49	<0,001*
Sexo						
Feminino	96	50	96	50,0	0,009	0,923
Masculino	104	50,5	102	49,5		
Cor da pele						
Negra	6	3,0	5	2,5	6,803	0,060
Parda	2	1,0	9	4,5		
Amarela	0	0	2	1,0		
Branca	192	96,0	182	91,9		
Cor dos olhos						
Pretos ou castanhos	157	78,5	121	68,0	5,360	0,021*
Verdes ou azuis	43	21,5	57	32,0		
Cor dos cabelos						
Pretos ou castanhos	180	90,5	132	74,2	17,484	<0,001*
Loiros ou ruivos	19	9,5	46	25,8		
Quantidade de sardas e acne						
Nenhuma ou raras	134	67,0	80	42,8	22,932	<0,001*
Algumas ou muitas	66	33,0	107	57,2		
Presença de pintas						
<20	147	76,6	79	41,4	57,198	<0,001*
20-50	39	20,3	68	35,6		
>50	6	3,1	44	23,0		
Fototipo						
V+VI	13	6,5	10	5,6	0,689	0,708
III+IV	67	33,5	67	37,4		
I+II	120	60,0	102	57,0		
Exposição solar						
Não	79	39,5	33	18,0	21,284	<0,001*
Sim	121	60,5	150	82,0		

Continuação da Tabela 4

Queimadura solar na infância e adolescência						
Não	121	61,1	51	29,0	38,734	<0,001*
Sim	77	38,9	125	71,0		
Tipo de exposição solar						
Nenhuma	77	38,5	34	24,8	29,058	<0,001*
Intermitente	70	35,0	27	19,7		
Crônica	53	26,5	76	55,5		
História familiar de câncer de pele não melanoma						
Não	183	91,5	155	84,7	4,262	0,039*
Sim	17	8,5	28	15,3		
História familiar de melanoma						
Não	195	97,5	163	86,2	16,789	<0,001*
Sim	5	2,5	26	13,8		
História familiar de outros tumores						
Não	134	67,3	75	45,2	18,154	<0,001*
Sim	65	32,7	91	54,8		

N= número de indivíduos, χ^2 = teste chi-quadrado ou teste *t-Student*. *p≤0,05, DP=desvio-padrão.

Tabela 5. Variáveis clínicas como fatores de risco para o desenvolvimento de melanoma.

Variáveis	p	OR	IC 95%	
			Inferior	Superior
Cor da pele (parda)	0.393	2.87	0.255	32.29
Cor da pele (branca)	0.098	0.27	0.057	1.275
Cor dos olhos (azuis ou verdes)	0.781	0.90	0.429	1.889
Cor dos cabelos (loiros ou ruivos)	0.008*	3.31	1.375	7.977
Quantidade de sardas e acne (algumas ou muitas)	0.099	1.64	0.911	2.945
Pintas (20-50)	0.032*	2.00	1.061	3.786
Pintas (>50)	<0,001*	10.08	3.516	28.901
Exposição solar (Sim)	<0,001*	12.50	3.468	45.062
Queimadura solar na infância e adolescência (Sim)	<0,001*	2.89	1.598	5.240
Tipo de exposição solar (intermitente)	0,001*	0.11	0.031	0.389
Tipo de exposição solar (crônica)	0.115	0.37	0.109	1.270

OR= odds ratio, IC = intervalo de confiança. *p≤0,05.

Figura 14. Análise de curva de sobrevida (Kaplan-Meier) para 198 pacientes da UNICAMP. A. Sobrevida Média de $134,46 \pm 5,76$ meses. B. Sobrevida livre de doença de $112,94 \pm 6,08$ meses.

Os diferentes genótipos do SNP rs6917 do gene *PHB* (Homozigoto para o alelo frequente CC, homozigoto para o alelo polimórfico TT e Heterozigoto CT) foram determinados nos casos e controles por meio de PCR em Tempo Real TaqMan®. Não se encontrou associação do alelo polimórfico T com a presença de melanoma (Tabela 6), este resultado difere do publicado por Gonçalves *et al.*, (2011). Este estudo, reportou pela primeira vez o polimorfismo rs6917 como fator de risco para o aparecimento de melanoma em uma amostra brasileira e que o genótipo TT aumentava em 2,4 vezes o risco do desenvolvimento desta doença em comparação com os portadores do alelo C.

Estudos publicados em outros modelos de câncer também têm reportado a associação positiva entre o polimorfismo rs6917 e o aparecimento da doença. Em 2007, Jakubowska *et al.*, e, em 2001, Jupe *et al.*, analisaram em amostras independentes de pacientes com câncer de mama na Polônia e Estados Unidos, respectivamente e encontraram que a frequência do

alelo T da 3'UTR da *PHB* estava aumentando nos casos. Esses dados coincidem com os publicados por Tang *et al.*, 2013 e Zhou, Yin, Huang, & Ou, 2012, usando bases de dados públicos de câncer de mama, onde observou-se a alta correlação entre este polimorfismo e o risco de aparecimento da doença em comparação com o alelo C.

Tabela 6. Distribuição genotípica e frequência alélica para os casos (N=198) e controles (N=200) de melanoma.

Amostra	Genótipos	N (%)				χ^2	p
		Casos		Controles			
Melanoma (UNICAMP)	CC	131	(66,2)	128	(4,0)	0,397	0,82
	CT	61	(30,8)	67	(33,5)		
	TT	6	(3,0)	5	(2,5)		

N: número de indivíduos; *p≤0,05

Quando avaliados os casos (Tabela 7) a presença do SNP rs6917 foi associada com o dado clinicopatológico de tipo de crescimento do tumor, encontrando-se associação entre o modelo dominante (CT+TT) e o melanoma de crescimento vertical.

O crescimento do melanoma, ocorre com a partir da proliferação descontrolada de melanócitos ainda confinados na camada epidérmica (melanoma de crescimento radial). Por isso, este tipo de melanoma apresenta baixa capacidade proliferativa e invasiva. As alterações no DNA e a desregulação de mecanismos epigenéticos, permitem a progressão para a forma vertical do melanoma que invade a derme e metastatiza para órgãos distantes. O comportamento invasivo deste tipo de tumor está acompanhado por altas taxas de proliferação.

No presente trabalho, reportamos a associação entre o crescimento vertical do melanoma nos pacientes com pelo menos uma das cópias do alelo (Modelo dominante). Dessa forma, poderíamos supor que a presença da troca de um único nucleotídeo nesta

sequência não regulatória seria suficiente para alterar o fenótipo da célula tornandola mais invasora. Até o momento não existem reportados elementos regulatórios que reconheçam a região onde se encontra este polimorfismo e que possam regular negativamente a expressão da *PHB*. Porém, no trabalho publicado em modelo de câncer gástrico, por Leal *et al.*, 2014, se demonstra que, em uma amostra brasileira, a presença do alelo T na 3'UTR/*PHB* em indivíduos heterozigotos, estava associada com a expressão reduzida de RNAm de *PHB*, indicando que este polimorfismo pode regular a expressão da *PHB* e que a regulação negativa poderia ser através do aumento da instabilidade do transcrito via elementos regulatórios.

Tabela 7. Associação do SNP rs6917 (modelo dominante) com o melanoma de crescimento vertical.

Crescimento vertical	P	OR ^a	95% IC	
			Inferior	Superior
Dominante (CT+TT)	0,01*	5,62	1,52	20,79

^aAjustado por sexo e idade; OR: *Odds ratio*; 95% IC: 95% Intervalo de confiança;

*p≤0,05.

5.2 O polimorfismo rs6917 (UTR/T) modula a atividade transcripcional *in vitro* incrementando os níveis da atividade da luciferase.

As células de melanoma humano UACC-62 e SK-Mel-05 transfectadas com as diferentes variantes alélicas UTR/C, UTR/T e o vetor vazio EV, (Figura 15) foram mantidas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e com antibiótico de seleção geneticina (G418), nas concentrações 0,8 mg/mL para UACC 62 e 0,6 mg/mL para

SK-Mel-05. (doses determinadas por ensaio de morte celular nas linhagens sem transfectar).

Figura 15. Aspectos morfológicos das células de melanoma humano SK-Mel-05 e UACC-62 transfectadas com o vetor vazio (EV), a variante C (UTR/C) e a variante T (UTR/T) da 3'UTR da *PHB*. As células foram mantidas com geneticina (G418) como antibiótico de seleção. 20x. Imagens representativas.

