ANA CAROLINA FERREIRA CARDOSO

**Consequências da exposição de células de melanoma
ao *shear stress* para o remodelamento da
microvasculatura intratumoral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Programa de Oncologia
Orientador: Prof. Dr. Roger Chammas

**São Paulo
2018**

ANA CAROLINA FERREIRA CARDOSO

**Consequências da exposição de células de melanoma
ao *shear stress* para o remodelamento da
microvasculatura intratumoral**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutora 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

Cardoso, Ana Carolina Ferreira
Consequências da exposição de células de melanoma
ao shear stress para o remodelamento da
microvasculatura intratumoral / Ana Carolina
Ferreira Cardoso. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Melanoma 2.Galectina 3
3.Resistência de cisalhamento 4.Plasticidade
celular 5.Moduladores da angiogênese 6.Remodelação
vascular

USP/FM/DBD-451/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

À comunidade

À minha mãe Zélia

À minha avó Maria (*in memoriam*)

À minha tia Nena (*in memoriam*) e
todos os pacientes com câncer

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Roger Chammas**, primeiramente pela oportunidade de ser aluna integrante do seu grupo, pelo exemplo de ética e dedicação na pesquisa. Por incentivar e acreditar na minha carreira quando eu mesma tive dúvidas.

À **Dra. Luciana Andrade**, “mãe”, “âncora” e mentora científica, além da amizade, das conversas filosóficas, das inúmeras risadas, do incentivo, da sinceridade e das tantas coisas em comum. Pela ajuda no aperfeiçoamento da minha crítica científica e no meu amadurecimento profissional. Toda a ajuda durante a construção da minha carreira e vida pessoal foi imensamente fundamental.

Aos integrantes do **Laboratório de Oncologia Experimental**, pela convivência diária com conversas pessoais e profissionais, pelo apoio e incentivo em tantos momentos, pela ajuda e conhecimento compartilhado, todos essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Silvina e Renata**, pela amizade cultivada durante todos esses anos. Por me acompanharem e auxiliarem desde os momentos mais difíceis aos mais felizes.

Aos alunos, pesquisadores e professores do **CTO-ICESP**, por todas as trocas e apoio científico durante a realização desse trabalho.

Ao **Grupo de Apoio CTO-ICESP** e as meninas do **Gerenciamento de Projetos**, por todo o suporte para a realização desse trabalho.

À **Keri Schadler** e o **Laboratório de Biologia Vascular Tumoral (MD Anderson Cancer Center)**, que me receberam durante meu estágio no exterior. Por toda a receptividade, carinho, aprendizado e crescimento pessoal e profissional que me acompanharam durante esse processo.

Aos meus pais, **Zélia e Reis**, primeiramente pela vida e educação que me proporcionaram. À minha mãe **Zélia** em especial, pelos valores de bondade, humildade, fé e respeito passados com tanta dedicação ao longo de todos esses anos. Também por todos os momentos de dificuldades e desafios, em que ela esteve ao meu lado como uma guerreira. À você, mãe, todo o meu amor e admiração.

À minha **vó Maria**, junto a Deus, por todos os sorrisos e abraços que tive a honra de ganhar durante sua vida aqui. Sua força e fragilidade, duas características tão antagônicas, descrevem uma das mulheres que mais tenho orgulho nessa vida.

À minha **tia Nena**, junto a Deus, minha querida segunda mãe, incentivadora de tudo o que sou. Meu primeiro financiamento na vida, em todos os sentidos. Cúmplice e formadora, me deixa sem palavras e restam as lágrimas de saudade.

À **Eliana**, por segurar forte minha mão e caminharmos por uma trilha muito mais leve, alegre, construtiva, colorida e transcendental. Em seu amor provei a revolução.

À **Renata**, minha irmã de alma, por me mostrar outra forma de enxergar a vida e para me encher de risadas e bons momentos. E agora, me encher de um amor chamado **Davi**.

Às minhas amigas de infância **Gisa, Carol, Tamy e Gabi**. Por todos esses anos de amizade e dedicação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

À **CAPES**, pelo apoio financeiro para a realização do meu estágio no exterior. Processo: PDSE - 88881.134443/2016-01

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** e à **CAPES/CNPq**, pelo apoio financeiro essencial para a realização deste trabalho.

Agradeço, de forma geral, a todas as pessoas que marcaram um momento, passado ou presente, em minha memória e contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização do meu desenvolvimento profissional.

“Não aceito mais as coisas que não posso mudar, estou mudando as coisas que não posso aceitar”

Angela Davis

*“O movimento vaivém nas águas-lembranças
dos meus marejados olhos transborda-me a vida,
salgando-me o rosto e o gosto.
Sou eternamente náufraga,
mas os fundos oceanos não me amedrontam
e nem me imobilizam.”*

Conceição Evaristo

“I think...”

Charles Darwin

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: parte I (ABNT)**. 3. ed. rev. ampl. mod. São Paulo: SIBiUSP, 2016. 100 p. (Cadernos de Estudos n. 9). ISBN 978-85-7314-060-6. Disponível em: <<http://www.livrosabertos.sibi.usp.br/portaldelivrosUSP/catalog/book/111>> Acesso em 19 dez. 2016.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 MELANOMA E VASCULATURA TUMORAL.....	1
1.2 ANGIOGÊNESE, MOSAICISMO E MIMETISMO VASCULOGÊNICO	3
1.3 GALECTINA-3 E CÂNCER	5
1.4 SHEAR STRESS E CÂNCER	9
2. OBJETIVOS	13
3. MÉTODOS.....	14
3.1 MODELOS.....	14
3.2 ENSAIOS FUNCIONAIS.....	16
3.3 ANÁLISES DE QUANTIFICAÇÃO.....	19
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4. RESULTADOS	23
4.1 CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO MELHOR MODELO DE APLICAÇÃO DO SHEAR LAMINAR EM CÉLULAS TUMORAIS.....	23
4.2 EFEITO DO SHEAR LAMINAR BAIXO NAS CÉLULAS TUMORAIS.....	32
4.3 EFEITOS DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS SHEAR NA ALTERAÇÃO DE FUNÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	41
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES.....	64
7. BIBLIOGRAFIA	65
ANEXO A.....	72
CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA USO DOS CAMUNDONGOS C57BL6	72
ANEXO B.....	73
CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA (CIBio) DO DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	73
ANEXO C.....	74
CARTA DE ACEITE PARA ESTÁGIO SUPERVISIONADO NO LABORATÓRIO DA DRA. KERI SCHADLER, PROFESSORA ASSISTENTE NO DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA, MD ANDERSON CANCER CENTER	74
ANEXO D.....	75
CARTA DE APROVAÇÃO COM FINANCIAMENTO DA CAPES PARA ESTÁGIO NO EXTERIOR.....	75

RESUMO

Cardoso ACF. *Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A patogênese e o estadiamento do melanoma são clinicamente bem caracterizados, entretanto, muitas variações são observadas no que diz respeito à progressão e respostas terapêuticas. Mecanismos intrínsecos das células de melanoma contribuem para esse fenômeno, como a plasticidade fenotípica e a expressão de determinadas moléculas, como a galectina-3. Galectina-3 tem papel fundamental para o crescimento do tumor, metástase e montagem de uma rede vascular funcional. Dessa forma, o melanoma possui mecanismos alternativos de vascularização, onde células endoteliais e células tumorais formam a superfície luminal dos vasos e são expostas às forças fluídicas do sangue, o *shear stress*. Nós hipotetizamos que o *shear* promove a adaptação celular e células de melanoma se comunicam com (1) outras células tumorais para sustentar a progressão do tumor, ou (2) com células endoteliais para garantir a manutenção vascular. Para isso, comparamos dois modelos de geração do *shear* denominados pela agitação de placas concêntricas e rotação de um cone sobre placa, que é o modelo padrão dos estudos em células endoteliais. O modelo de placas concêntricas gerou resultados mais robustos, pois garantiu a viabilidade e a adesão celular em até 24h. Também investigamos o potencial angiogênico das células de melanoma após monitorar a ativação de células endoteliais em contato com o meio condicionado (MC) do *shear*. O *shear* aumentou significativamente a secreção de Angiopoietina-2, IL-8 e PLGF num contexto independente de galectina-3. Além disso, o *shear* diminuiu a taxa de crescimento das células que expressam galectina-3, o que não foi observado no tratamento com o MC. Já a capacidade de sobreviver em longo prazo foi maior quando as células tumorais são expostas ao MC derivado do *shear*, sem influência da expressão de galectina-3. Em relação ao efeito do MC liberado após *shear* para o remodelamento vascular, nós não observamos alteração na proliferação das células endoteliais. Entretanto, o MC do *shear* parece acelerar a formação de túbulos e favorecer a desorganização das fibras de actina, além de diminuir a fosforilação de ERK nas células endoteliais. Juntos, esses resultados mostram que o *shear* induz a secreção de moléculas pró-angiogênicas e pró-inflamatórias que promovem a sobrevivência e proliferação a longo prazo das células tumorais *naïve*. Nas células endoteliais, o MC derivado do *shear* altera a sinalização de ERK e o rearranjo do citoesqueleto.

Descritores: melanoma; galectina 3; resistência de cisalhamento; plasticidade celular; moduladores da angiogênese; remodelação vascular.

ABSTRACT

Cardoso ACF. *Effects of shear stress exposure on melanoma cells to tumor vascular remodeling* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Melanoma pathogenesis and staging are clinically well characterized, although a large variation is observed in progression and therapeutic responses. Intrinsic mechanisms of melanoma cells contribute to this phenomenon, such as phenotypic plasticity and the expression of certain molecules as galectin-3. Galectin-3 plays a prominent role in tumor growth, metastasis, and to build a functional vascular network. In this way, melanoma has alternative mechanisms of vascularization, in which both endothelial cells and tumor cells form the luminal surface of vessels and are in contact with flowing blood. Here, we postulated that shear stress promotes cell adaptation and melanoma cells communicate with (1) other tumor cells in order to support tumor progression; or (2) with endothelial cells to ensure vascular maintenance. We compared two methods for generating shear stress, namely revolution of concentric plates and stirring of a suspended cone on a plate, which is the gold standard method for studies on endothelial cells. The concentric plates model yielded more reliable results, since it ensured the greater viability and adhesion of cells up to 24h, as compared to the cone and plate system. We then investigated the angiogenic potential of melanoma cells by monitoring the activation of endothelial cells upon exposure to the conditioned medium (CM) from cells exposed to shear stress. Shear stress significantly increased the secretion of Angiopoietin-2, IL-8 and PLGF, in a galectin-3 independent manner. Also, shear stress decreased the growth rate of galectin-3 positive melanoma cells, but not when galectin-3 was down regulated. No such effect was observed with the shear-derived CM. Instead, we did observed long-term melanoma survival under low density upon treatment with the shear-derived CM. In this scenario, the expression of galectin-3 did not change the results. Regarding the effect of shear-derived CM to vascular remodeling, endothelial cells did not show any change in cell proliferation. However, the CM of melanoma cells upon shear accelerated the endothelial cell tube formation and disorganized the actin stress fibers. CM also decreased the phosphorylation of ERK. Taken together, these data indicate that the production of proangiogenic and proinflammatory molecules by melanoma cells under shear enables long-term survival and proliferation of naïve melanoma cells. To endothelial cells, shear-derived CM led to changes in ERK signaling and cytoskeletal rearrangement.

Descriptors: melanoma; galectin 3; shear strength; cell plasticity; angiogenesis modulating agents; vascular remodeling.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *MELANOMA E VASCULATURA TUMORAL*

Dentre os diferentes tipos de câncer de pele, o melanoma cutâneo tem origem a partir da transformação maligna dos melanócitos, células localizadas na porção basal da epiderme e responsáveis pela produção do pigmento melanina. No Brasil, apenas 4% dos casos de câncer de pele registrados é representado por melanoma, ao mesmo tempo, ele é responsável pelo maior número de mortes nessa categoria, segundo os dados do INCA - 2016. A formação do melanoma é um fenômeno complexo, que envolve fatores ambientais, genéticos e de localização. Tanto os dados clínicos, epidemiológicos e mais recentemente genéticos, revelam que os melanomas são tumores altamente heterogêneos, abrigando diversas alterações genéticas, que podem se desenvolver em diferentes locais do corpo, sendo estas regiões expostas ou não ao sol, o que sugere que o surgimento do melanoma pode ocorrer por diferentes vias (CHIN, 2003). Ainda assim, as maiores evidências epidemiológicas apontam que o dano ao DNA causado pela irradiação solar correlacionada a relatos de queimadura solar na infância constituem a causa primária do melanoma (BENNETT, 2008b). No mesmo sentido, uma série de lesões genômicas também contribuem para o desenvolvimento e progressão dessa doença, como principalmente as mutações relacionadas à ativação constitutiva da sinalização das MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), que inclui, por exemplo, a mutação ativadora em BRAF (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) encontrada em aproximadamente 60% dos melanomas primários (BENNETT, 2008a; DAVIES et al., 2002).

Os pacientes com melanoma primário, quando submetidos à ressecção cirúrgica precoce, possuem maior chance de cura. Entretanto, uma vez que o melanoma se dissemina rapidamente e a doença se torna metastática, há uma baixa sobrevida e o tratamento é essencialmente paliativo. Muitos estudos clínicos mostraram de forma consistente que o melanoma metastático é altamente resistente à terapia citotóxica convencional. Entretanto, as terapias alvo-dirigidas e imunoterapias já se tornaram um avanço terapêutico, com benefícios clínicos concretos no aumento da sobrevida de pacientes com melanoma avançado (BHATIA; THOMPSON, 2012; EGGERMONT; SPATZ; ROBERT, 2014). O motivo pelo qual o melanoma é considerado uma doença grave, mesmo comparada a outros tipos de câncer, ainda

é uma questão pouco entendida. Talvez a explicação dessa agressividade esteja na similaridade entre o melanoma e o desenvolvimento normal dos melanócitos em termos de vias de sinalização envolvidas (caracterizada pela alta plasticidade fenotípica), e os paralelos que podem ser traçados entre a metástase do melanoma e a migração dos melanoblastos a partir da crista neural (HOEK; GODING, 2010). Dessa forma, o melanoma parece manter uma “memória” do desenvolvimento embrionário, caracterizada pela intensa capacidade de plasticidade e interconversão de fenótipos.

A evolução do melanoma está intimamente associada ao alto grau de atividade angiogênica, com aumento constitutivo da expressão de inúmeros fatores pró-angiogênicos e seus respectivos receptores em relação aos nevos benignos. De maneira geral, a estrutura vascular do tumor é bem diferente da existente em tecidos normais, com regiões de hipervascularização, enquanto outras possuem pouco ou são ausentes em vasos sanguíneos. O melanoma possui uma estrutura vascular imatura, com grande variabilidade no tamanho dos vasos, vasos extremamente tortuosos, ocorrência reduzida de pericitos e lâmina basal recobrimdo as células endoteliais, o que resulta na perda de função de aproximadamente 50% dos vasos (FISHER et al., 2016; JOUR; IVAN; AUNG, 2016).

A vascularização tumoral é uma característica importante para o desenvolvimento do melanoma e seu grau de ocorrência está correlacionado com a agressividade, risco de recorrência e a taxa de resposta aos tratamentos. Por muito tempo, a vascularização tumoral foi considerada como resultado exclusivo da angiogênese. Entretanto, a resposta limitada das terapias antiangiogênicas deu espaço para a investigação de vários cenários que explicam a resistência desse tratamento, os quais podem envolver (1) respostas alternativas às vias clássicas de indução da angiogênese ou (2) a descoberta de estruturas alternativas que colaboram com irrigação sanguínea do tumor. De fato, o modelo da angiogênese hoje em dia é pouco efetivo para descrever o cenário geral de eventos moleculares e morfogênicos que atuam na formação da rede vascular tumoral. No melanoma e em outros tipos de tumores, mecanismos alternativos de vascularização tumoral já vêm sendo descritos há quase duas décadas e incluem a cooptação de vasos pré-existentes, o crescimento microvascular intussusceptivo, a vasculogênese pós-embrionária, o mimetismo vasculogênico, e o mosaicismo vascular, como ilustrado no esquema 1 (DÖME et al., 2007; PASTUSHENKO et al., 2014). É interessante lembrar que todos esses mecanismos não são mutuamente exclusivos, eles estão, na maioria dos casos, interligados e ocorrendo juntamente com os processos fisiológicos e patológicos da angiogênese.

Esquema 1. Representação esquemática dos mecanismos alternativos de vascularização em tumores, incluindo melanoma. Modificado de (PASTUSHENKO et al., 2014).

1.2 ANGIOGÊNESE, MOSAICISMO E MIMETISMO VASCULOGÊNICO

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, e esse mecanismo é o mais estudado até hoje para explicar a rede vascular observada em tumores sólidos. O processo angiogênico pode ser dividido em quatro fases: A primeira fase compreende ativação das células endoteliais, que conduz à degradação localizada da membrana basal do vaso sanguíneo e da matriz extracelular circundante; na segunda, ocorre a migração orientada das células endoteliais pela matriz extracelular; e a terceira fase compreende o aumento da proliferação das células endoteliais, a sua diferenciação, e por fim a organização em estruturas tubulares com uma nova lâmina basal (CARMELIET; JAIN, 2000).

A angiogênese é regulada por um balanço entre moléculas pró e anti-angiogênicas, processo chamado de *switch* angiogênico. As principais moléculas reguladoras descritas são os fatores de crescimento específicos do endotélio vascular: como membros da família do

VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), FGF (*Fibroblast growth factor*) e das angiopoietinas; e outros fatores de crescimento não específicos do endotélio: como membros da família dos fatores de crescimento derivado de plaquetas e TGF- β (*Transforming growth factor* β) (YANCOPOULOS et al., 2000).

A liberação desses sinais reguladores tanto pró- ou anti-angiogênicos é resultado de processos fisiológicos como: estresse metabólico (por exemplo: hipóxia, acidose ou hipoglicemia); resposta imune/inflamatória; mutações genéticas; ou estresse mecânico (por exemplo: pressão gerada pela proliferação das células tumorais, *shear stress*). Além disso, células tumorais, endoteliais, estromais, o sangue e a matriz extracelular contribuem para a liberação dessas moléculas reguladoras (CARMELIET; JAIN, 2000).

Contudo, a parede dos vasos tumorais não é sempre formada por uma camada homogênea de células endoteliais. Pela primeira vez, um estudo comprovou que 15% dos vasos funcionais em um xenotransplante de carcinoma de cólon eram mosaicos, ou seja, vasos constituídos por células endoteliais e por células tumorais (CHANG et al., 2000). Existem algumas explicações para a formação desses “vasos mosaicos”. Primeiro, a migração das células endoteliais durante o rápido crescimento vascular pode não ser acompanhada pela proliferação dessas mesmas células, fazendo com que algumas regiões do novo vaso formado fiquem “incompletas” e sujeitas à exposição das células tumorais ao lúmen. Segundo, algumas células endoteliais da parede do vaso podem lisar, deixando áreas igualmente expostas às células tumorais. Terceiro, as células tumorais migram e invadem a parede do vaso, desprendendo e substituindo as células endoteliais da parede do vaso. E por fim, essas regiões são ocupadas por células com características endoteliais, porém sem marcadores específicos desse subtipo celular (DI TOMASO et al., 2005).

