GUILHERME TUDE COELHO NETO

**Peptídeo antimicrobiano LL-37 e seus efeitos em
stemness de diferentes células tumorais**

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Processos
Imunes e Infecciosos

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Pinheiro
da Silva

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Coelho Neto, Guilherme Tude

Peptídeos antimicrobiano LL37 e seus efeitos em "*Stemness*" de diferentes células tumorais / Guilherme Tude Coelho Neto. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Processos Imunes e Infeciosos.

Orientador: Fabiano Pinheiro da Silva.

Descritores: 1.Peptídeos catiônicos antimicrobianos 2.Catelicidinas
3.Neoplasias da mama 4.Expressão gênica 5.Técnicas de silenciamento de genes
6.Neoplasias cutâneas 7.Fenômenos do sistema imunológico 8.Imunidade inata
9.RNA interferente pequeno 10.Melanoma

USP/FM/DBD-429/16

Normatização adotada

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

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

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

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

Dedicatória

*Ao meu pai, Dr. Jean Norberto Coelho (in
memoriam), cuja eterna saudade me
determina a seguir em frente.*

Agradecimentos

A **Deus**, pelo dom maior da vida;

À minha mãe, **Maria de Nazaré Fonseca Coelho**, que com sua infinita bondade e generosidade me faz acreditar a cada dia que é possível superar o passado, ter olhos para o futuro e amar incondicionalmente ao próximo, a Jesus Cristo e aos seus ensinamentos;

Ao meu pai (*in memoriam*) Dr. **Jean Norberto Coelho**, cujo exemplo de perseverança e dedicação aos estudos e à ciência perpetua em mim;

Aos meus irmãos, **Bruno** e **Glauber**, minha **sobrinha**, meus **afilhados**, **primos**, **tios** e toda a **família** oficial e agregada, por todas as experiências proporcionadas durante esses anos de convívio;

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Fabiano Pinheiro**, do qual tenho orgulho de ter recebido não apenas orientação científica, mas puxões de orelha, conselhos e sugestões, o que, acima de tudo, enriqueceu minha experiência na Casa de Dr. Arnaldo, a qual, a partir de hoje, passará a ser minha *Alma Mater*;

À Dra. **Thais Lima**, uma pessoa ímpar, cuja paixão pela pesquisa e pela vida me fizeram voltar a acreditar em mim e em meu potencial;

Neste momento, a grande família do **Laboratório de Imunofisiologia da UFMA**, da qual sou oriundo, se enche de orgulho pelo doutoramento de mais um filho seu;

Ao LIM51, em especial a **Kelli Gouveia**, uma amiga que restaurou minha fé em Deus; a **Fátima Abatepaulo**, que tem um coração muito mais doce que a gente imagina; a Dra. **Márcia Koike**, onde encontrei uma amiga que espero levar pra vida; à Dra. **Denise Barbeiro**, pela sua gentileza, palavras sábias, calmas e acolhedoras; ao Dr. **Hermes Barbeiro**, pelas imensas ajudas nos experimentos, mas muito mais pelas conversas que enriqueceram e abriram meus olhos para dois vastos aprendizados: o da humanidade e o da Biologia em si; a **Suely Kubo Ariga**, que me segurou na sala de cultura até eu aprender tudo que deveria e ainda me socorreu mesmo achando que tinha aprendido tudo; aos Profs. Drs. **Heraldo Possolo** e **Marcel Machado**, pelas discussões, durante o processo do doutoramento e na qualificação, as quais amadureceram e tornaram possível o restante do trabalho; e ao Prof. Dr. **Francisco Garcia Soriano**, pelas excelentes conversas;

A **Joleen Lopes Machado**, “mãe”, com quem eu sempre pude contar e que sempre foi a garantia de um dia incrível;

A **Anne Karine Martins**, mais outra “mãe”, pela amizade e carinho, pela conterraneidade que nos une e faz com que nos entendamos;

A **Vanessa Jacob Vitorino**, que se tornou “irmã” mesmo sendo do sul, pelas longas conversas, pelo apoio e por me ensinar tantas coisas que apenas um “muito obrigado” se torna pouco;

A todos os colegas mestres e doutores do LIM51/FMUSP, em especial a **Débora Cunha, Rízia Amaral e Jaqueline Beppler**, e aos futuros Doutores **Emerson Martins, Mike Yoshio e Mário Teles** pelo apoio nessa caminhada;

Ao **Grupo de Choque – Isquemia – Reperusão – Reposição Volêmica – Soluções Hipertônicas da FMUSP**, pelas discussões proporcionadas para que este trabalho pudesse ser realizado em sua plenitude;

À Secretaria do PPGCM/ICHC, **Angélica e Rose**, que desde o início me receberam muito bem como aluno do Programa;

À DMIP/FMUSP e ao IMT, onde tive orgulho de desenvolver minhas atividades como Aluno PAE; aos Prof. Drs. **Ronaldo Gryschek e Marta Heloísa Lopes**, que gentilmente me supervisionaram durante este estágio; e às secretárias da DMIP, **Gladis dos Santos**, e do CEDEM, **Gisela**, que se tornaram grandes amigas durante todo esse processo;

Aos amigos queridos de São Paulo e de São Luís, que, inobstante meus vários “sumiços”, sempre me apoiaram: **Alessandra Siedschlag, Rafael Alexandre, Ulysses Ayres, Naomi Luciane, Valdécio Marques, Paulo Henrique Lima, Daniela Assaf e Ana Júlia Moraes**. A **Cacilda**

Rego, Marcus Brasileiro, Heloísa Rutigliani, Nicolas Clark, Justin Jones e **Paula Elizabeth Oliveira**, que me acolheram na *Utah State University* e em Logan, nos EUA, da mesma forma como em casa.

Por último, mas não menos importantes, à **FMUSP**, ao **HC**, **CAPES**, **CNPq** e **FAPESP** pelas bolsas e auxílios recebidos para o bom desenvolvimento deste trabalho.

It's a great thing when you realize you still have the ability to surprise yourself.

Makes you wonder what else you can do that you've forgotten about.

- Kevin Spacey, *in* Beleza Americana

Sumário

Lista de abreviaturas, Siglas e símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Resumo

Abstract

I	Introdução.....	1
	1 Peptídeos antimicrobianos e câncer.....	2
	1.1 Catelicidinas.....	2
	1.1.1 LL-37.....	3
	1.2 Câncer.....	5
	1.2.1 Caracterização.....	6
	1.3 Caracterização imunobiológicas dos tumores malignos.....	8
	1.3.1 Como se forma o câncer? A sinalização induzida pela resposta imune inata e sua atuação tumorigênica.....	13
	1.4 Descobrimos <i>stemness</i>	19
	1.4.1 Entendendo <i>stemness</i> e EMT.....	21
	1.5 A plasticidade do fenótipo CSC.....	22
	1.6 A ligação entre CSCs e EMT.....	22
	1.6.1 EMT atua na invasividade e na metastatização do câncer.....	23
	1.6.2 CSCs também atuam na invasividade e na metastatização do câncer.....	23
	1.7 A relação entre EMT e CSCs.....	24
	1.8 LL-37 e câncer: uma relação ainda não totalmente estabelecida.....	26
	1.8.1 A presença ou ausência de LL-37 no microambiente tumoral tem impacto na progressão tumoral.....	27
II	Objetivos	
	2.1 Objetivo geral.....	29
	2.2 Objetivos específicos.....	29
III	Material e Método	
	3.1 Tipos celulares.....	30
	3.2 Cultura de células.....	31

3.3	Obtenção do RNA total.....	31
3.4	RT-PCR e PCR convencional.....	31
3.4.1	Determinação quantitativa da expressão gênica de LL-37 nas amostras.....	32
3.5	<i>Knockdown</i> de LL-37 por siRNA.....	32
3.5.1	Validação de <i>Knockdown</i>	33
3.6	PCR array para DNA <i>damage</i>	33
3.7	Formação de oncosfera.....	34
3.8	Análise estatística.....	34
IV	Resultados.....	35
V	Discussão.....	42
V	Conclusões.....	49
VI	Anexo.....	50
VII	Referências.....	51

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
≤	Menor igual
AIM2	Absent in Melanoma 2
AMP	Peptídeo Antimicrobiano
ATCC	American Type Culture Collection
BMP	Bone morphogenetic protein
CAMP	Cathelicidin Antimicrobial Peptide
Cas1	CRISPR-associated protein 1
CD	Cluster of Differentiation
CETN2	Centrin-2
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
CO ₂	Gás Carbônico
CpG	Citosina Trifosfato Desoxinucleotídeo fosfosdiéster-ligado a Guanina Trifosfato Desoxinucleotídeo
CRAMP	Cathelin-related Antimicrobial Peptide
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSC	Cancer Stem Cell
CXCR2 C-X-C	motif chemokine receptor 2
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors
DDX41	DEAD (Asp–Glu–Ala–Asp) box polypeptide 41
DNA	Ácido Desoxiribunucleico
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNAse	DNA quinase
dsDNA	DNA dupla-fita
EGF	Fator de Crescimento Epitelial
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
FPRL1	Formyl Peptide Receptor-like 1
GPCR	G-protein-coupled receptor
hCAP18	human Cathelicidin Antimicrobial Protein 18
IFI16	interferon gamma inducible protein 16
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
kDa	Kilodaltons
Ku70	Lupus Ku autoantigen protein p70
Ku80	Lupus Ku autoantigen protein p80
LL-37	Leucina-leucina 37
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases

MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
MRE11	Meiotic Recombination 11
MRN	Complexo Mre11/Rad50/Nbs1
MutS	Mut protein, S
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 8
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
NK	Natural Killer
P2X7 P2X	purinoceptor 7
p63	Tumor protein p63
RAD23B	RAD23 homolog B, nucleotide excision repair protein
Rad50	Radiation Sensitive 50
RNA	Ácido Ribonucleico
SASP	Fenótipo Secretório Associado à Senescência
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disorder
siRNA	small-interferng RNA
STING	Stimulator of interferon genes
T γδ	T gama-delta
TBK1 TANK	binding kinase 1
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptor Toll-like
VEGF	Fator de Crescimento Vasoendotelial
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C

Lista de Figuras

Figura 1	Pontos-chave essenciais para a carcinogênese. Fonte: adaptado de Hanahan& Weinberg (2000).....	9
Figura 2	Pontos-chave emergentes e características essenciais para a carcinogênese. Fonte: adaptado de Hanahan& Weinberg (2011).....	10
Figura 3	Principais mecanismos de sensoriamento ao DNA e a sinalização imune associada. (A) sensores de DNA distintos podem ligar DNA de dupla-fita (dsDNA) no citoplasma e induzir uma resposta imune. AIM2 liga-se dsDNA e ativa o inflamassomo, produzindo IL-1 β . (B) DAI, cGAS, DDX41 ou IFI16 também podem ligar DNA livre no citosol e desencadear uma resposta mediada por Interferon tipo I, através do eixo TBK1/STING. (C) DNA de fita simples nos endossomos ativa uma sinalização por TLR9, a qual, através de MyD88, induz transcrição mediada por (NF- κ B). Alternativamente, a sinalização pelos TLRs ativa uma resposta reguladora por IRF, através do engajamento de TBK1. No núcleo, fatores especializados no reparo ao DNA (MutS, XPC/RAD23B/CETN2, DNA-PK/Ku70/80, e o complexo MRN) ligam-se ao DNA para disparar uma resposta ao dano ao DNA, dependendo do dano ocorrido. (D) MRE11/RAD50, Ku70/80, e DNA-PK também ligam dsDNA livre no citoplasma e induzem uma resposta por IRF, possivelmente através do eixo TBK1/STING. (E) Adicionalmente, as proteínas envolvidas na resposta ao DNA danificado, como ATM, são enviadas para o citoplasma e ativam uma resposta mediada por NF- κ B. Fonte: Chatzinikolaou et al., 2014.....	16
Figura 4	PCR Convencional para LL-37 dos tipos utilizados neste trabalho.....	35

Lista de Gráficos

Gráfico 1	<i>Knockdown</i> de LL-37 mediado por siRNA, A375, 10nM, 48hs. (*), (#) e (\$) representam diferença estatisticamente relevante ($p \leq 0,05$).....	36
Gráfico 2	<i>Knockdown</i> de LL-37 mediado por siRNA, SKBR3, 1nM, 24hs. (*), (#) e (\$) representam diferença estatisticamente relevante ($p \leq 0,05$).....	37
Gráfico 3	Eficiência, em porcentagem, na formação de oncosferas na linhagem SKBR3, sem e com <i>knockdown</i> para o RNAm de LL-37.....	40
Gráfico 4	Eficiência, em porcentagem, na formação de oncosferas na linhagem A375, sem e com <i>knockdown</i> para o RNAm de LL-37..	41

Lista de Tabelas

Tabela 1	RNA _m alterados pela indução do <i>knockdown</i> do RNA _m de LL-37 em células SKBR3. Em negrito estão os que são correlacionados com <i>stemness</i>	38
Tabela 2	RNA _m alterados pela indução do <i>knockdown</i> do RNA _m de LL-37 em células A375. Em negrito, estão genes elencados como participantes de <i>stemness</i>	39

Resumo

COELHO NETO GT. *Peptídeo antimicrobiano LL-37 e seus efeitos em stemness de diferentes células tumorais*[Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Os peptídeos antimicrobianos desempenham papéis protetores críticos em uma gama de doenças humanas, incluindo o câncer. Vários estudos demonstraram funções - tais como proliferação, angiogênese, apoptose e imunomodulação - desses peptídeos em vias cancerígenas cruciais. Investigamos o papel do Peptídeo antimicrobiano LL-37 sobre *stemness* em câncer de mama (SKBR3) e células de melanoma (A375). Análise por PCR array da expressão diferencial de genes em SKBR3 e A375 com knockdown por siRNA para o mRNA de LL-37 revelou uma regulação negativa de genes relacionados com *stemness*, incluindo transcriptase reversa da telomerase, *forkhead box D3* e para o fator indiferenciado de transcrição de células embrionárias 1, notavelmente em células de câncer de mama. Além disso, as células SKBR3 com *knockdown* para a expressão de LL-37 mostraram uma diminuição da produção de oncosferas em comparação com controles negativos, enquanto as células A375 exibiram uma produção aumentada. Tomados em conjunto, nossos achados indicam um papel para LL- 37 em *stemness*, dependendo do tipo de celular analisado.