Sabe-se que a síntese protéica é um processo regulado por diferentes mecanismos e que a perturbação de um deles pode levar a alterações dentro da célula. Com o objetivo de determinar se as variantes polimórficas da 3'UTR da *PHB* UTR/C e UTR/T tem efeito sobre a proteína sintetizada, foram feitos ensaios para a medição da atividade da luciferase. Após seleção estável com os respectivos vetores, populações heterogêneas das linhagens SK-Mel-05 e UACC-62 foram lisadas e os substratos para luciferase de vagalume e *Renilla* foram adicionados para quantificação da atividade enzimática, tendo como normalizador endógeno a atividade da luciferase de *Renilla*. A Figura 16 mostra como as células UTR/T

possuem maior atividade da luciferase em comparação com as UTR/C em ambas linhagens celulares. Este resultado mostra como a expressão da luciferase cuja ORF encontra-se clonada *upstream* ao inserto 3'UTR, é perturbada pela troca em um único nucleotídeo da região regulatória 3'UTR.

Já que a atividade regulatória na síntese protéica reside nas extremidades 5' e 3' UTR do RNAm, sendo estas regiões as encarregadas de manter a estabilidade do RNAm. (Chen *et al.*, 2006a; Chen, Férec, & Cooper, 2006a; Chen, Férec, & Cooper, 2006b; Chatterjee & Pal, 2009), os nossos resultados mostram que o polimorfismo rs6917 tem um papel funcional e que os diferentes alelos da 3'UTR da *PHB* influenciam o processo de tradução proteica. Provavelmente o transcrito UTR/C possui um sítio de reconhecimento de elementos regulatórios que desestabilizam o transcrito, que são refletidos na diminuição das unidades de luciferase, pelo contrário o transcrito UTR/T aumenta a estabilidade do RNAm possivelmente por escapar a regulação por elementos regulatórios via 3'UTR. A Figura 16 mostra que a troca de um único nucleotídeo é o suficiente para obter uma diferença fenotípica na síntese proteica da luciferase, pois ocorre o aumento da atividade da luciferase

Figura 16. Atividade relativa do gene repórter Luciferase (LUC2/*Renilla*) decorrente do efeito do SNP rs6917. As linhagens de melanoma humano SK-MEL-05 (A) e UACC-62 (B) foram transfectadas com os diferentes construtos (3'UTR/C da *PHB* e 3'UTR/T da *PHB*). O lisado celular foi usado para a medição sequências I da atividade do gene repórter da luciferase de vagalume e de *Renilla*. A luminescência da luciferase de vagalume foi normalizada pela luminescência da *Renilla*, RLU = Unidades relativas de luminescência. Os dados dos gráficos são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e os resultados estatisticamente significativos representados com asterisco (**** $p < 0,001$) de dois experimentos independentes para cada linhagem celular.

5.3 A superexpressão da variante UTR/T modula positivamente a proliferação das células de melanoma humano.

Com o objetivo de investigar mais profundamente o efeito fenotípico causado pela superexpressão das variantes UTR/C e UTR/T em melanoma, foram feitos ensaios de proliferação por azul tripan nas células UACC-62 e SK-Mel-05 transfectadas, com ambas variantes da *PHB* e o EV correspondente (Figura 17). Concordando com os resultados previamente encontrados no estudo dos pacientes, onde os portadores da variante UTR/T possuíam o risco aumentado de desenvolver melanoma vertical em comparação com os portadores da variante UTR/C. Experimentos *in vitro* mostram que as células transfectadas com a variante UTR/T apresentam maior proliferação celular, dessa forma, poderíamos

inferir que a superexpressão deste transcrito modula e potencializa a capacidade de duplicação celular.

Os nossos resultados reforçam a hipótese de que a variante UTR/T tem um papel importante na patogênese da doença. Estudos prévios publicados por Manjeshwar *et al.* 2003 demonstraram que células de câncer de mama MCF7 transfectadas com a variante UTR/C apresentam redução da capacidade proliferativa o que foi comprovado no nosso modelo e pode ser observado na Figura 17, além disso, estudos prévios do nosso grupo demonstram como a superexpressão da variante UTR/C diminui *in vivo* o fenótipo tumorigênico em comparação com as células UTR/T.

Figura 17. Representação gráfica da proliferação no tempo das células superexpressando as variantes alélicas 3'UTR/C e 3'UTR/T da PHB. Contagem das células UACC-62 (A) e SK-Mel-05 (B) viáveis com azul tripan em câmara de Neubauer ao longo do tempo.

5.4 A superexpressão da variante UTR/T modula a localização subcelular da PHB no núcleo nas células de melanoma humano.

Ao evidenciar esta diferença na taxa da duplicação das células transfectadas com as diferentes variantes alélicas da 3'UTR da *PHB* e sabendo que a PHB promove atividades de proliferação ou de morte celular dependendo de sua localização dentro da célula.. (Rajalingam e Rudel, 2005), as linhagens SK-Mel-05 e UACC-62 expressando os diferentes vetores UTR/C, UTR/T e seus EV foram submetidas a análise de imunofluorescência, tentando esclarecer se a superexpressão das variantes alélicas modulariam a localização da PHB endógena.

Várias localizações celulares tem sido propostas para PHB, como na mitocôndria núcleo e citoplasma (Artal-Sanz & Tavernarakis, 2009). A PHB pode ser translocada da mitocôndria para o núcleo, e vice-versa (Fusaro, Dasgupta, Rastogi, Joshi, & Chellappan, 2003). No caso da mitocôndria, a PHB estabelece a estrutura da organela (Kasashima, Sumitani, Satoh, & Endo, 2008) e regula sua função, além de atuar como chaperona para novas proteínas que formarão o complexo mitocondrial na morfogênese desta organela (Tatsuta, Model, & Langer, 2005). Estudos prévios em *C. elegans* reportam que a perda de PHB resulta na fragmentação e desorganização da estrutura mitocondrial. Além disso, a PHB localizada na mitocôndria tem uma função de proteção contra estresse oxidativo (Zhang, Ji, Ni, & Sun, 2012).

No núcleo, a PHB colocaliza com a proteína do retinoblastoma (pRb) inibindo o fator de transcrição E2F, o que impede a progressão da fase G1 para S e consequentemente reduz a proliferação celular (Wang *et al.*, 2002).

No citoplasma, a PHB está envolvida na via de sinalização de RAS, de modo que a fosforilação de C-Raf na serina 338 requer a interação direta com PHB (Chowdhury *et al.*, 2014; Koushyar, Jiang, & Dart, 2015; Manjeshwar *et al.*, 2003; Mishra, Ande, & Nyomba,

2010; Rajalingam & Rudel, 2005; Rajalingam *et al.*, 2005). Estudos de modelo de câncer de mama expostas a camptotecina tem descrito, que a PHB se transloca do núcleo para o citoplasma. Assim, é importante aprofundar o papel da PHB em tratamentos alvo dirigidos como vemurafenib, que tem como modo de ação a inibição de BRAF V600E (Søndergaard *et al.*, 2010), que possui um papel importante na via de sinalização *downstream* de RAS.

As linhagens SK-Mel-05 e UACC-62 expressando os diferentes vetores 3'UTR/C, 3'UTR/T e seu EV foram submetidas a análise de imunofluorescência para identificação da localização sub-celular da PHB. A Figura 18 mostra que a PHB encontra-se localizada tanto no núcleo, quanto no citoplasma, colocalizando com a mitocôndria nas células transfectadas com EV e 3'UTR/C.

Interessantemente, as células 3'UTR/T apresentam apenas a marcação nuclear de PHB, indicando que a superexpressão dessa variante alélica modula a localização da PHB endógena para o núcleo. Segundo a literatura, a localização subcelular da PHB no núcleo induz parada na proliferação celular. Contrário a estes dados da literatura, nós evidenciamos um aumento na proliferação das células UTR/T. Este resultado sugere que a modulação da proliferação pela superexpressão da 3'UTR/T não ocorre pela localização da PHB no núcleo, mas por outros mecanismos que envolvem este processo celular.

May R 2005, demonstrou como a localização de proteínas com sequências de aminoácidos idênticas mudava quando geradas por transcritos com 3'UTR diferentes. Esta mudança em diferentes compartimentos celulares, ocorria através do recrutamento de fatores regulatórios efetores (como explicado anteriormente na Figura 7) que reconhecem uma sequência específica na 3'UTR que ao ter mais afinidade com a proteína sintetizada, se ligavam nela, mudando a função de esta proteína sem trocar a sequência de aminoácidos.