Paralelamente, Maniotis e colaboradores (1999) reconheceram um padrão de canais vasculares associados à matriz extracelular em melanomas humanos, sendo ausentes células endoteliais ou fibroblastos na constituição desses canais. Eles demonstraram que esses canais vasculares eram formados pelas células de melanoma altamente agressivas, o que explicaria o contínuo fornecimento de sangue ao tumor mesmo na ausência de fatores pró-angiogênicos. Esse padrão de microcirculação reconhecida primeiramente em melanoma foi denominado mimetismo vasculogênico, que funciona de maneira independente do mecanismo de angiogênese durante diferentes fases do crescimento tumoral (MANIOTIS et al., 1999). Análises gênicas globais mostraram que, nesse mecanismo, as células tumorais mais agressivas expressam genes associados ao fenótipo de célula endotelial/vascular, como VECADERINA, EPHA2 (*Ephrin type-A receptor 2*), metaloproteinases de matriz extracelular

(MMPs) e laminina 5 γ 2 (LAMC2). Portanto, a malha de matriz extracelular formada pelas células tumorais funciona como um condutor do fluído sanguíneo e se torna efetiva nas trocas nutricionais e metabólicas dos tumores (HENDRIX et al., 2003, 2016).

1.3 *GALECTINA-3 E CÂNCER*

As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam especificamente a carboidratos ramificados de glicolipídeos e glicoproteínas presentes na superfície celular e na matriz extracelular, podendo desempenhar distintas funções biológicas. A ligação aos carboidratos é desempenhada pelo domínio altamente conservado de reconhecimento a carboidratos (*Carbohydrate Recognition Domains* – CRDs). Por essa característica, o domínio CRD é utilizado para categorizar a maioria das lectinas descritas até então em famílias e superfamílias estruturalmente relacionadas (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2011; LIU; RABINOVICH, 2005).

As galectinas formam uma das famílias das lectinas de origem animal, as quais foram assim classificadas por compartilharem uma sequência altamente conservada no domínio CRD com cerca de 130 aminoácidos e por terem afinidade de ligação por β -galactosídeos (LIU; PATTERSON; WANG, 2002). A comparação da sequência de aminoácidos permitiu a divisão das galectinas em três subfamílias. O grupo prototipo (galectina-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15) contém um único domínio, o CRD, e seus membros existem como monômeros ou homodímeros. O grupo *tandem repeat* (galectina-4, -6, -8, -9 e -12) possui dois domínios CRD diferentes conectados por um polipeptídeo de até 70 aminoácidos. E por fim o grupo químera, que até o momento é representado por um único membro, a galectina-3, a qual possui um único domínio CRD ligado a um domínio N-terminal por uma cadeia peptídica rica em prolina e glicina, podendo existir na forma de monômeros e oligômeros (BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011; RABINOVICH; TOSCANO, 2009).

A galectina-3 possui aproximadamente 31 kDa (humana) e está localizada na região intracelular (núcleo, citoplasma, mitocôndria e em compartimentos vesiculares) e extracelular associada a membrana plasmática, matriz extracelular ou presente no soro e fluidos biológicos (FUNASAKA; RAZ; NANGIA-MAKKER, 2014; LIU; PATTERSON; WANG, 2002). Ela possui basicamente três domínios estruturais: (1) o domínio NH₂-terminal de 12 aminoácidos que contém dois sítios de fosforilação em serina, já descrito por serem importantes na

regulação da sua função e localização nuclear/citoplasmática; (2) o domínio de sequência semelhante ao colágeno rico prolina, glicina e tirosina, o qual pode ser clivado por metaloproteinases da matriz extracelular, como MMP-2 e MMP-9; e (3) o domínio COOH-terminal de 140 aminoácidos que possui apenas um CRD e o motivo NWGR (para a galectina-3 humana) encontrado também na proteína humana anti-apoptótica Bcl-2 (YANG; RABINOVICH; LIU, 2008). Como representado adiante no esquema 2, as diversas funções descritas para a galectina-3 dependem basicamente da sua localização e conformação estrutural.

Esquema 2 - Representação esquemática do papel da galectina-3 na transformação maligna e progressão tumoral, diferenciando as funções exercidas quando encontrada intra ou extracelularmente. Modificado de (RADOSAVLJEVIC et al., 2012).

No núcleo, galectina-3 já foi descrita por atuar como fator nuclear durante o *splicing* de pré-mRNAs (DAGHER; WANG; PATTERSON, 1995; HAUDEK; PATTERSON; WANG, 2010; PARK et al., 2001), ou por interagir com fatores de transcrição e promover a

estabilização do complexo proteína-DNA que regula a transcrição gênica de importantes reguladores do ciclo celular como ciclina D1 (LIN et al., 2002), ciclina A, ciclina E, p21 (WAF1/CIP1) e p27 (KIP1) (KIM et al., 1999; YOSHII et al., 2002). Em outro exemplo, galectina-3 interage com a β -catenina, um componente *downstream* da via de sinalização Wnt (via responsável pela regulação da transcrição de diversos genes envolvidos em processos como diferenciação celular, proliferação e migração), promovendo a transcrição de genes como c-myc, ciclina D1, COX-2 (*cyclooxygenase-2*), MMP-7 (*matrix metalloproteinase-7*), entre outros (SHIMURA et al., 2004). Um das principais funções citoplasmáticas da galectina-3 é a regulação da apoptose através da interação com Bcl-2, e regulação da sobrevivência e proliferação celular através da interação com proteínas da via de sinalização das MAP quinases (AKAHANI et al., 1997; CARDOSO et al., 2016; YANG; HSU; LIU, 1996).

No meio extracelular, a galectina-3 também modula vias importantes durante a cascata metastática, que promovem alterações na adesão, migração e invasão celular. O envolvimento da galectina-3 depende do seu arranjo conformacional e de como ela interage com os glicoconjugados presentes na superfície (GLINSKY et al., 2003). De maneira geral, a galectina-3 age como ponte promovendo a adesão entre duas ou mais células e entre células e componentes da matriz extracelular. Assim, ela modula processos como o intravasamento tumoral, a formação de êmbolos durante disseminação em vasos sanguíneos e/ou linfáticos, o extravasamento tumoral e a adesão das células tumorais no sítio pré-metastático (LIU; RABINOVICH, 2005; RADOSAVLJEVIC et al., 2012). De fato, galectina-3 interage com inúmeras glicoproteínas da matriz extracelular como fibronectina, colágeno IV, elastina e laminina, e também com glicoproteínas de superfície celular como integrinas, LAMPs (*Lysosome-Associated Membrane glycoproteins*) e componentes dos *lipid rafts* (BOSCHER; DENNIS; NABI, 2011). Um trabalho recente mostrou que a galectina-3 extracelular atua na via de EGFR, aumentando a sua fosforilação e internalização, que deflagra a migração de células tumorais de cólon (WU et al., 2018).

Durante a angiogênese, a galectina-3 regula a quimiotaxia de células endoteliais e estimula a formação de tubos capilares *in vitro* e a vascularização *in vivo* mediada por VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) e bFGF (*basic Fibroblast Growth Fator*) (MARKOWSKA; LIU; PANJWANI, 2010; NANGIA-MAKKER et al., 2000). O mesmo grupo mostrou que o possível mecanismo pelo qual galectina-3 estimula a formação de vasos é através da interação com a integrina $\alpha\beta 3$ e o VEGFR2 (*VEGF-Receptor 2*). Galectina-3 promove a junção dessas integrinas e ativa a via de sinalização mediada por FAK, que modula

a migração das células endoteliais. Galectina-3 também diminui a taxa de internalização endocítica do VEGFR2 e prolonga o tempo de exposição desse receptor na superfície celular das células endoteliais, sustentando a cascata de sinalização da angiogênese (MARKOWSKA; JEFFERIES; PANJWANI, 2011). Nosso grupo também mostrou que a presença de galectina-3 é essencial para a maior secreção de VEGF tanto pelas células de melanoma quanto pelos macrófagos derivados da medula óssea, o que favorece uma maior cobertura vascular nos tumores *in vivo* (MACHADO et al., 2014).

No mimetismo vasculogênico, a expressão da galectina-3 pelas células de melanoma é essencial durante a transição para um fenótipo endotelial, sendo que a inibição dessa molécula resultou na perda da capacidade invasiva e da formação de estruturas tubulares. De fato, galectina-3 regula a expressão de vários marcadores de células endoteliais que são encontrados superexpressos nas células de melanoma, como VE-caderina, interleucina-8, fibronectina-1, EDG-1 (*Endothelial differentiation sphingolipid G-protein receptor-1*) e MMP-2 (MOURAD-ZEIDAN et al., 2008). O mesmo fenômeno também foi descrito em células tumorais do esôfago, que perderam a capacidade de formar estruturas tubulares em matriz 3D após o silenciamento gênico de galectina-3. A expressão de genes associados ao mimetismo vasculogênico também foi reduzida nessas células, com diminuição expressiva de EphA2 (ephrin type-A receptor 2) e MMP2 (ZHANG et al., 2018).

A presença de galectina-3, seja ela no tecido tumoral ou circulante no soro de pacientes, já foi correlacionada com a progressão e prognóstico de vários tipos de câncer, como pâncreas, fígado, tireoide, mama, próstata e ovário. O que difere em cada tipo tumoral é a relação entre o aumento ou diminuição da expressão de galectina-3 ao longo da progressão (BARTOLAZZI; SCIANCHITANO; D'ALESSANDRIA, 2018; ILMER et al., 2016; LIU et al., 2018; WANG; GUO, 2016). No melanoma, as informações mais consistentes indicam que a expressão de galectina-3 está aumentada no melanoma primário em comparação com nevos benignos (BROWN et al., 2012; PRIETO et al., 2006). O estudo mais recente coletou 524 casos de lesões melanocíticas (incluindo nevos benignos, nevos displásicos, melanoma *in situ*, melanoma primário e melanoma metastático) para avaliar a expressão da galectina-3 e correlacionar com a progressão tumoral e o prognóstico do pacientes. Os autores concluíram que a expressão da galectina-3 possui uma distribuição bimodal, com aumento da expressão de galectina-3 nuclear e citoplasmática em melanomas de fina espessura (<1mm) comparados aos nevos benignos, e posterior diminuição da expressão em melanomas metastáticos. Além disso, a baixa expressão de galectina-3 (nuclear e citoplasmática) nos pacientes com

melanoma primário foi correlacionada com uma pior sobrevida global e específica da doença (BROWN et al., 2012).

1.4 *SHEAR STRESS E CÂNCER*

O *shear stress* (ou tensão de cisalhamento, no português) é um tipo de tensão gerada entre duas forças aplicadas na mesma direção e de maneira tangencial uma sobre a outra, mas com intensidades diferentes. É a tensão de fricção entre dois objetos e, quando um deles é um fluido laminar, usa-se o mesmo conceito para determinar a tensão de um líquido que se move ao longo de um cilindro, por exemplo. Portanto, esse conceito é também o mesmo utilizado para determinar a tensão tangencial entre o sangue e a parede dos vasos sanguíneos. Na biologia vascular, o *shear stress* resultante é definido pelo diâmetro interno do vaso, velocidade do fluxo sanguíneo, e pela viscosidade do sangue, ou seja, a magnitude do shear vai depender dessas três variáveis (WRAGG et al., 2014). O *shear stress* é definido em unidades de força por área: Newtons por metro quadrado (N/m^2) ou dinas por centímetro quadrado (dinas/cm^2) (WIRTZ; KONSTANTOPOULOS; SEARSON, 2011).

Dependendo do padrão do fluxo sanguíneo, o *shear* pode ser classificado em (1) laminar, quando o fluxo do sangue é paralelo à parede do vaso; e (2) turbulento ou oscilatório, quando o fluxo sanguíneo não é homogêneo. Considerando estável a viscosidade do sangue, a mudança de magnitude do *shear* laminar vai depender da velocidade do fluxo sanguíneo, entretanto, no shear turbulento é difícil estabelecer essa relação, e a magnitude não é proporcional ao fluxo sanguíneo. Em vasos pequenos o fluxo é tipicamente laminar, mas em vasos mais calibrosos (como as artérias) ocorre uma combinação de fluxo laminar e turbulento, principalmente pela ocorrência de obstruções ou bifurcações no lúmen do vaso em combinação à natureza pulsátil do ciclo cardíaco. Esses padrões e magnitudes do *shear* são relevantes porque eles possuem respostas fisiológicas distintas: enquanto o fluxo laminar apresenta papel ateroprotetor por inibir trombose, adesão de plaquetas, recrutamento de monócitos, e inibir apoptose das células endoteliais; o fluxo turbulento é geralmente associado à patogênese das doenças vasculares, pois induz respostas pró-inflamatórias e pró-aterogênicas, como trombose, adesão de leucócitos e apoptose das células endoteliais. No sistema vascular em repouso, as magnitudes médias do *shear* variam de 1-4 dinas/cm^2 na circulação venosa e 4-30 dinas/cm^2 na circulação arterial, e essas magnitudes são classificadas

em baixo, médio ou alto *shear*.(CHATTERJEE; FISHER, 2014; GIMBRONE et al., 2000; TRAUB; BERK, 1998).

O fluxo sanguíneo é, portanto, um mecanismo regulador importante que inicia e mantém muitos eventos biológicos durante o desenvolvimento embrionário e a vida adulta. O *shear* é capaz de controlar importantes funções fisiológicas e o endotélio é o sensor primário desses padrões de *shear*, respondendo através da conversão de uma força mecânica em uma resposta bioquímica celular, que é definido como mecanotransdução (HOEFER; DEN ADEL; DAEMEN, 2013). Esse fenômeno pode ser descrito como uma sequência de ações: (1) “sentir” o *shear* através de estruturas celulares; (2) tradução do sinal através de moléculas sinalizadoras; (3) transmissão e propagação do sinal; e (4) resposta fisiológica. Esse processo é evolutivamente conservado nas células endoteliais e permite que elas reajam rapidamente ou se adaptem às mudanças físicas no microambiente através processos celulares como proliferação, diferenciação, migração e apoptose (CHATTERJEE, 2018; CHATTERJEE; FISHER, 2014). Por exemplo, o *shear stress* regula a diferenciação celular das células endoteliais durante o remodelamento vascular que acontece nas fases iniciais embrionárias. A distinção morfológica entre veias e artérias de camundongos só acontece após o início do fluxo sanguíneo na circulação recém-formada (LUCITTI et al., 2007). O *shear* regula a secreção de moléculas mediadoras cruciais para a manutenção da estrutura e tônus vascular, da mesma forma que um *shear* aberrante, ou a ausência de *shear*, ativa vias de sinalização que causam disfunção vascular, inflamação e dano tecidual (HOEFER; DEN ADEL; DAEMEN, 2013).

Até hoje, o entendimento da maquinaria que “sente” o *shear*, conhecidos como mecanosensores, ainda é incompleto. Diversos grupos já identificaram os possíveis candidatos a mecanosensores, que incluem receptores de superfície celular e/ou citoplasmáticos, moléculas do citoesqueleto, estruturas de caveola, glicocálice, canais de íons, quinases, integrinas, e componentes da matriz extracelular. Todos esses sensores traduzem o sinal mecânico e desencadeiam uma resposta fisiológica através da geração de sinalizadores redox (ROS e NO) e/ou ativação de fatores de transcrição. Os fatores de transcrição já descritos por serem regulados pelo *shear* são: família dos fatores Kruppel-like (KLF2 e KLF4), YAP (um efetor da via Hippo de sinalização), e NFkB. As moléculas ROS e NO são os principais sinalizadores que transmitem o sinal do *shear* em uma resposta bioquímica, através da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Em conjunto, essas vias de sinalização alteram o fenótipo das células endoteliais e modulam o microambiente vascular através da produção de moléculas de adesão, moléculas pró-inflamatórias e fatores pró-

angiogênicos que desencadeiam quadros de inflamação endotelial e remodelamento vascular (CHATTERJEE, 2018; CHATTERJEE; FISHER, 2014).

No câncer, o microambiente tumoral é um cenário dinâmico nas quais propriedades físicas e mecânicas também evoluem ao longo da progressão da doença. Como consequência, as células tumorais estão expostas a diferentes estímulos mecânicos, como a tensão derivada do contato célula-célula ou célula-matriz, forças de compressão, pressão intersticial, e o *shear*. De maneira geral, a resposta celular frente a esses estímulos resulta em mudanças que direcionam para a agressividade e progressão do tumor. Em relação ao *shear*, as evidências sugerem que esse estímulo tem funções duais para as células tumorais. Ele pode (1) favorecer a metástase, através da promoção da migração, invasão, e extravasamento celular; e, alternativamente, (2) inibir a proliferação e promover a morte celular, como visto para as milhares de células tumorais circulantes que morrem quando caem na corrente sanguínea. Os trabalhos que investigam as respostas funcionais das células tumorais frente ao *shear* estão em ascensão nos últimos anos, e eles reportam que o *shear* é capaz de induzir a transição epitélio-mesenquimal e fenótipo de célula tronco, modular a sensibilidade à apoptose, alterar o perfil oxidativo celular, remodelar o citoesqueleto e a matriz extracelular, induzir autofagia e promover a migração e invasão celular (HUANG et al., 2018; NORTHCOTT et al., 2018; WIRTZ; KONSTANTOPOULOS; SEARSON, 2011).

1.5 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os efeitos do *shear stress* em células do sangue, células endoteliais, células do músculo liso e outras já foram bastante detalhados na literatura (CIVELEK et al., 2002; LI; HAGA; CHIEN, 2005; MOAZZAM et al., 1997), mas ainda pouco se conhece sobre os efeitos do *shear* sobre as células tumorais. As duas principais formas que as células tumorais podem estar expostas ao *shear stress* são: (1) células tumorais circulantes, que são as células que se destacaram do tumor primário e circulam no corpo pela corrente sanguínea ou linfática; (2) células presentes no tumor que são expostas ao fluxo sanguíneo durante o intravasamento, ou por formação de vasos mosaicos, ou mimetismo vasculogênico, por exemplo. Até o momento, as respostas funcionais das células tumorais frente ao *shear stress* envolvem todos os pilares do destino celular: morte, sobrevivência, autofagia, proliferação, migração e diferenciação (LIU et al., 2016; WANG et al., 2015, 2018a).

O fenômeno da mecanotransdução também é observado durante as fases de adesão e espalhamento celular, mediado pela ação das integrinas que conectam ligantes extracelulares às proteínas do citoesqueleto. A relação da galectina-3 com mecanotransdução foi descrita ao se observar que ela era rapidamente secretada para o meio condicionado a partir do momento em que as células começavam a se destacar do substrato (BAPTISTE et al., 2007). Ao iniciar a adesão ao substrato, galectina-3 é novamente captada para o meio intracelular. Os autores sugerem que galectina-3 atua como uma molécula mecanosensora ao interagir com as integrinas na superfície celular durante os primeiros momentos da adesão, o que promove o remodelamento das placas de adesão e do citoesqueleto para favorecer esse processo.

As células tumorais, incluindo melanoma, podem compor a parede do endotélio vascular seja por mosaicismo, mimetismo vasculogênico ou durante o tempo que a célula demora em invadir o vaso sanguíneo no processo de intravasamento. Essas células tumorais estão expostas às forças hemodinâmicas do fluxo sanguíneo, como o *shear* laminar baixo, típico em melanoma e resultante de uma desorganização vascular. Vimos ainda que galectina-3 é uma molécula responsiva a estímulos mecânicos e participa em processos de plasticidade fenotípica como diferenciação celular e transição entre fenótipos, além de também estar envolvida nos mecanismos da angiogênese e mimetismo vasculogênico. Portanto, a **hipótese** deste trabalho é dividida em dois pontos principais: (1) que o *shear* induz a alteração fenotípica das células de melanoma e a expressão de galectina-3 favorece esse processo, e (2) que o *shear* induz o remodelamento da vasculatura tumoral através da secreção de fatores pró-angiogênicos, sendo esse processo favorecido quando as células de melanoma expressam galectina-3.