Descritores: peptídeos catiônicos antimicrobianos; catelicidinas; neoplasias da mama; expressão gênica; técnicas de silenciamento de genes; neoplasias cutâneas; fenômenos do sistema imunológico; imunidade inata; RNA interferente pequeno; melanoma.

Abstract

Coelho Neto GT. *Antimicrobial peptide LL-37 and its effects on stemness in different cancer cells* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Antimicrobial peptides play critical protective roles in a range of human diseases, including cancer. Multiple studies have demonstrated functions — such as proliferation, angiogenesis, apoptosis and immunomodulation — of these peptides in crucial cancer pathways. We investigated the role of the antimicrobial peptide LL-37 on *stemness* in breast cancer (SKBR3) and melanoma cells (A375). PCR array analysis of differential gene expression in SKBR3 and A375 cancer cell lines downregulated for LL-37 expression by siRNA revealed downregulation of genes related to *stemness*, including telomerase reverse transcriptase, forkhead box D3 and undifferentiated embryonic cell transcription factor 1, remarkably in breast cancer cells. Furthermore, SKBR3 cells knocked down for LL-37 expression showed a decreased production of oncospheres in comparison with negative controls, while A375 cells exhibited increased production. Taken collectively, our findings indicate a role for LL-37 in cancer cell *stemness* depending on the cell type.

Descriptors: Descriptors: antimicrobial cationic peptides; cathelicidins; breast neoplasms; gene expression; gene knockdown techniques; skin neoplasms; immune system phenomena; immunity, innate; RNA, small interfering; melanoma.

I Introdução

Peptídeos antimicrobianos (AMPs) formam um grande grupo de compostos produzidos por organismos multicelulares em ambos os reinos vegetal e animal. Estes peptídeos formam um componente primitivo e conservado geneticamente, através da evolução das espécies, da resposta imune inata, que proporcionam proteção contra patógenos ambientais, agindo frente a um grande número de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, vírus e outros.

A produção de AMPs é um dos principais componentes da imunidade inata contra a infecção. A sua produção pode ser constitutiva ou induzida, de acordo com uma grande variedade de características, como organismo, tipo de célula e de peptídeos considerados. Peptídeos antimicrobianos são diversos em suas sequências de aminoácidos e estruturas; são geralmente anfifílicos, pequenos (de 12-50 aminoácidos), e têm pelo menos duas cargas positivas (resíduos de arginina e lisina, por exemplo), sendo, portanto, catiônicos. Estas propriedades químicas lhes permitem inserir nas paredes celulares e membranas de micro-organismos, essencialmente formadas por fosfolipídios aniônicos, resultando em lise e morte do micro-organismo. Até agora, mais de 1.200 peptídeos antimicrobianos foram identificados¹.

Os seres humanos e outros animais estão em constante contato com os micro-organismos e têm suas superfícies mucosas colonizadas por uma microbiota

complexa^{2,3}. Em seres humanos e outros mamíferos, as células de Paneth, por exemplo, são uma fonte importante de peptídeos antimicrobianos no intestino⁴⁻⁶. Muitos outros tipos celulares, no entanto, tais como os queratinócitos e células epiteliais dos pulmões, produzem AMPs, em especial a catelicidina LL-37, para proteger as superfícies das mucosas; AMPs são também produzidas por células que habitam a corrente sanguínea, tais como monócitos, neutrófilos e mastócitos. Eles são geralmente expressos como pró-peptídeos e, enquanto alguns deles são expressos constitutivamente, outros são induzíveis por inflamação ou lesão.

Nos últimos anos, vários mecanismos têm sido descritos como desencadeados pela presença de peptídeos antimicrobianos, tanto intra quanto extracelularmente. Essa capacidade de ativação da resposta imune inata tem sido alvo de intensas pesquisas, principalmente nas áreas de doenças infecciosas, doenças autoimunes e, bem mais recentemente, no câncer.

1 Peptídeos antimicrobianos e câncer

1.1 Catelicidinas

As catelicidinas foram identificadas em várias espécies de mamíferos. Em camundongos e humanos, apenas um gene que codifica as catelicidinas (CAMP) foi identificado até o momento, responsável pelos peptídeos denominados, respectivamente, CRAMP e LL-37; o gene humano que codifica LL-37 consiste de quatro éxons e está localizado no cromossomo 3.

Esta família de peptídeos antimicrobianos contém uma sequência-sinal altamente conservada, e uma pró-região (o nome Catelicidina advém de *Cathelin*, que deriva de *Cathepsin L Inhibitor*), mas demonstram alta heterogeneidade no seu domínio C-terminal que contém o peptídeo maduro, o qual pode variar entre 12 a 80 ou mais resíduos de aminoácidos⁷. Nos seres humanos, a proteína precursora é denominada hCAP18, pois possui massa de 18 kDa; esta proteína é então processada, libertando, a partir de seu domínio C-terminal, um peptídeo que contém 37 aminoácidos, iniciado com duas leucinas, e denominado LL-37.

1.1.1 LL-37

Muito embora α e β -defensinas sejam os mais abundantes AMPs expressos em mamíferos, vários AMPs lineares que formam α -hélices pertencentes à família das catelicidinas também são produzidos. A única catelicidina humana, LL-37, foi isolada primeiramente a partir da medula de ossos longos⁸⁻¹⁰.

LL-37 é expresso por leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, mastócitos, células NK, células B e células T $\gamma\delta$, residindo em grânulos, embora também seja bastante abundante na pele inflamada. A expressão de LL-37 é regulada por estímulos inflamatórios¹¹, abundantes no microambiente tumoral. Nos neutrófilos, este peptídeo é guardado em sua forma de pró-peptídeo; o processamento é realizado por serinoproteases de queratinócitos, como as calicreínas, e outras proteases, tais como a proteinase-3¹².

Nas vias aéreas, LL-37 é produzido pelos mesmos tipos celulares que produzem as β -defensinas, sendo secretado para o fluido superficial¹³. Adicionalmente, LL-37 também foi detectado no sobrenadante de células epiteliais cultivadas *in vitro*, assim como no lavado broncoalveolar de pacientes^{13,14}. Além de sua ação antimicrobiana, LL-37 liga-se ao LPS e o neutraliza, protegendo contra o choque endotoxêmico em um modelo murino de sepse¹⁵.

LL-37 também é encontrado no trato respiratório, intestinal, glândulas mamárias, epidídimo e pele. As células epiteliais do trato intestinal em seres humanos e camundongos produzem não apenas catelicidinas, mas um bloqueador de sua síntese, uma vez que esta síntese é limitada nas duas primeiras semanas após o nascimento, o que contribui para colonização bacteriana e consequente estabelecimento da homeostase intestinal¹⁶. Camundongos CRAMP^{-/-} desafiados com *Streptococcus* do grupo A desenvolvem áreas de infecção mais extensas que camundongos selvagens, o que prova que a função desta catelicidina é importante na defesa imunológica contra este patógeno^{12,17}.

LL-37 induz a fosforilação das MAPKs em monócitos derivados de sangue periférico humano¹⁸. A indução de fosforilação mediada por LL-37 se dá, em algumas situações, por meio de um GPCR, como FPRL1, o qual foi proposto como o receptor para a quimiotaxia induzida por LL-37¹⁹. Embora o exposto acima, ainda não está claro como AMPs são capazes de induzir sinalização celular; outros modelos foram propostos, incluindo a ligação direta aos receptores P2X₇²⁰ e CXCR2²¹. Muito embora LL-37 possa agir através de FPRL1, causando migração monocitária, o mesmo não ocorre em células epiteliais, queratinócitos e neutrófilos; o efeito sobre queratinócitos, por exemplo, requer EGF e outros GPCRs²²⁻²⁴.

Ademais, CRAMP exógeno pode ser citotóxico em níveis elevados, mas, em doses mais baixas, é potente ativador, como já demonstrado em camundongos CRAMP^{-/-} ²⁵. Este efeito se dá, em parte, de forma receptor-independente e pode ser devido à formação de pequenos poros na membrana da célula eucariótica, que não afetam sua sobrevivência, mas induzem pequenos fluxos de íons que são essenciais para ativação de TLRs e formação de inflamassomo. O mesmo efeito pode ser induzido pelos receptores diretos de ligação a receptores P2X₇ e semelhantes, através da abertura de canais iônicos. Em ambas as situações, CRAMP induz fluxos iônicos que afetam criticamente TLRs²⁶ e sinalizam a formação de inflamassomo^{27,28}.

A expressão das catelicidinas, a despeito de outros peptídeos antimicrobianos, está quase sempre ligada à disposição local de vitamina D em sua forma ativa do que em resposta à ativação de TLRs ou mesmo de outras citocinas e quimiocinas²⁸; a forma ativa da vitamina D (1,25-Vitamina D) induz diretamente a transcrição gênica de LL-37 na região promotora de CAMP no DNA humano^{29,30}.

1.2 Câncer

O aumento da expectativa de vida mais que duplicou nos dois últimos séculos, subindo de apenas 25 anos para pouco mais de 65 anos para os homens, e 75 anos para as mulheres. Algumas populações, como, por exemplo, a japonesa, atualmente desfrutam de uma expectativa de vida próxima aos 85 anos³¹. Quanto mais tempo se vive, maior a chance do DNA acumular mutações importantes que podem levar ao câncer.

As estatísticas sobre o câncer frequentemente são devastadoras; de acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. Siegel et al. (2016) estimaram que 1.685.210 norte-americanos teriam algum tipo de câncer em 2016, e que 595.690 faleceriam de câncer nos EUA³². No Brasil, a estimativa, era, para o ano de 2015, a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não-melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não-melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil)³³.

1.2.1 Caracterização

O Câncer é um grupo de doenças caracterizadas por um crescimento celular desregulado e a invasão e disseminação de células a partir do local de origem (ou tumor primário) para outros locais do organismo³⁴. Alguns pontos, porém, dessa definição necessitam de maior esclarecimento.

Em primeiro lugar, o câncer pode ser considerado um grupo de doenças. Mais de 100 tipos de câncer já foram classificados³⁵. O tecido de origem do câncer o distingue dos demais. Aproximadamente 85% dos casos de câncer ocorrem em células epiteliais, e são denominados de carcinomas, sendo que aqueles que

atingem tecidos glandulares são denominados adenocarcinomas³⁶⁻³⁸. Cada um dos tecidos atingidos comporta-se de maneira diferente, de forma que um câncer de pele não se forma da mesma maneira, tampouco tem o mesmo tratamento que um câncer de pulmão, ou de mama, por exemplo. Um dos fatores mais aventados para o câncer de pele é a exposição à radiação ultravioleta sem proteção, assim como para o câncer de pulmão é a utilização de produtos fumígenos e a exposição ao pó de amianto³⁵. A remoção cirúrgica de uma porção da pele atingida por um tumor geralmente não provoca maiores sequelas, mas a ressecção de uma parte do pulmão pode afetar sobremaneira o paciente em sua vida futura.

Também ocorrem diversas diferenças a nível celular e molecular, uma vez que cada tumor comporta uma singularidade, e mesmo dentro de uma classe de tumores não há consenso, o que significa que, embora haja a possibilidade de cada tumor se comportar de maneira previamente estudada, existem variações (em geral por diferentes mutações genéticas) que podem ou não determinar maior ou menor proliferação e invasividade³⁴.

Como doença que deriva primariamente da proliferação celular descontrolada, o câncer resulta de um acúmulo inoportuno de células ou de morte celular insuficiente. Por causa disso, não há muita surpresa que, frequentemente, o ciclo celular esteja alterado, quer pela ativação dominante de vias de sinalização extrínsecas, perda de mecanismos reguladores (como as vias de *checkpoint* da replicação celular) que normalmente limitam o crescimento celular, e alterações genéticas que permitem tal acúmulo de múltiplas mutações. Ainda que inúmeros fatores sejam necessários para que células em câncer se transformem efetivamente em um tumor, incluindo mudanças no ambiente extracelular circundante, são as

mudanças no próprio ambiente celular as mais importantes. Os genes alterados no câncer são classificados como oncogenes, os quais são genes que quando mutados ou super-expressos levam a um crescimento celular anormal; e supressores tumorais, os quais são genes que normalmente suspendem o ciclo celular, mas falham em fazerem-no quando mutados³⁹.