Figura 18. A 3'UTR/T da *PHB* modula a localização subcelular da PHB no núcleo nas células de melanoma humano. Localização subcelular da Proibitina (PHB) nas células de melanoma humano UACC-62 e SK-Mel-05transfectadas com o alelo selvagem (3'UTR/C) ou o alelo raro (3'UTR/T) em comparação com o vetor vazio (pmirGLO EV). Dados

representativos de três experimentos independentes. PHB (verde) e núcleo marcado com hoescht (azul). Aumento de 40X.

5.5 A superexpressão da variante UTR/T modula positivamente a quimiorresistência em melanoma humano.

Tentando esclarecer o papel da 3'UTR nas linhagens de melanoma, foram realizados outros ensaios que fornecessem hipóteses sobre sua funcionalidade enquanto a quimiorresistência.

Para determinar se a superexpressão das variantes alélicas da 3'UTR da *PHB* conferia resistência a morte em melanoma após tratamento com quimioterápicos, inicialmente se determinou a dose terapêutica mediante o tratamento dos vetores vazios (EV) por 48 e 72 horas com diferentes concentrações (0 μ M, 50 μ M, 250 μ M, 360 μ M e 450 μ M para temozolomida e 0 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M e 10 μ M para vemurafenib). Após tratamento, foram realizados ensaios de morte celular para a determinação da porcentagem de células hipodiplóides (indicador de morte celular) por iodeto de propídeo usando citometria de fluxo.

A dose escolhida dos quimioterápicos foi baseada na determinação da porcentagem de células hipodiplóides após os diferentes tratamentos e a comparação com as células controle (0 μ M de quimioterápico e 0,1% de DMSO). As doses escolhidas foram determinadas como a menor concentração que apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação com as células controle (Figura 19 e 20). Para ambas linhagens UACC-62 e SK-Mel-05 a dose de temozolomida escolhida foi 50 μ M por 72 hrs e a dose de vemurafenib foi 1 μ M por 72 hrs.

Figura 19. Resposta a temozolomida das células UACC-62 (A) e SK-Mel-05(B) transfectadas com o vetor vazio. Representação gráfica da porcentagem de células hipodiploides (ensaio de morte celular por iodeto de propídeo em citômetro de fluxo) após tratamento com diferentes doses de temozolomida (50μM, 250μM, 360μM e 450μM) em comparação com as células não tratadas (controle e DMSO 0,1%). Dados representativos de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*p<0,05, **p<0,001).

Figura 20. Resposta a vemurafenib das células UACC-62 (A) e SK-Mel-05(B) transfectadas com o vetor vazio. Representação gráfica da porcentagem de células hipodiploides (ensaio de morte celular por iodeto de propídeo em citômetro de fluxo) após tratamento com diferentes doses de vemurafenib (0,1μM, 1μM e 10μM) em comparação com as não tratadas (controle e DMSO 0,1%) Dados representativos de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão e resultados estatisticamente significativos foram representados com asterisco (*p<0,05, **p<0,001).

Com o objetivo de determinar se a superexpressão da variante UTR/T conferia alguma vantagem adaptativa com relação a quimiorresistência, ensaios de determinação de morte celular e capacidade clonogênica foram feitos em ambas linhagens transfectadas com os diferentes vetores UTR/C e UTR/T. As células foram tratadas com 50 μ M de temozolomida por 72 hrs, 1 μ M de vemurafenib por 72hs ou 5 μ M de cisplatina por 48hs (a padronização da concentração de cisplatina tinha sido previamente estabelecida por nosso laboratório no projeto 2011/18337-6). Após o tratamento foi determinada a porcentagem de morte celular (células hipodiploides) em cada caso e as células vivas sobreviventes foram plaqueadas em baixa densidade para determinação da capacidade clonogênica a longo prazo. A Figura 21 mostra que as células UACC-62 transfectadas com a variante UTR/T apresentaram menor porcentagem de morte celular e maior capacidade clonogênica após o tratamento com temozolomida, em comparação com as células UTR/C, (Figura 21.A e C) indicando que a expressão exógena da 3'UTR/T protege as células da morte induzida pelos quimioterápicos e incrementa a capacidade clonogênica das mesmas. No caso das células SK-Mel-05, embora tenha se apresentado uma maior morte das células contendo a variante UTR/T (Figura 21.B), as células superviventes do tratamento tiveram uma maior capacidade clonogênica em comparação com as células contendo a variante UTR/C (Figura 21.D) simulando uma repopulação tumoral concorrente de falha terapêutica. Mostrando que a variante UTR/T modula a quimioproteção nas células UACC-62 quando tratadas com temozolomida.

Figura 21. O SNP rs6917 influencia a resposta de morte celular nas células UACC-62 e SK-Mel-05 após tratamento com temozolomida. Sensibilidade a temozolomida das células em função das variantes alélicas da 3'UTR da *PHB*. Representação gráfica da porcentagem de células hipodiploides (ensaio de morte celular por Iodeto de propideo em citômetro de fluxo) das células UACC 62 (A) e SK-Mel-05 (B) transfectadas com o alelo selvagem (3'UTR/C) ou o alelo raro (3'UTR/T) em comparação com o vetor vazio (EV), após tratamento por 72 h com 50µM de temozolomida em comparação com as não tratadas (controle negativo: DMSO 0,1%). Dados representativos de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e os resultados estatisticamente significativos estão representados com asterisco (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Capacidade clonogênica das células em função das variantes alélicas de *PHB* após tratamento. Células vivas UACC-62 (C) e SK-Mel-05 (D) foram plaqueadas em baixa densidade após tratamento de 72 hrs com temozolomida (50 µM). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos estão representados pelo asterisco (**** $p < 0,01$).

A Figura 22 mostra como as células transfectadas com a variante UTR/T modulam o fenótipo de quimiorresistência das células após tratamento com vemurafenib ao obter uma menor porcentagem de morte celular (Figura 22. A e B) e maior capacidade clonogênica (Figura 22. C e D) após o tratamento com vemurafenib, em comparação com as células UTR/C, indicando que a expressão exógena da 3'UTR/T protege as células da morte celular.

Figura 22. O SNP rs6917 influencia a resposta de morte celular nas células UACC-62 e SK-Mel-05 após tratamento com vemurafenib. Sensibilidade a vemurafenib das células em função das variantes alélicas da 3'UTR da *PHB*. Representação gráfica da porcentagem de células hipodiplóides (ensaio de morte celular por iodeto de propideo em citômetro de fluxo) das células UACC 62 e SK-Mel-05 (B) transfectadas com o alelo selvagem (3'UTR/C) ou o alelo raro (3'UTR/T) em comparação com o vetor vazio (EV), após tratamento por 72 h com 1 μ M de vemurafenib em comparação com as não tratadas (controle negativo: DMSO 0,1%). Dados representativos de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e os resultados estatisticamente significativos estão representados com asterisco (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Capacidade clonogênica de células em função das variantes alélicas de *PHB* após tratamento com vemurafenib. Células vivas UACC-62 (C) e SK-Mel-05(D) foram plaqueadas em baixa densidade após tratamento de 72 hrs com vemurafenib (1 μ M). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos estão representados pelo asterisco (**** $p < 0,01$).

Nossos resultados apontam que as células que superexpressam a variante 3'UTR/T apresentam um comportamento mais quimiorresistente em comparação com as que expressam a variante 3'UTR/C. Além disso, estes resultados sugerem que superexpressão da variante 3'UTR/C nas células UACC-62 e SK-Mel-05 tratadas com cisplatina é suficiente para quimiossensibilizar as células revertendo o fenótipo quimiorresistente, apresentando uma maior morte celular (Figura 23. A e B) e capacidade clonogênica (Figura 23. C e D) em comparação com as células 3'UTR/T.

Figura 23. O SNP rs6917 influencia a resposta de morte celular nas células UACC-62 após tratamento com cisplatina. Sensibilidade a cisplatina das células em função das

variantes alélicas da 3'UTR da 3'UTR da *PHB*. Representação gráfica da porcentagem de células hipodiplóides (ensaio de morte celular por Iodeto de propídeo em citômetro de fluxo) das células UACC 62 (A) e SK-Mel-05(B) transfectadas com o alelo selvagem (3'UTR/C) ou o alelo raro (3'UTR/T) em comparação com o vetor vazio (EV), após tratamento por 48 hrs com 5 μ M de cisplatina em comparação com as não tratadas (controle negativo). Dados representativos de três experimentos independentes. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e os resultados estatisticamente significativos estão representados com asterisco (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$). **Capacidade clonogênica de células em função das variantes alélicas de *PHB* após tratamento com cisplatina.** Células vivas UACC-62 (C) e SK-Mel-05(D) foram plaqueadas em baixa densidade após tratamento de 48 hrs com cisplatina (5 μ M). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos estão representados pelo asterisco (**** $p < 0,01$).