2. OBJETIVOS

Diante do contexto elaborado, este projeto teve como objetivo avaliar o comportamento de células tumorais quando submetidas ao *shear stress* e se essa exposição era capaz de favorecer o remodelamento da vasculatura intratumoral, de maneira dependente da expressão de galectina-3.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar o conteúdo global secretado por células de melanoma expostas ao *shear* por meio da quantificação de biomarcadores angiogênicos pelo sistema multiplex. Verificar, ainda, se a expressão de galectina-3 nas células tumorais altera o conteúdo secretado nessas condições.
- b) Avaliar se há alteração fenotípica nas células de melanoma gal3(+) e gal3(-) após *shear*, determinando-se a taxa proliferativa, de morte celular e clonogenicidade. Verificar se esse fenômeno é dependente do estresse mecânico *per se* ou de fatores solúveis liberados pelas células após o *shear*.
- c) Avaliar a ativação *in vitro* de células endoteliais incubadas com o conteúdo secretado por células de melanoma após *shear*, determinando-se taxa proliferativa, formação de túbulos, reorganização do citoesqueleto e ativação de vias de sinalização.

3. MÉTODOS

3.1 MODELOS

Linhagens Celulares

As células de melanoma humano SK-MEL-37 foram cultivadas em meio MEM (Sigma Aldrich®) pH 7,2 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies). A outra linhagem de melanoma humano, WM 1366, e as respectivas derivadas WM SCR (*scramble*) e WM shGal-3 foram cultivadas em meio DMEM *High Glucose* (Sigma Aldrich®) pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies). As células WM 1366 transduzidas com o vetor viral contendo a sequência de shRNA para inibição de galectina-3 ou a sequência controle (SCR) foram complementadas com 0,5 µg/mL do antibiótico de seleção puromicina (Sigma). Os vetores com as sequências de shRNA e SCR foram gentilmente cedidos pelo laboratório do Prof. Dr. Marcelo de Carvalho (INCA – Rio de Janeiro). Todas as células foram mantidas em atmosfera úmida a 37 °C contendo 5 % de CO₂. Ao atingir a confluência, as células foram lavadas com solução PBS/EDTA, pH 7,2, destacadas dos frascos com solução 0,2% de tripsina (Life Technologies) e transferidas para novos frascos de cultivo na proporção de 1:7.

As células primárias endoteliais foram extraídas do pulmão de camundongos neonatos C57BL/6 e isoladas pelo método de purificação com anticorpos específicos e *beads* magnéticas. As células endoteliais foram expandidas em cultura celular e utilizadas até no máximo 10 passagens. Para cultivo das células endoteliais utilizamos o kit contendo 500 mL de meio *Advanced* DMEM (GIBCO®) pH 7,2 suplementado com 75 mL de soro fetal bovino, 5 mL de L-Glutamina, 5 mL de solução Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina, 50 mg de heparina, 12,5 mL de Hepes 1 M e 50 mg do suplemento para crescimento de células endoteliais. Após atingir confluência, as células foram lavadas com solução PBS pH 7,2, destacadas dos frascos com solução 0,2% de tripsina (Life Technologies) e transferidas para novos frascos de cultivo na proporção de 1:4.

Modelos de aplicação do *shear stress*

Dois modelos de *shear stress* foram utilizados neste projeto: sistema cone-placa e o sistema de placas concêntricas. No modelo cone-placa (**Esquema 3A**), as células são

plaqueadas (7.10^5 células) em placa de cultura de 10 cm de diâmetro. Após 48h em cultura para produção de matriz extracelular e fortalecer a adesão, as células foram submetidas ao *shear* laminar em estufa a 37°C e CO₂ 5%. A técnica se baseia na utilização de cones de teflon com ímãs na parte interna, que são acionados quando as placas com os cones são posicionadas sobre um agitador magnético. Os cones apresentam uma angulação de 0,5° (centro-borda) e baixa resistência a líquidos, ideal para simular o *shear* laminar no meio de cultura (JO et al., 1991). Os cones foram esterilizados (sob luz UV por 15 minutos) e colocados sobre a cultura de células nas placas. Antes de iniciar o *shear*, o meio de cultura foi trocado por meio fresco suplementado, específico de cada linhagem celular. O controle estático foi mantido na mesma estufa e utilizado em todos os experimentos. A fórmula para o cálculo do *shear* resultante nesse modelo foi a seguinte:

$$T = \eta \cdot \omega / \alpha$$

onde η é a viscosidade do meio (0,001 Pa.s), ω é a velocidade angular (rad/s), e α é a angulação do cone (0,0084 rad). Utilizamos a rotação de 50 rpm (mínima permitida pelo agitador magnético) correspondente a um *shear* de 5 dinas/cm².

No modelo de placas concêntricas (DELA PAZ et al., 2012), colamos a base de uma placa de 6 cm sobre a base de uma placa de 10 cm com auxílio do adesivo sintético médico embucrilato (Hystoacril) e cera de vela, que são compostos inertes para o cultivo das células (**Esquema 3B**). As placas manualmente fabricadas foram esterilizadas com luz UV por 15 minutos e posteriormente plaqueadas com as células. 4.10^5 células foram plaqueadas na periferia das placas de 10 cm modificadas. Quando atingida a confluência da monocamada de células (após 48h), as células foram submetidas ao *shear* laminar em estufa a 37 °C e CO₂ 5%. Para isso, as placas são colocadas sobre um agitador orbital (Major Science) posicionado no interior de uma incubadora. Para o controle estático, as células de mesma passagem e também cultivadas nas placas modificadas são mantidas na mesma incubadora, sem agitação. Nos gráficos, o controle estático aparece denominado, do inglês, como apenas *Static*. Como as células ficam restritas na periferia da placa, o *shear* resultante é calculado pela fórmula:

$$T = \alpha \sqrt{\rho \eta} (2\pi f)^3$$

onde α é o raio da rotação orbital (2 cm), ρ é a densidade do meio (1.0 g/mL), η é a viscosidade do meio ($7,5 \times 10^{-3}$ dinas.s/cm²) e f é a frequência de rotação (rotações/segundo). Usando essa equação, o *shear* de 1 dina/cm² é alcançado com a frequência de rotação de 34 rpm, e o *shear* de 2 dinas/cm² com uma rotação de 54 rpm.

Esquema 3: (A) Representação esquemática do modelo cone-placa. (B) Representação do modelo de placas concêntricas. Desenho esquemático (esquerda) do sentido do fluxo baseado na rotação orbital de placas fabricadas manualmente (direita) para restringir a adesão das células apenas na periferia.

3.2 ENSAIOS FUNCIONAIS

Proliferação Celular

Após cada experimento de *shear*, recolhemos e reservamos o meio condicionado proveniente de cada condição (*shear* e estático), e tripsinizamos as células tumorais em fluxo laminar. O meio condicionado foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos para sedimentar as células em suspensão. Os ensaios para avaliar o efeito do meio condicionado e das células expostas ao *shear* foram feitos ao mesmo tempo. Portanto, as células previamente expostas ao *shear*, ou do controle estático, foram plaqueadas ($2 \cdot 10^4$ células por poço) em triplicata em placa de 12 poços e incubadas com meio fresco suplementado. Em paralelo, $2 \cdot 10^4$ células *naive* também foram igualmente plaqueadas e incubadas com o meio condicionado proveniente das condições estático e *shear*. O *background* genético de cada célula foi respeitado para a incubação com o meio condicionado, ou seja, células WM shGal-3 apenas receberam o meio condicionado de outras células WM shGal-3, e o mesmo para as células WM SCR. Analisamos a proliferação celular após 24, 48 e 72h de experimento. Para isso, as células foram lavadas com PBS 1X, tripsinizadas, coradas com azul de tripan e contadas manualmente utilizando uma câmara de Neubauer. Para os ensaios de proliferação com as

células endoteliais, seguimos o mesmo protocolo, porém o número de células foi quantificado automaticamente utilizando o equipamento Vi-CELL XR (Beckman Coulter). Os gráficos foram construídos com valores do número total de células (média e desvio das triplicatas) em cada tempo amostral para cada uma das condições e célula utilizada.

Análise de ciclo e de morte celular

A partir do mesmo experimento plaqueado para analisar a proliferação celular, avaliamos também o ciclo e morte celular através da marcação com iodeto de propídio (PI – *Propidium iodide*). Para isso, após serem tripsinizadas, as células foram fixadas com etanol 70%, mantidas overnight à -20°C, e posteriormente incubadas com solução contendo 2,5 µg/mL de PI, 200 µg/mL de RNase A e 1% de Triton-X100. O PI se incorpora estequiometricamente ao DNA, permitindo a quantificação do conteúdo de DNA na população de células. A análise da citometria de fluxo foi realizada com auxílio do programa Attune (versão 2.1.0) da Thermo Fisher®. Utilizando a escala linear, demarcamos a população nas fases G0/G1 e S/G2-M, e a porcentagem de células em cada uma dessas fases foi expressa nos gráficos como relação G0/G1 / S/G2-M. Na escala logarítmica, demarcamos toda a população localizada a esquerda das células diplóides. A porcentagem de células hipodiplóides foi quantificada e plotada em gráficos de morte celular com valores representados como subG1.

Ensaio Clonogênico

Assim como no ensaio de proliferação, reservamos o meio condicionado e as células tumorais provenientes de cada condição (*shear* e estático) após cada experimento de *shear*. O meio condicionado foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos para sedimentar as células em suspensão, e os ensaios para avaliar o efeito do meio condicionado e das células expostas ao *shear* foram feitos ao mesmo tempo. Para isso, as células previamente expostas ao *shear*, ou do controle estático, foram plaqueadas (200 células por poço) em triplicata em placa de 6 poços e incubadas com meio fresco suplementado. Em paralelo, 200 células *naive* também foram igualmente plaqueadas e incubadas com o meio condicionado proveniente das condições estático e *shear*. As células foram deixadas em estufa a 37 °C contendo 5 % de CO₂ por até 8 dias. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS 1X, fixados com paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente corados com cristal violeta para a visualização das colônias de células.

Fotografias foram tiradas para a análise qualitativa da quantidade de colônias formadas em cada condição.

Ensaio de formação de túbulos

Um dia antes ao ensaio, as células endoteliais foram repicadas para garantir uma confluência de ~80%, e o matrigel foi descongelado a 4 °C *overnight*. No dia do ensaio, todo o material foi mantido em gelo para evitar a solidificação precoce do matrigel, e os procedimentos foram feitos dentro do fluxo laminar. Para fazer o *coating* com a matriz, adicionamos 80 µL de matrigel por poço, utilizando placa de 96 poços, e a placa foi centrifugada a 300g, 4 °C por 2 minutos para diminuir a formação de bolhas. A placa de 96 poços foi deixada na estufa a 37 °C por 30 minutos para solidificar o matrigel. Enquanto isso, as células endoteliais foram tripsinizadas e o número total de células em suspensão foi estimado. Utilizamos 15.000 células em cada poço. Foram feitas triplicatas para cada condição experimental: EC Media (meio de cultivo das células endoteliais), DMEM (meio de cultivo das células tumorais), e os meios condicionados *shear* e estático das células WM SCR e WM shGal-3. Após a solidificação completa do matrigel, 100 µL da suspensão de células, já nos respectivos meios, foi transferida para cada poço. A placa foi deixada na estufa a 37 °C e retirada apenas para a captura das imagens a cada 2 h. Para isso, as fotografias foram tiradas em microscópio de luz invertida utilizando as objetivas de 10x ou 5x. Todos os experimentos foram feitos com as células entre passagens 6 a 9.

Marcação de F-actina

Para visualização do citoesqueleto, utilizamos a sonda Faloidina-Rodamina (Thermo Scientific) que possui alta afinidade para F-actina. A faloidina é conjugada com o corante de cor vermelha TRITC (*Tetramethylrhodamine Isothiocyanate*), o que nos permite a análise por microscopia de fluorescência. Para isso, as células endoteliais foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços e deixadas em cultura por 48h. No dia do experimento, retiramos o meio de cultivo por aspiração e as células endoteliais foram incubadas com os meios condicionados por 30 e 60 minutos. Foram utilizadas triplicatas experimentais para cada condição: EC Media (meio de cultivo das células endoteliais), DMEM (meio de cultivo das células tumorais), e os meios condicionados *shear* e estático das células WM SCR e WM shGal-3. Após o tempo de incubação, retiramos os meios condicionados e as células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído 4% por

15 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas mais duas vezes com PBS 1X e permeabilizadas com a solução de 0,1% Triton X-100 em PBS 1X por 15 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS 1X e incubadas com faloidina-rodamina (diluição 1:1000 conforme recomendado pelo fabricante) em solução de PBS 1X e 1% BSA por 30 minutos e protegidas da luz. Os núcleos foram marcados com o reagente DAPI (Thermo Scientific). Ao final, as células foram lavadas mais duas vezes com PBS 1X e as lamínulas foram montadas sobre lâminas para visualização no microscópio. As imagens foram tiradas utilizando a objetiva de 20X.

3.3 ANÁLISES DE QUANTIFICAÇÃO

Quantificação da viabilidade celular após *shear*

Para os ensaios de viabilidade, as células aderidas e as células em suspensão foram recolhidas após o término de cada tempo amostral. Para coletar todas as células que se destacaram das placas após o *shear*, o sobrenadante foi centrifugado a 2000 rpm por 2 minutos. Todas as amostras foram lavadas com PBS 1X, centrifugadas e posteriormente incubadas por 15 minutos com solução de PI 10 μ M em PBS 1X. Após esse tempo, as células foram lavadas mais uma vez com PBS 1X e rapidamente analisadas por citometria de fluxo. A análise da citometria foi feita com auxílio do programa Attune (versão 2.1.0) da Thermo Fisher. A população de cada amostra foi demarcada como células positivas (para aquelas com sinal fluorescente de PI) e negativas (para aquelas sem sinal de PI). A porcentagem de células PI positivas da condição *shear* foi normalizada pela porcentagem de células PI positivas da condição estático. Essa relação foi feita para cada linhagem celular e respeitando os tempos amostrais de cada uma. Os gráficos foram construídos com os valores dessas relações de *shear*/estático.

Quantificação da atividade catalítica de LDH

A quantidade da enzima lactato desidrogenase (LDH – *Lactate dehydrogenase*) presente no sobrenadante é um indicativo da liberação de proteínas intracelulares para o meio extracelular através do rompimento da membrana plasmática. Para quantificar a proporção de células lisadas após exposição ao *shear*, dosamos a quantidade da LDH presente no sobrenadante das células. Para isso, alíquotas dos sobrenadantes tanto da condição *shear*

quanto estático (células WM 1366 e SK-MEL-37) foram retiradas logo após o término de cada tempo amostral: 2, 6 e 24h. Os meios condicionados foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos para sedimentar células soltas e posteriormente mantidos a 4 °C por, no máximo, 48h. A quantificação do LDH foi realizada com o kit LDHI2 (Roche) e a leitura da reação utilizando o equipamento COBAS C111 (Ref 05401674 – 190). Foi feita uma padronização do uso desse kit para dosagens em meio de cultura e, em todos os testes, a dosagem foi validada. Os gráficos foram construídos com os valores das unidades de LDH por litro de meio de cultura.

Quantificação das citocinas por multiplex

Na preparação das amostras, os meios condicionados de todos os experimentos foram estocados em -80 °C até o dia da quantificação. Como os experimentos anteriores, o meio condicionado foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos para sedimentar as células em suspensão. O teste de multiplex possibilita quantificar múltiplas citocinas ao mesmo tempo e em diversos tipos de amostras, incluindo amostras de soro, de plasma, tecidos e células. Para as nossas amostras, utilizamos o kit Bio-Plex Pro Human Cancer Biomarker Assay (Bio-Rad), Painel 2, que permite a análise de 18 citocinas: Angiopoetin-2, sCD40L, EGF, Endoglin, sFASL, HB-EGF, IGFBP-1, IL-6, IL-8, IL-18, PAI-1, PLGF, TGF- α , TNF- α , uPA, VEGF-A, VEGF-C e VEGF-D. Toda a reação e análise foi feita seguindo o protocolo do fabricante. Resumidamente, anticorpos de captura conjugados com as *beads* magnéticas são específicos para cada uma das 18 citocinas. Após a incubação com os anticorpos, a placa foi lavada para retirar o excesso de *beads* inespecíficas e, posteriormente, anticorpos de detecção biotinizados foram adicionados para a criação do “complexo sanduiche”, similar ao princípio utilizado nas reações de ELISA. A detecção final do complexo sanduiche é realizado após adicionarmos o conjugado Estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE), que serve como repórter fluorescente para quantificação das concentrações de cada biomarcador. A quantificação foi feita com base na curva padrão fornecida no kit. A leitura foi realizada no leitor de placas xPONENT® 4.2 (Millipore). A concentração de cada biomarcador foi normalizada pelo número total de células aderidas após o experimento. Cada amostra foi normalizada pelo número de células respectivo de cada condição.

Extração de Proteínas

Para obtenção dos extratos proteicos, as células foram desaderidas com tripsina, lavadas com PBS 1X e ressuspensas em tampão de lise NP40 Cell Lysis Buffer (Invitrogen – Life Technologies) (50 mM Tris, pH 7,4; 250 mM NaCl; 5 mM EDTA; 50 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 1% Nonidet P40 e 0.02% NaN₃) acrescido de 2 µg/mL aprotinina e 1 mM PMSF. O homogeneizado foi incubado por 30 minutos a 4 °C e posteriormente centrifugado por 15 minutos, 13000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo tubo e armazenado a -20 °C. Para determinar a concentração proteica dos extratos, utilizamos o Kit “Ensaio de Proteína BCA – Método de Lowry Modificado” da BioAgency.