1.3 Características imunobiológicas dos tumores malignos

No ano 2000, depois de várias análises, Hanahan & Weinberg⁴⁰ definiram 6 pontos-chave para a grande maioria dos cânceres. Eles propuseram que a aquisição da capacidade autônoma de sinalização de crescimento, evasão de mecanismos de inibição destes sinais, evasão dos mecanismos de apoptose celular, potencial de replicação ilimitado, angiogênese, e potencial invasivo e metastático são essenciais para a carcinogênese (Figura 1).

Figura 1. Pontos-chave essenciais para a carcinogênese. Fonte: adaptado de Hanahan & Weinberg (2000)⁴⁰.

Ainda mais recentemente, estes autores modificaram seu conceito para incluir duas características essenciais, a instabilidade genômica e a inflamação promovida pelo próprio tumor, que são cruciais para os seis pontos-chaves supracitados, e também adicionaram dois pontos-chaves que emergiam nas pesquisas: a reprogramação do metabolismo energético celular e a evasão do sistema imune (Figura 2).

Figura 2. Pontos-chave emergentes e características essenciais para a carcinogênese. Fonte: adaptado de Hanahan & Weinberg (2011)⁴¹.

Sendo assim, cada um dos pontos-chaves tem características importantes a serem consideradas^{34,40,41}:

- Capacidade autônoma de sinalização de crescimento:
 - Células normais precisam de sinalização externa, na forma de fatores de crescimento, para se dividir;
 - Células em câncer não são dependentes da sinalização normalmente realizada por fatores de crescimento;
 - Mutações adquiridas causam uma espécie de curto-circuito entre as vias sinalizadas por fatores de crescimento, acarretando assim o crescimento desenfreado.
- Insensibilidade aos mecanismos de inibição do crescimento:

- Células normais respondem a sinais inibitórios, de forma a manter a homeostase;
- Células em câncer são resistentes a estes sinais;
- Mutações adquiridas ou silenciamento gênico interferem diretamente nas vias inibitórias.
- Evasão do sistema imune:
 - Não há consenso na literatura de que o sistema imune tem a habilidade de reconhecer e eliminar células em câncer;
 - Células em câncer bem-sucedidas podem ser aquelas as quais não provocam resposta imune ou podem interagir com a resposta imune de forma a evadir a destruição por este.
- Potencial replicativo ilimitado:
 - Células normais têm um contador autônomo que define um número finito de duplicações celulares, depois das quais se tornam senescentes. Este mecanismo de contagem consiste no encurtamento dos telômeros que ocorre a cada *round* da replicação do DNA;
 - Células em câncer, porém, mantém o tamanho de seus telômeros;
 - A regulação alterada desse mecanismo resulta em um potencial de replicação ilimitado.
- Inflamação promovida pelo próprio tumor:
 - Quase qualquer tumor contém células imunes inflamatórias;

- A inflamação é uma resposta imune que facilita a habilidade de aquisição de vários pontos-chaves para o câncer. Por exemplo, células inflamatórias proporcionam a produção de fatores de crescimento e enzimas que promovem angiogênese e invasão;
- Adicionalmente, células inflamatórias podem liberar espécies reativas de oxigênio que são mutagênicas.
- Invasão e metástase:
 - Células normais mantém sua localização no corpo humano, e, geralmente, não migram para outros sítios;
 - A movimentação de células em câncer para outras partes do corpo é uma das maiores causas de morte por câncer;
 - Alterações genômicas podem afetar a atividade e/ou os níveis de proteínas e enzimas envolvidas na invasividade ou moléculas envolvidas na interação célula-célula e/ou célula-matriz extracelular;
- Angiogênese:
 - Células normais dependem de um suprimento de oxigênio e nutrientes que advém de vasos sanguíneos, porém sua estrutura é, na maioria das vezes, constante no organismo adulto;
 - Células em câncer induzem angiogênese, necessária para a expansão tumoral;
 - Alterando-se o balanço entre indutores e inibidores da angiogênese pode ativar tal mecanismo.
- Instabilidade genômica e mutação:

- A aquisição dos principais pontos-chave do câncer depende, na maioria das vezes, de alterações genômicas;
- Vias de reparo de DNA defeituosas contribuem para essa instabilidade genômica.
- Evasão dos mecanismos de apoptose celular:
 - Células normais são removidas por apoptose, geralmente em resposta ao dano ao DNA;
 - Células em câncer evadem esse mecanismo.
- Reprogramação do metabolismo energético celular:
 - A divisão celular descontrolada necessita de um incremento energético e de precursores biossintéticos que é obtido ajustando-se o metabolismo energético;
 - Diferentemente das células normais, as células em câncer conseguem efetuar glicólise mesmo na presença de oxigênio. Os intermediários da glicólise podem ser utilizados nas vias biossintéticas.

1.3.1 Como se forma o câncer? A sinalização induzida pela resposta imune inata e sua atuação tumorigênica

As células respondem a DNA estranho introduzido no citoplasma disparando uma série de respostas imunes inatas; da mesma forma, o DNA danificado no núcleo celular, incluindo quebras no DNA geradas durante a integração viral ou replicação lítica, estimulam uma cascata de sinais pró-inflamatórios⁴². Dessa forma,

não é surpresa que proteínas envolvidas no reparo do DNA e na resposta ao dano ao DNA também atuem de forma significativa na sinalização imune inata. Mesmo organismos unicelulares simples, como bactérias, possuem mecanismos de cuidado ao seu genoma, os quais, conhecidamente, protegem-nos contra infecções virais ou por outros patógenos⁴³. Por exemplo, Cas1, uma proteína associada a CRISPR que pertence a uma família de nucleases estruturalmente distinta, recentemente demonstrou ter papel relevante no reparo do DNA bacteriano e na imunidade antiviral⁴⁴. IFI16, um fator de transcrição que atua como um sensor nuclear contra patógenos⁴⁵ e está envolvido na resposta antiviral, também tem um papel na manutenção genômica e na resposta ao dano ao DNA^{46,47}.

Uma questão particularmente intrigante é o quão sequência-independente estes sensores de DNA funcionam, distinguindo entre DNA estranho e o DNA do hospedeiro, posto que, diferentemente de outros gigantes microbianos, o DNA não é exclusivo dos patógenos. Uma maneira através da qual células de mamíferos lidam com esse dilema é através do reconhecimento de diferenças na estrutura físico-química do DNA microbiano e do DNA próprio; por exemplo. DNA bacteriano possui uma alta frequência de motivos CpG que são reconhecidos pelo TLR9⁴⁸. Desta forma, o acúmulo de subprodutos do DNA endógeno no citosol, como aqueles gerados durante a replicação do DNA ou derivados da atuação de retrovírus^{49,50}, e a ocorrência anormal de DNA de dupla-fita viral ou bacteriano em endossomos dispara uma ativação imune^{51,52}.

A estrutura secundária de DNA, rica em sequências AT, no genoma de *Plasmodium falciparum*, é também considerada uma determinante crítica para a estimulação da atividade imune⁵³⁻⁵⁵. Além do citoplasma, o núcleo não é mais,

atualmente, considerado “invisível” para estes sensores imunológicos de DNA⁵⁶; DNA viral ou danificado podem provocar a ativação de respostas imunes pelo núcleo^{42,45}. A enorme diversidade de compartimentos membranares nos eucariotas ainda adiciona mais razões pelas quais a detecção de DNA pelo sistema imune não é direta; as espécies variadas de DNA encontradas tanto nos endossomos como nos núcleos podem ser reconhecidas por distintos mecanismos, ou recrutar diferentes tipos de resposta imune. Este, e o fato de que as células podem se dividir em diferentes ritmos ou variar enormemente em termos de função e sua habilidade em lidar com o dano ao DNA ou patógenos, pedem que diferentes sensores de DNA sejam dedicados a sinalizar a presença de DNA estranho ou danificado, independente de sua natureza, fonte, ou localização intracelular. Na última década foram feitos vários progressos para o entendimento de alguns desses mecanismos de sensoriamento de DNA, e suas ligações com a sinalização de resposta ao dano ao DNA; no mesmo caminho, este conhecimento oferece alguns *insights* sobre como a inflamação crônica promove o envelhecimento e o câncer.

Figura 3. Principais mecanismos de sensoriamento ao DNA e a sinalização imune associada. (A) sensores de DNA distintos podem ligar DNA de dupla-fita (dsDNA) no citoplasma e induzir uma resposta imune. AIM2 liga-se dsDNA e ativa o inflamassomo, produzindo IL-1 β . (B) DAI, cGAS, DDX41 ou IFI16 também podem ligar DNA livre no citosol e desencadear uma resposta mediada por Interferon tipo I, através do eixo TBK1/STING. (C) DNA de fita simples nos endossomos ativa uma sinalização por TLR9, a qual, através de MyD88, induz transcrição mediada por (NF- κ B). Alternativamente, a sinalização pelos TLRs ativa uma resposta reguladora por IRF, através do engajamento de TBK1. No núcleo, fatores especializados no reparo ao DNA (MutS, XPC/RAD23B/CETN2, DNA-PK/Ku70/80, e o complexo MRN) ligam-se ao DNA para disparar uma resposta ao dano ao DNA, dependendo do dano ocorrido. (D) MRE11/RAD50, Ku70/80, e DNA-PK também ligam dsDNA livre no citoplasma e induzem uma resposta por IRF, possivelmente através do eixo TBK1/STING. (E) Adicionalmente, as proteínas envolvidas na resposta ao DNA danificado, como ATM, são enviadas para o citoplasma e ativam uma resposta mediada por NF- κ B. Fonte: Chatzinikolaou et al., 2014.¹⁷⁸

Os sensores de dano ao DNA e a resposta ao dano ao DNA estimulam células da imunidade inata e adaptativa na presença de células danificadas. Estas e as descobertas recentes da contribuição causal de lesões ao DNA irreparáveis para a instalação da doença iluminaram a relevância clínica da resposta imune inata mediada por resposta ao dano ao DNA em doenças relacionadas à idade, anormalidades metabólicas, e o câncer.

Assim como o DNA danificado se acumula com a idade, sendo o combustível da senescência celular⁵⁷, a ativação de sensores de DNA danificado e um estado persistente de resposta ao dano ao DNA disparam as células humanas senescentes a adquirir um estado chamado de “fenótipo secretório associado à senescência” (SASP)⁵⁸. Este fenótipo engaja a produção de citocinas como IL-6 e IL-8, promovendo inflamação crônica⁵⁹; uma vez estabelecida, esta inflamação crônica acaba por ganhar a maquinaria celular através da amplificação de mecanismos de *feedback* do sistema imune, e está associada a mudanças degenerativas teciduais⁶⁰. Muito embora o SASP possa ser responsável por uma certa supressão tumoral ao reforçar a senescência celular, ele também pode promover o câncer ao estimular crescimento em células pré-cancerosas próximas^{58,61,62}.

Além do SASP, a inflamação provocada pelo dano ao DNA facilita a angiogênese e promove o crescimento, invasão e metástase de células tumorais; um microambiente inflamatório e uma rede de moléculas de sinalização são consideradas indispensáveis para a progressão maligna de células transformadas⁶³.

Eventualmente, um tema universal cresce a partir desses achados: não é o câncer nem a senescência, e muito menos o dano ao DNA *per se*^{61,64}, mas a

ativação persistente dos sensores de dano ao DNA e a resposta a esse dano que disparam um amplo repertório de respostas imunes. Além do mais, a inflamação provocada pelo DNA danificado pode ser tanto benéfica como detrimental para a sobrevivência do organismo. Sendo assim, algumas respostas imunes inatas foram selecionadas ao longo da evolução pelos seus maiores benefícios, quando comparados aos malefícios que podem causar no futuro. Por exemplo, o DNA danificado demonstrou, recentemente, poder elicitar uma resposta imune inata em células germinativas que extensivamente se sobressai às vias de resposta ao patógeno, assim protegendo o soma contra o estresse oxidativo e o *heat shock*⁶⁵. Porém, o acúmulo lento e contínuo de células danificadas dentro dos tecidos intensifica a sinalização de resposta ao dano ao DNA e a expressão de sinais pró-inflamatórios mediados pela resposta ao dano ao DNA ao longo do tempo. Esta expressão perpetua o círculo vicioso da resposta ao dano ao DNA persistente e os eventos de sinalização pró-inflamatória que levam a uma inflamação crônica, disfunções teciduais, e a degeneração durante a idade avançada.

Não somente toda essa sinalização imune inata causa o câncer. Existem fatores intrínsecos e extrínsecos, que, ultimamente, também induzem sinalização imune, e ultimamente têm-se descoberto que não apenas a sinalização provocada pelas células em câncer causa os seus efeitos deletérios, mas sim outros elementos compartimentais do tumor também podem provocar sinalização, mas também invasividade, metastatização, e, ultimamente, um prognóstico pobre.

1.4 Descobrimos *stemness*

Atualmente, há duas hipóteses principais explicando a organização e progressão maligna de um tumor. A primeira hipótese, referida como modelo da evolução clonal, foi descrita primeiramente por Nowel et al. em 1976. De acordo com esse modelo, instabilidades genéticas adquiridas determinam uma acumulação de mutações genéticas durante o desenvolvimento tumoral, as quais, em resposta à pressão seletiva darwiniana conferidas pelo microambiente ou por resposta a uma terapia anticâncer, resultavam na expansão sub-clonal das células cancerígenas mais competitivas. Subsequentemente, estes subclones mais competitivos persistiam e determinavam o fenótipo tumoral⁶⁶⁻⁶⁸. Basicamente, há dois tipos de evolução clonal, referidos como evolução clonal linear e não-linear. No primeiro modelo, assume-se que os clones que emergiam competiriam com as células tumorais remanescentes, resultando na evolução sequencial dos subclones das células em câncer. Contrariamente a isto, a hipótese não-linear arguia que subclones divergentes poderiam emergir paralelamente e independentemente de cada uma^{69,70}.