Ainda não existem trabalhos publicados sobre a funcionalidade do SNP de *PHB* e quimiorresistência em melanoma. No entanto, Manjeshwar *et al.*, 2004 demonstrou *in vivo* que a superexpressão da variante UTR/C da *PHB* causou uma completa regressão tanto do tumor primário mamário murino como da metástase, mostrando a atividade supressora tumoral da variante UTR/C. O nosso trabalho demonstra que esta atividade anti-tumoral que se obtém após a introdução do DNA exógeno pode ser potencializada com a adição dos quimioterápicos atualmente utilizados em melanoma.

5.6 A superexpressão da variante UTR/T modula positivamente a migração nas células de melanoma humano SK-Mel-05.

Manjeshwar *et al.*, 2004, demonstrou que a superexpressão da UTR/C diminuía a motilidade das células MCF7 estimuladas com fator de crescimento de queratinócitos (KFG, Keratinocyte Growth Factor, potente indutor de motilidade e migração nas células MCF7) em comparação com células EV. Nos corroboramos com este resultado, na

linhagem SK-Mel-05, (Figura 24.a) onde evidenciamos uma menor migração das células UTR/C em comparação com as UTR/T, estas últimas conseguiram invadir uma área maior após o estímulo com o risco (Figura 24.b). Esta diferença no fenótipo migratório das células após a introdução das variantes 3'UTR da *PHB* concorda com os resultados evidenciados nos pacientes da UNICAMP (Tabela 7) onde encontramos uma associação do melanoma de crescimento vertical com a presença do alelo T. No entanto, nas células UACC-62, obtivemos uma maior migração das células contendo a variante UTR/C (Figura 25.a,b) em comparação com as células UTR/T. Este resultado pode ser justificado porque esta linhagem celular possui uma mutação inativadora de PTEN, uma fosfatase que inibe os produtos de PI3K, ao estar inativo PTEN, estes produtos, ativam PDK1 que é uma quinase ativadora de AKT. A via PTEN/PI3K/AKT com ativação constitutiva de AKT, potencializa a migração celular, o que sugere que o transcrito UTR/C não tem efeito quando PTEN está inativo. Quando analisada a migração sem estímulo nas células individuais (Figura 26), não foram observadas diferenças qualitativas marcantes nos percorridos entre os subclones, unicamente se evidenciou um padrão de migração com menos área percorrida do subclone T2 da linhagem UACC-62 (Figura 26b).

Figura 24. Efeito da 3'UTR/T da *PHB* na migração nas células de melanoma humano SK-Mel-05. A) Movimentação espacial ao longo do tempo da monocamada de células plaqueadas em alta densidade e submetidas ao risco. 20X. B). Representação gráfica da porcentagem de área invadida das células após o estímulo do risco. C) Níveis de expressão de genes associados a transição epitélio mesênquima nas células transfectadas com as variantes alélicas da 3'UTR da *PHB*, usando análise por real-time RT-PCR. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos estão representados pelo asterisco (**** $p < 0,01$).

Figura 25. Efeito da 3'UTR/T da *PHB* na migração nas células de melanoma humano UACC-62. A) Movimentação espacial ao longo do tempo da monocamada de células plaqueadas em alta densidade e submetidas ao risco. 20X. B). Representação gráfica da porcentagem de área invadida das células após o estímulo do risco. C) Níveis de expressão de genes associados a transição epitélio mesênquima nas células transfectadas com as variantes alélicas da 3'UTR da *PHB*, usando análise por real-time RT-PCR. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e resultados estatisticamente significativos estão representados pelo asterisco (**** $p < 0,01$).

Figura 26. Representação gráfica do percurso migratório individual realizado por as células de melanoma humano. A) SK-Mel-05 e B) UACC-62. Gráficos representando a movimentação espacial das células ao longo do tempo. Cada cor representa uma célula individual e cada plot teve pelo menos 10 células por imagem analisada.

5.7 A superexpressão da 3'UTR/T da *PHB* pode atuar como esponja de miRNAs modulando a quimiorresistência em melanoma.

Uma das nossas hipóteses é que a sequência do transcrito da 3'UTR/T pode ser similar com outros transcritos endógenos na célula e que a sua superexpressão causaria um possível efeito esponja ao sequestrar fatores regulatórios (Figura 27) que deixariam de reconhecer os alvos endógenos, o que mudaria o fenótipo e comportamento da célula.

Figura 27. Possível mecanismo de ação da superexpressão das variantes alélicas da 3'UTR da *PHB*. Nas células sem transfectação, elementos regulatórios (como microRNAs ou RNA binding proteins) se unem a transcritos endógenos. A introdução de um RNAm exógeno sequestra estes elementos regulatórios, deixando livres os transcritos endógenos para uma posterior tradução o que pode mudar o fenótipo da célula. Modificado de Ebert & Sharp, 2010.

A introdução de uma sequência exógena como a 3'UTR da *PHB* pode ser suficiente para sequestrar elementos regulatórios endógenos o que ocasionaria uma interrupção na interação com outros transcritos celulares desencadeando uma mudança no fenótipo.

Para entender o papel funcional da introdução de uma região não codificante UTR *PHB* na célula, determinamos os elementos regulatórios que se unem especificamente a esta sequência, os elementos secundários que são alterados indiretamente e as vias nas

quais estes estão envolvidas. Para isso, foram preditos os miRNAs que estariam sendo sequestrados ao reconhecer as sequências s 3'UTR/C e 3'UTR/T através softwares microSNPer (<http://cbdb.nimh.nih.gov/microsniper>) e Mirbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu>) os possíveis microRNAs (Tabela 8). Para a variante 3'UTR/C foram preditos cinco miRNAs (hsa-miR-3687, hsa-miR-602, hsa-miR-4462, hsa-miR-1277-3p, hsa-miR-1277-3p e hsa-miR-4476), e para a variante 3'UTR/T foram preditos oito miRNAs (hsa-miR-4643, hsa-miR-1292-5p, hsa-miR-200b-5p, hsa-miR-200a-5p, hsa-miR-141-5p, hsa-miR-431-3p, hsa-miR-4789-3p, hsa-miR-4717-3p).

Em seguida, foi estabelecido os genes alvos para cada miRNAs através do software Mirtarget (<http://mirdb.org/>).

Observamos as redes de interação dos miRNAs e seus genes alvo utilizando o *software* Ingenuity (IPA- Pathway Analysis da Qiagen) e Navigator (Figura 28).

Os genes alvos encontrados foram submetidos a análise de enriquecimento em diferentes processos celulares através do genecodis (<http://genecodis.cnb.csic.es>) (Figura 29). Para os genes alvos da variante UTR/C (Figura 29.a) foi observado o enriquecimento de genes envolvidos na regulação positiva da proliferação celular (10%) e da anti-apoptose (6%), o que explicaria a alteração de ambos processos nas células superexpressando a variante UTR/C. Interessantemente, esta variante apresentou menor proliferação e maior morte celular em comparação com as células superexpressando a variante polimórfica UTR/T. Ao fazer a análise *in silico* dos genes alvos da variante UTR/T (Figura 29.b), obtivemos enriquecimento de genes em processos envolvidos tanto na regulação positiva (10%) como negativa da apoptose (5%), que confirma os nossos resultado *in vitro*, sugerindo que a somatória de ambos processos celulares tem como resultado final a

diminuição da morte nas células que superexpressam a variante UTR/T. Além disso, foi observado o enriquecimento de genes envolvidos na regulação da proliferação (4%), ciclo celular (4%) e divisão celular (2%), migração celular (2%), resposta a droga (3%), reparo de DNA (2%) e resposta a estímulo de dano de DNA (3%). Dados que concordam com os nossos resultados *in vitro*, como o aumento na cinética de proliferação, mudança no perfil migratório e maior quimiorresistência, respectivamente, nas células expressando a variante polimórfica UTR/T.