Western Blot

O extrato proteico (até 30 µg) em tampão de amostra (120 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,01% bromofenol blue, 20% glicerol e 5 mM DTT) foi submetido primeiramente à eletroforese em SDS-PAGE 12% (Laemmli 1970) e tampão de corrida pH 8,5 (250 mM de Tris base, 190 mM de glicina, 1% de SDS) e posteriormente transferido para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*). A transferência foi a 100 V constante, durante 1 hora a 4 °C, imerso em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina e 20% Metanol). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de TBS 1X, 0,05% Tween 20, 5% leite em pó desnatado Molico® por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo primário a 4 °C por um período de 8 a 12 horas. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBS 1X, 0,05% Tween 20, a membrana foi posteriormente incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (HRP) a temperatura ambiente durante 1 hora. Após 3 lavagens de 10 minutos com TBS 1X, 0,05% Tween 20, a imuno-marcação foi revelada através da reação de quimioluminescência e captamos as imagens pela câmara CCD (ImageQuant LAS 4000– GE). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-Akt (Santa Cruz - 5298) e anti-Akt fosforilado (Santa Cruz - 271966) na titulação de 1:200 e 1:100, respectivamente; anti-ERK1/2 (Santa Cruz – 135900) e anti-ERK1/2 fosforilado (Santa Cruz - 81492) na titulação de de 1:200 e 1:200, respectivamente. Para todos esses anticorpos primários, foi utilizado o anticorpo secundário anti-camundongo (Sigma) na titulação de 1:5000. A análise das densitometrias foi feita com auxílio do software Image J. Os gráficos foram apresentados com os valores da relação entre a quantidade de proteína fosforilada pela quantidade de proteína total.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software *GraphPad Prism* versão 4.0 para o Windows (*GraphPad Software*, San Diego California USA). Os dados foram comparados e analisados com o auxílio de testes paramétricos (*One-way* ANOVA e *Two-way* ANOVA seguidos da correção de Bonferroni, ou teste t) ou não paramétricos (Mann Whitney) após passarem pelo teste de normalidade. Foram consideradas como estatisticamente significantes as comparações com valor de p menor que 0,05 ($p < 0,05$). As repetições experimentais de cada experimento estão indicadas nas legendas das figuras.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO MELHOR MODELO DE APLICAÇÃO DO SHEAR LAMINAR EM CÉLULAS TUMORAIS

4.1.1 O sistema de cone-placa aumenta o destacamento das células após *shear*

Como as células tumorais não são naturalmente adaptadas a estresses mecânicos como o *shear*, avaliamos dois aspectos biológicos para comparar a eficiência dos dois modelos: a adesão e morte celular após *shear*. Para isso, as células SK-MEL-37 e WM 1366 foram submetidas ao *shear* laminar utilizando dois modelos diferentes: placas concêntricas e o cone-placa. Esses dois modelos têm peculiaridades técnicas distintas, como o cálculo para o valor da força aplicada e a limitação no intervalo de rotações por minuto que os agitadores possuem. Para que as comparações fossem equivalentes entre os modelos, padronizamos utilizar valores de baixo *shear*, inferiores a 5 dinas/cm^2 , que é o observado na microcirculação tumoral e está dentro das limitações dos dois modelos em questão. Nessas condições, nós comparamos, primeiramente, o número de células totais que se destacaram da placa após o *shear* e se isso era dependente do tempo de exposição e da linhagem tumoral. Após 2, 6 e 24h de exposição ao *shear*, o sobrenadante foi coletado e o número total de células em suspensão foi contado para cada grupo. Na Figura 1A e B, observamos que, quando utilizamos o modelo cone-placa, há um aumento no número de células em suspensão após *shear* nas duas linhagens utilizadas. Logo nas primeiras 2h, as células WM 1366 apresentaram um número de células no sobrenadante aproximadamente 100 vezes maior em relação ao controle estático, e esse incremento se mostrou dependente do tempo de exposição, com o maior acúmulo observado em 24h (Figura 1A). Nesse tempo amostral, o acúmulo de células WM 1366 no sobrenadante foi maior no modelo cone-placa (média: $0,30 \cdot 10^4$ estático; $58,9 \cdot 10^4$ *shear* – Figura 1A) do que no modelo de placas concêntricas (média: $0,046 \cdot 10^4$ estático; $0,073 \cdot 10^4$ *shear* – Figura 1B). O destacamento das células SK-MEL-37 também foi dependente do tempo de exposição ao *shear* e mais proeminente após 24h, sendo que o número de células no sobrenadante também foi maior no modelo cone-placa (média: $58,95 \cdot 10^4$ estático; $151,2 \cdot 10^4$

shear – Figura 1A) do que no modelo de placas concêntricas (média: $19,95 \cdot 10^4$ estático; $73,8 \cdot 10^4$ *shear* – Figura 1B).

Figura 1. Perfil do destacamento celular após *shear* laminar. **(A)** Número de células totais destacadas utilizando o modelo cone-placa. **(B)** Número de células totais destacadas utilizando o modelo de placas concêntricas. As células em suspensão após *shear* foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer. Cada ponto na curva representa a média e o desvio padrão do número total de células em cada condição e tempo amostral. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

Apesar do número total de células SK-MEL-37 em suspensão após *shear* ser maior quando utilizamos o modelo cone-placa, verificamos que a razão entre as condições *shear* e estático não varia entre os dois modelos. Como o número de células plaqueadas no início do experimento é diferente para os dois modelos (descrito na seção de materiais e métodos), normalizamos essa variável para tornar ambos os modelos comparáveis. Para isso, dividimos

o número de células que permaneceram aderidas após *shear* pelo número de células aderidas do controle estático, criando uma razão de destacamento para as duas linhagens celulares nos tempos propostos. Como mostrado na Figura 1, a fração de células que permanecem aderidas após o *shear* decai vigorosamente ao longo do tempo quando utilizamos o modelo de cone-placa (Figura 2A) em comparação ao modelo de placas concêntricas (Figura 2B). De fato, aproximadamente 50% das células SK-MEL-37 e WM 1366 se destacaram das placas já nas primeiras 6h de *shear*, sendo que após 24h praticamente não restam células aderidas na placa (Figura 2A). Entretanto, ressaltamos que a diferença entre os dois modelos é maior para as células WM 1366. O *shear* gerado pelo modelo de placas concêntricas também afeta consideravelmente o destacamento das células SK-MEL-37 ao longo das 24h (Figura 2B), ainda que em menor grau. Isto pode ser explicado porque as células SK-MEL-37 *naïve* são menos aderentes do que as células WM 1366 em cultura (dados não mostrados) e, portanto, são mais propensas a serem destacadas pela força mecânica do *shear*.

Figura 2. Fração de células aderidas após *shear* laminar utilizando o (A) modelo cone-placa e o (B) modelo de placas concêntricas. As células aderidas após 2, 6 e 24h de *shear* foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. O número total de células que permaneceram aderidas após *shear* foi normalizado ao número total de células aderidas na condição controle. Cada ponto na curva representa a média e o desvio padrão desses valores normalizados ao longo do tempo. Figura representativa de três experimentos independentes.

4.1.2 O sistema de cone-placa aumenta a morte celular após *shear*

Como o objetivo dessa primeira parte é verificar qual modelo de aplicação do *shear* é o mais robusto experimentalmente para o uso em células tumorais, nós também investigamos a viabilidade das células que permanecem aderidas e das que se destacam após o *shear*. Células submetidas a eventos físicos traumáticos como o *shear* perdem a integridade da membrana e extravasam o conteúdo intracelular para o meio circundante. Para isso, escolhemos primeiramente o ensaio de exclusão por PI, que é um corante intercalante de DNA capaz de entrar no espaço intracelular apenas quando a membrana da célula é corrompida, ou seja, quando a célula inicia o processo de morte celular. Portanto, na análise, células PI positivas representam a população de células não viáveis. Ao analisar a proporção de células não viáveis da população total de células do sobrenadante após o *shear*, observamos que, mesmo com o aumento no destacamento das células WM 1366 ao utilizar o modelo cone-placa, os dois modelos causam, de maneira similar, um incremento de morte de aproximadamente 1,5 vezes em 2h. A diferença estatística ocorre em 24h, onde a razão de células PI positivas é maior ($p < 0,01$) no modelo cone-placa (Figura 3A). Já para a linhagem SK-MEL-37, houve aumento da morte celular nos três tempos analisados quando utilizamos o modelo cone-placa ($p < 0,001$) (Figura 3A). Subsequentemente, ao analisar a proporção de células não viáveis das células que permaneceram aderidas após o *shear*, verificamos que o incremento de morte celular após 24h foi muito maior ($p < 0,001$) nas duas linhagens analisadas quando utilizamos o modelo cone-placa (Figura 3B). Nos outros dois tempos amostrais e para as duas linhagens analisadas, a variação da proporção de células PI positivas foi semelhante nos dois modelos.

Figura 3. Proporção de células não viáveis após serem submetidas aos dois modelos de *shear* por 2, 6 e 24h. As barras no gráfico representam a média e o desvio padrão das razões obtidas pela divisão do número de células PI positivas do *shear* pelo controle estático. **(A)** Proporção de células PI positivas a partir da população de células que se destacaram após *shear*. **(B)** Proporção de células PI positivas a partir da população de células que permaneceram aderidas após *shear*. Modelo 1 cone-plate; modelo 2: placas concêntricas. A linha vermelha demarca o ponto onde os valores entre *shear* e estático são iguais. A comparação estatística foi feita entre os dois modelos utilizados e o tempo de exposição ao *shear*. O teste utilizado foi o *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

Adicionalmente a análise de viabilidade celular por PI, também avaliamos a concentração de LDH no sobrenadante das células expostas ao *shear* pelos dois modelos. Essa enzima é restrita ao citoplasma, sendo que a dosagem de LDH no meio extracelular é indicativa de lise celular e extravasamento do conteúdo citoplasmático. Com essa abordagem, verificamos o mesmo resultado relatado anteriormente, ou seja, o modelo cone-placa induz mais morte celular quando comparado ao modelo de placas concêntricas. Apenas comparando

as escalas dos gráficos, a quantidade em valores absolutos de LDH (unidades por litro) foi muito maior no modelo cone-placa (Figura 4). De fato, quando utilizamos o modelo de cone-placa, as células WM 1366 tiveram a concentração aumentada de LDH ≥ 2 vezes após 2 e 6h de *shear* em comparação ao controle estático, e ≥ 5 vezes após 24h (Figura 4A). No modelo de placas concêntricas, o aumento na concentração de LDH no sobrenadante ocorreu apenas após 24h, em uma razão menor do que duas vezes (Figura 4B). Para as células SK-MEL-37, o aumento de LDH utilizando o modelo cone-placa foi a partir das 6h, numa proporção de aproximadamente 2 vezes, com posterior aumento de ≥ 5 vezes em 24h (Figura 4A). Já quando utilizamos as placas concêntricas, observamos um aumento de 1,5 vezes apenas após 24h de *shear* (Figura 4B).

Figura 4. Dosagem de LDH (U/L) após *shear*. O sobrenadante das linhagens WM 1366 e SK-MEL-37 após 2, 6 e 24h de *shear* foi coletado e a concentração de LDH foi mensurada para cada condição. **(A)** *Shear* utilizando o modelo cone-placa. **(B)** *Shear* utilizando o modelo de placas concêntricas. Os pontos no gráfico representam a dispersão das triplicatas experimentais; o traço sobre os pontos demarca a média. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

Em resumo, estes resultados mostram que a viabilidade das células de melanoma após serem submetidas ao *shear* depende do modelo escolhido para a aplicação da força, do tempo de exposição e da linhagem celular. Tempos mais curtos de *shear* são mais indicados, pois o aumento no destacamento e morte celular é mais evidente após as 6h, com crescimento gradual até 24h. Além disso, as células SK-MEL-37 são mais facilmente destacadas da placa após *shear*, apesar dos indicativos de morte serem semelhantes aos das células WM 1366. Consequentemente, o modelo escolhido para submeter as células tumorais ao *shear* representa um ponto essencial para garantir a integridade das células e a posterior confiabilidade dos dados. Portanto, o modelo de placas concêntricas é o que melhor garante essas características.

Dessa forma, nós escolhemos o modelo de placas concêntricas e o tempo amostral de 6h para prosseguir com todos os experimentos posteriores. Outra checagem experimental que fizemos foi comparar o uso ou não de soro fetal no meio de cultivo durante a exposição ao *shear*. Até então, todos os experimentos mostrados foram feitos utilizando meio de cultivo suplementado com soro. Como o nosso intuito posteriormente é dosar a concentração de moléculas secretadas para o meio condicionado após o *shear*, a utilização de meio livre de soro seria adequado para evitar contaminação cruzada com as citocinas de origem bovina. Entretanto, o soro atua, entre outras funções, como fator protetor no cultivo de linhagens celulares, e como o *shear* já é um estímulo de estresse, a retirada do soro poderia acrescentar mais um estímulo estressor nessa condição experimental. Para verificar se há indução de morte ao retirar o soro do meio, nós medimos a concentração de LDH no sobrenadante das células WM 1366 após 6h de *shear*. Verificamos, primeiramente, que a concentração basal (controle estático) de LDH é mil vezes maior no meio com soro (Figura 5A), o que é esperado, pois o soro é abundante em moléculas de LDH. Quando comparamos o controle estático com o *shear*, observamos que há um aumento significativo ($p < 0,001$) de LDH no sobrenadante na condição de meio sem soro, mas não quando o soro está presente (Figura 5A e B). Como a sensibilidade da técnica de dosagem do LDH é alta, é possível detectar pequenas alterações na concentração dessa molécula nas soluções. Por isso, o aumento na concentração de LDH após *shear* em ausência de soro é provavelmente consequência do aumento de morte celular nessa condição. Optamos então por manter o meio suplementado com soro fetal em todas as análises posteriores.

Figura 5. Dosagem de LDH (U/L) no sobrenadante com ou sem soro das células WM 1366 expostas à 6h de *shear*. (A) As barras no gráfico representam a média e o desvio padrão dos valores de concentração de LDH no controle estático e *shear*, dosadas nos grupos que utilizaram meio suplementado ou não com soro. Para facilitar a visualização, a tabela (B) contém as médias de cada condição experimental. A comparação estatística foi feita entre *shear* e o controle estático, para cada um dos dois grupos: com e sem soro. O teste utilizado foi o *Teste t*, *** $p < 0,001$. A figura representa apenas um experimento realizado com seis replicatas experimentais. *Static* = controle estático.

No próximo passo da padronização, acrescentamos duas variáveis para serem analisadas. Como o nosso foco está nos efeitos do baixo *shear* laminar, verificamos se a magnitude do *shear* poderia alterar a viabilidade das células de melanoma. Além disso, nosso interesse também é investigar o envolvimento da galectina-3 nas respostas funcionais das células de melanoma frente a esse estresse. Portanto, células WM 1366 silenciadas para esse gene também foram testadas para confirmar se a modificação genética não iria interferir na viabilidade celular após *shear*. Na figura 6, mostramos o perfil de células PI positivas após expor as células WM 1366 parentais e as modificadas WM shGal-3 e WM SCR à duas magnitudes de *shear*: 1 dina/cm² e 2 dinas/cm². Na magnitude de 1 dina/cm², não houve indução de morte em nenhuma das células utilizadas, seja na fração de células que se destacam ou na que permanece aderida (Figura 6A). Quando aumentamos a magnitude para 2 dinas/cm², há um aumento na morte das células WM 1366 parental ($p=0,04$), apenas na fração das células que se destacaram (Figura 6B). Embora a diferença entre o controle estático e *shear* não seja significativa para a célula WM shGal-3, o número de células PI positivas após *shear* foi maior quando utilizamos a magnitude de 2 dinas/cm². Dessa forma, esses resultados garantem que, ao utilizar a magnitude de 1 dina/cm², não há diferença na morte celular entre a linhagem parental e as linhagens geneticamente modificadas. Isso representa uma condição

experimental ótima para a comparação dos meios condicionados das células WM shGal-3 e WM SCR nos ensaios funcionais posteriores.

Figura 6. Viabilidade celular a relação à magnitude do *shear*. **(A)** Proporção de células PI positivas ao utilizar a magnitude de 1 dina/cm². **(B)** Proporção de células PI positivas ao utilizar a magnitude de 2 dinas/cm². As barras no gráfico representam a média e o desvio padrão do número de eventos (esquerda) ou das porcentagens (direita) de células PI positivas provenientes da população que se destaca ou das que permanecem aderidas após *shear*. A comparação estatística foi feita entre *shear* e o controle estático, para cada uma das três células utilizadas. O teste utilizado foi o *Teste t*, * p=0,04. Figura representativa de dois experimentos independentes. *Static* = controle estático.

4.2 EFEITO DO SHEAR LAMINAR BAIXO NAS CÉLULAS TUMORAIS

4.2.1 O *shear* influencia o perfil de citocinas secretadas pelas células de melanoma

Após a realização da primeira parte desse projeto, estabelecemos as condições experimentais que foram seguidas para todos os experimentos funcionais dessa segunda e a terceira parte em diante: modelo de placas concêntricas, meio suplementado com soro fetal, baixo *shear* de 1 dina/cm², e células WM shGal-3 e WM SCR.

Primeiramente, avaliamos se as células de melanoma alteram o perfil de moléculas secretadas para o meio condicionado após o *shear*. Como os tempos amostrais de 2h e 6h foram os que não induziram morte celular, nós analisamos se há diferença na secreção de moléculas de acordo com o tempo de exposição ao *shear*. Para isso, utilizamos um kit comercial baseado na tecnologia de multiplex para detectar 18 biomarcadores no meio condicionado, dentre eles proteínas solúveis, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

Na figura 7, visualizamos o painel de 15 moléculas que não foram enriquecidas no meio condicionado das células tumorais após 2h e 6h de *shear*. Realizamos a análise dos dados para comparar os grupos *shear* e estático, mas nenhuma dessas moléculas teve valores estatisticamente diferentes entre os grupos, seja em 2h ou em 6h. Em adição, fica claro na análise visual dos gráficos que praticamente todas as moléculas são secretadas de maneira tempo-dependente, com exceção de VEGF-D e uPA. Além disso, também é interessante acrescentar que, apesar do nosso interesse primário residir na diferença entre os grupos *shear* e estático, observamos que a concentração de algumas dessas moléculas é diferente na condição basal entre as células WM shGal-3 e WM SCR, dentre as quais podemos citar: IL-6, Endogлина, ligante solúvel de CD40, FASL solúvel, TNF- α , IL-18, VEGF-D, HB-EGF, IGFBP-1, VEGF-C, TGF- α , e uPA. Essa diferença parece estar associada à presença de galectina-3 que pode influenciar na expressão e/ou secreção dessas moléculas.

Figura 7. Painele de biomarcadores secretados pelas células tumorais após *shear* laminar baixo. A concentração das moléculas (pg/mL) foi normalizada pelo número de células aderidas na placa após 2 e 6h de *shear*. Os pontos no gráfico representam a dispersão dos valores das replicatas experimentais, com média e desvio padrão. Em vermelho, a distribuição das células WM shGal-3, e em azul das células WM SCR. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

Dos 18 biomarcadores tumorais analisados, encontramos 3 moléculas que foram enriquecidas no meio condicionado das células de melanoma expostas ao *shear*. Na figura 8, observamos o aumento da concentração de Angiopoietina-2, PLGF e IL-8 quando comparamos o grupo *shear* ao grupo controle estático, apenas no tempo amostral de 6h. A angiopoietina-2 teve sua concentração média aumentada em 6 vezes nas células WM shGal-3 ($p<0,01$) e em 4 vezes nas células WM SCR ($p<0,01$). O PLGF teve sua concentração média aumentada em 1,3 vezes nas células WM shGal-3 ($p=0,0134$) e em 1,4 vezes nas células WM SCR ($p<0,001$). Já IL-8 também teve sua concentração média aumentada em 1,3 vezes nas células WM shGal-3 ($p<0,01$) e em 1,4 vezes nas células WM SCR ($p<0,001$). Não houve diferença estatística na comparação das relações entre *shear* e estático levando em consideração a expressão de galectina-3. Portanto, o aumento da secreção dessas moléculas se dá por influência direta do *shear* e independe da expressão de galectina-3.

Apesar da concentração dessas três moléculas após *shear* estar aumentada nas células WM SCR, os valores basais (controle estático) já são diferentes entre as duas células. As células WM SCR em condição basal contêm os maiores níveis de PLGF e IL-8 no meio condicionado em 2h ($p<0,05$; $p<0,001$, respectivamente) e em 6h ($p<0,001$; $p<0,001$, respectivamente) em comparação com as células WM shGal-3. Não observamos diferença estatística na concentração basal de Angiopoietina-2 entre as células WM SCR e WM shGal-3. Portanto, na presença de galectina-3, o sobrenadante das células de melanoma é basalmente enriquecido com PLGF e IL-8, mas galectina-3 não influencia no aumento da secreção dessas moléculas em resposta ao *shear*. Além disso, a variável tempo foi estatisticamente significativa para as três moléculas secretadas, com $p<0,0001$. Portanto, o enriquecimento dessas moléculas no meio condicionado é proporcional ao tempo de exposição a esse estresse.