Entretanto, em 1994, o conceito de evolução clonal do tumor foi posto em cheque por uma observação interessante em um modelo de Leucemia Mielóide Aguda⁷¹, onde células transplantadas para ratos SCID produziram um alto número de progenitores formadores de colônias, enquanto as células remanescentes não demonstravam o mesmo fenótipo⁷². Não mais que uma década depois, “células que iniciam tumores” (*Cancer Stem Cells*, CSCs) também foram identificadas em vários outros tumores, como cânceres de mama, glioblastomas, tumores colorretais e

assim por diante, fazendo com que a hipótese do surgimento das CSCs se expandisse⁷³⁻⁷⁶.

De acordo com o conceito de CSCs, a tumorigenicidade em qualquer câncer é hierarquicamente organizada, com as CSCs sendo as principais responsáveis pela tumorigenicidade e pelo potencial metastático da doença neoplásica⁶⁷. Além do mais, como é também conhecido pelas células-tronco normais e embrionárias, CSCs são capazes de gerar grandes populações de cada vez mais descendentes diferenciados e menos tumorigênicos, assim sendo capazes de recapitular a heterogeneidade das linhagens de câncer que compreendem o tumor original^{67,72,77-80}.

Interessantemente, a proporção de células que detém tal destino de serem CSCs dependem bastante do background mutacional ou da célula que a originou. Além do mais, também há a possibilidade de que o conteúdo das CSCs dentro de um mesmo tumor pode mudar durante a progressão da malignidade, desenvolvendo assim desde uma hierarquia mais alta, próxima de uma célula-tronco original do tecido afetado, até uma célula em uma hierarquia mais baixa, dependendo da quantidade de CSCs geradas, assim perdendo até sua organização hierárquica frente às outras células⁸¹. Estes *insights* ajudam-nos a entender resultados controversos de diversos estudos que envolvem tal organização hierárquica⁸¹⁻⁸⁵.

1.4.1 Entendendo *stemness* e EMT

Além do mais, o conceito de CSCs mostra-nos ser intrinsicamente ligado com um processo bem descrito de mudança de fenótipo das células em câncer, o qual, por exemplo, em células epiteliais polarizadas passam por uma série de mudanças bioquímicas variadas e reversamente adquirem caráter fibroblastóide ou mesenquimal, conhecidos como transição epitélio-mesenquimal (EMT). A EMT ocorre, também, em condições fisiológicas, como a embriogênese ou a cura de uma ferida, mas também atua como processo principal na progressão maligna, equipando células em câncer como um aumento de potencial migratório, invasividade e atraso na apoptose⁸⁶⁻⁸⁸. Neste contexto, já foi demonstrado que EMT conduz uma geração de sítios metastáticos e promove a sobrevivência destes na circulação. Consequentemente, a colonização de sítios distantes por tumores extravasados é associada à reversão da EMT, referida também como transição mesenquimal-epitélio⁸⁹⁻⁹⁵. As evidências acumuladas mostram que a EMT de células de cânceres epiteliais não só equipa células em câncer com potencial migratório ou invasividade, mas também se conferem auto-renovação^{96,97}. Sendo assim, há uma grande sobreposição entre a definição do fenótipo EMT do fenótipo CSC, respectivamente, e deve ser sempre afastada a possibilidade de que as duas acontecem sempre ao mesmo tempo, podendo vir a acontecer em estágios diferentes da evolução tumoral.

1.5 A plasticidade do fenótipo CSC

De acordo com a hipótese acima mencionada, a geração de células de menor tumorigenicidade pelas CSCs era originalmente atribuída ao suposto fato da sua ocorrência de uma forma totalmente unidirecional. Interessantemente, porém, o modelo de CSCs recentemente descoberto vai, dinamicamente, muito além disso, e foi complementado pela observação de que podem haver profundos estados e plasticidade bidirecional entre células CSC e não-CSC. Gupta et al., por exemplo, analisaram células tumorais de câncer de mama, derivadas de tumores primários com características proporcionais em todos os tipos celulares envolvidos, tanto CSCs quanto não-CSCs; estas foram purificadas, e, inobstante seu status, mantiveram o mesmo equilíbrio anterior. Assim sendo, novas CSCs foram geradas a partir de células que se interconvertiam, entre basais e luminais CSCs. Independentemente disto, células de melanomas também podem fazer o mesmo, mediadas por um elemento epigenético.

Por tudo isso, a mesma hipótese citada, tomou outra forma, visto que a plasticidade das CSCs resulta da interconversão bidirecional das células que compõem o tumor⁹⁸.

1.6 A ligação entre CSCs e EMT

A metástase tumoral é uma sequência intrincada que requer uma população tumoral pequena que tenha capacidade de extravasar do tumor primário para a circulação sistêmica, sobrevivendo nesta e proliferar em um segundo sítio,

metastático. Mesmo após anos de estudos clínicos e laboratoriais, a metástase ainda é um grande desafio e continua sendo uma das maiores causas de mortes associadas ao câncer atualmente⁹⁹. Recentemente, a ligação EMT-CSCs demonstrou ser parte importante do processo metastático.

1.6.1 EMT atua na invasividade e na metastatização do câncer

Durante a progressão do câncer, algumas células do tumor primário podem reativar um estágio embrionário latente, denominado EMT, o que se achava ser um passo necessário para a invasão tumoral e metastatização¹⁰⁰. Através da EMT, as células epiteliais transformadas podem obter uma espécie de *status* mesenquimal, o que parece contribuir para a metástase. Células únicas de câncer com um fenótipo mesenquimal possuem a habilidade de atravessar barreiras endoteliais e entrar na circulação linfática e sanguínea. Uma vez chegando a outro tecido, elas não mais encontram a sinalização promovida pelo tecido primário e precisam da reversão da EMT. Várias proteínas participam deste processo, culminando na inibição da E-Caderina. Outros receptores também se mostraram cruciais na viabilização dessa reversão EMT¹⁰¹. A interação funcional entre essas sinalizações pode resultar em uma ainda maior amplificação resultando assim na metástase¹⁰².

1.6.2 CSCs também atuam na invasividade e na metastatização do câncer

O conceito, mencionado em alguns detalhes já anteriormente¹⁰³⁻¹⁰⁵, das CSCs, foi descoberto primeiro em tumores líquidos (mieloma e leucemia) quando uma

pequena percentagem das células em câncer foi observada se proliferando rapidamente e de maneira vultosa, formando colônias¹⁰⁶. Atualmente as evidências estão se acumulando, e apóiam a visão de que cânceres são doenças dirigidas por uma subpopulação de CSCs, as quais já foram encontradas não apenas em tecido hematopoiético^{111,112}, mas também em tecidos sólidos incluindo os da mama¹⁰⁷, cérebro⁷⁶, cabeça e pescoço^{77,113,114}, cólon⁷⁵, pulmão¹¹⁵, próstata¹¹⁶⁻¹¹⁸ e ovariano¹¹⁹. CSCs têm a capacidade de se diferenciarem, de auto-renovação, adquirir resistência a drogas, ancorar-se independentemente e migrar^{108-110,120}. Elas podem gerar diversas células tumorais e sustentar sua própria subpopulação. Uma grande variedade de vias de sinalização é conhecida por sua capacidade de afetar esse estabelecimento, como BMP, IGF e TGF β , afetando assim sua capacidade de auto-renovação e diferenciação¹²¹. O método mais utilizado para identificar CSCs envolve a obtenção de células viáveis baseadas na sua expressão de marcadores de superfície, como CD10, CD24, CD44, CD133, Nestina, p63 e $\alpha 2\beta 1$ -integrina^{119,122,123}. CSCs também demonstraram o poder de iniciar e sustentar o crescimento do tumor primário, determinar a formação de colônias extra-tumorais, e estabelecer metástases em sítios distantes do original¹²⁴.

1.7 A relação entre EMT e CSCs

A associação de CSCs com EMT no câncer foram estabelecidas apenas recentemente, pois as similaridades nos dois campos foram notadas pelas suas capacidades de contribuírem para a recorrência tumoral, metástase e resistências à medicação. EMT já se confirmou como sendo parte crítica na metástase e

recorrência tumoral, as mesmas que demonstram ter íntima ligação com as funções atribuídas às CSCs¹²⁵⁻¹²⁸. Entretanto, o mecanismo molecular pelo qual células com EMT se transformam em células-tronco similares às normais ainda resta ser pesquisado.

Algumas evidências apontam para que células que estejam passando pelo processo EMT podem adquirir características de células-tronco quando estão atuando conjuntamente com células-tronco normais¹²⁹⁻¹³¹. Células em câncer epitelial de mama induzidas à EMT demonstraram ter similaridade com células-tronco mesenquimais, em seu perfil genético, diferenciação multidirecional e habilidade em migrar para feridas¹²⁵. Mani et al. encontraram que a indução da EMT em células mamárias epiteliais em câncer podem levar à aquisição de morfologia mesenquimal e à expressão de marcadores mesenquimais¹³², o que leva também ao aumento de uma subpopulação com marcadores de células-tronco; Já Gupta et al. estabeleceram que isto leva a um aumento em mais de 100 vezes na sua habilidade de formar mamosferas¹⁰², o que claramente demonstra sua diferença com as células com fenótipo epitelial, aumentando assim sua resistência aos medicamentos, já relacionados com as CSCs¹³³. Também já fora reportado que os fibroblastos associados ao câncer, quando induzidos à EMT no câncer de próstata, também super-expressaram o mesmo fenótipo, formando oncosferas e se auto-renovando¹³⁴. Isto sugere que células-tronco podem adotar um fenótipo mesenquimal sem perder sua pluripotência, e este status mesenquimal parece ser condição necessária para o restabelecimento pleno da sua pluripotência.

1.8 LL-37 e Câncer: Uma relação ainda não totalmente estabelecida

Os AMPs têm uma infinidade de funções que podem ser exploradas no diagnóstico e tratamento de doenças complexas. A transcrição gênica da região promotora de CAMP, responsável, no DNA humano, pela codificação de LL-37, é fortemente aumentada em queratinócitos humanos sob condições de cura de feridas epiteliais, provocando a clivagem e liberação de heparina ligada à membrana através do EGF, o que, por sua vez, estimula a re-epitelização¹³⁵⁻¹³⁷.

A expressão de AMPs é diminuída na dermatite atópica, levando ao aumento de infecções locais¹³⁸ em outras doenças dermatológicas, tais como a psoríase e a rosácea, suas propriedades pró-inflamatórias levam a outros efeitos deletérios¹³⁹. Estes exemplos mostram como os AMPs podem agir de forma indutora ou supressora.

Curiosamente, tem sido demonstrado que LL-37 também é capaz de se ligar a auto-DNA, e, conseqüentemente a TLR9¹⁴⁰, bem como a auto-RNA, e seus receptores TLR7 e TLR8¹⁴¹ podendo ser alvo terapêutico para doenças autoimunes; em vários momentos, conforme descrito anteriormente, o dano ao DNA pode ser paralisado pela interposição de moléculas que bloqueiem este mecanismo, e que, adicionalmente, possam ser detectadas por sensores intracelulares de forma a sinalizar o dano e causar reparo ao DNA danificado.

1.8.1 A presença ou ausência de LL-37 no microambiente tumoral tem impacto na progressão tumoral

LL-37 está diretamente envolvido no recrutamento de MSCs em alguns tumores, e aumentam a liberação de moléculas imunomoduladoras e pró-angiogênicas, como IL-6, IL-10, MMP-2 e VEGF, aumentando assim a invasividade e o crescimento tumoral; a super-expressão de LL-37 em células de câncer de mama promove o desenvolvimento de metástases em camundongos SCID¹⁴²; esse comportamento, mais agressivo, deve-se à sua interação com FPRL1¹⁴³.

LL-37, ademais, promove o crescimento tumoral em modelo de xenoenxerto de câncer de pulmão; camundongos CRAMP^{-/-} tiveram crescimento tumoral mais rápido do que os controles do tipo selvagem em dois modelos diferentes de xenoenxerto¹⁴⁴; células NK de camundongos catelicidina^{-/-} mostraram atividade citotóxica prejudicada em direção a alvos tumorais¹⁴⁵, reforçando assim a tese de que a ação anti-tumoral de LL-37 seja sítio-dependente.

Por outro lado, LL-37 é expresso em níveis muito baixos em tumores hiperplásicos gástricos, adenomas e adenocarcinomas tubulares¹⁴⁵ e regula negativamente o câncer no trato gastrointestinal.

Os AMPs têm sido propostos como agentes terapêuticos para o tratamento de câncer^{146,147}, e podem ter efeitos na biologia deste devido aos seus efeitos citotóxicos, bem como pelas suas funções imunomoduladoras, incluindo a modulação do processo de diferenciação e proliferação celular, angiogênese e inflamação, bem como atuar nos processos de dano e reparo do DNA. Tem sido postulado que muitos AMPs possuem atividade seletiva para membranas

microbianas. Contudo, LL-37 em concentrações elevadas pode ter efeito pronunciadamente citotóxico em células eucarióticas diversas às tumorais, como os linfócitos T, importantes na resposta imune ao câncer. Apesar disso, LL-37 e outros AMPs podem ter um papel importante no câncer^{148,149}.