Utilizando o software KEGG (Figura 30), obtivemos a análise de enriquecimento de genes envolvidos com vias de sinalização. Para os genes alvos dos miRNAs da variante 3'UTR/T, foi observado o enriquecimento de genes associados com a sinalização envolvidas em câncer (17%), entre os quais se destaca o glioma (8%), câncer de próstata (7%) e o modelo do nosso estudo, melanoma (7%) o que abre novas portas ao descobrimento de genes alterados pelo efeito esponja da 3'UTR/T, que possivelmente possam ser responsáveis diretos da mudança fenotípica observada com a inserção e superexpressão da variante UTR/T da *PHB*.

Tabela 8. miRNAs preditos para cada variante polimórfica 3'UTR da *PHB*.

Variante polimórfica <i>PHB</i>	miRNAs preditos (MicroSNiPer)	Sequência miRNA	Reportados em melanoma (mirtabase)
3'UTR/C	hsa-miR-3687	CCCGGACAGGCGUUCGUGCGACGU	Não
	hsa-miR-602	GACACGGGCGACAGCUGCGGCCC	Não
	hsa-miR-4462	UGACACGGAGGGUGGCUUGGGAA	Não
	hsa-miR-1277-3p	UACGUAGAUUAUAUGUAUUUU	Não
	hsa-miR-4476	CAGGAAGGAUUUAGGGACAGGC	Não
3'UTR/T	hsa-miR-4643	GACACAUGACCAUAAAUGCUGAA	Não
	hsa-miR-1292-5p	UGGGAACGGGUUCCGGCAGACGCUG	Não
	hsa-miR-200b-5p	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	Sim
	hsa-miR-200a-5p	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA	Sim
	hsa-miR-141-5p	CAUCUCCAGUACAGUGUUGGA	Sim
	hsa-miR-431-3p	CAGGUCGUCUUGCAGGGCUUCU	Não
	hsa-miR-4789-3p	CACACAUAGCAGGUGUAUAUA	Não
	hsa-miR-4717-3p	ACACAUGGGUGGCUGUGGCCU	Não

Figura 28. Representação gráfica da rede biológica de interação gênica que considera os genes envolvidos na regulação pelos microRNAs preditos para as variantes polimórficas 3'UTR/C (A) e 3'UTR/T (B) investigadas nesse estudo.

Figura 29. Processos celulares enriquecidos a partir dos genes alvos dos miRNAs preditos para as variantes polimórficas 3'UTR/C (A) e 3'UTR/T (B) da *PHB*. As análises foram obtidas pelo *software* Genecodis e todas as vias celulares apresentadas apresentam diferença estatisticamente significativa.

Figura 30. Vias celulares enriquecidas a partir dos genes alvos dos miRNAs preditos para a variante polimórfica 3'UTR/T da *PHB*. As análises foram obtidas pelo *software* KEGG e todas as vias celulares apresentadas apresentam diferença estatisticamente significativa.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados revelaram que variáveis clínicas como a presença de cabelos claros (loiros ou ruivos), mais de 20 pintas, exposição solar intermitente e queimaduras solares na infância e adolescência são fatores de risco para o aparecimento de melanoma.

Nos casos, os portadores do alelo T mostraram um risco aumentado em 5,6 vezes para o desenvolvimento de melanoma de crescimento vertical em comparação com os pacientes com genótipo CC, o que sugere que o SNP rs6917 pode modular a progressão deste tipo de tumor, desde estádios histopatológicos do melanoma mais invasivos desde melanoma *in situ* até o melanoma de crescimento vertical.

Ensaio *in vitro* de morte celular nas linhagens de melanoma humano UACC-62 e SK-Mel-05 transfectadas com a porção 3' UTR polimórfica contendo o alelo raro T (3'UTR/T) e expostas à temozolomida, vemurafenib ou cisplatina, revelaram uma porcentagem menor de células hipodiplóides (indicador de morte celular) depois do tratamento em comparação com as células superexpressando a variante 3'UTR/C e as células vetor vazio (pmirGLO-EV).

Além de existir um aumento na resistência a morte celular após à exposição aos quimioterápicos, também foi observado um aumento na capacidade clonogênica das células superexpressando a variante alélica 3'UTR/T o que pode sugerir uma maior capacidade de recidiva após tratamento.

Também foi observado que a superexpressão da 3'UTR/T modula a localização subcelular da proibitina. Ensaio de imunofluorescência mostraram que a PHB permanece dentro do núcleo nas células 3'UTR/T em comparação com as células 3'UTR/C e

pmirGLO-EV onde a PHB se localiza tanto dentro como fora do núcleo, o que ocasionaria a interação da PHB com diferentes elementos que poderiam mudar o fenótipo quimiorresistente da célula.

Com estes resultados podemos concluir que o SNP rs6917 é um polimorfismo funcional que exerce um papel de extrema importância no desenvolvimento do melanoma além de promover um fenótipo mais quimiorresistente nas células expostas aos diferentes tratamentos.

No entanto, consideramos que uma doença complexa como o melanoma, raramente é causada por alterações em um único mecanismo e sabemos que um número de fatores são envolvidos na progressão da doença e sua quimiorresistência.

Ensaio de Western-blot e bioluminescência mostraram respectivamente um aumento na expressão e atividade da luciferase nas células 3'UTR/T em comparação com as células UTR/C. O que sugere que existem mecanismos intrínsecos da célula que desestabilizam o transcrito exógeno.

Análises *in silico* de processos envolvidos no efeito esponja da variante UTR/T predizeram um enriquecimento de genes afetados em processos relacionados com resposta a droga e reparo de DNA o que concorda com os nossos resultados *in vitro*, onde se obteve uma maior quimiorresistência das células expressando a variante polimórfica UTR/T, além de enriquecimento de genes envolvidos em outros processos importantes para o desenvolvimento de câncer como apoptose, proliferação e divisão celular e que possivelmente sejam os responsáveis diretos da mudança fenotípica observada com a inserção e superexpressão da variante UTR/T da *PHB* (Figura 31).

Figura 31. Possível efeito da superexpressão da 3'UTR/T da *PHB*. A superexpressão do transcrito 3'UTR/T se une a elementos regulatórios como microRNAs. O sequestro desses elementos inibe a degradação de transcritos endógenos envolvidos na quimiorresistência e desenvolvimento de melanoma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Artal-Sanz, M., & Tavernarakis, N. (2009). Prohibitin and mitochondrial biology. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(8), 394–401. <http://doi.org/10.1016/j.tem.2009.04.004>
- Berkovits, B. D., & Mayr, C. (2015). Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature*, 522(7556), 363–367. <http://doi.org/10.1038/nature14321>
- Chatterjee, S., & Pal, J. K. (2009). Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 101(5), 251–62. <http://doi.org/10.1042/BC20080104>
- Chen, J.-M., Férec, C., & Cooper, D. N. (2006a). A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Human Genetics*, 120(1), 1–21. <http://doi.org/10.1007/s00439-006-0180-7>
- Chen, J.-M., Férec, C., & Cooper, D. N. (2006b). A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3' UTR variants. *Human Genetics*, 120(3), 301–33. <http://doi.org/10.1007/s00439-006-0218-x>
- Choi, S. Il, Han, K. S., Kim, C. W., Ryu, K.-S., Kim, B. H., Kim, K.-H., ... Seong, B. L. (2008). Protein Solubility and Folding Enhancement by Interaction with RNA. *PLoS ONE*, 3(7), e2677. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002677>
- Choi, S. Il, Lim, K.-H., & Seong, B. L. (2011). Chaperoning Roles of Macromolecules Interacting with Proteins in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 1979–1990. <http://doi.org/10.3390/ijms12031979>
- Chowdhury, I., Thompson, W. E., & Thomas, K. (2014). Prohibitins role in cellular survival through Ras-Raf-MEK-ERK pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 229(8), 998–1004. <http://doi.org/10.1002/jcp.24531>
- Citrangulo Tortelli Junior, T., Martins Franco de Godoy, L., Antonio de Souza, G., Bonatto, D., Hanada Otake, A., de Freitas Saito, R., ... Roger Chammas, and. (2017). Accumulation of prohibitin is a common cellular response to different stressing stimuli and protects melanoma cells from ER stress and chemotherapy-induced cell death. *Oncotarget*, 8(26), 43114–43129. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.17810>
- Cullen, K. J., Yang, Z., Schumaker, L., & Guo, Z. (2007). Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 39(1), 43–50. <http://doi.org/10.1007/s10863-006->

- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2010). MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(11), 2043–50. <http://doi.org/10.1261/rna.2414110>
- Fitzpatrick, T. B. (1988). The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Archives of Dermatology*, 124(6), 869–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3377516>
- Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B., & Chellappan, S. (2003). Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47853–61. <http://doi.org/10.1074/jbc.M305171200>
- Gonçalves, F. T., Francisco, G., de Souza, S. P., Luiz, O. C., Festa-Neto, C., Sanches, J. A., ... Eluf-Neto, J. (2011). European ancestry and polymorphisms in DNA repair genes modify the risk of melanoma: a case-control study in a high UV index region in Brazil. *Journal of Dermatological Science*, 64(1), 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2011.06.003>
- Gruber, A. R., Martin, G., Müller, P., Schmidt, A., Gruber, A. J., Gumienny, R., ... Zavolan, M. (2014). Global 3' UTR shortening has a limited effect on protein abundance in proliferating T cells. *Nature Communications*, 5, 5465. <http://doi.org/10.1038/ncomms6465>
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F. S., Hwu, W.-J., Kefford, R., ... Ribas, A. (2013). Safety and Tumor Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 369(2), 134–144. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1305133>
- Hirokawa, N. (2006). mRNA Transport in Dendrites: RNA Granules, Motors, and Tracks. *Journal of Neuroscience*, 26(27), 7139–7142. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1821-06.2006>
- Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F., & McMahon, M. (2014). Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nature Reviews. Cancer*, 14(7), 455–67. <http://doi.org/10.1038/nrc3760>
- Jakubowska, A., Gronwald, J., Górski, B., Huzarski, T., Byrski, T., Benner, A., ... Hamann, U. (2007). The 3' untranslated region C > T polymorphism of prohibitin is a breast cancer risk modifier in Polish women carrying a BRCA1 mutation. *Breast Cancer Research and Treatment*, 104(1), 67–74. <http://doi.org/10.1007/s10549-006-9389-3>
- Jupe, E. R., Badgett, A. A., Neas, B. R., Craft, M. A., Mitchell, D. S., Resta, R., ... Thompson, L. F. (2001). Single nucleotide polymorphism in prohibitin 3' untranslated region and breast-cancer susceptibility. *Lancet (London, England)*, 357(9268), 1588–

9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11377649>
- Jupe, E. R., Liu, X. T., Kiehlbauch, J. L., McClung, J. K., & Dell'Orco, R. T. (1995). Prohibitin antiproliferative activity and lack of heterozygosity in immortalized cell lines. *Experimental Cell Research*, 218(2), 577–80. <http://doi.org/10.1006/excr.1995.1194>
- Jupe, E. R., Liu, X. T., Kiehlbauch, J. L., McClung, J. K., & Dell'Orco, R. T. (1996). The 3' untranslated region of prohibitin and cellular immortalization. *Experimental Cell Research*, 224(1), 128–35. <http://doi.org/10.1006/excr.1996.0120>
- Kasashima, K., Sumitani, M., Satoh, M., & Endo, H. (2008). Human prohibitin 1 maintains the organization and stability of the mitochondrial nucleoids. *Experimental Cell Research*, 314(5), 988–96. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.005>
- Keating, G. M. (2012). Vemurafenib: in unresectable or metastatic melanoma. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 26(5), 325–34. <http://doi.org/10.2165/11209860-000000000-00000>
- Koushyar, S., Jiang, W. G., & Dart, D. A. (2015). Unveiling the potential of prohibitin in cancer. *Cancer Letters*, 369(2), 316–22. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.09.012>
- Leal, M. F., Cirilo, P. D. R., Mazzotti, T. K. F., Calcagno, D. Q., Wisnieski, F., Demachki, S., ... Smith, M. C. (2014). Prohibitin expression deregulation in gastric cancer is associated with the 3' untranslated region 1630 C>T polymorphism and copy number variation. *PloS One*, 9(5), e98583. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098583>
- Manjeshwar, S., Branam, D. E., Lerner, M. R., Brackett, D. J., & Jupe, E. R. (2003). Tumor suppression by the prohibitin gene 3' untranslated region RNA in human breast cancer. *Cancer Research*, 63(17), 5251–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500355>
- Manjeshwar, S., Lerner, M. R., Zang, X.-P., Branam, D. E., Pento, J. T., Lane, M. M., ... Jupe, E. R. (2004). Expression of prohibitin 3' untranslated region suppressor RNA alters morphology and inhibits motility of breast cancer cells. *Journal of Molecular Histology*, 35(6), 639–46. <http://doi.org/10.1007/s10735-004-2185-7>
- Mayr, C., & Bartel, D. P. (2009). Widespread Shortening of 3'UTRs by Alternative Cleavage and Polyadenylation Activates Oncogenes in Cancer Cells. *Cell*, 138(4), 673–684. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.016>
- McClung, J. K., Jupe, E. R., Liu, X. T., & Dell'Orco, R. T. (n.d.). Prohibitin: potential role in senescence, development, and tumor suppression. *Experimental Gerontology*, 30(2), 99–124. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8591812>
- Meer, E. J., Wang, D. O., Kim, S., Barr, I., Guo, F., & Martin, K. C. (2012). Identification

- of a cis-acting element that localizes mRNA to synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), 4639–4644. <http://doi.org/10.1073/pnas.1116269109>
- Menzies, A. M., & Long, G. V. (2013). Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond. *European Journal of Cancer (Oxford, England)*: 1990), 49(15), 3229–41. <http://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.027>
- Miller, D. M., Flaherty, K. T., & Tsao, H. (2014). Current status and future directions of molecularly targeted therapies and immunotherapies for melanoma. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 33(2), 60–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25085663>
- Mishra, S., Ande, S. R., & Nyomba, B. L. G. (2010). The role of prohibitin in cell signaling. *The FEBS Journal*, 277(19), 3937–46. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07809.x>
- Mishra, S., Murphy, L. C., Nyomba, B. L. G., & Murphy, L. J. (2005). Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, 11(4), 192–7. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.004>
- Mitra, M., Johnson, E. L., & Collier, H. A. (2015). Alternative polyadenylation can regulate post-translational membrane localization. *Trends in Cell & Molecular Biology*, 10, 37–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26937127>
- Mouawad, R., Seibert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.-P., & Khayat, D. (2010). Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 74(1), 27–39. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.08.005>
- Nuell, M. J., Stewart, D. A., Walker, L., Friedman, V., Wood, C. M., Owens, G. A., ... Lumpkin, C. K. (1991). Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Molecular and Cellular Biology*, 11(3), 1372–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1996099>
- Qian, X., Zhao, P., Li, W., Shi, Z.-M., Wang, L., Xu, Q., ... Jiang, B.-H. (2013). MicroRNA-26a promotes tumor growth and angiogenesis in glioma by directly targeting prohibitin. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(10), 804–12. <http://doi.org/10.1111/cns.12149>
- Rajalingam, K., & Rudel, T. (2005). Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 4(11), 1503–5. <http://doi.org/10.4161/cc.4.11.2142>
- Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., ... Rudel, T. (2005). Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nature Cell Biology*, 7(8), 837–43.

<http://doi.org/10.1038/ncb1283>

- Rastrelli, M., Alaibac, M., Stramare, R., Chiarion Sileni, V., Montesco, M. C., Vecchiato, A., ... Rossi, C. R. (2013). Melanoma m (zero): diagnosis and therapy. *ISRN Dermatology*, 2013, 616170. <http://doi.org/10.1155/2013/616170>
- Ribas, A., Puzanov, I., Dummer, R., Schadendorf, D., Hamid, O., Robert, C., ... Daud, A. (2015). Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*, 16(8), 908–918. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00083-2](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00083-2)
- Sandberg, R., Neilson, J. R., Sarma, A., Sharp, P. A., & Burge, C. B. (2008). Proliferating Cells Express mRNAs with Shortened 3' Untranslated Regions and Fewer MicroRNA Target Sites. *Science*, 320(5883), 1643–1647. <http://doi.org/10.1126/science.1155390>
- Serrone, L., Zeuli, M., Segal, F. M., & Cognetti, F. (2000). Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*: CR, 19(1), 21–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840932>
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 345–358. <http://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
- Singh, P., Alley, T. L., Wright, S. M., Kamdar, S., Schott, W., Wilpan, R. Y., ... Graber, J. H. (2009). Global Changes in Processing of mRNA 3' Untranslated Regions Characterize Clinically Distinct Cancer Subtypes. *Cancer Research*, 69(24), 9422–9430. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2236>
- Søndergaard, J. N., Nazarian, R., Wang, Q., Guo, D., Hsueh, T., Mok, S., ... Ribas, A. (2010). Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *Journal of Translational Medicine*, 8, 39. <http://doi.org/10.1186/1479-5876-8-39>
- Stierner, U., Augustsson, A., Rosdahl, I., & Suurküla, M. (1991). Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma site and sun exposure. A case-control study. *Melanoma Research*, 1(5-6), 367–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422192>
- Sullivan, R. J., Lorusso, P. M., & Flaherty, K. T. (2013). The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: where we have been, are, and will be. *Clinical Cancer Research*: An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 19(19), 5283–91. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2151>
- Tang, L., Zhao, Y., Nie, W., Wang, Z., & Guan, X. (2013). 3' untranslated region 1630 C>T polymorphism of prohibitin increases risk of breast cancer. *OncoTargets and Therapy*, 6, 177–82. <http://doi.org/10.2147/OTT.S40997>