Figura 8. Moléculas enriquecidas no meio condicionado por efeito do *shear* laminar baixo. A concentração das moléculas (pg/mL) foi normalizada pelo número de células aderidas na placa após 2 e 6h de *shear*. Os pontos no gráfico representam a dispersão dos valores das replicatas experimentais, com média e desvio padrão. Em vermelho, a distribuição das células WM shGal-3, e em azul das células WM SCR. A comparação estatística foi feita entre *shear* e o controle estático, para as duas células utilizadas e nos dois tempos amostrais. O teste utilizado foi o *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

4.2.2 Efeitos diretos do *shear* e do meio condicionado para a proliferação, morte e capacidade clonogênica

A mecanotransdução pode se converter em efeitos funcionais para a própria célula que recebe o estímulo mecânico ou para células adjacentes, através da secreção de moléculas sinalizadoras. Como vimos anteriormente, o *shear* modula a secreção de três importantes moléculas envolvidas em respostas celulares como adesão, migração, proliferação, transição EMT, entre diversas outras. Para aprofundar o entendimento de quais funções são desencadeadas pelo *shear*, seja pelo efeito direto de mecanotransdução ou pelo efeito de

sinalização parácrina através das moléculas secretadas, analisamos algumas dessas respostas celulares envolvidas nas células de melanoma.

Para avaliar o efeito direto do *shear* na proliferação celular, as células WM shGal-3 e WM SCR, após 6h de exposição, foram tripsinizadas, replaqueadas em meio fresco, e o número de células foi contado após 24, 48 e 72h. Ao longo desse tempo, as células WM shGal-3 não apresentaram diferença no número de células entre os grupos controle estático e *shear*. Entretanto, as células WM SCR expostas ao *shear* apresentaram uma redução na taxa de duplicação comparada às células do controle estático, visualizado pelo menor número de células ($p < 0,001$) após 72 h em cultura (Figura 9A). Portanto, o *shear* diminui diretamente a capacidade proliferativa das células de melanoma que expressam galectina-3, sendo essa proteína responsável por sensibilizar as células ao *shear* ou conferir alguma alteração fenotípica que ainda precisa ser investigada. Para visualizar o efeito parácrino do meio condicionado na proliferação celular, células WM shGal-3 e WM SCR *naive* (que não foram expostas ao *shear*) foram plaqueadas com o meio condicionado derivado do *shear*. Nessa condição, não observamos alteração do número total de células nos tempos de 24, 48 e 72h, seja para as células shGal-3 ou SCR (Figura 9B). Dessa forma, a capacidade do *shear* em afetar a proliferação celular ocorre de maneira independente da sinalização parácrina, e está relacionada com a expressão de galectina-3 e algum mecanismo intrínseco de mecanotransdução.

Figura 9. Proliferação celular após *shear*. **(A)** Células que foram diretamente expostas ao *shear* ou **(B)** cultivadas com o meio condicionado derivado do *shear*. As barras no gráfico representam a média e o desvio padrão do número total de células WM shGal-3 e WM SCR em cada condição. A curva de proliferação foi medida ao longo de 24, 48 e 72h. A comparação estatística foi feita entre *shear* e o controle estático, para as duas células utilizadas e nos três tempos amostrais. O teste utilizado foi o *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

A análise do ciclo celular é um método alternativo para comprovar a alteração da proliferação nessas células. A partir do mesmo desenho experimental citado acima, também avaliamos a porcentagem de células nas fases G0/G1 e S/G2-M após 24, 48 e 72h. Apesar da redução do número de células WM SCR no tempo de 72h, não observamos diferença entre as populações de células em G0/G1 e S/G2-M comparadas ao grupo controle ou aos tempos mais iniciais (Figura 10A). Na verdade, não houve parada ou alteração de ciclo celular em nenhuma das células ou tempo amostral do grupo *shear*, seja nas células que receberam o estímulo mecânico direto (Figura 10A) ou nas células cultivadas com o meio condicionado derivado do *shear* (Figura 10B). Entretanto, a análise de fases do ciclo através da técnica de marcação por PI não nos permite extrair informações sobre a cinética de duplicação celular, e

também não é possível distinguir populações de células que estão numa fase S inicial ou tardia daquelas em fase G1 e G2, respectivamente. Para esse tipo de informação, um ensaio utilizando o intercalante BrdU (*bromodeoxyuridine*) é o mais adequado.

Figura 10. Fases do ciclo celular após *shear*. **(A)** Células WM shGal-3 e WM SCR que foram diretamente expostas ao *shear* ou **(B)** cultivadas com o meio condicionado derivado do *shear*. A relação entre o acúmulo de células na fase G0/G1 e S/G2-M está representada nos gráficos. As barras no gráfico representam a média e o desvio padrão da porcentagem de células em cada fase do ciclo ao longo de 24, 48 e 72h. A comparação estatística foi feita entre *shear* e o controle estático, para as duas células utilizadas e nos dois tempos amostrais. O teste utilizado foi o *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni ao longo de 24, 48 e 72h. Não houve diferença estatística entre os grupos. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

Como não houve parada de ciclo celular nas células WM SCR expostas ao *shear* que justificasse a redução no número de células em 72h, nós verificamos a indução de morte celular nessas mesmas condições. O ensaio de morte celular também foi feito utilizando o intercalante de DNA (PI), e a população de células em subG1 é a indicativa de morte celular. A figura 11 mostra os gráficos com as porcentagens de células em subG1 em 24, 48 e 72h, seguindo o mesmo delineamento experimental acima. Entretanto, nem as células WM shGal-3

e WM SCR que foram expostas ao *shear* (Figura 11A), tampouco as que foram cultivadas com o meio condicionado derivado dessa condição (Figura 11B) apresentaram incremento de morte, em nenhum dos tempos analisados. Dessa forma, o *shear* não induz morte celular a longo prazo, seja por estímulo direto ou pela sinalização de moléculas presentes no meio condicionado. Além disso, a redução do número de células em 72h (Figura 9A) não é consequência da indução de morte celular nessas mesmas células.

Figura 11. Análise de morte celular após *shear*. **(A)** Células WM shGal-3 e WM SCR que foram diretamente expostas ao *shear* ou **(B)** cultivadas com o meio condicionado derivado dessa condição. As barras no gráfico representam a média e o desvio padrão da porcentagem de células em subG1 ao longo de 24, 48 e 72h. A comparação estatística foi feita entre *shear* e o controle estático, para as duas células utilizadas e nos dois tempos amostrais. O teste utilizado foi o *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

O ensaio clonogênico nos permite avaliar a capacidade *in vitro* de uma única célula sobreviver e originar uma colônia, através da habilidade de se dividir ilimitadamente. Por isso, analisamos se o estresse causado pelo *shear* modula a clonogenicidade de células tumorais,

direta ou indiretamente. Da mesma maneira, as células WM shGal-3 e WM SCR, após 6h de exposição ao *shear*, foram tripsinizadas e 200 células/poço foram plaqueadas em meio fresco. Paralelamente, células *naive* foram plaqueadas nas mesmas condições com o meio condicionado derivado do *shear*. Na figura 12 observamos a marcação das células com cristal violeta após 8 dias em cultura. A capacidade clonogênica das células diretamente expostas ao *shear* não foi diferente em relação ao controle estático, independente da linhagem celular (Figura 12A). Por outro lado, quando células WM shGal-3 e WM SCR são plaqueadas com o meio condicionado derivado do *shear* (respeitando o mesma fonte de célula), observamos que essa condição potencializou o numero de colônias formadas nas duas células. (Figura 12B). Esse resultado mostra que moléculas enriquecidas no meio condicionado após *shear* podem promover resistência à morte, sobrevivência e formação de colônia em células de melanoma.

Figura 12. Formação de colônias após *shear*. **(A)** Células WM shGal-3 e WM SCR que foram diretamente expostas ao *shear* ou **(B)** cultivadas com o meio condicionado derivado do *shear*. À esquerda em azul, células provenientes do controle estático. À direita em vermelho, células provenientes do grupo *shear*. Células foram plaqueadas em baixa densidade (200/poço) e as imagens foram tiradas após oito dias de cultivo. As células foram coradas com cristal violeta, cada ponto roxo na imagem representa uma colônia de células.

4.3 EFEITOS DO MEIO CONDICIONADO DE CÉLULAS DE MELANOMA APÓS SHEAR NA ALTERAÇÃO DE FUNÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

4.3.1 Efeito do meio condicionado derivado do *shear* na ativação de células endoteliais

Projetando o cenário da biologia vascular do melanoma, em que a célula tumoral exposta ao fluxo sanguíneo estará localmente rodeada por células endoteliais (vasos mosaicos), ou próxima a outros vasos funcionais (no caso de mimetismo vasculogênico), nós hipotetizamos que as moléculas secretadas pela célula tumoral em resposta ao *shear* poderão atuar também na resposta funcional das células endoteliais. Durante o remodelamento vascular, as células endoteliais que antes se encontravam em estado de quiescência, passam a responder aos estímulos externos através de dois principais mecanismos: proliferação e migração.

Para investigar o efeito do secretoma das células tumorais como indutor do remodelamento vascular, monitoramos a proliferação das células endoteliais cultivadas com o meio condicionado das células de melanoma expostas ou não ao *shear*. Primeiramente nós fizemos alguns ajustes experimentais para garantir que a composição do meio de cultura não seria *per se* um fator estressor e/ou fator de confusão na análise dos resultados. As células endoteliais utilizadas nesse projeto foram cultivadas em meio enriquecido com todos os fatores de crescimento e de diferenciação específicos para essa linhagem, diferente do meio de cultivo das células tumorais, do qual é derivado o meio condicionado. De fato, em ensaios pilotos verificamos que a taxa de proliferação das células endoteliais reduziu drasticamente após 24h quando elas eram expostas ao mesmo meio de cultivo das células tumorais: DMEM com 10% de soro (dados não mostrados). Essa característica só foi revertida quando utilizamos uma diluição contendo duas partes de meio de cultivo das células endoteliais para uma parte de meio de cultivo das células tumorais (2:1).

Utilizando essas proporções, as células endoteliais foram então plaqueadas com o meio condicionado proveniente das células WM SCR e WM shGal-3 nas condições *shear* e controle estático. Monitoramos o crescimento celular durante 24, 48 e 72h pela contagem do número de células viáveis após coloração com azul de tripan. O número de células em cada poço foi quantificado utilizando o contador automático Vi-CELL. Conforme os gráficos

apresentados na figura 13, observamos que o meio condicionado derivado do *shear* não altera a proliferação das células endoteliais. Entretanto as análises estatísticas mostram apenas uma tendência na diminuição da proliferação em 72 h, com valores de $p=0,26$ e $p=0,11$ para as células WM SCR e WM shGal-3, respectivamente.

Figura 13. Proliferação das células endoteliais após serem expostas ao meio condicionado das células tumorais após *shear*. À esquerda, as células endoteliais que foram cultivadas com o meio condicionado derivado das células WM SCR, e, à direita, com o meio condicionado derivado das células WM shGal3. Os pontos no gráfico representam a média e o desvio padrão do número total de células endoteliais em 24, 48 e 72h. A comparação estatística foi feita entre os grupos *shear* e controle estático, nos três tempos amostrais. O teste utilizado foi o *Two-way* ANOVA seguido do teste de Bonferroni. O valores de p em 72 h estão representados no gráfico. Figura representativa de dois experimentos independentes. *Static* = controle estático.

A tendência na redução da proliferação das células endoteliais pode, ainda, ser derivada de um artefato experimental, pois utilizamos uma concentração três vezes menor do meio condicionado. A menor disponibilidade de moléculas sinalizadoras no meio condicionado pode ter mascarado o efeito na proliferação das células endoteliais. Como alternativa ao efeito da diluição, o meio condicionado pode ser liofilizado e ressuspensionado com o próprio meio das células endoteliais. Além disso, para corroborar esse resultado, serão necessários experimentos que avaliem, por exemplo, as fases do ciclo e a morte celular nesse contexto.

Posteriormente, realizamos um ensaio clássico de ativação das células endoteliais, que é medida pela capacidade de formação de estruturas tubulares em duas dimensões. Esse ensaio nos permite avaliar características migratórias e estruturais das células endoteliais, que foram plaqueadas sobre uma matriz composta por matrigel e fotografadas a cada duas horas. Com as imagens tiradas ao longo do tempo, podemos ter uma perspectiva temporal da

formação e dissociação das estruturas tubulares nos dois eventos testados (*shear* e controle estático).

A figura 14 mostra o conjunto de fotografias das células endoteliais expostas ao meio condicionado derivado das células WM SCR. Em 2h, nós claramente observamos o rearranjo conformacional que as células endoteliais fazem sobre a matriz, com pontos de ligação entre várias células (representada pelas setas vermelhas) e formação de estruturas tubulares (representada por asteriscos). Em 2 e 4h, observamos que as estruturas tubulares são mais completas (fechadas em toda a circunferência) e em maior número quando as células endoteliais estão em contato com o meio condicionado derivado do *shear* (Figura 14A e B). A dinâmica de formação e dissociação dos túbulos em matrigel se inicia com diversos túbulos de pequeno diâmetro que, ao longo do tempo, vão perdendo algumas conexões celulares e formando túbulos de diâmetro maior, até o total rompimento entre as células e desaparecimento das estruturas tubulares. Em 8h (Figura 14C), observamos essa fase, em que os túbulos já maduros são maiores e em alguns pontos começam a perder esses pontos de união (asteriscos vermelhos), marcando o final da dinâmica dessa conformação estrutural. Nesse tempo, observamos túbulos maiores na condição *shear*, o que não foi possível demonstrar no campo em que as fotos foram capturadas. Esse efeito foi mais visível após 10 h de experimento e com imagens tiradas em menor aumento, onde é possível observar a dissociação dos túbulos nas duas condições (Figura 14D).

Meio Condicionado - WM SCR

Figura 14. Ensaio de formação de túbulos pelas células endoteliais. Células endoteliais foram plaqueadas sobre uma camada de matriz extracelular (matrigel) e estimuladas com o meio condicionado derivado das células WM SCR expostas ou não ao *shear*. As fotos foram tiradas em microscópio de luz invertida ao longo de 2, 4, 8 e 10h. Em 2, 4 e 8h as imagens foram tiradas no aumento de 10x. Em 10h, as imagens foram tiradas no aumento de 5x. *Static* = controle estático. Asterisco azul = estruturas tubulares. Seta vermelha = pontos de ligação entre células. Asterisco vermelho = perda das ligações entre células. As imagens são exemplos que representam dois experimentos independentes.

Características muito similares foram observadas quando as células endoteliais foram expostas ao meio condicionado derivado das células WM shGal-3 (Figura 15). O início da formação de túbulos em 2h não foi tão evidente quanto ao observado para as células WM SCR, entretanto é claro que há mais pontos de ligação entre células (representada pelas setas vermelhas) e formação de estruturas tubulares (representada por asteriscos) na condição *shear* (Figura 15A). Em 4h parece não haver diferença entre os grupos experimentais (Figura 15B), entretanto, após 8h, também observamos que a dissociação dos túbulos (asteriscos vermelhos) acontece principalmente na condição *shear* (Figura 15C). Essa informação fica mais evidente após 10h, onde praticamente não existem mais estruturas tubulares na condição *shear* comparado ao controle estático (Figura 15D).

Meio Condicionado - WM shGal-3

Figura 15. Ensaio de formação de túbulos pelas células endoteliais. Células endoteliais foram plaqueadas sobre uma camada de matriz extracelular (matrigel) e estimuladas com o meio condicionado derivado das células WM shGal-3 expostas ou não ao *shear*. As fotos foram tiradas em microscópio de luz invertida ao longo de 2, 4, 8 e 10h. Em 2, 4 e 8h as imagens foram tiradas no aumento de 10x. Em 10h, as imagens foram tiradas no aumento de 5x. *Static* = controle estático. Asterisco azul = estruturas tubulares. Seta vermelha = pontos de ligação entre células. Asterisco vermelho = perda das ligações entre células. As imagens são exemplos que representam dois experimentos independentes.

Como as células endoteliais parecem se reorganizar mais rapidamente quando estão expostas ao meio condicionado derivado do *shear*, nós presumimos que isso também refletiria em outro aspecto biológico fundamental, a reorganização do citoesqueleto. Realizamos a marcação dos filamentos de actina das células endoteliais com rodamina-faloidina, após 30 e 60 minutos de incubação com o meio condicionado das células tumorais previamente expostas ao *shear*. Antes de adicionar os meios condicionados, as células endoteliais foram plaqueadas 48h antes para atingir a máxima confluência possível e garantir adesões mais robustas entre as células. A figura 16 mostra o efeito do secretoma proveniente do *shear* no arranjo do citoesqueleto comparado ao controle estático. Já em 30 minutos, nós observamos uma evidente desorganização nas fibras de F-actina. No controle estático as fibras são distribuídas de forma mais homogênea, com organização na região cortical em algumas células, e uma intensidade de marcação mais uniforme. No *shear*, a distribuição cortical das fibras ficou menos proeminente, houve acúmulo de agregados de F-actina e uma intensidade de marcação mais forte e heterogênea, provavelmente característica da formação desses agregados. O efeito na condição *shear* ainda é mantido após 60 minutos, com aparente aumento de agregados por todo o citoplasma das células. Entretanto, a diferença entre os grupos nesse tempo amostral não foi tão marcante quanto em 30 minutos, pois há uma reorganização das fibras de actina também no controle estático. É provável que o meio condicionado basal das células tumorais exerça, por si só, um efeito parácrino nas células endoteliais. Ainda nesse experimento, não foi evidente a diferença entre os meios condicionados derivados das células WM SCR e shGal-3.

Figura 16. Marcação de F-actina nas células endoteliais após incubação com o meio condicionado das células tumorais após *shear*. As fibras de actina (em vermelho) foram marcadas com rodaminafaloidina após 30 e 60 minutos de incubação com os meios condicionados das condições estático e *shear*. Os núcleos (em azul) foram marcados com DAPI. As imagens foram tiradas no aumento de 20X. *Static* = controle estático.

4.3.2 Efeito do meio condicionado derivado do *shear* na sinalização de células endoteliais

Diversas alterações na vasculatura são associadas à capacidade migratória e proliferativa das células endoteliais. Para isso, as principais vias de sinalização ativadas são das MAP quinases, Akt e da proteína quinase C (PKC) (MONOZ-CHAPULI; QUESADA; ANGEL MEDINA, 2004). Para investigar uma resposta mecânica das células endoteliais ao serem estimuladas com o meio condicionado, avaliamos a ativação das vias Akt e ERK1/2 por *western blotting*. Essas vias podem ser consideradas de resposta rápida ou de resposta sustentada, por isso, analisamos a ativação em períodos de tempo mais curtos e também mais longos.