Um dos pontos-chaves para tal ação se dá por causa da conformação estrutural que os resíduos catiônicos e hidrofóbicos e AMPs, incluindo LL-37, podem adotar, e essa conformação é crítica para sua atividade e seletividade¹³⁸.

Apesar do grande número de publicações que estão surgindo na literatura nos últimos tempos, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação dos peptídeos antimicrobianos no sistema imune. Muitos dos mecanismos propostos, além disso, carecem de comprovação genética e molecular sólida.

Dados do nosso grupo demonstraram que LL-37 transloca para o núcleo celular em neutrófilos de pacientes sépticos¹⁵⁰; propõe-se então que LL-37 também tenha atuação em diversas doenças graves, como o câncer.

Devido o exposto, o estudo de possíveis mecanismos desencadeados por LL-37 em células tumorais se torna extremamente importante, face aos desafios crescentes encontrados diante da terapia anticâncer e a possibilidade de atuar em uma faceta desta, com menor toxicidade ao paciente e maior eficiência no tratamento.

II Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar alterações genético-funcionais e seus desdobramentos em células tumorais com a supressão da expressão endógena de LL-37.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem de vários tipos celulares em câncer para a expressão gênica de LL-37;
- Nocautear, por meio de siRNA, a expressão do RNAm de LL-37;
- Analisar, por meio de PCR Array, as vias de sinalização de dano celular, nas células com e sem *knockdown*;
- Determinar diferenças gênicas entre as células com e sem *knockdown* de LL-37.
- Avaliar a eficiência na formação de oncosferas nos dois grupos já determinados.

III Material e Método

3.1 Tipos celulares

Este estudo utilizou os seguintes tipos celulares:

MCF7 – células de carcinoma invasivo ductal de mama humano, proveniente de uma mulher caucasiana de 69 anos;

SKBR3 – células de adenocarcinoma de mama humano, proveniente de sítio metastático (efusão pleural) de uma mulher caucasiana de 43 anos;

OVCAR3 – células de adenocarcinoma ovariano humano, proveniente de uma mulher caucasiana de 60 anos;

HT29 – células de adenocarcinoma colorretal humano, proveniente de uma mulher caucasiana de 44 anos;

A375 – células de melanoma maligno de pele humano, proveniente de uma mulher caucasiana de 54 anos;

SKMEL28 – célula de melanoma maligno de pele humano, proveniente de um homem caucasiano de 51 anos.

3.2 Cultura de células

Todos os tipos celulares supracitados foram cultivados obedecendo-se estritamente às recomendações da ATCC para cada tipo celular, em garrafas de cultura celular de 75mm³, a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Foram realizados subcultivos de acordo com o número necessário de células para o experimento a ser realizado.

3.3 Obtenção do RNA total

Após a cultura, 10⁶ células foram incubadas por poço em placas de 6 poços *overnight*, para realização dos experimentos. As células passaram por tratamento com *TRIzol* (Cat. # 15596-026, Life Technologies, EUA), seguido pelo método de extração de RNA total utilizando-se Clorofórmio – Isopropanol – Etanol, tratamento com DNase, e quantificação de RNA nas amostras através da medição da densidade ótica em 260nm em espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE, New Jersey, USA).

3.4 RT-PCR e PCR Convencional

Para avaliação da expressão gênica de LL-37 em linhagens de células tumorais, foi utilizado RT-PCR e PCR convencional para posterior validação do resultado. Todas as reações para o RT-PCR foram preparadas utilizando-se kits *Superscript Platinum III one-step* com *SYBR Green* incorporado (Cat. #11736-051,

Invitrogen, EUA). A produção de cDNA e a amplificação do DNA foi realizada no termociclador *StepOne* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA); os produtos de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Os *primers* usados foram:

- LL-37 *sense*: 5'-GCTAACCTCTACCGCCTCCT-3'
- LL-37 *reverse*: 5'-GGGTCACTGTCCCCATACAC-3'

A transcrição reversa foi realizada a 45°C por 30 minutos, 95°C por 5 minutos, e 5°C por 5 minutos. O PCR foi realizado nas seguintes condições: 95 °C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 1 minuto, por 35 ciclos.

3.4.1 Determinação quantitativa da expressão gênica de LL-37 nas amostras

Os níveis de fluorescência obtidos foram submetidos à quantificação relativa por normalização contra um gene de *housekeeping* (HPRT1) e expressos em unidades arbitrárias¹⁵¹.

3.5 Knockdown de LL-37 por siRNA

10⁵ células de dois tipos celulares selecionados foram incubadas por poço em placas de 6 poços *overnight*, visando a realização de *knockdown* com siRNA de LL-37. Cada 6 poços (n=6) formaram um grupo amostral, sendo subdivididos por tempo de incubação e concentração de siRNA de LL-37 (24 e 48hs, 1 e 10nM). Os tempos e concentrações ótimos para cada *knockdown* realizado foi determinado por análise

por RT-PCR, respeitando a verificação da diminuição da expressão do RNAm de LL-37 em cada grupo.

Estes foram divididos nos seguintes grupos:

- Controle (CTL), somente com o meio de cultura próprio para transfecção (OptiMEM, Life Technologies, EUA);
- Lipofectamina (Lipo), incubadas em OptiMEM e com adição do reagente *Lipofectamine RNAiMAX* (Life Technologies, EUA);
- Sequência de siRNA 1 (Seq. 1), (s2373, ThermoFisher, USA);
- Sequência de siRNA 2 (Seq. 2), (s2374, ThermoFisher, USA);
- Sequência de siRNA 3 (Seq. 3), (s2375, ThermoFisher, USA), todas incubadas em OptiMEM e *Lipofectamine RNAiMAX*;

Todas as sequências de siRNA utilizadas encontram-se listadas no site do fabricante, bem como os éxons afetados e a interposição *stopcodons* nas sequências.

- Sequência Negativa 1 (N1) (#4390843, ThermoFischer, USA);
- Sequência Negativa 2 (N2) (#4390846, ThermoFisher, USA); incubadas em OptiMEM, *Lipofectamine RNAiMAX*; elencadas no site do fabricante como sequências que não possuem alvo gênico elencado nas células;
- Sequência Positiva (P+) (#4390849, ThermoFisher, USA), incubada em OptiMEM, *Lipofectamine RNAiMAX*, sendo elencada como sequência que adentra a célula, que tem como alvo o gene GAPDH, um controle interno para a própria interferência no RNAm. Esta sequência encontra-se elencada no site do fabricante.

Todos estes experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.5.1 Validação do *Knockdown*

Após a realização do *Knockdown*, este necessita validação por RT-PCR, através do qual se verifica a diminuição da expressão de LL-37 pelos tipos celulares utilizados nos poços em que foram incubadas com sequências de siRNA, quando comparados ao grupo Lipofectamina. Para isto, é realizado RT-PCR nas amostras pós-*knockdown* e verificada a diminuição da expressão acima de 60% do gene alvo nas células.

3.6 PCR Array para DNA Damage

Dois grupos (*Knockdown* e Controle) de cada tipo celular estudado terão seu RNA total extraído com o kit RNAeasy *Mini Kit* (Cat. #74104, Qiagen, EUA) e serão submetidos a PCR Array utilizado o kit RT² *Profiler* qPCR DNA *Damage Signaling Pathway* (Cat. #330231, Qiagen, EUA), com 96 genes a serem pesquisados, conforme recomendações do fabricante. Os experimentos foram realizados em triplicata, e seus dados seguiram para análise através de ferramenta *online*, disponível no *website* do fabricante. Conforme a análise, pelo menos 3 dos 5 genes de *Housekeeping* de cada placa de *PCR Array* foram utilizados para normalização e análise final dos resultados, utilizando-se do método $\Delta\Delta$ -CT.

3.7 Formação de Oncosferas

Após o tratamento com o siRNA para nocautear o RNAm de LL-37, as células foram destacadas da placa e uma única suspensão foi obtida depois de passar estas células por agulhas de calibre 25 (25G). As células então foram cultivadas nos seus respectivos meios de cultura contendo suplemento B27 e rEGF, 100 ng/ml (Sigma Aldrich, Poole, UK; E-9644). Após 5 dias, o número de oncosferas formadas que foram maiores que 50µm em diâmetro foram contadas e a eficiência (%) na formação de oncosferas em relação aos controles (células sem *knockdown*) foi determinada.

3.8 Análise Estatística

Foram utilizados os testes de ANOVA, Mann-Whitney e t de *student*, de acordo com o experimento realizado.

IV Resultados

Preliminarmente, foram realizados experimentos para detecção do RNAm de LL-37 em vários tipos celulares, como forma de triagem para realização de futuros experimentos.

Figura 4. PCR Convencional para LL-37 dos tipos utilizados neste trabalho

O produto do PCR para LL-37, com o *primer* utilizado, é de 184pb, sendo que os tipos celulares OVCAR3, MCF7, A375 e SKBR3 apresentaram amplificação, e as células HT29 e SKMEL28 não apresentaram. Os tipos celulares A375 e SKBR3 foram os tipos selecionados dentre os disponíveis para realização dos próximos experimentos, pela facilidade de manutenção *in vitro*.

Após essa seleção, foi feita a padronização do *knockdown* do RNAm de LL-37 por siRNA nos tipos celulares selecionados, de forma que estes pudessem ser utilizados nos experimentos.

Gráfico 1. *Knockdown* de LL-37 mediado por siRNA, A375, 10nM, 48hs. (*), (#) e (\$) representam diferença estatisticamente relevante ($p \leq 0,05$)

Na padronização do referido *knockdown* no tipo celular A375, a concentração de siRNA de 10nM e o tempo de incubação de 48hs mostrou-se eficaz em todas as sequências de siRNA utilizadas, tendo sido a sequência 2 a de melhor resultado.

Gráfico 2. *Knockdown* de LL-37 mediado por siRNA, SKBR3, 1nM, 24hs. (*), (#) e (\$) representam diferença estatisticamente relevante ($p \leq 0,05$)

Na padronização do referido *knockdown* no tipo celular SKBR3, a concentração de siRNA de 1nM e o tempo de incubação de 24hs mostrou-se bastante eficaz em todas as sequências de siRNA utilizadas, tendo sido a sequência 2 a de melhor resultado.

No *PCR Array* para dano ao DNA, diversos RNAm ligados a *stemness* foram encontradas sub-expressos em SKBR3, porém em menor escala, também em A375.

Tabela 1. RNAm alterados pela indução do *knockdown* do RNAm de LL-37 em células SKBR3. Em negrito estão os que são correlacionados com *stemness*

Símbolo	Nome do gene (em inglês)	Fold Change	p-valor
ALPL	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	-1,838	0,026346
KAT2A	<i>K(lysine) acetyltransferase 2A</i>	-1,6337	0,008484
MYBL2	<i>V-mybmyeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2</i>	-1,6863	0,035958
OLIG2	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>	-1,7598	0,031648
LIN28A	<i>Lin-28 homolog A (C. elegans)</i>	-1,8108	0,036787
GDF3	<i>Growth differentiation factor 3</i>	-1,8402	0,014975
NES	<i>Nestin</i>	-1,8498	0,047692
COL2A1	<i>Collagen, type II, alpha 1</i>	-1,8903	0,012853
HNF4A	<i>Hepatocyte nuclear factor 4, alpha</i>	-1,9064	0,016682
TP53	<i>Tumor protein p53</i>	-1,9757	0,040021
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2 (basic)</i>	-2,0355	0,044985
SOX15	<i>SRY (sex determining region Y)-box 15</i>	-2,1014	0,02309
HAND1	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 1</i>	-2,1076	0,02039
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	-2,2468	0,018056
FOXD3	<i>Forkhead box D3</i>	-2,6502	0,03305
NAT1	<i>N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)</i>	-26,925	0,026202
HSPA9	<i>Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)</i>	-3,7997	0,020459
UTF1	<i>Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1</i>	-5,2139	0,048209
PARD6A	<i>Par-6 partitioning defective 6 homolog alpha (C. elegans)</i>	-14,2326	0,026805

Tabela 2. RNAm alterados pela indução do *knockdown* do RNAm de LL-37 em células A375. Em negrito, estão genes elencados como participantes de *stemness*