- Tatsuta, T., Model, K., & Langer, T. (2005). Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 16(1), 248–59. <http://doi.org/10.1091/mbc.E04-09-0807>
- Topalian, S. L., Sznol, M., McDermott, D. F., Kluger, H. M., Carvajal, R. D., Sharfman, W. H., ... Hodi, F. S. (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of Clinical Oncology*: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 32(10), 1020–30. <http://doi.org/10.1200/JCO.2013.53.0105>
- Wang, S., Fusaro, G., Padmanabhan, J., & Chellappan, S. P. (2002). Prohibitin co-localizes with Rb in the nucleus and recruits N-CoR and HDAC1 for transcriptional repression. *Oncogene*, 21(55), 8388–96. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1205944>
- Zaidi, M. R., Day, C.-P., & Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *The Journal of Investigative Dermatology*, 128(10), 2381–91. <http://doi.org/10.1038/jid.2008.177>
- Zhang, L., Ji, Q., Ni, Z.-H., & Sun, J. (2012). Prohibitin induces apoptosis in BGC823 gastric cancer cells through the mitochondrial pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*: APJCP, 13(8), 3803–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23098474>
- Zhou, T.-B., Yin, S.-S., Huang, J.-J., & Ou, C. (2012). Relationship between the prohibitin 3' untranslated region C > T gene polymorphism and cancer susceptibility--results of a meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*: APJCP, 13(7), 3319–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22994754>

8. ANEXOS

Documentos fornecidos pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da UNICAMP, assim como as fichas de coleta dos dados clínicos dos casos e controles que participaram e os termos de consentimento livre esclarecido para participação no estudo.

APROVAÇÃO

O Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em de **20/05/2015**, **APROVOU** **ad-referendum** o Sub Projeto do Protocolo de Pesquisa nº **208/15** intitulado: **“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO SNP rs6917 (C1703T) REGIÃO 3’UTR DO GENE PROBITINA E QUIMIORRESISTÊNCIA A TEMOZOLOMIDA E PLX-4032 EM MELANOMA”** apresentado pelo Departamento de RADIOLOGIA E ONCOLOGIA, como parte do projeto nº **426/11** intitulado **“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA REGIÃO 3’UTR DO GENE PHB EM MELANOMA HUMANO”** (Pesquisador responsável: Roger Chammas, Pesquisadora executante Priscila Daniele Cirilo Ramos)

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra “c”).

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Roger Chammas
Pesquisador (a) Executante: Lizeth Carolina Córdoba Camacho

CEP-FMUSP, 20 de Maio de 2015.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

APROVAÇÃO

O Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19.10.2011, **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº 426/11, intitulado: "Caracterização funcional da região 3'UTR do gene PHB em melanomas humano", apresentado pelo Departamento de Radiologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Prof. Dr. Roger Chammas

Pesquisador (a) Executante: Priscila Daniele Ramos Cirilo

CEP-FMUSP, 19 de outubro de 2011

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador Interino
Comitê de Ética em Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Influência de polimorfismos no gene PDCD1, regulador da atividade linfocitária, na expressão gênica e suscetibilidade ao melanoma cutâneo

Pesquisador: Gabriela Vilas Boas Gomez

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 4

CAAE: 23564813.1.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.454.022

Apresentação do Projeto:

Emenda ao projeto original, na qual a pesquisadora solicita a adição do CNPJ do centro co-participante para reconhecimento da aprovação no sistema do ICESP.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda ao projeto original, na qual a pesquisadora solicita a adição do CNPJ do centro co-participante para reconhecimento da aprovação no sistema do ICESP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mantidos em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisadora solicita a inclusão do CNPJ Nº56.577.059/0006-06 da instituição co-participante, FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA sob responsabilidade do pesquisador Dr Roger Chammas, para reconhecimento da aprovação no sistema do ICESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta emenda foi analisado o documento anexado: "Informações Básicas do projeto" (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_680385_E2.pdf 15/03/2016 11:04:01). As informações fornecidas

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 1.454.022

pela pesquisadora: "A modificação se refere a uma parceria com o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Centro Translacional em Oncologia, junto com o mesmo grupo de pesquisa sob orientação da mesma professora para a realização da genotipagem de um novo polimorfismo relacionado com o projeto principal. E se trata de um estudo retrospectivo, em que serão utilizadas as mesmas amostras de sangue e os mesmos das

clínicos dos pacientes com melanoma, o que justifica a autorização para a utilização das amostras já incluídas no estudo anterior", já foram analisadas e aprovadas anteriormente na emenda 1 deste projeto.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda solicitando a inclusão do CNPJ da instituição co-participante aprovada.

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_680385 E2.pdf	15/03/2016 11:04:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto com adendo 2016.pdf	06/02/2016 22:44:38	Gabriela Vilas Boas Gomez	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE 2.pdf	28/11/2013 15:41:35		Aceito
Outros	Esclarecimento ao Comitê de ética.pdf	28/11/2013 15:38:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Gabriela 2013.pdf	28/11/2013 15:33:52		Aceito
Outros	declaração.JPG	28/11/2013 15:32:06		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.JPG	28/11/2013 15:23:13		Aceito
Outros	Biorrepositório LAGECA 2013 B.pdf	17/10/2013 14:38:02		Aceito
Outros	Declaração Carmen projeto Gabi CEP 2013.pdf	17/10/2013 14:37:45		Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 1.454.022

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 16 de Março de 2016

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Influência de polimorfismos no gene PDCD1, regulador da atividade linfocitária, na expressão gênica e suscetibilidade ao melanoma cutâneo

Pesquisador: Gabriela Vilas Boas Gomez

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 23564813.1.0000.5404

Instituição Proponente: Centro de Hematologia e Hemoterapia - HEMOCENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.432.848

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto original, aprovado por este CEP.

A emenda apresenta a seguinte justificativa:

"A modificação se refere a uma parceria com o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Centro Translacional em Oncologia, junto com o mesmo grupo de pesquisa sob orientação da mesma professora para a realização da genotipagem de um novo polimorfismo relacionado com o projeto principal. E se trata de um estudo retrospectivo, em que serão utilizadas as mesmas amostras de sangue e os mesmos das clínicos dos pacientes com melanoma, o que justifica a autorização para a utilização das amostras já incluídas no estudo anterior."

Objetivo da Pesquisa:

Mantidos em relação ao projeto original.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Análises serão baseadas em amostras já colhidas para o presente estudo. Não haverá riscos ou benefícios adicionais, associados à presente emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

**COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS**

Continuação do Parecer: 1.432.848

Para a presente emenda os pesquisadores enviaram o projeto com as modificações devidamente ressaltadas em tarja amarela, além do formulário de informações básicas gerado pela Plataforma Brasil. O estudo será implementado através da introdução de mais um marcador polimórfico, a ser estudado nas biópsias já colhidas para este projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Devidamente apresentados e justificados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Coleta de dados referente a novo marcador biológico, a partir de biópsias já colhidas para o presente projeto.