Como no experimento anterior, as células endoteliais foram plaqueadas 48h antes para atingir a confluência e estabilização das adesões celulares. As células endoteliais foram expostas aos meios condicionados por 10, 30, 60 e 120 minutos, e então recolhidas para a extração das proteínas. Ao contrário do que hipotetizamos sobre a ativação dessas vias para justificar a dinâmica de formação de túbulos e de reorganização do citoesqueleto, não observamos aumento significativo da fosforilação de Akt e ERK1/2. Na figura 17, mostramos os perfis proteicos da proteína Akt total e Akt fosforilado (Figura 17A) e a quantificação da densitometria de três experimentos independentes (Figura 17B). Também mostramos os controles de sinalização basal dessa via quando as células endoteliais foram expostas ao seu meio de cultura específico (EC Media) ou ao meio das células tumorais (DMEM). Observamos que a dinâmica entre Akt total e Akt fosforilado ao longo do tempo foi semelhante entre os meios condicionados (derivados das células WM SCR e WM shGal-3) e os controles experimentais (EC Media e DMEM), sem diferença também entre as curvas do controle estático e *shear*.

Figura 17. Fosforilação de Akt nas células endoteliais. (A) A análise temporal da fosforilação de Akt nas células endoteliais estimuladas com o meio condicionado derivado das condições estático e *shear* foi realizada por *western blotting*. (B) Quantificação das densitometrias de três experimentos independentes. A intensidade das bandas de Akt fosforilado foi normalizada pela intensidade de Akt total. Os pontos no gráfico representam a média e o desvio padrão das relações pAKT/totalAkt em cada tempo amostral. A comparação estatística foi feita entre os grupos *shear* e controle estático, nos quatro tempos amostrais. O teste utilizado foi o Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

Em relação à ativação da via ERK1/2, é evidente a diminuição da fosforilação dessa proteína logo nos primeiros 10 minutos e depois em 60 minutos (Figura 18A). Entretanto, na quantificação das densitometrias (Figura 18B), observamos diferença estatística ($p < 0,05$) somente entre os grupos “*shear*” e “EC Media” em 60 minutos, porém, não houve diferença entre os grupos estático e *shear*, o que dificulta a conclusão de que o secretoma proveniente do *shear* altere o perfil de fosforilação da via ERK1/2. Apesar disso, é curioso que observamos a redução qualitativa da fosforilação de ERK, e não o contrário como se espera para a ativação das funções migratórias, por exemplo. Na comparação entre as células WM SCR e WM shGal-3, as duas tiveram praticamente o mesmo perfil de fosforilação de ERK1/2 na condição *shear*, entretanto, notamos que o controle estático das células WM SCR parecem aumentar a fosforilação em 120 minutos.

Figura 18. Fosforilação de ERK1/2 nas células endoteliais. (A) A análise temporal da fosforilação de ERK1/2 nas células endoteliais estimuladas com o meio condicionado derivado das condições estático e *shear* foi realizada por *western blotting*. (B) Quantificação das densitometrias de três experimentos independentes. A intensidade das bandas de ERK fosforilado foi normalizada pela intensidade de ERK total. Os pontos no gráfico representam a média e o desvio padrão das relações pERK/total ERK em cada tempo amostral. A comparação estatística foi feita entre os grupos *shear* e controle estático, nos quatro tempos amostrais. O teste utilizado foi o *Two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni. Figura representativa de três experimentos independentes. *Static* = controle estático.

5. DISCUSSÃO

Diversos modelos e aparatos foram construídos para reproduzir a força do fluxo sanguíneo *in vitro* (REZVAN et al., 2011). O uso da maioria desses modelos se concentra em dois temas principais na área da biologia/medicina: (1) estudo dos mecanismos de entrega e captação de fármacos (ou outras substâncias) sob fluxo, e (2) o estudo das alterações da função endotelial decorrentes da variação do fluxo sanguíneo. Além disso, os modelos de aplicação do *shear* proporcionam análises de pequena à larga escala, com uso desde microchips à biorreatores, respectivamente. Os microchips fluídicos, por exemplo, possibilitam avaliar as alterações moleculares em tempo real em uma única célula, enquanto o uso biorreatores garante o fluxo de nutrientes e resíduos, e a aplicação de forças mecânicas em culturas tridimensionais. Nesse trabalho, nosso intuito foi analisar a resposta funcional e o conteúdo secretado de células tumorais expostas ao *shear*, por isso escolhemos dois modelos de média escala para a aplicação do fluxo laminar: o cone-placa (JO et al., 1991) e o modelo das placas concêntricas (DELA PAZ et al., 2012). Esses modelos possuem duas principais vantagens: (1) utilizar um número maior de células, facilitando análises posteriores de transcrição gênica e ensaios funcionais, e (2) recuperar o meio condicionado dessas células após aplicação da força mecânica.

O modelo internacionalmente conhecido como padrão ouro nessa área em questão é o cone-placa, entretanto, a maioria dos estudos utilizam esse aparato nas respostas funcionais de células endoteliais, que são adaptadas em “sentir” o *shear* e transformar um sinal mecânico em sinal químico, com consequente função biológica. Pouco ainda se sabe sobre a adaptação das células tumorais frente a esse estímulo, se elas possuem uma maquinaria conservada para a função de mecanotransdução, e qual a importância para a biologia do tumor. De fato, os trabalhos que investigam a resposta das células tumorais frente às diferentes forças físicas presentes no tumor vêm ganhando cada vez mais atenção.

Uma busca realizada no PubMed com o termo em inglês “*shear stress and tumor cell*” gera em torno de 768 trabalhos encontrados até o momento. Descontando os erros de viés da busca, que incluem inúmeros trabalhos relacionados exclusivamente às alterações funcionais e moleculares de células endoteliais frente ao *shear*, os trabalhos que demonstram uma relação direta entre célula tumoral e *shear stress* envolvem principalmente a investigação de células tumorais circulantes (influência do *shear* no rolamento e adesão da célula tumoral no

endotélio vascular, ou na formação e dissociação de agregados célula-célula ou célula-plaqueta na circulação) e a exposição das células tumorais ao fluxo intersticial do microambiente, como consequência das diferenças de pressões entre o centro e a borda do tumor. Interessantemente, a elucidação dos mecanismos de resposta das células tumorais frente ao *shear* tem crescido nos últimos 4 anos, com publicações importantes descrevendo inúmeras alterações fenotípicas e moleculares.

Na prática, entretanto, não há padrões uniformes para aplicar essa força fluidica *in vitro*, gerando baixa reprodutibilidade dos dados e consequente dificuldade de traduzir as informações para a área clínica (HUANG et al., 2018). O modelo cone-placa, apesar de ainda ser considerado o padrão ouro para aplicação de *shear* em células endoteliais, possui alguns problemas técnicos como a diferença das magnitudes de *shear* que as células estão expostas ao longo do eixo axial da placa. Ou seja, as células são submetidas a um valor de *shear* próximo a zero no centro da placa, até o valor máximo de *shear* na região da borda. Um estudo recente comparou algumas características das células endoteliais sob *shear* quando elas estavam aderidas somente na região da borda da placa em relação à placa totalmente recoberta. Eles constataram que não há diferença na morfologia celular, no alinhamento (que é uma característica adaptativa das células endoteliais sob fluxo laminar), ou na densidade celular, entretanto, há diferença na expressão das moléculas de adesão VCAM e ICAM-1, e também na adesão de monócitos às células endoteliais. Os autores concluem, portanto, que para evitar resultados enviesados sobre a relação entre o *shear* e as propriedades celulares, é necessária a utilização de métodos que segmentem (ou restrinjam) o crescimento das células na área da placa em que a magnitude do *shear* é máxima (GHIM et al., 2018).

Dessa forma, apesar dessas características terem sido investigadas em células endoteliais, acreditamos que o mesmo possa acontecer para as células tumorais. De fato, o modelo cone-placa não foi o que melhor gerou resultados para as células tumorais. Ao analisar o destacamento e a morte celular após *shear*, observamos que esse modelo aumenta tanto o número de células destacadas (Figura 1 e 2) como o número de células PI positivas (i.e., células mortas) (Figura 3) e a concentração de LDH no sobrenadante (Figura 4). Não existe um consenso na literatura, até hoje, sobre quais são os modelos mais robustos para reproduzir o *shear* em células tumorais. Poucos são os trabalhos que relatam algum tipo de padronização ou mencionam a viabilidade das células tumorais após esse estresse. Por isso, este trabalho agrega bastante informação nesse campo, e mostra a importância de padronizar o modelo de *shear* experimental a ser utilizado, já que atualmente vários sistemas estão disponíveis e são citados na literatura.

Em adição, esse trabalho tentou projetar ao máximo o cenário real da biologia vascular do melanoma. Para determinar os perfis do fluxo sanguíneo intratumoral *in situ*, utilizamos como referência um trabalho que utilizou a técnica de microscopia intravital para visualização dos vasos sanguíneos e quantificação do fluxo em 10 pacientes no momento da excisão cirúrgica do melanoma. Os autores demonstraram que a velocidade do fluxo sanguíneo não é alterada, entretanto, o diâmetro dos vasos tumorais é maior, gerando um *shear* baixo calculado em $1,7 \pm 0,1$ dinas/cm² (FISHER et al., 2016). Além disso, o melanoma é um dos tipos de tumores que apresentam mecanismos alternativos de aporte sanguíneo além da angiogênese, como a cooptação de vasos hospedeiros, presença de vasos mosaicos, vasculogênese e o mimetismo vasculogênico (HELFRICH; SCHADENDORF, 2011). Esses achados evidenciam que células de melanoma são expostas ao *shear* quando ainda aderidas à massa tumoral (excluindo dessa análise, por exemplo, as células tumorais circulantes) e, portanto, estão sujeitas a um *shear* laminar baixo decorrente da estrutura vascular do melanoma.

Em relação à perda da viabilidade celular após *shear*, outros três trabalhos também demonstraram algo semelhante, apesar de nenhum deles terem usado os modelos de aplicação de *shear* adotados nesse estudo. Por exemplo, Fan e colaboradores (2016) desenvolveram um modelo de microfluídica para testar as respostas celulares frente ao *shear*. Usando sempre o mesmo modelo, eles mediram a viabilidade de células circulantes de cólon de câncer quando expostas à diferentes tempos e magnitudes de *shear*. Assim como observado nesse estudo, eles também demonstraram uma diminuição na viabilidade celular em função do tempo de exposição em resposta a um *shear* equivalente a 3,5 dinas/cm² (FAN et al., 2016). Outros dois trabalhos também utilizando microfluídica testaram diferentes linhagens tumorais (entre elas células tumorais de pâncreas, mama, pulmão, ovário e melanoma) e mostraram que a viabilidade dessas células decai quanto maior a magnitude e o tempo de exposição ao *shear* (BARNES; NAUSEEF; HENRY, 2012; REGMI; FU; LUO, 2016). Utilizando o modelo de placas concêntricas, nós também observamos que, ao aumentar a magnitude dessa força, há perda da viabilidade celular mesmo em tempos não muito longos (Figura 6). Um resultado interessante apresentado no trabalho de Barnes e colaboradores (2012) foi a comparação da viabilidade entre células tumorais, células não transformadas, células epiteliais e células do sangue, quando expostas as mesmas magnitudes e tempo de *shear*. Os autores observaram que dentre todas essas linhagens, assim como esperado, as células do sangue são as mais resistentes à exposição ao *shear*, seguidas das células tumorais, que foram mais resistentes quando comparadas com as células não transformadas e células epiteliais.

Portanto, sabemos que as células tumorais estão sujeitas a perda de viabilidade dependente do tempo de exposição e da magnitude do *shear*. Apesar desse resultado já representar um mecanismo de resposta frente ao estresse mecânico, ele também nos ajudou a estabelecer os requisitos técnicos suficientes para analisar outros efeitos da resposta ao *shear*: (1) a alteração do estado fenotípico da célula tumoral que “sente” o *shear*, e (2) a resposta fisiológica que o secretoma dessas células pode desencadear em outras células. Portanto, ao estabelecer condições experimentais em que não há perda de viabilidade celular pelo *shear*, garantimos que os efeitos posteriores de resposta foram independentes desse viés. De fato, um dos dados mais interessantes observado nesse estudo é que as células tumorais são resistentes à morte em períodos curtos de exposição ao *shear* e, através de uma resposta aguda, elas induzem a secreção de importantes moléculas sinalizadoras, como a Angiopoietina-2, o PLGF e a IL-8 (Figura 8). Além disso, a secreção dessas moléculas não depende da expressão de galectina-3 e foi apenas correlacionada com o tempo de exposição ao *shear*, o que pode enriquecer ainda mais a concentração delas no meio extracelular.

A Angiopoietina-2 (Ang-2) é membro da família das angiopoietinas, que possuem importante papel na angiogênese. Angiopoietina-2 foi inicialmente identificada por agir como antagonista da Angiopoietina-1 (Ang-1) através da sinalização via Tie2 (receptor expresso majoritariamente pelas células endoteliais), que é relevante para a maturação e estabilização dos vasos sanguíneos. Enquanto Ang-1 promove a estabilização dos vasos por promover a quiescência das células endoteliais e atuar no recrutamento de pericitos e células da musculatura lisa, a Ang-2 desestabiliza essa via e favorece a angiogênese em conjunto com outras moléculas indutoras como o VEGF (THURSTON; DALY, 2012). Apesar de existirem diversas atuações da Ang-2, esse é o seu papel dominante na biologia dos tumores, pois funciona como sinalização compensatória para a angiogênese e explica, parcialmente, a falha na indução de respostas anti-tumorais mais duradouras quando se utilizam as terapias anti-VEGF. De fato, Ang-2 está superexpressa em vários tipos de tumores e sua forma solúvel aparece elevada no plasma de pacientes com câncer comparado a indivíduos saudáveis, coincidindo com estágios mais avançados e com o pior prognóstico da doença (COELHO et al., 2018; DALY et al., 2013; RIGAMONTI et al., 2014).

No melanoma, a Ang-2 está elevada no soro dos pacientes com tumor avançado em estágio III e IV, mas não nos que estão em estágios iniciais I e II. Esses níveis elevados nos estágios mais avançados também foram estatisticamente maiores quando comparados aos níveis de Ang-2 de indivíduos saudáveis. Além disso, os autores rastrearam os níveis de Ang-2 dos pacientes em estágio III ao longo do tempo e demonstraram que Ang-2 circulante

aumenta naqueles pacientes que progrediram do estágio III para IV. Esse trabalho mostrou ainda uma forte associação dos níveis elevados de Ang-2 com a redução da sobrevida global e, ainda, a análise de risco foi estatisticamente relevante em identificar o aumento dos níveis de Ang-2 como fator prognóstico para o melanoma (HELFRICH et al., 2009).

IL-8 é uma quimiocina pertencente à família CXCL, que inclui algumas das principais quimiocinas envolvidas nas respostas inflamatórias agudas, como a migração de neutrófilos. Os membros da família CXCL são produzidos tanto por células imunes (neutrófilos, macrófagos e células T), quanto por células epiteliais ou endoteliais em resposta ao dano celular e infecção. As células tumorais também secretam diversas quimiocinas, incluindo IL-8, proporcionando um microambiente pró tumorigênico que facilita a progressão e metástase. Vários estudos funcionais vêm mostrando que a IL-8 derivada das células tumorais induz de maneira parácrina a infiltração de leucócitos na massa tumoral, criando um microambiente imunossupressor e pró-inflamatório. De maneira autócrina, a IL-8 derivada das células tumorais facilita a ativação de vias oncogênicas e pró-metastáticas, como indução da migração, invasão e resistência à quimioterapia (ALFARO et al., 2017).

A expressão de IL-8 também está aumentada em diferentes tipos de tumores, dentre eles o melanoma (WESTPHAL et al., 2000). Sanmamed e colaboradores (2014) mostraram que a concentração de IL-8 solúvel está aumentada tanto no sobrenadante de diferentes tipos celulares, quanto no soro de camundongos com tumores xenotransplantados e também no soro de pacientes com diferentes tipos de tumor, incluindo melanoma. Além disso, eles apresentaram informações importantes ao observar que a concentração de IL-8 no soro dos camundongos decai quando os tumores eram retirados cirurgicamente, da mesma forma que a concentração de IL-8 no soro dos pacientes se correlaciona com o tamanho da massa tumoral (SANMAMED et al., 2014). Junto a esse trabalho, outros dois estudos compararam a concentração de IL-8 no soro entre pacientes com melanoma e indivíduos saudáveis, e todos encontraram uma correlação positiva sobre a presença dessa molécula nos pacientes oncológicos (ENE et al., 2015; ENE NICOLAE; NICOLAE, 2016).

Nas ultimas décadas, o PLGF, ou fator de crescimento placentário, foi descoberto como um fator angiogênico isolado da placenta e caracterizado como membro da família VEGF. Como tal, PLGF possui afinidade apenas para o receptor VEGFR-2 (também denominado Flk1), encontrado na membrana celular e na forma solúvel extracelular. Como função principal, o PLGF promove a proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais e pericitos, e atua também no recrutamento de macrófagos e células progenitoras mielóides, contribuindo para o brotamento de novos vasos sanguíneos e linfáticos. A placenta

é o tecido onde se encontra a maior expressão do PLGF, mas níveis menores de expressão também foram detectados nas células endoteliais e em eritroblastos derivados da medula óssea. Entretanto, a superexpressão patológica desse gene já vem sendo descrita em diversos tecidos como a tireoide, coração, pulmão, músculo esquelético, além de tumores (DEWERCHIN; CARMELIET, 2012; NEWELL; HOLTAN, 2017).

Vários estudos observaram que a expressão de PLGF está aumentada em câncer gástrico e colón-retal, mama, e câncer de pulmão de células não pequenas. Os níveis elevados dessa molécula também já foram correlacionados com o estágio do tumor, presença de metástases e recorrência, e, em contrapartida, com a diminuição da sobrevivência em diversos tipos de tumores (BAGLEY et al., 2011; FISCHER et al., 2008). Em melanoma, um estudo em modelos animais relatou que a superexpressão de PLGF acelera o crescimento tumoral *in vivo*, gerando tumores de maior volume em relação aos controles, além de aumentar o número de focos metastáticos no pulmão (MARCELLINI et al., 2006). Entretanto, poucos estudos em melanoma até o momento correlacionam a expressão de PLGF com a progressão ou prognóstico da doença. Um estudo de fase II englobou pacientes com melanoma tratados com um inibidor de VEGFR para avaliar a resposta anti-tumoral. Quando os autores analisaram amostras coletadas antes e depois da intervenção, eles observaram que os pacientes com altos níveis de VEGFR1 e PLGF foram os que apresentaram pior sobrevida quando comparados aos pacientes com baixos níveis dessas moléculas (DECOSTER et al., 2015). Entretanto, esse estudo foi conduzido com apenas 39 pacientes e representa uma amostra específica de pacientes com melanoma avançado e refratário ao tratamento prévio com quimioterapia.

Dessa forma, vários estudos documentaram os altos níveis de Ang-2, IL-8 e PLGF no sangue de pacientes com melanoma. Independente se esse fenômeno está ou não envolvido com a progressão ou prognóstico da doença, esses trabalhos confirmam que as células tumorais, além de outras células do microambiente tumoral, contribuem para a produção e secreção dessas moléculas. Por isso, nossos resultados agregam um nível a mais na fisiopatologia do melanoma, que é a indução da secreção dessas moléculas sinalizadoras pelas células tumorais através de um estímulo mecânico: o *shear stress*.