Símbolo	Nome do gene (em inglês)	Fold Change	p-valor
LIN28A	<i>Lin-28 homolog A (C. elegans)</i>	-1,5252	0
TCF3	<i>Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)</i>	-2,9868	0
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>	-1,7998	0,000007
CCNA2	<i>Cyclin A2</i>	-1,3786	0,000011
FOXA2	<i>Forkhead box A2</i>	-1,5997	0,000018
CD34	<i>CD34 molecule</i>	-1,3355	0,000025
BGLAP	<i>Bonegamma-carboxyglutamate (gla) protein</i>	-1,5147	0,000044
CDH2	<i>Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)</i>	-1,6844	0,000044
FABP7	<i>Fatty acid binding protein 7, brain</i>	-1,6157	0,000056
CCNE1	<i>Cyclin E1</i>	-1,472	0,000063
OLIG2	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>	-1,5713	0,000086
NCAM1	<i>Neural cell adhesion molecule 1</i>	-1,2164	0,00013
REST	<i>RE1-silencing transcription factor</i>	-1,3996	0,000231
TUBB3	<i>Tubulin, beta 3</i>	-1,4953	0,000248
CDC42	<i>Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)</i>	-1,5889	0,00025
KRT15	<i>Keratin 15</i>	-1,469	0,000278
GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>	-1,5547	0,000372
ALPL	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	-1,4816	0,000379
GDF3	<i>Growth differentiation factor 3</i>	-1,7102	0,000422
TBX3	<i>T-box 3</i>	-1,5775	0,000669
AICDA	<i>Activation-induced cytidine deaminase</i>	-1,3863	0,001057
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>	-1,2238	0,001949
KLF4	<i>Kruppel-like factor 4 (gut)</i>	-1,1139	0,00216
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2 (basic)</i>	-1,4219	0,002267
NAT1	<i>N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)</i>	-1,3888	0,002528
LEFTY2	<i>Left-right determination factor 2</i>	-1,3489	0,003161
MYCN	<i>V-mycmyelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)</i>	-1,1672	0,003271
HAND1	<i>Heart and neural crest derivatives expressed 1</i>	-1,2117	0,003824
ZFP42	<i>Zinc finger protein 42 homolog (mouse)</i>	-1,2421	0,004222
HSPA9	<i>Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin)</i>	-1,4029	0,005582
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>	-1,3626	0,005687
FGF4	<i>Fibroblast growth factor 4</i>	-1,1789	0,006383
NODAL	<i>Nodal homolog (mouse)</i>	-1,6944	0,0064
ALDH1A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1</i>	1,2544	0,007374
KAT2A	<i>K(lysine) acetyltransferase 2A</i>	-1,2006	0,007585
PAX6	<i>Paired box 6</i>	-1,1578	0,008689
DNMT3B	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta</i>	-1,2005	0,011056

continua

Símbolo	Nome do gene (em inglês)	continuação	
		Fold Change	p-valor
HNF4A	<i>Hepatocyte nuclear factor 4, alpha</i>	1,4146	0,011275
CDK1	<i>Cyclin-dependent kinase 1</i>	-1,1471	0,012381
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	-1,1761	0,015877
LEFTY1	<i>Left-right determination factor 1</i>	-1,226	0,015976
DPPA3	<i>Developmental pluripotency associated 2</i>	-1,3138	0,024156
NR5A2	<i>Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2</i>	-1,1412	0,026799
EP300	<i>E1A binding protein p300</i>	-1,3847	0,029084
KAT7	<i>K(lysine) acetyltransferase 7</i>	-1,967	0,029885
PARD6A	<i>Par-6 partitioning defective 6 homolog alpha (C. elegans)</i>	-1,2703	0,033506
POU5F1	<i>POU class 5 homeobox 1</i>	-1,1131	0,042862
ESRRB	<i>Estrogen-related receptor beta</i>	-1,2021	0,044154

Gráfico 3. Eficiência, em porcentagem, na formação de oncosferas na linhagem SKBR3, sem e com *knockdown* para o RNAm de LL-37

Gráfico 4. Eficiência, em porcentagem, na formação de oncosferas na linhagem A375, sem e com *knockdown* para o RNAm de LL-37

V Discussão

Em nosso início, nos perguntamos, a partir da hipótese de que LL-37 migra para o núcleo de neutrófilos em sepse, qual sua ação na transcrição gênica, não só nos neutrófilos, mas em outras células em situações adversas, como no câncer. Nossos achados, embora envidássemos vários esforços, todos contribuíam para que não houvesse ação alguma, embora na época houvesse poucos estudos envolvendo LL-37, a não ser por administração exógena, o que não nos pareceu convidativo. Conforme o tempo passou, foram surgindo mais e mais evidências, algumas sintéticas, através de peptídeos criados a partir de LL-37 e outras catelicidinas animais, outras através de estudos que demonstravam possíveis teorias do envolvimento de AMPs em geral na formação do câncer e no dano e reparo ao DNA. Foi a partir desse ponto que decidimos optar por estudar o que aconteceria na célula tumoral se deprivássemos sua expressão basal de LL-37.

Surpreendentemente, porém, sua atuação está muito mais ligada à invasividade, metastatização e proliferação do que achávamos¹⁵⁴. Nós já sabíamos que LL-37 estava envolvido nesses processos durante a infecção, mas não pensamos essa hipótese no câncer, uma vez que fomos guiados, pelas emergentes evidências e pelo senso de urgência em avaliar se haveria envolvimento de LL-37 no processo de dano e reparo ao DNA.

As células pesquisadas foram submetidas, tanto os controles como as mesmas com *knockdown* do RNAm de LL-37, a um PCR Array para *DNA Damage*. Notavelmente, entretanto, alguns dos RNAm que codificam proteínas que também

participam na formação de CSCs, na EMT e na sua reversão, são também encontrados no processo de dano ao DNA. O que mais nos chamou atenção foi que a grande maioria dos RNAm que tiveram expressão bastante diminuída estavam muito mais convenientemente ligados à formação de CSCs e à EMT do que os outros genes, o que denota a atuação de LL-37 não no processo de dano ao DNA, mas sim neste outro processo, qual seja o de *stemness*.

Devido a isto, passamos buscar a compreensão desses resultados, uma vez que eram absolutamente inesperados e, ressaltando teorias e alguns poucos estudos, novos na literatura.

A relação CSCs e EMT (e sua reversão) pode ser ligada ao *knockdown* do RNAm de LL-37 na linhagem SKBR3

Vários genes elencados na Tabela 1 representam essa afirmação, especialmente, *TERT*, o que representa a possibilidade do *knockdown* de LL-37 afetá-lo negativamente. Quando *TERT* é afetado negativamente, a chance de ativação de outros oncogenes é abortada, uma vez que *TERT* amplifica os efeitos das CSCs de atuarem como unidades autônomas (pois as mesmas extravasam dos tumores para formarem sítios metastáticos)^{152,153}.

Mais um dos RNAm elencados ligados a EMT, *PARD6A*, apresentou-se extremamente diminuído. *PARD6A* codifica uma proteína que participa não só da etapa de polarização da célula em câncer e na sua transição de mesenquimal para epitelial¹⁵⁵, como também participa na formação das *tight junctions*, o que desfavorece a reversão EMT, contendo assim a progressão tumoral¹⁵⁶. Resultados

que corroboram como estes estão também na diminuição da expressão gênica de outros marcadores como *HSPA9*, *NAT1*, *NES* e *UTF1*.

UTF1 aparece antes mesmo de *TERT*, uma vez que a dimensão de sua atuação se dá através de modificações na própria cromatina antes de sua ativação transcricional¹⁵⁶. Ainda com isso, *UTF1* é expresso em uma população restrita de células que podem se reprogramar, fazendo com que este também seja um bom marcador para a detecção precoce e efetiva de reprogramação celular¹⁵⁷.

NES codifica a Nestina, proteína bastante associada como marcadora para as CSCs^{158,159}. A expressão elevada de *NES* já foi encontrada em diversos tumores dos mais variados tipos, como pulmonar, prostático e pancreático¹⁶⁰. *In vivo*, *NES* é altamente expresso no adenocarcinoma pulmonar de pequenas células¹⁵⁹, sendo correlacionado com o tamanho tumoral, metástase para linfonodos regionais e prognóstico pobre. Nesse mesmo estudo, confirmou-se também sua elevada expressão em diversas outras linhagens tumorais pulmonares¹⁶⁰.

NAT1 codifica uma enzima bastante importante no processo de invasividade e proliferação consequentes da EMT e das CSCs, além do crescimento celular, em vários subtipos de cânceres de mama. Sua atividade está intrinsicamente ligada ao fato de ela desativar a ação de oncogenes relacionados a cada subtipo^{161,162}. Em MDA-MB-231, um desses subtipos, utilizando-se shRNA para silenciar a expressão de *NAT1*, demonstrou-se que ao tumor não só invadia menos, como também as células cresciam menos sem a expressão de *NAT1*¹⁶³.

FOXD3 codifica uma proteína fortemente ligada à supressão da tumorigenicidade no câncer de mama, e de sua agressividade. A depleção da

expressão de *FOXD3* altera significativamente as células de câncer de mama, promovendo proliferação e invasão *in vitro*¹⁶⁴. Adicionalmente, constata-se também que a sub-expressão de *FOXD3* promove um fenótipo parecido com o de EMT, suprimindo o tumor, sem no entanto transformá-lo a ponto de produzir mais CSCs¹⁶⁴.

HSPA9 codifica uma chaperona, e é intimamente ligada ao processo de EMT; é encontrada altamente expressa em vários tipos tumorais^{165,166}, estando conectada a vários eixos de sinalização que promovem a transição epitélio-mesenquimal¹⁶⁷. Além disso, em cânceres de mama, também promove um caráter mais agressivo, invasivo e migratório, ao promover o fenótipo CSC. Sua sub-expressão, através de shRNA ou por via medicamentosa, faz com que as células percam esse este fenótipo e o tumor seja suprimido¹⁶⁵.

Todos estes marcadores, tomados coletivamente, representam uma possível ligação entre o *knockdown* realizado com CSCs e EMT.

A relação CSCs e EMT (e sua reversão) também estão ligadas ao *knockdown* de LL-37 na linhagem A375, embora em menor escala.

Em menor escala e com diminuição menos pronunciada, encontramos também diferenças na expressão de vários RNAm que codificam proteínas ligadas diretamente às CSCs e EMT. Dentre os principais RNAm encontrados diminuídos está *TCF3*, cuja proteína que codifica participa ativamente no processo de diferenciação celular em células neuronais indiferenciadas, além de ser o principal componente do intrincado circuito que compõe as células-tronco¹⁶⁸. Este achado nos facilita entender o porquê da entrada em um estado bem mais latente das CSCs, conforme já inferido anteriormente, como também nos ajuda a entender a forma

como A375 se comporta durante o *knockdown*¹⁶⁹, praticamente revertendo-se à sua forma mais primária, a ponto de tentar se disfarçar como uma célula-tronco comum, para que possa viajar pela corrente sanguínea e encontrar um sítio favorável para metastatização.

Outros RNAm se comportaram de forma menos pronunciada, talvez devido a essa ação. RNAm como os de *RUNX1* e *RUNX2*, que codificam proteínas ligadas à reversão da EMT, também foram sub-expressos em relação aos controles; sua ligação estreita com a EMT e sua reversão^{170,171}, nos faz entender que ao tempo do experimento não era possível sua expressão tão arraigada, uma vez que estávamos face um processo ainda de EMT e formação de CSCs, principalmente latentes.

ALDH1A1, embora detectado menos pronunciado, é regulado pelo mesmo eixo β -catenina/TCF, o qual conduz a produção de complexos que regulam a adesão célula-célula¹⁷². Neste contexto, temos também a diminuição da expressão de *CDH2*, que é um RNAm que codifica uma caderina, importante no processo de salvaguarda do próprio *stemness*, sendo assim requisito para que estas CSCs possam completar sua reprogramação somática¹⁷³.

NODAL, que tem importante parte na EMT e na formação de *stemness*, também foi encontrado diminuído. Em experimentos com melanoma murino, foi possível saber que a proteína codificada por *NODAL*, responsável pela morfogênese embrionária¹⁷⁵, induz EMT importante nesse modelo animal quando super-expressa; a supressão de *NODAL* por siRNA diminui a EMT, mas não a bloqueia como todo, havendo ainda alguma atividade da EMT¹⁷⁴. Possivelmente há outros mecanismos que atuam nesse eixo além dos que *NODAL* pode modular. Algumas dessas vias

pode ser a resposta para o aumento na produção de oncosferas, independentemente do demonstrado; entretanto essa hipótese carece confirmação, pois ainda não há estudos que ligam a modulação de *NODAL* à eficiência na produção de oncosferas.

Células em câncer com *knockdown* para o RNAm de LL37 demonstram menor eficiência na produção de oncosferas na linhagem SKBR3 e aumento na linhagem A375.

Analizando a produção de vesículas extracelulares, denominadas oncosferas, como um dos pontos-chave de *stemness*, em células depletadas de LL-37, percebemos uma discrepância entre as linhagens celulares. Nossos resultados demonstraram que as células da linhagem SKBR3 com *knockdown* para LL-37 produziram um número de oncosferas menor quando comparadas com controles negativos; a linhagem A375, por sua vez, demonstrou um aumento na produção de oncosferas quando comparadas com seu controle negativo. Atribuímos isto aos fatos já descritos anteriormente, uma vez que SKBR3 estava em pleno processo de EMT e aumento na formação de CSCs, extravasando seu conteúdo tumorigênico. Ora, o processo de reprogramação celular ainda estava em curso ainda estava em curso plenamente ativo; por isso, quando suprimimos LL-37 nessa linhagem, diminuimos significativamente a produção de oncosferas, o que é indicativo de que este atua, de alguma forma, nesse processo.

Já em A375, onde encontramos panorama gênico diverso, onde temos uma expressão aumentada de oncosferas devido ao fato dos genes elencados serem, na sua maioria, ligados à formação de CSCs e à EMT, que já haviam acontecido. É

provável que à época do experimento, embora estivéssemos no tempo ótimo de supressão do RNAm de LL-37, fosse tarde para reverter todo o processo. Tal hipótese, obviamente, carece de maiores estudos, já que se trata de um melanoma com receptor estrogênico, epidemiologicamente importante quando se fala em câncer.