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 1.432.848

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_654604_E1.pdf	06/02/2016 22:51:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto com adendo 2016.pdf	06/02/2016 22:44:38	Gabriela Vilas Boas Gomez	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE 2.pdf	28/11/2013 15:41:35		Aceito
Outros	Esclarecimento ao Comitê de ética.pdf	28/11/2013 15:38:25		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Gabriela 2013.pdf	28/11/2013 15:33:52		Aceito
Outros	declaração.JPG	28/11/2013 15:32:06		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.JPG	28/11/2013 15:23:13		Aceito
Outros	Biorrepositório LAGECA 2013 B.pdf	17/10/2013 14:38:02		Aceito
Outros	Declaração Carmen projeto Gabi CEP	17/10/2013		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8938 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DA UNICAMP -
CAMPUS CAMPINAS

Continuação do Parecer: 1.432.848

Outros	2013.pdf	14:37:45		Aceito
--------	----------	----------	--	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 02 de Março de 2016

Assinado por:

Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Ficha de Coleta dos Dados Clínicos de Controles

1) Identificação

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Telefone: _____

Nº amostra: _____

2) Caracteres Pessoais:

2.1) Cor da Pele: Branca() Negra() Parda()

2.2) Cor dos olhos: Azul() Verde() Castanho() Preto()

2.3) Cabelo: Preto() Castanho() Loiro() Ruivo()

2.4) Sardas: nenhuma/raras () algumas/muitas()

2.5) Nevos: <20() 20-50() >50()

2.6) Fototipo: I() II() III() IV() V() VI()

Grupo	Eritema	Bronzeado	Sensib.
I Branca	Sempre	Nunca	Muito sensível
II Branca	Sempre	Às vezes	Sensível
III Morena clara	Moderado	Moderado	Normal
IV Morena moderada	Pouco	Sempre	Normal
V Morena escura	Raro	Sempre	Pouco sensível
VI Negra	Nunca	Pele muito pigmentada	Insensível

3) Antecedentes pessoais:

3.1) Fumo: Sim() Não() Quantos cigarros: _____ Por quanto tempo: _____ anos

3.2) Etilismo: Sim() Não() Quantidade/Tipo: _____ Por quanto tempo: _____ anos

3.3) Exposição Solar: Sim() Não() Por quanto tempo: _____ anos

3.4) Queimaduras Solares Infância (até 14 anos) por ano: < 1x() 1-6x() >7x()

3.5) Queimaduras Solares Adolescência (até 15-19 anos) por ano: < 1x() 1-6x() >7x()

3.6) Ocupação exposto ao sol: Sim() Não() Qual? _____

3.7) Exposição solar intermitente: Sim() Não()

3.8) Anos de exposição ao Sol: 0() ≤ 20() >20()

3.9) Histórico de outro tipo de câncer: Sim() Não()

4.0) Histórico de doença-autoimune: Sim() Não()

4) Antecedente Familiares:

4.1) Câncer de Pele Não Melanoma: Negativo() Positivo() 1 ou mais da família com CA de pele

4.2) Câncer de Pele Melanoma: Negativo() Positivo() 1 ou mais da família com melanoma

4.3) Histórico de Câncer: Negativo() Positivo() com histórico de pai e mãe

4.0) Histórico de doença-autoimune: Sim() Não()

OBSERVAÇÕES: _____

5) Padrão de dieta: (A = maior que preconizada; B = menor que preconizada; P = preconizada)

Carnes (2 a 3 porções diárias): Vegetais (3 a 5 porções diárias):

Frutas (2 a 4 porções diárias): Cereais (pão, arroz, massa) (6 a 11 porções diárias):

Ficha de Coleta dos Dados Clínicos de Pacientes e Dados do Tumor

1) Identificação: _____ HC _____

2) Data de nascimento: ____/____/____

3) Dados tumorais:

2.1) Data do diagnóstico: ____/____/____

2.2) Índice de Breslow (mm): _____

2.3) Níveis de Clark: I() II() III() IV() V()

2.4) T: is() 1a() 1b() 2a() 2b() 3a() 3b() 4a() 4b()

2.5) N: 0() 1a() 1b() 2a() 2b() 2c() 3()

2.6) M: 0() X() 1a() 1b() 1c()

2.7) EC: 0() IA() IB() IIA() IIB() IIC() IIIA() IIIB() IIIC() IV()

2.8) Localização do tumor: _____

2.9) Tipo de crescimento: _____

2.10) Ulceração: Sim () Não ()

4) Caracteres pessoais:

3.1) Cor da pele: Branca() Negra() Parda()

3.2) Cor dos olhos: Azul() Verde() Castanho() Preto()

3.3) Cor do cabelo: Preto() Castanho() Loiro() Ruivo()

3.4) Sardas: Sim() Não()

3.5) Nevos: <20 () 20-50 () >50 ()

3.6) Fototipo: I() II() III() IV() V() VI() (Classificação Fitzpatrick)

5) Antecedentes pessoais:

4.1) Exposição solar: Sim() Não() Por quanto tempo: _____ anos Tipo: _____

4.2) Queimaduras solares: Sim() Não()

4.3) Câncer de pele não melanoma: Sim() Não()

4.4) Câncer de pele melanoma: Sim() Não()

4.5) Outro tipo de câncer: Sim () Não()

6) Antecedente familiares:

5.1) Câncer de pele não melanoma: _____

5.2) Câncer de pele melanoma: _____

5.3) Outro tipo de câncer: _____

Termo de Consentimento Livre Esclarecido a ser obtido dos indivíduos controles, para participação no estudo intitulado “Influência de polimorfismo no gene *PCDD1*, regulador da atividade linfocitária, na expressão gênica e na suscetibilidade ao melanoma cutâneo”

Nome:.....

RG: **Raça:** **Idade:** anos

Endereço residencial:.....

Telefone:.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue a ser coletada em veia de um dos braços (volume: 10 ml). Estou ciente que este material será utilizado para avaliar a expressão de um gene, o *PCDD1*, e analisar uma proteína, a PD1, que podem participar da origem do minha doença ou mesmo de suas manifestações. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. Sei que posso sentir dor de pequena intensidade e curta duração no local de punção da veia e, eventualmente, o aparecimento de mancha roxa que vai desaparecer em alguns dias. Sei que terei direito de saber o resultado do meu exame, caso esteja interessado. Neste caso, poderei marcar uma consulta no ambulatório de Oncogenética, que é realizado no mesmo local do ambulatório de Oncologia Clínica, no terceiro andar do Hospital de Clínicas da UNICAMP, no telefone (19) 35217363, com a Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo ou a Profa. Dra Fátima Aparecida Böttcher Luiz, que darão esclarecimentos necessários para o meu caso. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai me trazer prejuízos. Sei que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Sei que outros estudos só serão realizados com o meu sangue após a aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e caso eu concorde com o seu armazenamento.

Em relação a pesquisa:

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando o meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dr. José Augusto Rinck Jr. ou a Dra. Carmen Silvia Passos Lima, no ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Tel: (19) 3251 7363. Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas UNICAMP. Tel: (19) 3521 8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....
Assinatura do controle

.....
Assinatura do responsável legal

.....
Assinatura do pesquisador legal

Campinas, / /

Termo de Consentimento Livre Esclarecido a ser obtido dos pacientes, para participação no estudo intitulado “Influência de polimorfismo no gene *PDCD1*, regulador da atividade linfocitária, na expressão gênica e na suscetibilidade ao melanoma cutâneo”

Nome:.....

RG: **Raça:** **Idade:** anos

Endereço residencial:.....

Telefone:.....

Nome do responsável legal (se paciente incapacitado):

.....

RG:..... **Grau de parentesco:**.....

Endereço:.....

.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume: 10 ml) a ser coletada em veia de um dos braços. Estou ciente de que este sangue será utilizado para a avaliação de uma predisposição pessoal para o desenvolvimento de melanoma maligno ou de como o melanoma evolui. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização destes exames. Sei que posso sentir dor de pequena intensidade e curta duração no local de punção da veia. Sei que terei direito de saber o resultado do meu exame, caso esteja interessado. Neste caso, poderei marcar uma consulta no ambulatório de Onco-Genética, que é realizado no mesmo local do ambulatório de Oncologia Clínica, no terceiro andar do hospital de Clínicas da UNICAMP, no telefone 35217363, com a Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo ou a Profa. Dra Fátima Aparecida Böttcher Luiz, que darão esclarecimentos necessários para o meu caso. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Sei que outros estudos só serão realizados com o meu sangue após a

aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e caso eu concorde com o seu armazenamento.

Em relação a pesquisa:

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, dispensando o meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar o Dr. José Augusto Rinck Júnior ou a Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima, no ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital das Clínicas da UNICAMP, Tel: 3521 7496, 3521 7363.

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo, poderei procurar a secretaria do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas UNICAMP. Tel: 3521 8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....

Assinatura do paciente

.....

Assinatura do responsável legal

.....

Assinatura do pesquisador legal

Campinas, / /