Interessantemente, o único trabalho que relaciona o *shear* laminar e a expressão de Ang-2 em células tumorais foi feito por Buchanan e colaboradores (2014). Eles quantificaram a expressão gênica de alguns fatores angiogênicos (MMP9, HIF1 α , VEGFA, ANG-1 e ANG-2) em células tumorais de mama após 6h de exposição a três diferentes magnitudes de *shear*. Em baixo *shear* (1 dina/cm²), o único fator com expressão aumentada foi Ang-2, mas nas magnitudes maiores de 4 e 10 dinas, há uma tendência na redução da expressão

(BUCHANAN et al., 2014). De fato, a expressão de Ang-2 nas células endoteliais pode ser induzida em resposta ao *shear* e estímulos inflamatórios ou angiogênicos como a hipóxia e secreção de TNF e VEGF. Um possível mecanismo é através do fator de transcrição KLF2 (*Kruppel-like fator 2*), que é responsável pela regulação da expressão de Ang-2 e conhecidamente regulado pelo *shear* (AUGUSTIN et al., 2009; THURSTON; DALY, 2012; VAN AGTMAAL et al., 2012). Portanto, apesar de sabermos que a expressão de Ang-2 aparece aumentada em diversos tipos tumorais, o mecanismo que regula a expressão e secreção dessa molécula nas células tumorais ainda está pouco caracterizado.

Assim como a Ang-2, o PLGF também é comumente induzido nas células endoteliais através de mecanismos em resposta a hipóxia, e a secreção de outros fatores de crescimento como TGF e VEGF (DEWERCHIN; CARMELIET, 2012). Em relação ao *shear*, um trabalho mostrou que o *shear* laminar baixo (1 dina/cm^2) induz a expressão e a secreção de PLGF em células primárias do sinciciotrofoblasto (tecido formado durante a gestação), através da indução da via de cAMP-PKA (LECARPENTIER et al., 2016). Outros estudos relacionam o aumento da expressão de PLGF em células endoteliais apenas em *shear* laminar alto, através da sinalização por espécies reativas de oxigênio, que têm a produção aumentada sob essas condições (RASHDAN; LLOYD, 2015; SHAW et al., 2011). Nas células tumorais, faltam descrições dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão de PLGF. Alguns trabalhos sugerem a atuação de oncogenes, entretanto não há demonstração de quais seriam os genes candidatos responsáveis por tal evento. Em um trabalho de 2003, os autores mostraram que a expressão de PLGF é aumentada nas linhagens celulares que superexpressam o oncogene H-ras (LARCHER et al., 2003).

Como falado anteriormente, a IL-8 é expressa e secretada por vários tipos celulares, entre eles as células endoteliais em resposta a estímulos pró-inflamatórios (por ação de citocinas e espécies reativas de oxigênio) e infecções virais ou bacterianas. Sendo uma quimiocina liberada após estímulo estressor, a expressão de IL-8 também está regulada pelo *shear*. Quando várias magnitudes de *shear* são comparadas, o *shear* laminar baixo foi o que mais induziu a transcrição de vários genes pró-inflamatórios, entre eles a IL-8. Inclusive, um possível mecanismo descrito na regulação da expressão é através da via de MAP quinases, pois células endoteliais expostas ao *shear* tiveram ativação e translocação para o núcleo de ERK1/2, p38 e JNK1/2 fosforilados (CHENG et al., 2008; ISHIBAZAWA et al., 2013). Outros autores compararam dois tipos de *shear*, o laminar e o turbulento, e observaram que a secreção de IL-8 acontece nos dois momentos, sendo maior no *shear* turbulento (URSCHEL et al., 2012).

Os trabalhos citados acima juntamente com os resultados encontrados nesse projeto conduzem a ideia de que o *shear* é um dos mecanismos que regulam a expressão de moléculas pró-angiogênicas e pró-inflamatórias como Ang-2, PLGF e IL-8. Como esse fenômeno foi observado nas células tumorais, a resposta ao *shear* laminar parece ser um evento conservado entre diferentes tipos celulares. Ou seja, mesmo as células tumorais não sendo programadas para atuar em resposta às forças fluidicas, elas possuem funções fisiológicas semelhantes às células endoteliais quando se encontram nesse contexto.

O próximo passo foi focar nos efeitos do *shear* na proliferação e capacidade clonogênica das células tumorais, e se isso ocorre a partir da resposta intrínseca da célula que “sente” o *shear* ou pela sinalização parácrina através das moléculas secretadas. Primeiramente analisamos os efeitos da capacidade proliferativa em curto prazo, ou seja, nas primeiras horas após a exposição ao *shear*. Nesse cenário, observamos uma diminuição significativa no número de células 72h depois de serem submetidas ao *shear* (Figura 9). Esse efeito parece ser mediado somente por mecanotransdução, uma vez que não observamos diferença na proliferação das células após incubação com meio condicionado enriquecido em Ang-2, PLGF e IL-8 derivado de células previamente expostas ao *shear*.

Além disso, a redução da capacidade proliferativa pelo *shear* se mostrou dependente da presença de galectina-3. Galectina-3 é comumente associada a estratégias adaptativas em situações de estresse no microambiente tumoral (CARDOSO et al., 2016). Em vários modelos ela já foi descrita por ativar a via de MAP quinases, culminado no aumento da proliferação e sobrevivência celular. Galectina-3 também auxilia a ativação da via K-Ras/MEK em células tumorais de mama, o que está associado à aquisição de um fenótipo mais agressivo. Contudo, observamos uma diminuição da proliferação após *shear* nas células que expressam galectina-3, sem alterar a taxa de morte das mesmas (Figura 11). Uma possível explicação para esse resultado é a regulação inversamente proporcional entre a proliferação e diferenciação celular, ou seja, a diminuição da proliferação pode ser resultado de uma indução de diferenciação celular (RUIJTENBERG; VAN DEN HEUVEL, 2016). Dessa forma, a diminuição da proliferação das células WM SCR pode estar relacionada à aquisição de um fenótipo mais diferenciado, como por exemplo, a transição para um fenótipo endotelial. Esse resultado explicaria a transição fenotípica necessária para o mimetismo vasculogênico observado nos melanomas. Essa hipótese precisa ser avaliada por outros ensaios funcionais e de expressão gênica.

Em adição, visto que o *shear* leva a uma diminuição no número de células que expressam galectina-3, avaliamos a capacidade de sobrevivência e proliferação das células

após o *shear* a longo prazo. Curiosamente, a alteração na taxa de proliferação em curto prazo das células que sentem o *shear* não refletiu qualquer diferença na capacidade de formar clones após 8 dias de cultivo (Figura 12). Ou seja, a sobrevivência e capacidade clonogênica de células de melanoma frente ao *shear* parece ser independente da expressão de galectina-3. Dessa maneira, células de melanoma que expressam galectina-3 exibem um padrão de resposta bifásica ao estresse causado pelo *shear*, levando, a longo prazo, a sobrevivência e proliferação celular. Por outro lado, interessante observamos que o meio condicionado de células previamente expostas ao *shear* confere uma vantagem adaptativa a células *naive*. Diante desse contexto, o meio condicionado de células submetidas ao *shear* aumentou significativamente a capacidade clonogênica de células *naive* independentemente do *status* de galectina-3, corroborando os achados anteriores de que essa lectina exerça um papel apenas na resposta direta ao *shear* (i.e., na mecanotransdução).

Vale ressaltar que o efeito observado na capacidade clonogênica das células pode ser consequência de outras moléculas abundantes no meio extracelular, que não apenas Ang-2, PLGF ou IL-8. Para isso, o ideal seria realizar a análise do secretoma das células tumorais após exposição ao *shear*. Além disso, na técnica de multiplex são detectadas apenas as proteínas solúveis presentes no meio condicionado, excluindo, por exemplo, o efeito proveniente da sinalização por microvesículas. Em relação às moléculas citadas aqui, destaco alguns trabalhos que ajudam a elucidar quais mecanismos podem estar envolvidos na sinalização parácrina em função do *shear*. Células de melanoma, além de secretar Ang-2, também expressam o receptor Tie2, caracterizando uma resposta autócrina capaz de induzir a migração e invasão celular (HELFRICH et al., 2009). A secreção do PLGF é maior nas células de melanoma com fenótipo invasivo, e ele atua como agente quimioatrativo, além de induzir a transição epitélio-mesenquimal, a migração, invasão e aquisição de fenótipo do tipo tronco pelas células tumorais (LI et al., 2018; PAGANI et al., 2016). Um dos mecanismos de resistência da terapia antiangiogênica é a neovascularização por mimetismo vasculogênico através da superexpressão do eixo CXCR2-(IL-8), e também, a inibição dessa via mostrou ser eficaz em diminuir a proliferação, migração, invasão e formação de colônias pelas células tumorais (ANGARA et al., 2018; FU et al., 2018; WANG et al., 2018b).

O próximo passo desse projeto foi avaliar o potencial da sinalização parácrina entre células tumorais e células endoteliais em induzir o remodelamento vascular. O remodelamento vascular é um processo altamente complexo que envolve a ativação de múltiplas vias de sinalização envolvidas na regulação da proliferação, apoptose, migração, adesão, e da síntese e quebra de componentes da matriz extracelular. Essa mudança estrutural

dos vasos sanguíneos ocorre em resposta a alterações fisiológicas (como mudança na hemodinâmica), ou patofisiológicas (como inflamação, estresse oxidativo ou dano na parede dos vasos) (MELO et al., 2007).

Primeiramente, nós não observamos alteração na proliferação das células endoteliais expostas ao meio condicionado das células WM SCR e WM shGal-3 (Figura 13). Entretanto, o meio condicionado derivado do *shear* altera a dinâmica de formação de túbulos das células endoteliais. Como observado nas Figuras 14 e 15, o *shear* parece acelerar a movimentação e reorganização das células endoteliais, que são visíveis logo após 2h nessa condição, mas não no controle estático. Nos tempos mais longos dessa dinâmica, onde se inicia a dissociação dos túbulos, parece que o rompimento entre as células endoteliais é mais evidente na condição de *shear*, principalmente no meio condicionado das células WM shGal-3. Ou seja, as células iniciam mais rapidamente a montagem das estruturas tubulares assim como se desestabilizam mais facilmente ao final do processo.

A montagem dessas estruturas tubulares implica que pelo menos dois aspectos funcionais das células endoteliais estejam ocorrendo: a migração e o remodelamento do citoesqueleto. Nesse sentido, a perda da homeostase das adesões celulares e da organização do citoesqueleto é essencial para a aquisição de um fenótipo mais migratório. De fato, quando analisamos a marcação de F-actina nas células endoteliais, observamos que o *shear* contribui para a desorganização das fibras, com presença de agregados de F-actina e perda da polarização cortical (Figura 16). A desestabilização do citoesqueleto pode justificar a rápida organização das células endoteliais em estruturas tubulares.

Estímulos angiogênicos tais como bFGF e VEGF são conhecidos por ativarem a via de sinalização Akt, um dos mediadores mais investigados na resposta a sobrevivência, e a via ERK 1/2, membro das MAP quinases, que são envolvidos principalmente na sinalização da proliferação, migração e diferenciação (CHIU et al., 2013; MUNOZ-CHAPULI; QUESADA; ANGEL MEDINA, 2004). Apesar do *shear* atuar na formação de túbulos e desorganização do citoesqueleto, o que sugere a aquisição de características migratórias pelas células endoteliais, o mecanismo molecular por trás dessa resposta não é dependente da fosforilação e ativação das vias Akt e ERK. Ao contrário, não houve alteração na fosforilação de Akt em até 2h (Figura 17) e, curiosamente, as análises qualitativas de *western blotting* indicam para uma diminuição da fosforilação de ERK 1/2 (Figura 18).

Na literatura, outros dois trabalhos mostraram que o meio condicionado derivado de células de melanoma desencadeia efeitos funcionais nas células endoteliais. Em um deles, o meio condicionado derivado de duas linhagens de melanoma aumentou a migração e a

proliferação de células endoteliais em até 24h (ANFUSO et al., 2009). Outro trabalho mostrou que o meio condicionado de melanomas, mas não de células tumorais de mama e pâncreas, é necessário para garantir a sobrevivência de células endoteliais em hipóxia (DAS et al., 2016). Além disso, os dois trabalhos verificaram que essas funções nas células endoteliais são dependentes da ativação de Akt e ERK1/2. Interessantemente, Das e colaboradores (2016) fracionaram o meio condicionado por peso molecular e observaram que o efeito de sobrevivência ocorria somente nas frações < 1kDa, o que exclui a maioria dos fatores angiogênicos conhecidos. Nossos resultados mostram o enriquecimento de três importantes fatores pró-angiogênicos no meio condicionado e, portanto, as respostas funcionais das células endoteliais provavelmente variam de acordo com a disponibilidade, quantidade e o tipo de moléculas que compõem o meio condicionado.

Ang-2, por exemplo, é classicamente abordada como um fator pró-angiogênico, mas também está correlacionada com a regressão vascular em vários modelos biológicos. Isso porque o papel dominante de Ang-2 é inibir a sinalização Tie2, que desestabiliza os vasos sanguíneos já formados. A desestabilização dos vasos é pré-requisito para o início da cascata angiogênica na presença de outros estímulos, como VEGF, ou para a regressão vascular quando tais estímulos estão ausentes (GERALD et al., 2013). Da mesma forma, a atividade biológica de PLGF pode ser divergente, com atuação pró-angiogênica ou simplesmente ineficiente em estimular o crescimento e migração de células endoteliais. Isso porque as células endoteliais são descritas por produzir altas quantidades de PLGF em cultura, que provavelmente satura os receptores VEGFR1 e os deixa incapazes de responder ao estímulo exógeno de PLGF. PLGF também foi descrito por inibir a angiogênese quando, em níveis supra fisiológicos, forma heterodímeros com VEGF e interfere nessa via de sinalização (CARMELIET et al., 2001; DEWERCHIN; CARMELIET, 2012).

Sobre o efeito do meio condicionado na reorganização do citoesqueleto e dinâmica conformacional das células endoteliais, pode-se estabelecer uma relação entre a via de sinalização de Ang-1/Ang-2-Tie2 e a permeabilidade vascular. A ativação da via Ang-1/Tie2 é fundamental para a manutenção da barreira vascular por fortalecer as junções celulares das células endoteliais, que podem ser reguladas por membros da sinalização de cálcio, Akt, p21, ERK1/2 e Rho (LI et al., 2008). Quando há um aumento na razão Ang-2/Ang-1, Ang-2 atua como antagonista, reduzindo a fosforilação de Tie2 e inibindo a via de sinalização *downstream*, o que leva, dentre outras funções, ao aumento da permeabilidade vascular. Ang-2 já foi descrita por atuar na desestabilização vascular e consequente perda da função de

barreira endotelial através da interação com a integrina $\beta 1$, independente da sinalização via Tie2 (HAKANPAA et al., 2015; HARFOUCHE; HUSSAIN, 2006).

Portanto, entre os diferentes processos necessários para o remodelamento vascular, a sinalização parácrina das células de melanoma expostas ao *shear* parece não influenciar a proliferação das células endoteliais, mas, com a reorganização do citoesqueleto e das estruturas tubulares, pode influenciar na função de permeabilidade vascular.

6. CONCLUSÕES

Como conclusões desse trabalho, podemos mencionar que:

1) o modelo de placas concêntricas para aplicação de estudos funcionais do *shear stress* nas células de melanoma gera resultados mais robustos que garantem a integridade celular e a confiabilidade dos dados. Além disso, o tempo de exposição, a magnitude da força utilizada e a linhagem celular são fatores que devem ser levados em consideração na padronização dos experimentos.

2) o *shear* laminar baixo induz a secreção de moléculas pró-angiogênicas e pró-inflamatórias como Ang-2, PLGF e IL-8 independente da presença de galectina-3.

3) o *shear* laminar baixo diminui a proliferação a curto prazo de células de melanoma que expressam galectina-3.

4) o secretoma de células de melanoma em resposta ao *shear* laminar baixo, independente da expressão de galectina-3, promove a sobrevivência e a proliferação a longo prazo de células de melanoma que não foram previamente expostas a esse estresse mecânico.

5) o secretoma de células de melanoma em resposta ao *shear* laminar baixo, independente da expressão de galectina-3, favorece a formação de túbulos e a reorganização do citoesqueleto de células endoteliais.

7. BIBLIOGRAFIA

- AKAHANI, S. et al. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer research**, v. 57, n. 23, p. 5272–6, 1 dez. 1997.
- ALFARO, C. et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. **Cancer Treatment Reviews**, v. 60, p. 24–31, nov. 2017.
- ANFUSO, C. D. et al. PKC α -MAPK/ERK-phospholipase A2 signaling is required for human melanoma-enhanced brain endothelial cell proliferation and motility. **Microvascular Research**, v. 78, n. 3, p. 338–357, dez. 2009.
- ANGARA, K. et al. CXCR2-Expressing Tumor Cells Drive Vascular Mimicry in Antiangiogenic Therapy-Resistant Glioblastoma. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 20, n. 10, p. 1070–1082, 2018.
- AUGUSTIN, H. G. et al. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin–Tie system. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 165–177, 1 mar. 2009.
- BAGLEY, R. G. et al. Placental growth factor upregulation is a host response to antiangiogenic therapy. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 17, n. 5, p. 976–88, 1 mar. 2011.
- BAPTISTE, T. A. et al. Mechano-transduction mediated secretion and uptake of galectin-3 in breast carcinoma cells: implications in the extracellular functions of the lectin. **Experimental cell research**, v. 313, n. 4, p. 652–64, 15 fev. 2007.
- BARNES, J. M.; NAUSEEF, J. T.; HENRY, M. D. Resistance to fluid shear stress is a conserved biophysical property of malignant cells. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e50973, 2012.
- BARTOLAZZI, A.; SCIACCHITANO, S.; D’ALESSANDRIA, C. Galectin-3: The Impact on the Clinical Management of Patients with Thyroid Nodules and Future Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 445, 2 fev. 2018.
- BENNETT, D. C. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 1, p. 27–38, fev. 2008a.
- BENNETT, D. C. Ultraviolet wavebands and melanoma initiation. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 5, p. 520–4, out. 2008b.
- BHATIA, S.; THOMPSON, J. A. Systemic therapy for metastatic melanoma in 2012: dawn of a new era. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN**, v. 10, n. 3, p. 403–12, mar. 2012.
- BOSCHER, C.; DENNIS, J. W.; NABI, I. R. Glycosylation, galectins and cellular signaling. **Current opinion in cell biology**, v. 23, n. 4, p. 383–92, ago. 2011.
- BROWN, E. R. et al. Association of galectin-3 expression with melanoma progression and prognosis. **European Journal of Cancer**, v. 48, p. 865–874, 2012.
- BUCHANAN, C. F. et al. Flow shear stress regulates endothelial barrier function and expression of angiogenic factors in a 3D microfluidic tumor vascular model. **Cell adhesion & migration**, v. 8, n. 5, p. 517–24, 2014.
- CARDOSO, A. C. F. et al. Galectin-3 Determines Tumor Cell Adaptive Strategies in Stressed Tumor Microenvironments. **Frontiers in oncology**, v. 6, p. 127, 2016.

CARMELIET, P. et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. **Nature Medicine**, v. 7, n. 5, p. 575–583, 1 maio 2001.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249–257, 14 set. 2000.

CHANG, Y. S. et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14608–13, 19 dez. 2000.

CHATTERJEE, S. Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 524, 2018.

CHATTERJEE, S.; FISHER, A. B. Mechanotransduction in the endothelium: role of membrane proteins and reactive oxygen species in sensing, transduction, and transmission of the signal with altered blood flow. **Antioxidants & redox signaling**, v. 20, n. 6, p. 899–913, 20 fev. 2014.