VI Conclusões

Coletivamente, nossos achados demonstram que há importância clara de LL-37 nos mecanismos de *stemness* e EMT. Seu *knockdown* demonstra, porém, diferentes resultados em diferentes tipos celulares. A eficiência na formação de oncosferas demonstrou-se diminuída na linhagem SKBR3, fato esperado devido ao comportamento gênico que esta teve em seu *knockdown*; por outro lado, a linhagem A375 demonstrou comportamento adverso, com aumento na eficiência da produção de oncosferas.

Em busca de uma maior compreensão dos dados, mais experimentos são necessários, inclusive utilizando bloqueios de vias de sinalização e quantificação das proteínas no sobrenadante das culturas. Esperamos que com esses achados, agora e no futuro, possamos contribuir cada vez mais para a compreensão dos mecanismos que levam LL-37 a interferir no câncer.

VII Anexo

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP

APROVAÇÃO

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **02.07.14**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **034/14** intitulado: "**Mecanismo de ação do peptídeo antimicrobiano LL-37 no núcleo celular em câncer**", apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica..**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Fabiano Pinheiro da Silva

Pesquisador (a) Executante: Guilherme Tude Coelho Neto

CEP-FMUSP, 02 de julho de 2014.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

VIII Referências

1. Lai Y, Gallo R. AMP'ed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*. 2009;30(3):131-141.
2. Ley R, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh P, Ramey R, Bircher J et al. Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*. 2008;320(5883):1647-1651.
3. Hill D, Artis D. Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 2010;28(1):623-667.
4. Porter E, Bevins C, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. 2002;59(1):156-170.
5. Wehkamp J, Salzman N, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras R et al. Reduced Paneth Cell α -Defensins and Antimicrobial Activity in Ileal Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2006;12:S20.
6. Ouellette A. Paneth cells and innate mucosal immunity. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2010;26(6):547-553.
7. Zanetti M, Gennaro R, Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Letters*. 1995;374(1):1-5.
8. Agerberth B, Gunne H, Odeberg J, Kogner P, Boman H, Gudmundsson G. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(1):195-199.
9. Cowland J, Johnsen A, Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Letters*. 1995;368(1):173-176.
10. Gudmundsson G, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The Human Gene FALL39 and Processing of the Cathelin Precursor to the

- Antibacterial Peptide LL-37 in Granulocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1996;238(2):325-332.
11. Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H et al. The Expression of the Gene Coding for the Antibacterial Peptide LL-37 Is Induced in Human Keratinocytes during Inflammatory Disorders. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(24):15258-15263.
 12. Gallo R, Murakami M, Ohtake T, Zaiou M. Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2002;110(6):823-831.
 13. Bals R, Wang X, Wu Z, Freeman T, Bafna V, Zasloff M et al. Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(5):874-880.
 14. AGERBERTH B, GRUNEWALD J, CASTAÑOS-VELEZ E, OLSSON B, JÖRNVALL H, WIGZELL H et al. Antibacterial Components in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Healthy Individuals and Sarcoidosis Patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1999;160(1):283-290.
 15. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infection and Immunity*. 1999;67:6084–6089.
 16. Ménard S, Förster V, Lotz M, Gütle D, Duerr C, Gallo R et al. Developmental switch of intestinal antimicrobial peptide expression. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(1):183-193.
 17. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner R et al. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature*. 2001;414(6862):454-457.
 18. Bowdish D, Davidson D, Speert D, Hancock R. The Human Cationic Peptide LL-37 Induces Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Kinase Pathways in Primary Human Monocytes. *The Journal of Immunology*. 2004;172(6):3758-3765.
 19. Kurosaka K, Chen Q, Yarovsky F, Oppenheim J, Yang D. Mouse Cathelin-Related Antimicrobial Peptide Chemoattracts Leukocytes Using Formyl Peptide Receptor-Like 1/Mouse Formyl Peptide Receptor-Like 2 as the Receptor and

- Acts as an Immune Adjuvant. *The Journal of Immunology*. 2005;174(10):6257-6265.
20. Tomasinsig L, Pizzirani C, Skerlavaj B, Pellegatti P, Gulinelli S, Tossi A et al. The Human Cathelicidin LL-37 Modulates the Activities of the P2X7 Receptor in a Structure-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(45):30471-30481.
21. Zhang Z, Cherryholmes G, Chang F, Rose D, Schraufstatter I, Shively J. Evidence that cathelicidin peptide LL-37 may act as a functional ligand for CXCR2 on human neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2009;39(11):3181-3194.
22. Braff M, Hawkins M, Nardo A, Lopez-Garcia B, Howell M, Wong C et al. Structure-Function Relationships among Human Cathelicidin Peptides: Dissociation of Antimicrobial Properties from Host Immunostimulatory Activities. *The Journal of Immunology*. 2005;174(7):4271-4278.
23. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y et al. Induction of Keratinocyte Migration via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor by the Antimicrobial Peptide LL-37. *The Journal of Immunology*. 2005;175(7):4662-4668.
24. Nagaoka I, Tamura H, Hirata M. An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *The Journal of Immunology*. 2006;176(5):3044-3052.
25. Pinheiro da Silva F, Gallo R, Nizet V. Differing effects of exogenous or endogenous cathelicidin on macrophage toll-like receptor signaling. *Immunology and Cell Biology*. 2009;87(6):496-500.
26. Scheel O, Papavlassopoulos M, Blunck R, Gebert A, Hartung T, Zahringer U et al. Cell Activation by Ligands of the Toll-Like Receptor and Interleukin-1 Receptor Family Depends on the Function of the Large-Conductance Potassium Channel MaxiK in Human Macrophages. *Infection and Immunity*. 2006;74(7):4354-4356.
27. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death and Differentiation*. 2007;14(9):1583-1589.

28. Arlehamn C, Petrilli V, Gross O, Tschopp J, Evans T. The Role of Potassium in Inflammasome Activation by Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(14):10508-10518.
29. Schaubert J, Dorschner R, Yamasaki K, Brouha B, Gallo R. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology*. 2006;118(4):509–519.
30. Liu P. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. *Science*. 2006;311(5768):1770-1773.
31. Oeppen J. DEMOGRAPHY: Enhanced: Broken Limits to Life Expectancy. *Science*. 2002;296(5570):1029-1031.
32. Siegel R, Miller K, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(1):7-30.
33. Brasil. Estimativa|2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2014.
34. Pecorino L. Molecular biology of cancer. 3rd ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 2012.
35. Alison M. The cancer handbook. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons; 2007.
36. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature*. 2001;411(6835):390-395.
37. Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. 2010;127(12):2893-2917.
38. Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69-90.
39. Craig N. Molecular biology. 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 2014.
40. Hanahan D, Weinberg R. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
41. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
42. Brzostek-Racine S, Gordon C, Van Scoy S, Reich N. The DNA Damage Response Induces IFN. *The Journal of Immunology*. 2011;187(10):5336-5345.

43. Žgur-Bertok D. DNA Damage Repair and Bacterial Pathogens. *PLoS Pathog.* 2013;9(11):e1003711.
44. Babu M, Beloglazova N, Flick R, Graham C, Skarina T, Nocek B et al. A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Molecular Microbiology.* 2010;79(2):484-502.
45. Kerur N, Veettil M, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P et al. IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Cell Host & Microbe.* 2011;9(5):363-375.
46. Aglipay J, Lee S, Okada S, Fujiuchi N, Ohtsuka T, Kwak J et al. A member of the Pyrin family, IFI16, is a novel BRCA1-associated protein involved in the p53-mediated apoptosis pathway. *Oncogene.* 2003;22(55):8931-8938.
47. Frontini M, Vijayakumar M, Garvin A, Clarke N. A ChIP-chip approach reveals a novel role for transcription factor IRF1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Research.* 2008;37(4):1073-1085.
48. Akira S, Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408(6813):740-745.
49. Yang Y, Lindahl T, Barnes D. Trex1 Exonuclease Degrades ssDNA to Prevent Chronic Checkpoint Activation and Autoimmune Disease. *Cell.* 2007;131(5):873-886.
50. Stetson D, Ko J, Heidmann T, Medzhitov R. Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. *Cell.* 2008;134(4):587-598.
51. Ishii K, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nature Immunology.* 2005;7(1):40-48.
52. Stetson D, Medzhitov R. Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response. *Immunity.* 2006;24(1):93-103.
53. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald K, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nature Immunology.* 2009;10(10):1065-1072.

54. Chiu Y, MacMillan J, Chen Z. RNA Polymerase III Detects Cytosolic DNA and Induces Type I Interferons through the RIG-I Pathway. *Cell*. 2009;138(3):576-591.
55. Sharma S, DeOliveira R, Kalantari P, Parroche P, Goutagny N, Jiang Z et al. Innate Immune Recognition of an AT-Rich Stem-Loop DNA Motif in the *Plasmodium falciparum* Genome. *Immunity*. 2011;35(2):194-207.
56. Paludan S, Bowie A. Immune Sensing of DNA. *Immunity*. 2013;38(5):870-880.
57. Garinis G, van der Horst G, Vijg J, H.J. Hoeijmakers J. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nature Cell Biology*. 2008;10(11):1241-1247.
58. Coppé J, Patil C, Rodier F, Sun Y, Muñoz D, Goldstein J et al. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*. 2008;6(12):e301.
59. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen B. Aging and proinflammatory cytokines. *Current Opinion in Hematology*. 2001;8(3):131-136.
60. Karakasilioti I, Kamileri I, Chatzinikolaou G, Kostas T, Vergadi E, Robinson A et al. DNA Damage Triggers a Chronic Autoinflammatory Response, Leading to Fat Depletion in NER Progeria. *Cell Metabolism*. 2013;18(3):403-415.
61. Rodier F, Coppé J, Patil C, Hoeijmakers W, Muñoz D, Raza S et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*. 2009;11(8):973-979.
62. Freund A, Patil C, Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO Journal*. 2011;30(8):1536-1548.
63. Grivennikov S, Greten F, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-899.
64. Gasser S. The DNA Damage Response Arouses the Immune System. *Cancer Research*. 2006;66(8):3959-3962.
65. Ermolaeva M, Segref A, Dakhovnik A, Ou H, Schneider J, Utermöhlen O et al. DNA damage in germ cells induces an innate immune response that triggers systemic stress resistance. *Nature*. 2013;501(7467):416-420.

66. Lohaus F, Linge A, Tinhofer I, Budach V, Gkika E, Stuschke M et al. HPV16 DNA status is a strong prognosticator of loco-regional control after postoperative radiochemotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma: Results from a multicentre explorative study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Radiotherapy and Oncology*. 2014;113(3):317-323.
67. Nowell, P.C. The clonal nature of neoplasia. *Cancer Cells*. 1989;1(1):29-30.
68. Marjanovic N, Weinberg R, Chaffer C. Cell Plasticity and Heterogeneity in Cancer. *Clinical Chemistry*. 2012;59(1):168-179.
69. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-28.
70. Burrell R, Swanton C. The evolution of the unstable cancer genome. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2014;24:61-67.
71. Burrell R, Swanton C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Molecular Oncology*. 2014;8(6):1095-1111.
72. Kaplan R, Riba R, Zacharoulis S, Bramley A, Vincent L, Costa C et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*. 2005;438(7069):820-827.
73. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-648.
74. Medema J. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nature Cell Biology*. 2013;15(4):338-344.
75. Ricci-Vitiani L, Lombardi D, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2006;445(7123):111-115.
76. Singh S, Hawkins C, Clarke I, Squire J, Bayani J, Hide T et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396-401.
77. Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, Morrison S, Clarke M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(7):3983-3988.
78. Shackleton M, Quintana E, Fearon E, Morrison S. Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. *Cell*. 2009;138(5):822-829.

79. Bonnet Dick J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. 1997;3(7):730-737.
80. Clarke M, Dick J, Dirks P, Eaves C, Jamieson C, Jones D et al. Cancer Stem Cells--Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Research*. 2006;66(19):9339-9344.
81. Ahmed N, Abubaker K, Findlay J. Ovarian cancer stem cells: Molecular concepts and relevance as therapeutic targets. *Molecular Aspects of Medicine*. 2014;39:110-15.
82. Meacham C, Morrison S. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013;501(7467):328-337.
83. Stewart J, Shaw P, Gedye C, Bernardini M, Neel B, Ailles L. Phenotypic heterogeneity and instability of human ovarian tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(16):6468-6473.
84. Kreso A, Dick J. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):275-291.
85. Quintana E, Shackleton M, Foster H, Fullen D, Sabel M, Johnson T et al. Phenotypic Heterogeneity among Tumorigenic Melanoma Cells from Patients that Is Reversible and Not Hierarchically Organized. *Cancer Cell*. 2010;18(5):510-523.
86. Quintana E, Shackleton M, Sabel M, Fullen D, Johnson T, Morrison S. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*. 2008;456(7222):593-598.
87. Kalluri R, Neilson E. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(12):1776-1784.
88. Kalluri R, Weinberg R. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(6):1420-1428.
89. Thiery J. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(6):442-454.
90. Bao S. Stem Cell-like Glioma Cells Promote Tumor Angiogenesis through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Research*. 2006;66(16):7843-7848.

91. Liu H, Zhang X, Li J, Sun B, Qian H, Yin Z. The biological and clinical importance of epithelial–mesenchymal transition in circulating tumor cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2014;141(2):189-201.
92. Shih J. Transcription Repressor Slug Promotes Carcinoma Invasion and Predicts Outcome of Patients with Lung Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(22):8070-8078.
93. Drake J, Strohbehn G, Bair T, Moreland J, Henry M. ZEB1 Enhances Transendothelial Migration and Represses the Epithelial Phenotype of Prostate Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2009;20(8):2207-2217.
94. Smit M, Geiger T, Song J, Gitelman I, Peeper D. A Twist-Snail Axis Critical for TrkB-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition-Like Transformation, Anoikis Resistance, and Metastasis. *Molecular and Cellular Biology*. 2009;29(13):3722-3737.
95. Stoletov K, Kato H, Zardouzian E, Kelber J, Yang J, Shattil S et al. Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. *Journal of Cell Science*. 2010;123(13):2332-2341.
96. Ocaña O, Córcoles R, Fabra Á, Moreno-Bueno G, Acloque H, Vega S et al. Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell*. 2012;22(6):709-724.
97. Mani S, Guo W, Liao M, Eaton E, Ayyanan A, Zhou A et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*. 2008;133(4):704-715.
98. Morel A, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of Breast Cancer Stem Cells through Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*. 2008;3(8):e2888.
99. Fan S, Tang Q, Lin Y, Chen W, Li J, Huang Z et al. A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oral Science*. 2011;3(4):180-191.
100. Thiery J, Sleeman J. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2006;7(2):131-142.
101. Wu Y, Zhou B. Inflammation: A driving force speeds cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2009;8(20):3267-3273.

102. Gupta P, Fillmore C, Jiang G, Shapira S, Tao K, Kuperwasser C et al. Stochastic State Transitions Give Rise to Phenotypic Equilibrium in Populations of Cancer Cells. *Cell*. 2011;146(6):1042.
103. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt E, Zabierowski S, Brafford P, Vultur A et al. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. *Cell*. 2010;141(4):583-594.
104. Sharma S, Lee D, Li B, Quinlan M, Takahashi F, Maheswaran S et al. A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell*. 2010;141(1):69-80.
105. Chaffer C, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli A, Wiggins P, Rodrigues L et al. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(19):7950-7955.
106. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):415–428.
107. Ye X, Tam WL, Shibue T, et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature*. 2015;525(7568):256–260.
108. Yang MH, Wu KJ. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development. *Cell Cycle*. 2008;7(14):2090–2096.
109. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst*. 1971;46(2):411–422.
110. Bruce WR, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature*. 1963;199(4888):79–80.
111. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730–737.
112. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645–648.
113. Ailles L, Prince M. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Methods Mol Biol*. 2009;568:175–193.

114. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973–978.
115. Eramo A, Lotti F, Sette G, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008;15(3):504–514.
116. Gu G, Yuan J, Wills M, Kasper S. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. *Cancer Res*. 2007;67(10):4807–4815.
117. Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007;67(3):1030–1037.
118. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007;1(3):313–323.
119. Zhang S, Balch C, Chan MW, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res*. 2008;68(11):4311–4320.
120. Maugeri-Saccà M, Vigneri P, De Maria R. Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clin Cancer Res*. 2011;17(15):4942–4947.
121. Wu KJ. Direct activation of Bmi1 by Twist1: implications in cancer stemness, epithelial-mesenchymal transition, and clinical significance. *Chang Gung Med J*. 2011;34(3):229–238.
122. Yadav AK, Sahasrabuddhe AA, Dimri M, Bommi PV, Sainger R, Dimri GP. Deletion analysis of BMI1 oncoprotein identifies its negative regulatory domain. *Mol Cancer*. 2010;9:158.
123. Biddle A, Liang X, Gammon L, et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res*. 2011;71(15):5317–5326.
124. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011;13(1):202.
125. Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704–715.

126. Zhi Y, Mou Z, Chen J, et al. B7H1 expression and epithelial- to- mesenchymal transition phenotypes on colorectal cancer stem-like cells. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135528.
127. Garg M. Urothelial cancer stem cells and epithelial plasticity: current concepts and therapeutic implications in bladder cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2015 Sep 2; Epub.
128. Chang YW, Su YJ, Hsiao M, et al. Diverse targets of β -catenin during the epithelial-mesenchymal transition define cancer stem cells and predict disease relapse. *Cancer Res*. 2015;75(16):3398–3410.
129. Radisky DC, LaBarge MA. Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype. *Cell Stem Cell*. 2008;2(6):511–512.
130. Scheel C, Weinberg RA. Phenotypic plasticity and epithelial-mesenchymal transitions in cancer and normal stem cells? *Int J Cancer*. 2011;129(10):2310–2314.
131. Battula VL, Evans KW, Hollier BG, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(8):1435–1445.
132. Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008;3(8):e2888.
133. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009;138(4):645–659.
134. Giannoni E, Bianchini F, Masieri L, Serni S, Torre E, Calorini L et al. Reciprocal Activation of Prostate Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts Stimulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stemness. *Cancer Research*. 2010;70(17):6945-6956.
135. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*. 2009;138(4):645–659.
136. Heilborn J, Nilsson M, Sørensen O, Ståhle-Bäckdahl M, Kratz G, Weber G et al. The Cathelicidin Anti-Microbial Peptide LL-37 is Involved in Re-Epithelialization of Human Skin Wounds and is Lacking in Chronic Ulcer Epithelium. *Journal of Investigative Dermatology*. 2003;120(3):379-389.

137. Tokumaru S, Sayama K, Shirakata Y, Komatsuzawa H, Ouhara K, Hanakawa Y et al. Induction of Keratinocyte Migration via Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor by the Antimicrobial Peptide LL-37. *The Journal of Immunology*. 2005;175(7):4662-4668.
138. Carretero M, Escámez M, García M, Duarte B, Holguín A, Retamosa L et al. In vitro and In vivo Wound Healing-Promoting Activities of Human Cathelicidin LL-37. *Journal of Investigative Dermatology*. 2008;128(1):223-236.
139. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415(6870):389-395.
140. Yamasaki K, Di Nardo A, Bardan A, Murakami M, Ohtake T, Coda A et al. Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nature Medicine*. 2007;13(8):975-980.
141. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y, Homey B et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*. 2007;449(7162):564-569.
142. Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;206(9):1983-1994.
143. Weber G, Chamorro C, Granath F, Liljegren A, Zreika S, Saidak Z et al. Human antimicrobial protein hCAP18/LL-37 promotes a metastatic phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2009;11(1):R6.
144. Coffelt S, Tomchuck S, Zwezdaryk K, Danka E, Scandurro A. Leucine Leucine-37 Uses Formyl Peptide Receptor-Like 1 to Activate Signal Transduction Pathways, Stimulate Oncogenic Gene Expression, and Enhance the Invasiveness of Ovarian Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*. 2009;7(6):907-915.
145. von Haussen J, Koczulla R, Shaykhiev R, Herr C, Pinkenburg O, Reimer D et al. The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2008;59(1):12-23.
146. Hase K, Murakami M, Imura M, Cole S, Horibe Y, Ohtake T et al. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2003;125(6):1613-1625.

147. Zhang L, Scott M, Yan H, Mayer L, Hancock R. Interaction of Polyphemusin I and Structural Analogs with Bacterial Membranes, Lipopolysaccharide, and Lipid Monolayers. *Biochemistry*. 2000;39(47):14504-14514.
148. Mader J, Hoskin D. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2006;15(8):933-946.
149. Bullard R, Gibson W, Bose S, Belgrave J, Eaddy A, Wright C et al. Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1: New insight into its potential role in cancer. *Molecular Immunology*. 2008;45(3):839-848.
150. Coffelt S, Scandurro A. Tumors Sound the Alarmin(s). *Cancer Research*. 2008;68(16):6482-6485.
151. Pinheiro da Silva F, Medeiros M, Santos Â, Ferreira M, Garippo A, Chammas R et al. Neutrophils LL-37 migrate to the nucleus during overwhelming infection. *Tissue and Cell*. 2013;45(5):318-320.
152. Wong M, Medrano J. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005;39(1):75-85.
153. Teralı K; Yilmazer A. New surprises from an old favourite: The emergence of telomerase as a key player in the regulation of cancer stemness. *Biochimie*. 2016;121:170-178.
154. Kim N, Piatyszek M, Prowse K, Harley C, West M, Ho P et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-2015.
155. Buchau A, Morizane S, Trowbridge J, Schaubert J, Kotol P, Bui J et al. The Host Defense Peptide Cathelicidin Is Required for NK Cell-Mediated Suppression of Tumor Growth. *The Journal of Immunology*. 2009;184(1):369-378.
156. Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene*. 2008;27(55):6958-6969.
157. Koche R, Smith Z, Adli M, Gu H, Ku M, Gnirke A et al. Reprogramming Factor Expression Initiates Widespread Targeted Chromatin Remodeling. *Cell Stem Cell*. 2011;8(1):96-105.
158. Buganim Y, Faddah D, Cheng A, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K et al. Single-Cell Expression Analyses during Cellular Reprogramming Reveal an Early Stochastic and a Late Hierarchic Phase. *Cell*. 2012;150(6):1209-1222.

159. Ishiwata T. Nestin in gastrointestinal and other cancers: Effects on cells and tumor angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2011;17(4):409.
160. Janikova M, Skarda J, Dziechciarkova M, Radova L, Chmelova J, Krejci V et al. Identification of cd133+/nestin+ putative cancer stem cells in non-small cell lung cancer. *Biomedical Papers*. 2010;154(4):321-326.
161. Perou C, Sørlie T, Eisen M, van de Rijn M, Jeffrey S, Rees C et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-752.
162. Narita K, Matsuda Y, Seike M, Naito Z, Gemma A, Ishiwata T. Abstract 4062: Nestin regulates proliferation, migration, invasion and stemness of lung adenocarcinoma. *Cancer Research*. 2014;74(19 Supplement):4062-4062.
163. Tiang J, Butcher N, Minchin R. Small molecule inhibition of arylamine N-acetyltransferase Type I inhibits proliferation and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;393(1):95-100.
164. Bhati R, Patterson C, Livasy C, Fan C, Ketelsen D, Hu Z et al. Molecular Characterization of Human Breast Tumor Vascular Cells. *The American Journal of Pathology*. 2008;172(5):1381-1390.
165. Wadhwa R, Takano S, Kaur K, Deocaris C, Pereira-Smith O, Reddel R et al. Upregulation of mortalin/mthsp70/Grp75 contributes to human carcinogenesis. *International Journal of Cancer*. 2006;118(12):2973-2980.
166. Chu T, Zhao H, Li Y, Chen A, Sun X, Ge J. FoxD3 deficiency promotes breast cancer progression by induction of epithelial–mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2014;446(2):580-584.
167. Na Y, Kaul S, Ryu J, Lee J, Ahn H, Kaul Z et al. Stress Chaperone Mortalin Contributes to Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Cancer Research*. 2016;76(9):2754-2765.
168. Cubillo E, Diaz-Lopez A, Cuevas E, Moreno-Bueno G, Peinado H, Montes A et al. E47 and Id1 Interplay in Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59948.
169. Lu W, Lee N, Kaul S, Lan F, Poon R, Wadhwa R et al. Mortalin–p53 interaction in cancer cells is stress dependent and constitutes a selective target for cancer therapy. *Cell Death and Differentiation*. 2011;18(6):1046-1056.

170. Cubillo E, Diaz-Lopez A, Cuevas E, Moreno-Bueno G, Peinado H, Montes A et al. E47 and Id1 Interplay in Epithelial-Mesenchymal Transition. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e59948.
171. Kuwahara A, Sakai H, Xu Y, Itoh Y, Hirabayashi Y, Gotoh Y. Tcf3 Represses Wnt- β -Catenin Signaling and Maintains Neural Stem Cell Population during Neocortical Development. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e94408.
172. Niu D, Kondo T, Nakazawa T, Oishi N, Kawasaki T, Mochizuki K et al. Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas. *Laboratory Investigation*. 2012;92(8):1181-1190.
173. Vasuri F, Resta L, Fittipaldi S, Malvi D, Pasquinelli G. RUNX-1 and CD44 as markers of resident stem cell derivation in undifferentiated intimal sarcoma of pulmonary artery. *Histopathology*. 2012;61(4):737-743.
174. Pieters T, van Roy F. Role of cell-cell adhesion complexes in embryonic stem cell biology. *Journal of Cell Science*. 2014;127(12):2603-2613.
175. Cojoc M, Peitzsch C, Kurth I, Trautmann F, Kunz-Schughart L, Telegeev G et al. Aldehyde Dehydrogenase Is Regulated by β -Catenin/TCF and Promotes Radioresistance in Prostate Cancer Progenitor Cells. *Cancer Research*. 2015;75(7):1482-1494.
176. Fang R, Zhang G, Guo Q, Ning F, Wang H, Cai S et al. Nodal promotes aggressive phenotype via Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition in murine melanoma. *Cancer Letters*. 2013;333(1):66-75.
177. Stefanidis K, Pergialiotis V, Christakis D, Loutradis D, Antsaklis A. Nodal, Nanog, DAZL and SMAD gene expression in human amniotic fluid stem cells. *Journal of Stem Cells*. 2013;8(1):17-23.
178. Chatzinikolaou G, Karakasilioti I, Garinis G. DNA damage and innate immunity: links and trade-offs. *Trends in Immunology*. 2014;35(9):429-435.