CHENG, M. et al. Activation of MAPK participates in low shear stress-induced IL-8 gene expression in endothelial cells. **Clinical Biomechanics**, v. 23, p. S96–S103, jan. 2008.

CHIN, L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 8, p. 559–70, 1 ago. 2003.

CHIU, W.-C. et al. β 2-Glycoprotein I inhibits VEGF-induced endothelial cell growth and migration via suppressing phosphorylation of VEGFR2, ERK1/2, and Akt. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 372, n. 1–2, p. 9–15, 6 jan. 2013.

CIVELEK, M. et al. Smooth muscle cells contract in response to fluid flow via a Ca^{2+} -independent signaling mechanism. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 93, n. 6, p. 1907–17, dez. 2002.

COELHO, A. L. et al. CSF-1 and Ang-2 serum levels — prognostic and diagnostic partners in non-small cell lung cancer. **ESMO Open**, v. 3, n. 5, p. e000349, 25 jul. 2018.

DAGHER, S. F.; WANG, J. L.; PATTERSON, R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 4, p. 1213–7, 14 fev. 1995.

DALY, C. et al. Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. **Cancer research**, v. 73, n. 1, p. 108–18, 1 jan. 2013.

DAS, A. M. et al. Melanomas prevent endothelial cell death under restrictive culture conditions by signaling through AKT and p38 MAPK/ ERK-1/2 cascades. **OncoImmunology**, v. 5, n. 10, p. e1219826, 2 out. 2016.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, 9 jun. 2002.

DECOSTER, L. et al. Biomarker Analysis in a Phase II Study of Sunitinib in Patients with Advanced Melanoma. **Anticancer research**, v. 35, n. 12, p. 6893–9, 1 dez. 2015.

DELA PAZ, N. G. et al. Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 4, p. 831–843, 15 fev. 2012.

DEWERCHIN, M.; CARMELIET, P. PlGF: a multitasking cytokine with disease-restricted activity. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 8, 1 ago. 2012.

- DI TOMASO, E. et al. Mosaic tumor vessels: cellular basis and ultrastructure of focal regions lacking endothelial cell markers. **Cancer research**, v. 65, n. 13, p. 5740–9, 1 jul. 2005.
- DÖME, B. et al. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 1, p. 1–15, jan. 2007.
- EGGERMONT, A. M.; SPATZ, A.; ROBERT, C. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 383, n. 9919, p. 816–827, 1 mar. 2014.
- ENE, C.-D. et al. 25-OH Vitamin D and Interleukin-8: Emerging Biomarkers in Cutaneous Melanoma Development and Progression. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 904876, 2015.
- ENE NICOLAE, C. D.; NICOLAE, I. Interleukin 8 *serum* concentration, but not lactate dehydrogenase activity, positively correlates to CD34 antigen in melanoma tumors. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**, v. 37, n. 5, p. 463–471, 2 set. 2016.
- FAN, R. et al. Circulatory shear flow alters the viability and proliferation of circulating colon cancer cells. **Scientific reports**, v. 6, p. 27073, 2016.
- FISCHER, C. et al. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 942–956, 1 dez. 2008.
- FISHER, D. T. et al. Intraoperative intravital microscopy permits the study of human tumour vessels. **Nature communications**, v. 7, p. 10684, 17 fev. 2016.
- FU, S. et al. Inhibition of interleukin 8/C-X-C chemokine receptor $\zeta^{1/21}/2$ signaling reduces malignant features in human pancreatic cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 1, p. 349–357, 30 abr. 2018.
- FUNASAKA, T.; RAZ, A.; NANGIA-MAKKER, P. Nuclear transport of galectin-3 and its therapeutic implications. **Seminars in Cancer Biology**, v. 27, p. 30–38, ago. 2014.
- GERALD, D. et al. Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. **Cancer research**, v. 73, n. 6, p. 1649–57, 15 mar. 2013.
- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236–47, maio 2011.
- GHIM, M. et al. A novel method for segmenting growth of cells in sheared endothelial culture reveals the secretion of an anti-inflammatory mediator. **Journal of biological engineering**, v. 12, p. 15, 2018.
- GIMBRONE, M. A. et al. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 902, p. 230–9; discussion 239–40, maio 2000.
- GLINSKY, V. V et al. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. **Cancer research**, v. 63, n. 13, p. 3805–11, 1 jul. 2003.
- HAKANPAA, L. et al. Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin $\beta 1$ activation. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 5962, 30 dez. 2015.
- HARFOUCHE, R.; HUSSAIN, S. N. A. Signaling and regulation of endothelial cell survival by angiopoietin-2. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 4, p. H1635–H1645, out. 2006.
- HAUDEK, K. C.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. SR proteins and galectins: what's in a name? **Glycobiology**, v. 20, n. 10, p. 1199–207, 1 out. 2010.
- HELFRICH, I. et al. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association**

for **Cancer Research**, v. 15, n. 4, p. 1384–92, 15 fev. 2009.

HELFRICH, I.; SCHADENDORF, D. Blood vessel maturation, vascular phenotype and angiogenic potential in malignant melanoma: one step forward for overcoming anti-angiogenic drug resistance? **Molecular oncology**, v. 5, n. 2, p. 137–49, abr. 2011.

HENDRIX, M. J. C. et al. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 411–21, jun. 2003.

HENDRIX, M. J. C. et al. Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 159, p. 83–92, mar. 2016.

HOEFER, I. E.; DEN ADEL, B.; DAEMEN, M. J. A. P. Biomechanical factors as triggers of vascular growth. **Cardiovascular Research**, v. 99, n. 2, p. 276–283, 15 jul. 2013.

HOEK, K. S.; GODING, C. R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. **Pigment cell & melanoma research**, v. 23, n. 6, p. 746–59, dez. 2010.

HUANG, Q. et al. Fluid shear stress and tumor metastasis. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 5, p. 763–777, 2018.

ILMER, M. et al. Low expression of galectin-3 is associated with poor survival in node-positive breast cancers and mesenchymal phenotype in breast cancer stem cells. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 97, 29 dez. 2016.

ISHIBAZAWA, A. et al. Low shear stress up-regulation of proinflammatory gene expression in human retinal microvascular endothelial cells. **Experimental Eye Research**, v. 116, p. 308–311, nov. 2013.

JO, H. et al. Endothelial albumin permeability is shear dependent, time dependent, and reversible. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 6 Pt 2, p. H1992–6, jun. 1991.

JOUR, G.; IVAN, D.; AUNG, P. P. Angiogenesis in melanoma: an update with a focus on current targeted therapies. **Journal of clinical pathology**, v. 69, n. 6, p. 472–83, jun. 2016.

KIM, H. R. et al. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. **Cancer research**, v. 59, n. 16, p. 4148–54, 15 ago. 1999.

LARCHER, F. et al. Modulation of the angiogenesis response through Ha-ras control, placenta growth factor, and angiopoietin expression in mouse skin carcinogenesis. **Molecular Carcinogenesis**, v. 37, n. 2, p. 83–90, jun. 2003.

LECARPENTIER, E. et al. Fluid Shear Stress Promotes Placental Growth Factor Upregulation in Human Syncytiotrophoblast Through the cAMP–PKA Signaling Pathway. **Hypertension**, v. 68, n. 6, p. 1438–1446, dez. 2016.

LI, H. et al. The PLGF/c-MYC/miR-19a axis promotes metastasis and stemness in gallbladder cancer. **Cancer science**, v. 109, n. 5, p. 1532–1544, maio 2018.

LI, X. et al. Basal and angiopoietin-1-mediated endothelial permeability is regulated by sphingosine kinase-1. **Blood**, v. 111, n. 7, p. 3489–97, 1 abr. 2008.

LI, Y.-S. J.; HAGA, J. H.; CHIEN, S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. **Journal of Biomechanics**, v. 38, n. 10, p. 1949–1971, out. 2005.

LIN, H.-M. et al. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene**, v. 21, n. 52, p. 8001–10, 14 nov. 2002.

LIU, F.-T.; PATTERSON, R. J.; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et**

biophysica acta, v. 1572, n. 2–3, p. 263–73, 19 set. 2002.

LIU, F.-T.; RABINOVICH, G. A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 1, p. 29–41, 1 jan. 2005.

LIU, S. et al. Fluid shear stress induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in Hep-2 cells. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 32876–92, 31 maio 2016.

LIU, Y. et al. Galectin-3 and β -catenin are associated with a poor prognosis in serous epithelial ovarian cancer. **Cancer Management and Research**, v. Volume 10, p. 3963–3971, set. 2018.

LUCITTI, J. L. et al. Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 18, p. 3317–26, 8 set. 2007.

MACHADO, C. M. L. et al. Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGF β 1-induced macrophages. **Cancer medicine**, v. 3, n. 2, p. 201–14, abr. 2014.

MANIOTIS, A. J. et al. Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 3, p. 739–752, set. 1999.

MARCELLINI, M. et al. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. **The American journal of pathology**, v. 169, n. 2, p. 643–54, ago. 2006.

MARKOWSKA, A. I.; JEFFERIES, K. C.; PANJWANI, N. Galectin-3 Protein Modulates Cell Surface Expression and Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Human Endothelial Cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 29913–29921, 26 ago. 2011.

MARKOWSKA, A. I.; LIU, F.-T.; PANJWANI, N. Galectin-3 is an important mediator of VEGF- and bFGF-mediated angiogenic response. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 9, p. 1981–93, 30 ago. 2010.

MELO, L. G. et al. Vascular Remodeling in Health and Disease. In: **Cardiovascular Medicine**. London: Springer London, 2007. p. 1541–1565.

MOAZZAM, F. et al. The leukocyte response to fluid stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5338–43, 13 maio 1997.

MOURAD-ZEIDAN, A. A. et al. Expression Profiling of Galectin-3-Depleted Melanoma Cells Reveals its Major Role in Melanoma Cell Plasticity and Vasculogenic Mimicry. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 6, p. 1839–1852, dez. 2008.

MUÑOZ-CHAPULI, R.; QUESADA, A. R.; ANGEL MEDINA, M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 17, p. 2224–43, ago. 2004.

NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 Induces Endothelial Cell Morphogenesis and Angiogenesis. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 3, p. 899–909, mar. 2000.

NEWELL, L. F.; HOLTAN, S. G. Placental growth factor: What hematologists need to know. **Blood reviews**, v. 31, n. 1, p. 57–62, jan. 2017.

NORTHCOTT, J. M. et al. Feeling Stress: The Mechanics of Cancer Progression and Aggression. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 17, 2018.

PAGANI, E. et al. Placenta growth factor and neuropilin-1 collaborate in promoting melanoma aggressiveness. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 4, p. 1581–1589, 1 abr. 2016.

PARK, J. W. et al. Association of galectin-1 and galectin-3 with Gemin4 in complexes containing the

SMN protein. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 17, p. 3595–602, 1 set. 2001.

PASTUSHENKO, I. et al. Mechanisms of tumour vascularization in cutaneous malignant melanoma: clinical implications. **British Journal of Dermatology**, v. 171, n. 2, p. 220–233, ago. 2014.

PRIETO, V. G. et al. Galectin-3 Expression Is Associated with Tumor Progression and Pattern of Sun Exposure in Melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 22, p. 6709–6715, 15 nov. 2006.

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. Turning “sweet” on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 5, p. 338–52, 1 maio 2009.

RADOSAVLJEVIC, G. et al. The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. **Immunologic Research**, v. 52, n. 1–2, p. 100–110, 15 abr. 2012.

RASHDAN, N. A.; LLOYD, P. G. Fluid shear stress upregulates placental growth factor in the vessel wall via NADPH oxidase 4. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 10, p. H1655–H1666, 15 nov. 2015.

REGMI, S.; FU, A.; LUO, K. Q. High Shear Stresses under Exercise Condition Destroy Circulating Tumor Cells in a Microfluidic System OPEN. **Nature Publishing Group**, 2016.

REZVAN, A. et al. Animal, in vitro, and ex vivo models of flow-dependent atherosclerosis: role of oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 5, p. 1433–48, 1 set. 2011.

RIGAMONTI, N. et al. Role of angiopoietin-2 in adaptive tumor resistance to VEGF signaling blockade. **Cell reports**, v. 8, n. 3, p. 696–706, 7 ago. 2014.

RUIJTENBERG, S.; VAN DEN HEUVEL, S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 15, n. 2, p. 196–212, 2016.

SANMAMED, M. F. et al. Serum interleukin-8 reflects tumor burden and treatment response across malignancies of multiple tissue origins. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 22, p. 5697–707, 15 nov. 2014.

SHAW, J. H. et al. Placenta growth factor expression is regulated by hydrogen peroxide in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 300, n. 2, p. C349–C355, fev. 2011.

SHIMURA, T. et al. Galectin-3, a Novel Binding Partner of β -Catenin. **Cancer Research**, v. 64, n. 18, p. 6363–6367, 15 set. 2004.

THURSTON, G.; DALY, C. The complex role of angiopoietin-2 in the angiopoietin-tie signaling pathway. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 9, p. a006550, 1 set. 2012.

TRAUB, O.; BERK, B. C. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 18, n. 5, p. 677–85, maio 1998.

URSHEL, K. et al. Shear stress patterns affect the secreted chemokine profile in endothelial cells. **Clinical hemorheology and microcirculation**, v. 50, n. 1–2, p. 143–52, 2012.

VAN AGTMAAL, E. L. et al. The shear stress-induced transcription factor KLF2 affects dynamics and angiopoietin-2 content of Weibel-Palade bodies. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38399, 2012.

WANG, L.; GUO, X.-L. Molecular regulation of galectin-3 expression and therapeutic implication in cancer progression. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p. 165–171, mar. 2016.

- WANG, P. et al. Fluid shear promotes chondrosarcoma cell invasion by activating matrix metalloproteinase 12 via IGF-2 and VEGF signaling pathways. **Oncogene**, v. 34, n. 35, p. 4558–69, 27 ago. 2015.
- WANG, X. et al. Fluid Shear Stress Promotes Autophagy in Hepatocellular Carcinoma Cells. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1277–1290, 2018a.
- WANG, Z. et al. MicroRNA-506 suppresses invasiveness and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting IL8. **American journal of cancer research**, v. 8, n. 8, p. 1586–1594, 2018b.
- WESTPHAL, J. R. et al. Angiogenic balance in human melanoma: Expression of VEGF, bFGF, IL-8, PDGF and angiostatin in relation to vascular density of xenografts in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 86, n. 6, p. 768–776, 15 jun. 2000.
- WIRTZ, D.; KONSTANTOPOULOS, K.; SEARSON, P. C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 7, p. 512–22, 24 jun. 2011.
- WRAGG, J. W. et al. Shear Stress Regulated Gene Expression and Angiogenesis in Vascular Endothelium. **Microcirculation**, v. 21, n. 4, p. 290–300, maio 2014.
- WU, K.-L. et al. Extracellular galectin-3 facilitates colon cancer cell migration and is related to the epidermal growth factor receptor. **American journal of translational research**, v. 10, n. 8, p. 2402–2412, 2018.
- YANCOPOULOS, G. D. et al. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 242–248, 14 set. 2000.
- YANG, R.-Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F.-T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e17, 13 dez. 2008.
- YANG, R. Y.; HSU, D. K.; LIU, F. T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 13, p. 6737–42, 25 jun. 1996.
- YOSHII, T. et al. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 9, p. 6852–7, 1 mar. 2002.
- ZHANG, J. et al. Effect of galectin-3 on vasculogenic mimicry in esophageal cancer cells. **Oncology letters**, v. 15, n. 4, p. 4907–4911, abr. 2018.
- ZHANG, W.; LIU, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 1 mar. 2002.

ANEXO A

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para uso dos camundongos C57BL6

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral”, protocolo nº 066/16 sob a responsabilidade de Roger Chammas e Ana Carolina Ferreira Cardoso, apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 22.06.16.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Novembro/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo SPF Balb/c Nude
Nº de animais	60
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 22 de Junho de 2016

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B

Carta de aprovação da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Departamento de Radiologia e Oncologia

Av. Dr. Arnaldo, 455 – 4º andar – sala 4123
CEP 01246-903
São Paulo - SP - Brasil
Fone/Fax: (11) 3061.7161

APROVAÇÃO

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, APROVOU, em 16 de Maio de 2018, o projeto de pesquisa: Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral.

Pesquisador Principal: Roger Chammas

Pesquisador Executante: Ana Carolina Ferreira Cardoso.

São Paulo, 16 de Maio de 2018.

Prof. Dra. Maria Aparecida Nagai
Presidente da Comissão de Biossegurança
Departamento de Radiologia e Oncologia
FMUSP

ANEXO C

**Carta de aceite para estágio supervisionado no laboratório da Dra. Keri Schadler,
Professora Assistente no Departamento de Pediatria, MD Anderson Cancer Center**

Keri Schadler, PhD
Assistant Professor
Division of Pediatrics
klschadl@mdanderson.org

Department of Pediatrics -
Research
T: 713-794-1035
Unit 853
1515 Holcombe Boulevard
Houston, Texas 77030-4009

June 16, 2017

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes),

This letter confirms my intention to host Ana Carolina Ferreira Cardoso, MSc for an internship from August 2, 2017 to February 1, 2018 in my laboratory at MD Anderson Cancer Center. During this period, Ms. Cardoso will train in different experimental approaches to evaluate aspects of endothelial cells exposed to factors released by tumor cells under shear stress. These approaches will be useful for the development of her PhD project, and will serve as a basis of potential collaborations between my group and the Chammas laboratory at Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, where Ms. Cardoso studies. Additionally, Ms. Cardoso will be involved in our laboratory routine, and will attend seminars on Pediatric cancer and other basic research programs at MD Anderson Cancer Center.

Please do not hesitate to contact me, if any other information is necessary.

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "K. Schadler", with a stylized, cursive script.

Keri Schadler

ANEXO D

Carta de aprovação com financiamento da CAPES para estágio no exterior

Ministry of Education - MEC
Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education - CAPES
Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 06
CEP 70040-020 - Brasília, BRAZIL

Dear Mr.(s),
ANA CAROLINA FERREIRA CARDOSO
Otávio Roque - 68
Jardim Guanã
São Paulo - São Paulo
Brasil
02.151-040

29/06/2017

Processo: PDSE - 88881.134443/2016-01

TO WHOM IT MAY CONCERN

We hereby certify that Mr./Mrs. ANA CAROLINA FERREIRA CARDOSO has been awarded a scholarship from the CAPES Foundation, an agency under the Ministry of Education of Brazil, in order to conduct part of his doctoral research as a Visiting Student at M.D ANDERSON CANCER CENTER.

The scholarship includes:

Grant	Unit Value	Parcels (up to)	Total
Health insurance allowance	US\$ 90.00	7	US\$ 630.00
Monthly stipends	US\$ 1,300.00	7	US\$ 9,100.00
Settling-in allowance	US\$ 1,300.00	1	US\$ 1,300.00
Travel allowance	US\$ 1,604.00	2	US\$ 3,208.00

*The parcels depend on the period of the scholarship stated below.

- . The scholarship is valid from 08/2017 to 02/2018.
- . Travel allowance towards the cost of travel for the itinerary: Brasil/Estados Unidos/Brasil
- . The benefits granted are linked to the period spent abroad, within the approved period.
- . Capes will not be responsible for costs related to academic and research fees.

Sincerely,

Marilene Maria Augusto Vieira
General Coordinator for International Scholarships and Projects
This document is public and does not need signature recognition
- Article 19, interpolated proposition II, Federal Constitution of Brazil.